

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2010

MOLEKULARNA ENCIMOLOGIJA
KLINIČNI IN TEHNOLOŠKI POMEN
(s primeri)

Matjaž Zorko
Medicinska fakulteta

GLEJ: http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/lab_medicina/default.html

Klinični pomen encimov

- diagnostika
- terapija
- kot pomožna sredstva

Encimi v diagnostiki

- Encimi kot diagnostični indikatorji → določanje encimske aktivnosti v plazmi
- encimi kot reagenti v klinični analitiki

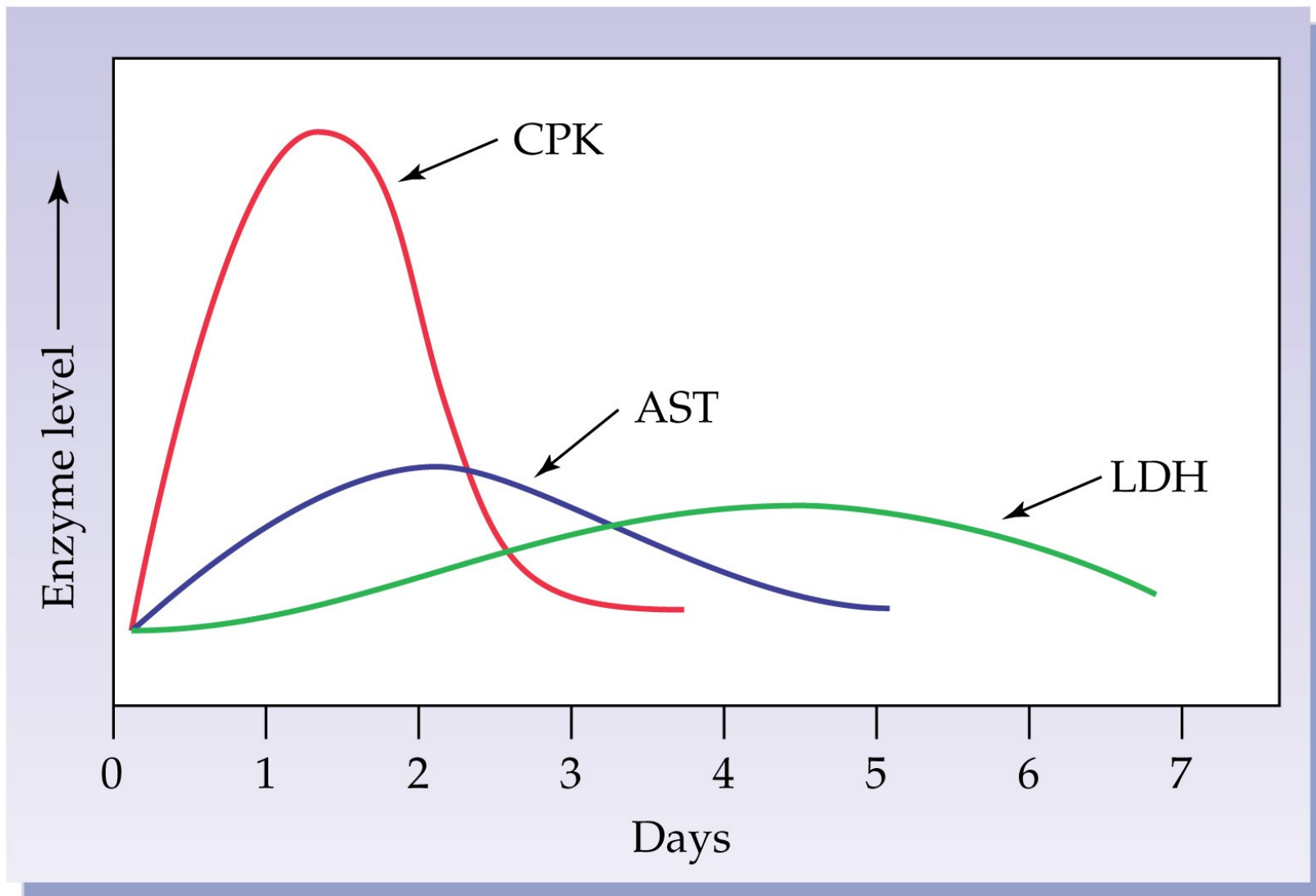
Encimi kot diagnostični indikatorji:

V krvotoku zdravega človeka ni veliko encimov (encimi za koagulacijo krvi, butirilholinesteraza...). Pri različnih boleznih določena tkiva propadajo, encimi pridejo v kri, kjer se njihova aktivnost močno poveča. To se izkorišča za diagnostične namene. V nekaterih patoloških stanjih se lahko encimska aktivnost tudi zmanjša. Najprej pa moramo natančno poznati kateri encimi so povezani z določeno boleznijo in njihove normalne aktivnosti v krvi.

Primeri:

1. Srčni infarkt so nekoč diagnosticirali (potrjevali) s pomočjo določanja aktivnosti laktat-dehidrogenaze (LDH) tipa H₄ in MH₃, kreatin-fosfokinaze (CPK) in aspartat-transaminaze (AST), danes pa se večinoma določa srčni troponin (ni encim).

Časovna odvisnost aktivnosti kreatin-fosfokinaze (CPK), aspartat-transaminaze (AST) in laktat-dehidrogenaze (LDH) v krvi pacienta po srčnem napadu. S takimi diagrami lahko pri pacientu potrdijo ali ovržejo sum na srčni infarkt.



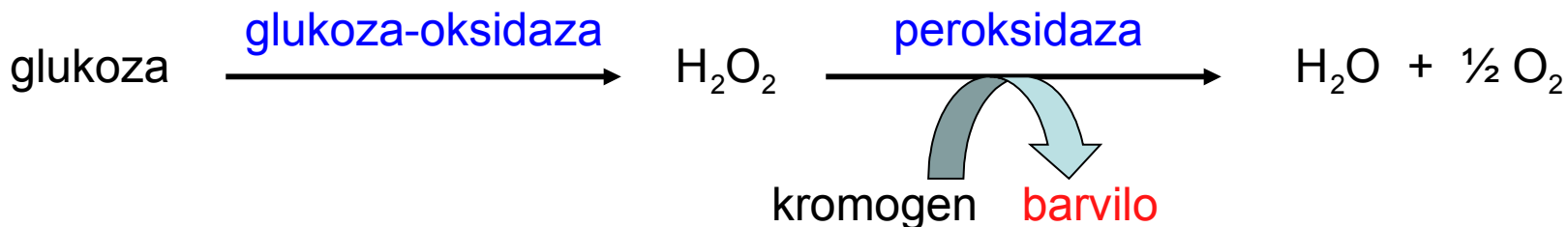
DRUGI ENCIMI KOT DIAGNOSTIČNI INDIKATORJI

- zmanjšana aktivnost holinesteraz pri zastrupitvi z organofosfati (pesticidi, bojni strupi...)
- ala-transaminaza in asp-transaminaza – razpad jeter (ciroza, rak...)
- alkalna fosfataza v krvi – kostne in jetrne bolezni (razlika v denaturaciji!)
- kislina fosfataza v krvi – rak prostate
- tripsin, lipaza in amilaza - pankreatitis

Encimi kot reagenti v klinični analitiki

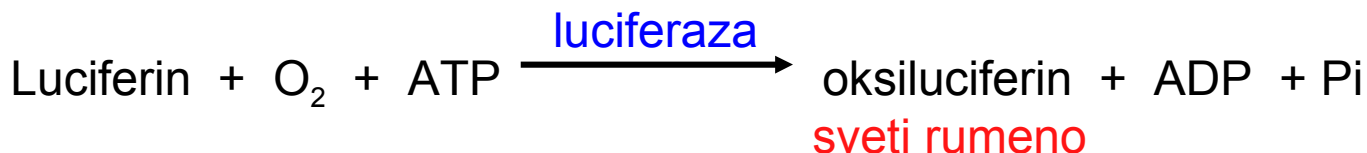
Koncentracije številnih spojin določajo v fizioloških tekočinah s pomočjo encimskih testov:

glukoza:



Uporabno npr. za hitro diagnozo glukoze v urinu → diabetes

Na podoben način določajo koncentracijo piruvata in laktata v krvi (z laktat-dehidrogenazo) ali ATP (luciferaza):



VEČ O TEM BO NA SEMINARJIH!

Encimi v terapiji

Direktna uporaba encimov je zelo omejena zaradi razgradnje v prebavnem traktu in težav pri resorpciji in dostavi v ustrezno tkivo v organizmu.

- prebavni encimi (oralna uporaba)
- nekatere encime lahko dodajamo intravensko

Dodajanje prebavnih encimov (oralna uporaba):

Laktaza → laktozna intoleranca:

Laktoza se ne resorbira, potrebna je laktaza, da jo pretvori v glukozo in galaktozo, ki se resorbirata. Laktozna intoleranca se pojavlja pri odraslih in se navadno stopnjuje s starostjo. Lahko je genetska → pojavi se že v otroštvu.

Dodaja se laktaza v kapsulah z zaščitno plastjo, da lahko preidejo želodec, ne da bi se laktaza razgradila ali denaturirala.

Bolezni ali (delna) odstranitev trebušne slinavke:

Ni prebavnih encimov (proteinaze, lipaze, amilaze...), ki jih je potrebno dodajati. Pankreatin = ekstrakt iz prašičjih pankreasov se še vedno uporablja kljub rekombinantnim čistim encimom.

Uporablja se tudi pri **cistični fibrozi** za zagotovitev ustrezne prehranjenosti ter pri **luskavici** za zmanjšanje količine alergenov. Pri slednji se uporablja tudi zonaza iz iker (lososa) za odstranjevanje odmrlega tkiva - mazilo.

Dodajanje encimov v krvni obtok (intravenska uporaba):

Nadomestna terapija pri genetskih boleznih:

- Genetske bolezni = prirojena okvara gena za določen protein, v našem primeru encim. Avtosomno recesivne genetske bolezni → homozigoti imajo manj kot 10% normalno aktivnosti, heterozigoti pa 50%. Avtosomno dominantnih ni → fetus ne preživi.
- Večine encimov ne moremo dodajati, ker ne pridejo v ustrezna tkiva. Pomagajo si z liposomi in drugimi nosilci (CPP).
- Primer 1: Gaucherjeva bolezen tip I = pomanjkanje glukocerebrozidaze, zato nabiranje cerebrozidov (lipidi); 60.000 pacientov. Pomaga doživljsko iniciranje encima (Cerezyme®).
- Primer 2: Mukopolisaharidoza VI, pomanjkanje encima N-acetilgalaktozamin-4-sulfataza, zato nabiranje mukopolisaharidov (glikoproteinov); zelo malo pacientov. Pomaga doživljsko iniciranje encima (Nagluzyme®).

Dodaten problem

Imunogenost dodanih encimov!

Druga možna terapija:

Navadno se skuša olajšati stanje z dieto: Fenilketonurija (pomanjkanje fenilalanin-hidroksilaze): doživljenska dieta brez fenilalanina. Potencialna možnost je tudi transplantacija (organa, celic - fibroblasti) in genska terapija – vse še zelo na začetku.

Drugi primeri:

Pljučna embolija (strdek v pljučni arteriji):

Krvni strdki v pljučih se raztapljajo z vnosom aktivatorja plazminogena (urokinaza) v plazmo. Ta aktivira serijo reakcij, na koncu se sprosti plazmin, proteaza, ki razgradi fibrin v strdkih.

Levkemija:

Rakave celice potrebujejo asparagin (ga ne sintetizirajo). V hudih primerih iniciirajo v krvotok asparaginazo, da uniči asparagin v krvotoku in s tem zavre rast levkemičnih celic.

Encimi v tehnologiji

1. Uporaba intaktnih mikroorganizmov kot virov encimov
2. Uporaba izoliranih encimov
3. Uporaba dizajniranih encimov

Prehranska industrija:

Alkoholne pijače – izraba encimov glikolize iz gliv za pretvorbo sladkorjev v alkohol. Predhodno se včasih dodaja amilaza za razgradnjo škroba do glukoze.

Kis – alkohol v očetno kislino

Mlekarstvo: siri in jogurti

Kruh in drugi pekovski izdelki: razgradnja škroba do glukoze (amilaza) in nadaljnja pretvorba (aerobno!) do CO₂ in vode.

Proteolitična obdelava (mehčanje) mesa.

Encimi v mikroorganizmih – industrijska proizvodnja organskih kislin in drugih snovi:

- kisline: mlečna, citronska, glukonska in druge

- antibiotiki

Ekologija: Nekatere glive imajo encime (lakaza, peroksidaza) za razgradnjo lignina, ki učinkovito razgrajujejo toksična barvila in druge ksenobiotike v industrijskih odplakah. Uporabljajo se njihovi miceliji, cele imobilizirane glive ali očiščeni encimi.

Pralni praški – lipaze in proteaze.

Uporaba izoliranih encimov:

Čisti izolirani encimi so le redko dovolj stabilni za uporabo in jih po uporabi težko odstranimo.

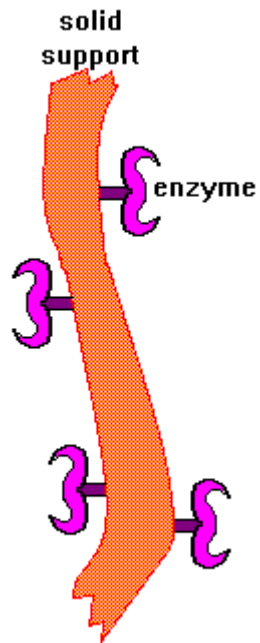
Imobilizirani encimi: vgradnja encimov v netopne a porozne nosilce (različni polimeri). Velike prednosti:

- kontrolirano dodajanje in odvzemanje iz reakcijske raztopine
- pogosto povečana stabilnost, ki omogoča večkratno uporabo
- več encimov na enem nosilcu – kataliza serije reakcij

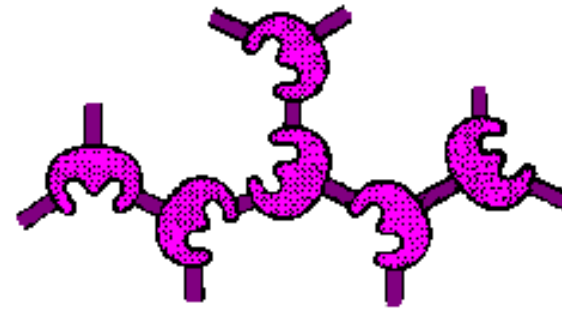
Primeri:

aminoacilaza	→	priprava L-aminokislin iz racematov
glukoza-izomeraza	→	priprava zmesi glukoze in fruktoze
penicilin-amidaza	→	priprava 6-aminopenicilanske kisline
fumarat-hidrataza	→	priprava malata in fumarata
laktaza	→	priprava mleka brez laktoze

NAČINI IMOBILIZACIJE ENCIMOV

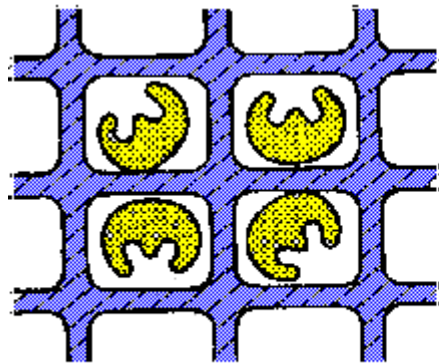


VEZAVA NA TRDEN NOSILEC



ZAMREŽENJE

VGRADNJA V TRDEN ALI ŽELATINOZEN POROZEN NOSILEC



entrapped in a matrix



entrapped in droplets

Dizajnirani encimi – encimi, ki katalizirajo pretvorbo substratov po želji:

- spremenjeni encimi (s točkastimi mutacijami in rekombinantno izraženi ter izolirani)
- encimi konjugirani s protitelesi za usmerjeno dostavo
- katalitična protitelesa

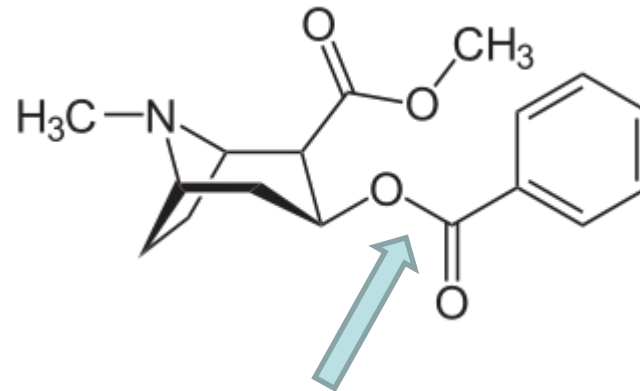
DANES ŠE NISO V PRAKTIČNI UPORABI

Spremenjeni encimi: IDEJA: z mutacijami spremeniti obstoječe encime, da bi sprejeli drugačne substrate ali pa bi bili bolj termostabilni.

Konjugirani encimi: IDEJA: Ab izkoristiti za specifičnost

Katalitična protitelesa: IDEJA: narediti protitelesa proti analogom prehodnega stanja substratov, ki jih hočemo pretvarjati.

MODIFICIRANA KOKAIN-ESTERAZA



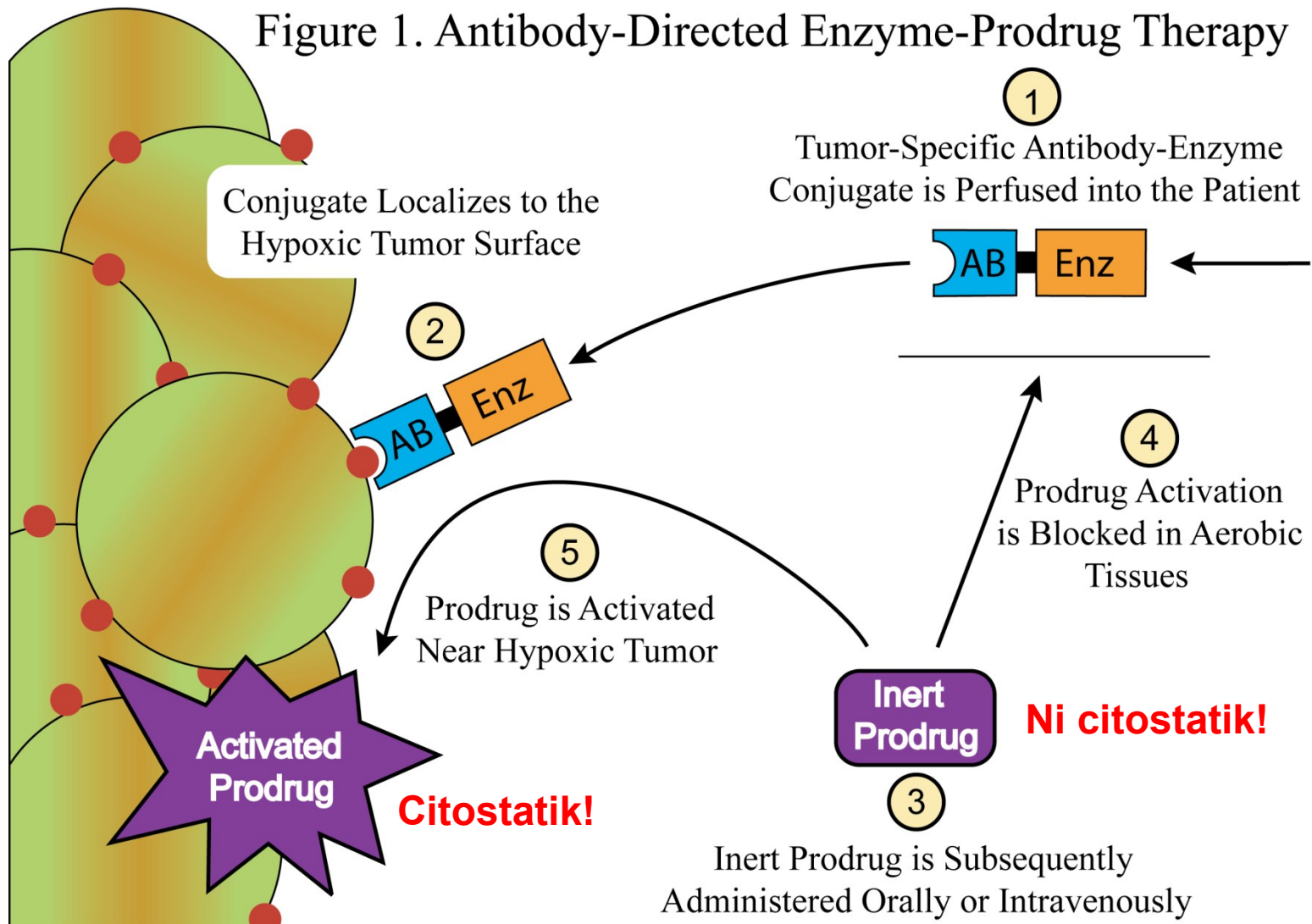
Kokain je ester!

Kokain-esteraza katalizira hidrolizo te vezi.

Kokain-esteraza (CocE) iz bakterije, ki živi ob koreninah kokinih grmov, učinkovito razgrajuje kokain. Deluje podobno kot butirilholin-esteraza, a ~1000-krat hitreje. PROBLEM: je zelo nestabilna pri 37 °C, zato so bile potrebne številne modifikacije za povečanje stabilnosti (podrobnosti še niso znane, članek je pravkar izšel).

KONJUGATI ENCIMOV S PROTITELESI ZA USMERJANJE NA DOLOČENA TKIVA npr. TUMORJE

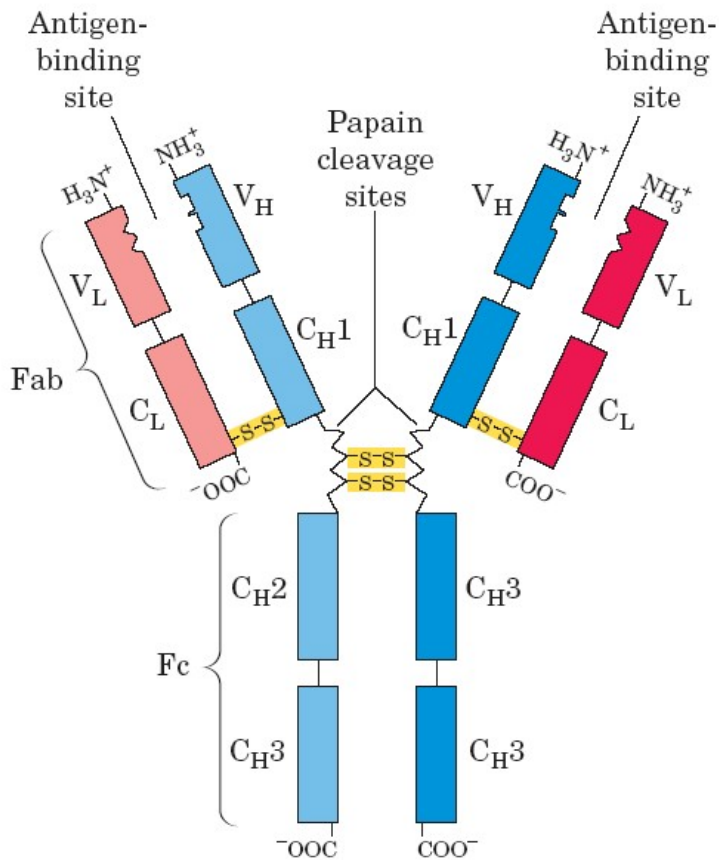
Figure 1. Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy



Katalitična protitelesa - abcimi

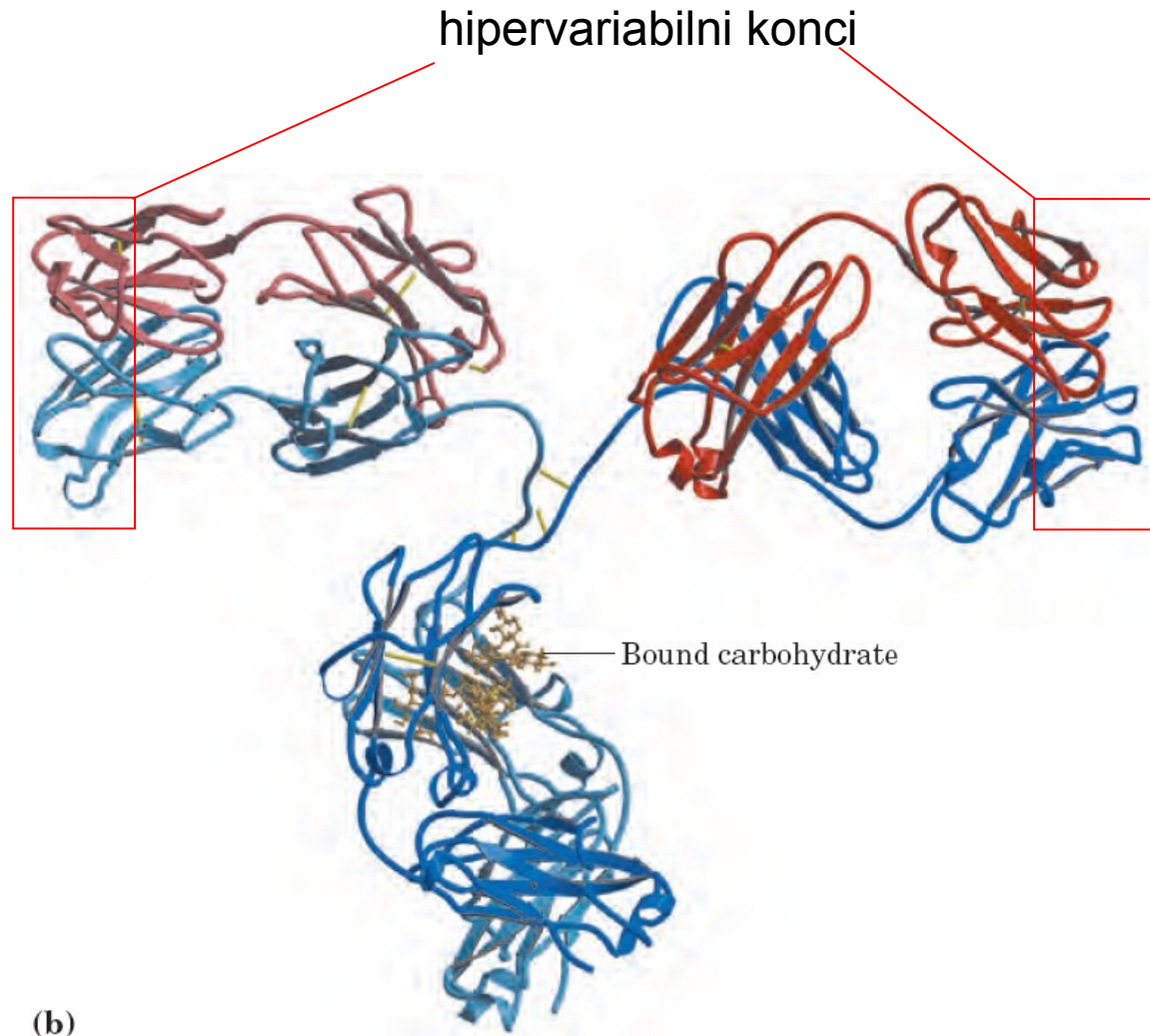
- zelo specifična vezava Ag na Ab - kako to izrabit?
- Ab lahko postane encim, če veže Ag v prehodnem stanju.
- male molekule (hapteni) niso imunogene – vezane morajo biti na večje nosilce.
- encimi 'a la carte' – velike možnosti v industriji, medicini in raziskavah.

Protitelesa vežejo zelo različne molekule zelo specifično in z veliko afiniteto. Za imunizacijo mora biti Ag dovolj velik molska masa > 10.000 Da.

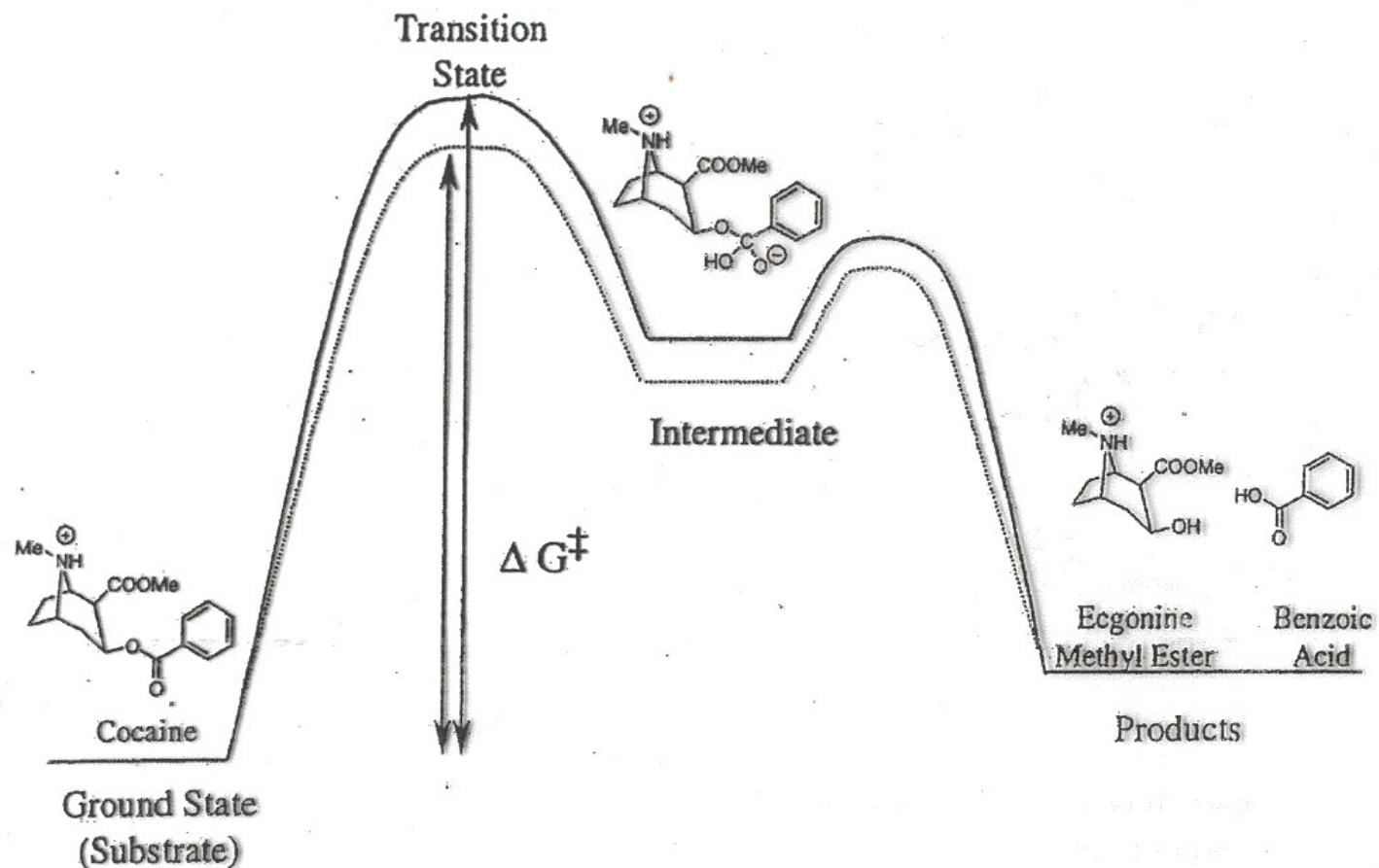


C = constant domain
 V = variable domain
 H, L = heavy, light chains

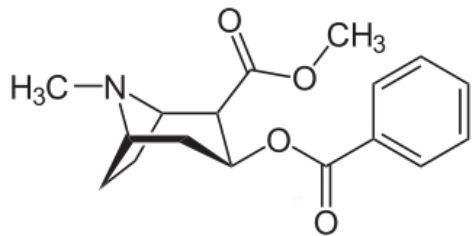
(a)



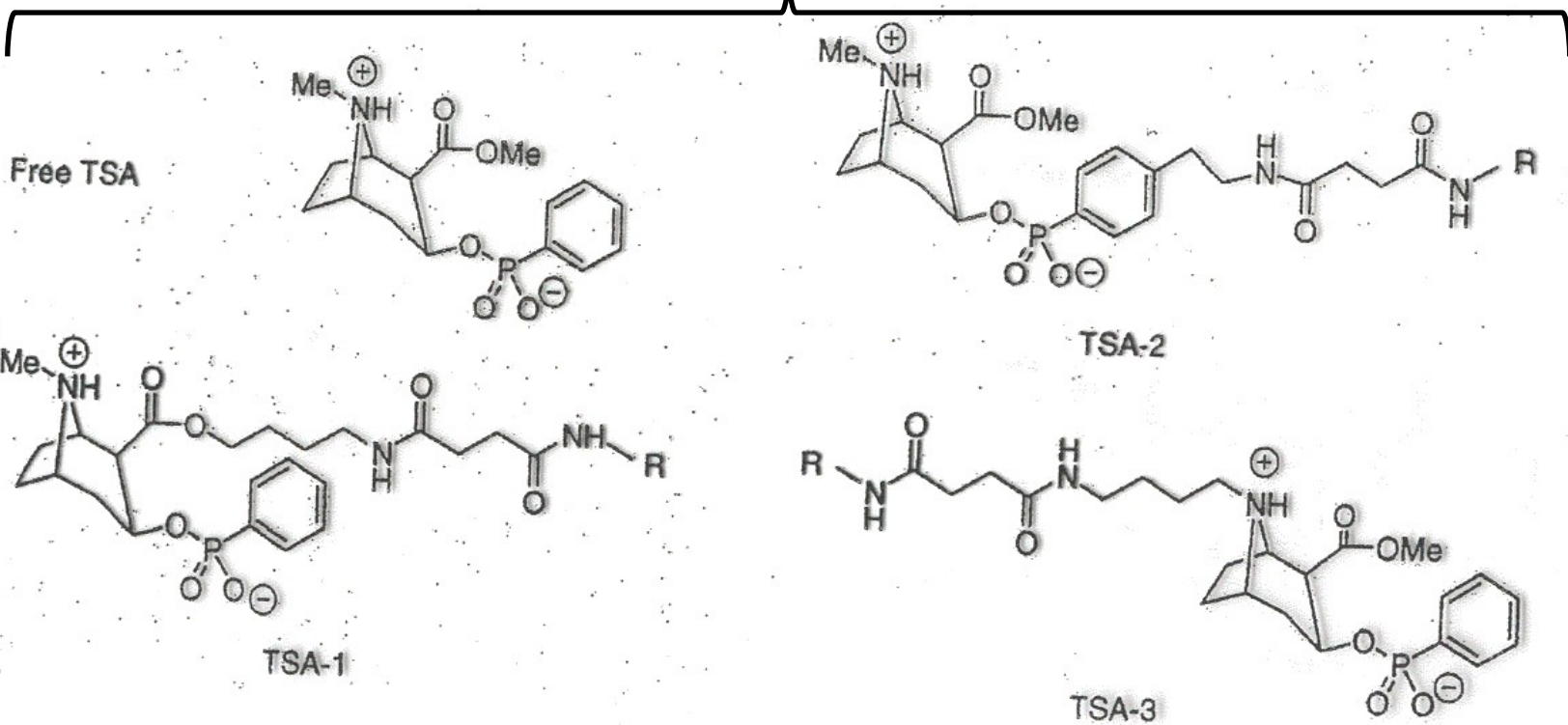
(b)



PRIMER: Hidroliza kokaina – iskanje ustreznega analoga prehodnega stanja.



Kokain in njegovi analogi prehodnega stanja



Izbrane potencialne analoge prehodnega stanja so vezali na nosilce in jih uporabili za imuniziranje. Nastala katalitična protitelesa so katalizirala hidrolizo kokaina, a premalo učinkovito, da bi bila uporabna v praksi.

ENCIMSKI INHIBITORJI KOT ZDRAVILA (PRIMERI)

ANTIPIRETIKI in ANTIKOAGULANTI

Inhibitorji ciklooksigenaze: aspirin

ZDRAVILA ZA AIDS

Inhibitorji reverzne transkriptaze: AZT, nevirapin

Inhibitorji HIV1-proteinaze: sekvinavir

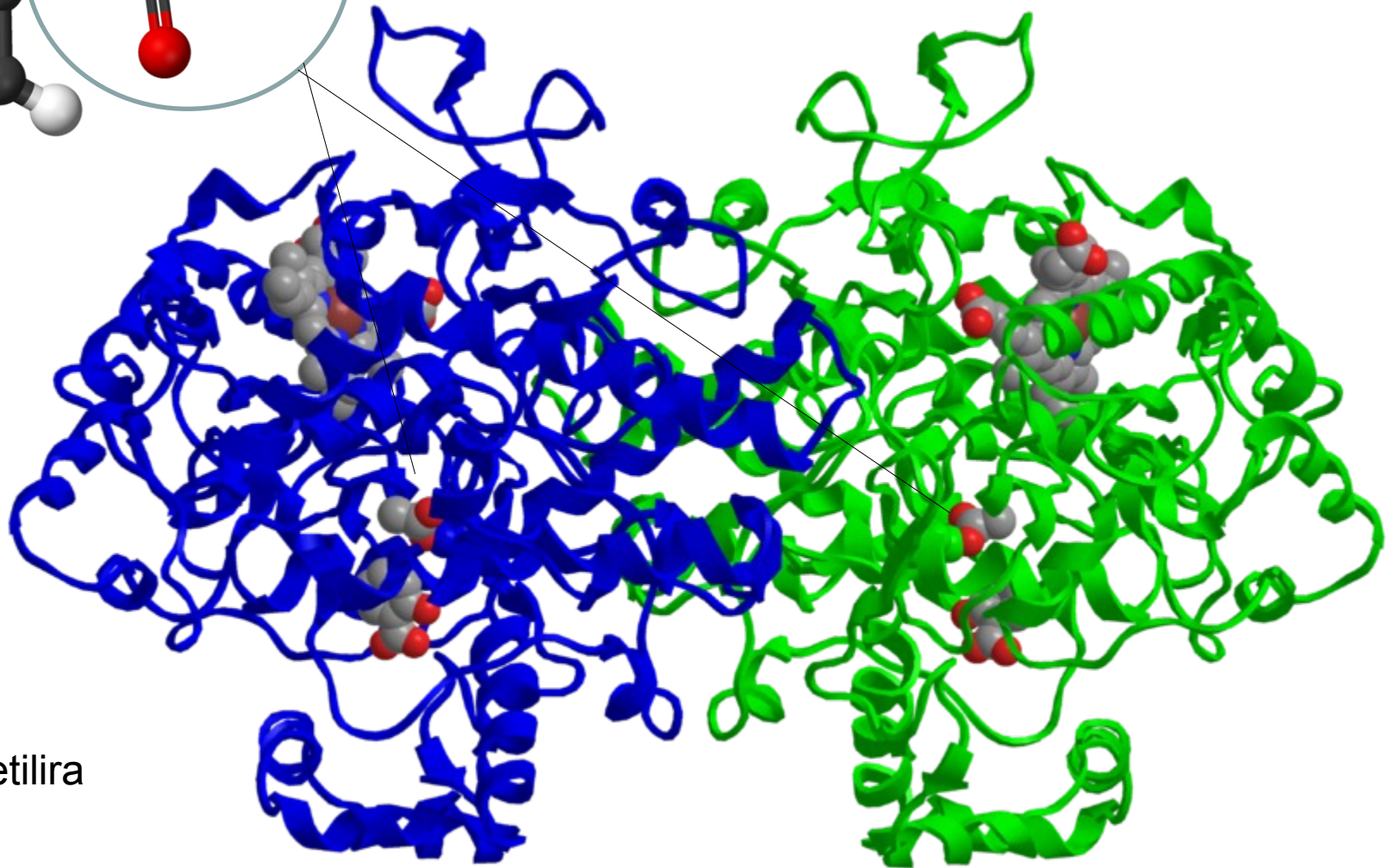
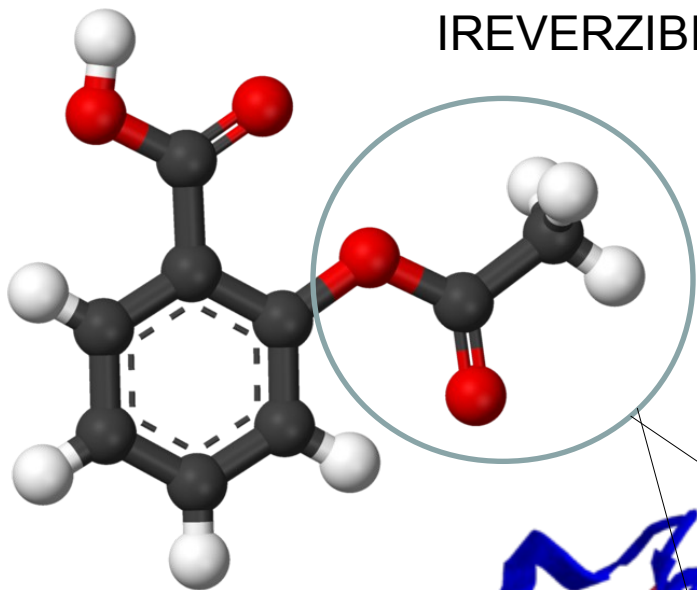
CITOSTATIKI

Inhibitorji timidilat-sintaze: fluorouracil

Inhibitorji dihidrofolat-reduktaze: metotreksat

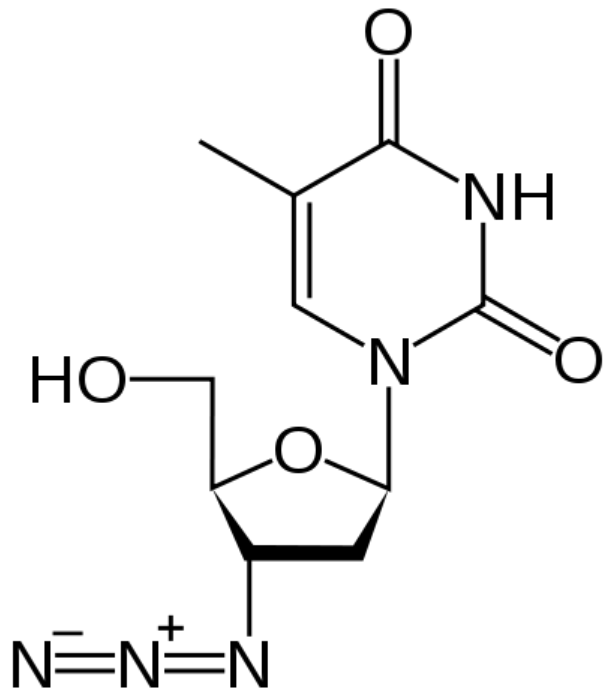
Inhibitorji topoizomeraze: irinotekan, etopozid- fosfat,

IREVERZIBILNA INHIBICIJA CIKLOOKSIGENAZE Z ASPIRINOM

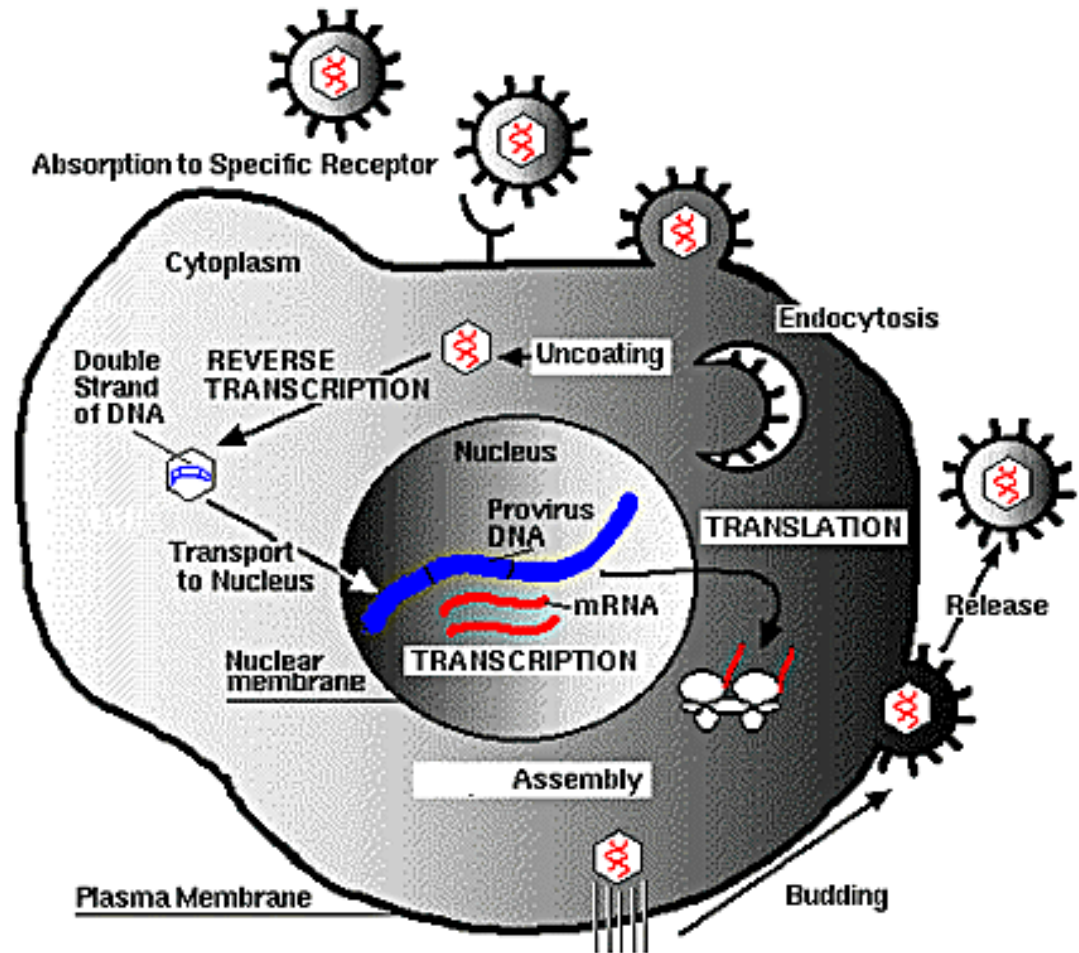


Ser⁵¹⁶ se acetilira

ZAVIRALCI AIDSa

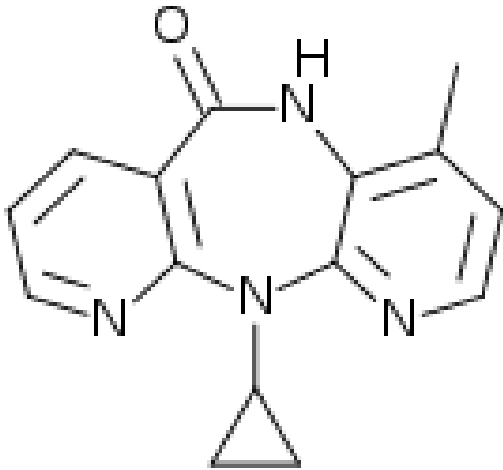


Zidovudin ali **azidotimidin (AZT)** (tudi ZDV) je analog timidina in zato kompetitivni inhibitor reverzne transkriptaze. Uporablja se kot antiretro virusno zdravilo za HIV oz. AIDS. V prodaji je kot retrovir.



Retrovirus replication

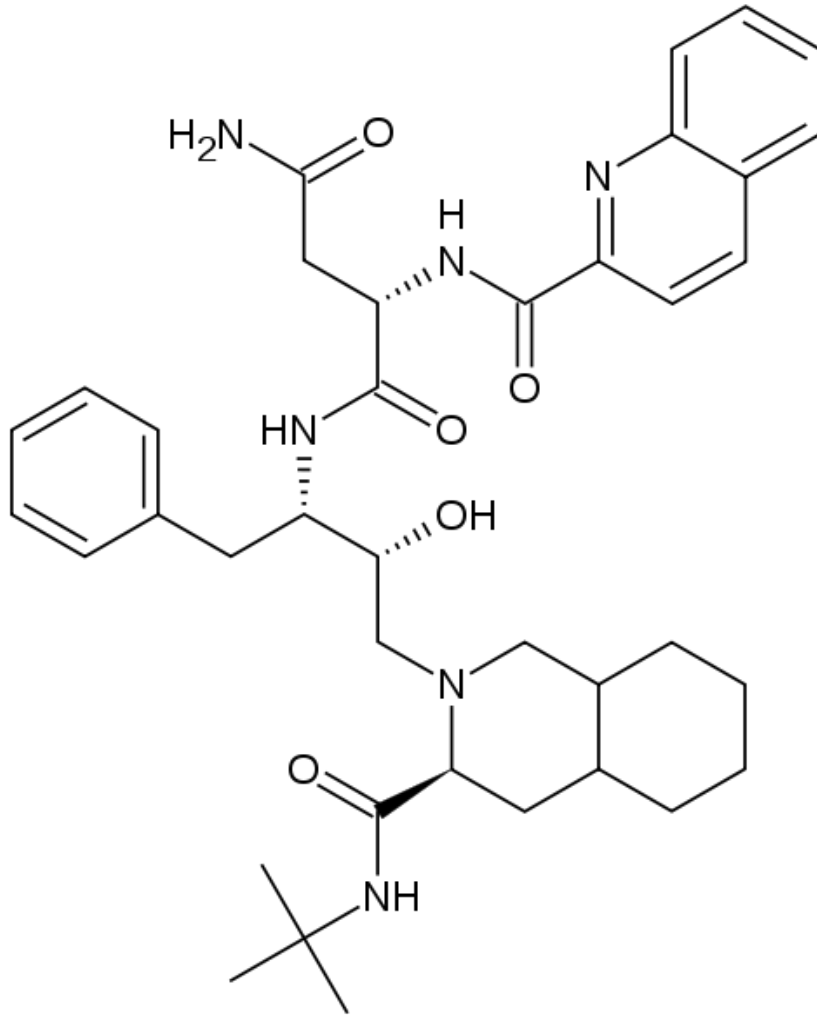
ZAVIRALCI AIDSa



Nevirapin je ne-nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze in ga tudi prištevamo med antiretrovirusna zdravila. Ne veže se v aktivno mesto encima, ampak v alosterično mesto, precej stran od aktivnega. Ne deluje proti virusu HIV-2, ki ima nekoliko drugačno reverzno transkriptazo.

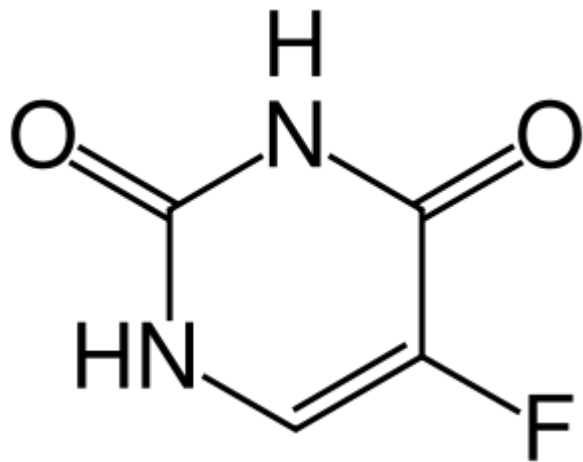
Rezistanca na nevirapin se žal razvije zelo hitro (razen, če so uničeni vsi virusi) – virus redno mutira (navadno Y181C and K103N), kar onemogoči večino alosterični antiretrovirusnih zdravil.

ZAVIRALCI AIDSa



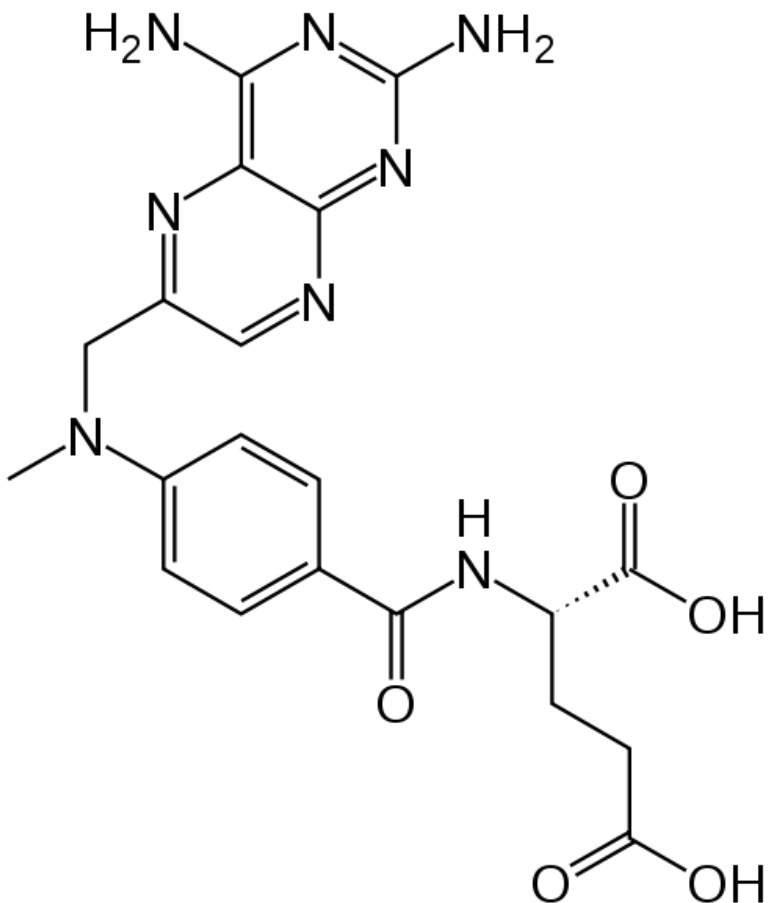
Sakvinavir je inhibitor HIV proteaz, ki so nujno potrebne za replikacijo virusov in za izstop novih virusov iz gostitelja. Deluje na HIV-1 in HIV-2 proteaze.

CITOSTATIKI - inhibitorji timidilat-sintaze



Fluorouracil (5-FU) se v kemoterapiji uporablja že 40 let. Deluje na več načinov, predvsem pa je kompetitivni inhibitor timidilat-sintaze, torej ustavi sintezo timidina iz uridina. Timidin je nujen za podvajanje DNA. Pomanjkanje timidina bistveno bolj prizadene tumorske celice, ki se veliko hitreje delijo kot zdrave.

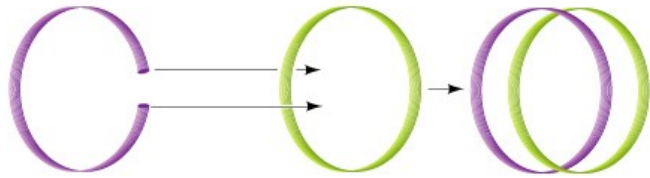
CITOSTATIKI - Inhibitorji dihidrofolat-reduktaze



Metotreksat je kompetitivni inhibitor dihidrofolat-reduktaze, ta pa sodeluje pri sintezi tetrahidrofolata. Tetrahidrofolna kislina je potrebna za sintezo timidina *de novo*, pa tudi za sintezo purinskih baz. Zato metotreksat inhibira sintezo DNA, RNA in proteinov.

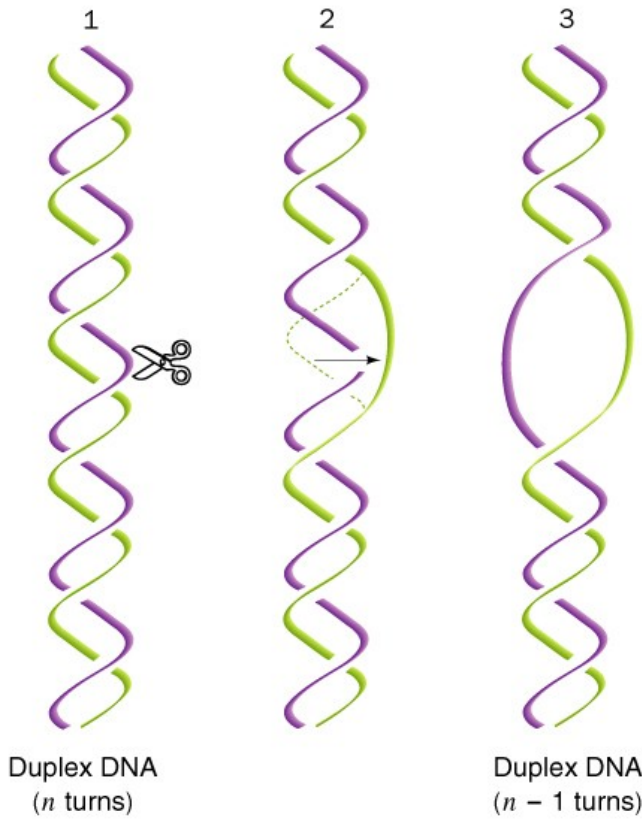
CITOSTATIKI - inhibitorji topoizomeraze

(a)

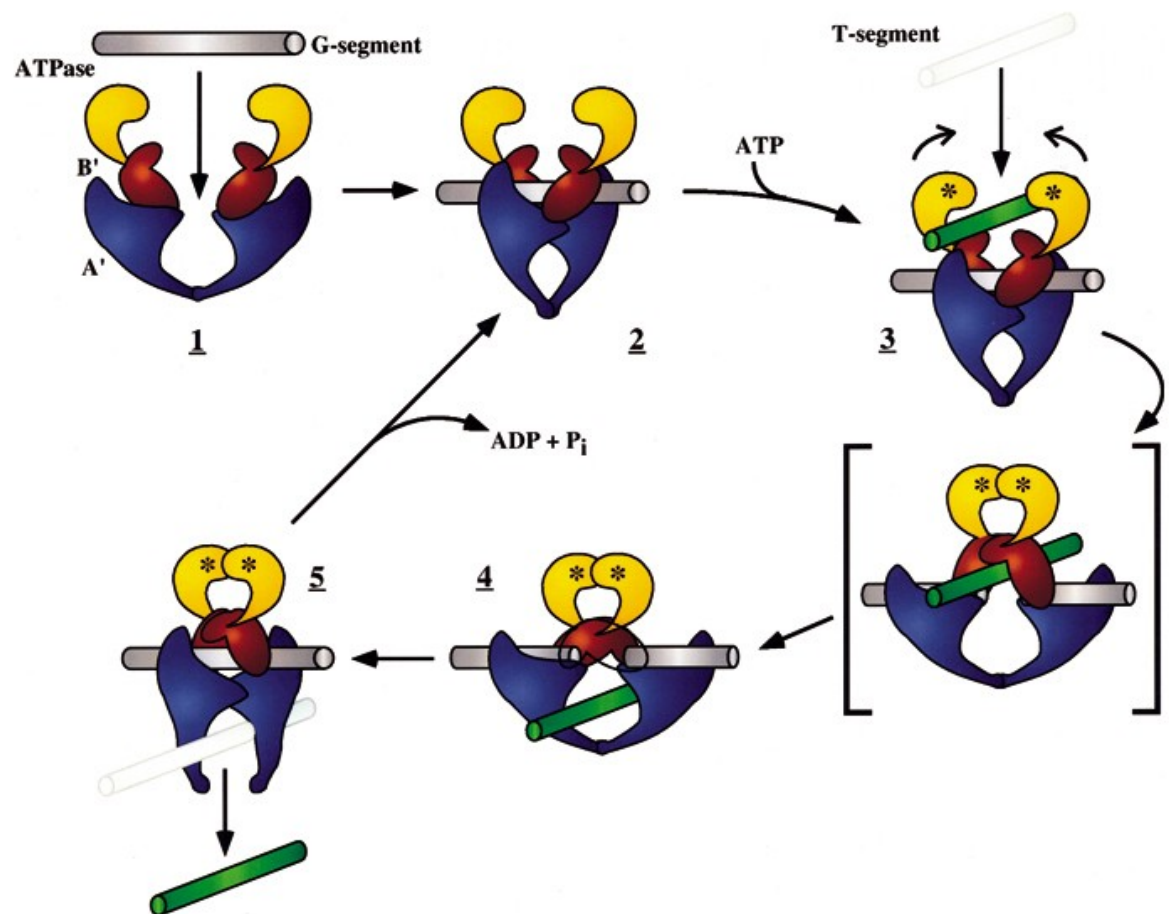


DELOVANJE TOPOIZOMERAZE

(b)



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.



Courtesy of Stephen Harrison and James Wang, Harvard University.
Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

