

A humán szérumban paraoxonáz státusz romániai mintában

Kaucsár Tamás¹, Dronca Eleonora², Pașca P. Sergiu¹, Nemeș Bogdan¹, Endreffy Emőke³, Dronca Maria¹
Iuliu Hațieganu Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Kolozsvár, ¹Orvosi Biokémia Tanszék, ²Orvosi Genetika Tanszék, ³Gyermekgyógyászati Klinika és
Egészségügyi Központ, Általános Orvostudományi Kar, SZTE Szent-Györgyi Albert Orvos és Gyógyszerészeti Centrum, Szeged

Statusul paraoxonazei serice umane într-un lot din România

Paraoxonaza umană serică (PON1) este o hidrolază calciu-dependență asociată cu HDL-ul plasmatic. Prin activitățile sale (paraoxonazică, arilesterazică și anti-lipoperoxidică), PON1 joacă un rol important în îndepărtarea substanțelor organofosforice neurotoxice, respectiv în protecția anti-aterosclerotică. PON1 prezintă două polimorfisme mai frecvent studiate, care determină substituțiile L55M și Q192R în secvența proteinei, și astfel influențează stabilitatea/concentrația enzimei, respectiv afinitatea enzimei pentru paraoxon, dar nu și pentru acetat de fenil. Obiectivele acestui studiu au fost determinarea distribuției genotipurilor PON1 într-un lot din România și de a verifica dacă fenotipul (determinat prin analiza bidimensională a activităților paraoxonazică și arilesterazică) poate prezice genotipul Q192R PON1. În acest scop, am efectuat analiza genetică și am determinat activitățile paraoxonazei serice la 79 de subiecți. Am găsit următoarea distribuție a genotipurilor: 56,96% QQ, 37,97% QR și 5,06% RR, respectiv: 13,92% MM, 55,70% ML și 30,38% LL. În urma analizei bidimensionale a activităților PON1, am observat o distribuție trimodală a fenotipurilor corespunzătoare genotipurilor PON1 Q192R. De asemenea, am evidențiat o creștere semnificativă a valorii raportului activităților PON1 (paraoxonazică/arilesterazică) simultan cu acumularea alelei R ($p < 0,001$), și respectiv a alelei L ($p < 0,001$). Lucrarea noastră este primul studiu care relatează distribuția genotipurilor PON1 într-un lot din România. Totodată fenotipul PON1 este un bun predictor al genotipului Q192R, oferind informații suplimentare privind protecția împotriva bolilor cardiovasculare și a intoxicațiilor cu substanțe organofosforice.

The status of the human serum paraoxonase in a Romanian sample

Human serum paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent hydrolase, associated with high density lipoprotein (HDL). PON1 is involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases by protecting LDL against peroxidation. It also plays a major role in detoxifying neurotoxic organophosphorus compounds (such as paraoxon) and nerve agents. The PON1 gene has two common coding region polymorphisms: L55M and Q192R, leading to decreased serum PON1 levels and modifying the substrate affinity of the enzyme towards paraoxon. The goals of the present study were to examine the frequencies of the two PON1 genotypes in a sample from the general Romanian population and to verify whether the PON1 phenotype could predict the Q192R genotype. Therefore we have performed special genetic melting point analysis with real-time PCR technology and we assayed the paraoxonase and arylesterase activities of the PON1 enzyme using spectrophotometric methods in 79 individuals. The frequencies of the PON1 genotypes were: 56,96% QQ, 37,97% QR and 5,06% RR, respectively: 13,92% MM, 55,70% ML and 30,38% LL. Through the two-dimensional enzyme analysis plot we detected that the values fall along one of three distinct lines according to the PON1 Q192R genotypes. At the same time the ratio of the paraoxonase/arylesterase activity showed separation of all three PON1 192 genotypes, with no overlap between the groups (QQ: < 4 , QR: $4-10$, RR: > 10). Our study is the first to investigate the distribution of genotypes in the Romanian population. It also shows that the PON1 phenotype estimates the PON1 Q192R genotype, hence being more useful and informative than the genotype alone.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (4): 291-294

www.emeogysz.ro

A humán szérumban paraoxonáz (PON1) 355 aminosavból álló kalciumfüggő hidroláz. Génje a 7(q21.22) kromozómán helyezkedik el egy géncsalád tagjaként: a PON2 és PON3 génjeivel egy csoportban. A paraoxonáznak antilipoperoxidáns, arilesteráz, paraoxonáz, és laktonáz aktivitásai ismertek. A PON1 szintézise a májban történik majd onnan az enzimfehérje N-terminális, hidrofób részével a HDL-hez kötődik és a vérkeringésbe kerül. Szintén a HDL segítségével jut az arteriális érfalban található endothelialis és simaizom sejtekbe, ahol egyik legfontosabb célja, hogy meggátolja az LDL oxidációját és ezáltal az atherogenesis kialakulását. Ugyanakkor a PON1, paraoxonáz hatásának köszönhetően, a neurotoxikus organofosforikus vegyületek (parathion, sarin, soman) méregtelenítésében is igen fontos szerepet tölt be [4, 6, 13].

A PON1 plazma-koncentrációját és különböző aktivitásait befolyásolhatják a génjében található polimorfizmusok, amelyek ezáltal csökkenthetik az enzim egészségvédő hatását is [4]. A kódoló régió polimorfizmusok közül a legismertebbek a fehérje aminosav-sorrendjének 55-ös és a 192-es pozíciójában található Met(M)/Leu(L) illetve Gln(Q)/Arg(R) szubsztitúciók [1]. A PON1 55M allél az enzim olyan konformációját kódolja, amelynek N-terminális régiója csak gyengén kötődik a HDL-hez és ezért a PON1 plazma-koncentrációjának csökkenését eredményezheti [8]. A

paraoxonáz 192R allél által kódolt izoformája, az arilesteráz aktivitás befolyásolása nélkül, csökkent diazoxonáz (és antilipoperoxidáns), ugyanakkor magasabb paraoxonáz aktivitáshoz vezethet [2, 7]. Korábbi tanulmányok a PON1 192R allélt egyrészt a cardiovascularis betegségek (KVB) és magas oxidatív stressz rizikófaktorának, másrészt pedig az organofosforikus vegyületekkel történő mérgezések elleni védőfaktorának tekintik [5, 6]. Az 55M allél hatása sajnos még nem egyértelmű [10]. A különböző haplotípus csoportokon belüli magas, interindividuális PON1 koncentráció ingadozása miatt Richter és mtsai bevezették a PON1 paraoxonáz és arilesteráz aktivitásainak a kétdimenziós analízisét [16]. A módszer segítségével meghatározható a PON1 státusz, amely a PON1 fenotípust és ezen keresztül a Q192R genotípus helyzetét méri fel. Ennek köszönhetően az analízis lehetővé teheti a PON1 prognosztikai értékének pontosabb és összetettebb tanulmányozását különböző betegségeknél.

A PON1 M55L és Q192R genotípusok romániai előfordulásáról még nincs irodalmi adat. Ezért jelen kutatásunk egyrészt a PON1 M55L és Q192R genotípusok romániai minta megoszlásának meghatározásával, másrészt pedig a paraoxonáz és arilesteráz aktivitások kétdimenziós analízisével foglalkozik, a PON1 Q192R genotípusok fenotípus szerinti elkülönítése érdekében.



Anyag és módszer

Vizsgált anyag

Kutatásunk az erdélyi népességhez tartozó 79 személytől vett vérmintára terjedt ki (átlagéletkor $\pm$ S.E.: $19,25 \pm 2,62$ év, nemek eloszlása: 36,4% nő és 63,6% férfi). Mivel az átlaglakosságot céloztuk meg, ezért nem kötöttük feltételhez a személyek tanulmányunkba való felvételét.

Genotípusok meghatározása

Az EDTA-val vett vérmintákból a DNS izolálását Qiagen (Quiagen GmbH, Hilden, Németország) kit segítségével végeztük. A PON1 M55L és Q192R genotípusok meghatározására LightCycler készüléket használtunk [15]. Először real time PCR segítségével amplifikáltuk a PON1 gén M55L illetve Q192R aminosav-szubsztitúcióihoz vezető DNS szekvenciáit primerekkel és specifikus, jelölt próbákkal. A genotípusokat a DNS minták és a specifikus, jelölt próbák olvadáspont analízisével különítettük el.

Fenotípusok meghatározása

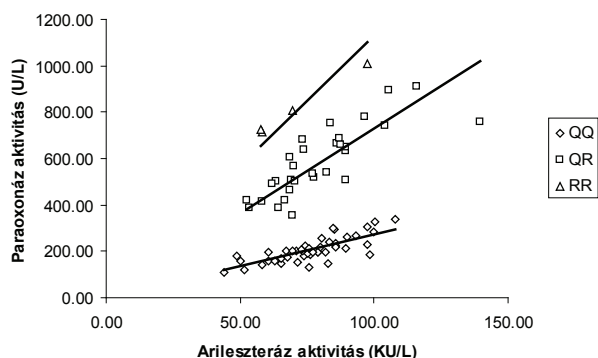
A PON1 arileszteráz és paraoxonáz aktivitásait spektrofotometriás eljárással határoztuk meg a heparinnal vett vérminta plazmájából [7]. A paraoxonáz aktivitás meghatározásához szubsztrátként paraoxont, az arileszteráz aktivitás méréséhez pedig fenil-acetátot használtunk.

1. táblázat. A PON1 M55L és Q192R genotípusok százalékos megoszlása.

%	QQ	QR	RR	Összesen
MM	13,92	0,00	0,00	13,92
ML	34,18	20,25	1,27	55,70
LL	8,86	17,72	3,80	30,38
Összesen	56,96	37,97	5,06	

2. táblázat. A paraoxonáz és az arileszteráz aktivitások hányadosainak a Q192R genotípusonkénti értékintervallumai

PON1 Q192R polimorfizmus	QQ	QR	RR
Paraoxonáz és arileszteráz aktivitások hányadosa	>4,00	4,00 - 10,00	10,00<



1. ábra. A PON1 paraoxonáz és arileszteráz kétdimenziós analízise a PON1 Q192R genotípusok feltüntetésével. A regressziós egyenesek R_2 értékei: (◇) QQ: 0,61, (□) QR: 0,64, (△) RR: 0,68

Statistikai analízis

ANOVA tesztet alkalmaztunk a paraoxonáz és arileszteráz aktivitások hányadosainak összehasonlításához, a $p < 0,05$ értékeit tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Genotípusok megoszlása

A tanulmányozott csoportban a PON1 M55L és Q192R genotípusok előfordulását az **1. táblázatban** tüntettük fel. A domináns a 192-es pozícióban a Q allél (75,95%), az 55-ös pozícióban pedig az M allél (41,77%) volt.

A PON1 aktivitások kétdimenziós analízise

Az enzimaktivitások kétdimenziós analízisének a paraoxonáz aktivitást az arileszteráz aktivitás függvényében vizsgáltuk. A grafikus ábrázolás során az értékek három, különböző egyenes mentén helyezkedtek el, a Q192R genotípusnak megfelelően (**1. ábra**).

Mivel az analízis a paraoxonáz és az arileszteráz aktivitások közötti hányadost vizsgálja, a következőkben megvizsgáltuk ennek a hányadosnak a Q192R genotípusonkénti értékintervallumait is (**2. táblázat**).

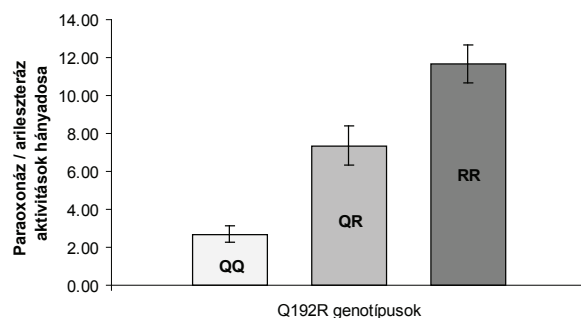
A 192R allél felhalmozódásával a hányados szignifikáns ($p < 0,001$) növekedését észleltünk (**2. ábra**).

A hányados az M55L genotípus-csoportok szerinti értékei igen magas normális szórást mutattak. Ennek ellenére szignifikáns ($p < 0,001$) csökkenését sikerült kimutatni az 55 M allél felhalmozódásával is (**3. ábra**).

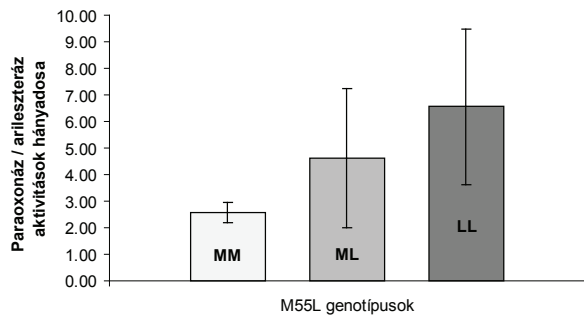
Megbeszélés

Genotípusok megoszlása

Kutatásunk elsőként számol be a PON1 M55L és Q192R genotípusok romániai minták méréseinek eredményeiről. Dominánsnak az 55ML heterozigóta és a 192QQ homozigóta genotípusokat találtuk. A leggyakoribb haplotípus az 55ML és 192QQ volt. Tanulmányunkban bár a nemek eloszlása egyenlőtlen, a szakirodalomban nincs adat mely összefüggést mutatna ki a nemi hovatartozás és a PON1



2. ábra. A PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitások hányadosának átlaga és normális szórása a PON1 Q192R genotípusok függvényében (QQ: $2,70 \pm 0,42$, QR: $7,36 \pm 1,03$, RR: $11,68 \pm 0,98$; $p < 0,001$)



3. ábra. A PON1 paraoxonáz és arileszteráz aktivitások hányadosának átlaga és normális szórása a PON1 Q192R genotípusok függvényében (MM: 2,59±0,38, ML: 4,62±2,63, LL: 6,57±2,93; $p < 0,001$)

polimorfizmusok megoszlása között (a PON1 gén nem a nemi kromoszómán található). Eredményeink hasonlóak a kaukázusi népesség körében leírt PON1 genotípusok megoszlásával, de eltérőek az ázsiai populációétól, ahol gyakoribb a 192RR genotípus [3]. A felmérések szerint a KVB és az oxidatív stressz elleni védelem szempontjából a 192-es pozícióban kedvezőbb a QQ genotípus az R allélt tartalmazó genotípusokkal szemben [6]. A PON1 atherosclerosis és organofoszforikus mérgezések ellen nyújtotta védelméről csak enzimológiai mérések adhatnak pontosabb képet [5].

A PON1 aktivitások kétdimenziós analízise

Az enzimaktivitások kétdimenziós analíziséhez a paraoxonáz aktivitást vizsgáltuk az arileszteráz aktivitás függvényében [16]. A PON1 arileszteráz aktivitása arányosan változik az enzim plazma-koncentrációjával. Az enzim paraoxonáz aktivitása ugyanakkor a PON1 plazma-koncentrációján kívül a 192-es pozícióban található allélok típusától is függ [11]. Ismert, hogy az enzim 192R allél által kódolt izoformája magasabb paraoxonáz aktivitással rendelkezik, mint a 192Q allélnak megfelelő izoforma [5]. Ennek értelmében, a PON1 aktivitások hányadosának tanulmányozása kiküszöbölheti azokat a tényezőket, amelyek azonos mértékben befolyásolják az enzim aktivitásait (pl. enzim koncentráció), és az értékeket a Q192R genotípusoknak megfelelően három csoportra oszthatja. A PON1 aktivitások kétdimenziós analízise, a regressziós egyenesek dőlésszögének tangensével, az enzim aktivitások hányadosát vizsgálja. Ezzel magyarázható, hogy az eljárás során az értékek három, különböző egyenes mentén helyezkedtek el, a Q192R genotípusnak megfelelően (1. ábra). Ugyanakkor a paraoxonáz és arileszteráz aktivitások közötti hányados átlagértékének szignifikáns növekedését is alátámasztja a 192R allél felhalmozódása (2. ábra). A PON1 Q192R genotípus-csoportok értékintervallumai között nem volt átfedés (2. táblázat) és hasonlóak az irodalomban található adatokkal [14].

A PON1 M55L genotípusokat az aktivitások kétdimenziós analízisével nem sikerült elkülöníteni. Mégis a két aktivitás közötti hányados átlagértékeinek szignifikáns csökkenését észleltük ezen genotípus csoportok között, az M allél felhalmozódásával (3. ábra). Véleményünk szerint ezt a jelenséget a szakirodalomban már említett kiegyensúlyozatlan

kapcsolódás (linkage disequilibrium, LD) eredményezheti [8, 9, 12]. Ennek értelmében, a két polimorfizmus lokusza között egy bizonyos kapcsolat létezhet, amely gyakoribbá teheti a 192R és 55M allél együttes jelenlétét.

A 192QR és 192RR genotípusokhoz tartozó hányados értékeinek szórása miatt nehezebb volt a két genotípus egymástól való elkülönítése. Az M55L genotípus-csoportokban a hányados értékei is igen magas normális szórást mutattak. A két esetben észlelhető nagy szórás valószínű, hogy az enzim multifaktoriális befolyásolhatóságának köszönhető. Az életkor, az egészségtelen (zsíros, antioxidáns vitaminok nélküli) táplálkozás, a szeszesitalok fogyasztása, a dohányzás és más toxinok kedvezőtlenül hathatnak a PON1 aktivitásra. A gyulladásgátló gyógyszerek ugyanakkor csökkenthetik az oxidatív stressz szintjét és növelt PON1 koncentrációhoz vezethetnek [4, 6]. Ezért fontos a PON1 státusz felmérése, amely nemcsak a genetikai, hanem a környezeti tényezőket is figyelembe veszi.

Más tanulmányok a PON1 paraoxonáz és diazoxonáz aktivitásokat vizsgálták [5, 10]. Az előbb említett aktivitások kétdimenziós analízisével még hatékonyabban és pontosabban elkülöníthetők a 192-es pozíciójú polimorfizmus genotípusai, bár az enzim koncentrációjáról így nem nyerünk információt.

A tanulmányunkban alkalmazott analízis egyik előnye, hogy a PON1 fenotípusok enzimológiai meghatározásai sokkal elérhetőbbek, mint a speciális genetikai eljárások. Ennek köszönhetően a módszer egyrészt a PON1 Q192R genotípusok könnyebb meghatározására használható. Másrészt információval szolgál a PON1 státuszról is, lehetővé adva, hogy felmérhessük a környezeti rizikófaktorok szintjét is.

Irodalom

- Adkins S., Gan K.N., Mody M. et al. - *Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes*, Am. J. Hum. Genet., 1993, 52(3):598-608.
- Aviram M., Billecke S., Sorenson R. et al. - *Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1998, 18(10):1617-1624.
- Chen J., Kumar M., Chan W. et al. - *Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates*, Environ. Health. Perspect., 2003, 111(11):1403-1409.
- Costa L.G., Vitalone A., Cole T.B. et al. - *Modulation of paraoxonase (PON1) activity*, Biochem. Pharmacol., 2005, 69(4):541-550.
- Davies H. G., Richter R. J., Keifer M. et al. - *The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin*, Nat. Genet., 1996, 14(3):334-336.
- Deakin S. P., James R. W. - *Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-I*, Clin. Sci., 2004, 107(5):435-447.
- Eckerson H. W., Romson J., Wyte C. et al. - *The human serum*

- paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts*, Am. J. Hum. Genet., 1983, 35(2):214-227.
8. Garin M.C., James R.W., Dussoix P. et al. - *Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes*, J. Clin. Invest., 1997, 99(1):62-66.
 9. Holland N., Furlong C., Bastaki M. et al. - *Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns*, Environ. Health Perspect., 2006, 114(7):985-991.
 10. Jarvik G. P., Rozek L. S., Brophy V. H. et al. - *Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, 20(11):2441-2447.
 11. Kujiraoka T., Oka T., Ishihara M. et al. - *A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration*, J. Lipid. Res., 2000, 41(8):1358-1363.
 12. Leviev I., James R. W. - *Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations*, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2000, 20(2):516-521.
 13. Mackness B., Durrington P.N., Mackness M.I. - *Human serum paraoxonase*, Gen. Pharmacol., 1998, 31(3):329-336.
 14. Nakanishi M., Takanami Y., Maruyama T. et al. - *The ratio of serum paraoxonase/arylesterase activity using an improved assay for arylesterase activity to discriminate PON1(R192) from PON1(Q192)*, J. Atheroscler. Thromb., 2003, 10(6):337-342.
 15. Pocsai Z., Toth Z., Paragh G. et al. - *Rapid genotyping of paraoxonase 55 and 192 mutations by melting point analysis using real time PCR technology*, Clin. Chim. Acta., 2003, 332(1-2):31-36.
 16. Richter R. J., Furlong C. E. - *Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping*, Pharmacogenetics, 1999, 9(6):745-753.