فصل اول

مقدمه

۱-آنزیمها

آنزیمها پلیمرهای زیستی هستند که با کاتالیز فرآیندهای متعدد پویا، حیات را آنچنان که می‌شناسیم امکان پذیر می‌سازند. آنزیمها سرعت انجام وقایع فیزیولوژیک را تعیین می کنند و لذا نقشی محوری در سلامت وبیماری دارند.

تجزیه غذاها برای تأمین انرژی و واحدهای شیمیایی سازنده آنها، گردآوری این واحدهای سازنده پروتئینها، غشاها و DNA که حامل اطلاعات ژنتیکی است مهار انرژی برای ایجاد حرکت سلولی، همگی اعمالی هستند که با کار دقیقاً هماهنگ آنزیمها امکان پذیر می شوند.تمام فرایندهای فیزیولوژیک در سلامت به صورت مرتب و منظم انجام می گردند و هومئوستاز حفظ می شود، حال آنکه هومئوستاز در حالات بیماری می تواند به شدت مختل شود. گستره ای از بیماریهای نادر ولی غالباً معلولیت‌زا و مرگبار ژنتیکی هم وجود دارند که نمایانگر عواقب فیزیولوژیک شدید اختلال فعالیت صرفاً یک آنزیم می باشند.

بخشی از ویژگیهای عمومی بسیاری از آنزیمها را می‌توان در چند جمله خلاصه کرد به این ترتیب که آنزیمها کاتالیزورهایی می باشند که علاوه برسوبسترا جهت انجام واکنش به ترکیبات دیگری به نام کوآنزیم نیاز دارند و بدون آن غیرفعال می باشند. شاید مهمترین خاصیت هر آنزیم قابلیت آن در کاتالیز یک واکنش خاص و تقریباً هیچ گونه واکنش دیگر است. آنها از نظر شکل فضایی ترکیب, نیز اختصاصی عمل می کنند.

فعالیت کاتالیزی هر آنزیم شناسایی آن را تسهیل می‌کند. مقدار اندک آنزیمهای موجود در سلولها باعث دشواری اندازه‌گیری هر آنزیم در مایعات یا عصاره‌های بافتی می‌شود. خوشبختانه فعالیت کاتالیزی هر آنزیم راهنمایی حساس و اختصاصی برای اندازه گیری آن است. قدرت ملکولی هزارها و دهها هزار یا تعداد بیشتری ملکول سوبسترا به محصول طی مدتی کوتاه، این قابلیت را به هر ملکول آنزیم می‌دهد که حضور خود را ازطریق شیمیایی بزرگتر از آنچه هست جلوه دهد [۱].

۱-۱طبقه بندی آنزیمها

آنزیمها بر اساس نوع و مکانیسم واکنش در اتحادیه بین المللی بیوشیمی (IUB) به شش دسته اصلی طبقه بندی شده اند[۲].

۱) اکسیدوردوکتازها: این آنزیمها انتقال اتمهای H وO_2 یا الکترونها را در یک سوبسترا به دیگری کاتالیز می کنند.اکسیدازها (H را به O_2 انتقال می‌دهند.)دهیدروژنازها (H را به پذیرنده دیگری غیر ازO_2 انتقال می دهند) و پراکسیدازها سه گروه اصلی این دسته می باشند.

۲) ترانسفرازها: آنزیمهای قرار گرفته در این دسته با انتقال یک گروه (متیل، آلدهید، کتون، آسیل، گلکوزیل و فسفات] از یک سوبسترا به سوبسترای دیگر عمل کاتالیزی خود را انجام می‌دهند. کینازها، فسفو موتازها، ترانس آلدولاز، ترانس کتولاز در این گروه قرار می گیرند.

۳) *هیدرولازها*: این آنزیم ها عمل شکستن پیوندهای بین یک کربن باسایر اتم ها را با کمک افزودن آب کاتالیز می کنند.آنزیمهای پروتئولتیک ، آمیلازها و استرازها را در این دسته می‌توان نام برد.

٤) *لیازها*: برداشت غیرهیدرولتیک گروهها از سوبسترا را لیازها کاتالیز کرده واغلب پیوند دوگانه ایجاد می کنند. دکربوکسیلاز، هیدراتاز،دهیدراتاز، سنتاز و آلدولاز در این گروه طبقه بندی می شوند.

۵) *ایزومرازها*: این آنزیمها تبدیل ایزومرهای مختلف به یکدیگر را کاتالیز می‌کنند. از آن جمله می‌توان تبدیل سیس به ترانس، L به D و آلدهید به کتون را نام برد.

٦) *لیگازها*: آنزیمهای این طبقه تشکیل پیوندهای جدید کربن با اکسیژن، گوگرد، نیتروژن وسایر اتم‌ها را کاتالیز می‌کنند. انرژی مورد نیاز برای تشکیل پیوند، اغلب از هیدرولیزATP تامین می‌شود. اصطلاح سنتتاز نام دیگر این طبقه است. تیوکیناز و کربوکسیلاز دو نمونه از این آنزیم هستند.

۱-۱-۲ استراز ها

استرازها آنزیمهای هیدرولازی هستند که در یک واکنش شیمیایی با آب، استر را به اسید والکل تبدیل می نمایند. یک محدوده وسیعی از استرازها بر اساس سوبسترای اختصاصی، ساختار پروتئین وفعالیت بیولوژیکی موجود می باشد.

شکل۱-۱واکنش هیدرولیزی استرازها

Aldridge [۳] استرازها را براساس واکنش با ترکیبات ارگانوفسفاته به دو دسته اصلی تقسیم بندی نموده است.A- استرازها وB-استرازها

A – استرازها: آنزیم های قرارداده شده دراین دسته ارگانو فسفاته ها را هیدرولیز می کنند که شامل دو آنزیم مهم به نامهای پاراکسوناز[۱] (PON) و دی ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز[۲] (DFP ases) می باشند. از خصوصیات مهم و بارز آنزیمهایی که دراین گروه تقسیم بندی می‌شوند نیاز آنها به یونهای فلزی به عنوان کوفاکتور می باشد که جهت فعالیت و پایداری آنزیم مورد نیاز است. حضور ضروری Ca^{+2} برای پاراکسوناز وکبالت Co^{+2}، منگنزMn^{+2} و منیزیم Mg^{+2} بر رویDFP ases بیانگر این موضوع می باشد.

B- استرازها: توسط ترکیبات ارگانوفسفاته مهار می‌شوند. کربوکسیل استراز[۳] و کولین استراز [٤]دراین گروه طبقه بندی می شوند.

ترکیبات ارگانوفسفاته که به طور وسیع در ساخت حشره کشها و گازهای عصبی مورد استفاده قرار می گیرند، با مهار استیل کولین استراز اثرات بیو شیمیایی خطرناکی را ایجاد کرده که A – استرازها با هیدرولیز این ترکیبات نقش حفاظتی مهمی را ایفا می نمایند.

1-paraoxonases

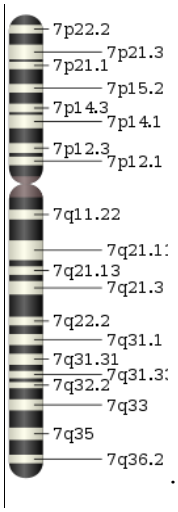
2- Diisopropyl fluorophosphatese

3- *Carboxylase*

4- cholinestrases

۱-۲خوشه ژنی پاراکسوناز PON

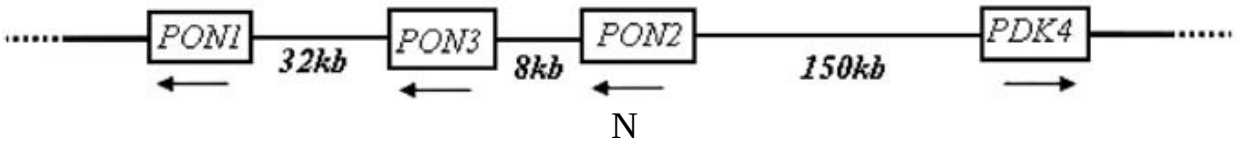
تا کنون سه فرم ژنتیکی پاراکسوناز شناخته شده است شامل PON3،PON2،PON1 که به صورت خوشه ژنی بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ۷ (q21 .3) در انسان وکروموزوم شماره ٦ موش قرار گرفته است [٤].



شکل ۱-۲کروموزوم شماره ۷

در بین پستانداران حدود ٦۰ درصد تشابه و همولوژی بین اسیدهای آمینه و تا ۷۰ درصد شباهت در سطح نوکلئوتیدها در بین این سه پروتئن دیده می‌شود. تفاوت مشاهده شده شامل وجود سه ریشه اضافی نوکلئوتید در اگزون شماره ٤ ناحیه کدینگ برای اسید آمینه شماره ۱۰۵ در ژن PON1 می‌باشد که در PON3،PON2 وجود ندارد [۵].

در مجاورت خوشه ژنیPON ژن کد کننده آنزیم پیروات دهیدروژناز کنیاز قرار گرفته است که ممکن است بتواند توضیح دهنده ارتباط ژنوتیپیPON با بیماری گلایسمیک دیابت باشد [٦-۷].



شکل۱-۳نقشه ژنتیکی خوشه ژنی PON

۱-۳پلی مورفیسم ژن پاراکسوناز-۱

پلی مورفیسمهای ژن PON1 در دو ناحیه کدینگ[1] و پروموتور[2] قرار دارد. دو پلی مورفیسم شناخته شده در ناحیه کدینگ ژن یکی موقعیت ۱۹۲ می‌باشد که اسید آمینه گلوتامین به جای آرژنین قرار می‌گیرد و به صورت PON1 R/Q192 بیان می‌شود. و دیگر موقعیت ۵۵ ، اسید آمینه لوسین جایگزین متیونین شده و به صورت PON1N/L 55 نوشته می‌شود [۸-۹].

برای ناحیه پروموتور ژن آنزیم ۵ پلی مورفیسم گزارش شده است که در موقعیتهای -907/909 108/107 -824/832-160/162-126 قرار گرفته اند[۱۰]. قابل ذکر است که مطالعات و بررسی های صورت گرفته بیشتر بر پلی مورفیسمهای موقعیتهای ۱۹۲و ۵۵ ناحیه کدینگ متمرکز بوده است. بررسی ارتباط این پلی مورفیسمها با انواع بیماریها، فعالیت آنزیم وهمچنین سطح فاکتورهای سرمی، نمونه‌هایی از مطالعات انجام شده می باشد.

پراکندگی پلی مورفیسم های PON1 در بین جمعیتهای انسانی متفاوت است. فرکانس الل Met 55 در سفیدپوستان بالاتر از سیاه‌پوستان و این در حالی است که فرکانس الل Arg192 بر عکس می-باشد [۱۱]. کمترین فرکانس مربوط به PON1 Met 55 می‌باشد که در چین گزارش شده است و بالاترین فرکانس که در سیاه پوستان چین و ژاپن بررسی شده است در ارتباط با Arg192 می‌باشد. که حدود ۵۸ تا ٦٥ درصد پلی مورفیسم PON1 را در برگرفته است [۱۲-۱۳[2]].

۱-۳-۱پلی مورفیسم ژن PON1 وفعالیت آنزیم

سطح سرمی فعالیتPON1 در بین افراد بسیار متفاوت می‌باشد که باعث تفاوتهای فردی در مسمومیت ارگانوفسفاته‌ها می‌گردد. به نظر می‌رسد اساس مولکولی این تفاوت در ارتباط با پلی مورفیسم ژن PON1 باشد.

هیدرولیز پاراکسون باPON1 در پلی مورفیسم‌های PON1 RR 192 وPONLL155 بالاترین حد و در پلی مورفیسم های PON1 QQ 192 وPON MM 155 با حداقل فعالیت هیدرولیتیکی همراه می باشد. در هتروزیگوت ها سطح متوسطی از فعالیت گزارش شده است [۱۵-۱٤]. الگوی مشابهی در مورد دیگر سوبستراهای اختصاصی مانند متیل پاراکسون و[3] کلرفیزیس – اکسین[4]نیز مشاهده شده است[۱٦]. توانایی آلو آنزیمهای پاراکسوناز-۱ در حفاظت از LDL در برابر اکسیداسیون کاملاً بر عکس فعالیت هیدرولیتیکی پاراکسون می‌باشد. بنابراین افراد M55/ QQ 192

1-codding
2-promoter
3-methyl paraoxon
4-chloropyrifos oxon

دارای PON1 فعالتر و در نتیجه HDL با ظرفیت حفاظتی بالاتری می باشد. این آلوآنزیمها همچنین در هیدرولیز دیازوکسون [1]و گازهای عصبی (سارین[2] و سومان[3]) فعال‌تر می‌باشند [۱۶].

در مورد دیگر گروههای سوبسترا متیل استات[4]، کلروپیریفیوز اکسین و دو نفتیل استات آلو آنزیمهای PON1 فعالیت هیدرولیتیکی یکسان دارند [۱۶]. در خرگوش هر دو پلی‌مورفیسم R/Q192 فعالیت هیدرولیکی مشابهی دارند اما R192 فعالیت پاراکسونازی بالاتری از خود نشان می دهد [۱۷].

در مورد اثر پلی مورفیسمهای ناحیه پروموتور و فعالیت آنزیم Brophy [۱۸] گزارش داده است که پلی مورفیسم 108 اثر قابل توجهی بر سطح فعالیت PON1 دارد در حالی که پلی مورفیسم 162 کمترین اثر را دارا می‌باشد. پلی مورفیسم 909 تاثیر مستقل و خیلی کم را بر سطح فعالیتPON1 در invivo از خود نشان می‌دهد. بررسی ها نشان می دهد[۱۹] پلی‌مورفیسم‌های ناحیه پروموتور ژن PON1 تاثیر بسیار قوی بر بیان و سطح سرمی آنزیم دارد. در پلی مورفیسم های موقعیتهای 106، 907،827 بالاترین غلظت وفعالیت آنزیم دیده شده است. همچنین ناحیه پلی مورفیک 107 به نظر می رسد یک اثر غالب بربیان ژن PON1 داشته باشد.

این در حالی است که پلی مورفیسم ناحیه تنظیمی به تنهایی قادر به تاثیر بر سطح سرمی آنزیم نمی‌باشد. فاکتورهای محیطی ممکن است بیان ژن و فعالیت آن را کاهش دهند که می‌تواند پاسخ دهنده این مطلب باشد که چرا افراد با ناحیه تنظیمی کارآمد و موثر سطح فعالیت آنزیمی کمی دارندو عکس مصرف آنتی‌اکسیدانها ممکن است در یک فرد با ناحیه تنظیمی غیر موثر سطح سرمی متوسطی را بیان کند اگرچه به نظر می رسد این افراد قادر به بیان سطح بالای آنزیم نباشند [۲۰-۲۱-۲۲-۲۳].[3]

۱-۳-۲پلی مورفیسم ژن PON1 و لیپو پروتئین های پلاسما

1-diazoxon
2-sarin
3-soman
4-methylacatat

مطالعات زیادی نشان دهنده ارتباط بین پلی مورفیسم ژنPON1 وغلظت لیپو پروتئین های پلاسما می باشد.پروفایل لیپدی شامل apoA1، apoB، LDL – کلسترول، HDL- کلسترول، و کلسترول توتال در پلی مورفیسم آنزیم مورد بررسی قرار گرفته است.تفاوتهای مشاهده شده در نتایج می تواند به علت گوناگونی محیطهای جغرافیایی، فاکتورهای ژنتیکی و محیطی باشد.

در هموزیگوتها PON1 Q192 پروفایل لیپوپروتئینی بهتر با کمترین سطح پلاسمایی apoB و کلسترول توتال نسبت به فرم هموزیگوت یا هتروزیگوت PON1R192 دیده می شود [۲٤]. سطح بالای LDL و کلسترول توتال در افراد که در موقعیت 55 آنزیم اسید آمینه لوسین را به صورت هموزیگوت دارند دیده می‌شود. در حالی که پلی مورفیسم PON1M55 پروفایل لیپوپروتئین پلاسمائی بهتر از خود نشان می دهد [۲۵]. اگر چه گزارشاتی که عکس این موضوع را بررسی کرده است نیز موجود می باشد که در پلی مورفیسم PON1M55 کلسترول LDL، apoB بالاتری نسبت به افراد غیر حامل دیده شده است [۲٦].

در صورتی که هموزیگوتهای M نسبت به میزان نرمال افزایش غلظت HDL را دارا می باشند و همچنین به داشتن غلظت بالای apoA1 تمایل دارند [۲۷]. ژنوتیپ R/Q192 در درمان با پراواستاتین[1] افزایش غلظت HDL کلسترول و apoA1 بیشتری نسبت به PON1 M/L 55 دارند [۲۷]. قابل ذکر است که مطالعاتی هم در جمعیتهای مختلف موجود می باشد که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم PON1 و لیپوپروتئین های پلاسما وجود ندارد [۲۸-۲۹-۳۰]. ارتباط بین ژنوتیپ PON وکلسترول توتال، کلسترول HDL و کلسترول LDL و apoA، apoB نشان می‌دهد که ژنوتیپ PON بر متابولیسم لیپیدها موثر است اما مکانیسم آن هنوز نا مشخص است.

۱- ٥ آنزیم پاراکسونا۱ (PON1)

اولین بار در سال ۱۹٤٦، Abraham Mazur گزارش داد که آنزیمی در بافت‌های حیوانات موجود می باشد که قادر به هیدرولیز ترکیبات ارگانوفسفاته است [۳۱] و منجر به شناسایی اولیه پاراکسونازا از سرم انسان در اوایل دهه ۱۹۵۰ گردید [۳۲-۳۳].

آنزیم به علت توانایی هیدرولیز سوبسترای ارگانوفسفاته پاراکسون که از متابولیت‌های سمی پاراشیون (حشره کش) می‌باشد پاراکسوناز نام گرفت. از طرفی به خاطر این که PON1 قادر به هیدرولیز

1- pravastatin

استرهای آروماتیک مانند فنیل استات می‌باشد اصطلاح A-استراز برای معرفی آن به کار برده شد [۳۲-۳۳].

هیدرولیز دو نوع متفاوت سوبسترا باعث ایجاد بحث‌های مختلف بر سر این موضوع گردید که ممکن است دو آنزیم با دو عملکرد متفاوت پاراکسونازی و آریل استرازی موجود باشد یا یک آنزیم هر دو فعالیت را انجام می‌دهد. سرانجام بررسی‌های متعدد نشان داد که پاراکسونازا مسئول هر دو فعالیت می باشد [۳٤].

پاراکسونازا (PON1)(Ec(3.1.8.1 یک پروتئین گلیکوزیله با وزن مولکولی ٤۳ کیلودالتون است که به صورت اولیه در کبد سنتز شده و در خون ترشح می‌گردد و بر روی ذره HDL قرار می گیرد [۳۵].

۱-۴-۱جایگاه سنتز PON1

آنالیزهای نورترن بلات در انسان و بافت های خرگوش مشخص کرد که mRNA آنزیم تنها در کبد موجود است در حالی که RT-PCR[1] در موش mRNA آن را در کبد، کلیه، قلب، مغز، روده و ریه نشان داد [۳٦].در ادامه بررسی بانک ژنی ترادف PON1 با استفاده ESTs[2] نشان دادآنزیمهای موجود در ریه، مغز، کبد، بانکراس و جفت تنها تشابه۷۰% با پاراکسوناز سرم دارند این در حالی است که درمورد پاراکسوناز کبد و طحال جنین و کبد بالغین این تشابه به ۱۰۰%

می رسد[5]. [۳۷]. فعالیتPON1 در نوزادان و جنین نارس در حدود نیمی از سطح فعالیت آنزیم بالغین می باشد[۳۸]. سطح فعالیت در بالغین حدود یک سال بعد از تولد حاصل شده و در طول زندگی ثابت باقی می ماند. هم چنین تفاوتی در بین غلظت و فعالیت کلی بین دو جنس زن و مرد دیده نشده است[۳۸].

در سال ۱۹۹۳ اولین متد جهت خالص سازی نسبی PON1 کبد رت منتشر شد [۳۹]. پروسه شامل آماده‌سازی میکروزوم، حلالیت باتریتونX-100 و جذب بر روی هیدروکسی آپاتیت و کروماتوگرانی با DEAE-52 سلولز می‌باشد که محصول خالص شده ۷۷-fold به دست آمده است. Huany و همکارانش [٤۰] از میکروزوم‌های کبد موش و Rodrig در سال ۱۹۹۷ آنزیم با٤۱۵-

1- reverase transciptase polymrase chaine reaction

2- *identified expressed sequence tags*

fold به دست آوردند. آن ها از سه مرحله کروماتوگرافی شامل DEAE سفاروز ، کروماتوگرافی میل ترکیبی و fast Performane liquide Mono QHR استفاده نمودند.

ترادف اسیدآمینه ناحیه N-ترمینال و دو ترادف داخلی دیگر مشابه به آنزیم به دست آمده از سرم انسان و موش و کبد موش بود. بسیاری از ویژگی‌های دیگر شامل pH اپتیم،PON1 و ثابت کینتیک، اپتیمم دما و احتیاج به کلسیم در هر دو آنزیم یکسان بود [٤١]. میکروزوم های کبدی جایگاه اصلی کاتابولیسم ترکیبات گزنوبیوتیک می باشند که رادیکال های آزاد زیادی تولید می نماید. Rodringo مشاهده کرد[٤٢] که بیان پروتئین PON1 به صورت اصلی در سلول‌های کبد از ناحیه سنترالوبولار[٢]صورت می گیرد این می‌تواند حامی این نظریه باشد که PON1 داخل سلول های کبد در غیر فعال کردن محصولات اکسیداتیو شرکت می کند.

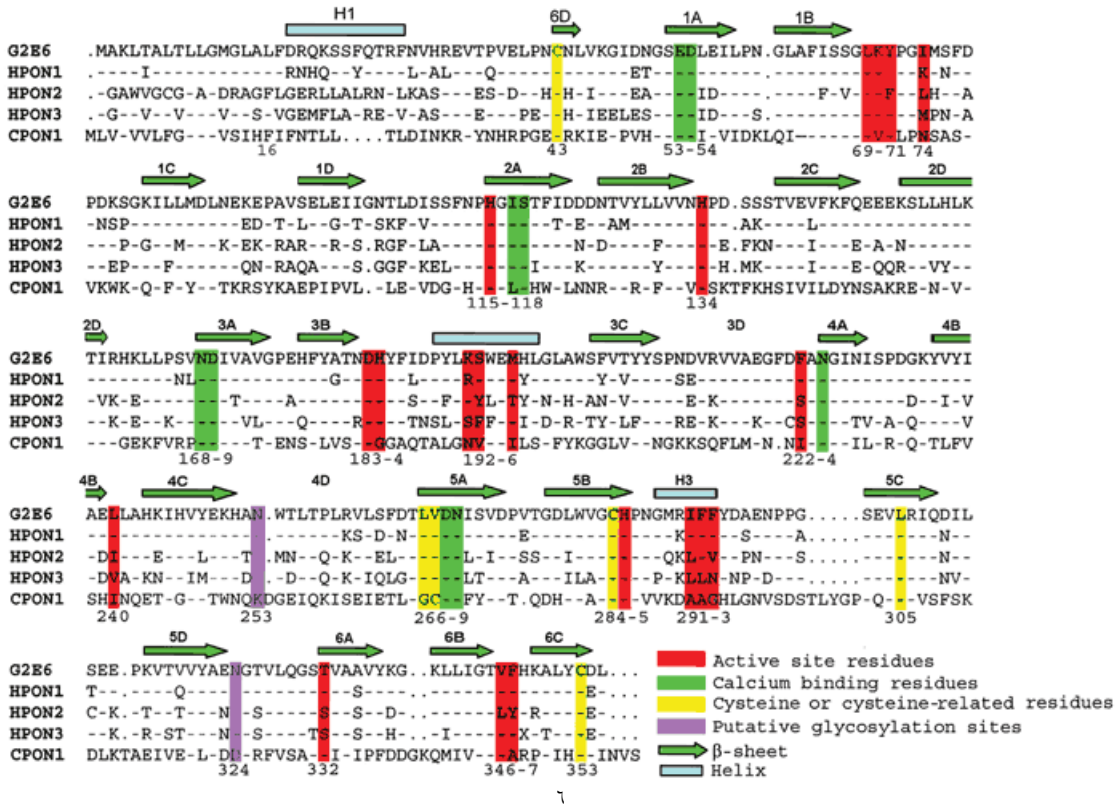
١-٤-٢ ساختار آنزیم

تلاش‌های اولیه در جهت شناسایی ساختار پروتئینی آنزیم به علت ناپایداری بسیار بالای آنزیم خالص شده از سرم انسان بی نتیجه ماند [٤٣]. بررسی‌های انجام شده بین ٤ ژن PON1 در٤ گونه انسان، موش، رت و خرگوش شباهت بسیار بالایی را نشان داد به طوری که تنها PON1 خرگوش در ریشه های ٣١-١٤ با سه گونه دیگر متفاوت می باشد.

ژن های این چهارگونه با هم ترکیب شده و در باکتری E.coli بیان گردید. آنزیم بیان شده از نظر ویژگی‌های آنزیماتیک ضروری که در نوع وحشی آنزیم یافت می‌شد و هم چنین فعالیت فیزیولوژیکی به خصوص مهار اکسیداسیون LDL مورد بررسی قرار گرفت که نتایج کاملاً با نوع وحشی همخوانی داشت. آنزیم تولید شده از نسل اول پایداری لازم را نداشت در حالی که کریستالیزاسیون نسل دوم پایداری مورد نظر را نشان داد [٤٤]. این آنزیم با نامPON1 re نامیده شد که ٩١ درصد شباهت با تایپ وحشی PON1 خرگوش داشت و درصد بالایی از تشابه با انسان، رت و موش نشان می داد. تفاوت های موجود بر فعالیت و شکل غالب آنزیم موثر نبودند [٤٥].

٣٥٤ اسید آمینه ساختمان اول آنزیم را شکل می‌دهند. در آنالیز پاراکسونازا انسان Hu PON1 باDSSP[١] مشخص گردید ساختار دوم آنزیم متشکل از ٤٣% صفحات بتاو ١٥%turn و٢٨%

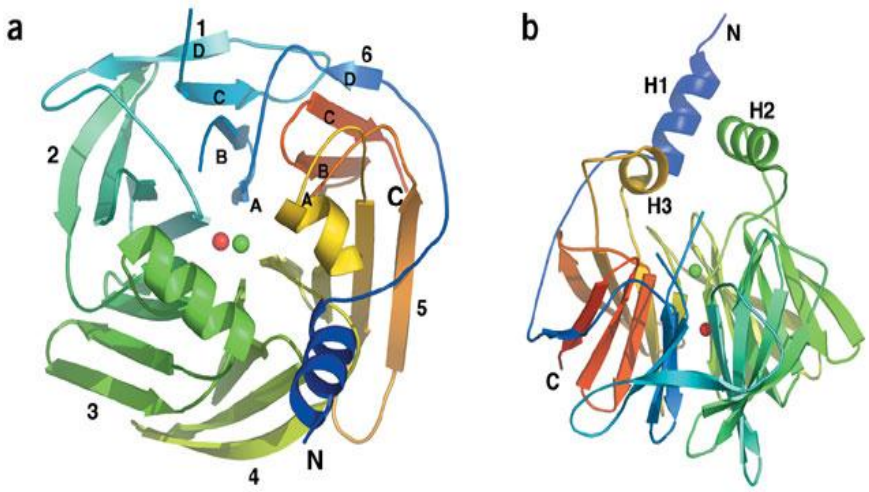
آلفاهلیکس می باشد [٤٦]. دومین های تشکیل دهنده ساختار سوم آنزیم از نوع β پروانه ای٦ تیغه ای[٢] می باشد که هر تیغه آن شامل ٤صفحه β است.



٦

شکل ١-٦ ساختار دوم PON1

1- *Definaion of secondary structure protein*
2-six-blad *propeller-β*



شکل۱-۷ ساختار سوم PON1

این ساختار با یک پیوند دی سولفیدی بین cys42 [رشته 6D] وcys353 [رشته 6c] کامل می-گردد. پیوند کووالانسی بین N و C ترمینال به ندرت در ساختارهای β پروانه‌ای با ٤ تیغه دیده می-شود در حالی که در خانواده پاراکسوناز کاملاً حفظ شده است.[٤٧]

۱۱۵ مولکول آب، یک یون فسفات و ۲ یون کلسیم در کریستال شکل گرفته از rePON1 دیده می‌شود [٤٨]. دو یون کلسیم در مرکز تونل پروانه ،یکی در بالا (ca_1)ودیگری در موقعیت مرکزی (ca_2)قرارگرفته است. ca2 اغلب کلسیم ساختاری نامیده می‌شود به این دلیل که حذف آن موجب دناتوراسیون غیر قابل برگشت آنزیم می گردد.Ca_1 یا کلسیم کاتالیتیکی به نظر می‌رسد با ۵ ریشه اسید آمینه‌ای شامل اکسیژن زنجیره جانبی Asp269، Asn224،Asn270،Asn168 اتصال دارد. مولکول آب و اکسیژن یون فسفات دو موقعیت اتصالی دیگر برای ca1 در کریستال تشخیص داده شده است [٤٩].

ساختار PON1 به آنزیم دی‌ایزوپروپیل فلوروفسفاتاز (Dfpase) لولیگاولگاریس شباهت دارد [۵۰]. هر دو آنزیم ساختار β- پروانه ای با دو اتم کلسیم در مرکز تونل دارندو عملکرد مشابهی (فعالیت فسفوتیواسترازی) از خود نشان می دهنداین در حالی است که هنوز ترادف مشابهی در بین آنها شناسایی نشده و بررسی‌ها حاکی از تفاوت های کاملاً مشهود در ساختار جایگاه فعال ،مکانیسم و طراحی این دو آنزیم است. [٤٣]

در PON1 لوپهای H_1 و H_2 در تماس با اسکلت آنزیم یک جایگاه فعال کاملاً بسته‌ای را ایجاد می‌کنند این در صورتی است که در اغلب ساختارهای β – پروانه ای یک جایگاه فعال باز قابل

شناسایی است و همین موضوع می‌تواند توضیح دهنده مکانیسم متفاوت PON1 باشد. فرم حل شده با دترجنت PON1 دیمر وبیشتر الیگومر است، اما در کریستال به ازای هر واحد تقارن یک مولکول موجود است و به عبارتی درکریستالیزاسیون فرم مونومرآنزیم دیده می شود. به نظر می‌رسد فرم الیگومر آنزیم در دترجنت، حاصل قلاب انداختن آنزیم در میسل‌های بیشتر HDL باشد [٤٨].

PON1 که در سلول های جانوران بیان می‌شود گلیکوزیله است [٥١١١٢] گلیکوزیلاسیون جهت فعالیت هیدرولیتکی آنزیم ضروری نمی باشد اما ممکن است در افزایش حلالیت و پایداری آن و همچنین در جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی به غشای سلول‌ها مهم باشد، ٤ ناحیه با پتانسیل – N گلیکوزیلاسیون در PON1 موجود است. دو موقعیت در ریشه های Asn227 وAsn270 در مرکز تونل پروانه، که غیرقابل حل شدن می باشندو دو موقعیت در ریشه های Asn253 Asn324، در سطح لوپ ها ،که به احتمال بیشترPON1در این دو موقعیت تحت گلیکوزیلاسیون قرارمی گیرد [٥٢-٥٣].

بررسی ساختار سه بعدی آنزیم می‌تواند دیدگاهی در مورد چگونگی عملکرد آنزیم در انتخاب سوبستراهای مختلف و به دنبال آن واکنشهای متفاوت بیان نماید. بررسی ها نشان می دهند که پلی مورفیسمهای تک نوکلئوتیدی (SNPs)[1] که در خانواده پاراکسوناز رایج می باشد (تا آنجایی که حدود SNPs٢٠٠ تنها در pon1 تشخیص داده شده است) می توانند هم در فعالیت و هم در پایداری آنزیم موثر باشند. در تمام خانواده پاراکسوناز، اسیدهای آمینه ناحیه مرکزی ساختار β-پروانه ای، دو کلسیم قرار گرفته در مرکز ساختار آنزیم، ریشه‌های متصل به کلسیم و ریشه‌هایی که با جفت هیستیدین در ارتباط می‌باشند کاملا حفظ شده می‌باشند. بنابراین خانواده آنزیمی به سه پروتئین کاملا مجزا تقسیم می شوند در حالی که ساختار جایگاه فعال و مکانیسم کاتالیتیکی کاملا یکسان و حفظ شده ای در آنها دیده میشود. به دنبال مطالعات صورت گرفته بر رV وی ساختار سه بعدی در پروتئینهای پاراکسوناز، مجموعه ١٦ اسیدآمینه ای شناسایی شده است که دیواره جایگاه فعال و اطراف آن را تشکیل میدهند وبنابراین در انتخاب سوبسترا نقش مهمی دارند که در زیرگروههای پاراکسوناز کاملا متفاوت و البته کاملا حفظ شده گزارش گردیده است و این می‌تواند کلید انتخاب سوبستراهای فیزیولوژیکی گوناگون باشد. علاوه براین ریشه های در خارج از جایگاه فعال دیده می-شود که در سه پروتئین کاملا متفاوت است از جمله Asn253 که یکی از موقعیتهای احتمالی گلیکوزیلاسیون در PON1 می باشد که دردو پروتئین دیگر کاملا از بین رفته است. این ریشه ها

1- *single-nucleotide polymorphism*

احتمالاً در فعالیتهایی به جز فعالیت هیدرولیز آنزیمها و جایگاه قرار گیری آنها نقش دارد (PON1 وPON3 بر روی ذره HDL و PON2 در بسیاری از بافتها قرار دارد) نظریه Michal harel و همکارانش بیان می‌کند هیدروفوبیسته سوبسترا عامل مهمی انتخاب سوبسترا در آنزیم است. که این نظریه با هیدروفوبیک و عمیق بودن جایگاه فعال مطابقت دارد. آنها معتقدند سوبستراهای ضعیف و قوی همگی با k_m مشابه متصل می‌شوند اما k_{cat} آنها متفاوت است. به عبارتی نحوه اتصال آنها به کلسیم متفاوت می باشد،چنانچه سوبستراهای ضعیف نسبت به سوبستراهای قوی در موقعیت نامناسبتری نسبت به ca_1 و ریشه های جایگاه فعال قرار می گیرند.

۱-۴-۳ جایگاه فعال آنزیم

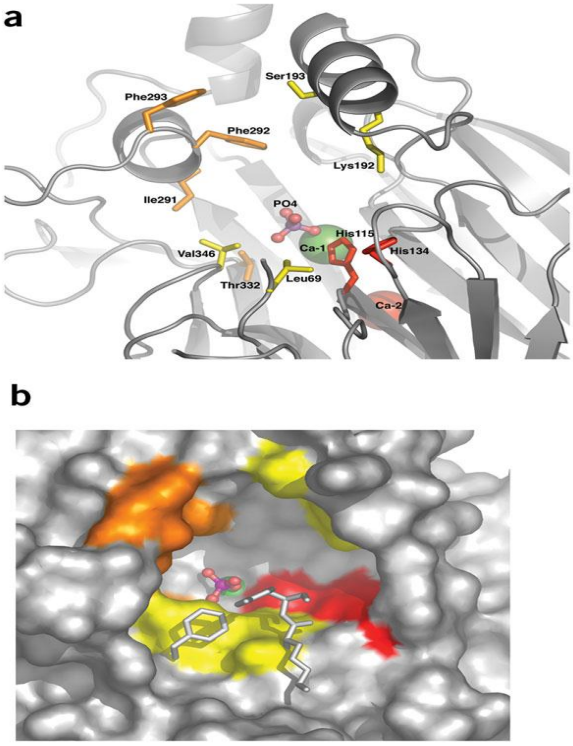
جهش در جایگاه خاص[۱] معمولی‌ترین روش مورد استفاده در تشخیص ریشه‌های جایگاه فعال آنزیم-ها می‌باشد. اگرچه با وجود تخریب ساختاری که دراین روش حاصل می شود نمی‌توان عدم فعالیت آنزیم به علت تغییر ریشه اسید آمینه را دلیل حضور آن در جایگاه فعال دانست[۵۳-۵٤]. محققان بعد از بررسی ترادف اسید آمینه PON1 در گونه‌های مختلف از جمله [۸]انسان ،موش،خرگوش ،رت، سگ و مرغ چندین ریشه اسید آمینه کاملا حفظ شده راشناسایی کردند [۵۵]و به این ترتیب کتابخانه ژنی از PON1 ترجیحا با تغییر در ریشه‌های حفظ شده تهیه و در وکتورهای گوناگون (باکتریایی و پلاسمید) کلون گردید. کلنی‌ها در محیط کشت آگارز رشد کرده و هر کدام با سوبستراهای آنزیم (پاراکسون، فنیل استات، دیازوکسون وکلروپیریفیوز اکسین) از نظر سطح فعالیت مورد بررسی قرار گرفت [٥٦].

اسپارتیک اسید/گلوتامیک اسید: موتان‌های ایجاد شده در اثر جایگزینی آلانین به جای ریشه‌های اسپارتیک اسید/گلوتامیک اسید در موقعیت های 32, 48, 88 ,107, 121 و 273 در K_{cat} آنزیم کاهش ایجاد می‌کنند، اما تاثیری بر فعالیت آن ندارند. در عوض موتان‌های اسپارتیک53 (D53) و گلوتامیک 52 (E52) کاهش قابل چشمگیری در فعالیت آنزیم نشان می دهند.

باتوجه به لیگاندهای مشخص شده برایca1 که با مولکول‌های آب، اکسیژن یون فسفات و ریشه های آسپارتات، آسپارژین وگلوتامین برقرار میکند به نظر می‌رسد حضور ریشه های اسید اسپارتیک و اسیدگلوتامیک در جایگاه فعال آنزیم PON1 ضروری باشد [٥٦].

1- 1-[۸] Site-directed mutagenesis[۸]

هیستیدین: موتانهای H250 , H 245 , H160 وH347 حدود 10-60% فعالیت تایپ وحشی آنزیم را دارند به ویژه برای سوبستراهای ارگانو فسفاته اما نکته مورد توجه کاهش فعالیت آنزیم در موتانهای H115, H134, H155, H242 میباشد. تاثیر در پایداری و حفظ جایگاه اتصال در آنزیم توسط این ریشه های هیستیدین و همچین نقش فعال در مکانیسم کاتالیتیکی از جمله نقش های مهم آنها شمرده می شود [٥٦].تریپتوفان: آنچنان که موتان W280 باعث کاهش فعالیت آنزیم میگردد موتانهای ایجاد شده در موقعیت های 193و201 نمیتوانند این کاهش را ایجاد نمایند [٥٦].



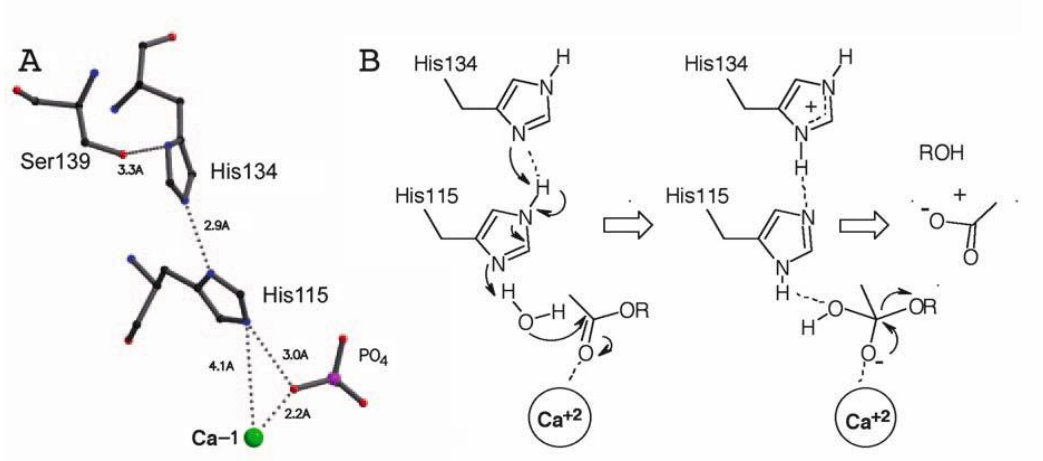
شکل۱-۸جایگاه فعال PON1

۱-۴-۴ مکانیسم کاتالیتیکی آنزیم

به صورت کلی در آنزیمهای هیدرولیتیک، اسید آمینه هیستیدین به عنوان یک باز عمل می کند که با دپروتونه کردن مولکول آب و تولیدیون هیدروکسید حمله کننده باعث هیدرولیز میشود. جهت بررسی مکانیسم کاتالیتیکیPON1 ابتدا فعالیت کاتالیتیکی آنزیمهای مشابه آن مورد مطالعه قرار گرفت. درفسفولیپاز A2 (PLA2)هیدروکسیدحمله کننده با جفت هیستیدین-آسپارژین ایجاد میشود که ایمیدازول به عنوان یک باز، مولکول آب را دپروتونه می‌کند و دکربوکسیلات آسپارتات خاصیت

بازی ایمیدازول را بامکانیسم پروتون-شاتل افزایش میدهد. نزدیکترین نیتروژن ایمیدازول از کلسیم کاتالیتیکی A° ۶/۳ فاصله دارد. دو مولکول آب نقش مهمی را در کاتالیز ایفا می‌کنند. مولکول آب حمله کننده که بعد از دپروتونه شدن به سوبسترا حمله می‌کند و دیگری مولکول آب کاتالیتیکی است که به عنوان حدواسط بین مولکول حمله کننده و باز هیستیدین عمل مینماید.

همچنین جایگاه فعال DFPase شامل جفت هیستیدین-گلوتامین است که نیتروژن هیستیدین باکلسیم کاتالیتیکی A° ۷.۲A فاصله دارد. مطالعات بیشتر در ساختار rePON1 نشان داد که در جایگاه فعال آنزیم هم مانند PLA2 جفت His184-Asp183 وجود دارد. His184 حدود A°۱۱ از ca1 فاصله دارد. علاوه بر این جفت His285-Asp269 نیز در جایگاه فعال آنزیم قرارگرفته است. Asp269 با ca1 لیگاند است و His285 حدود $\AA$ ۸ از ca1 و $\AA$۵ از نزدیکترین اکسیژن فسفات فاصله دارد. پیشنهادات اولیه حاکی از حضور جفت هیستیدین-آسپارژین در مکانیسم کاتالتیکی PON1 بود. اما بررسی های بیشتر منجربه شناسایی جفت هیستیدین-هیستیدین گردید که هم نزیک Ca1 و هم یون فسفات بود. طبق این مطالعه پیشنهاد شد His115 (نزدیکترین نیتروژن آن تنها ca_1با$\AA$٤.١ فاصله دارد) به عنوان باز عمومی عمل کرده و در دپروتونه شدن مولکول آب نقش دارد. و یون هیدروکسید حمله کننده تولید مینماید در حالی که His134 با مکانیسم پروتون-شاتل باعث افزایش خاصیت بازی His115 می‌گردد.



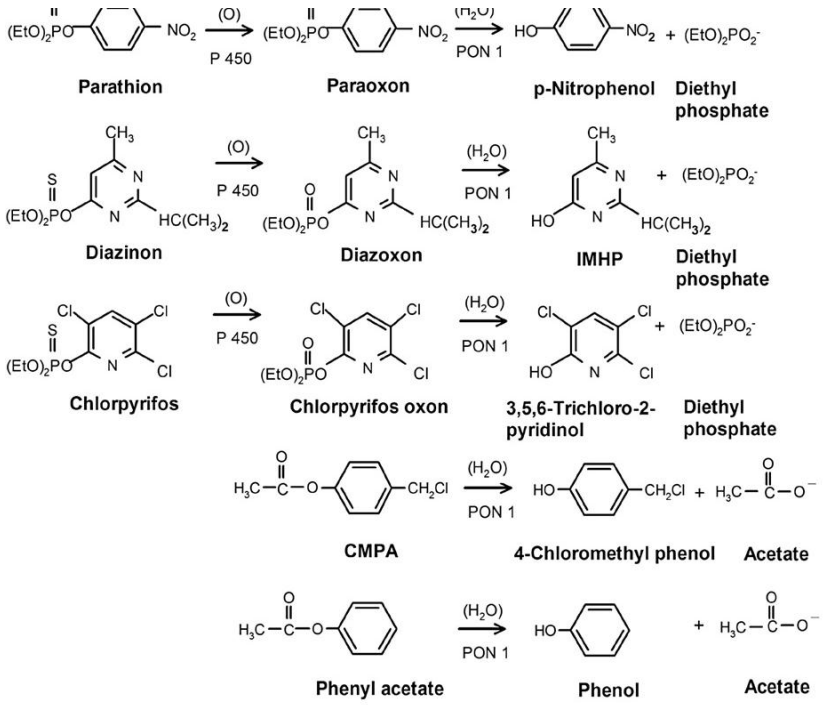
شکل۱-۹مکانیسم کاتالیتیکیPON1 . جایگاه کاتالیتیکی شامل ca_1، یون فسفات درقسمت ته جایگاه و جفت His115-His134 می باشد. مکانیسم عمل کاتالیتیکی PON1 بر روی یک استر مانند فنیل استات نشان داده شده است. اولین مرحله شامل دپروتونه شدن مولکول آب توسط جفت هیستیدین- هیستیدین و تولید آنیون هیدروکسید می باشد. که به کربونیل استر حمله میکند و یک حدواسط اکسی آنیونیک چهاروجهی ایجاد می نماید. این حدواسط سپس شکسته میشود به یک مولکول استر و یک فنول.

۱-۴-۵ سوبستراهای آنزیم

پاراکسون اولین سوبسترای شناسایی شده برای آنزیم پاراکسوناز-۱ می‌باشد که بر همین اساس نامگذاری گردید. پاراکسوناز-۱ از این جهت که یک آنزیم چند سوبسترایی چند فعالیتی می باشد مورد توجه قرار دارد.

لاکتونها، تیولاکتون ها، کربنات ها، استرو فسفوتیواسترها از جمله سوبستراهای شناسایی شده برای آنزیم هستند. اگرچه تاکنون سوبسترای فیزیولوژیکی برای PON1 شناخته نشده است ،برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که برخی لاکتون‌ها، فسفولیپیدهای خاص اکسید شده و محصولات آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک اکسیداسیون آرشیدونیک و هم چنین N–اسیل هموسرین لاکتون (که از سیگنالهای حساس شده در باکتری‌های پاتوژنیک می‌باشند) از جمله سوبستراهای طبیعی پاراکسوناز-۱ به شمار می‌روند [۵۹]بررسی‌های اخیر پیشنهاد می‌کند که فعالیت هیدرولیتیکی لاکتون‌ها (استرهای حلقوی) فعالیت اصلیPON1 می‌باشد. مطالعات ساختاری-فعالیتی نشان می‌دهد که لاکتون‌ها سوبسترای ترجیحی برای آنزیم جهت هیدرولیز می‌باشند حضور حفظ شده این فعالیت در تمام پروتئین های پاراکسوناز و در طول تکامل می تواند موید این موضوع باشد [۶۰] .

همچنین به اثبات رسیده است که PON1 سرم انسان می‌تواند ارگانوفسفاته‌ها، شامل حشره‌کش‌ها ،گازهای عصبی و هم چنین تعدادی از استرهای اسید کربوکسیک آروماتیک را هیدرولیز نماید [۶۱]. PON1 یک دامنه ی وسیعی از فعالیت‌های هیدرولیتکی شامل لاکتونازی، آریل استرازی و فسفوتیو استراری از خود نشان می دهد. جهت تعیین فعالیت PON1 در *invitro* معمولا از سوبستراهای اگزوژن مانند پاراکسون، فنیل استات و چندین لاکتون استفاده می نمایند.



شکل ۱-۱۰سوبستراهای PON1

۱- ۵ تنظیم PON1

پاراکسونازا ازجمله آنزیم هایی است که هم فاکتورهای ژنتیکی و هم فاکتورهای محیطی بر فعالیت آن موثر می باشند [۶۲-۶۳].

۱-۵-۱ تنظیم**PON1** با ترکیبات خارجی

انواع یون های فلزی و داروها بامهار یا فعال سازی آنزیم قادر به تنظیم آن می باشند. PON1 یک آنزیم کاملاً وابسته به کلسیم است که با مهار توسط EDTA این موضوع اثبات می گردد. کاتیون هایی مانند باریوم، لانتانوم، مس، روی و جیوه باعث مهار آنزیم خالص شده از کبد موش و انسان میگردند[٦٤]. به نظر می‌رسد پلی مورفیسم PON1 Q192 نسبت به مهار یون های فلزی حساسیت کمتری داشته باشند. اگر چه منگنز، کبالت، کادمیوم و نیکل بالاترین اثر مهاری بر آنزیم را در این افراد دارند [٦٥]. جیوه و مس با اثر بر گروه تیول آزاد بر روی ریشه cys285 به عنوان مولکول هدف اثر مهاری خود را اعمال می کند [٦٤-٦٥]. بیشترین پتانسیل مهاری بر فعالیت PON1 در پلی موفیسم PON1 R192 توسط یون‌های کادمیوم، آهن، روی و جیوه در غلظت 100mM نشان داده شده است [٦٥].

علی رغم مطالعات مهاری که در invitro صورت گرفته است، مسمومیت موش با کادمیوم، متیل جیوه و یا آهن باعث افزایش غلظت فلز سرم بیشتر از 1mM می‌گردد در حالی که اثری بر تغییر فعالیتPON1 در سرم و کبد ندارد [٦٦]. بنابراین اثرات مهاری مشاهده در invitro نمی‌تواند مدرکی برای در معرض قرار

گرفتن در *invivo* گردد .شاید وجود پروتئین‌های بانده شونده با فلزات در پلاسما به اندازه کافی PON1 را از مهار حفاظت می نماید.

۱-۵-۲ داروها

اغلب مطالعات بر روی تنظیم PON1 با ترکیبات دارویی بر روی داروهای کاهنده چربی متمرکز است. در معرض قرار گرفتن *invitro* سلول های کبدی انسان (HuH7) با فلاواستاتین[۱], سیموااستاتین[۲] و پراوااستاتین[۳] (با غلظت ۱۰۰-۱۰ میکرومولار) یک کاهش ۵۰-۲۵ درصدی در فعالیت PON1 در محیط کشت نشان می دهد همچنین بیان آنزیم با اثر مهاری بر تولید mRNA آن کاهش می یابد [٦٧]. روزانه ۲۰میلی گرم فلاواستاتین در رت به مدت ۳ هفته باعث کاهش فعالیت PON1 کبدی و پلاسما می‌گردد، در حالی که کاهش دوز تا حدود ۲mg تنها بر فعالیت آنزیم کبدی اثر می‌گذارد. نتایج به دست آمده از بیماران درمان شده با انواع استاتین ها کاملاً عکس این موضوع می باشد .مصرف آترواستاتین[٤]، موااستاتین[٥]، لوواستاتین[٦] باعث افزایش فعالیت آنزیم هم در کبد و هم در پلاسما می‌شود. کاهش سطح استرسهای اکسیدایتو یکی دیگر از اثرات ترکیبات[۹]دارویی در انسان می باشد [٦٨-٦٩-٧٠]. مجاورت لیپوپروتئین‌های ایزوله شده از سرم انسان با آترواستاتین با دوز ۵۰-۵ mM فعالیت PON1 وابسته به HDL را افزایش می‌دهد [٧١].

1- fluvastatin
2- simvastatin
3- pravastatin
4- atherostatin
5- mevastatin
6- lovastatin

تماس موالونات[1] با سلول های کبدی انسان در محیط کشت با اثر افزایشی فعالیت و تولید mRNA PON1 همراه می‌باشد. هم چنین این اثر در سلول های مشابه با فنوفیبریک اسید[2] با غلظت ۲۵۰mM قابل مشاهده است. این دارو حدود ۵۰ درصد فعالیت[10] آنزیم و ۳۰ درصد بیان mRNA آن را افزایش می دهدکه به نظر می رسد با القا فعالیت پروموتورژن اثر فعال سازی خود را اعمال می-نماید[۷۲]. علاوه بر این نتایج بدست آمده، گزارشاتی نیز موجود می باشد که سطح فعالیت آنزیم در بیماران درمان شده با سیپروفیبرات[3] و بزافیبرات[4] هیچ تغییری نکرده است[۷۳-۷٤].

در مصرف کنندگان آسپیرین افزایش چشمگیر و قابل مشاهده‌ای در فعالیت و غلظت آنزیم در سرم دیده شده است. که این ممکن است به علت اثر ضد التهابی آسپیرین باشد. سطح PON1 در سرم در پاسخ به التهاب در مدل های حیوانی کاهش می یابد آسپیرین ممکن است به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل نماید [۷۵].

گلوکورتیکوئیدهای ضد التهابی مانند دگزامتازون[5](1mM) باعث افزایش ۸ برابری mRNA در سلول های کبد موش (Hepa cell)در*invitro* و هم چنین در *invivo* می گردد [۷٦].

آنتی بیوتیک‌ها به عنوان دسته بزرگی از داروها که در انواع آلودگی‌های میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، دسته‌ای دیگری از داروها مورد بررسی بر سطح فعالیت و غلظت آنزیم پاراکسوناز می‌باشند. بررسی اثر آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت *invitro* با آنزیم خالص شده و*invivo* در موش، بیانگر نقش مهاری آن‌ها با غلظت های مشخص بر سطح فعالیت آنزیم سرمی و کبدی می باشد.

جنتا مایسین سولفات[6]، سفازولین سدیم[7]، سدیم آمپی سیلین[8]، سیپروفلاکسامین[9]، کلیندامایسین فسفات[10]، سولفانامید[11]، پنی سیلین[12] و ماکرولید[13] از جمله داروهایی می باشند که اثر مهاری آنها به اثبات رسیده است [۷۷-۷۸].

۱۰

1- mevalonate
2- phenofibric acid
3- ciprofibrate
4- bezafibrate
5- *Dexamethasone*
6- *Gentamicin Sulfate*
7- *cefazolin sodium*
8- *ampicillin sodium*
9- *Ciprofloxacin*
10- *Clindamycin phosphate*
11- *sulfanamid*
12- *Penicillin*
13- *macrolide*