

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena ROŠKAR

**RAZVOJ ZAVIRALCEV PREBAVNIH GLIKOZIDAZ
IN DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena ROŠKAR

**RAZVOJ ZAVIRALCEV PREBAVNIH GLIKOZIDAZ IN
DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DEVELOPMENT OF DIGESTIVE GLYCOSIDASES AND
DIPEPTIDYL-PEPTIDASE 4 INHIBITORS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2017

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 41. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 3. 7. 2013 in 28. seje Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 14. 6. 2016 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje Biotehnologija. Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Mojca Lunder.

Raziskovalno delo je bilo opravljeno na Katedri za Farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mojca Narat
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Samo Kreft
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Irena Roškar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 577.15:616.379-008.64:615.322(043.3)
KG alfa-glukozidaza/alfa-amilaza/dipeptidil-peptidaza 4/inhibitor/bakteriofagni prikaz/peptidi/fenolne spojine/izvleček lesa bele jelke/izvleček lubja bele jelke/lignani
AV ROŠKAR, Irena, mag. farm.
SA LUNDER, Mojca (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, področje biotehnologije
LI 2017
IN RAZVOJ ZAVIRALCEV PREBAVNIH GLIKOZIDAZ IN DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4
TD Doktorska disertacija
OP XI, 90 str., 12 pregл., 14 sl., 182 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Postprandialno hiperglikemijo, pomemben faktor tveganja pri sladkorni bolezni tipa 2, uravnavamo z upočasnitvijo absorpcije glukoze v krvni obtok. To dosežemo tako z inhibicijo prebavnih glikozidaz, kakor dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4). Namen doktorske naloge je bil razviti zaviralce omenjenih encimov. V prvem delu naloge smo iz bakteriofagnih peptidno predstavitevnih knjižnic izolirali kratke peptide, ki so izkazovali afiniteto do alfa-glukozidaze ali DPP4. V prvem primeru smo kot tarčo uporabili podganjo črevesno maltazo glukoamilazo in v procesu 6 selekcij pridobili ciklični peptid, čigar sintezni analog je pri koncentraciji 1,2 mM signifikantno zaviral aktivnost tarčnega encima. V drugem primeru smo ciljali humani rekombinantni DPP4 in naredili 20 selekcij po 5 različnih protokolih. Izmed 78 peptidov, izraženih na fagih, noben ni izkazoval vezave na tarčni encim, dokazali pa smo vezavo nekaterih peptidov na protitelesa, ki smo jih uporabili v selekciji. V drugem delu naloge smo zaviralce obravnavanih encimov iskali v naboru naravnih fenolnih spojin in izvlečkih bele jelke (*Abies alba*). Ugotovili smo, da so alfa-glukozidazo in DPP4 najmočneje inhibirali flavonoidi, alfa-amilazo pa hidroksibenzojske kislina. Nordihidrograjaretinska kislina je zavirala delovanje vseh treh encimov. Vse tri encime sta inhibirala tudi oba izvlečka lesa in lubja bele jelke, najmočneje alfa-glukozidazo. Lignani, prisotni v izvlečku lesa bele jelke so izkazovali aktivnost predvsem na DPP4.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd
DC UDC 577.15:616.379-008.64:615.322(043.3)
CX alpha-glucosidase/alpha-amylase/dipeptidyl-peptidase 4/inhibitor/phage display/peptides/phenolic compounds/silver fir wood extract/silver fir bark extract/lignans
AU ROŠKAR, Irena
AA LUNDER, Mojca (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Field: Biotechnology
PY 2017
TI DEVELOPMENT OF DIGESTIVE GLYCOSIDASES AND DIPEPTIDYL-PEPTIDASE 4 INHIBITORS
DT Doctoral Dissertation
NO XI, 90 p., 12 tab., 14 fig., 182 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Postprandial hyperglycemia, an important risk factor in type 2 diabetes, is regulated by retarding the absorption of glucose. This is achieved either by inhibition of the gastro-intestinal glucosidases or dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4). The aim of the doctoral dissertation was to develop inhibitors of these enzymes. In the first part of the work, peptides with affinity for either one of these enzymes were selected from phage displayed libraries. First, rat intestinal maltase-glucoamylase was used as a target in six biopanning approaches and a cyclic peptide was selected, whose synthetic analog significantly inhibited the activity of the target enzyme in the concentration of 1.2 mM. Then 20 biopannings employing 5 different strategies were done by targeting human recombinant DPP4. Seventy eight different peptides displayed on phages were isolated, yet none of them showed the affinity for the target molecule. Some of the peptides were binding to specific selection-related antibodies. In the second part of the dissertation natural phenolic compounds and silver fir (*Abies alba*) extracts were analysed. We showed that alpha-glucosidase and DPP4 were inhibited most efficiently by flavonoids and alpha-amylase was best inhibited by hydroxybenzoic acids. Nordihydroguaiaretic acid inhibited activity of all three enzymes. All of them were also inhibited by both silver fir wood and bark extract, with best inhibitory activity to alpha-glucosidase. Lignans, present in silver fir wood extract, exhibited inhibitory activity mainly with DPP4.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA	1
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 DIABETES.....	4
2.1.1 Prebavne glikozidaze.....	5
2.1.1.1 Alfa-amilaza	6
2.1.1.2 Alfa-glukozidaza	7
2.1.1.2.1 Saharaza-izomaltaza.....	8
2.1.1.2.2 Maltaza-glukoamilaza	8
2.1.1.2.3 Inhibitorji alfa-glukozidaze	8
2.1.2 Dipeptidil-peptidaza 4.....	9
2.1.2.1 Inhibitorji dipeptidil-peptidaze 4.....	12
2.2 RAZVOJ NOVIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN	13
2.2.1 Peptidi kot zdravilne učinkovine	13
2.2.1.1 Razvoj peptidnih učinkovin	15
2.2.1.1.1 Bakteriofagna peptidno-predstavitevna knjižnica	17
2.2.2 Razvoj zdravil naravnega izvora	18
2.2.2.1 Fenolne spojine	20
2.2.2.2 Rastlinski izvlečki	21
2.2.2.2.1 Izvlečki iglavcev	22
3 MATERIAL IN METODE.....	24
3.1 MATERIAL	24
3.1.1 Laboratorijska oprema	24

3.1.2	Raztopine in gojišča	26
3.1.3	Bakteriofagne predstavitevne knjižnice	27
3.1.4	Protitelesa.....	28
3.1.5	Encimi.....	28
3.1.6	Sintezni peptidi	29
3.1.7	Spojine naravnega izvora	29
3.1.8	Rastlinski izvlečki.....	32
3.2	METODE	33
3.2.1	Peptidni zaviralci encimov, pridobljeni s selekcijo iz bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic	33
3.2.1.1	Selekcija peptidov na tarči maltaza-glukoamilaza	33
3.2.1.1.1	Izolacija encima alfa-glukozidaza iz oborine podganjega črevesa	33
3.2.1.1.2	Imobilizacija tarčne molekule	33
3.2.1.1.3	Afinitetna selekcija.....	34
3.2.1.1.4	Pomnoževanje in čiščenje eluiranih bakteriofagov	34
3.2.1.1.5	Določanje vezave izbranih bakteriofagnih klonov na tarčni protein.....	35
3.2.1.1.6	Sekvenciranje DNA.....	36
3.2.1.1.7	Določanje kompeticije bakteriofagov ter izbranih sinteznih peptidov ali kompetitivnih inhibitorjev za vezavo na tarčni protein.....	36
3.2.1.1.8	Encimski test s sinteznimi peptidi	36
3.2.1.2	Selekcija peptidov na tarči dipeptidil-peptidaza 4	37
3.2.1.2.1	Afinitetna selekcija.....	37
3.2.1.2.1.1	Protokol A	37
3.2.1.2.1.2	Protokol B	39
3.2.1.2.1.3	Protokol C	39
3.2.1.2.1.4	Protokol D	40
3.2.1.2.1.5	Protokol E.....	42
3.2.1.2.2	Pomnoževanje in čiščenje eluiranih bakteriofagov	43
3.2.1.2.3	Sekvenciranje DNA.....	43
3.2.1.2.4	Določanje vezave izbranih bakteriofagnih klonov na tarčni protein.....	43
3.2.1.2.5	Test encimske aktivnosti dipeptidil-peptidaze 4	44
3.2.2	Zaviralci encimov, pridobljeni z rešetanjem naravnih spojin ter analizo izvlečkov lesa in lubja bele jelke	44
3.2.2.1	Rešetanje nabora naravnih spojin.....	44

3.2.2.1.1	Test aktivnosti alfa-glukozidaze (EC 3.2.1.20).....	44
3.2.2.1.2	Test aktivnosti alfa-amilaze (EC 3.2.1.1).....	44
3.2.2.1.3	Test aktivnosti DPP4 (EC 3.4.14.5)	45
3.2.2.1.4	Analiza podatkov.....	45
3.2.2.2	Ocena aktivnosti izvlečkov lesa in lubja bele jelke.....	46
3.2.2.2.1	Test aktivnosti alfa-glukozidaze (EC 3.2.1.20).....	46
3.2.2.2.2	Test aktivnosti alfa-amilaze (EC 3.2.1.1).....	46
3.2.2.2.3	Test aktivnosti DPP4 (EC 3.4.14.5)	46
3.2.2.2.4	Analiza podatkov.....	46
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	47
4.1	PEPTIDNI ZAVIRALCI ENCIMOV, PRIDOBLJENI S SELEKCIJO IZ BAKTERIOFAGNIH PEPTIDNO-PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC	47
4.1.1	Selekcija peptidnih ligandov na tarči maltaza-glukoamilaza	47
4.1.2	Selekcija peptidnih ligandov na tarči DPP4	53
4.2	ZAVIRALCI ENCIMOV, PRIDOBLJENI IZ SNOVI NARAVNEGA IZVORA.....	63
4.2.1	Rešetanje nabora naravnih spojin	63
4.2.2	Ocena aktivnosti izvlečkov lesa in lubja bele jelke.....	68
5	SKLEPI	72
6	POVZETEK (SUMMARY).....	73
6.1	POVZETEK	73
6.2	SUMMARY	75
7	VIRI	77
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpomembnejše aparature.....	24
Preglednica 2: Laboratorijski pribor.....	24
Preglednica 3: Reagenti.....	25
Preglednica 4: Sestava raztopin.....	26
Preglednica 5: Sestava gojišč	27
Preglednica 6: Protitelesa.....	28
Preglednica 7: Seznam analiziranih spojin naravnega izvora po skupinah s strukturnimi formulami	29
Preglednica 8: Povzetek glavnih karakteristik posameznih selekcijskih protokolov, uporabljenih na tarčni molekuli DPP4.....	37
Preglednica 9: 21 peptidov, prikazanih na površini bakteriofagov iz treh različnih knjižnic.....	48
Preglednica 10: Peptidi, izraženi na bakteriofagih in izolirani po enem izmed petih uporabljenih protokolov na tarči DPP4.....	56
Preglednica 11: IC ₅₀ vrednosti testiranih naravnih spojin na encimih a) alfa-glukozidaza, b) alfa-amilaza in c) DPP4.....	64
Preglednica 12: Inhibicija alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in DPP4 s strani devetih lignanov iz izvlečka lesa bele jelke, v koncentraciji 1 mg/ml.....	70

KAZALO SLIK

Slika 1:	Dve človeški alfa-glukozidazi, maltaza-glukoamilaza (MGAM) in saharaza-izomaltaza (SI), zasidrani v membrani tankega črevesa.....	7
Slika 2:	Metabolizem in učinki GLP-1 v stanju po obroku.....	11
Slika 3:	Aminokislinsko zaporedje GIP in GLP-1 in mesto delovanja DPP4.....	12
Slika 4:	Shema selekcijskega postopka s knjižnico peptidov, izraženih na površini pIII nitastega bakteriofaga M13	18
Slika 5:	Vezava izbranih bakteriofagnih klonov na MGAM	49
Slika 6:	Specifičnost vezave 4 bakteriofagnih klonov na MGAM.....	49
Slika 7:	Vezava bakteriofagnih klonov na MGAM v prisotnosti sinteznih peptidov, enakih izraženim na površini fagov.	50
Slika 8:	Preostala encimska aktivnost MGAM v prisotnosti sinteznih peptidov v koncentraciji 1,2 mM.....	51
Slika 9:	Aktivnost encima DPP4, imobiliziranega na površino na različne načine.	54
Slika 10:	Izbrani kloni iz selekcij na DPP4.....	58
Slika 11:	Analiza bakteriofagnih klonov, izoliranih iz protokolov A in E, kjer je bila tarča imobilizirana na magnetne kroglice preko vezave na protitelesa proti polihistidinskemu repku.....	59
Slika 12:	Primerjava vezave bakteriofagnih klonov iz protokola E na protitelesa proti polihistidinskemu repku ter vezave na druga mišja protitelesa	61
Slika 13:	Inhibitorna aktivnost posameznih spojin za alfa-glukozidazo, alfa-amilazo in DPP4.....	67
Slika 14:	Delež encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije štirih analiziranih izvlečkov.....	69

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

4-MUG	4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid
Ab	protitelo
AK	aminokislina
BSA	goveji serumski albumin
c _{max}	maksimalna serumska koncentracija učinkovine
kDa	kilodalton
dH ₂ O	destilirana voda
DPP4	dipeptidil-peptidaza 4
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNSA	3,5-dinitrosalicilna kislina
EC	numerična klasifikacijska shema za encime (Enzyme Commission number)
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
ELISA	encimski imunski test na trdem nosilcu (enzyme-linked immunosorbent assay)
FDA	Agencija ZDA za hrano in zdravila
GCG	glukagon
GI	glikemični indeks
GIP	glukozno-odvisni inzulinotropni polipeptid (glucose-dependent insulinotropic polypeptide)
GLP-1	glukagonu podoben peptid 1 (glucagon-like peptide 1)
GP-AMC	Gly-Pro-7-amino-4-metilkumarin
GACP	dobra kmetijska in žetvena praksa (Good Agricultural and Collection Practice)
HbA _{1c}	glikirani hemoglobin
HRP	hrenova peroksidaza
HTS	rešetanje visoke zmogljivosti (high throughput screening)
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zavre 50 % aktivnosti encima
IDF	mednarodno združenje diabetikov (International Diabetes Federation)
IPTG	izopropiltio- β -D-galaktopiranozid
LB	Luria-Bertani gojišče
MGAM	maltaza-glukoamilaza
MTG	motena toleranca za glukozo
NIJZ	Nacionalni inštitut za javo zdravje
OD ₆₀₀	optična gostota, izmerjena pri valovni dolžini 600 nm
PBS	slani fosfatni pufer
PBST	slani fosfatni pufer s Tween [®] -om
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polimerase chain reaction)

PE	pomnoženi eluat
pfu	plakotvorna enota (plaque forming unit)
obr./min	obrati v minuti
SI	saharaza-izomaltaza
ST	sobna temperatura
ssDNA	enovijačna DNA (single stranded DNA)
T	temperatura
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organisation)
m/V %	masno volumski odstotek

Standardne okrajšave za aminokisline

Alanin	Ala	A	Levcin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lizin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Metionin	Met	M
Asparaginska kislina	Asp	D	Fenilalanin	Phe	F
Cistein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminska kislina	Glu	E	Treonin	Thr	T
Glicin	Gly	G	Triptofan	Trp	W
Histidin	His	H	Tirozin	Tyr	Y
Izolevcin	Ile	I	Valin	Val	V

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV RAZISKOVALNEGA PROBLEMA

Sladkorna bolezen tipa 2, za katero je značilna neodzivnost receptorjev na inzulin, je ena najbolj pogostih kroničnih bolezni na svetu in v večini razvitih držav med vodilnimi vzroki smrti. Še pred kratkim je bilo zdravljenje osredotočeno na koncentracijo glukoze v plazmi na tešče, kar pa po navadi ne zadošča za doseganje optimalne urejenosti glikemije. Epidemiološke raziskave kažejo močno povezanost med postprandialno hiperglikemijo, ki nastopi zaradi hitrega dviga koncentracije glukoze v krvi po obroku, ter pojavnostjo in napredovanjem zapletov bolezni. To postavlja postprandialne poraste glukoze v fokus terapevtskega pristopa pri uravnavanju diabetesa tipa 2 in prediabetičnih stanj (Ceriello, 2005; Smernice ..., 2007).

Eden od terapevtskih pristopov je upočasnitev prebave ogljikovih hidratov do enostavnih monosaharidov, ki se lahko absorbirajo v krvni obtok in povečajo koncentracijo glukoze v krvi. Na to lahko delujemo z inhibicijo vpletenih hidrolitičnih encimov v prebavnem traktu: alfa-amilaza v slini in pankreasu ter dva encima, maltaza-glukoamilaza ter saharaz-izomaltaza, iz družine alfa-glukozidaz v tankem črevesu. Zaviralci teh encimov upočasnijo absorpcijo sladkorjev iz prebavil in tako omejijo postprandialna zvečanja koncentracije glukoze v plazmi. Drugi način uravnavanja glukoze po obroku je z zaviralci dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4), encima, ki v črevesu razgrajuje pankreasne in črevesne hormone (inkretine). Le-ti imajo pomemben vpliv na izločanje inzulina in glukagona, na sitost in na praznjenje želodca. Če z inhibitorji DPP4 zavremo njihovo razgradnjo, se podaljša delovanje aktivne oblike hormona, kar ugodno vpliva na raven glukoze v krvi po hranjenju (Smernice ..., 2007; Waget in sod., 2011). Opisani encimi imajo pomembno vlogo pri terapiji sladkorne bolezni. V sklopu doktorskega dela smo jih izbrali kot tarče za razvoj novih aktivnih spojin, spojin vodnic, pri načrtovanju učinkovin z vplivom na koncentracijo sladkorja v krvi.

Eno izmed orodij pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin so kombinatorične peptidne knjižnice. Gre za obsežne zbirke strukturno sorodnih peptidov, ki nam v relativno kratkem času omogočajo sistematično proučevanje interakcij ciljne makromolekule. V primeru biološke knjižnice gre za zbirko strukturno sorodnih oligopeptidov, katerih genetski zapis je vključen v genom gostitelja in predstavljen na njegovi površini. Najbolj razširjena oblika so bakteriofagne predstavitevne knjižnice z do 10^{12} različnimi fagnimi kloni. Izbrana zaporedja DNA vstavijo na takšno lokacijo v genomu bakteriofaga, da se kodirani protein izraža na površini nitastega faga kot fuzijski produkt z enim od proteinov fagnega plašča. Z metodo bakteriofagnega prikaza izoliramo tiste, ki na svoji površini izražajo peptide z iskanimi strukturnimi lastnostmi. Na ta način pridobljeni peptidi so običajno relativno močni ligandi tarčnih proteinov.

Po drugi strani zdravilne rastline že tisočletja predstavljajo pomemben vir antidiabetičnih spojin. Študije o ugodnih učinkih rastlinskih učinkov na zdravje so v porastu in kažejo ugoden učinek določenih rastlinskih izvlečkov in posameznih naravnih spojin na kontrolo diabetesa. Ta učinek pripisujejo predvsem polifenolom in nizkomolekularnim fenolom v tradicionalno uporabljenih živilih in začimbah. Mehanizmi delovanja so različni in redko popolnoma pojasnjeni (Bahadoran in sod., 2013; El-Abhar in Schaalaa, 2014; Hanhineva in sod., 2010; Xiao in Hogger, 2015). Rešetanje takšnih spojin je eden od načinov za pridobivanje novih učinkovin in spojin vodnic.

Nabor različnih polifenolov z zanimivimi farmakološkimi lastnostmi je prisoten tudi v lubju nekaterih iglavcev. V tem pogledu je najbolj raziskano lubje obmorskega bora, ki ima že dokazane antioksidativne, antidiabetične in mnoge druge učinke (Liu in sod., 2004; Maimoona in sod., 2011). Bela jelka je ena najbolj razširjenih drevesnih vrst v centralni Evropi in izredno pomembna tudi v naših gozdovih. Njeno lubje in les vsebujejo številne nizkomolekularne polifenole, izvlečkom lubja pa so že dokazali antioksidativne in vazoprotективne učinke (Tavčar Benković in sod., 2014; Drevencsek in sod., 2015). Glede na številne raziskave izvlečkov bora pričakujemo podobno antidiabetično delovanje tudi pri izvlečku lesa bele jelke (Schäfer in Högger, 2007). V doktorskem delu smo izvedli raziskave, ki so dokazale *in vitro* delovanje izvlečkov lesa in lubja bele jelke na encime, vpletene v uravnavanje postprandialne hiperglikemije.

Namen doktorskega dela je bil odkriti nove peptidne ali naravne inhibitorje encimov, vpletene v patologijo diabetesa. Kot prvi cilj smo si zadali izolacijo niza peptidov iz bakteriofagno predstavitevkih knjižnic, ki bi izkazovali vezavno afiniteto do prebavne alfa-glikozidaze oziroma do dipeptidil-peptidaze 4. V nadaljevanju smo z encimskimi testi preizkušali biološko aktivnost izbranih sinteznih peptidov. Namen drugega dela študij pa je bil z rešetanjem individualnih spojin iz rastlinskih izvlečkov, ter rastlinskih izvlečkov kot celot, najti spojine oziroma izvlečke z inhibitornim delovanjem na prebavne glikozidaze oziroma DPP4.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

1. Predvidevamo, da se v bakteriofagnih predstavitevkih knjižnicah med okoli 10^{12} peptidi, predstavljenimi na površini bakteriofagov, nahajajo tudi takšni z afiniteto do prebavnih glikozidaz ter takšni z afiniteto do dipeptidil-peptidaze 4.
2. Pričakujemo, da bomo s primerjavo aminokislinskih zaporedij izbranih peptidov našli značilne aminokislinske motive, odgovorne za vezavo na tarčno molekulo.
3. Pričakujemo, da bodo afiniteto do tarčnih encimov izkazovali tudi sintezni analogi izbranih peptidov.

4. Predvidevamo, da bodo nekateri izmed izbranih sinteznih peptidov, ki bodo izkazovali afiniteto do tarčnih encimov, tudi zavirali encimsko aktivnost.
5. Pričakujemo, da bomo iz nabora naravnih fenolnih spojin določili takšne, ki inhibirajo prebavne glikozidaze in/ali dipeptidil-peptidazo 4.
6. Pričakujemo, da bosta tudi izvlečka lesa in lubja bele jelke inhibirala prebavne glikozidaze in/ali dipeptidil-peptidazo 4.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DIABETES

Diabetes mellitus je ena najbolj pogostih kroničnih bolezni na svetu in v večini razvitih držav med vodilnimi vzroki smrti. Po ocenah mednarodnega združenja diabetikov (IDF - International Diabetes Federation) je na svetu že 415 milijonov bolnikov z diabetesom, do leta 2040 pa naj bi število zrastlo do 642 milijonov. Najpogostejsa oblika diabetesa je sladkorna bolezen tipa 2, ki v razvitih državah med odraslimi bolniki predstavlja približno 91 % vsega diabetesa, njena prevalenca pa raste skupaj s kulturnimi in socialnimi razmerami v družbi (IDF Diabetes Atlas, 2015). Po podatkih Nacionalnega inštituta za javno zdravje je bilo leta 2014 v Sloveniji 104.550 zdravljenih bolnikov s sladkorno boleznijo, število prejemnikov zdravil za sladkorno bolezen pa se vsako leto poveča za 3 % oz. za približno 2.500 oseb (NIJZ, 2015).

Sladkorna bolezen tipa 2 je metabolna motnja, za katero sta značilna spremenjeno izločanje inzulina in zmanjšana občutljivost receptorjev za inzulin, kar se biokemijsko izraža kot ne uravnan nivo glukoze v krvi na tešče in/ali po obroku. Bolezen je progresivna in se razvije iz predhodnega obdobja rezistence na inzulin in motene tolerance za glukozo (MTG), ki sta običajno povezana s predhodno debelostjo in genetsko dovzetnostjo posameznika (Johnson in sod., 2002). Začetno primarno neodzivnost tarčnih tkiv na inzulin organizem nekaj časa kompenzira preko povečane aktivnosti trebušne slinavke. To se kaže kot povečano izločanje inzulina iz funkcionalnih β -celic Langerhansovih otočkov. Povečana obremenitev pankreasa v kombinaciji s toksičnimi učinki hiperglikemije (glukotoksičnost) in povečano ravnijo prostih maščobnih kislin (lipotoksičnost), privede do progresivnega upada funkcije β -celic, zaradi česar se urejenost glikemije sčasoma slabša. Ta razvoj običajno traja od 9 do 12 let (Del Prato, 2009; Nyenwe in sod., 2011; Skliros in sod., 2016).

Še pred kratkim je bilo zdravljenje osredotočeno predvsem na uravnavanje vrednosti HbA_{1c} z močnim poudarkom na koncentraciji glukoze v plazmi na tešče. Čeprav je urejanje hiperglikemije na tešče potrebno, po navadi ne zadošča za doseganje optimalne urejenosti glikemije. Vse več je dokazov, da je za doseganje ciljnih vrednosti HbA_{1c} enako ali morda še bolj pomembno uravnavanje postprandialnih porastov koncentracij glukoze. Epidemiološke raziskave kažejo močno povezanost med postprandialno hiperglikemijo ter srčno-žilnim tveganjem in izidi. Poleg tega narašča število dokazov o vzročni povezanosti postprandialne hiperglikemije in oksidativnega stresa, debeline karotidne intime medije in disfunkcije endotelija, ki so vsi znani označevalci srčno-žilne bolezni. Postprandialna hiperglikemija je prav tako povezana z retinopatijo, kognitivno disfunkcijo pri starejših osebah in z nekaterimi vrstami raka. Vse to postprandialne poraste glukoze postavlja v fokus terapevtskega pristopa pri uravnavanju diabetesa tipa 2 in prediabetičnih stanj (Ceriello, 2005; Smernice ..., 2007).

Postprandialna hiperglikemija nastopi zaradi hitrega dviga koncentracije glukoze v krvi po obroku. Glikemični indeks (GI) je metoda razvrščanja živil z ogljikovimi hidrati s primerjavo glikemičnih učinkov (izraženih kot postprandialno povečanje površine pod krivuljo) mase ogljikovih hidratov v posameznih živilih. Glikemična obremenitev je uporabljena kot ocena napovedi postprandialne glikemije in potrebe po inzulinu. Potrjeno je, da glikemični indeks in glikemična obremenitev posameznih živil zanesljivo napovesta relativno rangiranje postprandialnega odziva glukoze in inzulina na mešane obroke (Smernice ..., 2007). Znano je, da se hranilne snovi iz živil z nižjim glikemičnim indeksom (stročnice, testenine, nekatere vrste sadja) počasneje absorbirajo iz gastrointestinalnega trakta v organizem in tako upočasnijo dvig postprandialne glukoze in sproščanja inzulina, kar dokazano zmanjša tveganje za diabetes tipa 2 ter kardiovaskularne bolezni (Sheard in sod., 2004).

Poleg izbire pravilne prehrane postprandialno glukozo uravnavamo tudi farmakoterapevtsko. Številna zdravila izboljšajo celotno urejenost glikemije, vključno s koncentracijo postprandialne glukoze v plazmi, medtem ko je nekaj farmakoterapij specifično usmerjenih na postprandialno koncentracijo glukoze v plazmi. Na to lahko delujemo z zaviranjem vpletenih hidrolizirajočih encimov v prebavnem traktu (Smernice ..., 2007).

Eden od terapevtskih pristopov je upočasnitev prebave ogljikovih hidratov do enostavnih monosaharidov, ki se lahko absorbirajo v jetrni krvni obtok in povečajo koncentracijo glukoze v krvi (Chiba, 1997). Encimi, ki so vpleteni v hidrolizo škroba in ostalih polisaharidov, so alfa-amilaza (EC 3.2.1.1) v slini in pankreasu ter dva encima iz družine alfa-glukozidaz, vsak z dvema podenotama, v tankem črevesu: maltaza-glukoamilaza (EC 3.2.1.20 in EC 3.2.1.3) ter saharaza-izomaltaza (EC 3.2.1.48 in EC 3.2.1.10) (Dhital in sod., 2013; Sim in sod., 2008). Zaviralci teh encimov upočasnijo absorpcijo sladkorjev iz prebavil in tako omejijo postprandialna zvečanja koncentracije glukoze v plazmi. Drugi način uravnavanja glukoze po obroku je z zaviralcji dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4) (EC 3.4.14.5), ki v črevesu razgrajuje pankreasne in črevesne hormone (inkretine). Le-ti imajo pomemben vpliv na izločanje inzulina in glukagona, sitost in praznjenje želodca. Če z inhibitorji DPP4 zavremo njihovo razgradnjo, se podaljša delovanje aktivne oblike hormona, kar ugodno vpliva na raven glukoze v krvi po hranjenju (Duez in sod., 2012; Waget in sod., 2011). V sklopu doktorskega dela smo opisane encime izbrali kot tarče za razvoj novih učinkovin z vplivom na koncentracijo sladkorja v krvi.

2.1.1 Prebavne glikozidaze

Pri ljudeh je za popolno razgradnjo škroba do glukoze potrebno skupaj šest prebavnih glikozidaz. Dve sorodni alfa-amilazi – v slini in pankreasu – sta endohidrolazi, ki cepita notranje α -1,4 vezi amiloze in amilopektina, pri čemer so produkt krajsi linearni ali razvezani oligomeri glukoze, imenovani dekstrini. Zmes dekstrinov nato v lumnu črevesa naprej

hidrolizirata dve membranski eksohidrolazi, vsaka z dvema katalitičnima enotama: maltaza-glukoamilaza (MGAM) in saharaza-izomaltaza (SI). Glukoza, ki se ob tem sprošča iz dekstrinov, se iz črevesa absorbira v krvni obtok (Jones in sod., 1983; Quezada-Calvillo in sod., 2007; Sim in sod., 2008). Vseh 6 encimov spada v razred glikozidnih hidrolaz, ki cepijo glikozidne vezi med slatkornimi enotami, eno izmed kinetično najobstojnejših vezi v naravnih polimerih. Glikozidna vez se na ta način cepi 10^{17} -krat hitreje kot pri nekatalizirani reakciji (Yip in Withers, 2004).

2.1.1.1 Alfa-amilaza

Alfa-amilaza (EC 3.2.1.1) je encim, ki hidrolizira notranje α -1,4 vezi amiloze in amilopektina, ne pa tudi α -1,6 vezi amilopektina. Je eden glavnih sekretornih produktov pankreasa (okrog 5-6 %) in žlez slinavk (Whitcomb in Lowe, 2007).

Človeška alfa-amilaza je klasični kalcij vsebujoči encim. Zgrajena je iz 512 aminokislin v enojni oligosaharidni verigi z molekulsko maso 57,6 kDa (Whitcomb in Lowe, 2007). Na kromosому 1, na lokaciji 1q21, je 5 genov za alfa-amilazo. Trije kodirajo alfa-amilazo v slini, *AMY1A*, *AMY1B* in *AMY1C*, medtem ko sta dva gena, *AMY2A* in *AMY2B*, izražena v pankreasu (Groot in sod., 1988). Pri ljudeh je med obema alfa-amilazama velika stopnja podobnosti v aminokislinskem zaporedju – v celotnem proteinu je enakih 97 % aminokislin, v sami katalitični domeni pa 92 % (Brayer in sod., 1995).

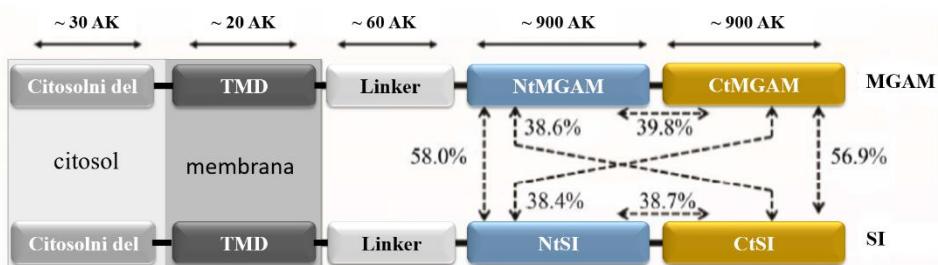
Znano je, da akarboza, registrirani inhibitor alfa-glukozidaze, inhibira tudi alfa-amilazo. Ren in sod. (2011) so primerjali inhibicijo pankreasne alfa-amilaze in MGAM z različnimi registriranimi in novimi potencialnimi inhibitorji. Ugotovili so, da ima alfa-amilaza jasno preferenco do inhibitorjev z daljšo slatkorno verigo, medtem ko MGAM (predvsem N-končno domeno) bolje inhibirajo manjši inhibitorji, kot sta vogliboza in miglitol. Iz tega so sklepali, da je žep z aktivnim mestom NtMGAM relativno majhen, medtem ko so aktivna mesta alfa-amilaze in CtMGAM večja. Oboje je v skladu z dokazanimi strukturami encimov (Qin in sod., 2011; Sim in sod., 2008).

Inhibitorji alfa-amilaze ne predstavljajo svoje skupine v ATC klasifikacijskem sistemu zdravil, se pa veliko uporabljajo v tradicionalni medicini. Etnofarmakološko presejanje zdravilnih rastlin je privedlo do velikega števila raziskav, ki so identificirale mnoge naravne inhibitorje alfa-amilaze. Ta mehanizem so dokazali za mnoge zdravilne rastline, tradicionalno uporabljane v terapiji diabetesa (Ali in sod., 2006; Funke in Melzig, 2006; Sales in sod., 2012), kakor tudi za posamezne spojine, prisotne v njih (Sales in sod., 2012; Tadera in sod., 2006; Xiao in sod., 2011).

2.1.1.2 Alfa-glukozidaza

Alfa-glukozidazno aktivnost imata dva, na membrano vezana encima v tankem črevesu: maltaza-glukoamilaza (MGAM) in saharaza-izomaltaza (SI). Vsak od njiju je sestavljen iz dveh katalitičnih domen: N-končne, membranske domene (NtMGAM in NtSI) ter C-končne, luminalne domene (CtMGAM in CtSI). Encima sta zasidrana v celice epitelne membrane tankega črevesa preko O-glikoziliranega dela, ki izhaja iz N-končne domene (slika 1). Zaradi evolucije encimov iz skupnega prekursorja gena sta si med seboj bolj podobni N-končni domeni MGAM in SI ter C-končni domeni MGAM in SI (okrog 60 % sekvene), kot N- in C-končni domeni posameznih encimov (okrog 40 % sekvene) (Sim in sod., 2010).

Vse 4 domene izkazujejo eksoglukozidazno aktivnost in cepijo α -1,4 vezji na nereducirajočem koncu oligosaharidov, s čimer progresivno odcepljajo monomere glukoze. Izkazujejo različne preference do malto-oligosaharidov različnih dolžin (Quezada-Calvillo in sod., 2008). NtSI in CtSI posedujeta še dodatno aktivnost: NtSI za α -1,6 vezji škroba in izomaltoze, CtSI pa za α -1,2 vezji saharoze (Gray in sod, 1979). Glede na to, da je škrob prevladujoča komponenta človeške prehrane, pa predstavljajo tudi glavni substrat SI oligomeri glukoze, povezani z α -1,4 vezjo. SI je v črevesu prisotne več, MGAM pa to kompenzira z višjo hidrolitično aktivnostjo (Robayo-Torres in sod., 2006).



Slika 1: Dve človeški alfa-glukozidazi, maltaza-glukoamilaza (MGAM) in saharaza-izomaltaza (SI), zasidrani v membrani tankega črevesa. Zgrajeni sta iz kratke citosolne domene, transmembranske domene (TMD), O-glikoziliranega povezovalnega peptida (linker) in dveh homolognih katalitičnih enot. Procenti prikazujejo homologijo aminokislinskih zaporedij med dvema domenama (prijejeno po Nakamura in sod. 2012; Sim in sod., 2008).

Figure 1. Two kinds of human alpha-glucosidase, maltase-glucoamylase (MGAM) and sucrase-isomaltase (SI), located on intestinal brush border membrane. Features of MGAM and SI include: a small cytosolic domain, a transmembrane domain (TMD), an O-glycosilated linker and two homologous catalytic subunits. Percentage values show the amino acid sequence homology between the two domains (adapted from Nakamura et al., 2012; Sim et al., 2008).

2.1.1.2.1 Saharaza-izomaltaza

SI predstavlja 10 % proteinov epitelne membrane črevesa. Nahaja se po vsej dolžini tankega črevesa, z največjo aktivnostjo na sredini. Majhne količine SI so lahko tudi v debelem črevesu (Asp in sod., 1975; Van Beers in sod., 1995).

Gen za SI se nahaja na tretjem kromosому (3q26) in kodira okrog 210 kDa protein. SI se sintetizira kot enojni polipeptid v velikosti približno 240-260 kDa, ki je glikoziliran z N- in O-povezanimi sladkorji. Po glikozilaciji se encim transportira in vstavi v apikalno membrano enterocitov, kjer ga procesirajo ekstracelularne pankreasne proteaze. Tako nastaneta prosta CtSI in membransko vezana NtSI podenota, ki sta sicer proteolitično ločeni, vendar ostaneta povezani z nekovalentnimi povezavami (Moolenaar in Naim, 1995; Shapiro in sod., 1991; West in sod., 1988).

In vivo prispeva SI 80 % celotne membranske maltazne (1,4-O- α -D-glukanohidrolazne) aktivnosti, vso saharazno (D-glukopiranozil- β -D-fruktohidrolazno) aktivnost ter skoraj vso izomaltazno (1,6-O- α -D-glukanohidrolazno) aktivnost (Nichols in sod., 2003).

2.1.1.2.2 Maltaza-glukoamilaza

MGAM je manj zastopana kot SI in v črevesni epitelni membrani predstavlja 2 % vseh proteinov. Razporejena je po celotni dolžini tankega črevesa, njena aktivnost pa z oddaljenostjo raste in je največja v distalnem ileumu. Nahaja se tudi v epiteliju ledvic, ni pa prisotna v debelem črevesu, kot SI (Asp in sod., 1975; Van Beers in sod., 1995).

Gen za MGAM se nahaja na 7. kromosomu in kodira protein s predvideno velikostjo 210 kDa (Nichols in sod., 2003; Nichols in sod., 1998). Med procesom zorenja je protein MGAM veliko bolj glikoziliran kot SI, zaradi česar ima molekulsko maso okrog 335 kDa. Za razliko od SI, MGAM ni proteolitično procesiran, zato C- in N-končni domeni MGAM ostaneta združeni, MGAM pa deluje kot enojna polipeptidna veriga. Predvidevajo, da je to posledica močne glikozilirnosti, ki protein varuje pred encimsko proteolizo (Naim in sod., 1988).

Na MGAM so naredili manj kinetičnih študij kot na SI. MGAM poseduje vso membransko glukoamilazno (1,4-O- α -D-glukanohidrolazno) aktivnost za substrate amilozo in amilopektin, poleg tega pa še 1 % izomaltazne aktivnosti in 20 % maltazne aktivnosti (Nichols in sod., 2003).

2.1.1.2.3 Inhibitorji alfa-glukozidaze

V idealnem primeru naj bi se inhibitor alfa-glukozidaze vezal na vse 4 domene, da bi kar najbolj učinkovito inhibiral hidrolizo oligosaharidov (Nakamura in sod., 2012; Sim in sod., 2008). V praksi je to težko doseči, saj imajo encimi različno selektivnost do substratov in aktivna mesta z različnimi specifikami.

Da inhibitorji intestinalne alfa-glukozidaze izboljšajo postprandialno glikemijo, je bilo dokazano že v 1970-tih letih, v 1990-tih pa so prišla na trg prva zdravila v tem razredu peroralnih antidiabetikov (Hakamata in sod., 2009). Kot prvo so odobrili za uporabo v humani medicini akarbozo, kmalu nato sta na nekaterih trgih sledila še miglitol in vogliboza (Asano, 2003).

V več študijah so dokazali, da akarboza primarno inhibira alfa-amilazo ter v manjši meri tudi nekatere druge encimske aktivnosti v črevesu, predvsem C-končne domene MGAM in SI, medtem ko na N-končnih domenah izkazuje šibkejše delovanje (Quezada-Calvillo in sod., 2008; Rossi in sod., 2006). Miglitol in vogliboza po drugi strani, zaradi manjše velikosti, preferenčno inhibirata intestinalne glukozidaze (Bischoff, 1994; Ren in sod., 2011). Dodatna razlika med miglitolom in akarbozo je, da se miglitol skoraj popolnoma absorbira iz črevesa in ima posledično poleg lokalnega delovanja tudi sistemski učinke (Asano, 2003). Kljub različnim preferencam do tarčnih encimov ter mesta delovanja, pa je klinični efekt miglitola in vogliboze primerljiv z učinkom akarboze (Chehade in Mooradian, 2000).

Akarboza je najbolj uporabljan inhibitor alfa-glukozidaze in edini trenutno prisoten na slovenskem trgu. Njene učinke so potrdili v meta analizi sedmih kliničnih študij, ki so vsebovale placebo kontrolno skupino (skupaj 2180 bolnikov – 1248 jih je jemalo akarbozo, 932 pa placebo). Pri bolnikih z razvito sladkorno bolezni jo tipa 2, ki so se zdravili z akarbozo, se je tudi tveganje za pojav kardiovaskularnih dogodkov zmanjšalo za 24 %, tveganje za pojav srčnega infarkta pa za 64 %. Obe spremembi sta bili statistično značilni (Bayer, 2010).

Med stranskimi učinki prevladujejo gastrointestinalni učinki. V primeru Glucobaya® (Bayer) se je flatulanca pojavila bolj pogosto kot pri vsakem desetem uporabniku. Pogoste (med 1/10 in 1/100 pacientov) so bile diareja in bolečine v trebuhi, občasno (med 1/100 in 1/1000 pacientov) pa so se pojavili navzea, bruhanje in dispepsija (Bayer, 2010). Predvideva se, da do teh učinkov pride zaradi povečane obremenitve z nerazgrajenim škrobom, ki ga posledično procesirajo in fermentirajo bakterije v debelem črevesu (Krentz in Bailey, 2005). Ker omenjeni stranski učinki velikokrat vodijo v prekinitev terapije (Inzucchi, 2002), so tudi razlog velikega števila raziskav na področju inhibitorjev alfa-glukozidaze, predvsem na področju naravnih in iz narave pridobljenih aktivnih substanc, za katere se predvideva boljši varnostni profil in manj neželenih učinkov.

2.1.2 Dipeptidil-peptidaza 4

Pomembno vlogo pri homeostazi glukoze v krvi igrajo inkretini. To so peptidni hormoni, ki se po zaužitju hrane sprostijo iz endokrinskih celic prebavil. Pri ljudeh sta pomembna predvsem dva polipeptidna hormona: GLP-1 (ang. glucagon-like peptide 1) in GIP (ang. glucose-dependent insulinotropic polypeptide), ki spodbujata izločanje inzulina iz trebušne slinavke (Drucker, 2006). Skupaj sta odgovorna za t.i. inkretinski učinek: peroralna

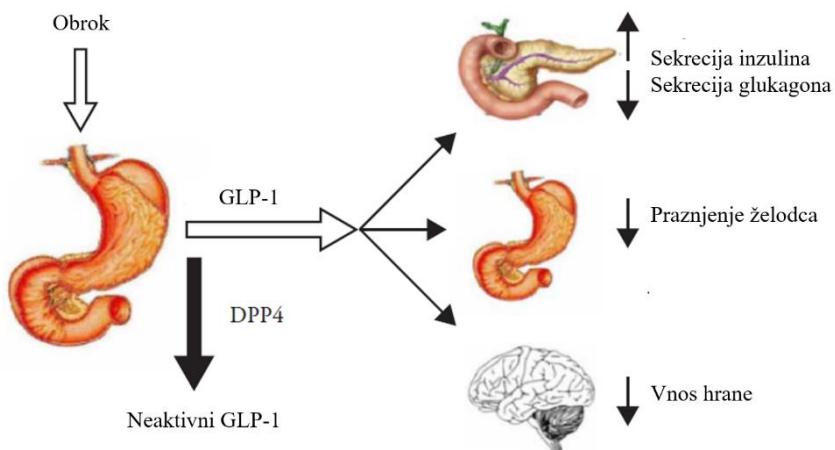
obremenitev z glukozo vodi v višji nivo inzulina v krvi v primerjavi z enako količino glukoze, dostavljene po intravenozni poti (Elrick in sod., 1964; Opinto in sod., 2013). Ocenjujejo, da inkretinski hormoni prispevajo 50 do 70 % izločenega inzulina po spodbudi z obrokom (Baggio in Drucker, 2007). Znano je, da je inkretinski učinek zmanjšan pri pacientih z diabetesom tipa 2 zaradi manj učinkovitega delovanja GIP ter slabšega izločanja GLP-1 (Holst in Gromada, 2004; Holst in sod., 2011; Vilsboll in Holst, 2004).

GIP gradi 42 aminokislinskih ostankov in ga izločajo celice K, ki so pretežno v duodenomu in jejunumu (Baggio in Drucker, 2007; Holst in Gromada, 2004). V krvni obtok se sprosti po obroku, v glavnem po zaužitju maščob in ogljikovih hidratov, medtem ko proteini manj vplivajo na izločanje (Deacon, 2005). Po drugi strani GLP-1 proizvajajo črevesne endokrine celice L, ki se v glavnem nahajajo v nižjem predelu črevesa, v ileumu in debelem črevesu. V krvni obtok se sprosti kmalu po zaužitju celotnega obroka – maščob, ogljikovih hidratov ter tudi proteinov (Baggio in Drucker, 2007; Deacon, 2005). GIP in GLP-1 se kmalu po sprostitvi v obtok inaktivirata. To se zgodi z odstranitvijo N-končnega dela peptida s pomočjo dipeptidil-peptidaze 4 (DPP4) (Baggio in Drucker, 2007; Deacon, 2004). Oba polipeptida stimulirata izločanje inzulina v odvisnosti od koncentracije glukoze v krvi, kar je osnova inkretinskega učinka (Drucker, 2006; Vilsboll in Holst, 2004).

Poleg stimulacije izločanja inzulina, GLP-1 pri glodalcih dokazano povečuje tudi nastajanje in diferenciacijo celic Langerhansovih otočkov ter reducira apoptozo celic β , kar se izkazuje s povečano maso pankreasnih celic β (Perfetti in Hui, 2004; Xu in sod., 1999). Inkretinski hormoni vplivajo tudi na izločanje glukagona iz celic α pankreasnih otočkov. Dokazali so, da GIP spodbuja izločanje glukagona, medtem ko ga GLP-1 inhibira (Drucker, 2006; Meier in sod., 2003). Inkretini delujejo tudi izven trebušne slinavke. Oba, GIP in GLP-1, inhibirata praznjenje želodca. GIP dodatno inducira lipogenezo, GLP-1 pa preko centralnega delovanja povečuje občutek sitosti (Vilsboll in Holst, 2004). GLP-1 poleg tega še ugodno vpliva na miokardno in endotelno funkcijo (Nikolaïdis in sod., 2004; Nystrom in sod., 2004).

GLP-1 tako izkazuje številne učinke, ki imajo potencialno vlogo pri terapiji sladkorne bolezni (slika 2). Zaradi tega omenjeni inkretin obravnavajo v raziskavah kot novo tarčo za zdravljenja diabetesa. Študije z začetka 90-tih let prejšnjega stoletja so pokazale, da GLP-1 pri intravenskem dajanju zmanjša potrebo po inzulinu po obroku tako pri diabetesu tipa 1 kot tipa 2 (Gutniak in sod., 1992). Prav tako je infuzija GLP-1 znižala nivo glukoze v krvi pri diabetesu tipa 2 (Nauck in sod., 1996). Glavni problem pri delovanju GLP-1 je hitra inaktivacija hormona z DPP4. V premagovanju te težave sta se kot uspešni izkazali dve strategiji. Prva je bil razvoj agonistov GLP-1 receptorja (mimetiki GLP-1), ki so odporni na delovanje DPP4. Primer tega pristopa je eksenatid (Byetta®) (Bond, 2006). Alternativni pristop je inhibicija encima DPP4, kar prepreči inaktivacijo GLP-1 in tako poveča in podaljša delovanje inkretinov (Barnett, 2006; Duez in sod., 2012). GIP se po drugi strani ni izkazal kot primeren kandidat za razvoj antidiabetične terapije, v glavnem zaradi

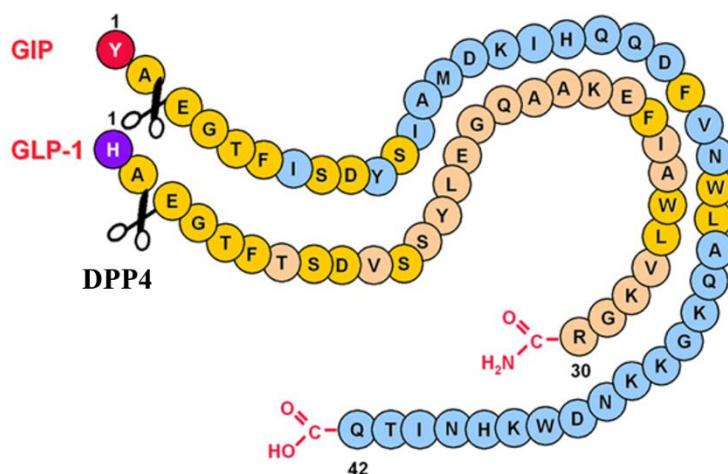
oslabljenega inzulinotropičnega odziva pri pacientih z diabetesom tipa 2 ter zaradi stimulacije sekrecije glukagona (Meier in Nauck, 2004).



Slika 2: Metabolizem in učinki GLP-1 v stanju po obroku. Po stimulaciji z ogljikovimi hidrati, maščobami ali proteini, povzroči GLP-1 številne postprandialne učinke. DPP4 ga hitro deaktivira, zaradi česar je učinek GLP-1 kratkotrajen (Doupis in Veves, 2008).

Figure 2: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) metabolism and effects in a postprandial state. Stimulated by carbohydrates, fats and proteins, GLP-1 leads to a number of changes in a postprandial state. Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) rapidly de-activates GLP-1, making its effect short-lived (Doupis and Veves, 2008).

DPP4 (tudi DPP-IV, CD26, EC 3.4.14.5) je multifunkcijski, 110 kDa velik glikoprotein, prisoten na površini membrane večine tipov celic. Povezan je z imunsko regulacijo, prevajanjem signalov in apoptozo (Morimoto in sod., 1994; Rohrborn in sod., 2015). Pri ljudeh je DPP4 prisoten v skoraj vseh organih in tkivih, največ pa ga je v gastrointestinalnem traktu, jetrih, ledvicah, vaskularnem epiteliju, trebušni slinavki in placenti. Topna oblika DPP4, ki jo najdemo v serumu in semenski tekočini, je proteolitični derivat membranske oblike. Kot serinska eksopeptidaza cepi dipeptide z N-konca polipeptidov, še posebej če je aminokislina na mestu 2 alanin (kot pri GLP-1, slika 3) ali prolin (Duez in sod., 2012; Durinx in sod., 2000; Lambeir in sod., 2003). To delovanje DPP4 je hitro in učinkovito. Razpolovni čas aktivnega GLP-1 je manj kot 2 minuti (Deacon, 2004). Inhibicija DPP4 občutno podaljša razpolovni čas in približno trikrat poveča delež aktivnega GLP-1 v krvnem obtoku po obroku (Ahren in sod., 2004).



Slika 3: Aminokislinsko zaporedje GIP (ang. glucose-dependent insulinotropic polypeptide) in GLP-1 (ang. glucagon-like peptide-1) in mesto delovanja DPP4 (prirejeno po McIntosh, 2008).

Figure 3: Amino acid sequences of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the cleavage sites for DPP4 (adapted from McIntosh, 2008).

Poleg inkretinskih hormonov so potencialni substrati DPP4 še številni drugi bioaktivni peptidi, npr. nevropeptid Y, peptid YY, gastrin sproščajoči polipeptid, inzulinu podoben rastni faktor 1 (IGF-1) ter različni kemokini. Izraža se tudi na celični membrani aktiviranih limfocitov T (imenovan T-celični antigen CD26) (Boonacker in Van Noorden, 2003; Mentlein, 1999). DPP4 zelo verjetno ne sodeluje le v procesih homeostaze glukoze, ampak lahko vpliva tudi na mehanizme, ki urejajo krvni pritisk, vnetja ter imunski sistem. Kljub sposobnosti cepitve različnih peptidov *in vitro* pa so živalski modeli z inaktiviranim DPP4 klinično normalni in zdravi (Kopcho in sod., 2005). Niso še jasno dokazali, ali je katalitična funkcija encima pomembna v imunskejem sistemu ter ali je katerikoli od teh bioaktivnih peptidov substrat DPP4 tudi v fizioloških pogojih (Ahren, 2007; De Meester in sod., 1999; Thornberry in Gallwitz, 2009). DPP4 poleg tega z aktivacijo intracelularnih signalnih poti sodeluje tudi pri prenosu signalov iz ekstracelularnega v intracelularni prostor, vendar tudi ta mehanizem ni podrobno raziskan, inhibitorji encima pa nanj ne vplivajo (Boonacker in Van Noorden, 2003; Doupis in Veves, 2008; Lambeir in sod., 2003).

2.1.2.1 Inhibitorji dipeptidil-peptidaze 4

Na svetovnem (in tudi slovenskem) trgu je trenutno registriranih pet DPP4 inhibitorjev, znanih tudi kot »gliptini« (sitagliptin, vildagliptin, saksagliptin, alogliptin, linagliptin). Vsaj še enkrat toliko jih je v drugi in tretji fazi kliničnega testiranja. Najbolj raziskana med njimi sta sitagliptin (Januvia®, Merck) in vildagliptin (Galvus®, Novartis). Oba sta primerena za peroralno uporabo. Sta kompetitivna in reverzibilna inhibitorja encima. Absorbirata se hitro, C_{max} je dosežen v 1-2 urah, biorazpoložljivost pa v obeh primerih presega 80 % (He in sod., 2005; Herman in sod., 2005). Oba učinkovito inhibirata plazemsko DPP4 z enkrat dnevno

aplikacijo. Povprečno znižanje vrednosti glikiranega hemoglobina HbA_{1c} je ob uporabi DPP4 inhibitorjev med 0,5 in 0,8 % (Ahren, 2009).

Inhibicija DPP4 poveča koncentracijo aktivnega GLP-1 po obroku, izkazalo pa se je, da je povиšan tudi celoten cirkadiani ritem izločanja GLP-1, vključno s stanji na tešče ter po obrokih skozi 24 ur (Mari in sod., 2005). Z nižjim nivojem glukoze v krvi se skozi čas izboljša tudi občutljivost receptorjev za inzulin, kar dodatno prispeva k uravnavanju homeostaze glukoze (Mari in sod., 2005). Poleg izboljšanja v metabolizmu glukoze, inhibicija DPP4 ugodno vpliva tudi na metabolizem lipidov po obroku, ki je znan faktor tveganja za kardiovaskularne bolezni (Matikainen in sod., 2006). Klinične študije kažejo tudi ugoden učinek na krvni pritisk pri uporabi DPP4 inhibitorjev (Lovshin in Zinman, 2014). DPP4 inhibitorji so se v kliničnih preskušanjih izkazali kot varne učinkovine. Ker delujejo tako, da povečujejo razpolovni čas inkretinov, ki se sproščajo v prebavni trakt v odvisnosti od zaužite glukoze, pri uporabi DPP4 inhibitorjev ni povečanega tveganja za razvoj hipoglikemije, kot je to pri nekaterih drugih vrstah antidiabetikov, npr. sulfonilurei (Nauck in sod., 2007). Kot že opisano, imajo DPP4 inhibitorji poleg inkretinov potencial cepitve številnih drugih bioaktivnih spojin, kar bi lahko vodilo v pojav stranskih učinkov v povezavi s krvnim pritiskom, nevrogenim vnetjem ali imunsko reakcijo. Takih pojavov niso opazili niti v živalskih niti v humanih kliničnih študijah (Mentlein, 2004).

2.2 RAZVOJ NOVIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

2.2.1 Peptidi kot zdravilne učinkovine

Število novih učinkovin v skupini malih sinteznih molekul v kliničnih raziskavah ter na trgu odobrenih zdravil v zadnjem desetletju upada, saj farmacevtska industrija več pozornosti posveča biološkim zdravilom (Albericio in Kruger, 2012; Sun, 2013). Ena od terapevtsko in tržno zanimivih skupin na trgu zdravil, ki glede na svoje fizikalne in farmakokinetične lastnosti predstavlja nekakšen most med konvencionalnimi in biološkimi zdravili, so peptidna zdravila. Na tržišču so že štiri desetletja, predvsem v zadnji dekadi pa se je zaradi uspeha v klinični uporabi ter izboljšanih tehnologijah razvoja in proizvodnje njihova uporaba izredno razširila (Goldflam in Ullman, 2015; Lien in Lowman, 2003). Samo v letu 2012 je dovoljenje za promet dobilo 6 novih peptidnih učinkovin, trenutno pa je z odobritvijo ameriške Agencije za hrano in zdravila (FDA) na trgu več kot 60 peptidnih zdravil. V prihodnjih letih pričakujemo znatno rast, saj je približno 140 terapevtskih peptidov v različnih fazah kliničnega testiranja in več kot 500 peptidov v predkliničnem razvoju (Fosgerau in Hoffmann, 2015). Glavni terapevtski področji uporabe peptidnih zdravil sta diabetes tipa 2 in onkologija. Najpogosteјša tarča terapevtskih peptidov (12,1 % oz. 32 izmed skupno 265 peptidov), ki so vstopili v klinične študije med leti 2000 in 2012, je receptor za GLP-1 pri zdravljenju diabetesa tipa 2 (Kaspar in Reichert, 2013).

Kemijsko so peptidi linearni oligomeri α -aminokislin, pri čemer so te med seboj povezane z amidno (peptidno) vezjo med α -karboksilno skupino predhodne in α -aminsko skupino sledeče aminokisline. Od proteinov se razlikujejo zgolj po številu aminokislin (peptidi so zgrajeni iz manj kot 100 aminokislin) in so posledično po molekulski masi manjši (Štrukelj in Kos, 2007).

Peptidi so kot učinkovine zanimivi predvsem zaradi sposobnosti tvorbe visokospecifičnih interakcij z receptorji, kar je značilno za varna in učinkovita zdravila, ki jih pacienti dobro prenašajo. V naravi so identificirali približno 7000 peptidov, ki regulirajo večino fizioloških procesov v vlogah kot so hormoni, nevrotransmiterji, rastni faktorji, ligandi ionskih kanalčkov ter antiinfektivi. Posledično predstavljajo odlično izhodišče za razvoj novih biološko aktivnih spojin (Fosgerau in Hoffmann, 2015). Vendar pa so peptide tradicionalno obravnavali kot slabe kandidate za nova zdravila, kar gre pripisati lastnostim, kot so nizka biološka razpoložljivost, hitro izločanje z ledvično filtracijo, nestabilnost tako med shranjevanjem kot *in vivo* po peroralnem vnosu, hitri encimski razgradnji ter nezmožnost prehajanja krvno-možganske bariere in potencialna imunogenost (Goldflam in Ullman, 2015; Sachdeva, 2016).

Naravni peptidi zato običajno niso primerni za neposredno uporabo kot zdravilne učinkovine, lahko pa služijo kot izhodišče za načrtovanje in razvoj spojin vodnic z ugodnejšim farmakološkim profilom. Prva možnost je razvoj peptidomimetikov, spojin brez tipičnega peptidnega skeleta, a z ohranjenimi karakteristično usmerjenimi funkcionalnimi skupinami, ki so komplementarne mikrokolju proteinskega receptorja. Strukturno, predvsem pa funkcionalno posnemajo peptidne ligande, a imajo boljše fizikalno-kemijske značilnosti, kot so višja selektivnost in afiniteta do tarčnega proteina na račun konformacijske omejenosti, boljša metabolična stabilnost zaradi odsotnosti peptidnih vezi ter boljša biološka uporabnost zaradi nizke molekulske mase (Bratkovič in Sollner Dolenc, 2004).

Zadnja leta so prinesla velik napredek tudi pri premagovanju pomanjkljivosti peptidnih molekul. Pojavila oziroma nadgradila se je vrsta strategij in tehnologij, s pomočjo katerih se lahko izboljšajo tako metabolična stabilnost in prehajanje membran kakor tudi imunogene lastnosti peptidov. Kemijska modifikacija peptidov vključuje spremembe na stranskih verigah aminokislin, kovalentno konjugacijo peptida s polietilen glikolom (PEGilacija), substitucijo ene ali več L-amino kislin z D-amino kislinami ali pripravo rigidnejših peptidnih analogov (npr. s ciklizacijo preko disulfidnih vezi). Poleg tega imamo na voljo sledeče možnosti za izboljšanje farmakokinetičnega profila peptidov: ko-administracija inhibitorja proteinaz, inovativni dostavni sistemi (lizosomi, subkutane formulacije, gastrorezistentne emulzije in nanodelci, idr.) ter uvedba alternativnih poti dostave, uporaba pospeševalcev absorpcije (npr. detergenti, surfaktanti, maščobne kisline, fosfolipidi, idr.) in uporaba mukoadhezivnih polimerov (Sachdeva, 2016). Prav tako se v zadnjem času veliko pozornosti posveča razvoju multifunkcionalnih peptidov, ki imajo več kot eno farmakološko aktivnost,

npr. dvojni agonisti GLP-1 – GIP in GLP-1 – GCG, ki so trenutno v zgodnjih fazah kliničnih raziskav in poleg GLP-1 analoga vključujejo še del peptida, ki predstavlja agonista receptorja za GIP oziroma glukagon. Aktualne tehnološke modifikacije peptidov vključujejo tudi razvoj peptidov s sposobnostjo celične penetracije ter konjugate peptidov z drugimi učinkovinami, kjer lahko peptid predstavlja sredstvo dostave (npr. v onkologiji, ko komponenta peptida omogoča relativno visoko specifično tarčno dostavo konjugiranega radioaktivnega liganda v želeno tkivo) ali pa efektorski del (npr. konjugat peptida in protitelesa, kjer slednje prevzame vlogo dostavne molekule v tarčno tkivo) (Fosgerau in Hoffmann, 2015).

2.2.1.1 Razvoj peptidnih učinkovin

Medtem, ko je včasih optimalen pristop k načrtovanju novih učinkovin predstavljalо racionalno načrtovanje, je v poznih 1980-tih letih kombinatorična kemija povzročila revolucijo na področju odkrivanja novih učinkovin (Furka, 1995). Z metodami le-te je možno sintetizirati veliko število strukturno sorodnih spojin (t.i. knjižnic) in v relativno kratkem času testirati njihov učinek na določeno tarčno molekulo. To nam olajšuje načrtovanje učinkovin predvsem v zgodnjih fazah procesa, pri iskanju spojin vodnic, preučevanju interakcij med biološkimi receptorji in njihovimi ligandi, na ta način pa je mogoče odkriti tudi ligande, ki jih z racionalnim pristopom ne bi predvideli (Bratkovič in Sollner Dolenc, 2004). V primeru peptidnih učinkovin poznamo dva načina priprave knjižnic – z biološko ali kemijsko sintezo. Medtem, ko nam kemijske knjižnice nudijo možnost doseči mnogo večjo pestrost sestave z vgrajevanjem večjega števila različnih (tudi nenaravnih) aminokislin, je pri bioloških knjižnicah proces dekonvolucije (selekcije posameznih aktivnih komponent iz knjižnice ter določitev njihove strukture) manj zahteven, s pomnoževanjem mikroorganizmov, ki jih sintetizirajo, pa jih je mogoče tudi zlahka obnavljati (Bratkovič in Sollner Dolenc, 2004).

Z biološko sintezo pripravljamo izključno peptidne knjižnice. Za pripravo izkoriščamo biološke sisteme – običajno bakterije, redkeje evkariotske celice. Postopek zajema prvotno kemijsko sintezo oligonukleotidnih fragmentov, ki jih vstavimo v primeren vektor (npr. bakteriofagno genomsko dvostransko DNA, fagmid ali plazmid) in sicer v gene za površinske proteine virusa ali celice (t.i. nosilni protein). Rekombinantne vektorje vnesemo v gostiteljske celice (npr. z metodo elektroporacije). V kolikor vstavljen fragment ne poruši funkcije gena (ne pride do premika bralnega okvirja in vstavljen peptid ne vpliva na zvijanje ali procesiranje nosilnega proteina), se le-ta v obliki fuzijskega proteina izrazi na površini faga ali bakterije. Vsak klon mikroorganizma izraža na površini en sam peptid, zapis zanj pa se nahaja v rekombinantnem vektorju. Na ta način sta genotip in fenotip fizično povezana. Govorimo o bakteriofagnih ali bakterijskih predstavitevih knjižnicah (Bratkovič in Sollner Dolenc, 2004; Sergeeva in sod., 2006; Sidhu, 2000; Smith in Petrenko, 1997).

Najbolj razširjena oblika bioloških knjižnic so bakteriofagne predstavitvene knjižnice, ki jih je prvič opisal George P. Smith leta 1985 (Smith, 1985). Dokazal je, da je rekombinantne bakteriofage s površinsko predstavljenimi peptidi mogoče z afinitetno selekcijo izolirati iz populacije, v kateri je nekaj tisočkrat več bakteriofagov divjega tipa. To velja za začetek bakteriofagnega prikaza (Scott in Smith, 1990). Glede na vrsto vektorja, v katerega vstavimo tujo DNA, ločimo bakteriofagne in fagmidne knjižnice. Slednje se uporablajo za izražanje večjih proteinov. Najpogosteje uporabljeni vektorji pri bakteriofagnem prikazu so nelitični nitasti bakteriofagi (M13, fd ali f1). Nitasti bakteriofagi so skupina virusov, ki vsebujejo krožni enoverižni genom, zaprt v dolgo cilindrično kapsido. Pri sproščanju iz celic ne povzročijo lize gostitelja, kar olajša postopek izolacije in čiščenja v primerjavi z uporabo litičnih fagov (npr. T7). Ti se za pripravo knjižnic uporabljo redkeje (Smith, 1985; Smith in Petrenko, 1997).

Nitasti bakteriofagno prikazni sistemi so osnovani na N-končnih fuzijah s strukturnim proteinom pIII ali pVIII. Glede na razporeditev nosilnega proteina lahko takšne knjižnice razdelimo na različne tipe:

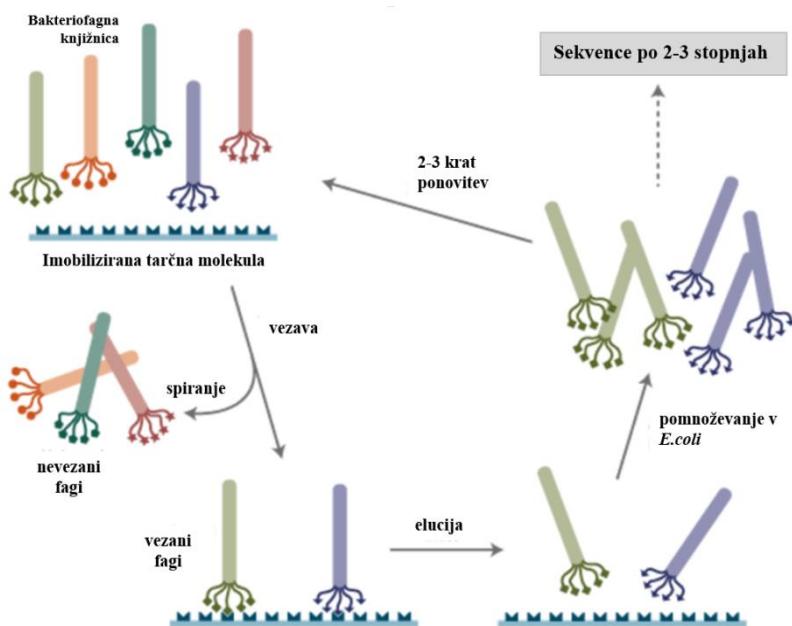
- a) Glede na strukturni protein kapside, ki služi kot nosilni protein za predstavitev peptidov ali proteinov, jih delimo na:
 - Tipi 3, 33 ali 3+3, če so peptidi izraženi kot fuzijski proteini s proteinom pIII
 - Tipi 8, 88 ali 8+8, če so peptidi izraženi kot fuzijski proteini s proteinom pVIII.
- b) Pri tipih 33 in 88 bakteriofagni genom vsebuje dva različna gena za protein pIII oz. pVIII, enega rekombinantnega in enega nativnega. Po okužbi bakterije s takimi bakteriofagi se iz nje sprostijo mozaični bakteriofagi, ki imajo na površini izražena dva tipa proteinov – nativni pIII oz. pVIII običajno prevladujejo nad rekombinantnimi.
- c) Pri tipih 3+3 in 8+8 sta rekombinantni in nativni protein pIII oz. pVIII zapisana v dveh različnih genomih – nativna različica v pomožnem bakteriofagu, rekombinantna pa na fagmidu. Po pomnoževanju se iz bakterijske celice sprostijo bakteriofagi dveh tipov, ki pa so vsi mozaični.
- d) Glede na valenco prikaza delimo bakteriofagne knjižnice na monovalentne (tipa 3+3 in 33), oligovalentne (tipa 3 in 88) ali polivalentne (tip 8).

2.2.1.1.1 Bakteriofagna peptidno-predstavitvena knjižnica

S procesom rešetanja pridobivamo peptide z iskanimi lastnostmi iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic. Selekcija peptidov poteka v več stopnjah na podlagi afinitete do izbranega receptorja (slika 4). Tarčno biomolekulo običajno immobiliziramo na trdno površino (npr. mikrotitrsko plošče ali magnetne kroglice) in nad njo inkubiramo bakteriofagno knjižnico. Kloni, ki s tarčno makromolekulo ne tvorijo interakcij, ostanejo prosti v suspenziji in jih od klonov, ki preko površinskih peptidov tvorijo komplekse s tarčnim proteinom, ločimo s spiranjem. Vezane klone eluiramo – specifično, z raztopino proste tarčne molekule ali znanega liganda, ali nespecifično, npr. s pufrom z nizkim pH. Eluirane bakteriofage pomnožimo in jih prenesemo v novo stopnjo selekcije. Po treh do petih selekcijskih stopnjah osamimo in pomnožimo posamezne eluirane klone. Iz njih izoliramo DNA, ki nosi zapis za fuzijski protein in določimo nukleotidno zaporedje fragmenta, ki kodira vstavljen peptid. To prevedemo v aminokislinsko zaporedje, s čimer dobimo primarno strukturo peptidnega liganda (Priročnik ..., 2016; Bratkovič in Sollner Dolenc, 2004; Smith in Petrenko, 1997).

Na tak način pridobljeni peptidi so običajno relativno močni ligandi tarčnih proteinov (K_d med 20 μM in 10 nM, pogosteje v nizkem mikromolarnem območju). Kljub velikosti tarčne makromolekule se peptidi običajno vežejo zgolj na omejeno število mest na tarči, ki navadno sovpadajo z aktivnimi ali vezavnimi mesti tarčne molekule. Znano je namreč, da je, ne glede na velikost dveh proteinov, ki med seboj interagirata, število aminokislinskih ostankov, odgovornih za to vezavo, relativno nizko (običajno od tri do deset). Posledično lahko kratki peptidi predstavljajo nadomestne ligande tudi za večje proteine (Kay in sod., 1998). Peptidni ligandi, ki se vežejo v aktivno mesto receptorskih proteinov, pogosto tudi spremenijo njihovo biološko aktivnost. Sintezni peptidi, pripravljeni na osnovi aminokislinskih zaporedij, izoliranih iz bioloških knjižnic, so se tako izkazali za agoniste ali antagoniste receptorjev, inhibitorje encimov in mimetike antigenov, in to celo v primerih, ko naravni ligandi tarčnih proteinov niso peptidne narave (Bratkovič, 2007).

Ameriški raziskovalci so z rešetanjem sintezne kombinatorične peptidne knjižnice že identificirali močne selektivne peptidne inhibitorje alfa-glukozidaze iz kvasovke (Eichler in sod., 1996). S pomočjo tehnologije bakteriofagnega prikaza so v literaturi že podatki o uspešnih selekcijah na različnih encimih (Bratkovič in sod., 2005; Gaser in sod., 2009; Lunder in sod., 2005), med drugim so naredili tudi začetne selekcije na glukoamilazi iz *Aspergillus niger* (Li in Wang, 2001) in prašičji pankreasni alfa-amilazi (Wong in sod., 1999). Podatkov o bakteriofagnem prikazu na DPP4 v literaturi nismo zasledili, naredili pa so uspešno selekcijo na receptorju za GLP-1, pri čemer so Chen in sod. (2007) pridobili sintezni peptid KS12, odporen na delovanje DPP4 in z ustrezno biološko aktivnostjo *in vitro* ter *in vivo*.



Slika 4: Shema selekcijskega postopka s knjižnico peptidov, izraženih na površini pIII nitastega bakteriofaga M13 (Priročnik ..., 2016).

Figure 4: Biopanning with peptide library displayed on pIII of M13 filamentous bacteriophage (Priročnik ..., 2016).

2.2.2 Razvoj zdravil naravnega izvora

Zdravila naravnega izvora vsebujejo biološko-aktivne snovi, ki izvirajo iz živih organizmov. Zdravilne rastline so skozi zgodovino dokazale svoj pomen kot vir spojin s terapevtskim potencialom. Danes še vedno predstavljajo pomemben vir za nove zdravilne učinkovine. Kljub temu, da je v zadnjih desetletjih v farmacevtskem raziskovanju prevladovala kombinatorična kemija, je pomen naravnih spojin v razvoju zdravil ostal velik. Od skupno 1073 novih malih molekul, ki so bila odobrena kot zdravila med letoma 1981 in 2010, so jih samo 36 % pridobili izključno s kemijsko sintezo, medtem ko jih je več kot polovica izvirala iz narave (Newman in Cragg, 2012). Znatno število le-teh so odkrili v višjih rastlinah (Kinghorn in sod., 2011). V Sloveniji zdravilne rastline kot način samozdravljenja uporablja 72 % prebivalcev (Kreft in Kočevan Glavač, 2013).

Farmacevtska industrija se pri razvoju zdravil naravnega izvora srečuje z izzivi, ki izhajajo iz same narave zdravilnih rastlin. Poleg pravilne identifikacije, še posebej, če zdravilne rastline pridobivamo direktno iz njihovega naravnega habitata, je prva ovira dostopnost izvornega materiala. Poleg tega, da so nekatere bioaktivne spojine, ki jih želimo pridobiti iz rastlin, sezonsko pogojene, je treba upoštevati še ekološke in pravne vidike nabiranja zdravilnih rastlin. Uveljavljene so bile smernice dobre kmetijske in nabiralne prakse (GACP, ang. good agricultural and collection practices), ki jih je potrebno upoštevati pri pridobivanju

surovin naravnega izvora (WHO smernice ..., 2003). Rastlinski material lahko zelo variira tudi v kvaliteti in kemijski sestavi, kar je odvisno tako od časa žetve, sestave zemlje, nadmorske višine rastišča in klime, kakor tudi od procesov obdelave in pogojev shranjevanja (Atanasov in sod., 2015).

Naslednja ovira pri razvoju zdravil naravnega izvora je neprimernost naravnih produktov za uporabo v metodah rešetanja visokih zmogljivosti (HTS, ang. high throughput screening). Med drugim so pogoji uporabe HTS, da med delom ne pride do razpada ali obarjanja spojin, interakcij med spojinami in testnimi reagenti ali do nespecifičnih reakcij testiranih spojin. Naravni produkti teh zahtev velikokrat ne izpolnjujejo. Uporaba naravnih spojin v HTS je v primerjavi s sinteznimi spojinami težja, ni pa nemogoča (Lahlou, 2013). Za testiranja se velikokrat izkažejo kot problematične tudi zaradi obarvanosti in fluorescence, kar onemogoča ali otežuje uporabo nekaterih metod detekcije (Henrich in Beutler, 2013).

Nenazadnje je ovira pri razvoju zdravil naravnega izvora tudi izvedba kliničnih testiranj, ki so pogoj za prihod zdravila na trg. Le-te so običajno financirane s strani farmacevtskih podjetij, ki zdravila izdelujejo. Zaradi kompleksne situacije pri patentiranju iz narave pridobljenih zdravil, je interes farmacevtskih podjetij na tem področju omejen, kar v veliki meri onemogoča izvedbo kliničnih raziskav (Atanasov in sod., 2015).

Kljub temu pa so naravne snovi vedno bile in bodo ostale pomemben vir novih farmacevtskih spojin. Večina od približno 310.000 do sedaj opisanih rastlin je farmakološko še neraziskana, kar nudi ogromen raziskovalni potencial. Poleg tega imajo naravni produkti lastnosti, ki so evolucijsko optimirane, da služijo različnim biološkim funkcijam (npr. vezava na tarčne proteine) (Atanasov in sod., 2015). Če primerjamo sekundarne metabolite z naključnimi sinteznimi spojinami, so naravni metaboliti običajno veliko kompleksnejši in superiorni, tako v biološki kot tudi farmakološki aktivnosti (Lahlou, 2013). Uporaba zdravil naravnega izvora je pri ljudeh spet vedno bolj priljubljena, vedno večji pa je spet tudi interes farmacevtske industrije in raziskovalnih ustanov za pridobivanje novih farmakološko aktivnih spojin iz naravnih snovi. Atanasov in sod. (2015) so analizirali trend PubMed-ovih publikacij med letoma 1982 in 2012 ter prišli do ugotovitev, da se število objav na področju zdravilnih rastlin povečuje hitreje kot skupno število letnih objav, kar kaže na povečan znanstveni interes na področju farmakologije, kemije in razvoja novih zdravil iz naravnih produktov rastlinskega izvora. Nova znanstvena dognanja in tehnološki napredki na tem področju, ki omogočajo premagovanje izzivov kompleksne narave razvoja naravnih zdravil, zagotavljajo, da bodo naravni produkti med najpomembnejšimi viri novih zdravil tudi v prihodnje (Atanasov in sod., 2015).

Pogost pristop pri odkrivanju naravnih zdravilnih snovi je preizkušanje učinkov rastlinskih izvlečkov, ki nam v povezavi s kromatografskimi separacijskimi metodami omogoča izolacijo biološko aktivnih molekul. S sodobnimi spektroskopskimi in spektrometrijskimi

metodami ugotavljamo njihove kemijske strukture, nadaljujemo pa s preizkušanjem njihovega farmakološkega delovanja.

Pri izbiri začetnega materiala, iz katerega poskušajo izolirati spojine z določeno biološko aktivnostjo, se raziskovalci poslužujejo različnih pristopov. Naključno presejanje izvlečkov iz različnih spojin ali izoliranih naravnih produktov, pretežno na podlagi njihove razpoložljivosti, nudi možnost identifikacije spojin z aktivnostjo, ki ni bila predvidena na podlagi dosedanja znanja. Po drugi strani pa strategije, ki temeljijo na že znanih podatkih, nudijo večjo možnost identifikacije relevantnih spojin. Eden izmed načinov je etnofarmakološki, pri katerem je izbor testnih vzorcev osnovan na podlagi tradicionalne uporabe rastlin v zdravilne namene. Pri kemijsko-sistematičnem pristopu vzorce izberemo na podlagi taksonomije in filogenije, kjer upoštevamo, da rastline iz določenih rodov ali družin proizvajajo spojine, povezane z določeno biološko aktivnostjo ali specifičnim terapevtskim potencialom. Ekološki pristop temelji na predpostavki, da rastline interagirajo z okoljem ter da imajo njihovi sekundarni metaboliti ekološko funkcijo, iz katere lahko predpostavimo potencialni terapevtski učinek pri ljudeh. Kot zelo učinkovit pa se je izkazal tudi pristop *in silico*, kjer s pomočjo računalniških analiz predpostavimo biološko aktivnost konstituent določene rastlinske vrste (Atanasov in sod., 2015). V okviru tega doktorskega dela smo naravne produkte z antidiabetično aktivnostjo *in vitro* iskali na podlagi dosedanja znanja o kemijski sestavi in biološki aktivnosti preučevanih ekstraktov.

2.2.2.1 Fenolne spojine

Tako epidemiološke kakor tudi empirične študije o ugodnih učinkih rastlinskih učinkov na zdravje so v porastu in kažejo ugoden učinek določenih rastlinskih izvlečkov in posameznih naravnih spojin na kontrolo diabetesa. Po etnobotaničnih informacijah se v ljudski medicini uporablja približno 800 rastlin, ki ugodno delujejo pri diabetičnih obolenjih, okrog 410 pa jih je takšnih z (bolj ali manj zanesljivo) eksperimentalno dokazanim antidiabetičnim učinkom (Prabhakar in Doble, 2008). Ta učinek se pripisuje predvsem polifenolom in nizkomolekularnim fenolom, prisotnim v tradicionalno uporabljenih živilih in začimbah (Solayman in sod., 2016; Xiao in Hogger, 2015). Mehanizmi njihovega delovanja so različni in redko popolnoma pojasnjeni. Nekateri izmed njih vplivajo na presnovo in absorpcijo ogljikovih hidratov, lahko pa tudi regulirajo metabolizem ogljikovih hidratov, izboljšajo privzem glukoze v mišične celice in adipocite ali izboljšajo funkcijo celic β in učinek inzulina (El-Abhar in Schaalaa, 2014; Hanhineva in sod., 2010).

Polifenoli so sekundarni metaboliti rastlin, vpleteni v zaščito rastlin pred ultravijoličnim sevanjem in patogeni. V rastlinski hrani, kot so sadje, zelenjava, žita, stročnice, kava, čaj, vino in kakav so identificirali več kot 8000 polifenolnih spojin. Živilom prispevajo lastnosti, kot so grenkost, adstringentnost, barva, okus, vonj ter oksidativna stabilnost (Pandey in Rizvi, 2009).

Glede na število fenolnih obročev in povezajoče strukturne elemente, lahko polifenole razvrstimo v več razredov. Fenolne kisline predstavljajo približno tretjino vseh polifenolnih spojin v hrani in jih nadalje lahko razdelimo v dva razreda: hidroksibenzojske kisline in hidroksicimetove kisline. Prisotne so v vsej hrani, še posebej veliko pa jih je v sadju kislega okusa (Manach in sod., 2004). Flavonoidi so najbolj obsežen razred polifenolov v prehrani, saj so jih identificirali več kot 4000 različnih. Delimo jih v 6 razredov: antocianini, flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni in izoflavoni. Skupna jim je struktura iz dveh aromatskih obročev, povezanih preko treh ogljikovih atomov, ki tvorijo oksigeniran heterocikel. En obroč običajno izvira iz molekule resorcinola, drugi pa je derivat šikimatne poti. Lignani so difenolne spojine, ki vsebujejo 2,3-dibenzilbutansko strukturo, ki se formira z dimerizacijo dveh cimetnih kislin. Pripisujejo jim fitoestrogeno aktivnost. Stilbeni so v humani prehrani prisotni v nizkih količinah. Sestavlja jih dve fenilni skupini, povezani z 2C metilenskim mostom. Večina se jih v rastlinah sintetizira samo kot odgovor na infekcijo ali poškodbo. Najbolj preučevan stilben je resveratrol (Bahadoran in sod., 2013; Pandey in Rizvi, 2009).

Ocenjujejo, da je vnos polifenolov iz hrane okrog 1 g/dan (Ovaskainen in sod., 2008). Njihova biorazpoložljivost je odvisna od procesa priprave hrane, prebave v gastrointestinalnem traktu, absorpcije in metabolizma. Vsak polifenol ima drugačno biorazpoložljivost, ki ni odvisna od količine polifenola v hrani. Tekom absorpcijske poti polifenole hidrolizirajo črevesni encimi ali mikroflora v debelem črevesu, nato pa se v intestinalnih celicah in kasneje v jetrih konjugirajo z metilacijo, sulfatacijo in/ali glukuronidacijo (Scalbert in sod., 2002). Posledično polifenoli dosežejo cirkulacijo v precej spremenjeni obliki, kar otežuje njihovo identifikacijo v krvi in oceno biološke aktivnosti. Izločajo se preko žolča in urina (Bahadoran in sod., 2013).

Številne študije so potrdile antidiabetični učinek polifenolov. Delovali naj bi preko različnih mehanizmov, tudi z inhibicijo absorpcije glukoze. Hipoglikemičen učinek diacetiliranih antocianinov pri dozi 10 mg/kg telesne teže podgan so opazili pri maltozi, ne pa tudi pri saharovi ali glukozi, iz česar sklepamo, da gre za inhibicijo prebavnih glikozidaz v črevesni sluznici (Matsui in sod., 2002). Glede na podatke iz literature, inhibicijo alfa-glukozidaze in alfa-amilaze povzročijo tudi flavonoidi, fenolne kisline in tanini (Bahadoran in sod., 2013; Tadera in sod., 2006), pri tem pa naj bi bili varni in naj ne bi izkazovali stranskih učinkov (Hanhineva in sod., 2010).

2.2.2.2 Rastlinski izvlečki

Pri mnogih zdravilnih rastlinah so ugotovili, da določenih učinkov ne izkazuje le ena izolirana snov, ampak ustrezna kombinacija več snovi iz te rastline (Yao in sod., 2012). V tem primeru je smotrno kot zdravilo uporabiti celoten rastlinski izvleček in ne posameznih izoliranih komponent. Tega pristopa se poslužujemo tudi v primeru, ko aktivne komponente izvlečkov niso poznane. Identifikacija posameznih aktivnih spojin v izvlečkih je lahko med drugim otežena s pojavom sinergizma, ki ga pogosto opažamo pri naravnih snoveh. Gre za

medsebojno dopolnjevanje učinkov dveh ali več snovi, pri čemer je skupni učinek večji kot le seštevek posameznih učinkov. Ko takšne spojine izoliramo, same ne izkazujejo pričakovane aktivnosti, poleg tega pa v tem primeru ločevanje spojin niti ni smiselno. Prisotnost več spojin v izvlečkih lahko prispeva tudi k boljšemu prenašanju zdravila, v primerjavi s sinteznimi molekulami, vendar pa to ne izključuje možnosti stranskih učinkov ali interakcij z drugimi zdravili.

Težava pri uporabi izvlečkov je uniformnost. Kvaliteta ekstrakta je namreč odvisna tako od kvalitete rastlinskih surovin, metode izdelave kot tudi od medsebojnih interakcij vsebovanih učinkovin in stabilnosti učinkovine, odgovorne za učinek ekstrakta. Uporaba rastlinskih izvlečkov kot zdravil mora biti zato podvržena enakim standardom, kot veljajo za vsa zdravila. Kot zdravila lahko uporabimo le tiste, ki so jim klinično dokazali učinkovitost in varnost (Kreft in Kočevar Glavač, 2013). Kljub temu, da je za rastlinske produkte značilno, da niso vse komponente vedno prisotne v enakih koncentracijah, lahko s standardizacijo ekstraktov zagotovimo njihovo konstantno kvalitetno. Celoten proces od kultivacije do ekstrakcije je nadzorovan, izdelek pa vedno vsebuje izvleček z eno ali več terapevtsko aktivnih komponent, prisotnih v zagotovljeni količini, običajno izraženi z odstotkom glede na končni volumen.

2.2.2.2.1 Izvlečki iglavcev

Različne polifenole z zanimivimi farmakološkimi lastnostmi najdemo tudi v lubju, lesu in iglicah nekaterih iglavcev. Najbolj je raziskano lubje obmorskega bora (*Pinus pinaster*) ter iz njega pripravljen standardizirani izvleček Pycnogenol®. Vsebuje katehin, epikatehin, oligomere, taksifolin ter derivate benzojske in cimetove kisline (Rohdewald, 2002). Njegove učinke kažejo številne laboratorijske in klinične raziskave, ki so potrdile antioksidativne, antidiabetične in mnoge druge učinke. Na trgu je že prisoten v prehranskih dopolnilih in kozmetičnih izdelkih (Liu in sod., 2004; Maimoona in sod., 2011). Njegov pozitiven učinek pri uravnavanju sladkorja v krvi pripisujejo inhibiciji alfa-amilaze in alfa-glukozidaze (Kim in sod., 2005; Schäfer in Högger, 2007) in so ga potrdili v dvojno slepi, s placebom kontrolirani, multicentrični klinični študiji na pacientih z diabetesom tipa 2 (Liu in sod., 2004).

Raziskani ter vpeljani v farmacevtsko uporabo so tudi izvlečki nekaterih drugih vrst iglavcev. Bela jelka (*Abies alba*) je ena najbolj razširjenih drevesnih vrst v centralni Evropi in izredno pomembna tudi v naših gozdovih. Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani so pridobili izvlečke lesa in lubja navadne jelke. Optimizirali so metode za pridobivanje in vrednotenje različnih oblik izvlečkov in nekatere od njih tudi patentirali (Rejc in sod. 2015). Ugotovili so, da so izvlečki navadne jelke učinkovitejši antioksidanti od Pycnogenola tako v *in vitro* antioksidativnih testih, kot tudi na humanih celičnih linijah, izoliranih iz periferne krvi (Tavčar Benković in sod., 2014). Njeno lubje in les vsebujejo številne nizkomolekularne polifenole. Tavčar Benković in sod. (2014) so komponente izvlečka lubja kromatografsko

ločili in jih identificirali. Dokazali so šest fenolkarboksilnih kislin (galno, homovanilno, protokatehusko, p-hidroksibenzojsko, vanilno in p-kumarno), tri flavonoide (katehin, epikatehin in katehintetrametileter) in štiri lignane (taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)-taksiresinol, sekolariciresinol in lariciresinol). Za izvlečke lubja so dokazali antioksidativne in vazoprotективne učinke (Drevenski in sod., 2015). Ugotovili so, da so izvlečki lesa in lubja jelke obetavna surovina za razvoj prehranskih dopolnil, kozmetičnih izdelkov in tudi zdravil. Izvleček lesa bele jelke so uporabili tudi v nedavni randomizirani, dvojno slepi, s placebom kontrolirani klinični študiji, kjer so ugotavljeni njegov učinek na nivo glukoze v krvi. Enaintrideset zdravih prostovoljcev je zaužilo odmerek ekstrakta lesa bele jelke skupaj s standardnim obrokom. Ob tem se je glikemični indeks obroka signifikantno znižal, česar ni bilo zaznati ob zaužitju placeba (Debeljak in sod., 2016). Ali je za antidiabetični učinek ekstrakta odgovorna inhibicija prebavnih glikozidaz in/ali DPP4, smo ugotavljeni v tem doktorskem delu.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 1: Najpomembnejše aparature.

Table 1: The most important laboratory equipment.

Aparatura	Proizvajalec
Analitska tehnika	Mettler Toledo, Švica
Aparatura ÄKTA Explorer P-900	Pharmacia, Švedska
Aseptična komora	Iskra PIO, Slovenija
Avtoklav	Kambič, Slovenija
Centrifuga Sorvall WX Ultra 100	ThermoScientific, ZDA
Centrifuga 5804 R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga – minispin	Eppendorf, Nemčija
Hladilnik +4 °C	Gorenje, Slovenija
Inkubator	Kambič, Slovenija
Inkubatorski stresalnik	Kühner, Nemčija
Magnetno mešalo	Tehnica, Slovenija
Mikrotitrski čitalec	Tecan, Avstrija
Mikrovalovna pečica	AEG, Nemčija
Multikanalna pipeta	BioHit, Nemčija
PCR aparatura	Tehnica, Slovenija
pH meter	Metrohm, Švica
Pipete	Eppendorf, Nemčija
Spektrofotometer	Backmann, Nemčija
Stresalnik	Tehnica, Slovenija
Tehnica Exacta	Tehnica, Slovenija
Termoblok	Biometra, Nemčija
Ultrazvočna kopel – Sonis3	Iskra PIO, Slovenija
Vakuumska črpalka	Millipore, Francija
Vibracijski mešalnik – Vortex	Tehnica, Slovenija
Zamrzovalnik -20 °C	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik -80 °C	Sanyo, Japonska

Preglednica 2: Laboratorijski pribor.

Table 2: Laboratory accessories.

Laboratorijski material	Proizvajalec
Centrifugirke (15 ml, 50 ml)	Corning, ZDA
Filtri za brizge 0,2 µm, Millex	Millipore, Francija
Kasete za dializo	Thermoscientific, ZDA
Kolona HiPrep Q XL 16/10	GE Healthcare, Velika Britanija
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Velika Britanija
Magnetne kroglice Dynabeads® M-280 Tosylactivated	Invitrogen, Norveška
Magnetne kroglice Dynabeads® Protein G	Invitrogen, Norveška
Mikrocentrifugirke (0,5 ml – 2,0 ml)	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrskie ploščice MaxiSorp®	Nunc, ZDA
Mikrotitrskie ploščice, črne	Nunc, ZDA

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Laboratorijski pribor.

Laboratorijski material	Proizvajalec
Nastavki za pipete	Eppendorf, Nemčija
Parafilmski trak	Pachiney, ZDA
Petrijevke	TPP, Švica
Pipete (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	TPP, Švica

Preglednica 3: Reagenti.

Table 3: Reagents.

Reagent	Proizvajalec
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, ZDA
3,5-dinitrosalicilna kislina (DNSA)	Sigma-Aldrich, ZDA
4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (4-MUG)	Sigma-Aldrich, ZDA
5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid (X-gal)	Sigma-Aldrich, ZDA
Agar	Sigma-Aldrich, ZDA
Agaroza	Sigma-Aldrich, ZDA
Akarboza	Sigma-Aldrich, ZDA
Amonijev sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, ZDA
Dimetil formamid	Merck, Nemčija
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, ZDA
Etanol	Riedel-deHaën, Nemčija
Etilendiamin tetraacetna kislina (EDTA)	Merck, Nemčija
Glicerol	Fluka, Švica
Gly-Pro-7-amino-4-metilkumarin (GP-AMC)	Bachem, Švica
Glicin	Sigma-Aldrich, ZDA
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, ZDA
Izopropiltio- β -D-galaktopiranozid (IPTG)	Sigma-Aldrich, ZDA
Kalijev dihidrogen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Nemčija
Kalijev klorid	Merck, Nemčija
Klorovodikova kislina	Riedel-deHaën, Nemčija
Maltoza monohidrat	Sigma-Aldrich, ZDA
Magnezijev klorid heksahidrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O)	Merck, Nemčija
Metanol	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev dihidrogen fosfat monohidrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev hidrogen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev hidrogen karbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev hidroksid (NaOH)	Fluka, Švica
Natrijev jodid (NaI)	Merck, Nemčija
Natrij kalijev tartrat	Sigma-Aldrich, ZDA
Natrijev karbonat (Na ₂ CO ₃)	Fluka, Švica
Natrijev klorid (NaCl)	Fluka, Švica
Ocetna kislina	Riedel-deHaën, Nemčija
Polietenglikol 8000 (PEG 8000)	Sigma-Aldrich, ZDA
Sitagliptin	Sigma-Aldrich, ZDA
Škrob	Sigma-Aldrich, ZDA
Tetraciklin	Sigma-Aldrich, ZDA
Tris baza	Fluka, Švica
Triton X-100	Promega, ZDA
Tween 20	Sigma-Aldrich, ZDA
Vogliboza	Sigma-Aldrich, ZDA
Žveplova kislina (H ₂ SO ₄)	Sigma-Aldrich, ZDA

3.1.2 Raztopine in gojišča

Vse raztopine in gojišča, ki smo jih uporabili pri bakteriofagnem prikazu, smo sterilizirali z avtoklaviranjem ali sterilno filtracijo.

Preglednica 4: Sestava raztopin.

Table 4: The composition of solutions.

Raztopina	Sestava
PBS – slani fosfatni pufer (za 1l)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBST 0,1 %	100 ml PBS 0,1 ml Tween 20
PBST 0,05 %	100 ml PBS 0,05 ml Tween 20
0,2 M glicinski pufer (za 100 ml)	2,34 g NaCl 1,5 g glicina pH 2,2
Nevtralizacijski pufer – 1M Tris pufer (za 1l)	121,1 g Tris baze pH 9,1
PEG/NaCl raztopina (za 100 ml)	14,6 g NaCl 20 g PEG 8000
Blokirni pufer – 2 % BSA (za 100 ml)	100 ml PBS 2 g BSA
Jodidni pufer (za 100 ml)	0,1 g Tris baze 0,03 g EDTA 60 g NaI pH 8,0
Etanol 70 %	210 ml 96 % etanola 90 ml dH ₂ O
2 % X-gal	200 mg X-gal Dimetil formamid do 10 ml
1 M IPTG	3,125 g IPTG dH ₂ O do 10 ml
Tetraciklin	0,2 g tetraciklina Etanol do 10 ml
Pufer B (za 1 l)	2,62 g natrijevega dihidrogen fosfata monohidrata 14,42 g natrijevega hidrogen fosfata dihidrata pH 7,4
Pufer C	39,64 g amonijevega sulfata Pufer B do 100 ml pH 7,4
Pufer D	0,5 g BSA PBS do 100 ml pH 7,4

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Sestava raztopin.

Raztopina	Sestava
Pufer E	0,1 g BSA PBS do 100 ml pH 7,4
Reagent A – 20 mM fosfatni pufer (za 100 ml)	0,28 g natrijevega dihidrogen fosfata monohidrata 39,15 g NaCl pH 6,9
Reagent B – 1 m/V % škrob	250 mg škroba Reagent A do 25 ml kuhamo 15 min
Reagent C	12 g NaK-tartrata 8,0 ml 2M NaOH raztapljamo s segrevanjem
Reagent D	438 g DNSA 20 ml dH ₂ O raztapljamo s segrevanjem
Reagent E – DNSA	8 ml reagenta C 20 ml reagenta D dH ₂ O do 40 ml shranimo v temni steklenički na ST do 6 mesecev
Reagent F – 0,2 m/V % maltoza	0,2 g maltoze dH ₂ O do 100 ml

Preglednica 5: Sestava gojišč.

Table 5: The composition of growth media.

Gojišče	Sestava
Vrhinja agaroza (za 1 l)	1 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O 7 g agaroze LB gojišče do 1 l
LB gojišče (za 1 l)	- 20 g LB zmesi - v gojišče z dodatkom tetraciklina dodamo še 1/1000 volumna raztopine tetraciklina - V trdno gojišče dodamo še 15 g agarja, po avtoklaviranju pod aseptičnimi pogoji vlijemo v petrijevke, shranujemo v hladilniku - V LB/IPTG/X-gal trdno gojišče dodamo po avtoklaviranju trdnega gojišča še 32 µl 1 M IPTG in 300 µl 2 % X-gal, pod aseptičnimi pogoji vlijemo v petrijevke, shranujemo v hladilniku

3.1.3 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice

Uporabljali smo bakteriofagne predstavitvene knjižnice naključnih linearnih oz. cikličnih heptamernih peptidov (Ph.D.-7TM in Ph.D.-c7cTM) in linearnih dodekamernih peptidov (Ph.D.-12TM) proizvajalca New England Biolabs, ZDA. V vseh knjižnicah je prisotno kratko

povezovalno zaporedje Gly-Gly-Gly-Ser med prikazanim peptidom in pIII. Pri knjižnici Ph.D.-c7c™ je pred prvo aminokislino izraženega peptida še zaporedje Ala-Cys, pri čemer Cys sodeluje v disulfidni vezi, ki jo tvori s Cys, ki sledi naključnemu zaporedju sedmih aminokislin vstavljenega peptida.

Kot gostiteljske celice smo uporabili bakterijski sev *Escherichia coli* ER2738 (New England Biolabs, ZDA).

3.1.4 Protitelesa

Preglednica 6: Protitelesa.

Table 6: The list of used antibodies.

Protitelo	Lastnosti
THE™ His Tag Antibody (GenScript, ZDA)	Mišje, monoklonsko 0,5 mg/ml Prepozna 4xHis – 6xHis podaljške
Protitelo proti MGAM sc-98598 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)	Zajčje, poliklonsko 200 µg/ml Prepozna interno regijo človeške, mišje ali podganje MGAM
Protitelo proti M13 (GE Healthcare, Velika Britanija)	Mišja, monoklonska, konjugirana s hrenovo peroksidazo Prepozna glavni plaščni protein pVIII
Mouse anti-rabbit IgG sc-2491 (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)	Mišje, sekundarno 0,4 mg/ml Sekundarno protitelo za detekcijo zajčjih IgG

3.1.5 Encimi

Kot encime oz. vire encimov smo pri delu uporabili:

- Alfa-amilaza iz prašičjega pankreasa (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Acetonska oborina podganjega črevesa (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Humani rekombinantni DPP4, izražen v *E.coli*, s polihistidinskim podaljškom (Abnova, Taiwan)

Pri izolaciji peptidnih zaviralcev encimov smo najprej potrebovali čim bolj definirano in homogeno tarčno molekulo, zato smo kot vir alfa-glukozidaze uporabili izoliran podganji encim MGAM (metoda opisana v poglavju 3.2.1.1.2). V drugem delu, pri presejanju naravnih spojin in ekstraktov, nismo razlikovali med posameznimi encimi v črevesu. Testirali smo encimsko aktivnost celokupne alfa-glukozidaze v izolatu podganjega črevesa (metoda opisana v poglavju 3.2.2.1.1).

3.1.6 Sintezni peptidi

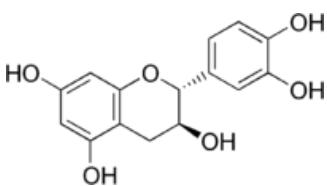
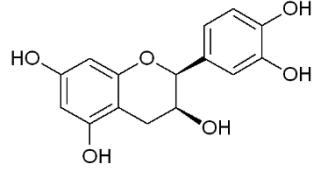
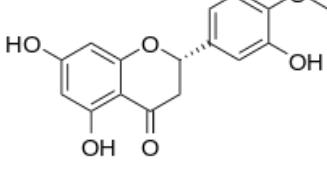
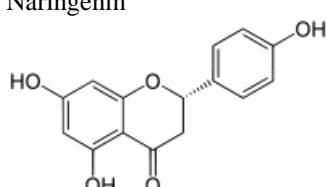
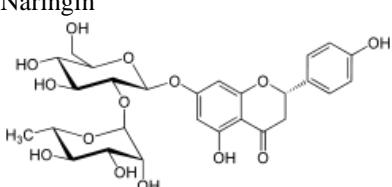
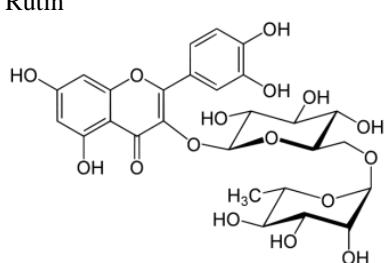
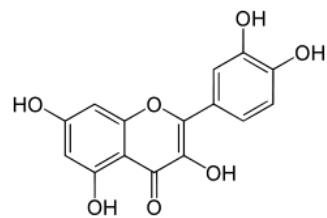
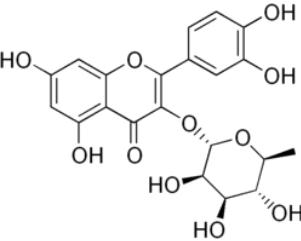
Podjetje EZ Biolabs (ZDA) je sintetiziralo 4 peptide, izolirane v selekciji na MGAM:

- Linearna peptida: NEISFHA (oznaka pA1) in GHLYDDP (pA5)
- Ciklične peptide (povezane preko disulfidne vezi med prvim in zadnjim cisteinom):
CTHYGFRGC (pC1) in CGHHHRDYC (pC2)

Pri vseh je bila C-končna karboksilna skupina amidirana. Čistost peptidov je bila nad 95 %. Identiteto je proizvajalec potrdil z masno spektrometrijo.

3.1.7 Spojine naravnega izvora

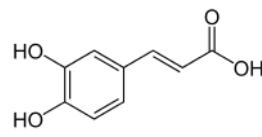
Preglednica 7: Seznam analiziranih spojin naravnega izvora po skupinah s strukturimi formulami.
Table 7: The list of groups of analyzed natural compounds and their structures.

Flavonoidi		
Katehin	Epikatehin	Hesperetin
		
Naringenin	Naringin	Rutin
		
Kvercetin	Kvercitrin	
		

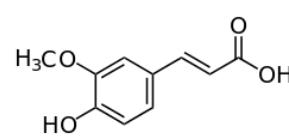
Nadaljevanje preglednice 7: Seznam analiziranih spojin naravnega izvora po skupinah s strukturnimi formulami.

Hidroksicimetove kislina

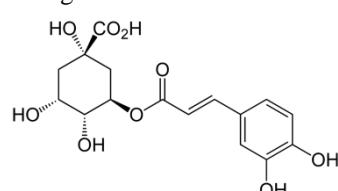
Kavna kislina



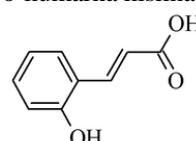
Ferulna kislina



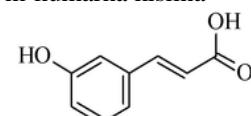
Klorogenska kislina



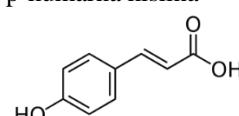
o-kumarna kislina



m-kumarna kislina

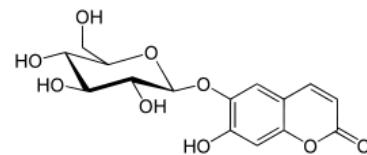


p-kumarna kislina

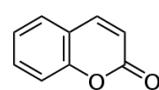


Kumarini

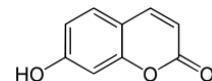
Eskulin



Kumarin

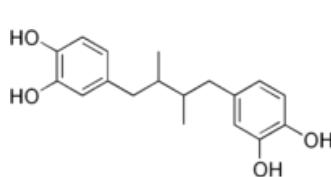


Umbeliferon

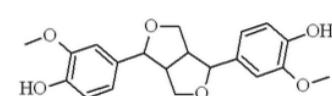


Lignani

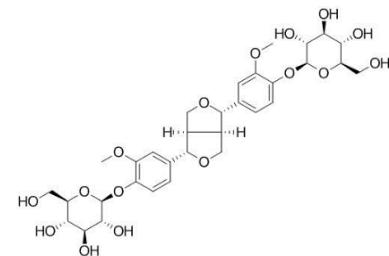
Nordihidrogvajaretnika kislina



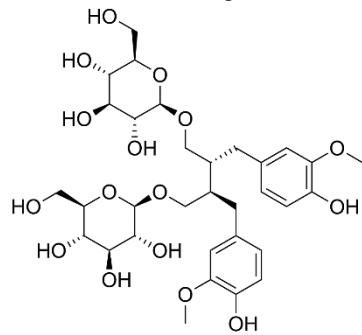
Pinoresinol



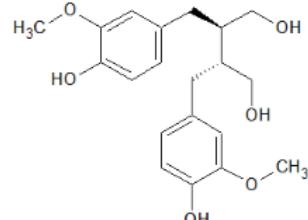
Pinoresinol diglukozid



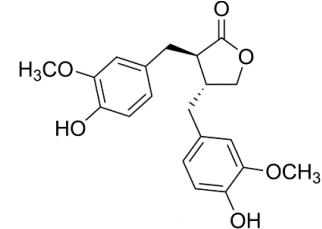
Sekoizolaricirezinol diglukozid



Sekolaricirezinol



Matairezinol

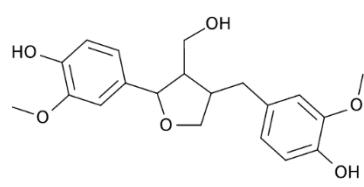


Se nadaljuje

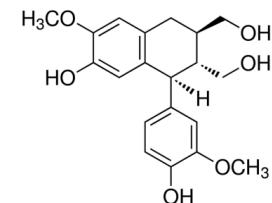
Nadaljevanje preglednice 7: Seznam analiziranih spojin naravnega izvora po skupinah s strukturnimi formulami.

Lignani

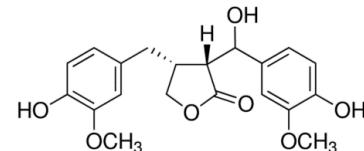
Laricirezinol



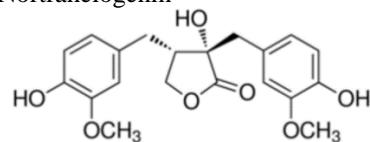
Izolaricirezinol



Hidroksimatairezinol

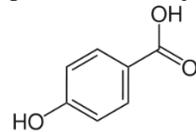


Nortrahelogenin

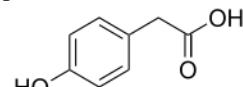


Hidroksibenzojske kislina

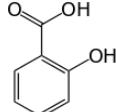
p-hidroksibenzojska kislina



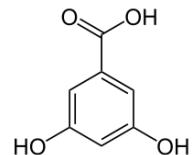
p-hidroksifenil acetna kislina



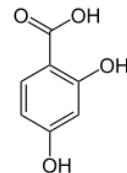
Salicilna kislina



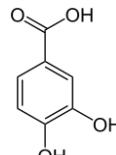
Alfa-resorcilna kislina



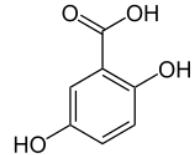
Beta-resorcilna kislina



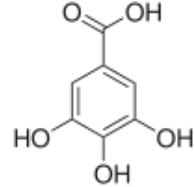
Protokatehuska kislina



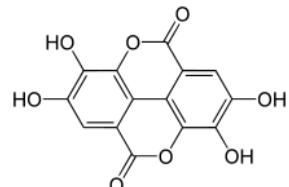
Gentizinska kislina



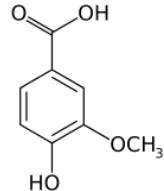
Galna kislina



Elagna kislina



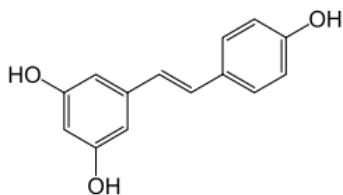
Vanilna kislina



Nadaljevanje preglednice 7: Seznam analiziranih spojin naravnega izvora po skupinah s strukturnimi formulami.

Stilbenoidi

Resveratrol



Vse spojine so bile analitične kakovosti. Večina spojin je bila kupljena pri podjetju Sigma-Aldrich (ZDA). Izjema so bili lignani: pinorezinol, laricirezinol, sekoizolaricirezinol diglukozid in nortrahelogenin, ki smo jih kupili pri podjetju PhytoLab (Nemčija).

Naravne spojine (za uporabo v metodah, opisanih pod poglavjem 3.2.2.1 – Rešetanje nabora naravnih spojin) smo raztopili v koncentraciji 50 mM v 25 % DMSO v vodi. Do različnih koncentracij (37,5 mM, 25 mM, 12,5 mM, 5 mM, 2,5 mM) smo jih redčili z vodo.

Devet lignanov, ki smo jih uporabili pri metodah, opisanih pod poglavjem 3.2.2.2 – Ocena aktivnosti izvlečka lesa in lubja bele jelke, smo pripravili v koncentraciji 1 mg/ml v 50 % metanolu v vodi.

3.1.8 Rastlinski izvlečki

- Izvleček lubja bele jelke: pridobljen z dvostopenjsko ekstrakcijo z vodo in etil acetatom (Fakulteta za farmacijo, UL)
- Izvleček lesa bele jelke: pridobljen z ekstrakcijo z vodo in sušenjem z razprševanjem (Alpe Pharma, Slovenija)
- Izvleček lesa pravega kostanja, Farmatan®: vodni izvleček (Tanin Sevnica, Slovenija)
- Standardizirani izvleček lubja obmorskega bora, Pycnogenol® (Biolandes, Francija)

Vse izvlečke smo pripravili v različnih koncentracijah z raztopljanjem v 25 % DMSO v vodi.

3.2 METODE

3.2.1 Peptidni zaviralci encimov, pridobljeni s selekcijo iz bakteriofagnih peptidno-predstavitev knjižnic

3.2.1.1 Selekcija peptidov na tarči maltaza-glukoamilaza

3.2.1.1.1 Izolacija encima alfa-glukozidaza iz oborine podganjega črevesa

Pri pripravi sesalske alfa-glukozidaze smo združili in priredili metode Yoshikawa in sod. (2010), Mohamed Sham Shihabudeen in sod. (2011) ter Oki in sod. (2000).

0,5 g oborine podganjega črevesa smo raztopili v 20 ml 0,1 M ledeno mrzlega fosfatnega pufra s 5 mM EDTA in 1 mM DTT, pH 7,0. Homogenat smo za 15 minut izpostavili ultrazvoku pri 4 °C, nato pa za 2 % volumna dodali Triton X-100 in krožno mešali 20 min. Dobljeno suspenzijo smo centrifugirali 30 minut pri 4 °C in 10.000 obr./min. Supernatant smo frakcioniranoobarjali s 30 % in 70 % amonijevim sulfatom ter suspenziji centrifugirali 30 min pri 50.000 obr./min. Dobljen precipitat z vmesno frakcijo proteinov smo resuspendirali v 2 ml 0,1 M fosfatnega pufra z 2 mM EDTA pH 7,0 in čez noč dializirali pri 4 °C proti istemu pufru. Dobljeni dializat je bil vir sesalske MGAM, ki smo jo uporabili kot tarčo pri selekcijah peptidov iz bakteriofagnih knjižnic.

Za namene ocenjevanja encimske aktivnosti smo raztopino encima dodatno prečistili. Dializat smo najprej z ultrafiltracijo skoncentrirali na 500 µl, nato pa izvedli anionsko izmenjevalno kromatografijo. Uporabili smo kolono HiPrep Q XL 16/10 (GE Healthcare, Avstrija), ekvilibrirano z 20 mM Tris pufrom pH 8,0. Eluirali smo z linearnim gradientom NaCl 0 – 1 M v 20 ml Tris pufru pH 8,0. Zbrali smo frakcije z alfa-glukozidazno aktivnostjo, ki smo jo določili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.1.8, in jih prečistili še z gelsko filtracijo. Uporabili smo kolono Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Avstrija). Za ekvilibracijo in spiranje smo uporabili 0,1 M fosfatni puffer z 2 mM EDTA in 150 mM NaCl pH 6,8. Združili smo frakcije z alfa-glukozidazno aktivnostjo, jih z ultrafiltracijo skoncentrirali na 1 ml ter dobljeno raztopino encima uporabili v nadalnjih eksperimentih.

3.2.1.1.2 Imobilizacija tarčne molekule

V prvi selekcijski stopnji: 60 µl (30 mg/ml) s proteinom G obloženih magnetnih kroglic (Dynabeads® Protein G) smo sprali s 100 µl 0,05 % PBST ter jim dodali 75 µl (200 mg/l) anti-MGAM poliklonskih protiteles. Inkubirali smo 30 minut z mešanjem pri 500 obr./min pri sobni temperaturi. Nato smo s pomočjo magneta odstranili supernatant in magnetne kroglice 3-krat sprali z 0,05 % PBST. Kroglicam z vezanimi protitelesi smo dodali 2 ml raztopine encima MGAM s koncentracijo proteinov 4 mg/ml ter inkubirali 45 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Po tem času smo supernatant odstranili, komplekse magnetnih kroglic z vezanimi protitelesi in imunoprecipitiranim encimom pa smo 5-krat sprali z 0,1 %

PBST. Komplekse smo na koncu resuspendirali v 600 µl 0,1 % PBST ter jih enakomerno razdelili v 6 mikrocentrifugirk, kjer smo jih uporabili kot imobilizirano tarčo v afinitetnih selekcijah.

V drugi in tretji selekcijski stopnji: uporabili smo 120 µl magnetnih kroglic in 150 µl protiteles. Protokol je bil enak kot v prvi selekcijski stopnji. Po vezavi protiteles smo komplekse kroglic in protiteles resuspendirali v 450 µl 0,05 % PBST ter to razdelili na 2 dela: 150 µl za imunoprecipitacijo in 300 µl, ki smo jih razdelili v 6 mikrocentrifugirk po 50 µl, namenjenih za subtraktivni korak. Kroglicam, namenjenim za selekcijo, smo dodali 800 µl raztopine encima MGAM ter inkubirali 1h. Komplekse smo nato 5-krat sprali, resuspendirali v 600 µl 0,1 % PBST ter jih razdelili v 6 mikrocentrifugirk po 100 µl, ki smo jih uporabili v šestih selekcijskih protokolih.

3.2.1.1.3 Afinitetna selekcija

Delali smo s tremi različnimi komercialno dostopnimi bakteriofagnimi knjižnicami: z linearima Ph.D.- 7TM in Ph.D.-12TM ter s ciklično Ph.D.-c7cTM. Pri vsaki knjižnici smo uporabili tako specifičen kot nespecifičen način elucije. Na ta način smo izvedli 6 neodvisnih selekcij, vsako s tremi stopnjami ter subtraktivnim korakom pred 2. in 3. stopnjo.

Alikvote suspenzij bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic po 2×10^{11} pfu smo resuspendirali vsakega v 100 µl 0,05 % PBST ter jih dodali k prej pripravljenim magnetnim kroglicam z imunoprecipitirano tarčno molekulo MGAM. Inkubirali smo 60 min pri sobni temperaturi z rahlim mešanjem pri 500 obr./min.

Pri subtraktivnem koraku, v drugi in tretji stopnji selekcij, smo pomnoženi eluat iz prejšnje stopnje selekcije najprej dodali k magnetnim kroglicam z vezanimi protitelesi, brez tarčne molekule. Po 30 minutah inkubacije z rahlim mešanjem pri sobni temperaturi smo supernatant prenesli h kroglicam z vezano tarčno molekulo ter inkubirali 60 minut.

Kroglice smo potem 10-krat sprali z 0,1 % PBST, da smo odstranili nevezane bakteriofage. Vezane bakteriofage smo nato eluirali s specifično oz. nespecifično elucijo. Pri specifični eluciji smo uporabili 400 µl raztopine 0,5 mM akarboze ter 0,5 mM vogliboze v 0,05 % PBST, inkubirali 60 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Eluat smo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Pri nespecifični eluciji smo uporabili 400 µl 0,2 M glicinskega pufra pH 2,2. Inkubirali smo 10 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi, eluat pa takoj nevtralizirali z 80 µl 1 M Tris pufra pH 9,1.

3.2.1.1.4 Pomnoževanje in čiščenje eluiranih bakteriofagov

Eluirane bakteriofage smo pomnožili v gostiteljski bakteriji *Escherichia coli* ER2738. 20 ml gojišča LB z dodatkom tetraciklina smo inokulirali s kolonijo *E. coli* in stresali pri 37 °C do začetne eksponentne faze rasti (OD_{600} 0,01 – 0,05). V tej fazи smo bakterijski kulturi dodali

eluat bakteriofagov ter jih s stresanjem pri 37 °C pomnoževali 4,5 h. Po tem času smo bakterijske celice odstranili z dvema cikloma centrifugiranja po 10 min pri 10.000 obr./min in 4 °C, supernatant s pomnoženimi bakteriofagi pa smo prenesli v novo centrifugirko.

Fagne delce smo prečistili z dvema zaporednima obarjanjem z raztopino 20 % PEG-8000 in 2,5 M NaCl. Supernatantu smo dodali raztopino PEG/NaCl do 1/6 volumna ter obarjali čez noč pri 4 °C. Oborjene fage smo ločili od supernatanta z dvema zaporednima centrifugiranjema po 15 min pri 10.000 obr./min in 4 °C. Oborino smo resuspendirali v 1 ml PBS pH 7,4 ter dodali raztopino PEG/NaCl do 1/6 volumna. Obarjali smo 1 h na ledu, nato pa s centrifugiranjem 10 min pri 10.000 obr./min in 4 °C odstranili supernatant. Oborjene, pomnožene, bakteriofage smo suspendirali v 200 µl PBS pufru in jih uporabili v naslednji selekcijski stopnji.

Po končani tretji stopnji selekcije smo z nepomnoženim eluatom bakteriofagov okužili bakterijske celice *E.coli* ER2738, ki smo jih gojili na ploščah z gojiščem LB z dodanima raztopinama 1 M IPTG in 2 % X-gal. Iz vsake od 6 selekcij smo iz tako dobljenih plošč naključno izbrali 20–40 plakov (posameznih bakteriofagnih klonov), ki smo jih individualno pomnožili in očistili za nadaljnje analize.

3.2.1.1.5 Določanje vezave izbranih bakteriofagnih klonov na tarčni protein

Afiniteto izoliranih bakteriofagnih klonov do tarčne molekule smo kvalitativno ocenili s testom ELISA. V dolbinice mikrotitrsko plošče smo prekrili s 50 µl 5 µg/ml raztopine anti-MGAM protiteles v pufru PBS in inkubirali čez noč pri 4 °C. Preostalo površino vdolbinic smo nato 90 min blokirali z 2 % BSA/PBS pri sobni temperaturi. Ploščo smo 3-krat sprali z 0,1 % PBST, nato pa v polovico vdolbinic dodali 50 µl dializata MGAM ter inkubirali z rahlim stresanjem 60 min pri sobni temperaturi ter spet sprali 3-krat z 0,1 % PBST. Druga polovica plošče je bila pripravljena brez dodatka tarčne molekule in namenjena negativni kontroli oz. določitvi stopnje vezave fagnih klonov na ozadje – t.j. na samo ploščico ali protitelesa, uporabljeni v selekciji. V vsako vdolbinico smo nato vnesli suspenzijo 5×10^9 pfu posameznih klonov v 0,05 % PBST in inkubirali 60 min pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem. Po tem času smo nevezane bakteriofage iz vdolbinic 5-krat sprali z 0,1 % PBST. Vezane fage smo detektirali z raztopino monoklonskih protiteles proti bakteriofagom M13, označenimi s hrenovo peroksidazo, redčeno z blokirnim pufrom v razmerju 1:5000. 200 µl protiteles na vdolbinico smo inkubirali 1h pri sobni temperaturi, nato pa vdolbinice 5-krat sprali z 0,1 % PBST. Za vizualizacijo smo uporabili substrat TMB (200 µl na vdolbinico), reakcijo pa smo ustavili z 2 M H₂SO₄ (50 µl na vdolbinico). Z optičnim čitalcem (Tecan Safire) smo izmerili absorbanci pri 450 nm ter izbrali 21 bakteriofagnih klonov z najvišjim razmerjem absorbanc encim/ozadje, katerim smo v nadaljevanju določali sekvene DNA.

3.2.1.1.6 Sekvenciranje DNA

Iz izbranih bakteriofagnih klonov smo izolirali bakteriofagno DNA. Izbrane bakteriofagne klone smo oborili s PEG/NaCl ter s centrifugiranjem odstranili supernatant. Proteine plašča bakteriofagov smo denaturirali s 150 µl jodidnega pufra (10 mM Tris pufer pH 8,0 z 1 mM EDTA in 4 M NaI) ter DNA oborili s 375 µl 95 % etanola. Po 10 min inkubaciji pri sobni temperaturi smo centrifugirali 10 min pri 10.000 obr./min ter usedlino sprali s 100 µl 70 % etanola. Supernatant smo odstranili s centrifugiranjem 5 min pri 10.000 obr./min, izolirano DNA pa 1 h sušili v aseptični komori. Za sekvenciranje smo DNA nato raztopili v 20 µl vode ter pripravili vzorec po navodilih podjetja GATC Biotech iz Nemčije, ki je opravilo sekvenciranje. Dobljene sekvence DNA smo prevedli v aminokislinska zaporedja fuzijskih peptidov. Le-ta smo skrbno pregledali s pomočjo internetnih baz mimotopov (npr. BDB: <http://immunet.cn/bdb/> in SAROTUP: <http://immunet.cn/sarotup/>), da smo iz nabora peptidov odstranili tarčno nespecifične vezalce.

3.2.1.1.7 Določanje kompeticije bakteriofagov ter izbranih sinteznih peptidov ali kompetitivnih inhibitorjev za vezavo na tarčni protein

Mikrotitrsko ploščico smo pripravili na enak način kot pri zgoraj opisanem bakteriofagnem ELISA testu. Blokirane testne vdolbinice smo pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem 30 min inkubirali s 50 µl raztopine 0,5 mM akarboze/0,5 mM vogliboze oziroma 50 µl 0,1 mM raztopin sinteznih peptidov v 0,05 % PBST. Na ta način so sintezni peptidi ali kompetitivni inhibitorji zapolnili domnevna vezavna mesta za fage na imobiliziranih molekulah encima. V ustrezne vdolbinice smo potem dodali 5×10^9 pfu bakteriofagov s predstavljenim peptidom, enakim sinteznemu, s katerim smo predhodno zapolnili vezavna mesta encima. Po 45 min inkubacije pri sobni temperaturi smo vdolbinice 5-krat sprali ter nadaljevali detekcijo vezave bakteriofagov na enak način kot v primeru zgoraj opisanega ELISA testa.

3.2.1.1.8 Encimski test s sinteznimi peptidi

Metoda določanja encimske aktivnosti za alfa-glukozidazo je bila povzeta po literaturi (Matsui in sod., 2009). Encim, dodatno prečiščen z anionsko izmenjevalno kromatografijo in gelsko filtracijo, smo redčili 5000-krat v fosfatnem pufru pH 6,8. Deset min smo pri 37 °C inkubirali 55 µl raztopine encima in 20 µl raztopine 0,5 mM akarboze/0,5 mM vogliboze ali raztopine sinteznih peptidov v končni koncentraciji 1,2 mM. Kot substrat smo dodali 50 µl 0,08 mM 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (4-MUG) v fosfatnem pufru pH 6,8. Reakcijo smo inkubirali pri 37 °C 120 min, nato smo jo ustavili z dodatkom 75 µl 0,2 M Na₂CO₃. Aktivnost alfa-glukozidaze smo določili za meritvijo fluorescence sproščenega aniona 4-metilumbelifera na pri λ_{ex} 365 nm in λ_{em} 445 nm (Tecan Safire).

3.2.1.2 Selekcija peptidov na tarči dipeptidil-peptidaza 4

3.2.1.2.1 Afinitetna selekcija

Naredili smo selekcije iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic po petih različnih protokolih. Vsaka selekcija je bila narejena v treh stopnjah z razlikami, ki so so prikazane v preglednici 8 in opisane v nadaljevanju.

Preglednica 8: Povzetek glavnih karakteristik posameznih selekcijskih protokolov, uporabljenih na tarčni molekuli DPP4. S – specifična elucija, NS – nespecifična elucija, SK – subtraktivni korak, NS – negativna selekcija.

Table 8: Summary of main characteristics of different biopanning protocols used with DPP4 as a target molecule. S – specific elution, NS – non-specific elution, SK – subtractive selection step, NS – negative selection.

Protokol	Imobilizacija tarče	Bakteriofagna knjižnica	Način elucije	Subtraktivni korak (SK) /negativna selekcija (NS)	Vezava v raztopini
A	Magnetne kroglice s proteinom G + protitelesa proti His oznaki	Ph.D.-c7c™	S in NS	SK	DA
B	MaxiSorp® polistirenske ploščice	Ph.D.-c7c™	S in NS	SK	NE
C	MaxiSorp® polistirenske ploščice	Ph.D.-7™, Ph.D.-12™	S in NS	NS	NE
D	Kovalentna vezava na magnetne kroglice	Ph.D.-7™, Ph.D.-12™, Ph.D.-c7c™	S in NS	NS	NE
E	Magnetne kroglice s proteinom G + protitelesa proti His oznaki	Ph.D.-7™, Ph.D.-12™, Ph.D.-c7c™	S in NS	SK	NE

3.2.1.2.1.1 Protokol A

Naredili smo 2 selekciji (s specifičnim ter nespecifičnim načinom elucije) iz knjižnice Ph.D.-c7c™. Vsaka selekcija je obsegala 3 stopnje.

Prva selekcjska stopnja:

Vezava Ab na magnetne kroglice: 15 µl (30 mg/ml) s proteinom G obloženih magnetnih kroglic smo sprali s 100 µl 0,05 % PBST ter jim dodali 7,2 µl (0,5 mg/ml) protiteles proti histidinski oznaki. Inkubirali smo 30 minut z mešanjem pri 500 obr./min pri sobni temperaturi. Nato smo s pomočjo magneta odstranili supernatant in magnetne kroglice 3-krat sprali z 0,05 % PBST ter jih resuspendirali v 100 µl 0,05 % PBST.

Selekcija v raztopini: V drugi mikrocentrifugirki smo zmešali 7 µl raztopine DPP4 (0,5 mg/ml) in 10 µl (2×10^{11} pfu) knjižnice Ph.D.-c7c™. Inkubirali smo 1h pri 500 obr./min in sobni temperaturi.

Afinitetna vezava tarče: Raztopino kompleksov fag-tarča (ter preostanka nevezanih fagov) smo prenesli k magnetnim kroglicam z vezanimi protitelesi proti polihistidinskemu repku na rekombinantnem DPP4. Inkubirali smo 1 h pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Potem smo magnetne kroglice 10-krat sprali z 1 ml 0,1 % PBST.

Elucija: Vezane fage smo najprej eluirali s specifično elucijo. Dodali smo 400 µl 1 mM sitagliptina v 0,05 % PBST ter inkubirali 1 h pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Po tem času smo fage dodatno eluirali z nespecifično elucijo s 400 µl 0,2 M glicinskega pufra, pH 2,2. Po 10 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi smo dodali 80 µl nevtralizacijskega pufra (1 M Tris pufer pH 9,1). Eluata obeh načinov elucij smo pomnožili ter v naslednjih stopnjah selekcije uporabili ločeno.

Druga in tretja selekcijska stopnja

Vezava Ab na magnetne kroglice: 30 µl (30 mg/ml) s proteinom G obloženih magnetnih kroglic smo sprali z 200 µl 0,05 % PBST ter jim dodali 14,4 µl (0,5 mg/ml) protiteles proti histidinski oznaki. Inkubirali smo 30 minut z mešanjem pri 500 obr./min pri sobni temperaturi. Nato smo s pomočjo magneta odstranili supernatant in magnetne kroglice 3-krat sprali z 0,05 % PBST ter jih resuspendirali v 600 µl 0,05 % PBST. Suspenzijo smo razdelili v 4 mikrocentrifugirke: 2-krat po 200 µl za subtraktivni korak (s specifično oz. nespecifično elucijo) ter 2-krat po 100 µl za vezavo kompleksov fagi-tarča.

Subtraktivni korak: K 200 µl resuspendiranih kroglic z vezanimi protitelesi smo primešali 2×10^{11} pfu pomnoženega eluata iz prejšnje stopnje ter inkubirali 30 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi.

Selekcija v raztopini: Supernatant iz subtraktivnega koraka smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter dodali 3 µl 0,5 mg/ml raztopine DPP4. Inkubirali smo 1 h pri 500 obr./min in sobni temperaturi.

Afinitetna vezava kompleksov bakteriofag – tarča: Raztopino kompleksov fag-tarča (ter preostanka nevezanih fagov) smo prenesli k magnetnim kroglicam z vezanimi protitelesi proti polihistidinskemu repku na rekombinantnem DPP4. Inkubirali smo 1 h pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Potem smo magnetne kroglice 10-krat sprali z 1 ml 0,1 % PBST.

Elucija: Vezane fage smo ločeno eluirali s specifično oz. nespecifično elucijo. Pri specifični eluciji smo dodali 400 µl 1 mM sitagliptina v 0,05 % PBST ter inkubirali 1h pri 500 obr./min in sobni temperaturi. Pri nespecifični eluciji smo dodali 400 µl 0,2 M glicinskega pufra pH 2,2. Po 10 min pri 500 obr./min in sobni temperaturi smo dodali 80 µl nevtralizacijskega pufra (1 M Tris pufer pH 9,1).

3.2.1.2.1.2 Protokol B

Naredili smo 2 selekciji (s specifičnim ter nespecifičnim načinom elucije) iz knjižnice Ph.D.-c7cTM. Vsaka selekcija je obsegala 3 stopnje.

Prva selekcijska stopnja

Za pasivno adsorpcijo tarče na polistirensko ploščo smo 100 µl DPP4 v koncentraciji 10 µg/ml v PBS čez noč (4 °C, 45 obr./min) vezali v vdolbinico mikrotitrske ploščice MaxiSorp®. Nevezano površino smo potem blokirali z 250 µl 2 % BSA 90 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Po tem času smo vdolbinico 3-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST ter dodali 2×10¹¹ pfu knjižnice Ph.D.-c7cTM v 100 µl 0,1 % PBST. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 obr./min, potem smo vdolbinico 10-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST, da smo odstranili nevezane bakteriofage. Vezane fage smo eluirali najprej specifično z 1 h inkubacijo pri sobni temperaturi in 50 obr./min s 100 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST. Nato smo eluirali še nespecifično s 100 µl 0,2 M glicinskega pufra s pH 2,2 10 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min, nato smo eluat takoj nevtralizirali z 20 µl 1M Tris pufra pH 9,1. Oba eluata smo pomnožili in v naslednjih stopnjah selekcije uporabili ločeno.

Druga in tretja selekcijska stopnja

Čez noč smo pri 4 °C in 45 obr./min v 2 vdolbinici vezali 100 µl 10 µg/ml DPP4 v PBS, v drugi dve vdolbinici pa 100 µl 2% BSA (za subtraktivni korak). Naslednji dan smo vdolbinice sprali z 0,1 % PBST, nato pa v vdolbinici, pripravljeni za subtraktivni korak, dodali 2×10¹¹ pfu pomnoženega eluata iz prejšnje stopnje v 100 µl PBS, ločeno za selekcije s specifičnim ter selekcije z nespecifičnim načinom elucije. Inkubirali smo 30 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Hkrati smo blokirali vdolbinici z vezano tarčo z 250 µl 2 % BSA, 90 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Vdolbinici za selekcijo smo 3-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST. Nato smo nevezano frakcijo pomnoženega eluata po subtraktivni vezavi na BSA prenesli v vdolbinici z vezano tarčo (ločeno za specifično in nespecifično elucijo) in hibridizirali 60 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Po tem času smo vdolbinici 10-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST, vezane bakteriofage pa eluirali specifično (100 µl 2 mM sitagliptin v 0,05 % PBST, 1h pri sobni temperaturi in 50 obr./min) ali nespecifično (100 µl 0,2 M glicinskega pufra pH 2,2, 10 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min, takoj nato nevtralizacija z 20 µl 1M Tris pufra pH 9,1).

3.2.1.2.1.3 Protokol C

Naredili smo 4 selekcije: pri vsaki izmed dveh knjižnic (Ph.D.-7TM, Ph.D.-12TM) smo uporabili tako specifični kot nespecifični način elucije. Vsaka selekcija je obsegala 3 stopnje.

Prva selekcijska stopnja

V 4 vdolbinice MaxiSorp® mikrotitrsko ploščico smo čez noč (4 °C, 45 obr./min) vezali 100 µl DPP4 v koncentraciji 10 µg/ml v PBS. Naslednji dan smo nevezano površino vdolbinic blokirali z 250 µl 2 % BSA 90 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Po tem času smo vdolbinico 3-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST ter v dve vdolbinici dodali 2×10^{11} pfu knjižnice Ph.D.-7™ v 100 µl 0,1 % PBST, v drugi dve pa 2×10^{11} pfu knjižnice Ph.D.-12™ v 100 µl 0,1 % PBST. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Po tem času smo vdolbinico 10-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST, da smo odstranili nevezane bakteriofage. Vezane fage smo eluirali pri vsaki knjižnici iz ene vdolbine specifično z 1 h inkubacijo pri sobni temperaturi in 50 obr./min s 100 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST ter iz druge vdolbine nespecifično s 100 µl 0,2 M glicinskega pufra s pH 2,2 10 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min, nato smo eluat takoj nevtralizirali z 20 µl 1M Tris pufra pH 9,1.

Druga in tretja selekcijska stopnja

V 4 vdolbinice MaxiSorp® mikrotitrsko ploščico smo čez noč pri 4 °C in 45 obr./min vezali 100 µl DPP4 v koncentraciji 10 µg/ml v PBS. Naslednji dan smo nevezano površino vdolbinic blokirali z 250 µl 2 % BSA 90 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Hkrati smo na enak način blokirali dodatne 4 vdolbinice, namenjene za negativno selekcijo. Vdolbinice smo nato 3-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST ter v vsako vdolbinico z vezano tarčo dodali 2×10^{11} pfu pomnoženega eluata (ločeno za knjižnici Ph.D.-7™ in Ph.D.-12™ ter za specifičen oz. nespecifičen način elucije) iz prejšnje stopnje v 100 µl 0,1 % PBST. Inkubirali smo 1 h pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Po tem času smo vdolbinico 10-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST, da smo odstranili nevezane bakteriofage. Vezane fage smo eluirali iz ustreznih vdolbinic specifično (1 h inkubacija pri sobni temperaturi in 50 obr./min s 100 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST) ali nespecifično (s 100 µl 0,2 M glicinskega pufra pH 2,2 10 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min, nato smo eluat takoj nevtralizirali z 20 µl 1M Tris pufra s pH 9,1). Eluate smo nato prenesli v prej pripravljene blokirane vdolbinice in inkubirali 30 min (RT, 50 obr./min). Shranili smo supernatant ter mu dodali še supernatant po 2-kratnem spiranju s 100 µl 0,1 % PBST. Teh 300 µl skupaj je predstavljalo nepomnoženi eluat, ki smo ga pomnožili in uporabili v naslednji stopnji.

3.2.1.2.1.4 Protokol D

Izvedli smo 6 selekcij: iz vsake izmed treh knjižnic (Ph.D.-7™, Ph.D.-12™ in Ph.D.-c7c™) po eno s specifičnim in eno z nespecifičnim načinom elucije. Vsaka selekcija je obsegala 3 stopnje.

Kovalentna vezava DPP4 na magnetne kroglice

K 110 µl s tozilno skupino aktiviranih magnetnih kroglic (Dynabeads M-280 Tosylactivated, Invitrogen, Norveška) smo dodali 1 ml pufra B, jih resuspendirali, odstranili supernatant, ter dodali 110 µl pufra B. Z magnetom smo odstranili supernatant ter dodali 80 µl DPP4 (0,5 mg/ml) in 70 µl pufra B ter močno premešali. Dodali smo 100 µl pufra C ter spet močno premešali. Inkubirali smo čez noč pri 37 °C z rahlim mešanjem. Naslednji dan smo z magnetom odstranili supernatant in dodali 1 ml pufra D ter inkubirali 1 h pri 37 °C z rahlim mešanjem. Odstranili smo supernatant in kroglice 2-krat sprali z 1 ml pufra E. Na koncu smo magnetne kroglice z vezanim encimom suspendirali v 110 µl pufra E, kar smo razdelili med 3 selekcijske stopnje: 42 µl za prvo stopnjo, 36 µl za drugo stopnjo in 30 µl za tretjo stopnjo. Z zmanjševanjem količine tarče v selekciji smo zaostrovali selekcijske pogoje z namenom izolacije peptidov z višjimi afinitetami vezave na tarčni encim.

Prva selekcijska stopnja

42 µl magnetnih kroglic z vezanim encimom DPP4 smo razdelili v 6 mikrocentrifugirk k 50 µl 0,05 % PBST (uporabili smo 3 knjižnice in 2 načina elucije – skupaj 6 selekcij) po 7 µl kroglic. Iz vsake knjižnice smo 2×10^{11} pfu fagov resuspendirali v 100 µl 0,05 % PBST ter to dodali pripravljenim magnetnim kroglicam. Inkubirali smo 1 h (RT, 500 obr./min). Sledilo je 10-kratno spiranje s 600 µl 0,1 % PBST. Vezane bakteriofage smo eluirali specifično (400 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST, 1 h, 500 obr./min, RT) oz. nespecifično (400 µl glicinskega pufra pH 2,2, 10 min, 500 obr./min, ST in takojšnja nevtralizacija z 80 µl 1 M Tris pufra, pH 9,1).

Druga in tretja selekcijska stopnja

36 µl (v drugi stopnji) oz. 30 µl (v tretji stopnji) magnetnih kroglic z vezanim encimom DPP4 smo razdelili v 6 mikrocentrifugirk k 50 µl 0,05 % PBST (3 knjižnice in 2 načina elucije – skupaj 6 selekcij) po 6 µl (v drugi stopnji) oz. 5 µl (v tretji stopnji) kroglic. 2×10^{11} pfu pomnoženega eluata iz prejšnje stopnje selekcije smo resuspendirali v 100 µl 0,05 % PBST ter to dodali pripravljenim magnetnim kroglicam. Inkubirali smo 1 h (RT, 500 obr./min). Sledilo je 10-kratno spiranje s 600 µl 0,1 % PBST. Vezane bakteriofage smo eluirali specifično (400 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST, 1 h, 500 obr./min, ST) oz. nespecifično (400 µl glicinskega pufra s pH 2,2, 10 min, 500 obr./min, ST in takojšnja nevtralizacija z 80 µl 1 M Tris pufra, pH 9,1). Nepomnoženi eluat smo prenesli na predhodno blokirano (2 % BSA) MaxiSorp® mikrotitrsko ploščico ter inkubirali 30 min pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Nevezano frakcijo fagov smo prenesli v mikrocentrifugirko in vdolbinice še enkrat sprali z 0,1 % PBST ter supernatante združili z nevezanimi fagi. Nepomnožene eluate smo pomnožili in uporabili v naslednji selekcijski stopnji.

3.2.1.2.1.5 Protokol E

Naredili smo 6 selekcij: iz vsake izmed treh bakteriofagnih knjižnic (Ph.D.-7TM, Ph.D.-12TM in Ph.D.-c7cTM), po eno na vsakega izmed dveh načinov elucije. Vsaka selekcija je obsegala 3 stopnje.

Prva selekcijska stopnja

60 µl magnetnih kroglic s proteinom G smo dodali 30 µl protiteles proti polihistidinskemu repku rekombinantnega DPP4, redčenih v 300 µl 0,05 % PBST. Inkubirali smo 20 min pri sobni temperaturi in 350 obr./min. Nato smo odstranili supernatant in kroglice 3-krat sprali z 250 µl 0,05 % PBST. Po koncu spiranja smo odstranili supernatant in dodali 34,5 µl DPP4 (0,5 mg/ml) v 250 µl 0,05 % PBST. Inkubirali smo 45 min pri sobni temperaturi in 350 obr./min. Supernatant smo nato odstranili, komplekse magnetnih kroglic s protitelesi in encimom pa 2-krat sprali z 250 µl 0,05 % PBST. Nato smo jih resuspendirali v 600 µl 0,05 % PBST in jih razdelili v 6 mikrocentrifugirk po 100 µl, za vsako knjižnico in način elucije eno. Temu smo dodali 2×10^{11} pfu iz posamezne knjižnice, resuspendirane v 100 µl 0,05 % PBST ter inkubirali 1 h pri sobni temperaturi in 500 obr./min. Nevezane bakteriofage smo nato odstranili z 10-kratnim spiranjem s 600 µl 0,1 % PBST. V eni selekciji iz vsake knjižnice smo vezane fage eluirali specifično z 1 h inkubacijo (ST, 500 obr./min) s 400 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST, v drugi selekciji pa nespecifično z 10 min inkubacijo (RT, 500 obr./min) s 400 µl 0,2 M glicinskega pufra s pH 2,2 ter takojšnjo nevtralizacijo eluata z 80 µl 1M Tris pufra s pH 9,1.

Druga in tretja selekcijska stopnja

Uporabili smo 120 µl magnetnih kroglic s proteinom G, od tega 60 µl za subtraktivni korak in 60 µl za selekcijo na tarči. Kroglicam, namenjenim za subtraktivni korak, smo dodali 30 µl protiteles proti polihistidinu, redčenih v 300 µl 0,05 % PBST. Medtem ko smo kroglicam, namenjenim za selekcijo na tarči, dodali 25 µl (v drugi stopnji) oz. 21 µl (v tretji stopnji) protiteles proti polihistidinu. Inkubirali smo 20 min z rahlim mešanjem (350 obr./min) pri sobni temperaturi. Nato smo odstranili supernatant in kroglice 2-krat sprali z 250 µl 0,05 % PBST. Kroglice, namenjene subtraktivnemu koraku, smo nato resuspendirali v 600 µl 0,05 % PBST ter jih razdelili v 6 mikrocentrifugirk po 100 µl. Dodali smo jim 2×10^{11} pfu fagov pomnoženega eluata iz prejšnje stopnje v 100 µl 0,05 % PBST ter inkubirali 30 min (RT, 350 obr./min). Kroglice, namenjenim za selekcijo na tarči, smo resuspendirali v 250 µl 0,05 % PBST ter jim dodali 29 µl (v drugi stopnji) oz. 25 µl (v tretji stopnji) DPP4 (0,5 mg/ml) in inkubirali 45 min (500 obr./min, RT). Komplekse kroglic s protitelesi in encimom smo nato 2-krat sprali z 250 µl 0,05 % PBST, jih resuspendirali v 600 µl 0,05 % PBST in jih razdelili v 6 mikrocentrifugirk po 100 µl, za vsako knjižnico in način elucije eno. Temu smo dodali 200 µl nevezane frakcije pomnoženega eluata iz prej narejenega subtraktivnega koraka ter inkubirali 60 min pri sobni temperaturi in 500 obr./min. Nevezane bakteriofage

smo odstranili z 10-kratnim spiranjem s 600 µl 0,1 % PBST. Vezane fage smo eluirali specifično – z 1h inkubacijo (ST, 500 obr./min) s 400 µl 2 mM sitagliptina v 0,05 % PBST, oz. nespecifično – z 10 min inkubacijo (ST, 500 obr./min) s 400 µl 0,2 M glicinskega pufra s pH 2,2 ter takojšnjo nevtralizacijo eluata z 80 µl 1 M Tris pufra s pH 9,1.

3.2.1.2.2 Pomnoževanje in čiščenje eluiranih bakteriofagov

Pomnoževanje in čiščenje bakteriofagov je potekalo kot je opisano v poglavju 3.2.1.1.4.

Po končani tretji stopnji selekcije smo z nepomnoženim eluatom bakteriofagov okužili bakterijske celice *E.coli* ER2738, ki smo jih gojili na ploščah z LB gojiščem z dodanima raztopinama 1 M IPTG in 2 % X-gal. Iz vsake od 20 selekcij smo iz tako dobljenih plošč naključno izbrali 20 – 40 plakov (posameznih bakteriofagnih klonov), ki smo jih individualno pomnožili ter očistili za nadaljnje analize.

3.2.1.2.3 Sekvenciranje DNA

Postopek izolacije in sekvenciranja DNA ter obravnave aminokislinskih zaporedij sta bila enaka kot v poglavju 3.2.1.1.6.

3.2.1.2.4 Določanje vezave izbranih bakteriofagnih klonov na tarčni protein

Ocena vezave na tarčo in ozadje: afiniteto izoliranih bakteriofagnih klonov do tarčne molekule smo ocenili s testom ELISA. Vdolbinice mikrotitrsko plošče smo prekrili s 65 µl 10 µg/ml raztopine DPP4 v pufru PBS in inkubirali čez noč pri 4 °C. Pri oceni vezave klonov iz protokolov A in E na v selekciji-uporabljeni protitelesa proti polihistidinu, smo pripravili še vdolbinice mikrotitrsko plošče, ki smo jih čez noč inkubirali s 50 µl teh istih protiteles v koncentraciji 5 µg/ml. Prosto površino vdolbinic ter dodaten set vdolbinic za oceno nespecifične vezave bakteriofagov na BSA smo nato 90 min blokirali z 250 µl 2 % BSA v PBS pri sobni temperaturi in 50 obr./min. Ploščo smo 3-krat sprali z 250 µl 0,1 % PBST. Nato smo v vsako vdolbinico vnesli raztopino s 5×10^9 pfu posameznih klonov v 100 µl PBS in inkubirali 1 h pri sobni temperaturi z rahlim stresanjem. Po tem času smo nevezane bakteriofage iz vdolbinic 5-krat sprali z 0,1 % PBST. Vezane bakteriofage smo zasledili kot v poglavju 3.2.1.1.5.

Ocena vezave bakteriofagnih klonov na Fc fragmente protiteles: vdolbinice mikrotitrsko ploščice smo prekrili s 50 µl protiteles proti polihistidinu (5 µg/ml) v PBS ter inkubirali čez noč pri 4 °C, kot je opisano zgoraj. Vzporedni set vdolbinic smo prekrili s 50 µl 5000-krat redčenih mišjih sekundarnih protiteles in ga prav tako inkubirali čez noč pri 4 °C. Nadaljnji postopek testa je bil enak kot pri zgoraj opisani oceni vezave fagov na tarčo in ozadje.

3.2.1.2.5 Test encimske aktivnosti dipeptidil-peptidaze 4

Določali smo encimsko aktivnost DPP4 imobiliziranega na 3 različne načine, kot v protokolih selekcij C, D in E. Metoda za določanje encimske aktivnosti za DPP4 je bila povzeta po literaturi (Matheeußen in sod., 2012). Uporabili smo fluorescenčni substrat glicil-prolil-7-amino-4-metilkumarin (GP-AMC). Za nevezani encim smo uporabili 10 µl raztopine encima DPP4 v koncentraciji 5 µg/ml. Za DPP4, vezan na magnetne kroglice (kovalentno ali preko protiteles), smo uporabili 10 µl suspenzije kroglic, pripravljenih za selekcije po protokolih D in E. Za DPP4, adsorbiran na polistirensko ploščico, smo predhodno čez noč vezali 100 µl raztopine encima v koncentraciji 10 µg/ml, kakor v protokolu B. Encim smo nato sprali in v vdolbinico dodali 10 µl 0,5 mM Tris pufr s pH 8,3. K tako imobiliziranim vzorcem encima smo dodali 100 µl 0,5 mM GP-AMC v 0,5 mM Tris pufru s pH 8,3. Aktivnost DPP4 smo merili kinetično 30 minut pri 37 °C z meritvijo hitrosti sproščanja AMC iz substrata pri valovnih dolžinah λ_{ex} 360 nm in λ_{em} 460 nm s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic (Tecan Safire).

3.2.2 Zaviralci encimov, pridobljeni z rešetanjem naravnih spojin ter analizo izvlečkov lesa in lubja bele jelke

3.2.2.1 Rešetanje nabora naravnih spojin

3.2.2.1.1 Test aktivnosti alfa-glukozidaze (EC 3.2.1.20)

Preverjali smo inhibicijo celokupne alfa-glukozidazne aktivnosti črevesnih encimov. Uporabili smo raztopino encima iz oborine podganjega črevesa ter dodatno prečiščenega s kromatografskimi metodami (glej poglavje 3.2.1.1.1).

Metoda določanja encimske aktivnosti za alfa-glukozidazo je bila povzeta po Matsui in sod. (2009). Raztopino encima smo redčili 5000-krat v fosfatnem pufru pH 6,8. V črnih mikrotitrskih ploščicah smo 10 min pri 37 °C inkubirali 55 µl raztopine encima in 20 µl posameznih spojin v različnih koncentracijah. Kot substrat smo dodali 50 µl 0,08 mM 4-MUG v fosfatnem pufru s pH 6,8 ter inkubirali v temi pri 37 °C. Reakcijo smo v različnih časovnih točkah (30, 60, 90, 120 min) ustavili s 75 µl 0,2 M Na₂CO₃. Merili smo fluorescenco sproščenega aniona 4-metilumbeliferona pri λ_{ex} 365 nm in λ_{em} 445 nm. Iz poteka encimske reakcije (količina produkta v odvisnosti od časa) smo izračunali naklone krivulj za reakcije ob prisotnosti različnih koncentracij spojin. Za določitev rezidualne aktivnosti alfa-glukozidaze smo naklon vzorčnih spojin delili z naklonom kontrolne reakcije encima brez dodanih spojin. Vsi testi so bili izvedeni v duplikatih.

3.2.2.1.2 Test aktivnosti alfa-amilaze (EC 3.2.1.1)

Metodi iz Ali in sod. (2006) in Bernfeld (1955) smo modificirali in prilagodili za delo v mikrotitrskih ploščicah. Priprava reagentov je opisana v preglednici 4 v poglavju 3.1

Material. Trideset mg prašičje pankreasne alfa-amilaze smo raztopili v 10 ml ledeno mrzle destilirane vode ter s pomočjo umeritvene krivulje določili aktivnost encima v raztopini. V testih aktivnosti alfa-amilaze smo uporabili raztopino encima z aktivnostjo 1 – 2 U/ml.

V mikrotitrski ploščici smo 5 min pri sobni temperaturi inkubirali 25 µl raztopine spojin v različnih koncentracijah in 25 µl raztopine encima. Dodali smo 50 µl 0,5 % raztopine škroba ter inkubirali natanko 3 min pri sobni temperaturi. Nato smo 50 µl reakcijske zmesi prenesli v PCR ploščico k 25 µl raztopine 3,5-dinitrosalicilne kisline (DNSA) ter to inkubirali 15 min pri 95 °C. Po tem času smo 60 µl reakcijske zmesi prenesli k 180 µl vode v novi mikrotitrski ploščici. Aktivnost alfa-amilaze smo določili z meritvijo absorbance nastale maltoze pri 540 nm.

Kontrolno inkubacijo encima brez inhibitorjev (100 % aktivnost encima) smo naredili na enak način, le da smo testirane vzorce nadomestili s 25 % DMSO v vodi. Za slepe vrednosti smo najprej dodali 37,5 µl zmesi inhibitorja in substrata k 25 µl DNSA in šele nato dodali 12,5 µl raztopine encima ter inkubirali, kot je opisano zgoraj. Na ta način smo pri meritvah upoštevali prispevek testiranih raztopin ter laktoze, prisotne v reagentu prašičje pankreasne alfa-amilaze k absorbanci. Vse teste smo izvedli v triplikatih.

Aktivnost alfa-amilaze smo določili po izračunih:

$$A_{540\text{nm}} \text{ (100 \% encim ali raztopine spojin)} = A_{540\text{nm}} \text{ (testna reakcija)} - A_{540\text{nm}} \text{ (slepa reakcija)}$$

$$\text{Rezidualna aktivnost alfa-amilaze} = A_{540\text{nm}} \text{ (raztopine spojin)} / A_{540\text{nm}} \text{ (100 \% encim)}$$

3.2.2.1.3 Test aktivnosti DPP4 (EC 3.4.14.5)

Metodo za določitev inhibitorne aktivnosti testiranih spojin na DPP4 smo povzeli po Matheussen in sod. (2012). V črnih mikrotitrskih ploščicah smo 10 min pri 37 °C inkubirali 30 µl 0,1 µg/ml raztopine humanega rekombinantnega DPP4 v 50 mM Tris pufru s pH 8,3 ter 30 µl raztopin testiranih spojin v različnih koncentracijah. Kot substrat smo dodali 50 µl 0,5 mM GP-AMC v istem Tris pufru. Aktivnost DPP4 smo merili kinetično 30 min pri 37 °C z merjenjem fluorescence sproščenega AMC pri $\lambda_{\text{ex}}=360\text{ nm}$ in $\lambda_{\text{em}}=460\text{nm}$. Za določitev rezidualne aktivnosti DPP4 ob prisotnosti spojin različnih koncentracij smo naklon poteka encimske reakcije vzorcev delili z naklonom kontrolne reakcije, kjer smo namesto raztopine spojin uporabili s 25 % DMSO (100 % aktivnost encima). Vse teste smo naredili v triplikatih.

3.2.2.1.4 Analiza podatkov

Teste smo naredili v duplikatih oz. triplikatih. Grafično smo predstavili povprečne vrednosti in standardne deviacije rezidualnih encimskih aktivnosti v odvisnosti od koncentracij spojin. IC₅₀ vrednost je koncentracija inhibitorja, ki zavre delovanje encima za 50 %. Za vsako spojino smo jo določili z analizo krivulje aktivnosti encima v odvisnosti od koncentracije

inhibitorja. Naredili smo medtočkovno analizo posameznih ponovitev in izračunali povprečne vrednosti IC_{50} za vsako spojino. Te vrednosti smo za vsak encim razdelili v tri razrede ter na tak način med sabo primerjali inhibitorno sposobnost testiranih spojin za posamezen encim.

3.2.2.2 Ocena aktivnosti izvlečkov lesa in lubja bele jelke

3.2.2.2.1 Test aktivnosti alfa-glukozidaze (EC 3.2.1.20)

Preverjali smo inhibicijo celokupne alfa-glukozidazne aktivnosti črevesnih encimov. Uporabili smo raztopino encima, izoliranega iz oborine podganjega črevesa ter dodatno prečiščenega s kromatografskimi metodami, kot je opisano v poglavju 3.2.1.1.1.

Metoda je bila enaka kot pri testu aktivnosti alfa-glukozidaze pri presejanju nabora naravnih učinkovin v poglavju št. 3.2.2.1.1, le da smo namesto posameznih spojin v različnih koncentracijah uporabili spojine izvlečkov lesa in lubja bele jelke, lesa pravega kostanja in Pycnogenol v različnih koncentracijah ter raztopine devetih lignanov v koncentraciji 1 mg/ml. Testi so bili narejeni v triplikatih.

3.2.2.2.2 Test aktivnosti alfa-amilaze (EC 3.2.1.1)

Metoda je bila enaka kot pri testu aktivnosti alfa-amilaze pri presejanju nabora naravnih učinkovin v poglavju 3.2.2.1.2, le da smo namesto posameznih spojin v različnih koncentracijah uporabili spojine izvlečkov lesa in lubja bele jelke, lesa pravega kostanja in Pycnogenol v različnih koncentracijah ter raztopine devetih lignanov v koncentraciji 1 mg/ml. Testi so bili narejeni v triplikatih.

3.2.2.2.3 Test aktivnosti DPP4 (EC 3.4.14.5)

Metoda je bila enaka kot pri testu aktivnosti DPP4 pri presejanju nabora naravnih učinkovin v poglavju 3.2.2.1.3, le da smo namesto posameznih spojin v različnih koncentracijah uporabili spojine izvlečkov lesa in lubja bele jelke, lesa pravega kostanja in Pycnogenol v različnih koncentracijah ter raztopine devetih lignanov v koncentraciji 1 mg/ml. Testi so bili narejeni v triplikatih.

3.2.2.2.4 Analiza podatkov

IC_{50} vrednost je definirana kot koncentracija izvlečka, ki pri pogojih testiranja zavre 50 % aktivnosti posameznega encima. Določili smo jo z analizo krivulj encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije izvlečkov. Analizirali smo krivulje za vsako ponovitev encimskega testa posebej ter določili povprečno IC_{50} vrednost.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 PEPTIDNI ZAVIRALCI ENCIMOV, PRIDOBLJENI S SELEKCIJO IZ BAKTERIOFAGNIH PEPTIDNO-PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC

4.1.1 Selekcija peptidnih ligandov na tarči maltaza-glukoamilaza

S selekcijami iz treh bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic (linearnih Ph.D.-7TM in Ph.D.-12TM ter ciklične Ph.D.-c7cTM) smo skušali pridobiti peptide z afiniteto do sesalske MGAM. Med njimi smo želeli najti takšne, ki so sposobni modulacije encimske aktivnosti.

Z vsako knjižnico smo naredili dve selekciji, pri čemer smo vezane peptide eluirali specifično oziroma nespecifično. Pri prvem načinu smo uporabili znana kompetitivna inhibitorja alfa-glukozidaze, to je akarbozo in voglibozo, s katerima smo želeli kompetitivno izpodriniti vezane bakteriofage iz vezavnega mesta na molekuli encima. Uporabili smo zmes obeh inhibitorjev, saj se vežeta, kot opisano v poglavjih 2.1.1.1 in 2.1.1.2.3 na različne domene encima. V drugem primeru smo interakcijo peptidov, prikazanih na bakteriofagih, in tarče prekinjali z dodatkom glicinskega pufra z nizkim pH. Pri vsakem od 6 selekcijskih protokolov smo naredili 3 selekcjske stopnje, v 2. in 3. stopnji smo naredili tudi subtraktivni korak, s čimer smo želeli zmanjšati možnost izolacije peptidov z afiniteto do ozadja, t.j. magnetnih kroglic s proteinom G in protiteles proti MGAM. Po zadnji stopnji selekcije smo iz vsakega od 6 selekcijskih protokolov naključno izbrali 20 – 40 bakteriofagnih klonov, ki smo jim s testom ELISA ocenili stopnjo vezave na tarčni protein ter na proteine in druge komponente ozadja. Izbrali smo 21 bakteriofagnih klonov z najvišjim razmerjem med absorbanco, izmerjeno pri vezavi na tarčni encim in absorbanco izmerjeno pri vezavi na ozadje. Izbrani fagni kloni so torej izkazovali največjo selektivnost za vezavo na tarčni protein. S sekvenciranjem fagne DNA smo določili zaporedja peptidov, ki so jih ti kloni izražali na svoji površini. Izkazalo se je, da ima 21 bakteriofagnih klonov, ki smo jih izbrali na podlagi najboljše vezave na tarčo, na površini izraženih 12 različnih peptidov. Sekvence le-teh so zbrane v preglednici 9.

Zaporedja peptidov smo nato analizirali s pomočjo zbirk objavljenih podatkov in internetnih baz mimotopov, kot sta MimoDB in SAROTUP (Huang in sod., 2010; Huang in sod., 2012) ter eliminirali že znane tarčno-nespecifične vezalce. Izmed preostalih peptidov smo jih izbrali 6 z najvišjo selektivnostjo do tarčne molekule (v preglednici 9 označeni s krepkim tiskom) ter jih dodatno analizirali.

Zanimalo nas je ali se peptidi vežejo v aktivno mesto na encimu. To smo preverili s kompetitivnim testom ELISA, v katerem so peptidi izraženi na bakteriofagu tekmovali za vezavno mesto na tarčnem proteinu z mešanico znanih kompetitivnih inhibitorjev alfa-glukozidaze, t.j. akarbozo in voglibozo. Kot je razvidno iz slike 5, so kompetitivni inhibitorji signifikantno preprečili vezavo vseh 6 bakteriofagnih klonov na imobiliziran encim. Posledično sklepamo, da se vseh 6 peptidov, predstavljenih na površini bakteriofagov, veže

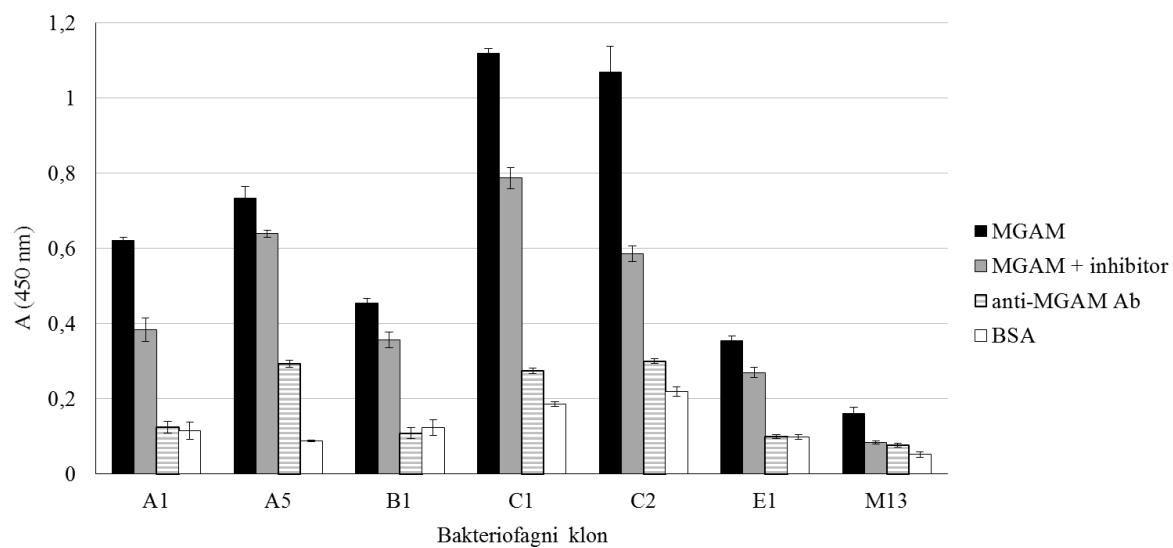
v aktivno mesto encima oziroma v njegovo okolico. S slike 5 je tudi razvidno, da se izbrani bakteriofagni kloni ne vežejo na proteine in ostale komponente ozadja (BSA, anti-MGAM protitelesa).

Preglednica 9: 21 peptidov, prikazanih na površini bakteriofagov iz treh različnih knjižnic, z najvišjim razmerjem vezave na encim v primerjavi z ozadjem. Prikazano je tudi število bakteriofagnih klonov z izraženim enakim peptidom. Peptidi z oznakami B, C in E so bili pridobljeni z nespecifičnim načinom elucije, peptidi z oznakama A in D pa s specifično elucijo. Peptidi, označeni s krepkim tiskom, so bili uporabljeni v nadalnjih analizah.

Table 9: Peptide sequences of 21 phage clones from three libraries with highest target to background absorbance ratio and the number of clones with each sequence. Peptides denoted B, C and E were selected using non-specific elution, and peptides denoted A and D were selected using competition elution. Peptides with sequences in bold have been further analysed.

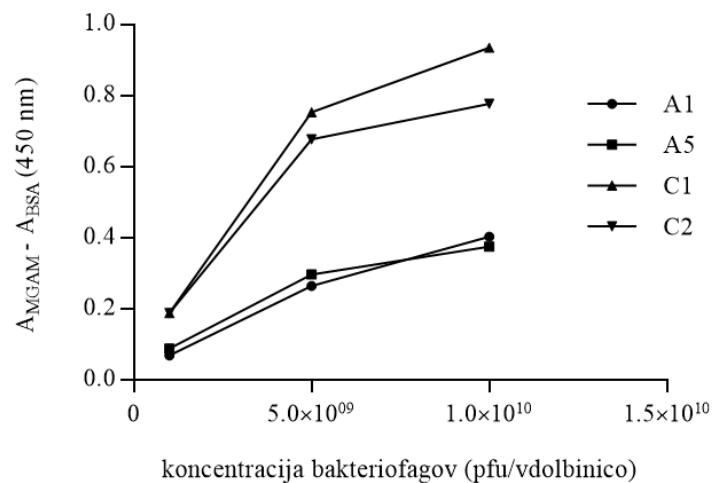
Linearna knjižnica heptapeptidov, Ph.D.-7 TM			Ciklična knjižnica heptapeptidov, Ph.D.-c7c TM			Linearna knjižnica dodekapeptidov, Ph.D.-12 TM		
B1	4x	FHGAREM	C1	2x	CTHYGFRGC	E1	1x	RDGSIAMHSMIP
B2	1x	TTYSRFP	C2	1x	CGHHHRDYC	D1	1x	QALLEGNAKGGN
A1	1x	NEISFHA				D2	1x	GGTKTHVDFSLK
A2	6x	LPLTPLP						
A3	1x	LPLGHHE						
A4	1x	IGHLSFE						
A5	1x	GHLYDDP						

V nadaljevanju smo izbrali štiri peptide, izražene na bakteriofagu, po naslednjem kriteriju: absorbanca, določena v testu ELISA kot merilo vezave na tarčno molekulo, je bila večja ali enaka 0,4 in razmerje absorbanc izmerjenih pri vezavi na tarčo in ozadje je bilo večje ali enako 4. Temu so ustrezali peptidi A1, A5, C1 in C2. Pri njih smo preizkusili vezavo bakteriofagnih klonov na encim ter na BSA pri naraščajočih koncentracijah bakteriofagov. Kot je razvidno iz slike 6, je razlika v stopnji vezave na encim in ozadje rastla hkrati s količino inkubiranih fagov. To je bilo še nekoliko bolj izrazito pri bakteriofagih C1 in C2, kar nakazuje na njihovo nižjo vezavo na proteine in druge komponente ozadja. Oba sta pridobljena z nespecifično elucijo ter imata na površini izražene ciklične peptide.



Slika 5: Vezava izbranih bakteriofagnih klonov na MGAM (črni stolpci) in na ozadje (beli stolpci: BSA, črtasti stolpci: protitelesa proti MGAM). Sivi stolci prikazujejo vezavo bakteriofagnih klonov na MGAM v prisotnosti kompetitivnih inhibitorjev (0,5 mM akarboza in 0,5 mM vogliboza). M13 bakteriofag, brez izraženega peptida, je bil uporabljen kot negativna kontrola.

Figure 5: Binding of selected phage clones to MGAM (black bars) and to the background (to BSA, white bars and to anti-MGAM antibody coated wells, striped bars). The grey bars show binding of phage clones to MGAM in the presence of a competitive inhibitor (0,5 mM acarbose and 0,5 mM voglibose). M13 phage vector showing no peptide was used as a control.



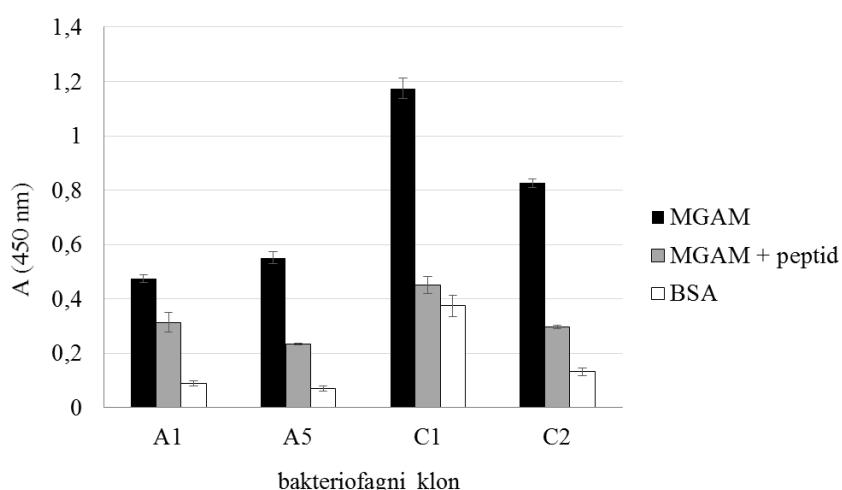
Slika 6: Specifičnost vezave 4 bakteriofagnih klonov na MGAM. Graf prikazuje razlike v izmerjenih absorbancah na MGAM in ozadju pri naraščajoči količini bakteriofagov.

Figure 6: Binding specificity of four selected phage clones to MGAM. The graph shows the differences in absorbances measured in MGAM-coated and blank microtiter wells at increasing amounts of phage particles.

Analiza sinteznih peptidov

Štiri izbrane peptide, pA1, pA5, pC1 in pC2, smo analizirali tudi kot sintezne peptide. Sintetiziralo jih je podjetje EZ Biolab iz ZDA. Peptida pC1 in pC2 sta bila ciklizirana z disulfidno vezjo med zunanjima cisteinoma. Da bi se izognili negativnemu naboju, je bila pri vseh peptidih C-končna karboksilna skupina amidirana. Čistota sinteznih peptidov je bila nad 95 %, identiteta pa je bila določena z masno spektrometrijo.

Vezavo sinteznih peptidov na tarčni encim smo analizirali s kompetitivnim testom ELISA (slika 7), kjer so za vezavno mesto na tarčnem encimu tekmovali bakteriofagni kloni s pripadajočim sinteznim peptidom pA1, pA5, pC1 ali pC2. Opazno znižanje količine vezanih bakteriofagov je bilo prisotno pri vseh peptidih, močneje pa je bil ta učinek izražen pri obeh cikličnih peptidih. Le-ta sta tudi izkazala višjo vezavo do MGAM kot linearna peptida, kar je razvidno iz slik 5, 6 in 7. Sklepamo lahko, da se v našem primeru sintezni peptidi vežejo na enako mesto na encimu kot enaki peptidi, izraženi na površini bakteriofaga.

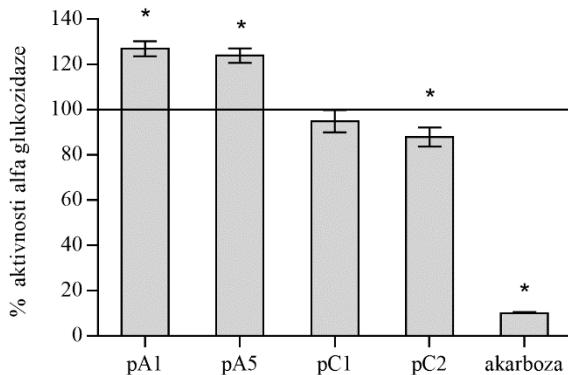


Slika 7: Vezava bakteriofagnih klonov na MGAM v prisotnosti sinteznih peptidov, enakih izraženim na površini fagov. Črni stolpci prikazujejo vezavo samih fagov na MGAM, sivi stolpci prikazujejo vezavo fagov ob predhodni inkubaciji z 0,1 mM sinteznimi peptidi, beli stolpci prikazujejo vezavo fagov na BSA.

Figure 7: Binding of phage clones to MGAM in the presence of respective synthetic peptide. Black bars represent binding of phage clones alone to MGAM, whereas striped bars represent binding of same clones to MGAM after preincubation of enzyme with 0,1 mM corresponding synthetic peptide. White bars show binding of phage clones to blank wells.

Na koncu smo preverili tudi sposobnost modulacije encimske aktivnosti z izbranimi sinteznimi peptidi. Pri koncentraciji 1,2 mM sta linearna peptida nekoliko dvignila aktivnost encima, pA1 pa za $26,8 \pm 3,4\%$, pA2 pa za $24,3 \pm 3,2\%$. Prav nasprotno pa sta oba ciklična peptida, kot je razvidno iz slike 8, inhibirala aktivnost alfa-glukozidaze, čeprav med njima ni skupnega motiva, razen disulfidnega mosta med zunanjima cisteinoma. Peptid pC1 je

encim inhibiral za $4,6 \pm 4,9\%$, pC2 pa za $12,02 \pm 4,23\%$. V primerjavi z akarbozo je sprememba aktivnosti majhna, vendar v primeru pC2 signifikantna ($p = 0,0238$, Mann-Whitney U-test).



Slika 8: Preostala encimska aktivnost MGAM v prisotnosti sinteznih peptidov v koncentraciji 1,2 mM. 100 % aktivnost je označena s črto. Signifikantno inhibicijo (12,0 %) smo dosegli s peptidom pC2. Akarbozo smo uporabili kot pozitivno kontrolo.

Figure 8: Residual enzyme activity in the presence of synthetic peptides at 1,2 mM concentration. The 100 % enzyme activity position is marked with a line. Significant inhibition (12,0 %) was observed with peptide pC2. Acarbose was used as a positive control.

V zadnjih letih so naredili veliko raziskav na področju preventivne in zdravljenja diabetesa tipa 2 s poudarkom na inhibiciji alfa-glukozidaze. Odkrili so številne nove spojine, tako naravne kot sintezne, z delovanjem na alfa-glukozidazo. Pomembno je poudariti, da je njihov učinek v veliki meri odvisen od izvora encima. Velike razlike so opazili med aktivnostjo sesalske ter alfa-glukozidaze iz kvasovk (Oki in sod., 1999). Po drugi strani pa so nedavne raziskave prebavnih podganjih glikozidaz pokazale, da poskusi na le-teh lahko upravičeno nadomestijo eksperimente z uporabo človeških encimov (Oku in sod., 2011).

Glede na to, da je bil naš cilj pridobiti peptide, primerne za nadaljnje raziskave in uporabo na človeških prebavnih encimih, je bil izvor encima pomembna komponenta načrtovanja raziskav. Zato smo kot tarčo v bioloških selekcijah uporabili celoten izolat podganjih črevesnih membranskih proteinov, iz katerega smo z metodami čiščenja pripravili raztopino, obogateno z alfa-glukozidazno aktivnostjo. To bi v procesu selekcij lahko predstavljalo problem, saj je zaželeno, da je tarčna molekula v procesu selekcije čim bolj čista. Prisotnost proteinskih nečistoč in heterogenosti tarče lahko namreč vodi v selekcijo peptidov, ki se vežejo na primešane proteine, posledica tega je izolacija tarčno-nespecifičnih ligandov. Vendar pa so bile že prej v literaturi opisane uspešne seleksijske strategije, kjer je bil kot imobilizirana tarča uporabljen celoten serum ali proteinski izolat (Lunder in sod., 2005;

Mennuni in sod., 1996), zato je tudi v našem primeru izvor encima pretehtal čistoto uporabljenega izolata.

Z uporabo specifičnih anti-MGAM protiteles v koraku imobilizacije tarčne molekule smo dodatno izločili ostale proteinske nečistote v izolatu črevesnih membranskih proteinov. Ta pristop je tudi zmanjšal možnost konformacijskih sprememb imobiliziranega encima ter tako omogočal ohranitev biološke aktivnosti alfa-glukozidaze skozi celotno selekcijo (rezultati niso prikazani). Pravilna orientiranost tarčnega proteina, ki smo jo na ta način zagotovili, je prav tako bistvena za uspešno selekcijo ligandov. Dodatno je uporaba magnetnih kroglic v primerjav s klasično selekcijo na mikrotitrski ploščici, nudila večjo površino za vezavo, kakor tudi omogočala lažje in bolj temeljito spiranje.

Velikega pomena za uspešnost selekcij je velik donos (delež eluiranih bakteriofagov glede na količino bakteriofagov, vnesenih v selekcijo) v prvi selekcijski stopnji, saj je vsak klon v začetni bakteriofagni predstavitveni knjižnici prisoten v izredno omejenem številu kopij (Smith in Petrenko, 1997). S tem namenom smo v prvi stopnji selekcije uporabili nekoliko večjo količino tarčnega proteina kot v nadaljevanju selekcij. Po drugi strani pa smo v drugi in tretji stopnji selekcije naredili dodaten, subtraktivni, korak, s čimer smo želeli izločiti fage z izraženimi peptidi z afiniteto do ne-tarčnih proteinov, komponent ozadja, ter na ta način doseči večjo specifičnost izbranih peptidov.

Glede na rezultate testov ELISA so na bakteriofagni površini izraženi ciklični peptidi izkazali višjo vezavo na tarčni encim v primerjavi z linearimi peptidi. To je v skladu z rezultati iz literature (Gaser in sod., 2009). V splošnem velja, da zmanjšana fleksibilnost cikličnih peptidov poveča njihov potencial za visoko afinitetno vezavo na proteinske tarče. Zaradi omejene strukture namreč peptidi privzamejo terciarno strukturo, kar omogoča posnemanje konformacijskih epitopov. Prav tako pa so ciklični peptidi manj podvrženi encimski razgradnji kot linearni peptidi (Denisova in sod., 2010; Eichler in sod., 1996). Opazili pa smo tudi višjo afiniteto vezave na tarčno molekulo v primeru bakteriofagnih klonov, izoliranih z nespecifično elucijo. Sklepamo, da smo s tem načinom elucije prekinili močnejše vezi med tarčo in izraženimi peptidi kot v primeru specifične elucije s kompetitivnimi inhibitorji.

Glede na to, da so ligandi, izolirani z metodo bakteriofagnega prikaza, izbrani izključno na podlagi njihove avidnosti do tarčnega proteina, ne moremo z gotovostjo vnaprej sklepati o njihovi biološki aktivnosti. Pri našem delu se je izkazalo, da ciklična peptida nekoliko zavirata encimsko aktivnost alfa-glukozidaze, medtem ko sta linearna peptida aktivnost podganje MGAM nekoliko dvignila. Vzroki za to niso znani, na podlagi lastnosti prebavnih glikozidaz pa sklepamo, da je do tega prišlo iz sledečega razloga. Intestinalna alfa-glukozidaza ima 4 katalitične komponente, ki delujejo kot mukozne α -1,4-eksoglukozidaze (Quezada-Calvillo in sod., 2007; Sim in sod., 2010). Kot tarčo smo v selekcijah uporabljali MGAM, pridobljeno z imunoprecipitacijo z anti-MGAM protitelesi, ki niso razlikovala med

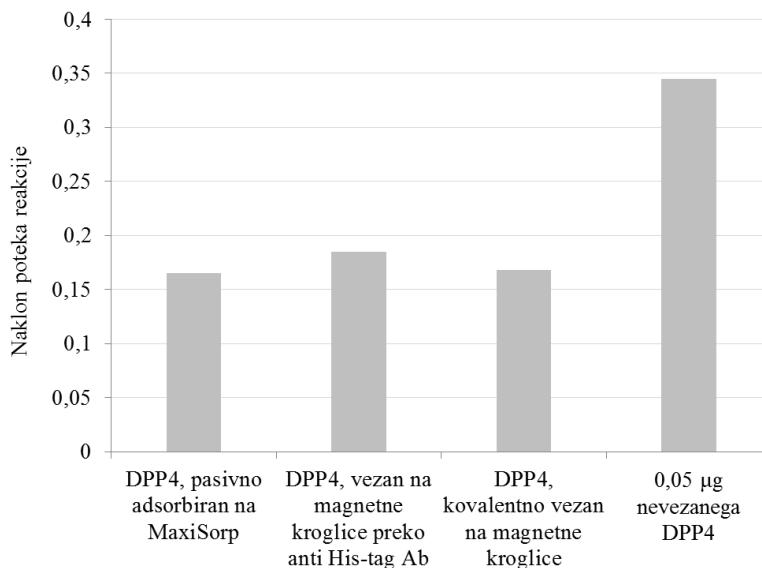
NtMGAM in CtMGAM. Glede na to, da smo tarčni encim izolirali iz ekstrakta membrane celotnega črevesa podgane, je prav tako realno pričakovati, da sta bili v manjši meri v reakcijski zmesi prisotni tudi obe podenoti encima SI. Različni avtorji so že dokazali, da se podenote alfa-glukozidaznih encimov razlikujejo v substratnih specifikah in jih lahko diferencialno inhibiramo (Lee in sod., 2012; Quezada-Calvillo in sod., 2007; Ren in sod., 2011; Sim in sod., 2010). Pri ljudeh je MGAM bolj aktivna kot SI, ampak je SI približno 20-krat več (Quezada-Calvillo in sod., 2007). Predvidevamo, da sta se linearna peptida pA1 in pA5 vezala na domene encima z nižjo afiniteto do substrata, ta pa se je posledično preusmeril na domene encima z višjo katalitično aktivnostjo. To lahko razloži višjo aktivnost alfa-glukozidaze v prisotnosti omenjenih peptidov.

Naravni substrat alfa-glukozidaznih encimov so polisaharidi. Že prej so odkrili peptide, ki so posnemali ogljikove hidrate, vendar so, v nasprotju s pristopom, uporabljenim v tej študiji, kot tarče v bakteriofagnem prikazu uporabili protitelesa proti ogljikovim hidratom (Matsubara, 2012). Prav tako je znano, da peptidi, ki se sicer specifično vežejo na vezavna mesta za ogljikove hidrate, ne izkazujejo vedno pričakovane biološke aktivnosti (Johnson in Pinto, 2008). Zato ni zanemarljivo, da je ciklični peptid pC2, izoliran iz bakteriofagne knjižnice, pri koncentraciji 1,2 mM, inhibiral aktivnost alfa-glukozidaze za 12,0 %. Čeprav inhibicija ni močna, je treba pripomniti, da gre komaj za prvi mejnik pri iskanju spojine vodnice, ki jo v primeru nadaljnjega razvoja čaka več struktturnih sprememb z namenom izboljšanja njenih farmakoloških lastnosti.

4.1.2 Selekcija peptidnih ligandov na tarči DPP4

Z metodo bakteriofagnega prikaza smo iz hepta- ter dodekapeptidnih knjižnic poskušali izolirati peptide z afiniteto do encima DPP4. Pri delu smo uporabili 5 različnih protokolov selekcij. Podrobnosti so prikazane v preglednici 8. Pri vseh protokolih smo izvedli tako specifično elucijo s kompetitivnim inhibitorjem DPP4, sitagliptinom, kakor tudi nespecifično elucijo s pufrom z nizkim pH. Pri štirih selekcijskih protokolih (A, B, D in E) smo uporabili knjižnico Ph.D.-c7cTM, knjižnici Ph.D.-7TM in Ph.D.-12TM pa vsako trikrat (C, D in E). V treh protokolih (A, B in E) smo pred 2. in 3. stopnjo selekcije naredili subtraktivni korak, medtem ko smo pri protokolih C in D po drugi in tretji stopnji naredili dodatno, negativno selekcijo. V dveh selekcijskih protokolih (B in C) smo tarčni encim imobilizirali na polistirensko ploščo. V dveh protokolih (A in E) smo encim preko polihistidinskega repka vezali na protitelesa proti histidinski oznaki, le-ta pa smo (v protokolu E predhodno) vezali na magnetne kroglice s proteinom G. V enem protokolu (D) smo encim preko aminskih skupin kovalentno vezali na magnetne kroglice. Glede na to, da je prisotnost tarče v aktivni konformaciji eden izmed kritičnih aspektov pri izvajanju bioloških selekcij, smo pred pričetkom selekcij preverili aktivnost imobiliziranega encima DPP4 pri posameznih protokolih. Kot je razvidno iz slike 9, je bil tarčni encim v vseh protokolih prisoten v aktivni konformaciji.

Pri vsakem protokolu smo naredili po 3 selekcijske stopnje. Po zadnji stopnji smo naključno izbrali 20 – 40 klonov bakteriofagov ter s testom ELISA ocenili njihovo vezavo na tarčni encim ter na ozadja selekcijskega sistema. Na podlagi teh rezultatov smo izbrali klone, ki smo jim na podlagi nukleotidnega zaporedja vstavljenega gena določili aminokislinsko sekvenco na fagni površini izraženih peptidov. Izbrani peptidi so zbrani v preglednici 10.



Slika 9: Aktivnost encima DPP4, imobiliziranega na površino na različne načine. Reakcija je potekala 30 minut, na sliki je prikazan naklon krivulj poteka encimskih reakcij (sproščanja produkta AMC iz substrata GP-AMC) v odvisnosti od časa.

Figure 9: The activity of DPP4, immobilized to surface in different ways. The bars represent the slope of enzyme kinetics (30 min reaction), where absorbance of AMC, released from substrate GP-AMC was measured.

Sekvence peptidov smo nato analizirali s pomočjo internetnih baz mimotopov (MimoDB in SAROTUP) (Huang in sod., 2010; Huang in sod., 2012) in eliminirali peptide, ki so se že pojavili v literaturi na drugih tarčah ter take, ki so že znani tarčno nespecifični vezalci. Iz vseh protokolov smo nato izbrali nabor peptidov z najvišjim razmerjem med absorbanco izmerjeno v testu ELISA ob vezavi na tarčni encim in absorbanco izmerjeno ob vezavi na ozadje (v preglednici 10, peptidi označeni s krepkim tiskom) ter jih dodatno analizirali. Naredili smo skupni ELISA test, kjer smo med sabo primerjali 22 peptidov iz 5 protokolov selekcij. Rezultati so prikazani na sliki 10.

Pri delu smo uporabili tri različne načine imobilizacije molekule encima na trdno podlago, ki so opisani zgoraj. Pasivna adsorpcija (protokol B in C) po eni strani omogoča delo brez kakršnikoli kemijskih modifikacij tarče, ki bi lahko vplivale na sposobnost vezave liganda,

je pa po drugi strani možna orientacija adsorbiranih molekul na način, ki skrije vezavni žep na tarčnem proteinu in tako omejuje vezavo ligandov v aktivno mesto encima. V nasprotju s tem uporaba magnetnih kroglic s proteinom G (protokol A in E), na katerega se preko vezave specifičnih protiteles indirektno veže tarča, omogoča pravilno orientacijo tarčnih molekul, ter ohranitev aktivne konformacije encima. Dodatno ta pristop nudi tudi večjo površino za vezavo, manjšo porabo tarče ter možnost enostavnejšega in učinkovitejšega spiranja nevezanih fagov s pomočjo magneta (McConnell in sod., 1999). Prednosti uporabe magnetnih kroglic smo izkoristili tudi v protokolu D, kjer je bila tarča kovalentno vezana na magnetne kroglice. Ta način nam omogoča še enostavnejše delo, saj so časi inkubacij lahko krajišči, ni možnosti, da bi predhodno pripravljeno tarčo sprali iz nosilca, kroglice pa lahko po uspešni eluciji ponovno uporabimo, kar še dodatno zmanjša porabo reagentov (Invitrogen, 2016). V primeru selekcij na DPP4 izrazite razlike v rezultatih med temi načini imobilizacije tarče nismo opazili. Tega niti nismo pričakovali, saj smo že v prvi fazi izvajanja poskusov dokazali biološko aktivnost encima tako na polistirenskih ploščah kot na magnetnih kroglicah. V kolikor je vezana tarča v aktivni konformaciji, sklepamo, da način imobilizacije sicer lahko olajša delo, ne vpliva pa pomembno na izid selekcije.

Pri delu smo uporabili tri komercialno dostopne bakteriofagne predstavitevne knjižnice, ki temeljijo na kombinatoričnih knjižnicah naključnih linearnih heptapeptidov, dodekapeptidov ter cikličnih heptapeptidov. Kot splošno pravilo velja, da imajo lahko konformacijsko omejeni peptidi zaradi manjše gibljivosti višjo afiniteto do tarčnih proteinov kot linearni peptidi (Eichler in sod., 1996; McConnell in sod., 1994). Po drugi strani pa je lahko nizka konformacijska svoboda tudi slabost cikličnih peptidov, saj lahko zaradi neustrezne konformacije želenega peptida ne izoliramo iz knjižnice, kljub potencialno ugodnemu aminokislinskemu zaporedju (McConnell in sod., 1994). Z uporabo tako cikličnih kot linearnih knjižnic smo izbirali med ligandi z večjo in manjšo konformacijsko svobodo ter med peptidi različne dolžine, vendar pa se rezultati selekcij med njimi pomembno ne razlikujejo. Za razliko od peptidov, izoliranih na tarči MGAM, v primeru selekcij na DPP4 nismo opazili niti določenega trenda pri uporabi specifičnega ali nespecifičnega načina elucije.

Preglednica 10: Peptidi, izraženi na bakteriofagih in izolirani po enem izmed petih uporabljenih protokolov. V prikazu so med seboj ločeni glede na dolžino in konformacijsko omejenost peptida ter glede na način elucije (oznaka S za specifično in NS za nespecifično elucijo) v selekciji. Prikazano je tudi razmerje absorbanc pri vezavi na tarčo in ozadje v testu ELISA. Peptidi, označeni s krepkim tiskom, so bili uporabljeni v nadaljnjih poskusih.

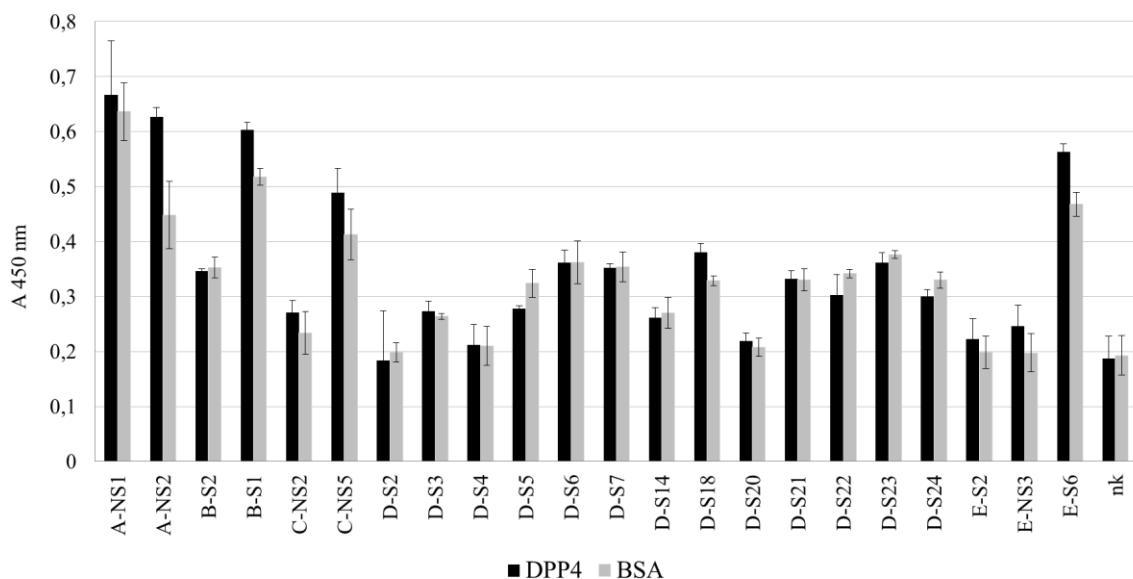
Table 10: Phage displayed peptides from biopannings using 5 different strategies. In the table they are arranged according to their lenght and conformational freedom as well as according to the elution approach used (S stands for specific and NS for non-specific elution). The target-to background ratio of absorbances is showed, too. Sequences in bold were used in following experiments.

Selekcija	Linearna knjižnica heptapeptidov Ph.D.-7 TM				Ciklična knjižnica heptapeptidov Ph.D.-c7c TM				Linearna knjižnica dodekapeptidov Ph.D.-12 TM			
	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a
A					A-S1	1x	C-NYLHHHR-C	1,26				
					A-S2	1x	C-NSHHHPR-C	1,20				
					A-NS1	1x	C-SAHQDLM-C	2,03				
					A-NS2	2x	C-APGPLMV-C	1,57				
					A-NS3	1x	C-IPYHHHR-C	1,08				
					A-NS4	1x	C-YTRNMNQ-C	1,14				
B					B-S1	1x	C-SVTKSTY-C	1,94				
					B-S2	1x	C-YTRNMNQ-C	1,95				
					B-NS1	1x	C-AVNMHRD-C	0,96				
C	C-S1	1x	HAIYPRH	2,31					C-S3	4x	ASVQGWAQITQR	2,33
	C-S2	1x	GSSIRYL	2,07					C-S4	1x	FHWWTWQFPYTST	1,14
	C-NS1	4x	STASYTR	2,48					C-S5	2x	NAASTFHAPDRL	2,73
	C-NS2	1x	GSGLVLM	2,02					C-S6	2x	WHWNAWNWSQQ	1,10
	C-NS3	1x	ATLTHPP	2,39					C-S7	1x	WHWNWMRLLDPMT	0,98
									C-NS4	1x	WHWYPWLVPGRS	0,92
									C-NS5	6x	SDNQFSIWPSPS	2,76

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 10: Peptidi, izraženi na bakteriofagih in izolirani po enem izmed petih uporabljenih protokolov.

Selekcija	Linearna knjižnica heptapeptidov Ph.D.-7 TM				Ciklična knjižnica heptapeptidov Ph.D.-c7c TM				Linearna knjižnica dodekapeptidov Ph.D.-12 TM			
	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a	Klon	Pojavnost	Fuzijski peptid	Razmeje absorbanc tarča/ozadje ^a
D	D-S1	1x	CCLFSNA	2,88	D-S17	1x	C-GVLSASV-C	2,44	D-S18	1x	IGAKSHYLGSLF	4,34
	D-S2	1x	AATRPPS	3,21					D-S19	1x	ASGSLSKQNVSQ	3,68
	D-S3	1x	TPARHIY	4,06					D-S20	1x	NPTVANLRALPI	4,20
	D-S4	1x	SLQYAPQ	3,58					D-S21	1x	QDSVISSIKYLG	4,64
	D-S5	1x	HAMRAQP	3,34					D-S22	1x	NNLYHSTVIRPE	3,80
	D-S6	1x	VAPMRYT	3,43					D-S23	1x	SAGANLTKTAYL	3,80
	D-S7	1x	SQSVKFA	2,76					D-S24	1x	NRPDSAQFWLHH	4,29
	D-S8	1x	SPSTHWK	2,25					D-S25	1x	DDFSANKGNLWQ	1,94
	D-S9	1x	YIQKMYS	1,76					D-S26	1x	TNSGKTLSAPKW	1,67
	D-S10	1x	YSLQSVI	2,33					D-S27	1x	TQFLQNRSVLGM	3,11
	D-S11	1x	DRTINSS	1,72					D-S28	1x	APLMVNNSPADSI	2,56
	D-S12	1x	AYPSAHR	1,69					D-NS1	1x	SWMPHPRWSPQH	2,38
	D-S13	1x	LSNNNNLR	1,83								
	D-S14	1x	FYLPTVG	2,09								
	D-S15	1x	NHGYASA	1,83								
	D-S16	1x	GVHKVAE	1,51								
E	E-S1	2x	AHISSYQ	0,98	E-S8	1x	C LPNHHKR C	1,01	E-S5	1x	HDASDQAYPQRH	0,60
	E-S2	2x	AHISSMT	1,01		1x	C NPIHSAR C	0,99	E-S6	2x	HDSDWYPERRPI	0,92
	E-S3	1x	AHISSFD	0,96		1x	C PASHSYR C	0,99	E-S7	1x	HTPEMDVRHSSR	0,93
	E-S4	1x	NDYHIKS	0,60		1x	C SPGHHSWR C	0,96	E-NS5	1x	HDWAKRPGDIGG	0,88
	E-NS1	2x	TTNLDKA	0,80		1x	C TVNHHSFR C	0,82	E-NS6	2x	ASFHTKSDWQFT	0,59
	E-NS2	2x	SPASRSV	0,80		1x	C LASHSYR C	0,63	E-NS7	1x	TTWHKENAYYQL	0,52
	E-NS3	1x	GSVHTQE	1,07		1x	C PDNHNNRR C	0,98	E-NS8	1x	HVIDQESWLVRT	0,82
	E-NS4	1x	HEGYQTA	0,68		1x	C LDIHSRR C	1,01	E-NS9	1x	HTTMKCNPKCTE	0,63
						1x	C SPMHHHSR C	0,94				
						1x	C HPHSMHR C	0,92				
						1x	C HPHSPHK C	0,97				

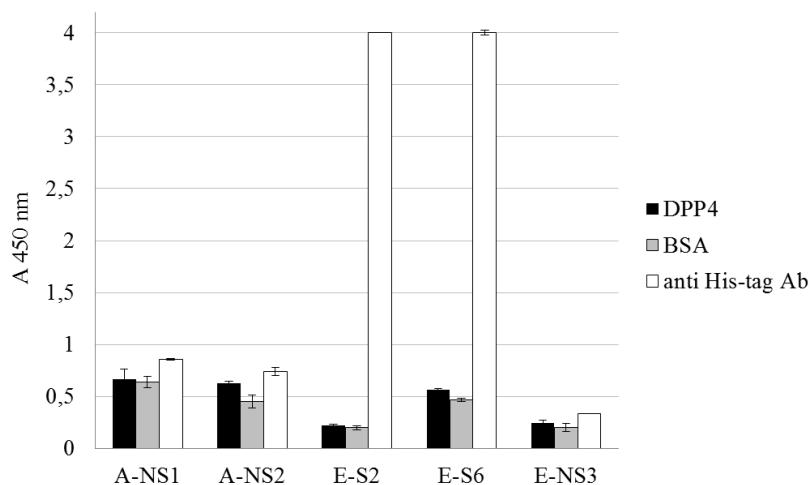


Slika 10: Izbrani kloni iz selekcij na DPP4. Črni stolpci prikazujejo vezavo peptidov, izraženih na izoliranih bakteriofagih, na encim, sivi stolci pa na BSA. Klon nk (izoliran v nepovezani selekciji) je bil uporabljen kot negativna kontrola. Test je bil narejen v triplikatu, rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti in standardne deviacije.

Figure 10: Selected phage clones from biopannings on DPP4. Binding of phage displayed peptides on DPP4 is represented with black bars and binding to BSA with grey bars. Phage clone nk was obtained from unrelated biopanning and was used here as a negative control. The assay was carried out in triplicate, the values are represented as means \pm standard deviations.

Pri protokolih B in C je bila tarčna molekula v obeh primerih imobilizirana na polistirensko ploščo. Razlika med njima je bila uporaba knjižnic. V protokolu B smo uporabili knjižnico cikličnih heptapeptidov, v protokolu C pa knjižnici linearnih hepta- ter dodekapeptidov. Kot že opisano, med njimi nismo zaznali razlike v izidu selekcij. Druga razlika med tem protokoloma pa je bila uporaba ukrepov v izogib izolacije tarčno nespecifičnih vezalcev. V protokolu B smo pred drugo in tretjo selekcijsko stopnjo naredili subtraktivni korak, medtem ko smo v protokolu C po drugi in tretji stopnji naredili dodatni korak negativne selekcije. Ta dva pristopa se razlikujeta predvsem v količini posameznih klonov v uporabljenem eluatu. Pri subtraktivnem koraku smo pred naslednjo stopnjo selekcije pomnoženi eluat izpostavili ozadju selekcijskega sistema. Ligandi ozadja so se vezali, nevezani supernatant pa smo uporabili v sledeči selekcijski stopnji. V primeru negativne selekcije pa smo najprej izvedli postopek selekcije, takoj nato pa nepomnoženi eluat izpostavili ozadju sistema, da so se vezalci le-tega vezali, supernatant pa smo pomnožili. Slabost slednjega pristopa je, da so v nepomnoženem eluatu vsi kloni zastopani v relativno majhnem številu, zato ob dodatnih vezavah obstaja nevarnost izgube tudi ligandov tarče. Po drugi strani pa pri subtraktivnem koraku tvegamo, da se nam nespecifični vezalci v stopnji pomnoževanja relativno boljše pomnožijo od ligandov tarče, s čimer lahko tudi pride do izgube želenih klonov. V primeru izvedenih selekcij na DPP4 se noben od teh pristopov ni izkazal za boljšega.

V protokolih A in E je bila tarča imobilizirana indirektno preko vezave na protitelesa proti polihistidinu. V testu ELISA smo zato preverili afiniteto vezave izbranih, na fagih predstavljenih peptidov do tarče ter do uporabljenih protiteles. Rezultati so prikazani na sliki 11.



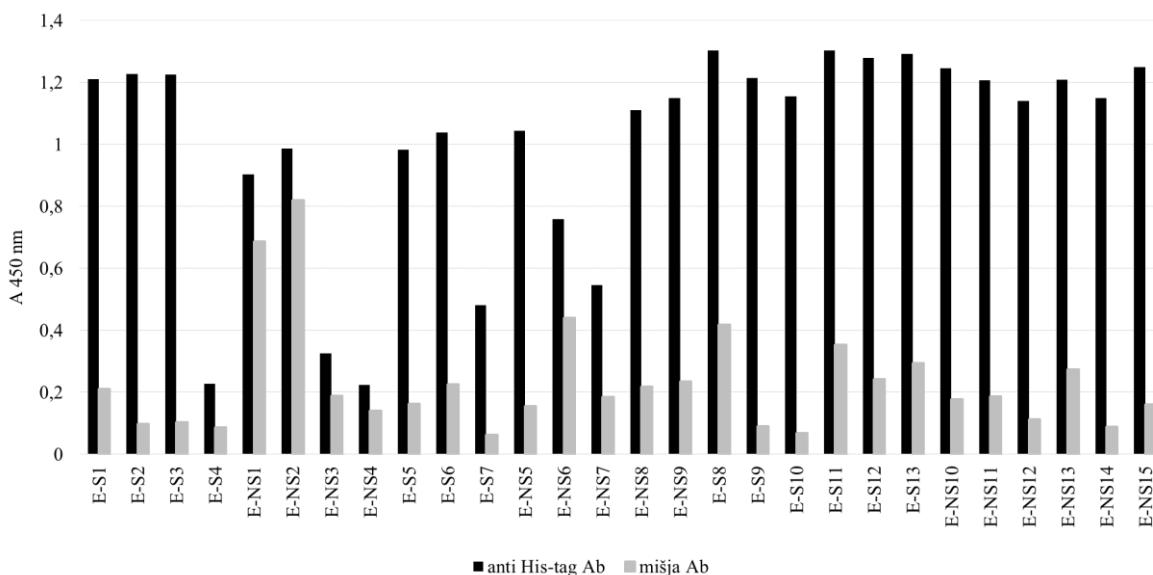
Slika 11: Analiza bakteriofagnih klonov, izoliranih iz protokolov A in E, kjer je bila tarča imobilizirana na magnetne kroglice preko vezave na protitelesa proti polihistidinskemu repku. Črni stolpci prikazujejo vezavo klonov na molekulo encima, sivi stolci vezavo na BSA, beli stolci pa na protitelo proti polihistidinskemu repku. Test je bil narejen v triplikatu, predstavljeni so povprečne vrednosti in standardne deviacije.
Figure 11: Selected phage clones from biopanning strategies A and E, where target was immobilized to magnetic beads through anti-His tag antibodies. Black bars represent binding to the enzyme, while grey bars represent binding to BSA and white bars to anti-His tag antibody. The assay was carried out in triplicate, the values are represented as means \pm standard deviations.

Pri vseh petih klonih je afiniteta vezave na protitelesa proti histidinski oznaki presegala afiniteto do tarčnega encima. To je še posebej izrazito pri klonih E-S2 in E-S6, ki sta bila za razliko od ostalih treh, izolirana s specifičnim načinom elucije, pri katerem bi pričakovali prav nasprotno, saj naj bi kompetitivni inhibitor izpodrival bakteriofage iz aktivnega mesta encima. Sklepamo, da je selekcija kljub izvedbi subtraktivnega koraka potekla na protitelesih namesto na predvideni tarči. To je nekoliko bolj razumljivo pri klonih iz protokola A, kjer smo naredili t.i. selekcijo v raztopini – bakteriofagno knjižnico smo inkubirali na tarčni molekuli v raztopini in šele nato tarčo imobilizirali na podlago, ki je omogočala spiranje nevezanih fagov ter elucijo vezalcev. Ta pristop bi naj v splošnem izboljšal izid selekcij, saj omogoča boljši dostop bakteriofagom do vezavnega mesta na encimu. Na ta način se je tudi mogoče izogniti delni denaturaciji tarče ob vezavi na plastično površino plošč, hkrati pa je poraba tarče bistveno manjša (Priročnik ..., 2016). Vendar pa v primeru selekcije po protokolu A takšen postopek predstavlja problem, ker tarčo vežemo na podlago preko vezave na protitelesa, pri čemer so v raztopini za hibridizacijo tako kompleksi tarče in vezanih bakteriofagov, kot tudi preostali nevezani bakteriofagi. V kolikor je afiniteta prostih fagov

na protitelesa večja od vezave polihistidinskih repkov rekombinantnega encima na mesto vezave antigena na protitelesu, lahko poteče selekcija teh fagov na protitelesu, kljub temu, da naj bi se večina teh odstranila že v subtraktivnem koraku. V protokolu E smo se temu izognili in smo najprej zapolnili vezavna mesta na protitelesih s tarčno molekulo, ki smo jo nato izpostavili knjižnici bakteriofagov. Kot je razvidno iz slike 11, to ni odpravilo možnosti vezave fagov na protitelesa, afiniteta vezave fagov iz protokola E je kvečemu večja.

Posebej presenetljivo je, da izolirani peptidi z afiniteto do protiteles proti polihistidinskemu repku v veliki večini nimajo pričakovanega motiva polihistidinov ali drugega konsenznega motiva. Nekoliko bolj bogati s histidini so le kloni A-S1, A-S2 in A-NS3 (vsak po tri zaporedne histidine) iz selekcij po protokolu A ter E-S8 in E-NS12 iz selekcij po protokolu E, ki imata v svojih sekvenkah vsak po 2 zaporedna histidina. Imunoglobulini so velike molekule, z molekulsko maso okrog 150 kDa, medtem, ko je vezavno mesto za antigen omejeno na majhen del variabilne regije. Posledično se lahko pri selekcijah iz obsežnih bakteriofagnih knjižnic izolirajo bakteriofagi z izraženimi peptidi z afiniteto do drugih regij protitelesa – ne-vezavnih mest na variabilni regiji ali na konstantno regijo. V literaturi so že opisani primeri uspešnih selekcij na Fc regiji humanih protiteles (Menendez in Scott, 2005; Vodnik in sod., 2011). Zato smo predvideli možnost vezave fagov iz selekcij na DPP4 na Fc regijo uporabljenih protiteles, raje kot na Fab regijo z vezavnim mestom za antigen (polihistidinski repek).

V nadaljevanju smo zato primerjali vezavo na bakteriofagih izraženih peptidov iz protokola E na protitelesa proti polihistidinu ter na druga protitelesa iste vrste (mišja), s posledično enako Fc regijo kot protitelesa, uporabljeni v selekciji. Rezultati testa ELISA so prikazani na sliki 12. Vezava je pri vseh bakteriofagnih klonih pomembno višja na protitelesih proti polihistidinu kot na s selekcijo nepovezanih protitelesih z enako Fc regijo in drugačno Fab regijo. Zanimivo je, da ob tem ne izstopata kloni E-S8 in E-NS12, ki imata v motivu več zaporednih histidinov od ostalih klonov. Njuna afiniteta vezave do protiteles proti polihistidinu (kakor tudi do s selekcijo nepovezanih mišjih protiteles) ni bistveno drugačna od ostalih klonov. Sklepamo, da kljub pomanjkanju pričakovanega motiva za vezavo na paratope, selekcija ni potekla na Fc regiji protiteles. Nismo pa izključili možnosti vezave na konstantno domeno Fab regije protiteles proti polihistidinu. Zaključujemo, da bi bilo delo od tu dalje bolj smiselno načrtovati v smeri raziskovanja epitopov, ki jih prepoznaajo protitelesa proti polihistidinskim podaljškom, kot ligandov za DPP4, kar pa je izven domene te disertacije.



Slika 12: Primerjava vezave bakteriofagnih klonov iz protokola E na protitelesa proti polihistidinskemu repku, uporabljeni v selekcijskem postopku (črni stolpci) ter vezave na druga mišja protitelesa (sivi stolpci).

Figure 12: Binding of phage clones from biopanning strategy E to anti His-tag antibodies, (black bars) and to selection unrelated antibodies from mouse (grey bars).

S ciljem iskanja peptidnih ligandov za DPP4 smo opravili obsežno delo na področju bakteriofagnega prikaza. Upoštevajoč uporabo treh bakteriofagnih knjižnic in dveh načinov elucije, smo skupaj izvedli 20 bioloških selekcij. Pri tem smo kot tarčo uporabili čisti encim brez primesi, saj smo uporabljali rekombinantni humani encim. Peptidne ligande smo poskušali izolirati po petih različnih protokolih, s čimer smo preizkusili vpliv vseh spremenljivk selekcijskega sistema. Tarčo smo imobilizirali na tri različne načine, uporabili smo tako dve linearne knjižnici s peptidi različnih dolžin, kakor tudi konformacijsko omejeno knjižnico cikličnih heptapeptidov. Vezane peptide smo eluirali kompetitivno z znanim inhibitorjem tarčnega encima, kot tudi nespecifično v pogojih z nizkim pH. Skupno smo posekvencirali 78 različnih bakteriofagno izraženih peptidov. Kljub temu noben izmed prikazanih peptidov ni izkazoval želenih lastnosti, t.j. afinitete in potencialno biološke aktivnosti na tarčnem encimu.

Tak izid na področju tehnike bakteriofagnega prikaza ni posebnost. Kljub temu, da gre za dobro uveljavljeno metodo pri odkrivanju novih zdravilnih učinkovin, se iskanje specifičnega liganda z visoko afiniteto vezave v kopici vseh peptidov v rekombinantni knjižnici (tipično $10^9 - 10^{10}$), pogosto ne konča z uspehom (Molek, 2015; Vodnik in sod., 2011). Možnih vzrokov za to je več. Najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na uspeh selekcij so kompleksnost knjižnice (t.j. diverziteta peptidov v rekombinantni knjižnici), konformacijska svoboda peptidov, čistota in kakovost tarče ter strategija selekcijskega postopka. Po izkušnjah iz literature in našega laboratorija pa ima pomemben vpliv na izid

presejanja rekombinantnih knjižnic tudi tip tarčnega proteina. Izkazalo se je namreč, da imajo nekatere skupine strukturno in funkcionalno sorodnih molekul večji uspeh pri afinitetnih selekcijah peptidnih ligandov kot druge. Kot najbolj uspešne tarče so se izkazala protitelesa. Le-ta imajo namreč običajno dobro izpostavljeni hipervariabilno regijo, evolucijsko optimizirano za vezavo antigenov, ki so povečini peptidne ali proteinske narave. Tako linearni kot diskontinuirani epitopi tipično obsegajo le manjši del proteinskega antiga, kar omogoča odlično posnemanje epitopov s kratkimi peptidi (Molek, 2015). To je v skladu z našimi rezultati, ki kažejo na potek selekcije na protitelesih namesto na tarčnem encimu DPP4. Tudi pri tem smo sicer pričakovali uspešno izolacijo ligandov, saj gre za encim, čigar endogeni substrat je peptidna molekula. Peptidaze, oz. proteinaze so druga skupina molekul, ki daje po izkušnjah raziskovalcev dobre rezultate presejanj rekombinantnih peptidnih knjižnic. Aktivno mesto je namreč pri teh encimih oblikovano tako, da objame (poli)peptidno verigo, zaradi česar selekcija lažje poteče (Molek, 2015). Tega pri našem delu nismo dosegli. Uspeh presejanj je bil slabši kot pri delu na tarči MGAM, katere endogeni substrat je polisaharidne narave.

Oseminsedemdeset peptidov po selekciji na DPP4, izmed katerih noben ni izkazoval želene vezave na tarčni encim, lahko označimo kot lažno pozitivne rezultate. Namesto specifičnih vezalcev tarčne molekule so v postopku selekcij izbrani bakteriofagi brez dejanske afinitete do tarče. Do tega lahko pride zaradi vezave na ostale komponente selekcijskoga sistema (imobilizacijska podlaga, blokirna sredstva, kontaminanti) ali zaradi sposobnosti hitrejšega pomnoževanja določenih bakteriofagov. V splošnem jih torej lahko delimo v dve skupini: tarčno nespecifični peptidi, povezani s selecijskim postopkom ter tarčno nespecifični peptidi, povezani s pomnoževanjem. V prvo skupino sodijo peptidi, ki se pri selekciji vežejo na komponente selekcijskoga sistema. V našem primeru so to lahko polistiren, protein G, protitelesa proti polihistidinu (glej sliko 11), BSA (glej sliko 10) ali kakršnekoli nepredvidene nečistote v uporabljenih reagentih. V literaturi so že opisani primeri in določena konsenzna zaporedja peptidov z afiniteto do vseh naštetih komponent (Menendez in Scott, 2005; Vodnik in sod., 2012; Vodnik in sod., 2011). Pri drugi skupini se nekateri bakteriofagni kloni pomnožujejo hitreje od ostalih. Pojav takšnih peptidov med rezultati presejanj knjižnic ni povezan z njihovo afiniteto do tarče, saj jim prednost pri pomnoževanju omogoča prevlado v naboru bakteriofagov v selecijskem sistemu. Sposobnost hitrejšega pomnoževanja je lahko rezultat mutacij v bakteriofagnem genomu, ki ali vpliva na virusovo sposobnost inficiranja bakterije ali omogoča pospešen proces sestavljanja virusnih delov. Lahko pa je to tudi lastnost na površini predstavljenega peptida samega, in ne mutacij. V primeru knjižnic, osnovanih na bakteriofagu M13, je npr. aminokislina prolin prisotna v nadpovprečno, aminokislina cistein pa podpovprečno veliko peptidih. Primer takšnih tarčno-nespecifičnih peptidov je v našem primeru klon C-S1 (HAIYPRH) iz knjižnice Ph.D.-7TM. Le-ta se pomnožuje neprimerljivo hitreje od ostalih klonov zaradi mutacije G→A v Shine-Dalgarnovem zaporedju za p2, to je protein vpletен v proces pomnoževanja (Brammer in sod., 2008).

4.2 ZAVIRALCI ENCIMOV, PRIDOBLJENI IZ SNOVI NARAVNEGA IZVORA

4.2.1 Rešetanje nabora naravnih spojin

Analizirali smo *in vitro* sposobnost devetindvajsetih naravnih polifenolov, prikazanih v preglednici 7, da zavrejo delovanje encimov alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in DPP4. Spojine, ki so v začetnem presejanju pri koncentraciji 25 mM izkazovale vsaj 50 % inhibicijo posameznega encima, smo analizirali v različnih koncentracijah. Zaradi omejujočih lastnosti nekaterih spojin, kot so obarvanost in slaba topnost, smo jih lahko v testih uporabili v koncentacijskem območju (0 – 12,5 mM končne koncentracije), ki je bilo preozko, da bi po logaritemski transformaciji nudilo podatke za izris celotnih sigmoidnih krivulj v grafih encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije inhibitorjev. Ker krivulj nismo mogli definirati s polinomskimi enačbami, ni bilo mogoče uporabiti metode linearne regresije za določitev vrednosti IC₅₀. Namesto tega smo analizirali krivulje med posameznimi točkami testiranja. Analizirali smo vsako ponovitev posebej, nato pa izračunali povprečno IC₅₀. Ker ni bilo mogoče pridobiti eksaktnih vrednosti ali določiti intervalov zaupanja, v katerih se z dano gotovostjo nahaja prava IC₅₀, smo dobljene IC₅₀ vrednosti spojin prikazali v obliki razredov ter na ta način med sabo primerjali inhibitorno sposobnost nabora spojin.

Pri delu smo razvili metodo presejanja potencialnih inhibitorjev alfa-amilaze na mikrotitrski platformi. Metodo smo povzeli po že objavljenem delu Ali in sod. (2006) in jo prilagodili za delo v mikrotitrskih ploščicah. To je predstavljalo pomemben korak pri delu, saj nam je omogočilo simultano rešetanje velikega števila spojin v več ponovitvah ter tako občutno skrajšalo čas analiz ter, zaradi nižje porabe reagentov, povečalo tudi stroškovno učinkovitost dela.

Flavonoidi in hidroksicimetove kisline so se izkazali kot najmočnejši inhibitorji alfa-glukozidaze. Kot je prikazano v preglednici 11a in na sliki 13, sta z IC₅₀ pod 0,2 mM, najboljše inhibirala alfa-glukozidazo kvercetin in rutin, medtem ko elagna kislina, resveratrol, ferulna kislina in kvercitrin niso izkazovali dosti slabše aktivnosti. Flavonoidi so bili tudi najboljši inhibitorji DPP4 (preglednica 11c). Kvercetin, kvercitrin in rutin so imeli vrednost IC₅₀ pod 0,3 mM. Najučinkovitejša skupina inhibitorjev alfa-amilaze so bile hidroksibenzojske kisline. Najmočneje je alfa-amilazo inhibirala salicilna kislina z IC₅₀ pod 1,5 mM, medtem ko sta beta-resorcilna kislina in gentizinska kislina imeli IC₅₀ pod 2,3 mM.

Preglednica 11: IC₅₀ vrednosti testiranih naravnih spojin na encimih a) alfa-glukozidaza, b) alfa-amilaza in c) DPP4.

Table 11: IC₅₀ value of tested compounds against a) alpha-glucosidase, b) alpha-amylase and c) DPP4.

a) IC₅₀: alfa-glukozidaza^a	Fenolne spojine	Skupina
< 0,4 mM	Kvercetin Rutin Elagna kislina Kvercitrin Resveratrol Ferulna kislina	flavonoid flavonoid tanin flavonoid stilbenoid hidroksicimetna kislina
0,4 - 0,8 mM	Klorogenska kislina Nordihidrogvajaretinska kislina Kavna kislina Galna kislina Naringin p-kumarna kislina	hidroksicimetna kislina lignan hidroksicimetna kislina tanin flavonoid hidroksicimetna kislina
> 0,8 mM	o-kumarna kislina Naringenin Hesperetin	hidroksicimetna kislina flavonoid flavonoid
b) IC₅₀: alfa-amilaza^b	Fenolne spojine	Skupina
< 2,5 mM	Salicilna kislina Beta-resorcilna kislina Gentizinska kislina	hidroksibenzojska kislina hidroksibenzojska kislina hidroksibenzojska kislina
2,5 - 4,0 mM	Nordihidrogvajaretinska kislina Alfa-resorcilna kislina p-hidroksibenzojska kislina Galna kislina	lignan hidroksibenzojska kislina hidroksibenzojska kislina tannin
> 4,0 mM	Protokatehujska kislina	hidroksibenzojska kislina
c) IC₅₀: DPP4^c	Fenolne spojine	Skupina
< 1,0 mM	Kvercetin Kvercitrin Rutin Klorogenska kislina	flavonoid flavonoid flavonoid hidroksicimetna kislina
1,0 - 2,5 mM	Naringenin Hesperetin Nordihidrogvajaretinska kislina	flavonoid flavonoid lignan
> 2,5 mM	Naringin	flavonoid

^a IC₅₀ akarboze za alfa-glukozidazo je < 0,05 mM.

^b IC₅₀ akarboze za alfa-amilazo je < 0,05 mM.

^c IC₅₀ sitagliptina za DPP4 je 0,2 µM.

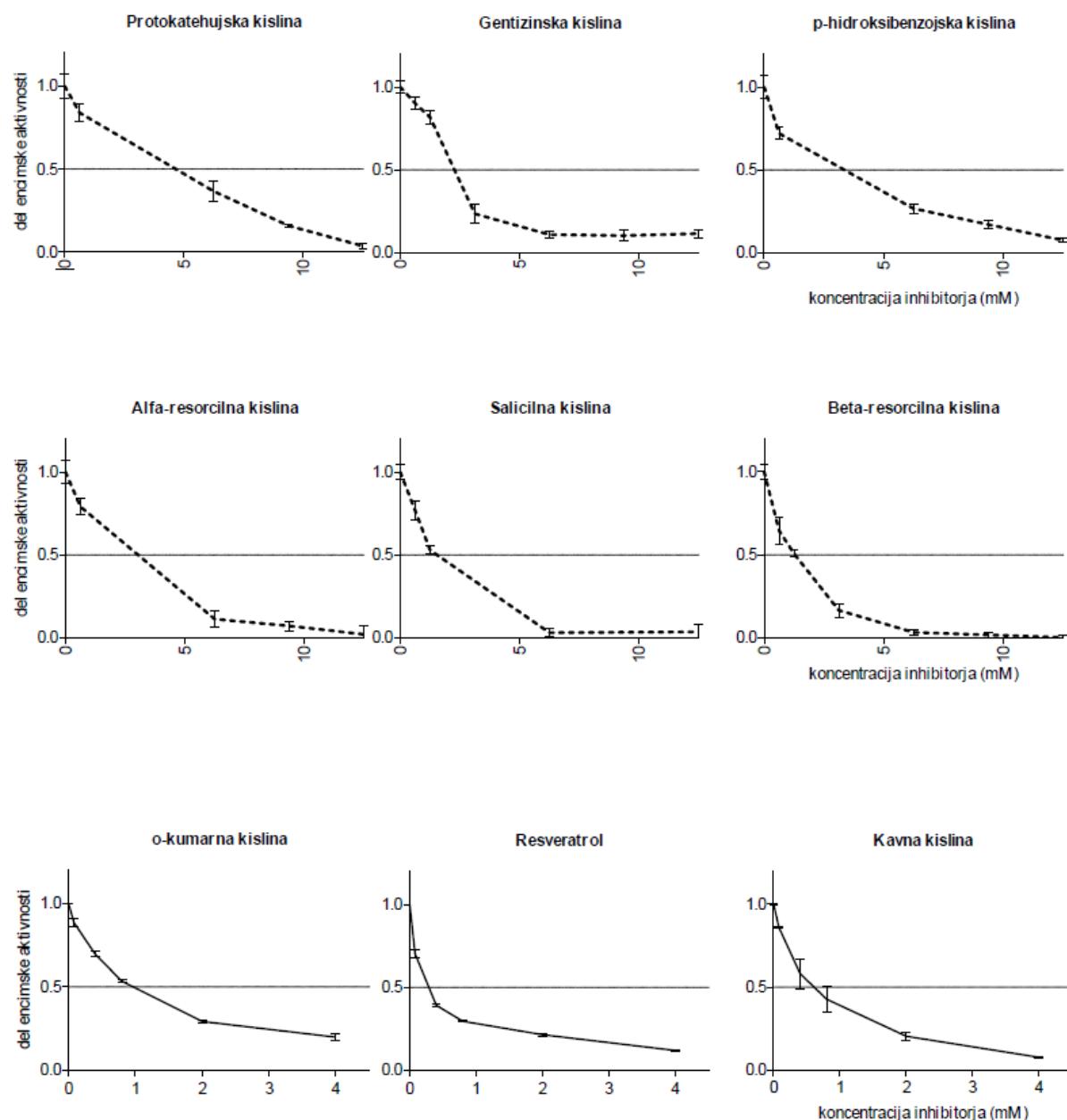
Izmed 29 spojin v začetnem presejanju, smo jih v nadalnjih analizah, na vseh encimih skupaj, obravnavali 20. Krivulje encimskih aktivnosti v odvisnosti od koncentracije teh spojin so prikazane na sliki 13. Nordihidrogvajaretinska kislina je inhibirala vse tri encime. Flavonoidi (hesperetin, naringenin, naringin, kvercetin, kvercitrin in rutin) so učinkovito inhibirali alfa-glukozidazo in DPP4. Ta dva encima je oba inhibirala tudi klorogenska kislina, medtem ko so ostale hidroksicimetne kisline (kavna kislina, ferulna kislina in okumarna kislina), kakor tudi resveratrol in elagna kislina, učinkovito inhibirali le alfa-glukozidazo. Galna kislina je inhibirala alfa-glukozidazo in alfa-amilazo, ostale hidroksibenzojske kisline (p-hidroksibenzojska kislina, salicilna kislina, alfa- in betaresorcilna kislina, gentizinska kislina in protokatehajska kislina) pa samo alfa-amilazo.

Nordihidrogvajaretinska kislina je bila edina spojina, ki je inhibirala vse tri encime. Gre za lignan, v veliki količini prisoten v rastlini *Larrea tridentata* (DC.) Coville, ki raste v puščavah Mehike in Severne Amerike in se je že dolgo uporabljala v ljudski medicini za lajšanje sladkorne bolezni tipa 2 (Arteaga in sod., 2005). Vendar pa je bilo objavljeno zgolj majhno število raziskav o njenem učinku *in vivo* ali mehanizmu delovanja. V doktorskem delu smo kot prvi opisali *in vitro* učinek nordihidrogvajaretinske kisline na encime alfa-glukozidazo, alfa-amilazo in DPP4 in tako osvetlili vsaj enega izmed mehanizmov delovanja, preko katerih *Larrea tridentata* učinkuje antidiabetično.

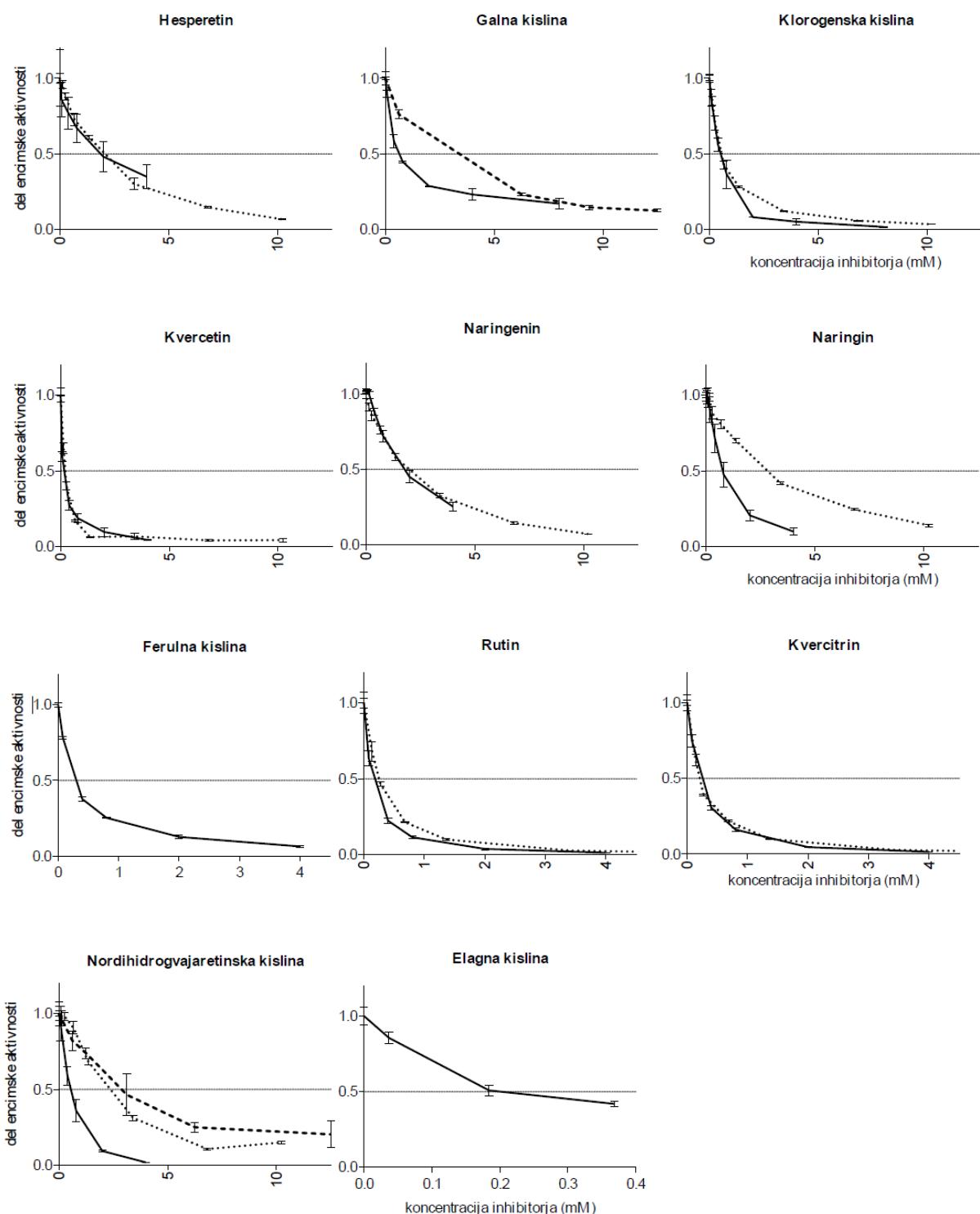
V skladu z rezultati iz literature (Adefegha in sod., 2014), je pri testiranih fenolnih spojinah v splošnem moč opaziti boljšo inhibicijo alfa-glukozidaze kot alfa-amilaze. Vendar pa je bilo to odvisno predvsem od skupine fenolnih spojin. Hidroksibenzojske kisline so bolje inhibirale alfa-amilazo, medtem ko so flavonoidi in hidroksicimetne kisline kazale boljšo inhibitorno sposobnost pri alfa-glukozidazi in DPP4. Presenetljivo je, da je alfa-glukozidazo inhibiral podoben nabor fenolnih spojin kot DPP4, medtem ko je alfa-amilazo inhibirala druga zbirka spojin. Tega nismo pričakovali, saj sta tako alfa-glukozidaza kot alfa-amilaza encima, ki hidrolizirata sladkorje, zato smo pričakovali, da bo med inhibitorji teh dveh encimov več podobnih spojin. Po drugi strani smo pričakovali ločen niz spojin, ki bi inhibirale DPP4, čigar endogeni substrati so peptidne narave. Ugotovili smo, da so kvercetin, kvercitrin in rutin med najbolj učinkovitimi inhibitorji tako alfa-glukozidaze kot DPP4. Učinek teh spojin je bil sicer že izpostavljen v raziskavah *in vivo*, vendar so bili tam predlagani tudi drugi mehanizmi učinkovanja, kot so stimulacija sproščanja inzulina in inhibicija transporta glukoze iz črevesa (Jadhav in Puchchakayala, 2012; Malini in sod., 2011; Wang in sod., 2015). Pomembno je dejstvo, da fenolne skupine lahko delujejo sinergistično, ko v *in vivo* pogojih delujejo na več tarč hkrati, pa tudi preko skupnega učinkovanja z drugimi fenolnimi in ne-fenolnimi spojinami iz rastlinske hrane (El-Abhar in Schaalann, 2014; Wang in sod., 2010).

Rastlinske polifenolne spojine učinkujejo pri sladkorni bolezni tipa 2 tudi po drugih mehanizmih in ne izključno preko uravnavanja hiperglikemije. Za veliko število fenolnih spojin so dokazali učinek tudi pri mikro- in makrovaskularnih zapletih, ki spremljajo

diabetes (Bahadoran in sod., 2013; El-Abhar in Schaalan, 2014; Hanhineva in sod., 2010). Za nekatere spojine, ki v naših testih niso izkazovale pomembnega inhibitornega učinka na izbranih encimih, so pokazali učinkovitost pri lajšanju diabetesa preko drugih mehanizmov. Katehin na primer deluje antihiperglikemično *in vivo* (Maruyama in sod., 2009; Nagao in sod., 2009), epikatechin pa preprečuje razvoj diabetesa preko uravnavanja imunske funkcije in varovanja pankreasnih otočkov (Fu in sod., 2013). Eskulin ima ugoden učinek pri diabetesu in pri vnetnih procesih v ledvicah, ki so povezani z oksidativnim stresom (Kang in sod., 2014). *In vivo* študije so prav tako potrdile antihiperglikemičen učinek siringinske kisline in umbeliferona (Muthukumaran in sod., 2013; Ramesh in Puglendi, 2006).



Slika 13 se nadaljuje.



Slika 13: Inhibitorna aktivnost posameznih spojin za alfa-glukozidazo, alfa-amilazo in DPP4. Rezidualna encimska aktivnost je prikazana v odvisnosti od koncentracije inhibitorjev. Polna črta prikazuje aktivnost alfa-glukozidaze, črtkana črta aktivnost alfa-amilaze, pikčasta pa aktivnost DPP4.

Figure 13: The inhibitory effect of individual natural compounds on alpha-glucosidase, alpha-amylase and DPP4. The remaining enzyme activity is presented in the presence of different inhibitor concentrations. Solid line is used to demonstrate the activity of alpha-glucosidase, dashed line is used for alpha-amylase and dotted line for DPP4.

4.2.2 Ocena aktivnosti izvlečkov lesa in lubja bele jelke

Testirali smo inhibitorno aktivnost izvlečkov lesa in lubja navadne bele jelke (*Abies alba*) na encimih alfa-glukozidaza, alfa-amilaza in DPP4. Te aktivnosti smo primerjali z inhibitorno sposobnostjo izvlečka lesa pravega kostanja ter standardiziranega izvlečka skorje obmorskega bora (Pycnogenol®). Preverili smo tudi, kakšno sposobnost inhibicije naštetih encimov ima 9 lignanov, identificiranih v vodnem izvlečku lesa bele jelke.

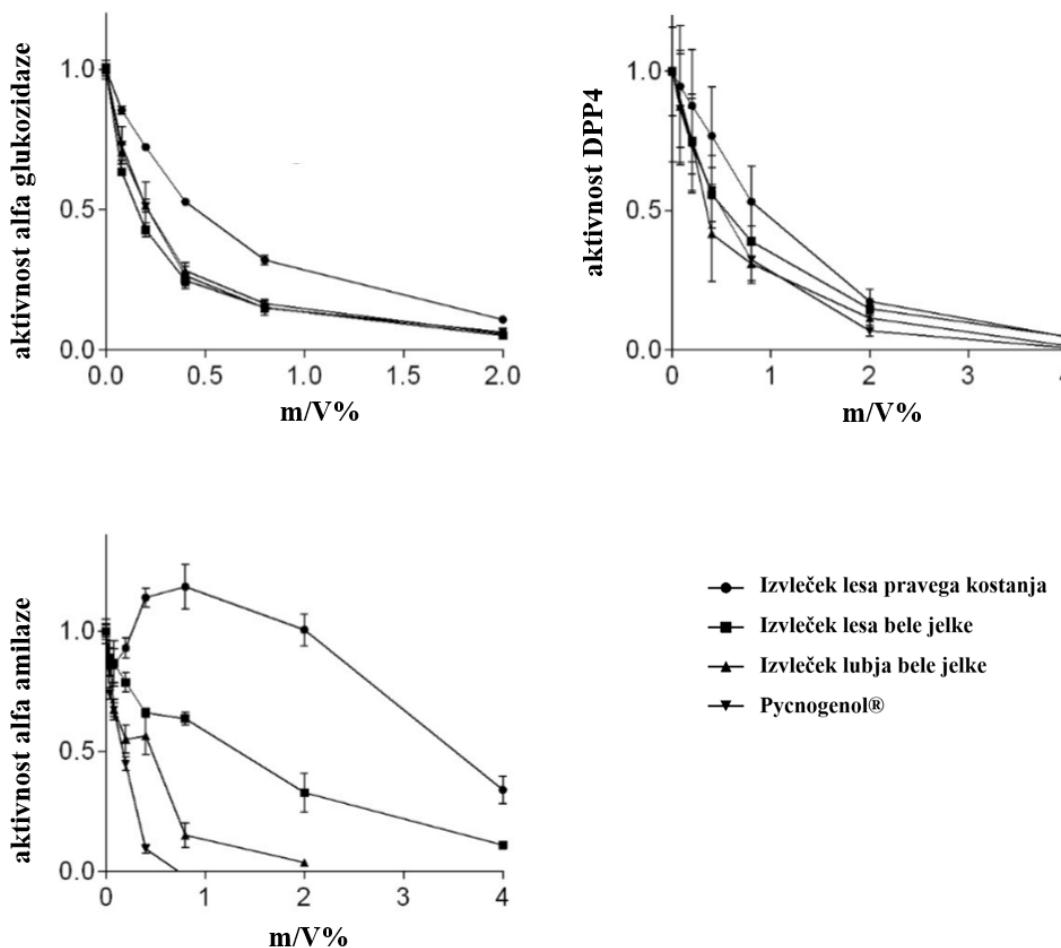
Slika 14 prikazuje krivulje encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije testiranih izvlečkov. Iz podatkov so bile izračunane vrednosti IC₅₀. Oba izvlečka bele jelke sta izkazovala velik *in vitro* inhibitorni potencial za vse tri encime. Alfa-glukozidazo je najbolj učinkovito inhibiral izvleček lesa bele jelke (IC₅₀ 0,14 m/V %), učinek izvlečka lubja pa je bil primerljiv z učinkom Pycnogenola (IC₅₀ 0,21 m/V %). Prav nasprotno je DPP4 najboljše inhibiral izvleček lubja bele jelke (IC₅₀ 0,34 m/V %) in je bil učinek izvlečka lesa primerljiv s Pycnogenolom (IC₅₀ 0,52 m/V %). Razlika med učinkom izvlečkov lesa in lubja bele jelke je bila najbolj očitna pri inhibiciji alfa-amilaze, kjer je imel ekstrakt lesa IC₅₀ 1,18 m/V %, ekstrakt lubja pa IC₅₀ 0,33 m/V %.

Pri pogojih testiranja je Pycnogenol znatno inhibiral aktivnost DPP4 (IC₅₀ 0,48 m/V %), vendar je bila ta inhibicija manjša kot učinek, ki ga je imel Pycnogenol na aktivnost alfa-amilaze (IC₅₀ 0,15 m/V %) ali alfa-glukozidaze (IC₅₀ 0,21 m/V %). Izvleček lesa pravega kostanja je inhibiral alfa-glukozidazo (IC₅₀ 0,45 m/V %), kakor tudi DPP4 (IC₅₀ 0,91 m/V %), vendar je bil učinek nekoliko manjši kot pri ostalih ekstraktih. Inhibicijo alfa-amilaze z izvlečkom lesa pravega kostanja smo dosegli šele v zelo visokih koncentracijah (IC₅₀ 3,82 m/V %).

Vsebnost lignanov v hrani je v glavnem nizka in običajno ne presega 2 mg/100 g (Peterson in sod., 2010). Glede na to, da je celokupna vsebnost lignanov v vodnem izvlečku lesa bele jelke kar 10 %, smo analizirali tudi inhibitorno sposobnost do obravnavanih encimov pri devetih lignanih, katerih vsebnost je bila potrjena v tem izvlečku (Tavčar Benković in sod., 2016). V preglednici 12 so zbrani odstotki inhibicije posameznih lignanov v koncentraciji 1 mg/ml. Medtem ko je ta koncentracija lignanov le v nekaterih primerih zgolj rahlo inhibirala alfa-amilazo in alfa-glukozidazo, so vsi testirani lignani inhibirali DPP4. Najmočneje je aktivnost DPP4 zavrl pinoresinol diglukozid (49,6 %), sledila pa sta mu izolaricirezinol (49,2 %) in sekolaricirezinol (42,9 %). Pinoresinol je šibko inhibiral vse tri encime.

Dokazali smo, da sta izvlečka lesa in lubja bele jelke močna inhibitorja alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in DPP4. Njuna inhibitorna sposobnost je večja kot pri izvlečku lesa pravega kostanja, še posebej v primeru alfa-amilaze. Učinki izvlečkov bele jelke so primerljivi z učinkom Pycnogenola, ki je dobro raziskan in ga zaradi teh učinkov že široko uporablja kot aktivno surovino v prehranskih dopolnilih. Izmed vseh testiranih ekstraktov se je izvleček

lesa bele jelke izkazal kot najmočnejši zaviralec alfa-glukozidaze, izvleček lubja bele jelke pa kot najmočnejši inhibitor DPP4.



Slika 14: Delež encimske aktivnosti v odvisnosti od koncentracije širih analiziranih izvlečkov.
Figure 14: Residual enzyme activity plotted against inhibitor concentrations for four tested extracts.

V eksperimentih je bil Pycnogenol uporabljen kot referenčna spojina, saj gre za široko uporabljano sestavino prehranskih dopolnil s klinično dokazano anti-diabetično aktivnostjo (Liu in sod., 2004) in dokazanim zaviralnim učinkom na alfa-glukozidzo in alfa-amilazo (Kim in sod., 2005; Schäfer in Högger, 2007). V doktorskem delu smo prvič dokazali tudi njegovo inhibitorno učinkovanje na DPP4.

Preglednica 12: Inhibicija alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in DPP4 s strani devetih lignanov iz izvlečka lesa bele jelke, v koncentraciji 1 mg/ml. NI – ni inhibicije.

Table 12: The inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase and dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) by nine lignans present in silver fir wood extract. NI – no inhibition.

	Inhibicija (%)		
	Alfa-glukozidaza	Alfa-amilaza	DPP4
Lariciresinol	NI	NI	7,9 ± 7,2
Matairesinol	NI	NI	7,0 ± 14,1
Nortrahalogenin	16,6 ± 6,2	NI	18,9 ± 11,9
Pinoresinol	13,8 ± 5,4	9,2 ± 3,4	7,0 ± 7,0
Sekoizolariciresinol diglukozid	NI	NI	4,3 ± 7,6
Hidroksimatairesinol	1,8 ± 6,6	NI	28,8 ± 17,0
Izolariciresinol	NI	NI	49,2 ± 7,0
Pinoresinol diglukozid	15,8 ± 14,1	NI	49,6 ± 10,2
Sekolariciresinol	NI	17,2 ± 7,6	42,9 ± 20,4

Ekstrakt lesa pravega kostanja so uporabili poleg ekstrakta lesa bele jelke v nedavni klinični raziskavi, kjer so avtorji primerjali njune učinke na koncentracijo glukoze v krvi (Debeljak in sod., 2016). Pri zaužitju izvlečkov skupaj s standardnim obrokom se je glikemični indeks obroka signifikantno znižal v primeru izvlečka lesa bele jelke, ne pa tudi pri izvlečku lesa pravega kostanja. V raziskavah smo zato pri izvlečku lesa pravega kostanja pričakovali manjši učinek na obravnavane encime kot v primeru ekstraktov iglavcev. V nasprotju z našimi pričakovanjimi je izvleček pravega kostanja učinkovito inhibiral alfa-glukozidazo in DPP4, vendar je bil ta učinek šibkejši kot pri ostalih izvlečkih. Poleg tega smo inhibicijo alfa-amilaze z izvlečkom pravega kostanja dosegli šele pri izredno visokih koncentracijah, kar bi lahko pripisali nespecifični inhibiciji ali denaturaciji encima, ki je običajna pri večini rastlinskih ekstraktov v dovolj visoki koncentraciji (Schäfer in Högger, 2007). Kljub *in vitro* učinku, ki smo ga dokazali v naših testih, pa izvleček pravega kostanja ni izkazoval primerljivega *in vivo* učinka, kar bi lahko pripisali potencialno nizki biorazpoložljivosti prisotnih polifenolov, kar je znana lastnost polifenolnih spojin v rastlinski hrani (Hu, 2007).

Razen dela rastline iz katerega sta bila pridobljena, se oba izvlečka bele jelke razlikujeta tudi v uporabi topil pri ekstrakciji. Medtem, ko je bil izvleček lubja pridobljen z ekstrakcijo z organskimi topili (Tavčar Benković in sod., 2014), je bilo topilo pri ekstrakciji lesa voda (Rejc in sod., 2015). Ena izmed pomembnih sestavin vodnih izvlečkov določenih rastlin so lignani, ki pa so v manjši meri prisotni tudi v izvlečku lubja bele jelke, pridobljenem z organskimi topili (Tavčar Benković in sod., 2014). V literaturi so že podatki o antidiabetični aktivnosti lignanov (Xu in sod., 2014), kakor tudi zanimivi, vendar ne dokončni, dokazi iz epidemioloških študij, da lignani prispevajo k zmanjšanju mortalitete zaradi koronarnih srčnih obolenj. Tudi intervencijske študije z uporabo višjih doz so ugotovile pozitivno

asociacijo med uživanjem lignanov in zmanjšanjem verjetnosti za razvoj kardiovaskularnih bolezni (Peterson in sod., 2010).

Naše raziskave kažejo, da lignani sodelujejo pri anti-diabetičnem delovanju izvlečka lesa bele jelke *in vitro*. Niso pa lignani edini odgovorni za ta učinek. V ekstraktih bele jelke so identificirali tudi druge komponente z delovanjem na encime, vpletene v patologijo diabetesa (Tavčar Benković in sod., 2014). Rezultati presejanj naravnih spojin, ki smo jih izvedli (poglavlje 3), so pokazali inhibitorni učinek nekaterih posameznih sestavin izvlečkov bele jelke: galna kislina, protokatehajska kislina in p-hidroksibenzojska kislina so inhibirale alfa-amilazo, medtem ko sta galna kislina in p-kumarna kislina inhibirali alfa-glukozidazo (Roškar in sod., 2016).

Naši rezultati so osvetlili mehanizem *in vivo* delovanja izvlečka lesa bele jelke (Debeljak in sod., 2016) in podpirajo uporabo izvlečkov bele jelke v prehrani ali zdravilih pri prediabetičnih stanjih.

5 SKLEPI

Namen doktorskega dela je bil odkriti nove peptidne ali naravne inhibitorje alfa-amilaze, alfa-glukozidaze in dipeptidil-peptidaze 4. Pri tem smo prišli do naslednjih zaključkov:

- V bakteriofagnih predstavitvenih knjižnicah naključnih peptidov se med okoli 10^{12} različnih peptidov nahajajo tudi peptidi z afiniteto do podganje maltaze-glukoamilaze. Prvi cilj raziskav smo delno dosegli, saj niti z različnimi načini selekcije iz uporabljenih knjižnic nismo izolirali peptidov z afiniteto do dipeptidil-peptidaze 4. V nasprotju s pričakovanji smo tako pridobili mimotope encimov, čigar naravni substrat so sladkorji, ne pa tudi encima, čigar endogeni substrat so peptidi.
- Izolirani peptidi, ki smo jim dokazali afiniteto do podganje maltaze-glukoamilaze, so se med seboj razlikovali in niso tvorili enotnega aminokislinskega motiva, kateremu bi lahko pripisali odgovornost za vezavo na encim.
- Afiniteto do podganje maltaze-glukoamilaze imajo tudi sintezni analogi izbranih izoliranih peptidov.
- Sintezna peptida CGHHHRDYC in CTHYGFRC, ki sta oba zaradi disulfidne vezi med skrajnima cisteinoma ciklične oblike, sta v koncentraciji 1,2 mM zavirala aktivnost podganje maltaze-glukoamilaze. V primerjavi z akarbozo je bila inhibicija majhna, ampak v primeru CGHHHRDYC, statistično značilna.
- Iz nabora 29 naravnih fenolnih spojin smo petnjstim dokazali sposobnost inhibicije alfa-glukozidaze, osmim spojinam inhibicijo alfa-amilaze in osmim inhibicijo dipeptidil-peptidaze 4. Osem spojin uspešno zavira aktivnost dveh izmed treh encimov, medtem ko nordihidrogvajaretinska kislina deluje inhibitorno na vse tri encime. S tem smo kot prvi opisali enega izmed možnih *in vitro* mehanizmov delovanja rastline *Larrea tridentata*, ki vsebuje relativno velike količine tega lignana in se tradicionalno uporablja pri sladkorni bolezni tipa 2.
- Dokazali smo, da sta tako izvleček lesa bele jelke kot izvleček lubja bele jelke močna inhibitorja alfa-glukozidaze in alfa-amilaze, kakor tudi DPP4. Izvleček lesa bele jelke je najmočneje inhibiral alfa-glukozidazo, izvleček lubja bele jelke pa se je izkazal kot najmočnejši inhibitor DPP4.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Sladkorna bolezen tipa 2 je metabolna motnja, za katero sta značilna spremenjeno izločanje inzulina in občutljivost receptorjev za inzulin. To se biokemijsko izraža kot ne uravnan nivo glukoze v krvi na tešče in/ali po obroku. Je ena najbolj pogostih kroničnih bolezni na svetu in v večini razvitih držav med vodilnimi vzroki smrti. Pri terapiji sladkorne bolezni tipa 2 posebno pozornost posvečajo postprandialni hiperglikemiji, ki se je izkazala za pomemben dejavnik tveganja pri večini zapletov, povezanih z boleznjijo. Postprandialna hiperglikemija nastopi zaradi hitrega dviga koncentracije glukoze v krvi po obroku. Uravnavamo jo z upočasnitvijo absorpcije glukoze v krvni obtok. Pri tem lahko delujemo na dve skupini encimov. Prva so prebavne glikozidaze. Njihovo zaviranje upočasni prebavo ogljikovih hidratov do enostavnih monosaharidov, kar upočasni in zmanjša njihovo absorpcijo v krvni obtok. Drugi encim je dipeptidil-peptidaza 4. Zaviranje njegovega delovanja podaljša razpolovni čas inkretinskih hormonov ter posledično poveča izločanje inzulina in privzem glukoze v celice. Te encime smo v doktorskem delu izbrali kot tarče za razvoj novih spojin z antidiabetičnim delovanjem.

Razvoja novega zdravila se lahko lotimo na več načinov. V tem delu smo opisali in uporabili dva: selekcijo peptidnih zaviralcev encimov iz bakteriofagnih peptidno-predstavitvenih knjižnic ter presejanje naravnih fenolnih spojin in rastlinskih izvlečkov.

Pri bakteriofagnih knjižnicah izkoriščamo povezavo med genotipom in fenotipom bakteriofagnih delcev, ki jim v gen za določeni plaščni protein vstavimo zaporedje za naključni peptid, le-ta pa se nato v obliki fuzijskega proteina izrazi na površini bakteriofaga. S selekcijami peptidov iz takšnih knjižnic pridobivamo močne ligande tarčnih proteinov. V prvem delu doktorske naloge smo z metodo bakteriofagnega prikaza iz treh peptidno predstavitvenih knjžnic, ki so se med seboj razlikovale po dolžini in konformacijski svobodi prikazanih peptidov, izolirali peptide z afiniteto do intestinalne alfa-glukozidaze ali do dipeptidil-peptidaze 4.

Kot prvo tarčo smo pri selekcijah uporabili podganjo črevesno maltazo-glukoamilazo. Izvedli smo 6 selekcijskih postopkov. Pri vsakem smo naredili 3 stopnje selekcije ter subtraktivni korak pred drugo in tretjo stopnjo. Izolirali smo 12 različnih peptidov, izmed katerih smo izbrali štiri z najboljšo vezavo na tarčo. Sinteznim analogom teh peptidov smo z encimskim testom dokazali biološko aktivnost. Rezultat selekcij sta bila dva peptida z inhibitornim delovanjem na alfa-glukozidazo, izmed katerih je pri koncentraciji 1,2 mM ciklični peptid CGHHHRDYC izkazoval statistično pomembno delovanje.

Druga tarča pri selekciji peptidov iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic je bila humana rekombinantna dipeptidil-peptidaza 4. Naredili smo 20 selekcij, pri čemer smo uporabili 5 različnih strategij dela s tremi načini imobilizacije tarčne molekule ter dvema načinoma

elucije bakteriofagov. Izolirali smo 78 različnih bakteriofagnih klonov in preverili afiniteto vezave izraženih peptidov do tarčnega encima. Kljub obsežnosti dela nismo izolirali peptidov z želenimi lastnostmi, dokazali pa smo vezavo določenih pridobljenih peptidov na protitelesa, ki smo jih uporabili v selekcijskem postopku.

V drugem delu doktorske naloge smo zaviralce analiziranih encimov iskali med spojinami naravnega izvora. Presejali smo nabor 29 polifenolnih spojin in dvajsetim dokazali zaviralo aktivnost pri vsaj enem izmed encimov alfa-amilaza (8 spojin), alfa-glukozidaza (15 spojin) in dipeptidil-peptidaze 4 (8 spojin). Alfa-glukozidazo in dipeptidil-peptidazo 4 so najučinkoviteje inhibirali flavonoidi, alfa-amilazo pa hidroksibenzojske kislne. Nordihidrogvajaretinska kislina je zavirala delovanje vseh treh encimov, s čimer smo osvetlili mehanizem delovanja rastline *Larrea tridentata*, ki vsebuje velike količine te spojine in se v Severni Ameriki tradicionalno uporablja pri lajšanju sladkorne bolezni tipa 2.

Zaviralo aktivnost preučevanih encimov smo ugotavljali tudi pri izvlečkih lesa in lubja bele jelke (*Abies alba*). Oba izvlečka smo v različnih koncentracijah dodajali encimom, merili rezidualno encimsko aktivnost in izračunali vrednosti IC_{50} . Kot kontroli smo uporabili standardiziran izvleček obmorskega bora (Pycnogenol), z že dokazanim učinkom zaviranja alfa-glukozidaze ter izvleček lesa prvega kostanja, pri katerem aktivnosti nismo pričakovali. Ugotovili smo, da sta oba izvlečka bele jelke izkazovala *in vitro* aktivnost na vseh treh encimih. Alfa-glukozidazo je najučinkoviteje inhibiral izvleček lesa bele jelke, izvleček lubja bele jelke pa je bil najmočnejši inhibitor dipeptidil-peptidaze 4. Alfa-amilazo je najbolj inhibiral Pycnogenol, izmed ekstraktov bele jelke pa jo je bolje inhibiral izvleček lubja. Preverili smo tudi delovanje devetih lignanov, prisotnih v izvlečku lesa bele jelke. Pri koncentraciji 1 mg/ml so vsi zavirali delovanje dipeptidil-peptidaze 4, medtem, ko je bil učinek na alfa-amilazo in alfa-glukozidazo manj opazen.

Tako peptidno zaporedje, ki smo ga identificirali v prvem delu naloge, kot posamezne fenolne spojine in celotni izvlečki lesa in lubja bele jelke, pri katerih smo osvetlili *in vitro* mehanizem antidiabetičnega delovanja, nudijo dobro osnovo za nadaljnji razvoj učinkovin z antidiabetičnim delovanjem, s čimer smo prispevali k razvoju na področju preventive in terapije sladkorne bolezni tipa 2.

6.2 SUMMARY

Type 2 diabetes is a metabolic disorder, characterized by fasting and/or postprandial hyperglycaemia resulting from defects in insulin production and action. It is presently one of the most common chronic diseases worldwide, recognized as a major cause of death in most developed countries. In the therapy, particular attention is given to the postprandial hyperglycaemia, which has been proven to be an important risk factor in the majority of complications associated with the disease. It occurs due to the rapid increase in the blood glucose level after a meal. One way to regulate postprandial hyperglycaemia is by retarding the absorption of glucose by acting on two crucial groups of enzymes. The inhibition of intestinal glucosidases delays the digestion of carbohydrates to simple monosaccharides which slows down and reduces the absorption of glucose into the bloodstream. On the other hand, the inhibition of dipeptidyl-peptidase 4 extends the half-life of incretin hormones, resulting in enhanced insulin secretion and glucose uptake. In the context of the doctoral dissertation those enzymes were chosen as a targets for the development of new compounds with antidiabetic activity.

The development of new medicaments can be approached in several ways; two of them were described and used in this work. The first one was the selection of enzyme inhibitors from the peptide phage displayed libraries, and the second one was the screening of natural phenolic compounds and plant extracts.

The genotype – phenotype association is employed in phage displayed libraries. The DNA encoding the random peptide is fused with phage coat protein genes, and the desired peptide is expressed on the surface of the phage particle. High affinity ligands of various target proteins can be selected from such libraries. In the first part of this work, peptides with affinity for either intestinal alpha-glucosidase or dipeptidyl-peptidase 4 were selected from three different phage displayed random peptide libraries containing peptides of various length and conformational freedom.

First, rat intestinal maltase-glucoamylase was used as a target in six biopanning approaches. At each of them, three rounds of selections were made, including the subtractive step in second and third round. Altogether, peptides with 12 different sequences were isolated and four of them, with highest target-to-background binding, were chosen for further experiments. The biological activity was demonstrated by their synthetic analogues. Finally, two peptides with alpha-glucosidase inhibitory activity were obtained, among which cyclic peptide CGHHHRDYC demonstrated statistically significant activity at the concentration of 1.2 mM.

The second target used for the peptide selection from phage displayed libraries was human recombinant dipeptidyl-peptidase 4. Here, 20 selections were made, using five different biopanning strategies with three modes of target immobilization and two different elution

approaches. 78 different peptides were isolated, yet none of them showed the affinity for the target molecule. Nevertheless, some of the peptides were proven to bind to specific selection-related antibodies.

Compounds of natural origin were analysed in the second part of the doctoral dissertation with the aim of finding researched enzymes inhibitors. Among 29 polyphenolic compounds, twenty of them demonstrated inhibitory activity for at least one of the utilized enzymes: alpha-amylase (8 compounds), alpha-glucosidase (15 compounds) and dipeptidyl-peptidase 4 (8 compounds). We demonstrated that among tested compounds, flavonoids were the most effective inhibitors of alpha-glucosidase as well as of dipeptidyl-peptidase 4 while alpha-amylase was best inhibited by hydroxybenzoic acids. Nordihydroguaiaretic acid, a phenolic compound abundant in Creosote bush, *Larrea tridentata* possessed inhibitory activity for all three enzymes, by which we elucidated the mechanism of action of a plant traditionally used in diabetes treatment in the North America.

Finally, in the last part of this work we analysed silver fir (*Abies alba*) wood and bark extracts for the tested enzymes inhibition. Enzyme activity was measured in the presence of different extract concentrations and IC₅₀ values were calculated. Pycnogenol, a standardised maritime pine bark extract with proven alpha-glucosidase inhibitory effect, was used as a positive control while sweet chestnut wood extract, with no anticipated activity, was used as a negative control. We showed that both silver fir extracts exhibited *in vitro* inhibition of all three enzymes. Alpha-glucosidase was best inhibited by silver fir wood extract and DPP4 was best inhibited by silver fir bark extract. Alpha-amylase was best inhibited by Pycnogenol while among silver fir extracts, the bark extract was more efficient alpha-amylase inhibitor. Nine lignans, present in the silver fir wood extract were further evaluated. All of them inhibited DPP4 in the concentration 1 mg/ml, whereas the effect in alpha-glucosidase and alpha-amylase was less potent.

The peptide sequences, isolated from phage displayed library, as well as indicated phenolic compounds and the silver fir wood and bark extracts, where *in vitro* mechanism of the anti-diabetic action was proposed, provide a good basis for further development of compounds with antidiabetic activity. Accordingly, this doctoral dissertation contributes to the developments in the field of prevention and treatment of type 2 diabetes.

7 VIRI

- Adefegha S. A., Oboh G., Adefegha O. M., Boligon A. A., Athayde M. L. 2014. Antihyperglycemic, hypolipidemic, hepatoprotective and antioxidative effects of dietary clove (*Syzgium aromaticum*) bud powder in a high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes rat model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 13: 2726-2737
- Ahren B. 2007. DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21, 4: 517-533
- Ahren B. 2009. Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin-diabetes control and potential adverse events. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23, 4: 487-498
- Ahren B., Landin-Olsson M., Jansson P. A., Svensson M., Holmes D., Schweizer A. 2004. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 5: 2078-2084
- Albericio F., Kruger H. G. 2012. Therapeutic peptides. *Future Medicinal Chemistry*, 4, 12: 1527-1531
- Ali H., Houghton P. J., Soumyanath A. 2006. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 3: 449-455
- Arteaga S., Andrade-Cetto A., Cardenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 231-239
- Asano N. 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, 13, 10: 93-104
- Asp N. G., Gudmand-Hoyer E., Andersen B., Berg N. O., Dahlqvist A. 1975. Distribution of disaccharidases, alkaline phosphatase, and some intracellular enzymes along the human small intestine. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 10, 6: 647-651
- Atanasov A. G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E. M., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Stuppner H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33, 8: 1582-1614
- Baggio L. L., Drucker D. J. 2007. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132, 6: 2131-2157
- Bahadoran Z., Mirmiran P., Azizi F. 2013. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12: 43
- Barnett A. 2006. DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *International Journal of Clinical Practice*, 60, 11: 1454-1470

- Bayer. 2010. Glucobay: Povzetek glavnih značilnosti zdravila.
http://skrito.draagle.com/media/d/smfp/054100_smfp.pdf (1. nov. 2016)
- Bernfeld P. 1955. Amylases, α and β Methods in Enzymology. Academic Press, 1: 149-158
- Bischoff H. 1994. Pharmacology of alpha-glucosidase inhibition. European Journal of Clinical Investigation, 24, 3: 3-10
- Bond A. 2006. Exenatide (Byetta) as a novel treatment option for type 2 diabetes mellitus. Proceedings Baylor University Medical Center, 19, 3: 281-284
- Boonacker E., Van Noorden C. J. 2003. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. European Journal of Cell Biology, 82, 2: 53-73
- Brammer L. A., Bolduc B., Kass J. L., Felice K. M., Noren C. J., Hall M. F. 2008. A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site. Analytical Biochemistry, 373, 1: 88-98
- Bratkovič T., Lunder M., Popovič T., Kreft S., Turk B., Štrukelj B., Urleb U. 2005. Affinity selection to papain yields potent peptide inhibitors of cathepsins L, B, H, and K. Biochemical and Biophysical Research Communications, 332, 3: 897-903
- Bratkovič T. 2007. Razvoj novih peptidnih inhibitorjev cisteinskih proteaz in Mur-ligaz z metodo prikaza na bakteriofagu, doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 110 str.
- Bratkovič T., Sollner Dolenc M. 2004. Oligopeptidne in peptidomimetične kombinatorične knjižnice kot orodje za odkrivanje novih spojin vodnic. Farmacevtski vestnik, 55, 1: 49-54
- Brayer G. D., Luo Y., Withers S. G. 1995. The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. Protein Science: A Publication of the Protein Society, 4, 9: 1730-1742
- Ceriello A. 2005. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? Diabetes, 54, 1: 1-7
- Chehade J. M., Mooradian A. D. 2000. A Rational Approach to Drug Therapy of Type 2 Diabetes Mellitus. Drugs, 60, 1: 95-113
- Chen J., Bai G., Yang Y., Geng P., Cao Y., Zhu Y. 2007. Identifying glucagon-like peptide-1 mimetics using a novel functional reporter gene high-throughput screening assay. Peptides, 28, 4: 928-934
- Chiba S. 1997. Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 61, 8: 1233-1239
- De Meester I., Korom S., Van Damme J., Scharpe S. 1999. CD26, let it cut or cut it down. Immunology Today, 20, 8: 367-375

- Deacon C. F. 2004. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. Hormone and Metabolic Research, 36, 11: 761-765
- Deacon C. F. 2005. What do we know about the secretion and degradation of incretin hormones? Regulatory Peptides, 128, 2: 117-124
- Debeljak J., Ferk P., Čokolič M., Zavratnik A., Tavčar Benković E., Kreft S., Štrukelj B. 2016. Randomised, double blind, cross-over, placebo and active controlled human pharmacodynamic study on the influence of silver fir wood extract (Belinal) on post-prandial glycemic response. Die Pharmazie, 71, 10: 566-569
- Del Prato S. 2009. Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies. Diabetic Medicine, 26, 12: 1185-1192
- Denisova G. F., Denisov D. A., Bramson J. L. 2010. Applying bioinformatics for antibody epitope prediction using affinity-selected mimotopes - relevance for vaccine design. Immunome Research, 6, e, doi:10.1186/1745-7580
- Dhital S., Lin A. H. M., Hamaker B. R., Gidley M. J., Muniandy A. 2013. Mammalian Mucosal alpha-Glucosidases Coordinate with alpha-Amylase in the Initial Starch Hydrolysis Stage to Have a Role in Starch Digestion beyond Glucogenesis. PLoS ONE, 8, 4: e, doi:10.1371/journal.pone.0062546
- Doupis J., Veves A. 2008. DPP4 inhibitors: a new approach in diabetes treatment. Advances in Therapy, 25, 7: 627-643
- Drevenšek G., Lunder M., Tavčar Benković E., Mikelj A., Štrukelj B., Kreft S. 2015. Silver fir (*Abies alba*) trunk extract protects guinea pig arteries from impaired functional responses and morphology due to an atherogenic diet. Phytomedicine, 22, 9: 856-861
- Drucker D. J. 2006. The biology of incretin hormones. Cell Metabolism, 3, 3: 153-165
- Duez H., Cariou B., Staels B. 2012. DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. Biochemical Pharmacology, 83, 7: 823-832
- Durinx C., Lambeir A. M., Bosmans E., Falmagne J. B., Berghmans R., Haemers A., De Meester I. 2000. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. European Journal of Biochemistry, 267, 17: 5608-5613
- Eichler J., Lucka A. W., Pinilla C., Houghten R. A. 1996. Novel alpha-glucosidase inhibitors identified using multiple cyclic peptide combinatorial libraries. Molecular Diversity, 1, 4: 233-240
- El-Abhar H. S., Schaal M. F. 2014. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. World Journal of Diabetes, 5, 2: 176-197

- Elrick H., Stimmller L., Hlad C. J., Arai Y. 1964. Plasma insulin response to oral and intravenous glucose administration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 24: 1076-1082
- Fosgerau K., Hoffmann T. 2015. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discovery Today*, 20, 1: 122-128
- Fu Z., Yuskavage J., Liu D. 2013. Dietary flavonol epicatechin prevents the onset of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 18: 4303-4309
- Funke I., Melzig M. F. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy: phytotherapeutics as inhibitors of alpha-amylase activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16: 1-5
- Furka Á. 1995. History of combinatorial chemistry. *Drug Development Research*, 36, 1: 1-12
- Gaser D., Štrukelj B., Bratkovič T., Kreft S., Pungerčar J., Lunder M. 2009. Cross-affinity of Peptide Ligands Selected from Phage Display Library Against Pancreatic Phospholipase A2 and Ammodytoxin C. *Acta Chimica Slovenica*, 56: 712-717
- Goldflam M., Ullman C. G. 2015. Recent Advances Toward the Discovery of Drug-Like Peptides De novo. *Frontiers in Chemistry*, 3, e, doi:10.3389/fchem.2015.00069
- Gray G. M., Lally B. C., Conklin K. A. 1979. Action of intestinal sucrase-isomaltase and its free monomers on an alpha-limit dextrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 13: 6038-6043
- Groot P. C., Bleeker M. J., Pronk J. C., Arwert F., Mager W. H., Planta R. J., Frants R. R. 1988. Human pancreatic amylase is encoded by two different genes. *Nucleic Acids Research*, 16, 10: 4724
- Gutniak M., Orskov C., Holst J. J., Ahren B., Efendic S. 1992. Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 326, 20: 1316-1322
- Hakamata W., Kurihara M., Okuda H., Nishio T., Oku T. 2009. Design and screening strategies for alpha-glucosidase inhibitors based on enzymological information. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 1: 3-12
- Hanhineva K., Torronen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkanen H., Poutanen K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 4: 1365-1402
- He Y. L., Balch A., Campestrini J., Rivere G. J., Serra D., Prasad P., Ligueros-Saylan M. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the DPP-4 inhibitor, LAF237, in patients with type 2 diabetes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 77, 2: 56-56
- Henrich C. J., Beutler J. A. 2013. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. *Natural Product Reports*, 30, 10: 1284-1298

- Herman G. A., Stevens C., Van Dyck K., Bergman A., Yi B., De Smet M., Wagner J. A. 2005. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78, 6: 675-688
- Holst J. J., Gromada J. 2004. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology*, 287, 2: 199-206
- Holst J. J., Knop F. K., Vilsbøll T., Krarup T., Madsbad S. 2011. Loss of Incretin Effect Is a Specific, Important, and Early Characteristic of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 34, 2: 251-257
- Hu M. 2007. Commentary: Bioavailability of Flavonoids and Polyphenols: Call to Arms. *Molecular pharmaceutics*, 4, 6: 803-806
- Huang J., Ru B., Li S., Lin H., Guo F. B. 2010. SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, ID 101932, doi: 10.1155/2010/101932: 7 str.
- Huang J., Ru B., Zhu P., Nie F., Yang J., Wang X., Rao N. 2012. MimoDB 2.0: a mimotope database and beyond. *Nucleic Acids Research*, 40: 271-277
- IDF Diabetes Atlas, 7 ed. 2015. Bruselj, Belgija, International Diabetes Federation: 144 str.
- Invitrogen, Dynabeads® M-280 Tosylactivated. Catalog nos. 14203, 14204; Manual. 2016. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/dynabeads_m280tosylactivated_man.pdf (21. okt. 2016)
- Inzucchi S. E. 2002. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *Jama*, 287, 3: 360-372
- Jadhav R., Puchchakayala G. 2012. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 2: 251-256
- Johnson M. A., Pinto B. M. 2008. Structural and functional studies of Peptide-carbohydrate mimicry. *Topics in Current Chemistry*, 273: 55-116
- Johnson T. O., Ermolieff J., Jirousek M. R. 2002. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 9: 696-709
- Jones B. J., Brown B. E., Loran J. S., Edgerton D., Kennedy J. F., Stead J. A., Silk D. B. 1983. Glucose absorption from starch hydrolysates in the human jejunum. *Gut*, 24, 12: 1152-1160
- Kang K. S., Lee W., Jung Y., Lee J. H., Lee S., Eom D. W., Kim S. N. 2014. Protective effect of esculetin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9: 2069-2076

- Kaspar A. A., Reichert J. M. 2013. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discovery Today*, 18,17: 807-817
- Kay B. K., Kurakin A. V., Hyde-DeRuyscher R. 1998. From peptides to drugs via phage display. *Drug Discovery Today*, 3, 8: 370-378
- Kim Y.M., Jeong Y.K., Wang M.H., Lee W.Y., Rhee H.I. 2005. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21, 6: 756-761
- Kinghorn A. D., Pan L., Fletcher J. N., Chai H. 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *Journal of Natural Products*, 74, 6: 1539-1555
- Kopcho L. M., Kim Y. B., Wang A., Liu M. A., Kirby M. S., Marcinkevičiene J. 2005. Probing prime substrate binding sites of human dipeptidyl peptidase-IV using competitive substrate approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 436, 2: 367-376
- Kreft S., Kočevar Glavač N. 2013. Sodobna fitoterapija: z dokazi podprtja uporaba zdravilnih rastlin. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 703 str.
- Krentz A. J., Bailey C. J. 2005. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 65, 3: 385-411
- Lahlou M. 2013. The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 3A: 17-31
- Lambeir A. M., Durinx C., Scharpé S., De Meester I. 2003. Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside: An Update on Structural Properties, Functions, and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40, 3: 209-294
- Lee B. H., Eskandari R., Jones K., Reddy K. R., Quezada-Calvillo R., Nichols B. L., Pinto B. M. 2012. Modulation of starch digestion for slow glucose release through "toggling" of activities of mucosal alpha-glucosidases. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 38: 31929-31938
- Li J. D., Wang K. Y. 2001. Screening An alpha-glucosidase Inhibitor from A Phage-displayed Peptide Library. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 33, 5: 513-518
- Lien S., Lowman H. B. 2003. Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology*, 21, 12: 556-562
- Liu X., Wei J., Tan F., Zhou S., Würthwein G., Rohdewald P. 2004. Antidiabetic effect of Pycnogenol® French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sciences*, 75, 21: 2505-2513
- Lovshin J. A., Zinman B. 2014. Blood pressure-lowering effects of incretin-based diabetes therapies. *Canadian Journal of Diabetes*, 38, 5: 364-371

- Lunder M., Bratkovič T., Kreft S., Štrukelj, B. 2005. Peptide inhibitor of pancreatic lipase selected by phage display using different elution strategies. *The Journal of Lipid Research*, 46, 7: 1512-1516
- Maimoona A., Naeem I., Saddiqe Z., Jameel K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 2: 261-277
- Malini P., Kanchana G., Rajadurai M. 2011. Antidiabetic efficacy of ellagic acid in streptozotocin-induced diabetes mellitus in albino wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4, 3: 124-128
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 5: 727-747
- Mari A., Sallas W. M., He Y. L., Watson C., Ligueros-Saylan M., Dunning B. E., Foley J. E. 2005. Vildagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor, improves model-assessed beta-cell function in patients with type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90, 8: 4888-4894
- Maruyama K., Iso H., Sasaki S., Fukino Y. 2009. The Association between Concentrations of Green Tea and Blood Glucose Levels. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 44, 1: 41-45
- Matheeuussen V., Lambeir A. M., Jungraithmayr W., Gomez N., McEntee K., Van der Veken P., De Meester I. 2012. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays and their application in biological samples containing reversible inhibitors. *Clinica Chimica Acta*, 413: 456-462
- Matikainen N., Manttari S., Schweizer A., Ulvestad A., Mills D., Dunning B. E., Taskinen M. R. 2006. Vildagliptin therapy reduces postprandial intestinal triglyceride-rich lipoprotein particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 49, 9: 2049-2057
- Matsubara T. 2012. Potential of peptides as inhibitors and mimotopes: selection of carbohydrate-mimetic peptides from phage display libraries. *Journal of Nucleic Acids*, 2012, ID 740982, doi: 10.1155/2012/740982: 15 str.
- Matsui T., Ebuchi S., Kobayashi M., Fukui K., Sugita K., Terahara N., Matsumoto K. 2002. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 25: 7244-7248
- Matsui T., Shimada M., Saito N., Matsumoto K. 2009. Alpha-glucosidase inhibition assay in an enzyme-immobilized amino-microplate. *Analytical Sciences*, 25, 4: 559-562
- McConnell S. J., Dinh T., Le M. H., Spinella D. G. 1999. Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. *Biotechniques*, 26, 2: 208-210

- McConnell S. J., Kendall M. L., Reilly T. M., Hoess R. H. 1994. Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene*, 151, 1: 115-118
- McIntosh C. H. 2008. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Frontiers in Bioscience*, 13: 1753-1773
- Meier J. J., Gallwitz B., Siepmann N., Holst J. J., Deacon C. F., Schmidt W. E., Nauck M. A. 2003. Gastric inhibitory polypeptide (GIP) dose-dependently stimulates glucagon secretion in healthy human subjects at euglycaemia. *Diabetologia*, 46, 6: 798-801
- Meier J. J., Nauck M. A. 2004. GIP as a potential therapeutic agent? *Hormone and Metabolic Research*, 36, 11: 859-866
- Menendez A., Scott J. K. 2005. The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical Biochemistry*, 336, 2: 145-157
- Mennuni C., Santini C., Dotta F., Farilla L., Di Mario U., Fierabracci A., Luzzago A. 1996. Selection of phage-displayed peptides mimicking type 1 diabetes-specific epitopes. *Journal of Autoimmunity*, 9, 3: 431-436
- Mentlein R. 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory Peptides*, 85, 1: 9-24
- Mentlein R. 2004. Cell-surface peptidases. *International Review of Cytology*, 235: 165-213
- Mohamed Sham Shihabudeen H., Hansi Priscilla D., Thirumurugan K. 2011. Cinnamon extract inhibits alpha-glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutrition & Metabolism*, 8, 1: 46, doi:10.1186/1743-7075-8-46: 11 str.
- Molek P. 2015. Razvoj peptidnih modulatorjev delovanja leptina in vrednotenje njihove biološke aktivnosti: doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo: 217 str.
- Moolenaar C. E., Naim H. Y. 1995. Cloning and expression of human intestinal sucrase-isomaltase. *Biochemical Society Transactions*, 23, 2: 304
- Morimoto C., Lord C. I., Zhang C., Duke-Cohan J. S., Letvin N. L., Schlossman S. F. 1994. Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human immunodeficiency virus type 1 infection and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 21: 9960-9964
- Muthukumaran J., Srinivasan S., Venkatesan R. S., Ramachandran V., Muruganathan U. 2013. Syringic acid, a novel natural phenolic acid, normalizes hyperglycemia with special reference to glycoprotein components in experimental diabetic rats. *Journal of Acute Disease*, 2, 4: 304-309
- Nagao T., Meguro S., Hase T., Otsuka K., Komikado M., Tokimitsu I., Yamamoto K. 2009. A catechin-rich beverage improves obesity and blood glucose control in patients with type 2 diabetes. *Obesity*, 17: 310-317

- Naim H. Y., Sterchi E. E., Lentze M. J. 1988. Structure, biosynthesis, and glycosylation of human small intestinal maltase-glucoamylase. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 36: 19709-19717
- Nakamura S., Takahira K., Tanabe G., Muraoka O., Nakanishi I. 2012. Homology Modeling of Human Alpha-Glucosidase Catalytic Domains and SAR Study of Salacinol Derivatives. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 2, 3: 50-60
- Nauck A. M., Wollschläger D., Werner J., Holst J. J., Ørskov C., Creutzfeldt W., Willms B. 1996. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide 1 (GLP-1 [7–36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*, 39, 12: 1546-1553
- Nauck M. A., Meininger G., Sheng D., Terranella L., Stein P. P. 2007. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, compared with the sulfonylurea, glipizide, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin alone: a randomized, double-blind, non-inferiority trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9, 2: 194-205
- Newman D. J., Cragg G. M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 3: 311-335
- Nichols B. L., Avery S., Sen P., Swallow D. M., Hahn D., Sterchi E. 2003. The maltase-glucoamylase gene: Common ancestry to sucrase-isomaltase with complementary starch digestion activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 3: 1432-1437
- Nichols B. L., Eldering J., Avery S., Hahn D., Quaroni A., Sterchi E. 1998. Human small intestinal maltase-glucoamylase cDNA cloning. Homology to sucrase-isomaltase. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 5: 3076-3081
- NIJZ. 2015. Obvladajmo sladkorno bolezen v Sloveniji.
<http://www.nijz.si/sl/obvladajmo-sladkorno-bolezen-v-sloveniji> (31. okt. 2016)
- Nikolaidis L. A., Mankad S., Sokos G. G., Miske G., Shah A., Elahi D., Shannon R. P. 2004. Effects of glucagon-like peptide-1 in patients with acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction after successful reperfusion. *Circulation*, 109, 8: 962-965
- Nyenwe E. A., Jerkins T. W., Umpierrez G. E., Kitabchi A. E. 2011. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*, 60, 1: 1-23
- Nystrom T., Gutniak M. K., Zhang Q., Zhang F., Holst J. J., Ahren B., Sjoholm A. 2004. Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 287, 6: 1209-1215
- Oki T., Matsui T., Matsumoto K. 2000. Evaluation of alpha-glucosidase inhibition by using an immobilized assay system. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23, 9: 1084-1087

- Oki T., Matsui T., Osajima Y. 1999. Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2: 550-553
- Oku T., Tanabe K., Ogawa S., Sadamori N., Nakamura S. 2011. Similarity of hydrolyzing activity of human and rat small intestinal disaccharidases. *Journal of Clinical and Experimental Gastroenterology*, 4: 155-161
- Opinto G., Natalicchio A., Marchetti P. 2013. Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 119, 4: 170-178
- Good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva WHO: 80 str.
- Ovaskainen M. L., Torronen R., Koponen J. M., Sinkko H., Hellstrom J., Reinivuo H., Mattila P. 2008. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *Journal of Nutrition*, 138, 3: 562-566
- Pandey K. B., Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 5: 270-278
- Perfetti R., Hui H. 2004. The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Hormone and Metabolic Research*, 36, 11: 804-810
- Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P., McCullough M. L. 2010. Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutrition Reviews*, 68, 10: 571-603
- Prabhakar P. K., Doble M. 2008. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Current Diabetes Reviews*, 4, 4: 291-308
- Priročnik za uporabo: Ph.D. Phage Display Libraries. Instruction Manual. Version 2.1 7/16.N.
<http://www.neb.com/~media/Catalog/Allproducts/BDA9A6DB00DC42E8B93A8D8FBD08C49B/Datacards%20or%20Manuals/manualE8100.pdf> (20. okt. 2016)
- Qin X., Ren L., Yang X., Bai F., Wang L., Geng P., Shen Y. 2011. Structures of human pancreatic alpha-amylase in complex with acarviostatins: Implications for drug design against type II diabetes. *Journal of Structural Biology*, 174, 1: 196-202
- Quezada-Calvillo R., Robayo-Torres C. C., Ao Z., Hamaker B. R., Quaroni A., Brayer G. D., Nichols B. L. 2007. Luminal substrate "brake" on mucosal maltase-glucoamylase activity regulates total rate of starch digestion to glucose. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45, 1: 32-43
- Quezada-Calvillo R., Sim L., Ao Z., Hamaker B. R., Quaroni A., Brayer G. D., Nichols B. L. 2008. Luminal starch substrate "brake" on maltase-glucoamylase activity is located within the glucoamylase subunit. *Journal of Nutrition*, 138, 4: 685-692

- Ramesh B., Pugalendi K. V. 2006. Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, 9, 4: 562-566
- Rejc T., Petric U., Debeljak J., Bremec T., Ferk P., Lunder M., Roškar I., Štrukelj B., Kreft, S. 2015. Zmes naravnih polifenolov iz lesa bele jelke za zmanjšanje postprandialne glukoze: patentna prijava: P-201500116. Ljubljana: Urad RS za intelektualno lastnino, 15 str.
- Ren L., Cao X., Geng P., Bai F., Bai G. 2011. Study of the inhibition of two human maltase-glucoamylases catalytic domains by different alpha-glucosidase inhibitors. *Carbohydrate Research*, 346, 17: 2688-2692
- Robayo-Torres C. C., Quezada-Calvillo R., & Nichols B. L. 2006. Disaccharide digestion: clinical and molecular aspects. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4, 3: 276-287
- Rohdewald P. 2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 40, 4: 158-168
- Rohrborn D., Wronkowitz N., Eckel J. 2015. DPP4 in Diabetes. *Frontiers in Immunology*, 6: 386
- Roškar, I., Štrukelj, B., Lunder, M. 2016. Screening of Phenolic Compounds Reveals Inhibitory Activity of Nordihydroguaiaretic Acid Against Three Enzymes Involved in the Regulation of Blood Glucose Level. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71, 1: 88-89
- Rossi E. J., Sim L., Kuntz D. A., Hahn D., Johnston B. D., Ghavami A., Rose D. R. 2006. Inhibition of recombinant human maltase glucoamylase by salacinol and derivatives. *The FEBS Journal*, 273, 12: 2673-2683
- Sachdeva S. 2016. Peptides as ‘Drugs’: The Journey so Far. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 1, e, doi:10.1007/s10989-016-9534-8
- Sales P. M., Souza P. M., Simeoni L. A., Silveira D. 2012. Alpha-amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15, 1: 141-183
- Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémesy C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 6: 276-282
- Schäfer A., Högger P. 2007. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) effectively inhibit α -glucosidase. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77, 1: 41-46
- Scott J. K., Smith G. P. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*, 249, 4967: 386-390

- Sergeeva A., Kolonin M. G., Molldrem J. J., Pasqualini R., Arap, W. 2006. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 15: 1622-1654
- Shapiro G. L., Bulow S. D., Conklin K. A., Scheving L. A., & Gray G. M. 1991. Postinsertional processing of sucrase-alpha-dextrinase precursor to authentic subunits: multiple step cleavage by trypsin. *American Journal of Physiology*, 261, 5: 847-857
- Sheard N. F., Clark N. G., Brand-Miller J. C., Franz M. J., Pi-Sunyer F. X., Mayer-Davis E., Geil P. 2004. Dietary Carbohydrate (Amount and Type) in the Prevention and Management of Diabetes. *Diabetes Care*, 27, 9: 2266-2271
- Sidhu S. S. 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 6: 610-616
- Sim L., Quezada-Calvillo R., Sterchi E. E., Nichols B. L., Rose, D. R. 2008. Human intestinal maltase-glucoamylase: crystal structure of the N-terminal catalytic subunit and basis of inhibition and substrate specificity. *Journal of Molecular Biology*, 375, 3: 782-792
- Sim L., Willemsma C., Mohan S., Naim H. Y., Pinto B. M., Rose D. R. 2010. Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and sucrase-isomaltase N-terminal domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 23: 17763-17770
- Skliros N. P., Vlachopoulos C., Tousoulis D. 2016. Treatment of diabetes: Crossing to the other side. *Hellenic Journal of Cardiology*, sprejeto v objavo
- Smernice za obvladovanje koncentracije glukoze po obrokih. 2007. Bruselj, Belgija, International Diabetes Federation: 31 str.
- Smith G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 4705: 1315-1317
- Smith G. P., Petrenko V. A. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews*, 97, 2: 391-410
- Solayman M., Ali Y., Alam F., Islam M. A., Alam N., Khalil M. I., Gan S. H. 2016. Polyphenols: Potential Future Arsenals in the Treatment of Diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 22, 5: 549-565
- Sun L. 2013. Peptide-Based Drug Development. *Modern Chemistry and Applications*, 1, 1
- Štrukelj B., Kos, J. 2007. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.
- Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. 2006. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 52, 2: 149-153

- Tavčar Benković E., Grohar T., Žigon D., Švajger U., Janeš D., Kreft S., Štrukelj B. 2014. Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol® and its antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 52: 23-28
- Tavčar Benković E., Žigon D., Mihajlovič V., Jamnik P., Štrukelj B., Kreft, S. 2016. Identification, in vitro and in vivo antioxidant activity, and gastrointestinal stability of lignans from silver fir (*Abies alba*) wood extract (poslano v objavo)
- Thornberry N. A., Gallwitz B. 2009. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4). *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 23, 4: 479-486
- Van Beers E. H., Buller H. A., GrandnR. J., Einerhand A. W., Dekker J. 1995. Intestinal brush border glycohydrolases: structure, function, and development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 3: 197-262
- Vilsboll T., Holst J. J. 2004. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47, 3: 357-366
- Vodnik M., Štrukelj B., Lunder M. 2012. HWGMWSY, an unanticipated polystyrene binding peptide from random phage display libraries. *Analytical Biochemistry*, 424, 2: 83-86
- Vodnik M., Žager U., Štrukelj B., Lunder M. 2011. Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules*, 16, 1: 790-817
- Waget A., Cabou C., Masseboeuf M., Cattan P., Armanet M., Karaca M., Burcelin R. 2011. Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice. *Endocrinology*, 152, 8: 3018-3029
- Wang H., Du Y.J., Song, H.C. 2010. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, 123, 1: 6-13
- Wang T., Li X., Zhou B., Li H., Zeng J., Gao W. 2015. Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and α -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). *Journal of Functional Foods*, 13: 276-288
- West L. F., Davis M. B., Green F. R., Lindenbaum R. H., Swallow D. M. 1988. Regional assignment of the gene coding for human sucrase-isomaltase (SI) to chromosome 3q25-26. *Annals of Human Genetics*, 52, 1: 57-61
- Whitcomb D. C., Lowe M. E. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*, 52, 1: 1-17
- Wong D. W., Robertson G. H., Tillin S. J., Wong, C. 1999. Phage-displayed peptide ligands for pancreatic alpha-amylase cross-react with barley alpha-amylase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 9: 3934-3937

- Xiao J., Kai G., Ni X., Yang F., Chen X. 2011. Interaction of natural polyphenols with alpha-amylase in vitro: molecular property-affinity relationship aspect. *Molecular BioSystems*, 7, 6: 1883-1890
- Xiao J. B., Hogger P. 2015. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 22: 23-38
- Xu G., Stoffers D. A., Habener J. F., Bonner-Weir S. 1999. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*, 48, 12: 2270-2276
- Xu Z., Ju J., Wang K., Gu C., Feng Y. 2014. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from *Fructus Arctii* in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 1: 548-555
- Yao Y., Luong T. N., Lepik M., Aftab N., Fong V. H., Vieira A. 2012. Synergism of antioxidant phytochemicals: comparisons among purified polyphenols and dietary plant extracts. *Acta Horticulturae*, 939: 121-127
- Yip V. L., Withers S. G. 2004. Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2, 19: 2707-2713
- Yoshikawa Y., Hirata R., Yasui H., Hattori M., Sakurai H. 2010. Inhibitory effect of CuSO₄(4) on alpha-glucosidase activity in ddY mice. *Metallomics*, 2, 1: 67-73

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Mojci Lunder, za zavzetost pri strokovnem usmerjanju in pomoč pri raziskovalnem delu. Hvala za vse spodbude, znanje in optimizem ter vedno, tudi v poznih popoldanskih urah, odprta vrata.

Iskrena hvala tudi prof. dr. Borutu Štruklju, ki mi je odprl pot v svet znanosti in mi omogočil raziskovalno delo. Hvala za to priložnost ter številne strokovne in življenske modrosti, ki sem jih prejela tekom študija.

Članom komisije, prof. dr. Mojci Narat, prof. dr. Petru Mačku in prof. dr. Samu Kreftu, se iskreno zahvaljujem za čas in skrb, ki ste ju vložili v pregled in oceno disertacije.

Sodelavcem na Medisu se zahvaljujem za razumevanje ter podporo tekom študija.

Hvala čisto vsem sodelavcem na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo za vse nasvete, strokovne diskusije ter vedno prijetno vzdušje. Še posebej hvala dr. Petru Moleku in dr. Mihu Vodniku za pomoč pri premagovanju začetnih težav pri delu v laboratoriju ter za vse spodbudne besede in prijetna druženja ob delu. Hvala tudi cimrom iz sobe 222 za vse strokovne posvete in prijetne klepete.

Predvsem pa, draga družina, neizmerna hvala za razumevanje, brezpogojno pomoč in vso podporo, ki ste mi jo nudili pri nastajanju tega dela.