

PARAOXONAZA – IMPLICAȚII ÎN ATEROGENEZĂ. ASPECTE BIOCHIMICE ȘI GENETICE

IRINA ILEA, CAIUS DUNCEA, ANDREEA PARV

Clinica Medicală V, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca

Rezumat

Paraoxonaza serică (PON1) este principala enzimă care conferă proprietăți antioxidante lipoproteinelor cu densitate mare (HDL), fiind responsabilă de mecanismul prin care acestea inhibă oxidarea LDL și a HDL însăși. Este o enzimă calciu-dependentă, asociată HDL, capabilă să hidrolizeze acizii grași oxidați din fosfolipide și să reducă acumularea de lipide oxidate la nivelul LDL, inhibând astfel răspunsul proinflamator promovat de acestea [1]. O activitate serică scăzută a PON1 se corelează cu un risc crescut de boală coronariană, infarct miocardic și ateroscleroză carotidiană [2]. Variația activității PON1 este influențată atât de factori genetici - polimorfismul PON, cât și de factori dobândiți [3].

Cuvinte cheie: HDL-colesterol, paraoxonaza serică (PON1), polimorfism genetic.

PARAOXONASE - IMPLICATION IN ATHEROGENESIS. BIOCHEMICAL AND GENETIC ASPECTS

Abstract

Serum paraoxonase (PON1) is the main enzyme that confers antioxidant properties of HDL-lipoprotein, being responsible for the mechanism by which they inhibit the oxidation of LDL and HDL itself. It is a calcium-dependent enzyme associated HDL, able to hydrolyze oxidized fatty acids in phospholipids and reduce fat accumulation from oxidized LDL, thus inhibiting pro-inflammatory response promoted by these [1]. A low serum PON activity is correlated with an increased risk of coronary disease, carotid atherosclerosis and myocardial infarction [2]. Variation of PON activity is influenced both by genetic factors - PON polymorphism and acquired factors [3].

Keywords: HDL-cholesterol, serum paraoxonase (PON1), genetic polymorphism.

Introducere

Paraoxonaza serică (PON1) a fost descrisă pentru prima dată în anul 1946 de către Abraham Mazur, care a raportat prezența acestei enzime în țesutul animal capabil să hidrolizeze compușii organofosforici [4]. Numele său este legat de *paraoxon*, metabolit activ al insecticidului organofosforic paration, care reprezintă cel mai studiat substrat al său. Deoarece hidrolizează metaboliții activi ai multor organofosforice, precum și unele gaze neurotoxice cum ar fi sarin și soman, a fost studiată în primul rând de toxicologi, interesați de capacitatea sa de a modula toxicitatea organofosforicelor [5,6]. În anul 1991 Mackness

și colegii [7] au demonstrat că PON1 poate preveni acumularea de lipoperoxizi la nivelul LDL lipoproteinelor, sugerând astfel relația dintre PON1 și ateroscleroză [8].

PON - aspecte biochimice și genetice

PON1 este membră a unei familii de enzime care include de asemenea enzimele PON2 și PON 3. Caracteristicile structurale și funcționale ale enzimelor PON au fost necunoscute pentru mult timp; în anul 2004, Harel și colaboratorii [9] au descris, folosind metoda "evoluei direcționate", variantele PON1 și PON3 exprimate în *Escherichia Coli* cu proprietăți enzimatice identice cu cele ale paraoxonazei serice umane. Determinarea structurii tridimensionale a PON1 a oferit posibilitatea de cunoaștere a modului în care este determinată specificitatea de substrat și de reacție a membrului familiei PON.

Enzima PON1 este o fosfotriesterază calciu-

Articol intrat la redacție în data de: 22.09.2009

Primit sub formă revizuită în data de: 15.11.2009

Acceptat în data de: 16.11.2009

Adresa pentru corespondență: irina_ilea@yahoo.com

dependentă formată din 354 de aminoacizi cu o masă moleculară de aproximativ 45 kDa [5]. Pe lângă capacitatea sa de a hidroliza paraoxonul, PON1 hidrolizează o serie de alți metaboliți ai insecticidelor organofosforice, precum și agenți neurotoxici [10]. PON1 exercită importante alte activități enzimatice ce includ activitatea de arilesterază, lactonază, peroxidază și fosfolipază A₂-like. Este cea mai studiată enzimă a familiei PON, cu puternice implicații în procesul de aterogeneză. PON2 și PON3 exercită în principal o activitate de lactonază; au capacitatea de a hidroliza mai mult de 30 de molecule diferite de lactone, ce cuprind și molecule endogene cum ar fi homocistein-lactona și **γ-glucocorticoid lactonele, dar și molecule** exogene cum ar fi statinele [5].

Familia de gene umane ale PON (hPON) constă în trei membre: hPON1, hPON2 și hPON3, care sunt localizate adiacent la nivelul brațului lung al cromozomului 7(7q) [11]. Acestea prezintă o similaritate de 75% la nivelul nucleotidelor, ce determină o similaritate de 65% la nivelul secvenței de aminoacizi din structura proteinelor codificate de acestea. La oameni expresia ARNm-PON1 este limitată la nivelul ficatului; expresia genei pentru PON3 apare la nivelul ficatului și rinichilor [12]. În contrast, expresia genei pentru PON2 este extinsă, fiind găsită într-o varietate de țesuturi [11]. Studiile efectuate la începutul anilor '90, au indicat faptul că activitatea plasmatică a paraoxonazei în populațiile umane prezintă o distribuție polimorfică, fiind identificați indivizi cu o activitate plasmatică scăzută, intermediară sau moleculară a polimorfismului acesteia.

Astfel, la nivelul regiunii codificatoare a genei PON1, au fost identificate 2 polimorfisme (T11714A și A20325G) care determină substituția glutaminei cu arginina în poziția 192 (Q/R 192) și substituția metioninei cu leucina în poziția 55 (M/L 55). Ambele polimorfisme ale PON1 au fost asociate cu diferite condiții fiziopatologice. Polimorfismul Q/R 192 influențează cinetica hidrolizei diferitelor substrate (paraoxonul, diazoxonul, somanul și sarinul), fiind asociat cu boala coronariană, accidente vasculare cerebrale, hipercolesterolemia familială, boala Parkinson și diabetul zaharat tip 2 [13]. Polimorfismul M/L55 este asociat cu nivelul plasmatic al proteinei PON1 și implicat cu concentrația PON1 asociată de HDL, cu boala coronariană, accidente vasculare cerebrale, boala Parkinson, variații ale nivelului plasmatic de colesterol total și LDL colesterol [14]. Frecvența alelelor PON1 variază în populațiile umane; distribuția celor două polimorfisme prezintă o diferență semnificativă între rasa albă și neagră: PON1 M55 apare cu frecvență mai mare la populația de rasă albă, comparativ cu rasa neagră, în timp ce polimorfismul PON1 R192 este mai frecvent la populațiile de rasă neagră.

În regiunea reglatoare a genei PON1 s-au identificat cinci polimorfisme în pozițiile: -107/-108(C sau T), -126(C sau G), -160/-162(A sau G), -824/-832(A sau G), -907/-909(C sau G), care au efect asupra exprimării genei PON1, și astfel asupra nivelului plasmatic al enzimei.

Conform rezultatelor obținute de Brophy și colaboratorii săi, polimorfismul PON1-108 are cel mai mare efect asupra activității de arilesterază a enzimei. Alela T-108 este asociată cu o reducere de 50% a nivelului plasmatic al PON1 în comparație cu alela C-108. SNP-urile C-108T, L55M, Q192R sunt cele mai bine caracterizate polimorfisme care afectează concentrația și specificitatea pentru substrat a PON1 [15].

Modularea activității PON1. Pe lângă factorii genetici, au fost identificați și alți factori reprezentați de compuși endo și exogeni, precum și stilul de viață abordat, care reglează atât expresia genei pentru PON1, cât și activitatea ei enzimatică (tabel 1 și 2). Expresia ARNm-PON1 la nivelul celulelor hepatice este scăzută de ox-LDL, lipidele oxidate, TNF-α, IL-6, IL-8 și crește în prezența statinelor. Mai mult, activitatea PON 1 scade la șoarecii și iepurii hrăniți cu dieta proaterogenă, bogată în colesterol. La oameni fumatul, dieta ce conține ulei prăjit scad activitatea PON1 și, în contrast, polifenolii, vitamina C, consumul moderat de alcool, și tratamentul cu atorvastatin cresc activitatea acesteia [16].

Tabel I. Modularea activității PON1 de către compuși exogeni [18,19,20,21,22].

Com-pușii chimici din mediu	Activitatea PON1	
	blocață	
EDTA		
Bariul, lantanul, cuprul, zincul și mercurul	↓	
Magneziul, cobaltul, cadmiul și nichelul	↓	
Acid dicloroacetic	↓↓	
Statine		
-pravastatin, simvastatin și fluvastatin	↓	↑
-2 metaboliți oxidați ai atorvastatinei		
Fibrati: gemfibrozil și fenofibrat	↑	
Eplerenona	↑	
Atropina	↓	
Aspirina	↑	

Tabel II. Efectul stilului de viață asupra PON1 [23,24, 25,26,27].

Efectul stilului de viață	Activitatea PON1
Fumatul	↓
Consumul moderat de alcool: vin, bere, băuturi spirtoase	↑
Dieta aterogenă:	
-acizi polinesaturați: acidul linoleic	↓
-acizi mononesaturați (ulei de măsline)	↑
-acizi grași 3ω-polinesaturați	↑
Antioxidanții:	
-flavinoizii (lemnul dulce) și quercetin (vinul roșu)	↑
-suc de rodii	↑
-vitamina C și E	↑
Sex: ♀/♂	↑/↓
Vârsta:	
-la naștere	↓
-9-15 luni	normală
-adult	normală
-vârsta peste 65 de ani	↓

Sinteza, stabilitatea și activitatea PON1

Determinantul primar al nivelului seric a PON1 este reprezentat de capacitatea ficatului de a elibera enzima, știut fiind că acesta reprezintă locul sintezei PON1. Un posibil mecanism de eliberare constă în inserția PON1 pe fața externă a membranei hepatocitare umane (Huh-7), urmată de eliberarea peptidei de la nivelul situsului său membranar în prezența unui acceptor corespunzător. Cel mai potrivit acceptor în acest caz constă într-un complex lipidic al cărui component determinant este reprezentat de fosfolipide. Procesul este unul de înaltă afinitate, lucru demonstrat de incapacitatea LDL-lipoproteinelor, care conțin în structura lor fosfolipide, de a declanșa eliberarea peptidei. Mecanismul implică inserția PON1 la nivelul membranei celulare externe, urmată de transferul ei la nivelul HDL-lipoproteinelor în timpul asocierii tranzitorii a acestora cu membrana celulară [29].

Mecanismele exacte prin care PON1 previne oxidarea lipidelor, limitând astfel dezvoltarea leziunilor aterosclerotice, rămân încă neclare. Unul din posibilele scenarii constă în faptul că enzima își exercită acțiunea în interiorul particulelor HDL [30], fapt ce ar presupune interacțiunea dintre HDL și sursa de lipide oxidate. Deși se pune problema efectului toxic exercitat de lipidele oxidate asupra HDL, trebuie amintit faptul că aceste lipoproteine dețin un bogat arsenal antioxidant (PON1, PON3, factorul de activare plachetară - acetilhidrolaze). Un al doilea scenariu posibil constă în acțiunea PON1 în afara complexului HDL. Se speculează un transfer al PON1 de la nivelul HDL la nivelul celulelor din peretele arterial, concept prin care PON1 ar fi poziționat în locul unde se petrece oxidarea lipidelor deoarece s-a demonstrat prezența PON1 la nivelul plăcii aterosclerotice, dar nu și în zonele sănătoase ale peretelui arterial [30].

PON1 în anumite condiții fiziologice și patologice

1. PON 1 în condiții fiziologice. Activitatea PON1 variază în diferite condiții fiziologice și patologice: sarcina a fost asociată cu reducerea activității PON1 [30]; exercițiul fizic moderat crește nivelul PON1 cu aproximativ 14%, restaurând valoarea PON1 la nivel normal chiar și la fumători la care se știe că activitatea PON1 este scăzută.

Vârsta reprezintă un determinant major al activității PON1. Studiile efectuate pe subiecți umani, arată faptul că concentrația plasmatică a PON1 este mică la naștere și crește paralel cu nivelul de exprimare al mRNA PON1 hepatic ajungând la un platou în jurul vârstei de 6-15 luni. Activitatea PON1 la feții umani este scăzută, prematurii (33-36 de săptămâni) având un nivel cu 24% mai mic comparativ cu nou-născuții la termen. Odată ce atinge valoarea adultului, activitatea PON1 este relativ constantă în timp, și scade progresiv cu vârsta [31]. Sarcina a fost asociată cu reducerea activității PON1, atât la animalele de laborator, cât și la subiecții umani [32].

2. PON 1, diabetul zaharat și boli asociate cu dislipidemie

Boala coronariană: Indivizii care au o activitate a PON1 crescută au un risc mai mic de a dezvolta boala coronariană; activitatea și concentrația PON1 este scăzută până la 50% la indivizii cu boli coronariene, indiferent de genotipul PON1 pe care aceștia îl exprimă (PON1-192, PON1-55). Activitatea PON1 scade după infarctul miocardic și rămâne redusă timp de 2 până la 40 de zile și mai mult se pare că activitatea PON1 scade la acești indivizi înainte de instalarea simptomelor clinice [33]. Concentrația plasmatică PON1 are o valoare predictivă privind boala coronariană similară cu concentrația plasmatică de colesterol total sau de HDL colesterol.

Hipercolesterolemia familială: S-a observat că activitatea PON1 la pacienții cu hipercolesterolemie familială este scăzută cu 50-80% față de populația control, în ciuda menținerii unor valori normale ale HDL lipoproteinelor. **Se pare că prin administrarea unui tratament** cu statine acestor pacienți, activitatea PON1 crește [34].

Diabetul zaharat: A fost raportat faptul că 67% din pacienții cu diabet zaharat tip 1 au un nivel scăzut al activității paraoxonazei, indiferent de nivelul plasmatic al HDL colesterolului. Pacienții cu diabet zaharat de tip 2 prezintă și ei o activitate scăzută a PON1 serice. În plus, diabeticii tip 2 care prezintă complicații ca boala coronariană, retinopatie sau neuropatie au nivele ale PON1 serice mai scăzute decât diabeticii fără complicații [34].

Insuficiența renală: Insuficiența renală este asociată cu dislipidemie, risc crescut de a dezvolta evenimente coronariene, nivel înalt al stresului oxidativ. Pacienții cu insuficiență renală au o activitate scăzută de paraoxonază, arilesteraza a PON1, precum și un nivel scăzut al HDL colesterolului [35].

În concluzie, paraoxonaza serică este o enzimă asociată HDL lipoproteinelor, a cărei activitate plasmatică scăzută este puternic corelată cu riscul de a dezvolta boli cardiovasculare, lucru datorat în special proprietăților sale antioxidante. Activitatea PON1 este modulată de factori nutriționali și farmacologici care acționează probabil în tandem cu polimorfismele din regiunea promotor a genei PON1. Elucidarea substratelor fiziologice și patologice de acțiune a PON1, precum și a mijloacelor nutriționale și farmacologice de stimulare a expresiei sale, va aduce beneficii importante în prevenirea procesului de ateroscleroză.

Bibliografie

1. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1304-1316
2. Mackness MI, Walker CH, Carlson LA. Low A-esterase activity in serum of patients with fish-eye disease. *Clin Chem* 1987; 33:587-588
3. Bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK.

Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:824–829

4. Durrington PN., Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473–480

5. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 1989; 180:242–247

6. Hassett C, Richter RJ, Humbert R, Chapline C, Crabb JW, Omiecinski CJ, Furlong CE. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30:10141–10149

7. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152–154

8. Srivastava RA, Srivastava N. High density lipoprotein, apolipoprotein A-I, and coronary artery disease. *Mol Cell Biochem* 2000; 209: 131–144

9. Harel et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 412–419

10. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusis A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Interact* 1999; 119/120:429–438

11. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonase. *J Biol Chem* 2006; 281(11): 7649–7656

12. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33:498–507

13. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:516–521

14. Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Costa LG. Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2000; 3:341–348

15. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001; 42: 528–535

16. Blatter Garin MC, Abbot C, Messmer S, Mackness MI, Durrington P, Pometta D, James RW. Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem. J* 1994; 304:549–554

17. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentration and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci(Lond)* 2004; 107: 435–447

18. Karanth S, Pope C. Carboxylesterase and A-esterase activity during maturation and aging: relationship to toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci* 2000; 58:282–289

19. Debord J, Bollinger JC, Merle L, Dantoine T. Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. *J Inorg Biochem* 2003; 94:1–4.

20. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69:541–550

21. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003; 63:945–56.

22. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:2083–2089

23. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998; 138:271–280

24. Ferre` N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arijia V, Murphy MM, Ceruelo S. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003; 49:1491–7

25. Van Der Gaag MS, Van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgest R, Schaafsma G. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomized intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147:405–410

26. De Roos NM, Schouten EG, Scheek LM, van Tol A, Katan MB. Replacement of dietary saturated fat with trans fat reduces serum paraoxonase activity in healthy men and women. *Metabolism* 2002; 51:1534–1537

27. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:892–904

28. Jarvik GP., Trevanian Tsai N, McKinstry LA, et al. Vitamins C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1329–33

29. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability, and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1986–1994

30. Bowry VW, Stanley KK, Stocker R. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:10316–10320

31. Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol* 2004; 39:59–66.

32. Weitman SD, Vodicnik MJ, Lech JJ. Influence of pregnancy on parathion toxicity and distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 71:215–24

33. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:330–335

34. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86:193–199

35. Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, et al. Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipient. *Kidney International* 1999; 56:289–298.