

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität München

Kommissarische Leitung Prof. Dr. med. P. Eyer

**Über die Phosphoryloxim-Hydrolase des Plasmas,**  
ein Enzym, das die Effizienz der Oximtherapie bei  
Organophosphat-Vergiftungen erheblich steigert

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Daniela Vera Kiderlen

aus Regensburg

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. P. Eyer
2. Berichterstatter	Prof. Dr. S. Werner
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. P. Lohse Prof. Dr. L. von Meyer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	15.06.2004

## **Danksagung**

Meinem verehrten Lehrer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Eyer danke ich ganz besonders herzlich und aufrichtig, nicht nur für die Möglichkeit, das überaus spannende und unerschöpfliche Thema aus den verschiedensten Blickwinkeln heraus bearbeiten zu dürfen, sondern auch für das große Vertrauen und die jederzeit bereitwillig geleistete, professionelle und wohlwollende Hilfestellung, die er mir im Laufe meiner Dissertationsarbeit zuteil werden ließ! Seine Begeisterung für die Wissenschaft war regelrecht ansteckend!

Das Voranschreiten dieser Arbeit wurde aber auch erst durch die Unterstützung einiger Personen möglich, bei denen ich mich vielmals bedanken möchte:

Herrn Dr. F. Worek von der Sanitätsakademie der Bundeswehr für seine wissenschaftliche und freundschaftliche Hilfsbereitschaft, seine Anregungen und für die mit Soman behandelten Plasmaproben. Den Herren Prof. Dr. L. Szinicz, Dr. H. Thiermann und PD Dr. Dr. H. Mückter danke ich für ihre Bereitschaft, wissenschaftliche Fragen zu diskutieren und für so manchen Botendienst. Herr Dr. R. Klimmek unterstützte mich mit experimentellen Ansätzen. Dank Herrn Prof. G. Sabbioni war die Aufnahme von Massenspektren möglich. Herr Prof. P. Masson vom Centre de Recherches du Service de Santé des Armées in La Tronche Cedex versorgte mich mit isolierter, gereinigter humaner Paraoxonase.

Mein besonderer Dank gilt auch unserem "Engel" Frau Dressnandt, sie erleichterte nicht nur die Beschaffung von Literatur erheblich!

Meinen Laborkollegen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eyer danke ich sehr herzlich für die kollegiale Zusammenarbeit und die freundschaftliche, fröhliche Atmosphäre, die ich in allerbesten Erinnerung behalten werde.

Schließlich danke ich noch Peter für seine ausdauernde Unterstützung und dafür, meinen Blick gelegentlich wieder auch auf andere schöne Dinge gelenkt zu haben.

Meinen lieben Eltern und meiner Schwester  
in Dankbarkeit

# INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
2	MATERIAL UND METHODEN .....	7
2.1	Materialien .....	7
2.2	Häufig verwendete Geräte, Labormaterialien und Meßanlagen.....	9
2.2.1	Geräte und Labormaterialien .....	9
2.2.2	UV/VIS-Photometrie .....	10
2.2.3	Massenspektrometrie .....	11
2.3	Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate.....	11
2.3.1	Pufferlösungen .....	11
2.3.2	Reagenzien.....	12
2.3.3	Enzympräparate .....	14
2.4	Methoden .....	18
2.4.1	Enzymatische Bestimmungen.....	18
	Kolorimetrische Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach Ellman.....	18
	Bestimmung der Reaktivierungskinetiken .....	19
	Bestimmung der Reaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter AChE.....	20
	Bestimmung der maximalen Reaktivierbarkeit und der Halbwertszeiten .....	21
	Bestimmung der Alterung und Spontanreaktivierung bei Paraoxon-methyl- und DFP-inhibierter EryAChE.....	22
	Bestimmung der Arylesterase-Aktivität.....	23
	Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität.....	23
	Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Soman-behandeltem Plasma (Methode durch AChE-Reaktivierung) .....	23
	Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Soman-behandeltem Plasma (Methode durch Quantifizierung des entstandenen Obidoxim) ...	24
	Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von $Tb^{3+}$ .....	24
	Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von N-Bromsuccinimid (NBS).....	25
	Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Anwesenheit von Carbodiimiden .....	26
	Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von Phenylmercuriacetat (PMA) und p-Hydroxymercuribenzoat (p-OHMB) .....	26
	Kinetik der Hemmung humaner EryAChE durch Paraoxon-ethyl und DEP-Obidoxim.....	27

2.4.2	Generierung und Isolierung von Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) und seinen Abbauprodukten .....	29
	DEP-Obidoxim.....	29
	Obidoxim-Mononitril .....	29
	Obidoxim-Monopyridon .....	29
2.4.3	Quantifizierung von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten.....	30
	DEP-Obidoxim.....	30
	Obidoxim .....	30
	Obidoxim-Monopyridon und Obidoxim-Mononitril .....	31
	Cyanid.....	31
2.4.4	HPLC-Methoden.....	32
2.4.5	Weitere Methoden.....	33
	Hämoglobinbestimmung .....	33
	Proteinbestimmung.....	34
	Ultrafiltration.....	34
	Ca <sup>2+</sup> -Entfernung durch Chelex-100.....	34
3	ERGEBNISSE .....	35
3.1	Einfluß des Plasmas auf die Reaktivierbarkeit humaner Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE .....	37
3.1.1	Welche Rolle spielt BChE bei der Reaktivierung? .....	37
3.1.2	Einfluß von Albumin auf die Reaktivierbarkeit .....	39
3.1.3	Charakterisierung des Plasma-Bestandteils mit DEP-Obidoxim-inaktivierender Fähigkeit.....	39
3.2	Isolierung der POX-Hydrolase .....	44
3.3	Auswirkung modifizierender Reagenzien auf die Enzymaktivitäten .....	45
3.3.1	Auswirkung von EDTA und verschiedener Kationen.....	46
3.3.2	Auswirkungen von Tb <sup>3+</sup> .....	49
3.3.3	Einfluß von N-Bromsuccinimid (NBS).....	50
3.3.4	Einfluß von Carbodiimiden .....	51
3.3.5	Einfluß von Phenylmercuriacetat (PMA) und p-Hydroxymercuribenzoat (p-OHMB).....	52
3.4	Identität der Paraoxonase/Arylesterase und der POX-Hydrolase?.....	54
3.5	Substratspezifität der POX-Hydrolase.....	56
3.6	Systeme, bei denen Bildung von DEP-Obidoxim beobachtet wurde.....	64
3.7	Optimierung der Bildung von DEP-Obidoxim.....	65

3.8	Welchem Schicksal unterliegt DEP-Obidoxim? .....	67
3.9	Charakterisierung von DEP-Obidoxim und seiner Zerfallsprodukte ...	68
3.9.1	Quantifizierung von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten.....	73
3.9.2	Einflüsse auf das Zerfallsmuster von DEP-Obidoxim .....	74
3.9.3	Wirkungen von DEP-Obidoxim und seiner Zerfallsprodukte .....	76
3.10	Versuche mit gereinigter humaner Paraoxonase (hPON), Typ AA .....	80
3.11	POX-Hydrolase in verschiedenen Spezies .....	83
4	DISKUSSION .....	86
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	102
6	LITERATUR.....	105
7	ANHANG .....	117
7.1	Massenspektrometrische Analyse im ESI <sup>+</sup> - Modus.....	117
7.2	Einfluß von Licht auf die Stabilität von DTNB .....	126

## Abkürzungen

AChE	Acetylcholinesterase
ASCh	Acetylthiocholin
BChE	Butyrylcholinesterase
BSCh	Butyrylthiocholin
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethyl
DEP-Obidoxim	Mono(Diethyl)phosphoryl-Obidoxim
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DIP-Obidoxim	Diisopropylphosphoryl-Obidoxim
DMP-Obidoxim	Dimethylphosphoryl-Obidoxim
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
E	freies Enzym
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropylcarbodiimid)
EP	phosphorylierte Acetylcholinesterase
EryAChE	Erythrozytenacetylcholinesterase
ESI	Electrospray Ionisation
HDL	High Density Lipoprotein
HI-6	1-(2-Hydroximinomethyl-1-pyridinium)-3-(4-carbamoyl-1-pyridinium)-2-oxapropen-dichlorid
HLö 7	1-[[[4-(Aminocarbonyl)pyridinio]-methoxy]-methyl]-2,4-bis[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dimethansulfonat
hPON	humane Paraoxonase
$K_D$	Dissoziationskonstante
$k_{obs}$	scheinbare Reaktionskonstante
$k_r$	Reaktivierungskonstante 1. Ordnung
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
NBS	N-Bromsuccinimid
OX	Oxim
4-PAO	Pyridin-4-aldoxim
PMA	Phenylmercuriacetat
p-OHMB	p-Hydroxymercuriacetat
PON1	Paraoxonase
POX	Phosphyloxim
PP	Phosphatpuffer

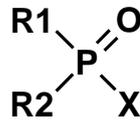
PTE	Phosphotriesterase
RT	Raumtemperatur
TMB-4	1,1`-Trimethylenbis-[4-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dibromid]
TNB <sup>-</sup>	5-Thio-2-nitrobenzoat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## 1 EINLEITUNG

Weltweit werden heute ca. 100 Verbindungen aus der chemischen Substanzgruppe der Phosphorsäureester, kurz Organophosphate genannt, als Pflanzenschutzmittel eingesetzt. E605 mit seinem aktiven Metaboliten Paraoxon-ethyl ist wohl das bekannteste aus dieser Klasse. Gegenüber den früher eingesetzten Organochlor-Verbindungen, wie z.B. DDT, haben die Insektizide auf Organophosphatbasis den Vorteil, daß sie rasch abgebaut werden und sich nicht in der Nahrungskette anreichern. Sie sind gegen ein breites Spektrum an Schädlingen wirksam, beinhalten allerdings auch für den Menschen ein erheblich akut-toxisches Risiko. Die Zahl der Vergiftungsfälle weltweit ist erschreckend hoch; die WHO hat die Vergiftungen durch Organophosphatpestizide 1990 weltweit auf 3 Millionen pro Jahr geschätzt, die Zahl der Todesopfer wird mit insgesamt 200.000 beziffert. Zum einen handelt es sich hierbei um Suizidkasuistiken, deren Anteil mit z.B. 80% in Sri Lanka einen hohen Stellenwert einnimmt (Sri Lankan Ministry of Health 2001). Andererseits wird von deutlich mehr accidentellen Vergiftungen oder chronischer Exposition mit entsprechend leichter verlaufender Symptomatik berichtet (Brown et al. 1989, Innes et al. 1990). Noch sehr viel toxischer als die Insektizide auf Organophosphatbasis sind die Nervenkampfstoffe wie Tabun, Sarin oder Soman, deren Einsatz im Iran-Irak-Konflikt oder bei den Anschlägen auf die Tokyoter U-Bahn (Suzuki et al. 1995, Nozaki et al. 1995, Nagao et al. 1997) als Beispiele für terroristische Aktivitäten aus jüngster Vergangenheit stehen.

Die Wirkformen der insektiziden Pflanzenschutzmittel und Nerven-kampfstoffe basieren in ihrem chemischen Bauplan auf der von G. Schrader 1937 aufgestellten "Schraderschen Acyl-Formel" (**Abb. 1-1**).

Bei den Insektiziden handelt es sich um Ester oder Amide der Phosphorsäure, während die Nervenkampfstoffe Derivate der Phosphonsäure darstellen.



**R1 und R2 = Alkyl-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Amino-Gruppen**

**X= Acylrest = leicht abspaltbare Halogen-, Cyano-, Phenoxy- oder Thiol-Gruppe**

**Abb. 1-1** Schradersche Acyl-Formel

Die wohl wichtigste Reaktion bei Vergiftungen mit Organophosphaten ist die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE). Infolgedessen kann der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) nicht mehr abgebaut werden und es kommt zu einer zentral und peripher ausgeprägten, cholinergen Überreaktion mit lebensbedrohlichen Vergiftungssymptomen wie Bronchorrhoe, Bronchokonstriktion, Bradykardie, Muskelfaszikulationen, Benommenheit bis hin zur zentralen Krampfauslösung und Atemlähmung; Miosis, Kopf- und Augenschmerz, Salivation, Rhinorrhoe und Schwitzen stellen in diesem Zusammenhang die weniger gefährlichen Symptome dar.

Der Mechanismus der Inhibierung besteht in einer irreversiblen Phosphorylierung (als Oberbegriff für Phosphorylierung, Phosphonylierung oder Phosphinylierung) der Serin-Hydroxylgruppe im aktiven Zentrum der AChE. Die Therapie besteht zum einen in der Gabe des kompetitiven Muscarin-Rezeptor-Antagonisten Atropin, der allerdings an den ACh-Rezeptoren vom Nicotin-Typ im Gehirn, den sympathischen Ganglien und der neuromuskulären Endplatte versagt. Für diesen

Angriffsort stehen die kausal wirkenden Oxime als zweites Standbein in der Therapie zur Verfügung.

Oxime sind in der Lage, die phosphorylierte AChE nucleophil anzugreifen, die Phosphylbindung zu spalten und damit das Enzym zu reaktivieren. Sie imitieren und beschleunigen dadurch den Vorgang der Spontanreaktivierung, bei der es sich um die spontane hydrolytische Abspaltung des Phosphatrestes von der Serin-Hydroxylgruppe handelt. Die Spontanreaktivierungsrate hängt sehr von der Art des eingesetzten Organophosphats ab; ist kein Überschuß an freiem Gift vorhanden, liegt die Halbwertszeit für diethylphosphorylierte AChE, wie sie z.B. nach Exposition gegenüber Paraoxon-ethyl vorliegt, bei pH 7,4 und 37 °C bei rund 30 Stunden (Worek et al. 1997), während für dimethylphosphorylierte AChE, z.B. nach Metasystox-Ingestion, bereits nach 0,7 Stunden die Hälfte des Enzyms wieder frei vorliegt (Worek et al. 1999a). Keinerlei Spontanreaktivierung findet vermutlich bei der Vergiftung mit einem N-Alkylphosphoramidat wie Isofenphos statt (Johnson et al. 2000).

Allerdings wird der positive Effekt der schnellen Spontanreaktivierung bei Dimethylphosphoryl-AChE von einer hohen Alterungsrate (Halbwertszeit 4 Stunden) überdeckt. Hierunter versteht man den Prozeß der stufenweise ablaufenden Dealkylierung der phosphorylierten AChE, in dessen Folge das Enzym unter keinen Umständen mehr reaktiviert werden kann, gealtert ist und erst wieder neu generiert werden muß.

Die Rekonvaleszenz eines akut vergifteten Patienten wird demnach stark von der Art und Menge des vorliegenden Giftes beeinflusst. Besonders schwierig gestaltet sich die Behandlung von Nervenkampfstoff-exponierten Patienten, für die u.a. aufgrund teilweise sehr rascher Alterung (z.B. Halbwertszeit bei Soman 3 Minuten) ein Antidot schnell verfügbar sein muß. Je früher daher die Therapie mit dem richtigen

Oxim begonnen wird, desto effektiver kann eine Reaktivierung erreicht und die Alterung verhindert werden.

Bei dem Reaktivierungs-Vorgang durch **Oxime (OX)** bilden sich, wie aus **Schema 1-1** ersichtlich, zum einen aus dem **Organophosphat-gehemmten Enzym (EP)** das wieder **aktive Enzym (E)**, zum anderen **Phosphyloxime (POX)** in äquimolarer Konzentration (Phosphyloxim als Oberbegriff für Phosphoryl- bzw. Phosphonyl- und Phosphinyloxime in Abhängigkeit des jeweils eingesetzten Organophosphats). (Wilson & Ginsburg 1955, Eyer 1996).

### **Schema 1-1**



Phosphyloxime selbst sind jedoch als hochpotente Cholinesterase-Hemmstoffe anzusehen, deren Toxizität sogar um 1 bis 2 Größenordnungen höher eingestuft wird als die der zugehörigen Organophosphate. (Hackley et al. 1959, Harvey et al. 1986, de Jong & Ceulen 1978, Lamb et al. 1964, Nenner 1974, Schoene 1973).

Eine Identifizierung von POX gelang bisher größtenteils auf synthetischem Wege (Becker et al. 1997, Green & Saville 1956, Hackley et al. 1959, Leader et al. 1999, Portmann et al. 1991). Allerdings bestätigen zahlreiche Daten, daß POX auch in Reaktivierungsansätzen entsteht (Luo et al. 1999).

In-vitro-Experimente, mit denen die Wirksamkeit von Oximen untersucht wird, werden normalerweise mit geringen Konzentrationen an Organophosphat-inhibierter Acetylcholinesterase durchgeführt (0,01-0,1 nM). Wie aus **Schema 1-1** ersichtlich, verläuft die Rückreaktion nach einer Reaktion 2. Ordnung mit äquimolaren Mengen an stabilem

Phosphyloxim und reaktiviertem Enzym, die Geschwindigkeit ist daher dem Quadrat der freien Enzymkonzentration proportional; das Gleichgewicht liegt im Falle von geringer Konzentration an inhibierter AChE auf der rechten Seite, da nur sehr geringe Konzentrationen an reaktiviertem Enzym und äquimolaren POX gebildet werden. Eine Reinhibierung durch Phosphyloxim tritt daher mit steigender Verdünnung in den Hintergrund. Geht man allerdings von physiologischen Enzymkonzentrationen aus, wie sie an der cholinergen Synapse (1 nM) oder im Blut (3 nM) (Lockridge & Masson 2000) vorliegen, fällt die Rückreaktion stärker ins Gewicht, ein geringerer Reaktivierungseffekt ist zu erwarten. Um so überraschender war die Beobachtung, daß bei Patienten mit einer Insektizidvergiftung die Erythrozyten-Acetylcholinesterase (EryAChE), durch Obidoxim in vivo sehr gut reaktiviert werden konnte (Thiermann et al. 1997). Da die EryAChE einen sehr guten Surrogatparameter für die Funktion der Endplatten-Acetylcholinesterase und der neuromuskulären Transmission darstellt (Eyer et al. 2000), dem eigentlich wichtigen Kriterium im Verlauf einer Organophosphatintoxikation, nehmen diese Befunde einen hohen Stellenwert für die Beurteilung des Therapieerfolges ein.

Was steckt hinter diesen voneinander abweichenden Beobachtungen? Muß man hier die Übertragbarkeit von Erkenntnissen, die aus In-vitro-Experimenten gewonnen wurden, auf die In-vivo-Situation in Frage stellen? Oder hat sich hier die Natur etwas einfallen lassen, von dessen Notwendigkeit sie eigentlich nichts gewußt haben konnte? Schließlich ist der Kontakt mit Phosphyloximen bzw. primär mit insektiziden Organophosphaten oder gar Nervenkampfstoffen sicherlich nicht in der Evolution vorgesehen gewesen.

Die vorgelegte Arbeit soll einen Einblick in die vielfältigen Abläufe gewähren, die bei der Beurteilung von AChE-Reaktivierungsvorgängen zu berücksichtigen sind.

## 2 MATERIAL und METHODEN

### 2.1 Materialien

Von der Firma **Sigma** (Deisenhofen, Deutschland) wurden bezogen:

Acetylthiocholin Iodid (**ASCh**), S-Butyrylthiocholin Iodid (**BSCh**), 5,5`-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (**DTNB**), Acetylcholinesterase vom Zitteraal (lösliche **AChE**, wäßrige Lösung, Typ III; 950 units/mg Protein EC 3.1.1.7), humane und equine Butyrylcholinesterase (**BChE**, EC 3.1.1.8), **Phenylacetat**, **Albumin** human rein (99%), **Albumin** human (Cohn Fr.V), **Rinderalbumin** (Cohn Fr.V), Diisopropylfluorophosphat (**DFP**), **Triton X-100**, 3-[Morpholino]propansulfonsäure (**MOPS**), 2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure (**MES**), N-Bromsuccinimid (**NBS**), N,N`-Dicyclohexylcarbodiimid (**DCC**), 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid (**EDC**), **Cibacron Blue 3GA Typ 3000**, **Ethopropazinhydrochlorid**, Pyridin-4-aldoxim (**4-PAO**), 1,1`-Trimethylenbis-(4-(hydroxyiminomethyl)pyridinium-dibromid (**TMB-4**), Isonicotinsäure (**INS**).

Von der Firma **Merck** (Darmstadt, Deutschland) stammten:

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** p.a., **NaCl** p.a., **Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O** p.a., **NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O** p.a., **NaOH** p.a., Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (**TRIS**), **CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O**, **Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O**, **NiSO<sub>4</sub>**, **ZnSO<sub>4</sub>**, **MgCl<sub>2</sub>**, **BaCl<sub>2</sub>**, **MnCl<sub>2</sub>**, **SrCl<sub>2</sub>**, **TbCl<sub>3</sub>**, **KCN**, **NaCN**, **Kaliumhexacyanoferrat(III)**, Barbitol-Na (**Veronal**), **Gelatine**, **NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>**, **HCl**, **K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>**, **H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>**, **Natriumdesoxycholat**, **Chloramin T**, **Ammoniak (25%)**, **Ameisensäure**, Trichloressigsäure (**TCA**), Titriplex<sup>®</sup> III (**EDTA**), Acetonitril (**CH<sub>3</sub>CN**) und Methanol (**MeOH**) für die HPLC (LiChrosolv<sup>®</sup>).

**Paraoxon-ethyl** und **Paraoxon-methyl** kamen von **Dr. Ehrenstorfer GmbH** (Augsburg, Deutschland).

Gereinigte humane Paraoxonase (**hPON**) vom **Typ AA** war ein Geschenk von Prof. P. Masson (La Tronche, Frankreich), **Obidoxim-dichlorid** stammte von **Duphar** (Amsterdam, Holland), **HI-6-dichlorid Monohydrat** war ein Geschenk von Dr. J. Clement, Defense Research Establishment Suffield (DRES), (Ralston, Alberta, Canada), **HLö 7-dimethansulfonat** wurde von Dr. J. Braxmeier (Döpschhofen, Deutschland) synthetisiert.

**Soman** (Pinacolylmethylphosphonylfluorid) wurde dankenswerterweise von der Sanitätsakademie der Bundeswehr zur Verfügung gestellt, bei der auch die Vorbehandlung der Plasmen vorgenommen wurde.

Meerschweinchen- und Rattenplasma wurde von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen, Cynomolgus- und Rhesus-Affenplasma vom Deutschen Primatenzentrum (Göttingen, Deutschland), Pavian- und Kaninchenplasma wurde von Dr. H.-P. Scheuber (Chirurgische Klinik und Poliklinik der LMU München, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie) zur Verfügung gestellt, Schweineplasma vom lokalen Schlachthof.

außerdem wurden verwendet:

**Glutathion, reduziert** von **Boehringer** (Mannheim, Deutschland), **Heparin Natrium** aus Schweinedarmmucosa (25.000 I.E./5ml) von **B. Braun** (Melsungen, Deutschland), **Aktivkohle** Norit A und p-Hydroxymercuribenzoessäure-Na-Salz (**p-OHMB**) von **Serva** (Heidelberg, Deutschland), Ionenpaarreagenzien **PIC B7<sup>®</sup>** (0,2 M 1-Heptansulfonsaures Natrium-Reagenz) und **PIC A<sup>®</sup> low UV** (0,25 M Tetrabutylammonium-Phosphat-Reagenz) von **Waters** (Milford, USA), **BCA-Protein-Reagenz** von **Pierce** (Rockford, Ill., U.S.A), **Essigsäure**

**99%** von **Riedel de Haen** (Seelze, Deutschland), **Chelex 100** Na-Form von **BioRad** (Hercules, California, U.S.A.), **Baker Bond Phase C18** for flash von **Baker** (Deventer, Holland), Phenylquecksilberacetat (**PMA**) von BDH (England), **Barbitursäure** von **EGA-Chemie** (Steinheim, Deutschland); das verwendete **Wasser** war demineralisiert und wurde anschließend doppelt quarzdestilliert (Aq. bidest.).

## 2.2 Häufig verwendete Geräte, Labormaterialien und Meßanlagen

### 2.2.1 Geräte und Labormaterialien

**Reaktionsgefäße** (Eppendorfcups): 0,5-2,0 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland); **Luftpolsterpipetten** und **Direktverdrängerpipetten** verschiedenen Volumens (Gilson Medical Electronics S. A., Villiers-le-Bel, Frankreich); **pH-Meßgerät**, Knick Digital-pH-Meter, Typ 647 (über Bachofer, Reutlingen, Deutschland); **pH-Elektrode**, Mettler Toledo Inlab 423 (Mettler Toledo, Deutschland); Kalibrierung mit Puffer pH 4,00 und Puffer pH 7,00 (Merck, Darmstadt, Deutschland); **Zentrifugen**: Hettich Zentrifuge Typ 2020, 15000 U/min (über Bachofer, Reutlingen, Deutschland); Eppendorf Zentrifuge Typ 3200 (Eppendorf-Gerätebau, Hamburg, Deutschland); Reagenzglaszentrifuge UJ0 (Heraeus Christ, Osterode, Deutschland); **Savant "Speed Vac"** Typ SC110 (über Bachofer, Reutlingen, Deutschland); **Membranfilter**: MF-Millipore Typ HA 0,45 µm und Fluoropore Membranfilter Typ HF 0,5 µm (Millipore S.A., Molsheim, Frankreich); **Dialyseschläuche**: Visking<sup>®</sup> dialysis tubing 20/32, 16 mm und 8/32, 6 mm (Serva, Heidelberg, Deutschland); **Fernbachfläschchen**, Gasvolumen 10 cm<sup>3</sup> (Bender & Hobein, München); **Polystyroleinmalküvetten**, makro

(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland); **Quarz-Küvetten**, mikro oder halbmikro (Hellma, Freiburg i. Br., Deutschland); **OMEGA Ultrafiltrationsmembranen** (Stamford, Conn., U.S.A)

**HPLC-Säulen** von E. Merck (Darmstadt, Deutschland):

LiChroCart 125-4 LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (125 mm x 4 mm ID; 5 µm);

LiChroCart 250-4 LiChrospher<sup>®</sup> 60 RP-select B (250 mm x 4 mm ID; 5 µm);

LiChroCart 125-3 Superspher<sup>®</sup> 60 RP-select B (125 mm x 3 mm ID; 4 µm)

### 2.2.2 UV/VIS-Photometrie

**Spektrophotometer**, Shimadzu UV 265 und UV 2401 PC (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg). **Zweiwellenlängenphotometer** ZFP 22 (Sigma, Berlin). **Flachbettstreiber Servogor 120** (BBC, Goerz, Metrawatt, Nürnberg, Deutschland)

### **High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

**DAD-System**, 1 1/2 Kopf-Pumpe mit Niederdruckgradientenformer, Merck Hitachi L-6200 intell. Pump (Merck, Darmstadt, Deutschland). Injektorventil Rheodyne 7125 mit 200 µl Probenschleife (Rheodyne, Cotati, USA); UV-VIS Diodenarray-Detektor Shimadzu SPD-M6A, Shimadzu-Detektorzelle, 10 mm, 8 µl (Shimadzu, Deutschland GmbH), gekoppelt mit einem Personal Computer Compaq ProLinea 4/66, und einem Laser-Drucker 4MP von Hewlett Packard, USA. Software Shimadzu Class LC-10 1992.

Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Retentionszeiten- und UV-Spektren-Vergleich authentischer Standards; die Quantifizierung der

Produkte über Peakintegrale nach Detektion mittels Diodenarray-Detektor.

### 2.2.3 Massenspektrometrie

Massenspektren wurden durch Positive Electrospray Ionisation (ESI-MS) an dem Quadrupole ion trap tandem Massenspektrometer LCQ DUO, ThermoQuest von Finnigan erhalten. Die Proben wurden über eine Spritzenpumpe mit einem Fluß von 25 µl/min aufgegeben, Kapillartemperatur betrug 170 bzw. 200 °C, Trägergasfluß war 20 (*willkürliche Einheit*). Obidoxim-Mononitril wurde über LC-MS durch Elution mit 10 mM NH<sub>4</sub>formiat/50% MeOH pH 6,0 analysiert. **Ion trap collision-induced dissociation** diente der Generierung der MS/MS-Spektren.

## 2.3 Pufferlösungen, Reagenzien, Enzympräparate

### 2.3.1 Pufferlösungen

#### **0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 (0,1 M PP)**

Stammlösung I: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O; MG: 177,9 (17,79 g in 1000 ml Aq. bidest.); Stammlösung II: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; MG: 136,1 (13,6 g in 1000 ml Aq. bidest.). Zur Einstellung des Na-Phosphatpuffers auf pH 7,4, wurde eine entsprechende Menge (ca. 200 ml) Lösung 2 mit 1 Liter der Lösung 1 gemischt.

#### **0,1 M MOPS/1 mM Ca<sup>2+</sup> pH 7,4**

20,9 g MOPS und 147 mg CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O in 1000 ml Aqua dest. lösen und pH bei Raumtemperatur mit 1 N NaOH einstellen.

**25 mM TRIS-HCl/1 mM Ca<sup>2+</sup>/0,15 M NaCl/0,1 % Triton X-100, pH 8,0**

3,02 g TRIS, 146 mg CaCl<sub>2</sub>\* 2H<sub>2</sub>O, 8,76 g NaCl und 1 g Triton X-100 in 1000 ml Aqua bidest. lösen und mit HCl konz. bei RT auf pH 8,0 einstellen.

Die einzelnen **TRIS-Puffer** wurden mit den verschiedenen Säuren auf den gewünschten pH-Wert bei der jeweiligen Temperatur eingestellt; die angegebene Molarität bezieht sich dabei auf die TRIS-Konzentration.

### 2.3.2 Reagenzien

**Acetylthiocholin Iodid (ASCh)**; MG: 289,2; für eine 28,4 mM wäßrige Lösung 41,12 mg ASCh in 5,0 ml H<sub>2</sub>O lösen.

**S-Butyrylthiocholin Iodid (BSCh)**; MG: 317,2; für eine 63,2 mM wäßrige Lösung 200,47 mg BSCh in 10,0 ml H<sub>2</sub>O lösen.

**5,5`-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)**; MG: 396,4; für eine 10 mM Lösung wurden 39,6 mg DTNB in 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4, gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

**Paraoxon-ethyl** O,O-Diethyl-O-4-nitrophenylphosphat; MG: 275,2; Stammlösungen (in Isopropanol) bzw. wäßrige Lösung nach **Reinigung**: (*als Substrat für Paraoxonase-Aktivitätsbestimmung*): Zur Entfernung des hohen Anteils an p-Nitrophenol in Paraoxon-ethyl wurden 14,6 ml einer 5 mM wäßrigen Suspension von Paraoxon-ethyl mit 19,5 mg Aktivkohle und 14 µl konz. HCl versetzt, gerührt, geschüttelt und anschließend bei 3000 U/min zentrifugiert. Überstand wurde durch Faltenfilter filtriert, pH-Wert des Filtrats mit 1 M Tris auf pH 5 eingestellt und Konzentration photometrisch bestimmt ( $\epsilon_{274\text{nm}}$  in H<sub>2</sub>O =

$8,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; Merck-Index, 1989). Gereinigte Lösung wurde portionsweise bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**Paraoxon-methyl** O,O-Dimethyl-O-4-nitrophenyl-phosphat; MG: 247,1; für eine 20 mM wäßrige Stammlösung wurden 9,88  $\mu\text{l}$  Paraoxon-methyl in 2,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

**DFP** Diisopropylfluorophosphat; MG: 184,1; für eine 20 mM wäßrige Stammlösung wurden 7,36 mg DFP in 2,0 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

**Phenylacetat**; MG: 136,2; für eine 8,1 mM Zubereitung wurden 50  $\mu\text{l}$  Phenylacetat in 48,75 ml  $\text{H}_2\text{O}$  suspendiert.

**Carbodiimide:** EDC, MG: 191,7; für eine 500 mM wäßrige Stammlösung wurden 70,85 mg EDC in 740  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  gelöst; DCC, MG: 206,3; für eine 50 mM Stammlösung wurden 51,6 mg DCC in 5,0 ml Ethanol gelöst.

**N-Bromsuccinimid (NBS)**; MG: 178,0; für eine 2 mM wäßrige Stammlösung wurden 7,1 mg NBS in 20 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst.

**Stammlösungen (1-2 mM) der Hg-Verbindungen PMA und p-OHMB** zunächst in NaOH suspendieren, anschließend mit 5 M MOPS auf pH 7,4 einstellen.

### **Oximlösungen**

Von allen Oximen wurden wäßrige Stammlösungen hergestellt, wobei die unterschiedlichen Reinheiten unberücksichtigt blieben.

**Obidoxim Dichlorid Monohydrat:** 99%, 1,1'-Oxybis(methylen)bis[4-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dichlorid-monohydrat; MG: 377,2

**HI-6 Dichlorid Monohydrat (HI-6):** 99,6% 1-(2-Hydroximinomethyl-1-pyridinium)-3-(4-carbamoyl-1-pyridinium)-2-oxapropan-dichlorid-monohydrat; MG: 377,2

**TMB-4 Dibromid:** 97%, 1,1'-Trimethylenbis-[4-(hydroxyimino)-methyl]pyridinium-dibromid]; MG: 446,15

**HLö 7 Dimethansulfonat (HLö 7):** 95%, 1-[[[4-(Aminocarbonyl)-pyridinio]-methoxy]-methyl]-2,4-bis[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dimethansulfonat; MG: 521,0

**Transformationslösung:** 200 mg Kaliumferricyanid ( $K_3[Fe(CN)_6]$ , MG: 329,2), 50 mg Kaliumcyanid (KCN, MG: 65,1), und 1000 mg Natriumbicarbonat ( $NaHCO_3$ , MG: 84,0) in 1000 ml Aqua dest. lösen, 0,5 ml Triton X-100 zugeben und gut durchmischen. In einer braunen Schraubflasche gut verschlossen bei Raumtemperatur aufbewahren.

### 2.3.3 Enzympräparate

#### **Acetylcholinesterase aus Human-Erythrozyten (EryAChE)**

Frisches Venenblut wurde heparinisiert, 10 min bei 3000 U/min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, das überstehende Plasma abpipettiert und die Erythrozyten 4 mal mit dem doppelten Volumen Verdünnungsmedium gewaschen (3000 U/min; 10 min). Nach dem Waschen wurde die Erythrozytensuspension mit Verdünnungsmedium auf den gewünschten Hämoglobingehalt eingestellt.

#### **Spender-Erythrozytenlysat**

Hierbei handelte es sich um hämolysierte Human-Erythrozyten eines Spenders mit Blutgruppe 0, die mit 0,1 M PP, pH 7,4, auf einen Hämoglobingehalt von 3 g Hb/dL eingestellt wurden.

#### **Organophosphat-inhibiertes Erythrozytenlysat**

Frische, gewaschene Human-Erythrozyten (ca. 15 g Hb/dL) wurden unter Zusatz des jeweiligen Organophosphats bei 37 °C inkubiert (200 nM Paraoxon-ethyl oder 10 µM DFP für 35 min, 1 µM Paraoxon-

methyl für 15 min). Anschließend wurden die Erythrozyten mit dem dreifachen Volumen an 0,1 M PP, pH 7,4, 5 mal bei +6 °C gewaschen, bevor mit Verdünnungsmedium auf den gewünschten Hämoglobingehalt (15 g Hb/dL) eingestellt wurde. Hämolyse erfolgte durch Einfrieren bei -20 °C und anschließendes Auftauen auf Eis.

*Im Falle von Paraoxon-methyl-inhibierten Enzymquellen war es, bedingt durch hohe Alterungs- und Spontanreaktivierungsraten, unbedingt erforderlich, möglichst kurze Wasch-, Hämolyse- und Inkubationszeiten einzuhalten.*

### **Zitteraal-AChE-Gebrauchslösung**

Käufliche Zitteraal-AChE wurde in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine, pH 7,4, 1:10 verdünnt.

### **Paraoxon-ethyl-inhibierte Zitteraal-AChE-Gebrauchslösung**

Die Inkubation der Zitteraal-AChE-Gebrauchslösung mit 200 nM Paraoxon-ethyl erfolgte bei 37 °C für 40 min. Zur Adsorption des Überschusses an Paraoxon-ethyl wurde jeweils 1 ml der Enzymlösung mit 50 mg MeOH-konditioniertem Baker Bond C18 ausgeschüttelt, bevor dieses schließlich durch Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, 1 min) abgetrennt und der Überstand portioniert bei -20 °C aufbewahrt wurde.

### **Soman-behandeltes, dialysiertes Plasma**

Heparin-Plasma wurde mit 10 µM Soman versetzt, bei 37 °C für 30 min inkubiert und die vollständige Inaktivierung der Plasma-BChE (Bestimmung der BChE-Aktivität nach modifizierter Ellman-Methode) überprüft. Zur Giftentfernung erfolgte anschließend 2 malige Dialyse für 12 Stunden bei +6 °C gegen Verdünnungsmedium. Die Vollständigkeit

der Giftelimination wurde mit Hilfe eines indirekten Giftnachweises überprüft. Hierfür kamen 30 µl Soman-gehemmtes, dialysiertes Plasma mit 100 µl ungehemmtem Spender-Erythrozytenlysat während 45 min bei 37 °C zur Reaktion; daran schloß sich die Bestimmung der EryAChE-Aktivität im Vergleich zu Kontrollansatz (mit Plasma ohne Soman-Behandlung) an.

### **Reinigung der POX-Hydrolase aus Soman-gehemmtem, dialysierten Plasma an Cibacron Blue 3GA**

Ausgehend von einer Affinitätschromatographie nach Gan et al. (1991) wurde der Paraoxonase-HDL-Komplex im Soman-gehemmten, dialysierten Plasma (Proband DK) an Cibacron Blue 3GA (Type 3000) gebunden, wohingegen Albumin und andere Proteine durch Elution mit 50 mM TRIS-HCl/1 mM CaCl<sub>2</sub>/5 µM EDTA/3 M NaCl, pH 8,0, entfernt wurden. Anschließend erfolgte die Elution des Paraoxonase-HDL-Komplexes mit 50 mM TRIS-HCl/1 mM CaCl<sub>2</sub>/5 µM EDTA/0,1% Na-Desoxycholat, pH 8,0, bei +6 °C während 7 h. Die Höhe der Arylesterase und POX-Hydrolase in den einzelnen Fraktionen wurde ermittelt, wobei für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität die Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE in 10 mM PP/1 mM Ca<sup>2+</sup>/0,9% NaCl, pH 7,4, mit 10 µM Obidoxim bei 10 °C während 20 min erfolgte, bevor die AChE-Aktivität in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 37 °C bestimmt wurde. Die vereinigten, aktivitätshaltigen Fraktionen wurden bei +6 °C gegen 1 mM PP/1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7,4, dialysiert (Dialyse 1). Nach Lyophilisieren, Resuspendieren in Aqua bidest. und erneutem Dialysieren bei +6 °C gegen 10 mM PP/1 mM Ca<sup>2+</sup>/0,9% NaCl, pH 7,4, (Dialyse 2) lag das Präparat ausreichend konzentriert und stabilisiert für den Einsatz in weiteren Experimenten vor.

**Tabelle 2-1:** Verlauf der Reinigung der Paraoxonase/Arylesterase durch Chromatographie an Cibacron Blue 3GA

Material	Volumen	Protein mg/ml	Protein gesamt mg	Aryl- esterase U/ml	Aryl- esterase gesamt U	<b>Aryl- esterase spezi- fische Aktivität U/mg</b>	Para- oxonase (+1M NaCl) mU/ml	<b>Para- oxonase spezi- fische Aktivität mU/mg</b>
Soman- gehemmtes dialysiertes Plasma	10ml	58	580	204	2040	<b>3,52</b>	736,1	<b>12,7</b>
nach Cibacron, vor Dialyse vor Lyophil- sation	36ml	0,25	9,0	17,3	622,8	<b>69,2</b>		
nach Cibacron nach Dialyse vor Lyophil- sation	33ml	0,23	7,6	17,6	580,8	<b>76,5</b>	52,8	<b>229,6</b>
nach Lyophil- sation und Dialyse 1	1,2ml	3,3	3,96	284,8	341,8	<b>86,3</b>	986	<b>298,8</b>
nach Dialyse 2	1ml	2,15	2,15	287,5	287,5	<b>133,7</b>	763,9	<b>355,3</b>

## 2.4 Methoden

*Ergaben sich im Laufe der Experimente neue Aspekte, z.B. daß einzelne Zusätze den Verzicht auf bestimmte Komponenten erforderlich machten (z.B. Verzicht von PP bei Experimenten mit  $Tb^{3+}$ ), so wurden die im folgenden beschriebenen Methoden abgewandelt. Die aktuelle Zusammensetzung der Ansätze ist bei den einzelnen Experimenten angeführt.*

### 2.4.1 Enzymatische Bestimmungen

#### **Kolorimetrische Bestimmung der Cholinesteraseaktivität nach Ellman**

Die Aktivitäten der Acetylcholinesterase (AChE) und der Plasma-Butyrylcholinesterase (BChE) wurden kolorimetrisch nach einer modifizierten Ellman-Methode (Ellman et al. 1961; Worek et al. 1999b) im Photometer bei 436 nm, pH 7,4 und 37 °C bestimmt. Substrat für die AChE war Acetylthiocholin (ASCh, 450 µM), während der BChE Butyrylthiocholin (BSCh, 1 mM) angeboten wurde. Die Cholinesterasen spalten die Substrate in Thiocholin und die entsprechende Säure. Thiocholin reagiert mit dem Ellman-Reagenz (DTNB) unter Bildung eines gelben, mesomeriestabilisierten Anions, das  $TNB^-$ . Gemessen wurde die Initialgeschwindigkeit der Spaltung von DTNB (0,3 mM) zu  $TNB^-$  in Polystyroleinmalküvetten (**Tabelle 2-2**).

Handelte es sich bei der Cholinesterase-Enzymquelle um EryAChE bzw. Plasma-BChE, so wurde zur Abreaktion der erythrozytären bzw. Protein-SH-Gruppen die Enzymsuspension in der Küvette vor Substratzugabe mit 0,3 mM DTNB 10 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt konnte bei Experimenten mit Zitteraal-AChE entfallen. Sollte die AChE-Aktivität in Anwesenheit von BChE ermittelt werden, die selbst auch ASCh

hydrolysiert, wurde dieser Einfluß durch den Zusatz von 20 µM Ethopropazin-HCl, einem reversiblen Cholinesterase-Hemmstoff, unterdrückt (Worek et al. 1999b).

**Tabelle 2-2.** Meßansatz mit Indikatorreaktion, 37 °C.

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Küvette	Ansatzbehandlung
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	ad 3,160	
DTNB	10 mM	0,100	
Erythrozyten	15 g Hb/dL	0,01	
<b>Plasma</b>		<b>0,01</b>	
Ethopropazin*	6 mM	0,01	10 min inkubieren
ASCh	28,4 mM	0,05	Reaktionsstart
<b>BSCh</b>	<b>63,2 mM</b>	<b>0,05</b>	<b>Reaktionsstart</b>

\*Ethopropazin-Zusatz entfällt bei fehlender BChE-Aktivität

***Plasma und BSCh bei BChE-Bestimmung***

Bei Experimenten mit verdünnten Enzymzubereitungen wurde entsprechend mehr Probenvolumen eingesetzt. Die Meßwerte wurden um die spontane ASCh- bzw. BSCh-Hydrolyse korrigiert und die AChE-Aktivität auf den Hämoglobingehalt (Eisenäquivalente, bestimmt als Cyanmethämoglobin) bezogen.

**Bestimmung der Reaktivierungskinetiken**

Die Organophosphat-gehemmten, temperierten Enzymquellen wurden unmittelbar vor dem Ellman-Test mit dem entsprechenden Oxim inkubiert, bevor nach verschiedenen Zeiten Aliquote in die vorgewärmte Testküvette überführt und die Reaktion mit Substrat gestartet wurde. (Tabellen 2-3 und 2-4).

**Tabelle 2-3.** Reaktivierungsansatz , 37 °C

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	Ansatzbehandlung
Erythrozytensuspension in Verdünnungsmedium pH 7,4 +/- Soman-Plasma	7,5 g Hb/dL	Temperieren
Reaktivatorlösung bzw. Aqua bidest. als Kontrolle	(10 µM im Ansatz)	Inkubieren

**Tabelle 2-4.** Meßansatz mit Indikatorreaktion, 37 °C.

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Küvette	Ansatzbehandlung
Reaktivierungsansatz	7,5 g Hb/dL	0,015	
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	ad 3,160	
DTNB	10 mM	0,100	
Ethopropazin	6 mM	0,010	10 min inkubieren
ASCh	28,4 mM	0,050	Reaktionsstart

*Sowohl die Geschwindigkeit der Reaktivierung als auch die Höhe an AChE-Aktivität variierten stark in Abhängigkeit von der Art des Inkubationsmediums, so daß für jedes Puffermedium unterschiedliche Referenzwerte berücksichtigt wurden.*

### **Bestimmung der Reaktivierung Paraoxon-methyl-gehemmter AChE**

Dimethylphosphoryl-AChE zeigt bei 37 °C in 0,1 M PP, pH 7,4, eine schnelle Spontanreaktivierung ( $t_{1/2} = 0,7$  h) und Alterung ( $t_{1/2} = 3,7$  h; Worek et al. 1999a). Beide Halbwertszeiten ließen sich durch Absenken der Reaktionstemperatur deutlich erhöhen. Für die Beurteilung nur schwach ausgeprägter Reaktivierungsunterschiede schien es daher sinnvoll, die Reaktivierung durch Obidoxim bei 10 °C durchzuführen, während die AChE-Aktivität bei 37 °C ermittelt wurde. Reaktiviert wurde Paraoxon-methyl-gehemmte EryAChE (in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4) mit 100 µM Obidoxim bei 10 °C. Der Ellman-Test erfolgte in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 37 °C, wobei die Probe sowohl in Meß- als auch in Referenzküvette pipettiert wurde. Dadurch

wurde die Reaktion von DTNB mit Matrix-SH-Gruppen kompensiert, die Präinkubation entbehrlich und die Spontanreaktivierungsrate minimiert.

### **Bestimmung der maximalen Reaktivierbarkeit und der Halbwertszeiten**

Dieser Test erfolgte bei Paraoxon-ethyl-, Paraoxon-methyl- und Diisopropylfluorophosphat (DFP)-gehemmtem Enzym durch Inkubation einer 1:100 verdünnten Erythrozytensuspension (0,15 g Hb/dL) mit 100  $\mu$ M Obidoxim (oder anderes Oxim) bei 37 °C über 30 min (45 min bei DFP). Durch die Verdünnung der Enzymquellen ließ sich die Re-Inhibierung durch gebildetes Phosphoryloxim nahezu vollständig zurückdrängen.

Die Abschätzung der Halbwertszeiten der Reaktivierung berechnet sich aus der Formel

$$k_{\text{obs}} = k_r \times [\text{Ox}] / (K_D + [\text{Ox}])$$

wobei für Paraoxon-ethyl:  $K_D = 70 \mu\text{M}$ ,  $k_r = 1,3 \text{ min}^{-1}$  und für Paraoxon-methyl:  $K_D = 163 \mu\text{M}$ ,  $k_r = 4,24 \text{ min}^{-1}$  (Worek et al. 1997/1999a) gilt. Die Halbwertszeiten liegen unter diesen Bedingungen bei weniger als 1 min, so daß die Reaktivierung nach 30 min vollständig abgeschlossen war.

Eine parallel durchgeführte Inkubation ohne Enzymquelle erlaubte die Korrektur der Oxim-katalysierten Substrathydrolyse. Die durch die vergleichsweise hohe Oximkonzentration meßbare Hemmung der AChE im Enzymtest wurde ebenfalls berücksichtigt.

Alternativ erfolgte die Berechnung der Reaktivierungshalbwertszeit durch Anpassung einer Exponentialfunktion an die mit der Zeit abnehmende Enzymhemmung mit

$E_i = E_{100\%} - E_a$  wobei  $E_i$  für das gehemmte Enzym,  $E_{100\%}$  für das reaktivierbare und  $E_a$  für das aktive Enzym steht.

Ferner gilt:

$E_{it} = E_{i0} \times e^{-kxt}$  wobei  $E_{it}$  für das gehemmte Enzym zum Zeitpunkt  $t$  und  $E_{i0}$  für das gehemmte Enzym zum Zeitpunkt 0 steht.

Schließlich errechnet sich die Halbwertszeit aus der Funktion

$$t^{1/2} = \ln 2/k.$$

Die Kurven wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse an die Datenpunkte angepasst (GraphPad Prism 3.0, GraphPad, San Diego, USA).

### **Bestimmung der Alterung und Spontanreaktivierung bei Paraoxon-methyl- und DFP-inhibierter EryAChE**

Die Alterungsrate wurde bestimmt durch Abnahme der Reaktivierbarkeit einer 1:100 verdünnten EryAChE-Probe (0,075 g Hb/dL) durch 20  $\mu$ M Obidoxim während 30 min (Paraoxon-methyl) bzw. 100  $\mu$ M Obidoxim während 45 min (DFP) bei 37 °C (in Küvette in Anwesenheit von 0,3 mM DTNB).

Die Ermittlung der Spontanreaktivierungsrate erfolgte durch Inkubation des konzentrierten Enzymansatzes, Verdünnen (1:100) nach verschiedenen Inkubationszeiten und anschließender Bestimmung der AChE-Aktivität, wobei die Probenzugabe sowohl in Meß- als auch in Referenzküvette mit DTNB erfolgte.

### **Bestimmung der Arylesterase-Aktivität**

Die Aktivität der Arylesterase wurde modifiziert nach Junge und Klees (1984) in 50 mM TRIS-acetat/0,3 mM Ca<sup>2+</sup> bei pH 7,4 und 37 °C bestimmt. Als Substrat diente 4 mM Phenylacetat, verfolgt wurde die durch Enzym freigesetzte Menge an Phenol bei 270 nm ( $\epsilon_{270 \text{ nm}} = 1,45 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Hesse et al. 1987), korrigiert um den Wert der spontanen Substrathydrolyse.

### **Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität**

Die Aktivität der Paraoxonase wurde bei 37 °C sowohl in 0,1 M TRIS-HCl/1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 8,5, als auch in 0,1 M TRIS-HCl/1 mM Ca<sup>2+</sup>/1 M NaCl, pH 8,5, über die Freisetzung von p-Nitrophenol aus 2 mM Paraoxon-ethyl bei 405 nm spektroskopisch bestimmt ( $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), korrigiert um den Betrag der spontanen Substrathydrolyse. Die Quotientenbildung der beiden Paraoxonase-Aktivitäten diente der Festlegung des **NaCl**-Faktors als Parameter für die Phenotypisierung der Paraoxonase (Eckerson et al. 1983a).

### **Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Soman-behandeltem Plasma (Methode durch AChE-Reaktivierung)**

Organophosphat-inhibierte, gewaschene Human-Erythrozyten (15 g Hb/dL) wurden mit Soman-gehemmtem, dialysierten Plasma und/oder Puffermedium verdünnt, mit dem jeweiligen Oxim bei der gewünschten Temperatur inkubiert und die AChE-Aktivität nach verschiedenen Zeitpunkten (37 °C 10 min bzw. 10 °C 20 min) aus einem Aliquot bestimmt (Temperatur und Puffermedium variierten in Abhängigkeit des zugrunde liegenden Organophosphates).

Für die Berechnung gilt:

$$\% \text{ POX-Hydrolase-Aktivität} = 100 \times (A_+ - A_-) / (A_0 - A_-)$$

wobei  $A_-$  und  $A_+$  für die AChE-Aktivität von inhibierten Erythrozyten (7,5 g Hb/dL) steht, die mit Oxim in Ab- bzw. Anwesenheit von Soman-behandeltem Plasma inkubiert waren.  $A_0$  bezieht sich auf die durch 1:100-Verdünnung der Erythrozytensuspension und Inkubation mit Oxim nach entsprechender Inkubationsdauer ohne Plasmazusatz maximal erreichbare AChE-Aktivität (läßt sich bei Kenntnis der kinetischen Parameter  $K_D$  und  $k_r$  berechnen oder wird experimentell bestimmt).

### **Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Soman-behandeltem Plasma (Methode durch Quantifizierung des entstandenen Obidoxim)**

DEP-Obidoxim wurde durch Inkubation mit Soman-behandeltem Plasma (dialysiert gegen 25 mM TRIS-HCl/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /0,15 M NaCl/0,1% Triton X-100, pH 8,0) bei 37 °C und pH 7,4 enzymatisch hydrolysiert. Die daraus entstandene Menge an Obidoxim wurde per HPLC nach Methode C quantifiziert (s. dort) und als Maß für die POX-Hydrolase-Aktivität herangezogen.

### **Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von $\text{Tb}^{3+}$**

Bei Experimenten zur Beurteilung eines  $\text{Tb}^{3+}$ -Einflusses mußte auf die Verwendung von phosphat- und tryptophanhaltigen Reagenzien verzichtet werden, durch die andernfalls die Verfügbarkeit von freien  $\text{Tb}^{3+}$ -Ionen zu stark gemindert worden wäre. Speziell für die

Beantwortung der Frage eines  $Tb^{3+}$ -Einflusses auf die POX-Hydrolase wurde der ursprünglich verwendete Assay, charakterisiert durch die Reaktivierung von Paraoxon-gehemmtem Erythrozytenlysat mit Obidoxim in Anwesenheit von Soman-gehemmtem, dialysierten Plasma, umgestaltet. Gelatine-stabilisierte Zitteraal-AChE anstelle von Erythrozytenlysat erwies sich hierfür als geeignete AChE-Quelle, nachdem sich herausgestellt hatte, daß  $Tb^{3+}$  sowohl von Erythrozytenlysat bzw. Hämoglobin, als auch von Albumin (aufgrund des hohen Anteils an Tryptophan; Belitz 1987) adsorbiert wurde. Zitteraal-AChE blieb bei Zusatz von Gelatine (0,02%) als Schutzkolloid über einen langen Zeitraum stabil, das Ausmaß der Alterung und Spontanreaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter Zitteraal-AChE war bei 25 °C über 24 Stunden zu vernachlässigen. Reaktionsmedium war 0,1 M MOPS/1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 7,4, reaktiviert wurde mit 1  $\mu$ M Obidoxim bei 10 °C während 15 min. Bei der POX-Hydrolase- und der Paraoxonase/Arylesterase-Quelle handelte es sich um das Cibacron-gereinigte Enzym, das gegen 0,1 M MOPS/1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 7,4, dialysiert und insbesondere isoliert von Albumin vorlag.

### **Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von N-Bromsuccinimid (NBS)**

Vorversuche zur Verwendung von NBS im Zusammenhang mit der Bestimmung der Paraoxonase/Arylesterase- und POX-Hydrolase-Aktivität machten deutlich, daß NBS sowohl Zitteraal-AChE als auch Arylesterase zu inhibieren vermochte. Reagenzien wie DTNB und Gelatine verringerten hierbei die NBS-bedingte Hemmung der Zitteraal-AChE. Auf den Einsatz von Halogeniden sollte verzichtet werden, da diese durch NBS oxidiert werden können und somit Proteine modifizieren (Lundblad 1991),  $CaCl_2$  wurde deshalb durch  $Ca(NO_3)_2$  ersetzt.

### **Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Anwesenheit von Carbodiimiden**

Für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität wurde das Cibacron-gereinigte Soman-Plasma nach Inkubation mit dem jeweiligen Carbodiimid (1 mM EDC bzw. 2 mM DCC bei 37 °C) gegen 1 mM PP/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4, dialysiert und lyophilisiert, bevor es anschließend mit Paraoxon-ethyl-gehemmter Zitteraal-AChE (0,1 M MOPS/0,02% Gelatine pH 7,4) und 1  $\mu\text{M}$  Obidoxim bei 10 °C für 20 min zur Reaktion gebracht wurde.

### **Bestimmung der Enzymaktivitäten in Anwesenheit von Phenylmercuriacetat (PMA) und p-Hydroxymercuribenzoat (p-OHMB)**

*Inkubierte man Cibacron-gereinigtes Soman-Plasma, das gegen 0,1 M MOPS/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4, dialysiert vorlag, mit 50  $\mu\text{M}$  PMA oder 100  $\mu\text{M}$  p-OHMB bei 37 °C und entnahm ein Aliquot zur Messung der Arylesterase-Aktivität, so erreichte man nach 35 min eine komplette Enzyminaktivierung. Wurde dem durch PMA- bzw. p-OHMB-gehemmten Enzym anschließend Glutathion im Überschuß zugesetzt, war eine Reaktivierung der Arylesterase zu beobachten, die Inaktivierung der Arylesterase durch PMA bzw. p-OHMB war somit reversibel.*

*Zur Klärung der Frage, inwieweit PMA oder p-OHMB die Zitteraal-AChE-Aktivität beeinflussen, durfte im Ellman-Test keine nennenswerte Konzentration an  $\text{Hg}^{2+}$ -Ionen vorliegen, die mit TNB<sup>-</sup> hätten reagieren können. Es war daher nur möglich, eine konzentrierte Enzymlösung mit Quecksilberverbindungen zu inkubieren und aus aliquoten Mengen die AChE-Aktivität zu bestimmen. Mit diesem Verfahren ließ sich eine irreversible Hemmung der Zitteraal-AChE durch p-OHMB ausschließen. Auch*

*wurde kein Einfluß von p-OHMB auf Geschwindigkeit und Ausmaß der Reaktivierung von Paraoxon-gehemmter Zitteraal-AChE durch Obidoxim festgestellt. Eine Entscheidung darüber, ob Quecksilber-Verbindungen die AChE auf reversible Weise zu inhibieren vermögen, konnte allerdings mit den hier angewandten Meßsystemen nicht gefällt werden. Eine reversible Hemmung ist allerdings auch nicht zu erwarten, da im aktiven Zentrum der AChE keine SH-Gruppen-tragenden Aminosäuren verankert sind (Sussman et al. 1991).*

Die Hemmung der Arylesterase durch p-OHMB bzw. PMA war reversibel, daher durfte für die Bestimmung der POX-Hydrolase der Überschuß der Quecksilber-Verbindung nicht entfernt werden. Deshalb wurde der Versuchsansatz für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität wie folgt gewählt: Cibacron-gereinigtes Soman-Plasma (dialysiert gegen 0,1 M MOPS/1 mM Ca<sup>2+</sup>, pH 7,4) wurde bei 37 °C mit 100 µM p-OHMB bzw. 50 µM PMA bis zur vollständigen Inaktivierung der Arylesterase inkubiert (nach ca. 30 min). Anschließend wurde ein Aliquot dieser Probe gemeinsam mit Paraoxon-ethyl-gehemmter Zitteraal-AChE und 1 µM Obidoxim während 20 min bei 10 °C inkubiert.

### **Kinetik der Hemmung humaner EryAChE durch Paraoxon-ethyl und DEP-Obidoxim**

Bei diesen Experimenten erfolgte die Reaktion von DTNB mit den erythrozytären SH-Gruppen bereits durch Vorinkubation (**Tabelle 2-5**), um den Zerfall von DEP-Obidoxim bei pH 7,4 zu minimieren. Die AChE-Aktivität wurde dadurch nicht beeinflusst.

**Tabelle 2-5.** Vorinkubationsansatz, 37 °C

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Eppendorff-Cup	Ansatzbehandlung
Spendererythrozyten	3 g Hb/dL	0,5	
DTNB	10 mM	0,1	
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	0,4	10 min inkubieren

Ebenfalls aus Stabilitätsgründen von DEP-Obidoxim wurde die Hemmkinetik nicht bei 37 °C, sondern bei 10 °C verfolgt (**Tabelle 2-6**), während die AChE-Aktivität bei 37 °C bestimmt wurde (**Tabelle 2-7**).

**Tabelle 2-6.** Hemmansatz, 10 °C

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	µl in Eppendorff-Cup	Ansatzbehandlung
Vorinkubat	1,5 g Hb/dL	900	bei 10 °C 10 min temperieren
isol. DEP-Obidoxim oder	250 nM oder	7,3	
Paraoxon-ethyl (in 10 mM NH <sub>4</sub> acetat/20% MeOH, pH 4,5)	25 µM	7,3	inkubieren

**Tabelle 2-7.** Meßansatz mit Indikatorreaktion, 37 °C

Reagenz bzw. Probe	Konzentration	ml in Küvette	Ansatzbehandlung
Inkubations- bzw. Hemmansatz	1,5 g Hb/dL	0,100	
Phosphatpuffer, pH 7,4	0,1 M	2,910	
DTNB	10 mM	0,090	
ASCh	28,4 mM	0,050	sofort Reaktionsstart

## 2.4.2 Generierung und Isolierung von Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) und seinen Abbauprodukten

### **DEP-Obidoxim**

Obidoximdichlorid wurde in 10 mM Veronal (Barbital-Na), pH 7,5, gelöst (50 mM, pH 6,38) und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Paraoxon-ethyl wurde in 10 mM Veronal, pH 7,5, suspendiert (15 mM). Die Inkubation von 10 mM Obidoxim und 10 mM Paraoxon-ethyl in 10 mM Veronal, pH 7,5, erfolgte über Nacht (16 h) auf Eis. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Ansatzes an LiChroCart 125-3, Superspher 60, RP-select B 4 µm nach (HPLC-) **Methode A** chromatographiert und DEP-Obidoxim aufgefangen (Rt 19 min).

### **Obidoxim-Mononitril**

Zur Gewinnung des Obidoxim-Mononitrils wurde zunächst isoliertes DEP-Obidoxim (in mobiler Phase) mit  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  bei pH 6,9 während 8,5 h bei 0 °C, anschließend für 7 min bei 37 °C inkubiert (am Ende der Inkubation pH 8,3); zur Vermeidung des weiteren Nitril-Zerfalls wurde der pH mit 1 N HCl auf 5,2 eingestellt, die Probe lyophilisiert und nach Resolubilisieren in wenig  $\text{H}_2\text{O}$  über HPLC nach **Methode B** daraus das Mononitril isoliert (Rt 6,5 min).

### **Obidoxim-Monopyridon**

Isoliertes DEP-Obidoxim (in mobiler Phase) wurde mit  $\text{NH}_3$  bei pH 7,4 für 16 h auf Eis und 4,5 h bei 37 °C inkubiert, bevor anschließend das Volumen eingengt (Speed Vac) und gebildetes Monopyridon über HPLC nach **Methode B** (Rt 13,4 min) isoliert wurde.

### 2.4.3 Quantifizierung von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten

Bei Verwendung einer HPLC-Methode mit Ionenpaarreagenzien musste bereits der Probe 5% (v/v) PIC B7 zugesetzt werden, um ein Aufspalten der Peaks zu verhindern.

#### **DEP-Obidoxim**

Die Konzentration von DEP-Obidoxim wurde, basierend auf der Annahme einer kompletten enzymatischen Hydrolyse, über die Konzentration an Obidoxim bestimmt, die sich bei der Inkubation von isoliertem DEP-Obidoxim mit unverdünntem, Soman-gehemmten, dialysierten Plasma (mit POX-Hydrolase-Aktivität) bei 37 °C und pH 7,4 gebildet hatte. Die Obidoxim-Bestimmung erfolgte per HPLC nach **Methode C**. Unter Zugrundelegung dieser Konzentration wurde anschließend die HPLC-Peakfläche für intaktes DEP-Obidoxim standardisiert und ein Extinktionskoeffizient für UV-spektrometrische Bestimmungen abgeschätzt.

#### **Obidoxim**

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Obidoxim aus Inkubationsansätzen in Anwesenheit von Proteinen, wurde zuerst Protein mit 1 M TCA gefällt, bevor der Überstand mit PIC B7/NH<sub>3</sub> neutralisiert wurde (**Tabelle 2-8**). Den Referenzwert stellte eine wäßrige, UV-spektrometrisch eingestellte Obidoxim-Standardlösung nach identischer Aufarbeitung dar.

**Tabelle 2-8** Probenbehandlung für Obidoxim-Quantifizierung

Reagenz bzw. Probe	Volumen	Ansatzbehandlung
Inkubat	150 µl	
1 M TCA	45 µl	vortexen, 2 min <b>Hettich-Zentrifuge</b>
Überstand	100 µl	
PIC B7/NH <sub>3</sub> -Reagenz *	50 µl	Mischen
	50 µl	<b>HPLC Methode C</b>

\* 1000µl PIC B7 + 120 µl NH<sub>3</sub> (25%)

### **Obidoxim-Monopyridon und Obidoxim-Mononitril**

Unter der Annahme, daß bei diesen „Obidoxim-Derivaten“ durch die verbliebene Oximgruppe des einen Pyridiniumrings die UV-Absorption im Alkalischen halb so stark ist wie die des Obidoxims, wurde die Höhe der Absorption im langwelligen UV bei pH 11 mit  $\epsilon_{354\text{nm}} = 23,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  angenommen und für die Standardisierung der HPLC-Flächen nach **Methode D** herangezogen.

### **Cyanid**

Die Bestimmung wurde modifiziert nach Mikrodifusion und Reaktion nach Nagashima (1978) durchgeführt (Eyer et al. 1987). Die zu analysierende Probe wurde im Graben eines Fernbachfläschchens (Gasvolumen 10 cm<sup>3</sup>) bei pH 7,4 inkubiert, wobei HCN in separat im Brunnen eines Fernbachfläschchens vorgelegte 0,1 N NaOH diffundierte. Nach vollständiger Diffusion wurde der CN<sup>-</sup>-Gehalt aus 300 µl Brunneninhalt mit Chloramin-T und Isonicotinat-Barbiturat-Reagenz bei 600 nm im Photometer vermessen ( $\epsilon_{600\text{nm}} = 11,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Kalibriert wurde gegen frische NaCN-Verdünnungen in 0,1 N NaOH.

*Wenn nicht anders angegeben, kamen 300 µl des Brunneninhalts mit 1000 µl Phosphatpuffer pH 5,22, 20 µl Chloramin-T 1% und*

*500 µl des Isonicotinat/Barbiturat-Reagenzes (200 mg Na-Isonicotinat, 200 mg Na-Barbiturat in 20 ml H<sub>2</sub>O) während 30 min unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln in einem dicht verschlossenen Gefäß zur Reaktion.*

#### 2.4.4 HPLC-Methoden

**Methode A:** zur DEP-Obidoxim-Isolierung und Quantifizierung

Eluent A bestand aus einer wäßrigen Lösung aus 10 mM NH<sub>4</sub>acetat, pH 4,5. Eluent B enthielt gleichviel NH<sub>4</sub>acetat wie A bei 50% (v/v) MeOH. Pumpenprogramm: 0,6 ml/min, t: 0-20 min/B: 0-40%, t: 20-30 min/B: 40%, t: 30-40 min/B: 40-100%, t: 40-50 min/B: 100%, t: 50-55 min/B: 100-0%, t: 55-65 min/B: 0%. Laufzeit: 65 min. Säule: LiChroCart Superspher 60, RP-select B 125 mm/3 mm/4 µm: Merck, Darmstadt, Deutschland. Detektorwellenlänge: 260 nm und 300 nm, Diodenarray-Detektor.

**Methode B:** zur Isolierung von Obidoxim-Mononitril und Obidoxim-Monopyridon für MS-Analyse

Eluent A bestand aus einer wäßrigen Lösung aus 10 mM NH<sub>4</sub>acetat, pH 4,5. Eluent B enthielt gleichviel NH<sub>4</sub>acetat wie A bei 50% (v/v) MeOH. Pumpenprogramm: 0,6 ml/min, t: 0-20 min/B: 0-40%, t: 20-30 min/B: 40%, t: 30-40 min/B: 40-100%, t: 40-50 min/B: 100%, t: 50-55 min/B: 100-0%, t: 55-65 min/B: 0%. Laufzeit: 65 min. Säule: LiChroCart LiChrospher 60, RP-select B 250 mm/4 mm/5 µm: Merck, Darmstadt, Deutschland. Detektorwellenlänge: 260 nm und 300 nm, Diodenarray-Detektor.

**Methode C:** zur Verifizierung und Quantifizierung von Obidoxim

Isokratischer Eluent, mit Ionenpaareagenz: 4%iger (v/v) Zusatz an Acetonitril zu einer wäßrigen Lösung aus 4% (v/v) Waters PIC B7 und 0,5% bzw. 0,35% (v/v) Waters PIC A low UV. Fluß: 1,2 ml/min. Laufzeit: 20 min. Säule: LiChroCart LiChrospher 60, RP-select B 125 mm/4 mm/5 µm: Merck, Darmstadt, Deutschland. Detektorwellenlänge: 285 nm, Diodenarray-Detektor.

**Methode D:** zur Detektion und Quantifizierung von DEP-Obidoxim, Obidoxim-Mononitril und Obidoxim-Monopyridon

Eluent A bestand aus einer wäßrigen Lösung aus 4% (v/v) Waters PIC B7 und 0,35% (v/v) Waters PIC A low UV. Eluent B enthielt gleichviel an Ionenpaarreagenzien wie Eluent A, zusätzlich war 20% (v/v) Acetonitril zugesetzt. Pumpenprogramm: 1,2 ml/min, t: 0-20 min/B: 10-60%, t: 20-25 min/B: 60%, t: 25-30 min/B: 60-80%, t: 30-35 min/B: 80-10%. Laufzeit: 40 min. Säule: LiChroCart LiChrospher 60, RP-select B 125 mm/4 mm/5 µm: Merck, Darmstadt, Deutschland. Detektorwellenlänge: 260 nm und 300 nm, Diodenarray-Detektor.

#### 2.4.5 Weitere Methoden

##### Hämoglobinbestimmung

Gesamthämoglobin wurde als Cyanmethämoglobin bestimmt. Erythrozyten-Lysat (1:100) wurde dazu bei Raumtemperatur 1:1 mit Transformationslösung versetzt, nach 10 min erfolgte die Messung der Hämoglobinabsorption gegen Transformationslösung bei 546 nm ( $\epsilon_{546\text{nm}} = 10,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Worek et al. 1999b).

### **Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Protein-Reagenz nach Vorschrift der Fa. Pierce bestimmt.

### **Ultrafiltration**

Ultrafiltrationsexperimente wurden mit Macrosep<sup>TM</sup> Centrifugal Concentrators (Filtron, Northborough, USA) durchgeführt. Hierfür wurde Nativ-Plasma bei 4 °C 30 min lang bei 5000 x g über OMEGA Ultrafiltrationsmembranen zentrifugiert.

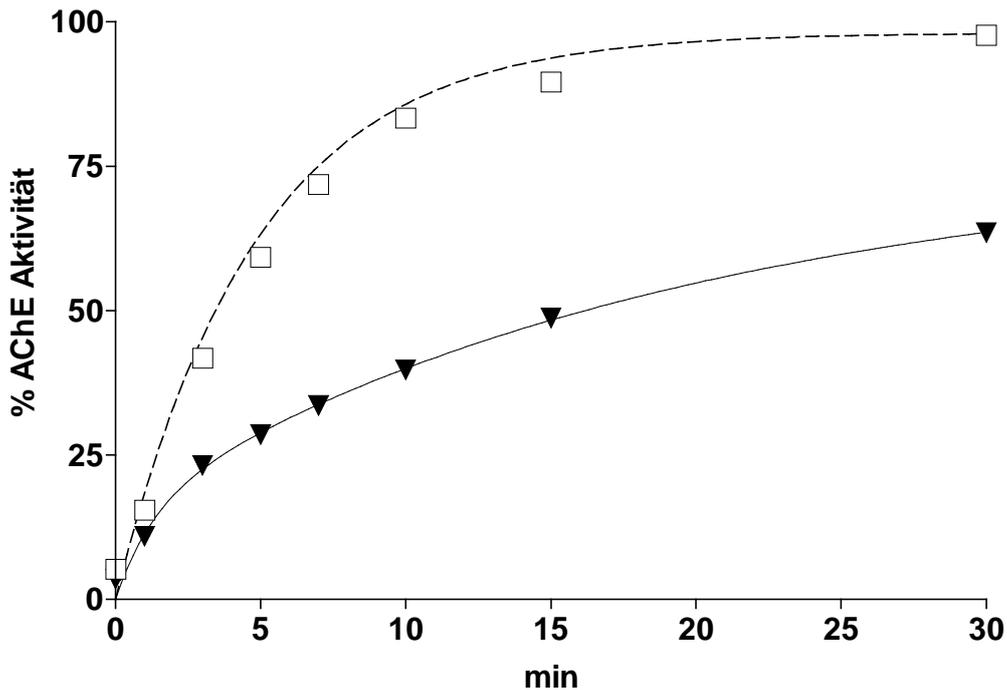
### **Ca<sup>2+</sup>-Entfernung durch Chelex-100**

Eine 1000 µl Eppendorf-Spitze wurde mit Watte abgedichtet, so daß noch sehr leichtes Abtropfen von Flüssigkeit möglich war. Gespült wurde zunächst mit 100 mM EDTA, pH 7,4, um etwaige Reste an Ca<sup>2+</sup> oder anderen Kationen zu komplexieren. Anschließend wurde intensiv mit Aqua bidest. gespült, bevor mit einer Suspension von Chelex-100-Resin in 0,1 M MOPS, pH 7,4, 6 cm hoch beschickt wurde. Dann solange mit 0,1 M MOPS pH 7,4 spülen, bis Eluat pH 7,4 aufweist; anschließend 2 ml Soman-gehemmtes, dialysiertes Plasma (oder andere Probe) aufgeben und bei +6 °C während ca. 30 min mit 0,1 M MOPS, pH 7,4, eluieren. Fraktionen wurden zur Minimierung der Kontamination in Eppendorfcups aufgefangen. Die weitere Probenaufbereitung erfolgte bei +6 °C, da die Stabilität der Ca<sup>2+</sup>-armen Enzympräparate stark temperaturabhängig ist. Im übrigen musste peinlich auf die Abwesenheit von Glasbestandteilen geachtet werden, um jegliches erneutes Einbringen von Ca<sup>2+</sup> zu vermeiden.

### 3 ERGEBNISSE

In der vorgelegten Arbeit wurden Untersuchungen zur Hemmung und Reaktivierung der Serin-Hydrolasen AChE und BChE bei pH 7,4 durchgeführt. Als Enzymquellen dienten Erythrozyten-Acetylcholinesterase (EryAChE) und Zitteraal-AChE sowie die Pseudocholinesterase (BChE) im Plasma. Die Enzymaktivitäten wurden anhand der Spaltung von Acetylthiocholin (ASCh) bzw. Butyrylthiocholin (BSCh) kolorimetrisch modifiziert nach Ellman et al. (1961) bestimmt.

Die Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter AChE aus menschlichem Vollblut (1:4 in 0,1 M PP verdünnt; 3,75 g Hb/dL) mit 10  $\mu$ M Obidoxim bei pH 7,4 und 37 °C verlief deutlich effektiver im Vergleich zur Reaktivierung von konzentriertem humanen, Paraoxon-ethyl-gehemmten Erythrozyten-Lysat (7,5 g Hb/dL). Überdies wurde nicht die Reaktivierungsleistung erbracht, die man auf Grund von In-vivo-Beobachtungen erwartet hätte (Erdmann & v. Clarmann 1963, Worek et al. 1997, Thiermann et al. 1997). Auffallend war auch die Zunahme der Reaktivierungsleistung von Obidoxim mit steigendem Verdünnungsgrad der Enzymquelle, obwohl die Oxim-Konzentration in allen Ansätzen um 3 Größenordnungen über der Konzentration der Enzymquelle lag.



**Abb. 3-1** Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim; Paraoxon-ethyl-gehemmte, humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde in Abwesenheit (t) und in Anwesenheit (O) von Human-Plasma (50%, v/v) mit 10  $\mu$ M Obidoxim in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 37 °C inkubiert. Die gestrichelte Linie ergab sich mit 1:100 verdünnter EryAChE ohne Plasma-Zusatz (Einzelmesspunkte nicht gezeigt). AChE-Aktivität wurde nach dem modifizierten Ellman-Test in Anwesenheit von 20  $\mu$ M Ethopropazin zur Inaktivierung der BChE bestimmt. Die Werte sind als % AChE-Aktivität angegeben und stellen die Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar.

**Abb. 3-1** vergleicht den Obidoxim-bedingten Reaktivierungsverlauf von konzentrierter und verdünnter, humaner Erythrozyten-Suspension, deren AChE durch Paraoxon-ethyl irreversibel blockiert vorlag. Der wichtige Befund hierbei war, daß die Reaktivierung der verdünnten Enzymquelle einer Kinetik 1. Ordnung gehorchte, während sich bei der Verwendung des konzentrierten Enzymansatzes ein biphasischer Verlauf abzeichnete. Dieses Verhalten diente als Hinweis für die Anhäufung von Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim), die bei Verwendung von hohen Enzymkonzentrationen auftritt (Ashani et al. 1998). Erfolgte allerdings die Reaktivierung von konzentrierter Erythrozyten-Suspension (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) in Anwesenheit von Human-Plasma, so verlief die Reaktion nicht mehr biphasisch sondern

monophasisch. In ähnlicher Weise gehorchte auch die Reaktivierung von humanem, heparinisierten Paraoxon-ethyl-gehemmten Vollblut mit 10  $\mu$ M Obidoxim einer Kinetik 1. Ordnung.

Diese Experimente erweckten den Verdacht, daß im Human-Plasma ein Bestandteil für die Spaltung bzw. Inaktivierung des vermutlich gebildeten DEP-Obidoxim vorhanden ist.

### 3.1 Einfluß des Plasmas auf die Reaktivierbarkeit humaner Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE

#### 3.1.1 Welche Rolle spielt BChE bei der Reaktivierung?

Zuerst wurde vermutet, daß die Plasma-BChE hierbei ihre Hände im Spiel hatte, zumal sie in ca. 10-fachem molaren Überschuß im Vergleich zur EryAChE vorliegt. In der Literatur wird auch von einer Scavenger-Funktion der BChE für Organophosphate berichtet (Ashani et al. 1998, Raveh et al. 1993).

Tatsächlich wurde die Reaktivierungsleistung durch Obidoxim gegenüber konzentrierter Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE (Endkonz. 15 g Hb/dL) in Anwesenheit von gereinigter BChE (2130 U) gesteigert. War identische Konzentration an aktiver BChE, human oder equin, im Reaktivierungsansatz, so war EryAChE auch in gleichem Ausmaß reaktiviert worden.

*Verfolgte man die BChE-Aktivität in den Reaktivierungsansätzen, so zeichnete sich nach 10 minütiger Inkubation ein Aktivitätsverlust ab. Diese Beobachtung ließ sich zwanglos mit der Scavenger-Funktion der BChE erklären, deren Resultat eine Hemmung der BChE durch DEP-Obidoxim darstellte.*

Allerdings konnte ein Einfluß durch BChE nicht für die Interpretation der Versuche mit Paraoxon-ethyl-gehemmtem Vollblut herangezogen werden. Denn hierbei lagen sowohl die EryAChE als auch die BChE irreversibel blockiert vor, und im Gegensatz zu Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE läßt sich Paraoxon-ethyl-inhibierte BChE nur schlecht durch Obidoxim reaktivieren. Um jedoch jegliche Reaktivierung der BChE mit daraus resultierender Scavenger-Funktion auszuschließen, wurde das Human-Plasma mit Soman versetzt, einem Nervenkampfstoff, der die Plasma-BChE schnell und irreversibel hemmt, ein rasch alterndes Enzym nach sich zieht und keine Reaktivierung durch Obidoxim erlaubt (Masson & Goasdoue 1986; experimentell bestätigt).

Interessanterweise war aber selbst Soman-gehemmtes, dialysiertes Plasma noch in der Lage, den hemmenden Einfluß von DEP-Obidoxim aufzuheben. Wurde Paraoxon-ethyl-gehemmte, konzentrierte EryAChE mit steigenden Konzentrationen an Soman-behandeltem Plasma versetzt und durch Obidoxim reaktiviert, zeigte sich mit zunehmendem Plasma-Anteil auch eine bessere Reaktivierung.

Im Gegensatz zu Plasma verlor isolierte, gereinigte humane BChE ihre DEP-Obidoxim inaktivierende Wirkung durch Soman-Behandlung vollständig. Auch der reversible Hemmstoff Ethopropazin (20  $\mu$ M) beseitigte die DEP-Obidoxim inaktivierende Wirkung von gereinigter BChE, jedoch nicht die des Plasmas. Es mußte demnach im Plasma neben der BChE als Scavenger noch ein weiteres System vorliegen, das DEP-Obidoxim inaktivierte, aber selbst nicht durch Paraoxon-ethyl, Soman oder Ethopropazin gehemmt wurde.

### 3.1.2 Einfluß von Albumin auf die Reaktivierbarkeit

Reines Human-Albumin als möglicher Plasma-Kandidat trug in einer fast physiologischen Konzentration von 2mg/100µl nicht zur Verbesserung der Reaktivierungsleistung von Obidoxim bei Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE bei; Human-Albumin der Cohn-Fraktion V hingegen bewirkte eine erhöhte Reaktivierung; dieser Effekt war möglicherweise auf den Anteil an aktiver BChE in der Cohn-Fraktion V zurückzuführen.

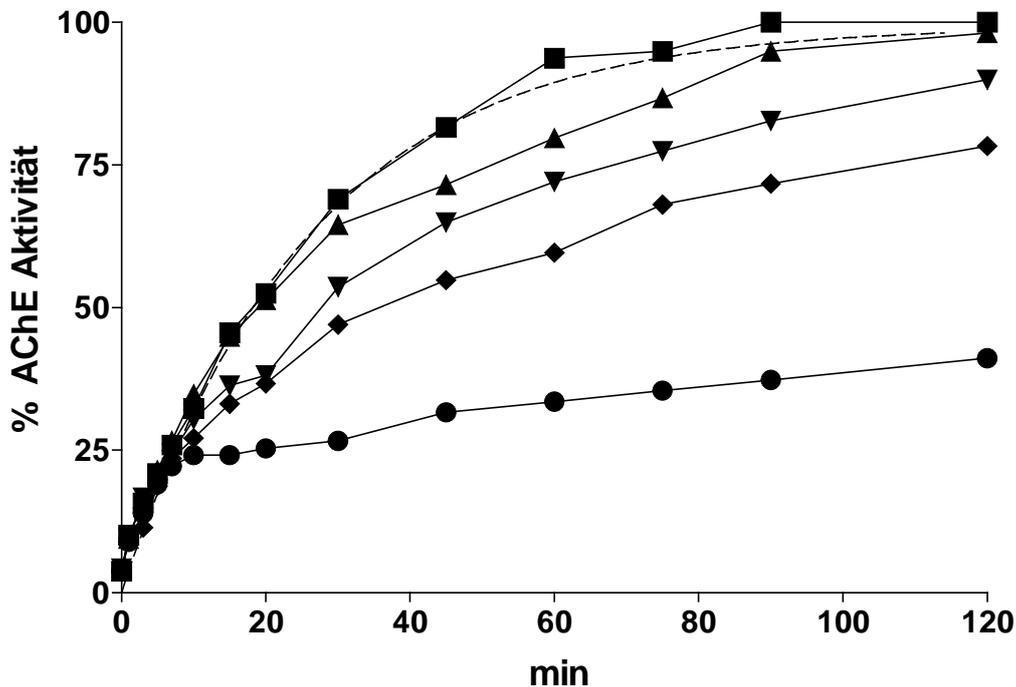
### 3.1.3 Charakterisierung des Plasma-Bestandteils mit DEP-Obidoxim-inaktivierender Fähigkeit

Erhitzen des Human-Plasmas auf 95 °C für 5 min führte zum Verlust der Eigenschaft, DEP-Obidoxim zu inaktivieren, während das Lyophilisieren diese Aktivität nicht minderte. Es wurde daher vermutet, daß es sich hierbei um ein Soman-insensitives Protein handeln mußte, dessen Molekulargewicht mittels Ultrafiltrationsexperimenten auf größer 100 kD festgelegt werden konnte.

Als nun *in vitro* die Kinetik der Hemmung der EryAChE aus humanem Vollblut durch Paraoxon-ethyl (0,1 µM) in An- und Abwesenheit von EDTA (10 mM) gleich verlief, die Reaktivierung durch Obidoxim (10 µM) in Anwesenheit von EDTA jedoch schlechter ausfiel, stellten sich die Weichen für die Formulierung einer Arbeitshypothese. Es wurde postuliert, daß es sich bei dem gesuchten Bestandteil um ein Soman-insensitives und der Organophosphat-Hydrolase verwandtes Enzymsystem handeln mußte, das entsprechend POX-Hydrolase getauft wurde. Diese Art von Enzymen benötigt üblicherweise  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für ihre katalytische Aktivität (Erdös et al. 1960).

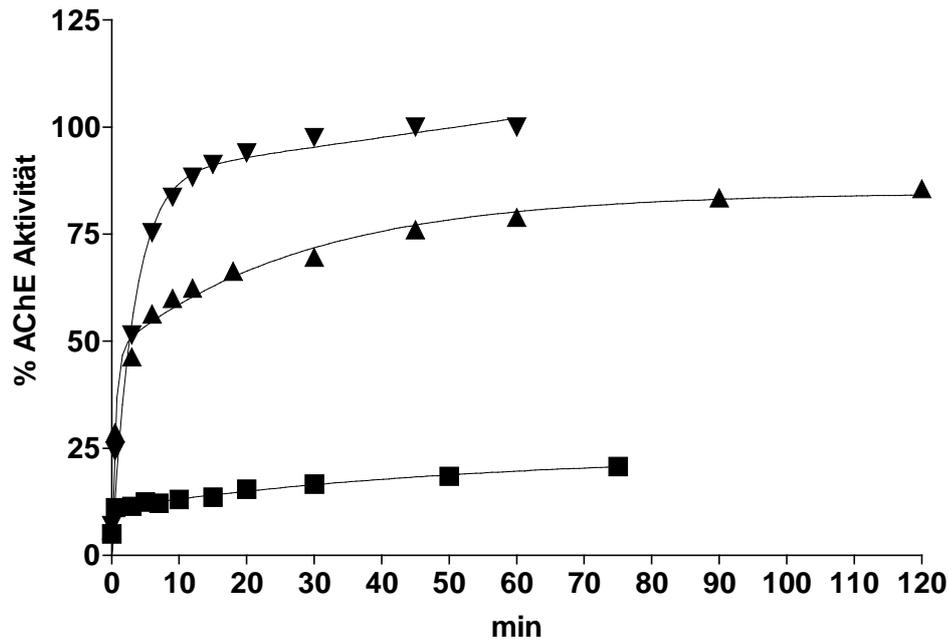
*Um künftig Experimente bei konstanter  $Ca^{2+}$ -Konzentration durchführen zu können, erfolgte die Reaktivierung Paraoxon-ethylgehemmter EryAChE mit Obidoxim in 10 mM PP/1 mM  $Ca^{2+}$ /0,9% NaCl, pH 7,4, wobei die Kinetik der Reaktivierung mit dem Ansatz in 0,1 M PP, pH 7,4, vergleichbar war.*

Zur besseren Unterscheidung zwischen spontaner und Plasma-verursachter DEP-Obidoxim-Inaktivierung wurde die Reaktivierungstemperatur auf 10 °C abgesenkt. Wie der **Abb. 3-2** zu entnehmen ist, war bei dieser Temperatur der biphasische Verlauf der Reaktivierung von konzentrierter Enzymquelle noch stärker ausgeprägt. Die Reaktivierungshalbwertszeit erhöhte sich von 4,3 min bei 37 °C auf 19 min bei 10 °C. Steigende Mengen an Soman-behandeltem Plasma beschleunigten auch hier die Reaktivierung und erzielten schließlich den Verlauf, den man bei Verwendung von verdünnter Erythrozyten-suspension beobachtete.



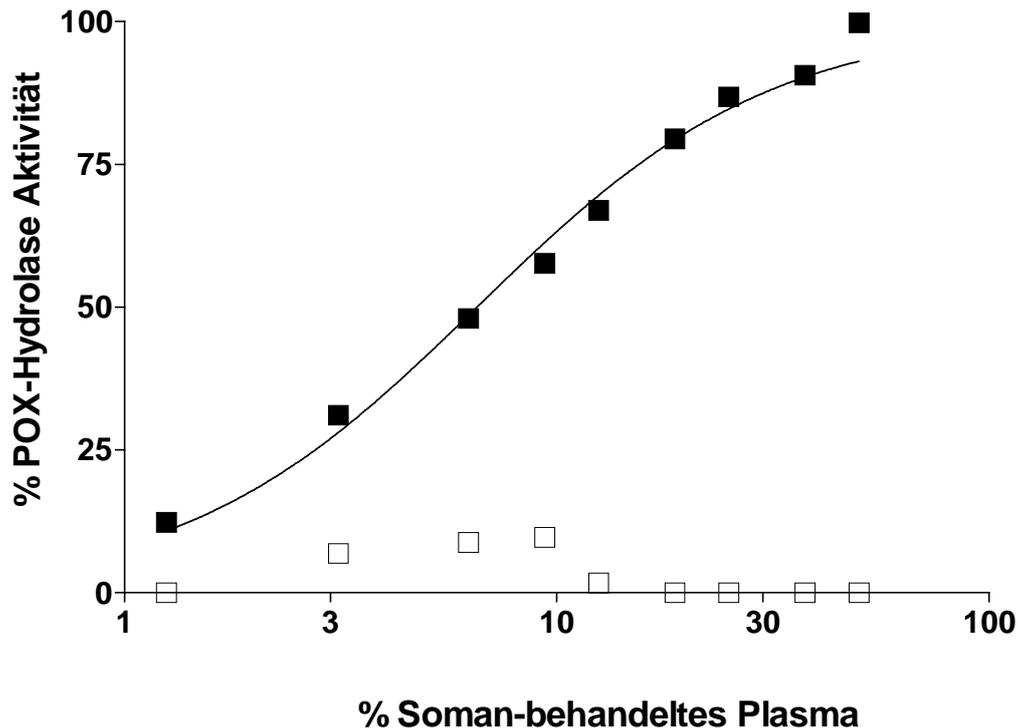
**Abb. 3-2:** Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim in Anwesenheit von Plasma. Paraoxon-ethyl-gehemmte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4, mit 10 μM Obidoxim in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an Soman-behandeltem Humanplasma bei 10 °C inkubiert. Die Plasmakonzentrationen betragen (% v/v): 50 (■), 25 (▲), 10 (▼), 5 (◆) und 0 (●). Die durchbrochene Linie zeigte sich mit verdünntem EryAChE-Ansatz (1:100) ohne Plasma (Einzelwerte sind nicht gezeigt).

*Sehr eindrucksvoll gestaltete sich der Verlauf der Reaktivierung von unterschiedlich stark verdünnter Paraoxon-ethyl gehemmter Zitteraal-AChE durch 1 μM Obidoxim bei 10 °C und pH 7,4 in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine. **Abb. 3-3** hebt den Einfluß von DEP-Obidoxim hervor, das hier aufgrund der deutlich größeren Zahl an aktiven Zentren im Vergleich zu EryAChE in sehr hoher Konzentration gebildet wird.*



**Abb. 3-3** Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim; Paraoxon-ethyl-gehemmte Zitteraal-AChE wurde konzentriert ( $\nabla$ ), 1:10 ( $\triangle$ ) bzw. 1:100 verdünnt ( $\blacksquare$ ) mit  $1 \mu\text{M}$  Obidoxim in  $0,1 \text{ M}$  MOPS/ $0,02\%$  Gelatine, pH  $7,4$ , bei  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die AChE-Aktivität wurde nach dem modifizierten Ellman-Test in  $0,1 \text{ M}$  MOPS/ $0,02\%$  Gelatine, pH  $7,4$ , bestimmt.

An dem  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ -Modell wurde der Einfluß von EDTA auf die Plasma-Aktivität untersucht. **Abb. 3-4** zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Soman-behandeltem Plasma in An- und Abwesenheit von  $5 \text{ mM}$  EDTA. Die Inhibierung war reversibel, ein Überschuß an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ( $7 \text{ mM}$ ) ließ die POX-Hydrolase wieder aktiv werden. In ähnlicher Weise gewann auch Soman-behandeltes Plasma durch den Zusatz von  $2,5 \text{ mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  seine Aktivität wieder, nachdem es in Anwesenheit von  $1$  bzw.  $2 \text{ mM}$  EDTA gegen  $10 \text{ mM}$  PP/ $0,9\%$  NaCl, pH  $7,4$ , und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  dialysiert vorlag.  $\text{Ca}^{2+}$  konnte nicht durch  $2,5 \text{ mM}$   $\text{ZnSO}_4$  oder  $\text{MgCl}_2$  ersetzt werden.



**Abb. 3-4:** Einfluß von Plasma auf die Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim und die Auswirkung durch EDTA. Paraoxon-ethyl-gehemmte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4, mit 10 µM Obidoxim in Abwesenheit (■) und in Anwesenheit (□) von 5 mM EDTA in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen an Soman-behandeltem Humanplasma bei 10 °C während 20 min inkubiert. Die Daten stellen Mittelwerte aus 2-3 Versuchsansätzen dar. Die Berechnung der POX-Hydrolase findet sich im Material- und Methodenteil (Methode durch AChE-Reaktivierung).

An dieser Stelle fiel der Gedanke auf die Paraoxonase/Arylesterase, die sich durch eine vergleichbare Ionensensitivität auszeichnet (Erdös & Boggs 1961).

*In der Literatur (Eckerson et al. 1983a/b, Geldmacher-von Mallinckrodt & Diepgen 1988, Haas & Geldmacher-von Mallinckrodt 1990, La Du 1992) herrscht bisher keine Einigkeit darüber, ob es sich bei der Paraoxonase und der Arylesterase um das gleiche Enzym mit breitem Substratspektrum handelt, oder ob hier verschiedene Proteine vorliegen. Entsprechend wird im folgenden bei der Freisetzung von Phenol aus Phenylacetat von der Arylesterase gesprochen, während für die Hydrolyse von Paraoxon-*

*ethyl von Paraoxonase-Aktivität gesprochen wird, ungeachtet dessen, ob vielleicht das identische Enzym die Hydrolyse der beiden Substrate bewerkstelligt.*

### 3.2 Isolierung der POX-Hydrolase

Bei der Paraoxonase/Arylesterase handelt sich um ein HDL-assoziiertes Glycolipoprotein, das ausgehend von einer Affinitätschromatographie an Cibacron Blue 3GA aus Plasma isoliert erhalten werden kann (Gan et al. 1991). Der Paraoxonase-HDL-Komplex wird hierbei an Cibacron Blue 3GA gebunden und nach Entfernen von Albumin und anderen Proteinen schließlich mit Na-Desoxycholat desorbiert. In der vorgelegten Arbeit wurde die Affinitätschromatographie an Cibacron Blue 3GA eingesetzt, um Soman-behandeltes Plasma aufzureinigen. In den einzelnen Fraktionen mit Paraoxonase/Arylesterase-Aktivität fand sich tatsächlich auch die gesamte POX-Hydrolase Aktivität wieder.

*Der Versuch, Cibacron-gereinigte Paraoxonase/Arylesterase mit Hilfe einer Chromatographie an DEAE inkl. Lyophilisation und Dialyse von HDL zu isolieren, erbrachte nur sehr geringe Ausbeute an Paraoxonase/Arylesterase. Überdies war es aus Stabilitätsgründen erforderlich, dem isolierten Enzympräparat Detergenzien wie z.B. Emulgen zuzusetzen. Derartige Bestandteile beeinflussten jedoch die Aktivität der AChE, die Basis für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität. Daher wurde für weitere Experimente auf diesen Reinigungsschritt über DEAE-Chromatographie verzichtet.*

### 3.3 Auswirkung modifizierender Reagenzien auf die Enzymaktivitäten

Das Ergebnis der gemeinsamen Elution von Paraoxonase/Arylesterase und POX-Hydrolase warf die Frage auf, ob diese Enzymaktivitäten auf ein und dasselbe Enzym zurückzuführen sind.

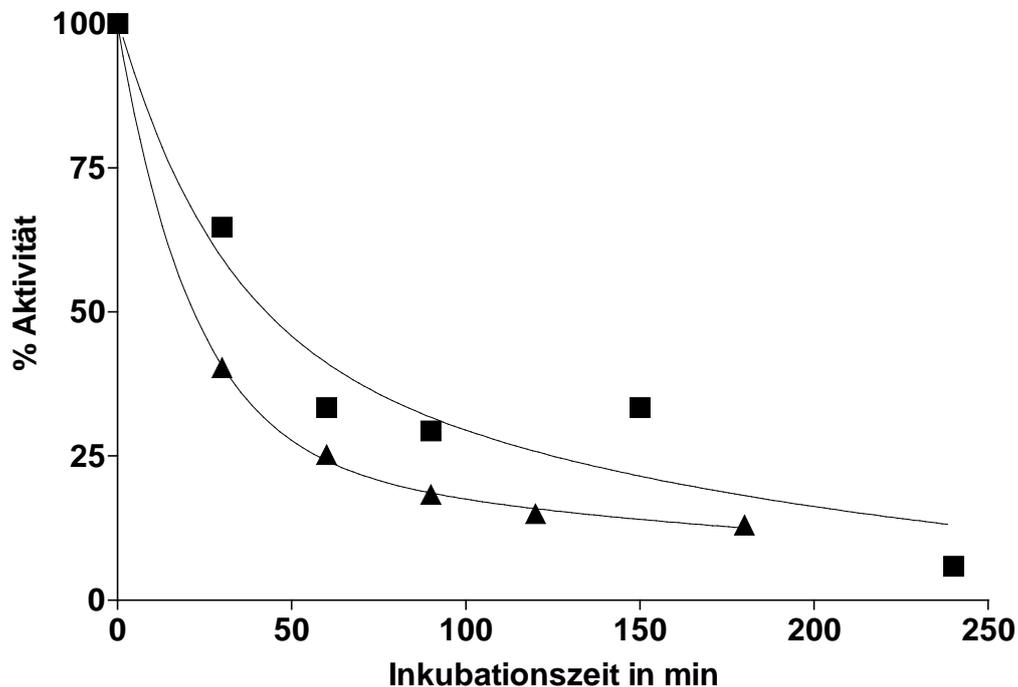
Angelehnt an bisher beschriebene Strukturmerkmale der Paraoxonase/Arylesterase (Erdös et al. 1960, Josse et al. 1999a/b), wurden daher an dem Cibacron-gereinigten Präparat die Einflüsse verschiedener gruppenspezifischer Reagenzien auf die Aktivität der Paraoxonase/Arylesterase und der POX-Hydrolase untersucht.

*Für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität wurde das isolierte und anschließend entsprechend vorbehandelte Enzympräparat mit Paraoxon-ethyl-gehemmter AChE inkubiert. Zu diesem Zweck war es bei allen Experimenten wichtig abzuklären, inwieweit das jeweilige Agens die AChE-Aktivität modifiziert. Im Falle einer Beeinflussung der AChE-Aktivität durch das Reagenz oder auch nur seines Lösungsvermittlers mußte eine Methode zur Eliminierung dieser Substanzen aus dem Cibacron-gereinigten, dialysierten Plasma angewandt werden, die gleichzeitig keinen Effekt auf die POX-Hydrolase und die Paraoxonase/Arylesterase haben durfte. Andernfalls war keine Aussage hinsichtlich der Auswirkung des jeweiligen Agens auf die POX-Hydrolase möglich. Vor diesem Hintergrund waren die Reaktionsbedingungen bei den einzelnen Versuchsprotokollen nicht einheitlich, sondern variierten in Abhängigkeit von der Charakteristik des jeweiligen Reagenzes.*

### 3.3.1 Auswirkung von EDTA und verschiedener Kationen

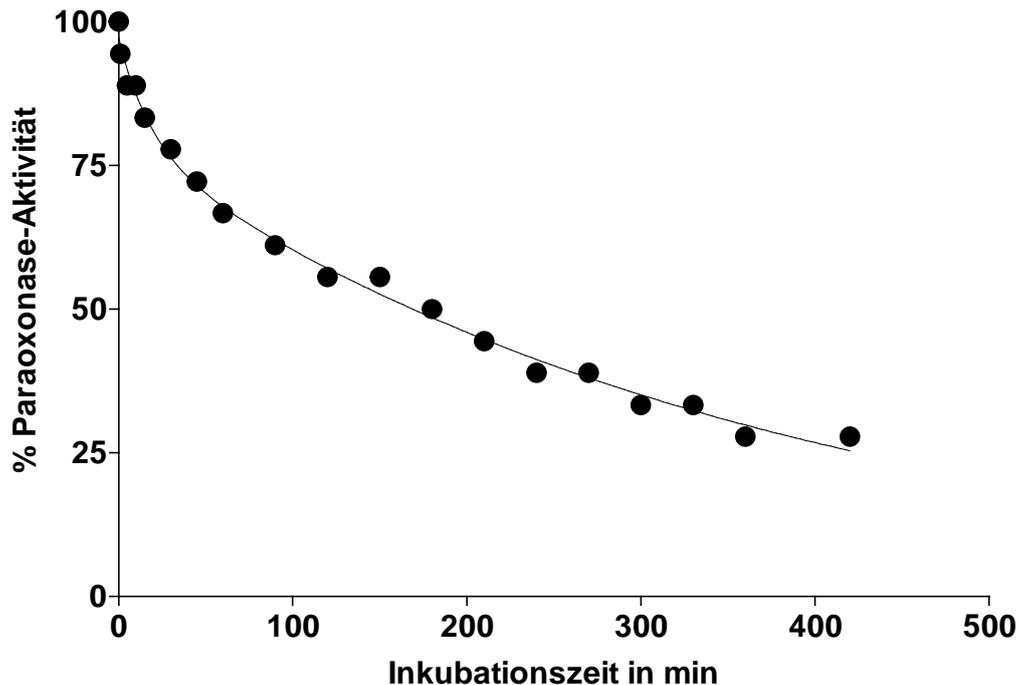
Es ist bekannt, daß  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zum einen für die katalytische Aktivität der Arylester-Spaltung entscheidend sind, zum anderen aber auch zur Stabilität des Enzyms beitragen (Kuo & La Du 1998). Wird die Arylesterase längere Zeit  $\text{Ca}^{2+}$ -frei gehalten, z.B. in Gegenwart von Chelatoren, kann ein nachträglicher  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschuß die Enzymaktivität nicht mehr herstellen. Die duale Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wird von anderen zweiwertigen Ionen unterschiedlich imitiert bzw. antagonisiert. Es lag daher nahe, dieses Verhalten bei der POX-Hydrolase und der Arylesterase vergleichend zu prüfen. Je nach Fragestellung mußten die Randbedingungen (Pufferzusammensetzung, Temperatur, Herkunft der diethylphosphorylierten AChE) variiert werden; sie waren aber für die vergleichenden Untersuchungen identisch.

Wie in **Abb. 3-5** zu sehen ist, bewirkte EDTA (2 mM) eine progressive Hemmung der Arylesterase und der POX-Hydrolase. Dabei hat es den Anschein, als verlief die Inaktivierung bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug nach einer biphasischen Exponentialfunktion.



**Abb. 3-5:** Lyophilisiertes, gegen 10 mM PP/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / 0,9% NaCl, pH 7,4, dialysiertes Cibacron-Soman-Plasma wurde mit 2 mM EDTA bei 37 °C inkubiert, anschließend für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität ( $\blacktriangle$ ) ein Aliquot 1:2 mit Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE (10 mM PP/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ / 0,9% NaCl, pH 7,4) verdünnt, mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim bei 10 °C während 20 min inkubiert, bevor mittels Ellman-Test in 0,1 M PP, pH 7,4, die AChE-Aktivität bestimmt wurde. Ein zweites Aliquot wurde 1:2 mit 10 mM PP/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /0,9% NaCl, pH 7,4, verdünnt und vor der Bestimmung der Arylesterase-Aktivität ( $\blacksquare$ ) mit 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bei 10 °C während 20 min inkubiert.

Um die Anfangsphase besser analysieren zu können, wurde die Inaktivierung bei 25 °C engmaschig verfolgt und dabei die Paraoxon-ethyl-Spaltung verfolgt. Wie **Abb. 3-6** zeigt, folgt auch die Hemmung der Hydrolyse nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug einer biphasischen Kinetik.



**Abb. 3-6:** Hemmung der Paraoxonase (1 mM Paraoxon-ethyl, ohne NaCl) eines Humanplasmas (dialysiert gegen 0,1 M TRIS-HCl/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4) durch 10 mM EDTA bei pH 7,4 und 25 °C.

Zur Frage der Kationen-Sensitivität wurde Soman-behandeltes Plasma oder Cibacron-gereinigtes Protein gegen 0,1 M MOPS/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4, dialysiert und anschließend über eine Chelex 100-Säule mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem MOPS-Puffer eluiert, bevor es mit verschiedenen Kationen (1 mM) bei 37 °C 1 h lang inkubiert wurde. Im Meßansatz der Phenylacetat-Spaltung wurde 0,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  zugesetzt, dem POX-Hydrolase-Test 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , wobei die Konzentration der anderen Kationen im Arylesterase-Test bei 1,5  $\mu\text{M}$ , im POX-Hydrolase-Test bei 400  $\mu\text{M}$  gehalten wurde.

**Tabelle 3-1** zeigt, daß Arylesterase und POX-Hydrolase-Aktivität im wesentlichen gleichartig beeinflusst werden:  $\text{Sr}^{2+}$  stabilisierte beide Enzymaktivitäten,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  stabilisierten die Arylesterase, nicht jedoch die POX-Hydrolase.  $\text{Mg}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  hemmten geringfügig in beiden Enzymtests, die Aktivität blieb aber über die Zeit (1 h) stabil.  $\text{Zn}^{2+}$  hemmte deutlich, was durch EDTA (unter Bedingungen:

$[Zn^{2+}] < [EDTA] < [Ca^{2+}]$ ) aufgehoben werden konnte. Die deutliche Hemmung der Enzymaktivität durch  $Zn^{2+}$  scheint demnach reversibel zu sein. Offensichtlich hat  $Zn^{2+}$  eine höhere Affinität zum Enzym als  $Ca^{2+}$ .

**Tabelle 3-1** Einfluß verschiedener Kationen (1 mM) auf Arylesterase und POX-Hydrolase

	CaCl <sub>2</sub>	MnCl <sub>2</sub>	SrCl <sub>2</sub>	BaCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub>	NiSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>
<b>Aryl- esterase</b>	stabil	stabil	stabil	stabil	gering- fügig gehemmt	gering- fügig gehemmt	gehemmt
<b>POX- Hydrolase</b>	stabil	inaktiv	stabil	inaktiv	gering- fügig gehemmt	gering- fügig gehemmt	gehemmt

### 3.3.2 Auswirkungen von Tb<sup>3+</sup>

Josse et al. postulieren 1999 (b) die Beteiligung eines Tryptophan-Restes am Aufbau des aktiven Zentrums der Paraoxonase/Arylesterase. Das Lanthanid und Ca<sup>2+</sup>-Analogon Tb<sup>3+</sup> eignete sich aufgrund seiner Affinität, mit Tryptophan zu komplexieren, für vergleichende Messungen an Paraoxonase/Arylesterase und POX-Hydrolase.

Die Paraoxonase/Arylesterase wurde durch Tb<sup>3+</sup> (100 µM) reversibel gehemmt, selbst bei Vorliegen eines Ca<sup>2+</sup>-Überschußes (1 mM). Für diese Bestimmung war es erforderlich, nicht nur das konzentrierte Enzympräparat mit Tb<sup>3+</sup> und Ca<sup>2+</sup> zu inkubieren, sondern diese Ionenmischung auch direkt dem Arylesterase-Meßansatz zuzusetzen.

Die durch Tb<sup>3+</sup> verursachte Hemmung konnte durch EDTA aufgehoben werden, solange Ca<sup>2+</sup> gegenüber EDTA im Überschuß vorlag (z.B. 100 µM Tb<sup>3+</sup>, 1 mM Ca<sup>2+</sup>, 500 µM EDTA). War allerdings Paraoxonase/Arylesterase mit Tb<sup>3+</sup> und Ca<sup>2+</sup> vorinkubiert und kam

EDTA als Komplexbildner erst nach bereits erfolgter Substratspaltung in den Reaktionsansatz, so wurde die Ausgangsaktivität nicht wieder komplett erreicht.  $Tb^{3+}$  schien zudem eine sehr viel höhere Affinität zum Enzym und zu EDTA zu besitzen als  $Ca^{2+}$ .

*Auch der Effekt der erheblich schnelleren Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter Zitteraal-AChE in Anwesenheit der POX-Hydrolase wurde durch 100  $\mu M$   $Tb^{3+}$  praktisch aufgehoben. Howells und Coult (1971) beschreiben zwar eine schlechtere Reaktivierung von Sarin-gehemmter AChE (bovine Erythrozyten) mit Pyridin-2-aldoxim durch den Zusatz von Yttrium und Marquis (1984) beschreibt  $Tb^{3+}$  als AChE-Inhibitor, der vermutlich die Struktur des aktiven Zentrums der AChE verändert, wodurch der Zugang des Reaktivators erschwert wird. Doch selbst unter Berücksichtigung der experimentell beobachteten schwächeren Reaktivierungsleistung von Obidoxim für Paraoxon-ethyl-gehemmte Zitteraal-AChE in Anwesenheit von 100  $\mu M$   $Tb^{3+}$  übertraf die  $Tb^{3+}$ -verursachte Hemmung der POX-Hydrolase deutlich die  $Tb^{3+}$ -bedingt herabgesetzte Reaktivierung.*

### 3.3.3 Einfluß von N-Bromsuccinimid (NBS)

Spande und Witkop (1967) beschreiben eine Änderung des Tryptophan-Spektrums durch N-Bromsuccinimid (NBS) und Josse et al. (1999a) setzen NBS als spezifisches Reagenz für Tryptophan ein, um eine Hemmung der Paraoxonase/Arylesterase zu erzielen.

Cibacron-gereinigtes Enzym in 0,1 M MES/0,1 mM  $Ca^{2+}$ , pH 6,5, wurde mit 0,2 mM NBS für 15 min bei 37 °C inkubiert, dann mit 0,2 mM Tryptophan zum Abfangen von freiem NBS versetzt, bevor es in den Arylesterase- oder POX-Hydrolase-Test eingesetzt wurde. Die Arylesterase-Aktivität war auf 7% gefallen, die POX-Hydrolase auf

11%. Zusatz von nativem Enzym erhöhte die Arylesterase-Aktivität auf 57%, die der POX-Hydrolase auf 62% der erwarteten Aktivität. Somit wurden beide Enzymaktivitäten in gleichem Ausmaß durch das Tryptophan-Reagenz gehemmt.

### 3.3.4 Einfluß von Carbodiimiden

Carbodiimide wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-HCl (EDC) gelten als spezifische Reagenzien für die Modifizierung von peptidisch gebundener Asparaginsäure und Glutaminsäure (Lundblad 1991). Von den Carbodiimiden war daher erwartet worden, daß sie eine Hemmung der Arylesterase hervorrufen (Josse et al. 1999a). Diese Inaktivierung bestätigte sich in den Versuchsansätzen mit 500  $\mu$ M DCC bzw. 1 mM EDC, in denen die Arylesterase-Aktivität des dialysierten, Cibacron-gereinigten Soman-Plasmas verfolgt wurde. Hierbei wirkte sich die Art des Inkubationsmediums auf das Ausmaß des Hemmeffektes aus. So ließ sich die Arylesterase durch DCC in 0,1 M MES/100  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 6,5, am stärksten inaktivieren. Josse et al. (2001) beschreiben, daß eine Modifizierung von Asparaginsäure/Glutaminsäure nur bei pH 6,0 und nicht bei pH 7,0 erfolgt.

Auch die AChE wird durch den Zusatz von Carbodiimiden in ihrer Aktivität gehemmt (Volkova & Kochetova 1981). Aus diesem Grund mußte ein Überschuß an Carbodiimid während der Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter AChE bei der Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität vermieden werden. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Carbodiimid (1 mM EDC bzw. 2 mM DCC bei 37 °C) wurde daher das Cibacron-gereinigte Soman-Plasma gegen 1 mM PP/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , pH 7,4, dialysiert und lyophilisiert, bevor es anschließend in den

Arylesterase- bzw. POX-Hydrolase-Test eingesetzt wurde. Die Aktivität des Erwartungswertes lag jeweils bei 30% (**Tabelle 3-2**).

### 3.3.5 Einfluß von Phenylmercuriacetat (PMA) und p-Hydroxymercuribenzoat (p-OHMB)

Ziel der Experimente mit den angeführten Quecksilberverbindungen war es, SH-Gruppen-tragende Aminosäuren zu blockieren und somit die Paraoxonase/Arylesterase in ihrer Aktivität zu beeinflussen. Als Ergebnis war festzuhalten, daß in den Ansätzen, in denen die Arylesterase durch Behandlung mit p-OHMB bzw. PMA komplett blockiert vorlag, auch die POX-Hydrolase nicht mehr aktiv war.

**Tabelle 3-2** fasst die Ergebnisse mit den einzelnen modifizierenden Reagenzien zusammen.

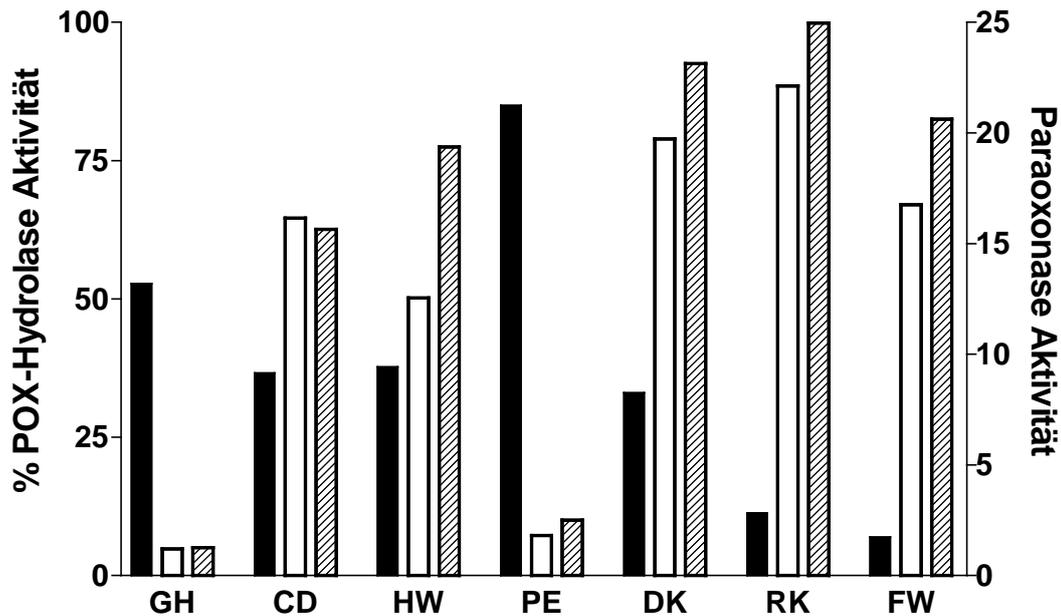
**Tabelle 3-2:** Einfluß verschiedener Reagenzien auf die Paraoxonase/Arylesterase und die POX-Hydrolase

Reagenz	%	%	Reaktion mit
	Paraoxonase/ Arylesterase	POX- Hydrolase	
EDTA	Keine Aktivität	Keine Aktivität	Ca <sup>2+</sup>
Tb <sup>3+</sup>	Keine Aktivität	Keine Aktivität	Tryptophan
N-Bromsuccinimid (NBS)	7%	11%	Tryptophan
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	30%	30%	Asparaginsäure
1-Ethyl-3-(3-dimethylamino- propyl)carbodiimid (EDC)			Glutaminsäure
Phenylmercuriacetat (PMA)			
p-Hydroxymercuribenzoat (p-OHMB)	Keine Aktivität	Keine Aktivität	SH-Gruppen

### 3.4 Identität der Paraoxonase/Arylesterase und der POX-Hydrolase?

Die bisherigen Ergebnisse bestätigten die Vermutung, daß die Paraoxonase/Arylesterase- und die POX-Hydrolase-Aktivität einem gemeinsamen Protein entspringen.

Die humane Paraoxonase/Arylesterase existiert in zwei genetisch determinierten, polymorphen und unterschiedlich aktiven Formen (mit entsprechender Anzahl an Phenotypen) (La Du 1992). Diese Eigenschaft war ein Ansatzpunkt, um der Frage nach der Identität der Paraoxonase/Arylesterase und der POX-Hydrolase näher auf den Grund zu gehen. Um zu beurteilen, ob der Reaktivierungseffekt mit den Paraoxonase/Arylesterase-Aktivitäten bei einzelnen Probanden korreliert, sind in **Abb. 3-7** die Paraoxonase- und die POX-Hydrolase-Aktivität von sieben gesunden Probanden beiderlei Geschlechts aufgezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Verteilung der POX-Hydrolase und der Paraoxonase miteinander nicht korrelieren. So zeigen die Probanden GH und PE gegenüber RK und FW inverse Aktivitätsverhältnisse.

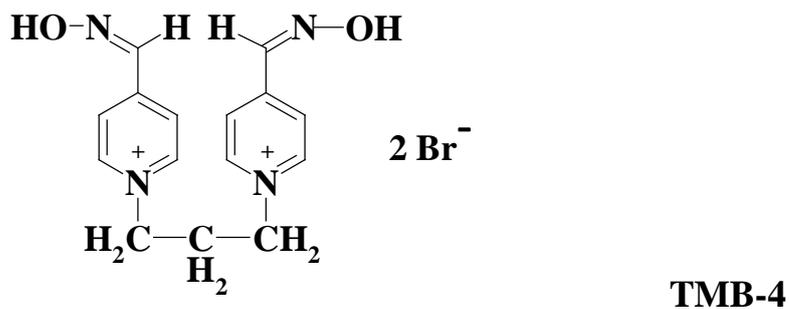
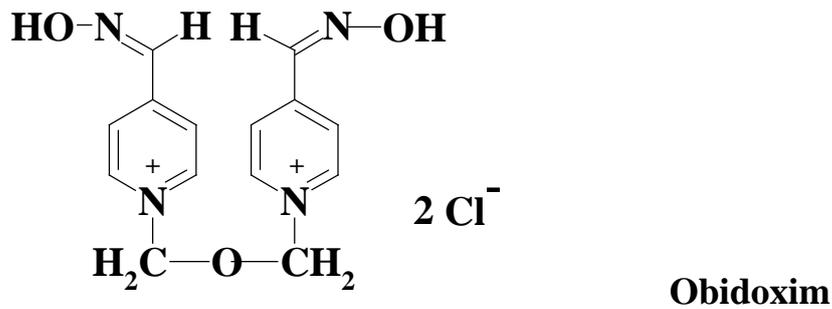


**Abb. 3-7:** Verteilung der Paraoxonase und der POX-Hydrolase-Aktivität bei 7 gesunden Probanden. *Schwarze Balken*, Paraoxonase; *Weißer Balken*, Diethylphosphoryl-Obidoxim-Hydrolase; *Schraffierte Balken*, Diethylphosphoryl-TMB-4-Hydrolase. Für die Quantifizierung der POX-Hydrolase-Aktivität wurde Diethylphosphoryl-AChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) mit 10  $\mu$ M Obidoxim oder TMB-4 in Anwesenheit von 25% (v/v) Soman-behandeltem Plasma in 0,1 M TRIS-HCl/1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4, bei 37 °C während 10 min inkubiert, bevor direkt im Anschluß die AChE-Aktivität bestimmt wurde. Die AChE-Aktivität wurde mit der Aktivität verglichen, die durch die Reaktivierung einer 1:100 verdünnten EryAChE-Zubereitung zu erzielen war (=100%-Wert; die Berechnung findet sich im Material- und Methodenteil; Methode durch AChE-Reaktivierung). Die Paraoxonase-Aktivität bezieht sich auf den Proteingehalt des Soman-behandelten und dialysierten Plasmas und wird als mU/mg Protein ausgedrückt ( $\mu$ mol/min pro g).

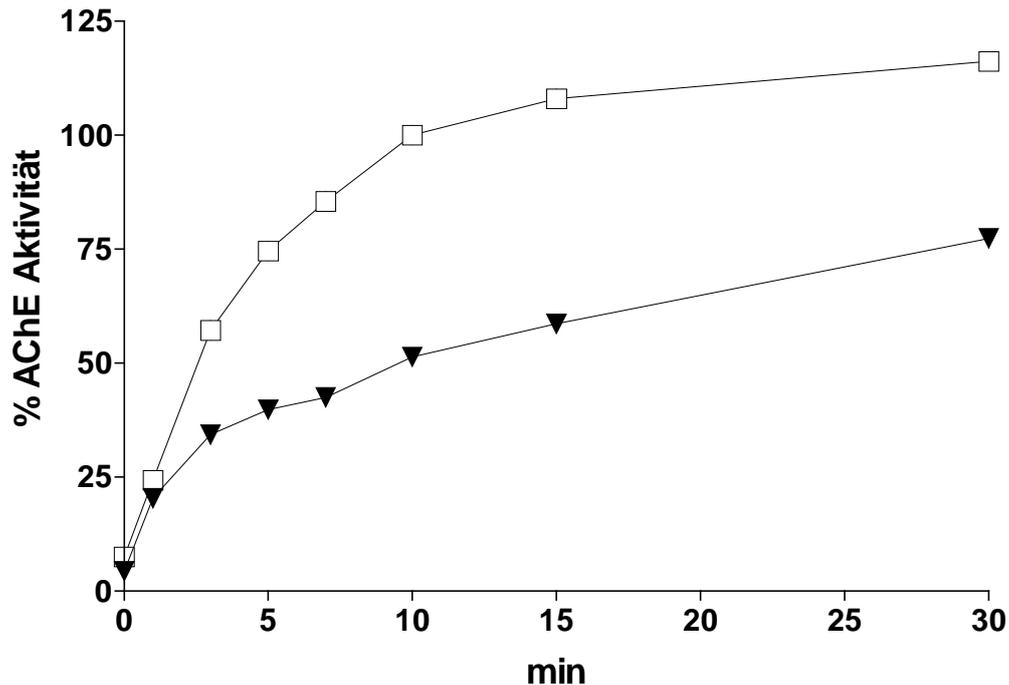
An dieser Stelle entstanden große Zweifel an der Identität der beiden Enzyme. Auch in Soman-behandeltem Kaninchenplasma mit ausgesprochen hoher Paraoxonase-Aktivität (Aldridge 1953a; 31,3 mU/mg Protein in eingesetzter Probe) konnte nur vergleichsweise wenig POX-Hydrolase-Aktivität nachgewiesen werden (31% für die Spaltung von DEP-Obidoxim, in **Abb. 3-7** nicht gezeigt).

### 3.5 Substratspezifität der POX-Hydrolase

Bei den bisher erwähnten Experimenten war Obidoxim der Reaktivator, ein Pyridinium-4-aldoxim. Zur gleichen Substanzgruppe mit ausgezeichneten Reaktivierungseigenschaften zählt auch TMB-4.



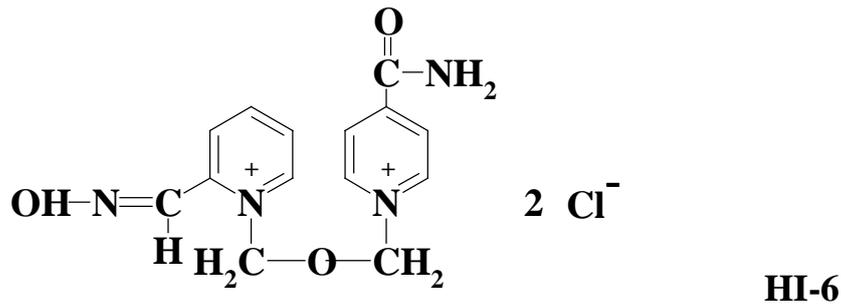
Wurden die Reaktivierungsversuche anstelle von Obidoxim mit TMB-4 in identischer Konzentration (10 µM) durchgeführt, so war auch dann ein vergleichbarer biphasischer Verlauf zu beobachten, wenn die Enzymkonzentration hoch gewählt war. Zusatz von Humanplasma ermöglichte auch hier eine erheblich bessere Reaktivierung (**Abb. 3-8**).



**Abb. 3-8:** Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch TMB-4. Paraoxon-ethyl-inhibierte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde in Abwesenheit (τ) und in Anwesenheit (○) von Humanplasma (50%, v/v) mit 10 μM TMB-4 in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 37 °C inkubiert. AChE-Aktivität wurde nach einer modifizierten Ellman-Methode in Anwesenheit von 20 μM Ethopropazin zur Inhibierung der BChE-Aktivität bestimmt.

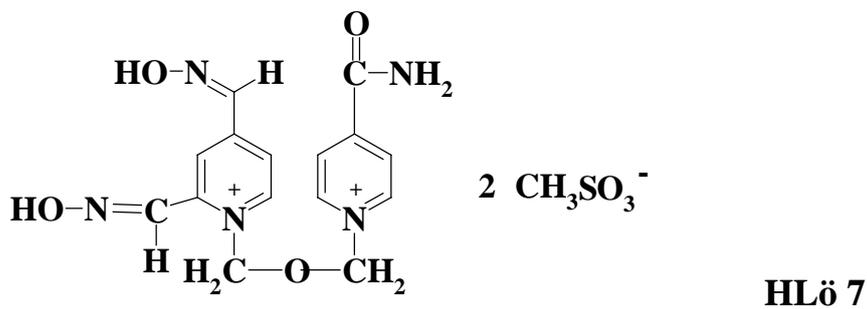
Dies war wieder ein Zeichen für das sich bildende Phosphoryloxim. In **Abb. 3-7** ist zusätzlich die POX-Hydrolase-Aktivität aufgetragen, die aus Soman-behandeltem Plasma für die Spaltung des DEP-TMB-4 ermittelt wurde. Die POX-Hydrolase zeigte sich demnach gleich aktiv hinsichtlich der Spaltung der beiden Substrate DEP-Obidoxim und DEP-TMB-4.

Ein ganz anderes Bild präsentierte sich bei der Reaktivierung von DEP-AChE mit HI-6, einem Pyridinium-2-aldoxim.

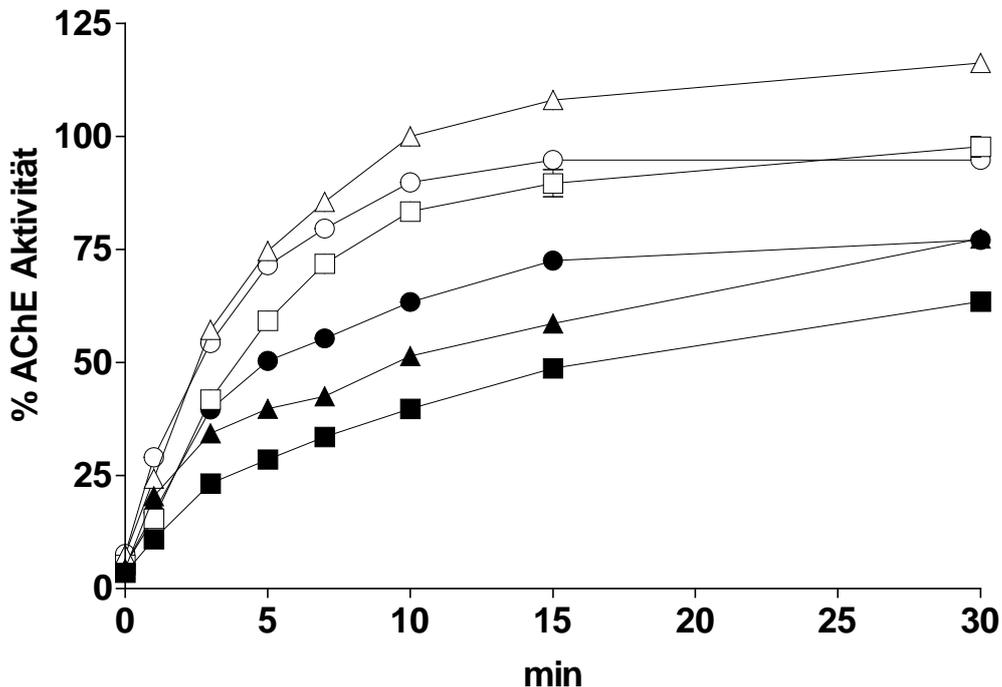


Bereits die Reaktivierung von konzentrierter Enzymquelle mit 536  $\mu\text{M}$  HI-6 gehorchte streng einer Kinetik 1. Ordnung, dementsprechend bewirkte auch der Zusatz von Soman-behandeltem Plasma keine Änderung im Reaktivierungsverlauf.

HLö 7 stellt mit 2 Oximfunktionen an einem Ring, in 2- und 4-Position, eine Kombination aus bisher eingesetzten Pyridiniumaldoximen dar.



Die Reaktivierung mit 31,6  $\mu\text{M}$  HLö 7 verlief in Abwesenheit von Plasma biphasisch und wandelte sich unter Plasma-Zusatz hin zum monophasischen Verlauf. Der Grad an biphasischen Verlauf war jedoch deutlich geringer als bei den Versuchen mit den reinen Pyridinium-4-aldoximen (**Abb. 3-9**).



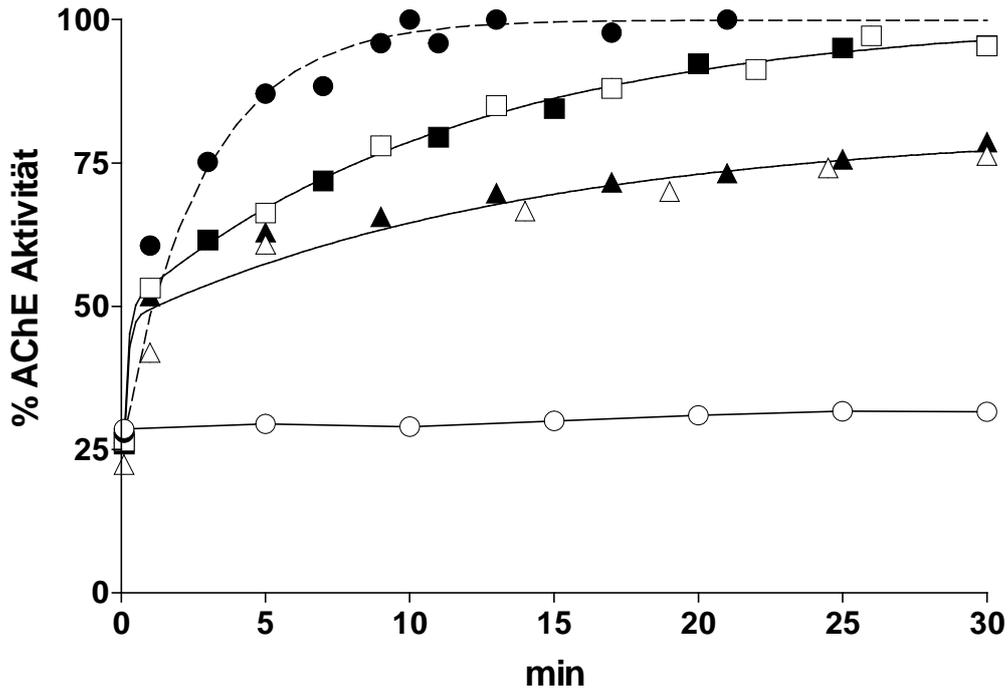
**Abb. 3-9:** Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch verschiedene Oxime. Paraoxon-ethyl-inhibierte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde in Abwesenheit (*schwarze Symbole*) und in Anwesenheit (*weiße Symbole*) von Humanplasma (50%, v/v) mit 10  $\mu$ M Obidoxim ( $\circ$ ), 10  $\mu$ M TMB-4 ( $\square$ ), bzw. 31,6  $\mu$ M HLö 7 ( $\triangle$ ) in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 37 °C inkubiert. AChE-Aktivität wurde nach einer modifizierten Ellman-Methode in Anwesenheit von 20  $\mu$ M Ethopropazin zur Inhibierung der BChE-Aktivität bestimmt.

Variationen in der Substratbeschaffenheit bestehen auch hinsichtlich des Phosphoryl-Restes. Bisher wurde von Versuchen berichtet, in denen die AChE durch Paraoxon-ethyl, einem Diethyl-Organophosphat, gehemmt vorlag. Einige Insektizide (z.B. **Metasystox**) bilden hingegen dimethylphosphorylierte AChE, während die Exposition gegenüber **Diisopropylfluorophosphat (DFP)** diisopropylphosphorylierte AChE als Komplex nach sich zieht.

Entstehen auch bei diesen Organophosphaten bei der Reaktivierung entsprechend stabile Phosphoryloxime und kann die POX-Hydrolase ihren Einfluß bei der Reaktivierung durch Oxime geltend machen?

Zunächst wurde der ChE-Inhibitor Paraoxon-ethyl durch **Paraoxon-methyl** ersetzt. Aus AChE entsteht hierbei das dimethylphosphorylierte

Enzym (DMP-AChE), das sich durch eine hohe Spontanreaktivierungs- und Alterungsrate auszeichnet. Aufgrund der ausgesprochen schnellen Spontanreaktivierung von Dimethylphosphoryl-AChE ( $t_{1/2} = 0,7$  h; Worek et al. 1999a), erschien die Beobachtung des Reaktivierungsverlaufs mit Soman-Plasma bei 37 °C mit ohnehin schwach ausgeprägter POX-Wirkung wenig aussagekräftig. Um dennoch die Frage nach einem POX-Hydrolase-Effekt befriedigend beantworten zu können, wurde die Reaktivierung mit 100 µM Obidoxim bei 10 °C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen waren Spontanreaktivierung und Alterung vergleichsweise langsam, so daß eine POX-Inaktivierung durch Soman-behandeltes Plasma eindeutig von der Spontanreaktivierung abgegrenzt werden konnte. Dieser Befund deutete darauf hin, daß das vermutlich gebildete Dimethylphosphoryl (DMP)-Obidoxim auch ein Substrat für die POX-Hydrolase darstellt (**Abb. 3-10**).

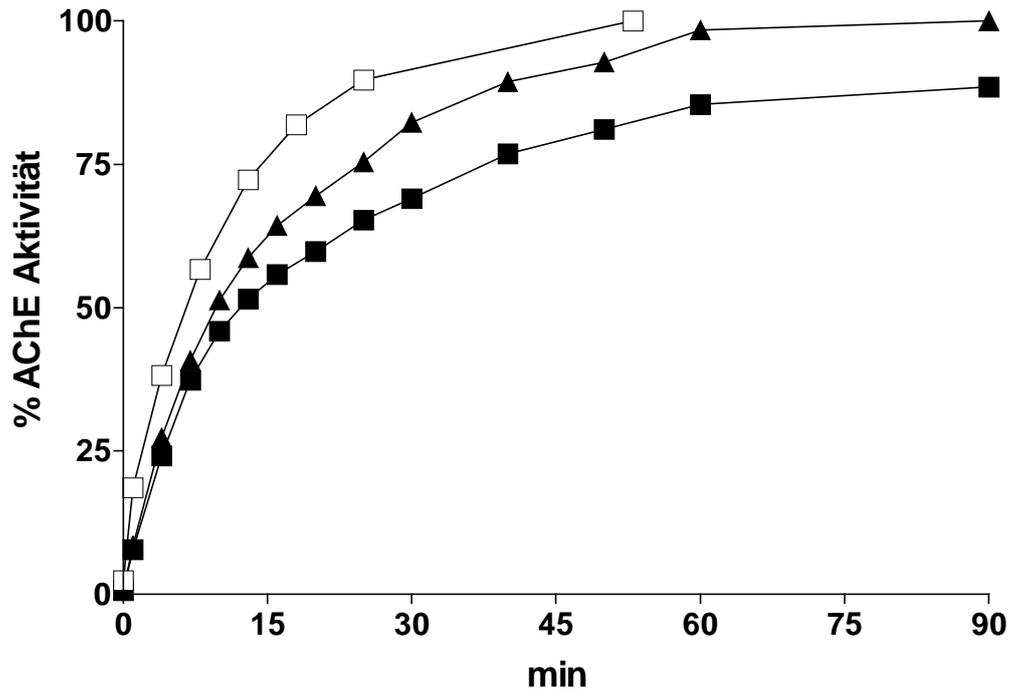


**Abb. 3-10:** Reaktivierung von Dimethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim. Paraoxon-methyl-inhibierte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde mit 100  $\mu$ M Obidoxim in Abwesenheit (●) und in Anwesenheit (■) (2 Experimente) von Soman-behandeltem Humanplasma (50% v/v) in 10 mM PP/1 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,9% NaCl, pH 7,4, bei 10 °C reaktiviert. Die Spontanreaktivierung (○) wurde ohne Obidoxim in Anwesenheit von Plasma bestimmt. Die durchbrochene Linie (▲) zeigt die Werte für Paraoxon-methyl-inhibierte humane EryAChE, 1:10 verdünnt (7,5 g Hb/dL) in Anwesenheit von 50% Plasma.

Reaktivierte man (unter Bedingungen für eine Reaktion pseudo 1. Ordnung) einen 1:10 verdünnten Paraoxon-methyl-gehemmten Enzymsatz (0,75 g Hb/dL) in 10 mM PP/1 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,9% NaCl, pH 7,4, mit 100  $\mu$ M Obidoxim bei 10 °C, erfolgte dies mit einer Halbwertszeit von ca. 2 min. Die Berechnung der erwarteten Halbwertszeit für diese Reaktivierung ergab einen Wert von 1,9 min. Hierfür bediente man sich zum einen  $k_r = 4,24 \text{ min}$  und  $K_D = 163 \mu\text{M}$  bei 37 °C (Worek et al. 1999a in 0,1 M PP, pH 7,4), zum anderen eines experimentell ermittelten Faktors von 4,5, der für die Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE mit 10  $\mu$ M Obidoxim bei pH 7,4 und 10 °C (19 min) im Vergleich zu 37 °C (4,3 min) bestimmt wurde.

Soman-behandeltes Plasma mit geringer POX-Hydrolase-Aktivität gegenüber DEP-Obidoxim (PE in **Abb. 3-7**) zeigte auch nur schwache Hydrolyseaktivität gegenüber DMP-Obidoxim. Allerdings ist der "Entgiftungs"-Effekt auch in Plasma mit ausgeprägter Hydrolyse-Aktivität gegenüber DEP-Obidoxim deutlich geringer als für DEP-Obidoxim; DMP-Obidoxim stellt vermutlich nur ein schlechtes Substrat für die POX-Hydrolase dar.

Über die Existenz und Stabilität von Phosphoryloximen, die sich während der Inkubation von **DFP**-gehemmter AChE mit Oximen bilden könnten, ist wenig bekannt. Zunächst wurde daher die Reaktivierungskinetik von DFP-gehemmter humaner EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4, und 37 °C mit 100 µM Obidoxim mit und ohne Zusatz von Soman-behandeltem Plasma (50%, v/v) verfolgt. Zum einen beobachtete man einen nur gering ausgebildeten POX-Effekt, andererseits arbeitete die POX-Hydrolase sowohl bei 10 °C als auch bei 37 °C nur zögerlich, so daß man davon ausgehen kann, daß das vermutliche Diisopropylphosphoryl (DIP)-Obidoxim nur ein schwaches Substrat für die POX-Hydrolase des Human-Plasmas darstellt (**Abb. 3-11**).



**Abb. 3-11:** Reaktivierung von Diisopropylphosphoryl-AChE durch Obidoxim. Diisopropylphosphoryl (DIP)-inhibierte humane EryAChE (Endkonzentration 7,5 g Hb/dL) wurde mit 100  $\mu\text{M}$  Obidoxim in Abwesenheit ( $\square$ ) und in Anwesenheit ( $\blacktriangle$ ) von Soman-behandeltem Humanplasma (50%, v/v) in 10 mM PP /1 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,9% NaCl, pH 7,4, bei 37 °C reaktiviert. Nur die Reaktivierung des verdünnten AChE-Präparats (0,75 g Hb/dL; 1 ) durch Obidoxim gehorchte einer Kinetik 1. Ordnung.

*Die Halbwertszeit der Reaktivierung eines 1:100 verdünnten, DFP-gehemmten EryAChE-Präparats (0,075 g Hb/dL) in 10 mM PP/1 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,9% NaCl, pH 7,4, lag für 100  $\mu\text{M}$  Obidoxim bei 10 min, für 10  $\mu\text{M}$  Obidoxim bei 35 min. (Reaktion pseudo 1. Ordnung). Aus  $k_{obs} = k_r/(1+K_D/Ox)$  berechnete sich  $K_D$  zu 37,4  $\mu\text{M}$  und  $k_r$  zu 0,0948  $\text{min}^{-1}$ .*

### 3.6 Systeme, bei denen Bildung von DEP-Obidoxim beobachtet wurde

Die Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter BChE durch Obidoxim verläuft nur sehr zögerlich und bedarf höherer Konzentrationen an Obidoxim im Vergleich zu AChE (Aldridge & Reiner 1972, Hahn & Henschler 1969, Thiermann et al. 1997). Daß hierfür ein Einfluß durch DEP-Obidoxim mitverantwortlich ist, bestätigte sich in Experimenten, in denen der Zusatz an POX-Hydrolase, in Form von dialysiertem Soman-Plasma, die Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-gehemmter BChE effizienter ausfallen ließ. Die Reaktivierungshalbwertszeit für humane Paraoxon-ethyl-gehemmte BChE mit 100 µM Obidoxim bei 37 °C in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4, lag bei 42,5 min, wenn eine 1:10 verd. Plasmaprobe eines Probanden mit nur sehr geringer POX-Hydrolase-Aktivität (PE) unter Zusatz von Somanplasma mit ausgeprägter POX-Hydrolase-Aktivität reaktiviert wurde und somit die Bedingungen für eine Reaktion pseudo 1. Ordnung erfüllt waren. Die Reaktivierung ohne Soman-Plasmazusatz verlief hingegen biphasisch, wobei die 2. Phase eine Halbwertszeit von 176 min aufzeigte.

*Anzumerken ist hierbei, daß die schlechte Reaktivierung von Paraoxon-ethyl-BChE sicherlich nicht nur auf den Einfluß von DEP-Obidoxim zurückzuführen ist, sondern wohl im Aufbau des aktiven Zentrums der BChE begründet liegt.*

Basierend auf der Kenntnis, daß BChE eine Scavenger-Funktion u.a. für Organophosphate besitzt, wurde geprüft, inwieweit der EryAChE eine ähnliche Funktion zugesprochen werden kann. Zu diesem Zweck wurde Paraoxon-ethyl gehemmtes Plasma (1:10 verd.) eines Probanden mit nur

sehr geringer POX-Hydrolase-Aktivität (PE) mit ungehemmten, nicht hämolysierten Erythrozyten (Endkonz. 15 g Hb/dL) und 130  $\mu$ M Obidoxim bei 37 °C inkubiert (in 10 mM PP/1 mM CaCl<sub>2</sub>/0,9% NaCl, pH 7,4). Im Falle hoher Affinität der EryAChE zu DEP-Obidoxim konnte man bei diesem Versuchsansatz erwarten, daß Paraoxon-ethyl-gehemmte BChE schneller reaktivieren würde und dabei gebildetes DEP-Obidoxim von ungehemmter EryAChE abgefangen wird. In den Experimenten zeigte sich in Anwesenheit der EryAChE tatsächlich eine gesteigerte Reaktivierung der Paraoxon-ethyl-gehemmten BChE. Eine Inaktivierung der EryAChE hingegen war dabei nicht zu erkennen.

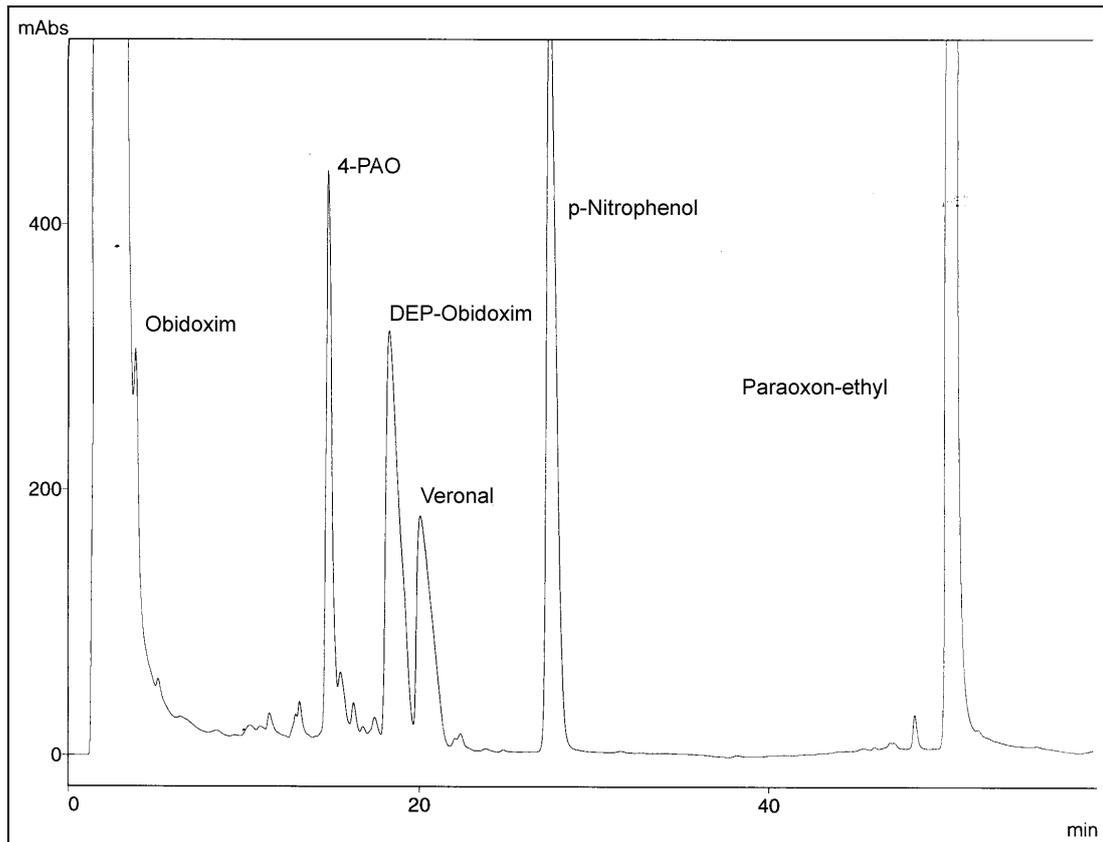
*Zieht man in Betracht, daß bei den Ansätzen  $60 \times 10^{-9}$  M DEP-BChE (Josse et al. 2001) und  $3 \times 10^{-9}$  M (Lockridge & Masson 2000) aktive AChE vorlagen, so war es vermutlich der hohen Reaktivierungsleistung von  $1,3 \times 10^{-4}$  M Obidoxim zu verdanken, daß entstandenes DEP-Obidoxim keinen sichtbaren Hemmeinfluß auf EryAChE nahm und somit kein Widerspruch gegen die Scavenger-Funktion der EryAChE besteht.*

### 3.7 Optimierung der Bildung von DEP-Obidoxim

Bei den bisher durchgeführten Experimenten wurde das Phosphoryloxim ausschließlich in-situ generiert. Ziel der folgenden Versuche war es jetzt, isoliertes **DEP-Obidoxim** in ausreichender Konzentration und Stabilität zu gewinnen.

Nachdem bei der Reaktion von Obidoxim mit Diethylphosphorylchlorid kein POX entstanden war und das reaktivere Diethylphosphorylfluorid nicht bezogen werden konnte, wurde versucht, DEP-Obidoxim in einer Direktreaktion zwischen Obidoxim und Paraoxon-ethyl zu gewinnen (Becker et al. 1997). Dabei sollte möglichst kein Bis-

(Diethylphosphoryl)-Obidoxim gebildet werden. Abweichend von Becker et al. wurde daher Paraoxon-ethyl nicht im Überschuß zugesetzt. Da zu erwarten war, daß konzentrierte Puffer, insbesondere Phosphatpuffer, die Ausbeute mindern (Becker et al. 1997; Leader et al. 1999; Steinberg & Solomon 1966), wurde der Ansatz nur geringgradig gepuffert. Beste Ausbeuten an DEP-Obidoxim wurden bei Reaktion äquimolarer Mengen von Obidoxim und Paraoxon-ethyl (je 10 mM) in 10 mM Na-Barbital bei pH 7,5 erhalten. Niedrigere pH-Werte verlangsamten die Reaktion und erhöhten gleichzeitig die Menge an Nebenprodukten. Alkalischere Bedingungen beschleunigten zwar die Reaktion durch Erhöhung des Oximat-Anteils, ließen das Produkt aber auch sehr viel schneller zerfallen (Veronal pH 8,25). Da sich DEP-Obidoxim bei niedriger Temperatur wesentlich stabiler zeigte als bei Raumtemperatur wurde die Inkubation bei 0 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz in 0,1 ml Portionen per HPLC nach **Methode A** aufgetrennt. **Abb. 3-12** zeigt ein Chromatogramm, in dem man neben den Ausgangssubstanzen das gewünschte Produkt (Rt 18 min) zusammen mit 4-PAO, p-Nitrophenol und Veronal erkennt. Die Ausbeute an DEP-Obidoxim betrug ca. 1%; es war bei -70 °C und pH 4,5 über Wochen stabil.



**Abb. 3-12:** HPLC-Chromatogramm eines Reaktionsansatzes von Obidoxim und Paraoxon-ethyl zur Isolierung von DEP-Obidoxim nach Methode A, Meßwellenlänge 260 nm.

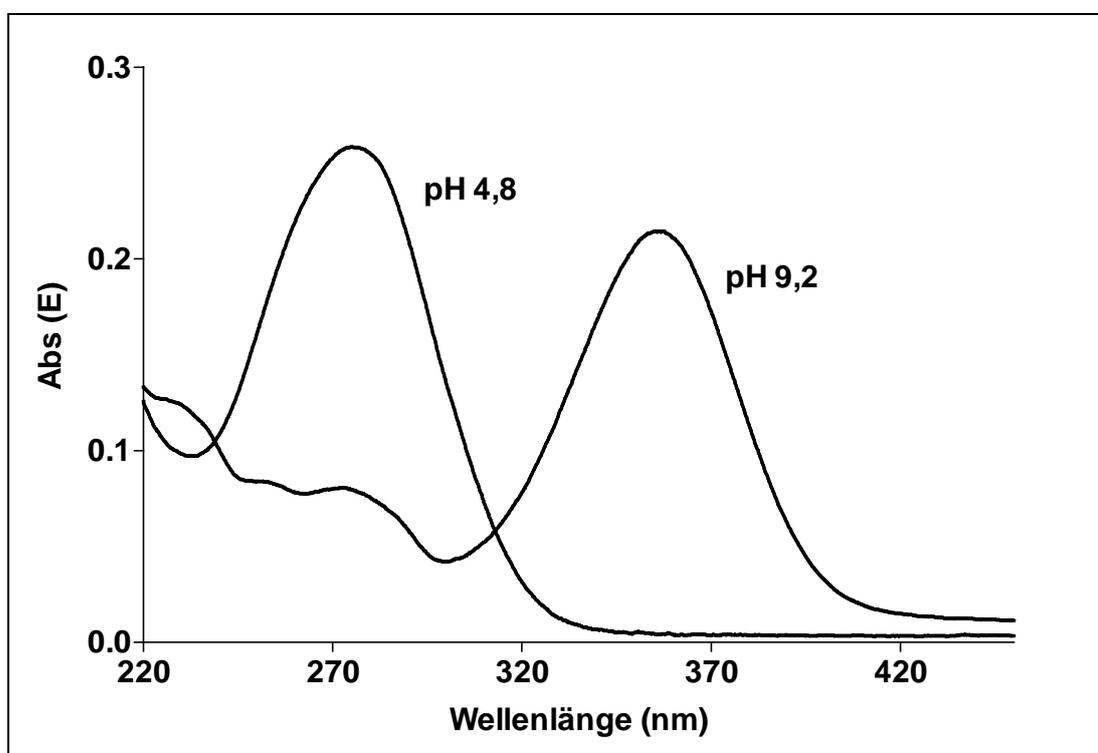
### 3.8 Welchem Schicksal unterliegt DEP-Obidoxim?

Inkubierte man das isolierte DEP-Obidoxim mit Human-Plasma bei pH 7,4, verschwand der Hemmstoff vollständig, und neben Diethylphosphorsäure war Obidoxim als Reaktionsprodukt entstanden. Die enzymatische Inaktivierung des Phosphoryloxims basierte demnach auf einer hydrolytischen Spaltung. Dieser Mechanismus rechtfertigte die bisher verwendete Bezeichnung POX-Hydrolase für das DEP-Obidoxim-inaktivierende Enzym.

Anders verhielt es sich mit DEP-Obidoxim, das ohne Plasma-Zusatz bei pH 7,4 inkubiert wurde. Auch hier wurde Phosphoryloxim komplett abgebaut, aber diesmal war kein Obidoxim entstanden.

### 3.9 Charakterisierung von DEP-Obidoxim und seiner Zerfallsprodukte

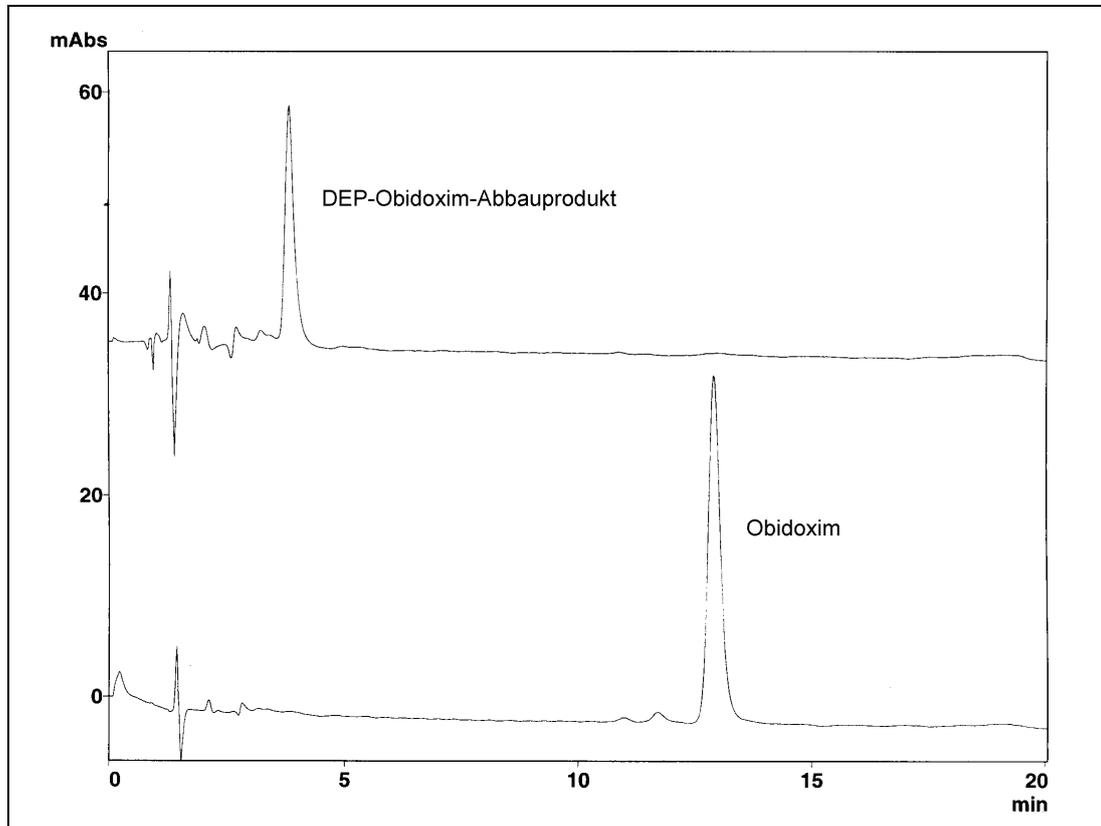
Das UV-Spektrum von isoliertem DEP-Obidoxim in 10 mM  $\text{NH}_4$ acetat/20% MeOH, pH 4,8, zeigte ein Maximum bei 273 nm (Obidoxim 285 nm), das bei pH 9,2 eine bathochrome Verschiebung mit Maximum bei 354 nm erfuhr (**Abb. 3-13**). Erneutes Ansäuern führte zu einem neuen UV-Spektrum mit Maximum bei 267 nm.



**Abb. 3-13:** UV-Spektren von DEP-Obidoxim (9 µM) in 10 mM  $\text{NH}_4$ acetat/20% MeOH, pH 4,8 und pH 9,2; d = 1 cm.

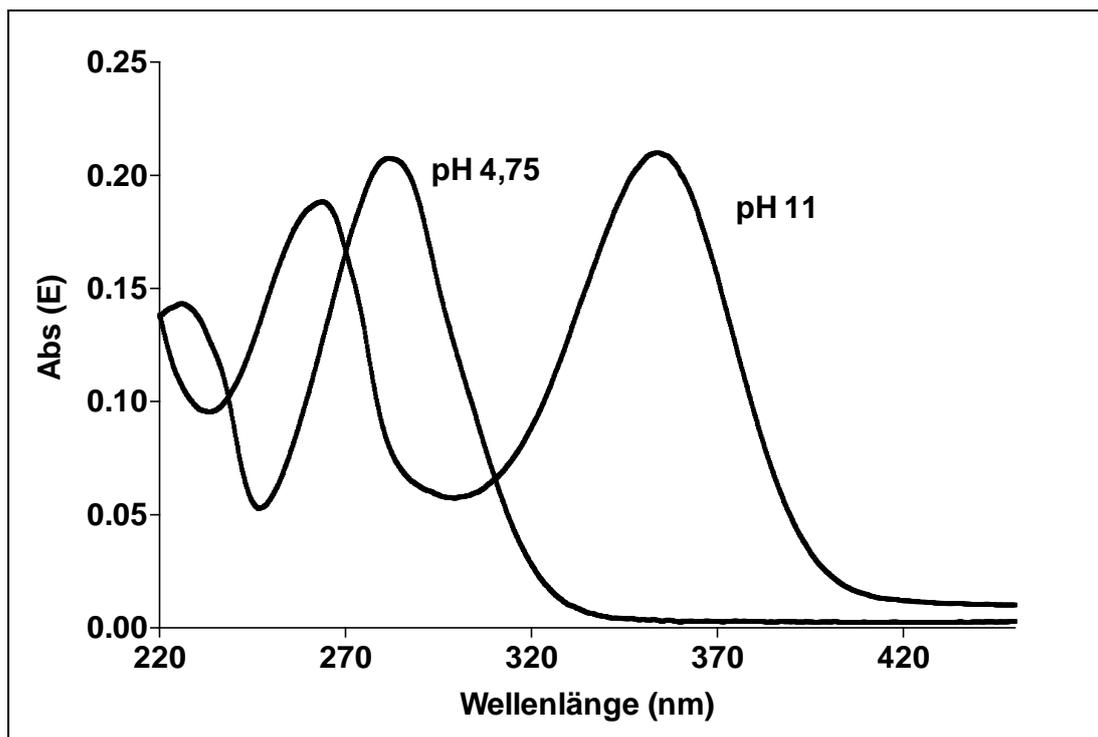
Das im Alkalischen beobachtete bathochrome Maximum bei 354 nm findet sich allerdings auch bei Obidoxim; es ist charakteristisch für 2- und 4-Pyridiniumaldoxime und ist bedingt durch die Nitrosotautomerie, die bei N-substituierten Pyridinium-Oximen nach Betainisierung (Bernasconi 1965) möglich ist. So konnte angenommen werden, daß die Verbindung eine freie Oximgruppe aufweist, was für das Vorliegen von Mono(Diethylphosphoryl)-Obidoxim sprach.

Die HPLC-Analyse (**Methode D**) ergab, daß die Verbindung im Alkalischen zu einem hydrophilen Produkt zerfallen war, bei dem es sich nicht um Obidoxim handelte (**Abb. 3-14**).



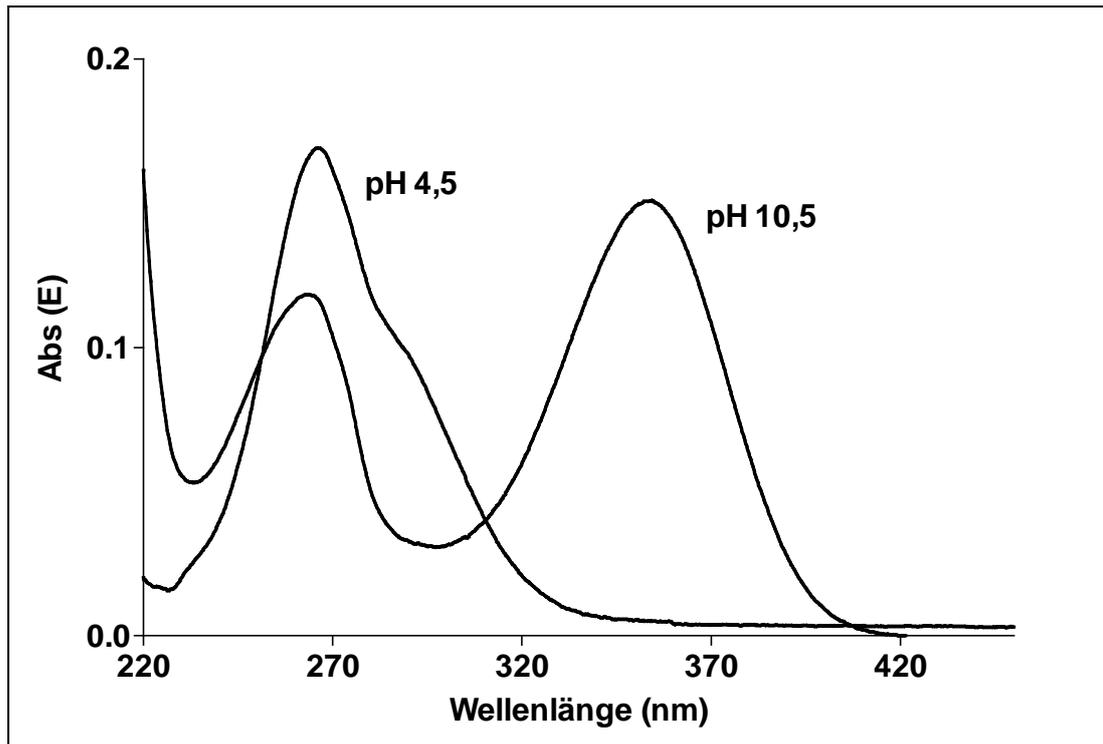
**Abb. 3-14:** HPLC-Chromatogramme des DEP-Obidoxim-Abbauprodukts nach Alkalisierung auf pH 11 und authentischem Obidoxim-Standard. HPLC-Methode D, Detektion bei 285 nm.

Wurde DEP-Obidoxim bei neutralem pH (pH 7,4) in Eis inkubiert, dann nahm es langsam zugunsten eines weiteren, noch hydrophileren Produktes ab. Dabei entstand zunächst kein Cyanid, so daß die Bildung eines intermediären Mononitrils vermutet wurde. Dieses Produkt wies bei pH 4,75 ein Maximum bei 282 nm auf, absorbierte also geringfügig kürzerwellig als Obidoxim (285 nm). Bei pH 11 trat das Oximatmaximum von 354 nm auf (**Abb. 3-15**), wobei der komplette Zerfall des vermuteten Mononitrils per HPLC bestätigt wurde.



**Abb. 3-15:** UV-Spektren von Obidoxim-Mononitril (8,9 µM) in 10 mM NH<sub>4</sub>acetat/20% MeOH, pH 4,75 und pH 11; d = 1 cm.

Wurde das Mononitril bei neutralem pH bei 37 °C inkubiert, zerfiel es rasch unter Bildung eines ebenfalls hydrophilen Produkts. Dabei entstand Cyanid, was auf die Bildung eines Monopyridons schließen ließ. Das vermutete Monopyridon zeigte bei pH 4,5 ein Maximum bei 267 nm mit Schulter bei 285 nm, letztere dürfte auf eine Oximgruppe zurückzuführen sein. Bei pH 10,5 zeigte sich die Oximabsorption bei 354 nm (**Abb. 3-16**). Erneutes Ansäuern ergab wieder das Ausgangsspektrum. Dieses Verhalten sprach für ein Monopyridonderivat des Obidoxims.



**Abb. 3-16:** UV-Spektren von Obidoxim-Monopyridon (6,9 µM) in 10 mM NH<sub>4</sub>acetat/20% MeOH, pH 4,5 und pH 10,5; d = 1 cm.

*Dieses Produkt zeigte darüber hinaus im UV-Spektrum und in der HPLC-Analyse die gleiche Charakteristik wie das DEP-Obidoxim-Abbauprodukt nach raschem Anheben des pH-Wertes auf pH 11 (s.o.).*

Es waren nun die Bedingungen bekannt, um DEP-Obidoxim, das Obidoxim-Mononitril und das Obidoxim-Monopyridon zu generieren, per HPLC zu isolieren (**Methode A für DEP-Obidoxim, Methode B für Obidoxim-Mononitril und Obidoxim-Monopyridon**), und das jeweilige Produkt anschließend durch Massenspektrometrie zu charakterisieren (**Anhang**).



### 3.9.1 Quantifizierung von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten

Zur Konzentrationsbestimmung der einzelnen Produkte wurde isoliertes DEP-Obidoxim mit Soman-Plasma bei pH 7,4 und 37 °C bis zur vollständigen Hydrolyse inkubiert und die entstandene Konzentration an Obidoxim bestimmt. Unter der Annahme der vollständigen Hydrolyse wurde die gebildete Menge an Obidoxim mit der eingesetzten Menge an DEP-Obidoxim gleichgesetzt. Alternativ dazu erlaubte die UV-spektroskopische Analyse des bei pH 11 zerfallenen DEP-Obidoxim seine Quantifizierung als Obidoxim-Monopyridon. Die Höhe des Extinktionskoeffizienten von Obidoxim bei pH 11 und 354 nm wird durch die Absorption der beiden Pyridinium-4-aldoximat-Strukturen bestimmt. War hingegen, wie im Falle des Obidoxim-Monopyridons, nur noch eine Pyridinium-4-aldoximat-Funktion vorhanden, so ging man davon aus, daß die dadurch hervorgerufene Absorption auch nur halb so hoch ist. Demzufolge wurden die Extinktionskoeffizienten der DEP-Obidoxim-Abbauprodukte, deren Strukturen sich durch massenspektrometrische Analyse als Moleküle mit einer Pyridinium-4-aldoximfunktion bestätigten, für pH 11 und 354 nm mit  $23,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  angesetzt. Basierend auf den so berechneten Konzentrationen wurden die Extinktionskoeffizienten der einzelnen Moleküle für den sauren pH-Bereich ermittelt. Die Konzentrationsberechnung von DEP-Obidoxim als Obidoxim nach Inkubation mit Plasma bzw. über UV-Absorption ergab übereinstimmende Ergebnisse.

**Tabelle 3-4** zeigt spektroskopische Daten für die dargestellten Produkte

**Tabelle 3-4:** Zusammenfassung der spektroskopischen Daten von Obidoxim, Mono(Diethylphosphoryl)-Obidoxim, Obidoxim-Mononitril und Obidoxim-Monopyridon

	<b>Obidoxim*</b>	<b>Mono(Diethyl- phosphoryl)- Obidoxim</b>	<b>Obidoxim- Mononitril</b>	<b>Obidoxim- Monopyridon</b>
$\lambda_{\max}$ [nm] (log $\epsilon$ [ $M^{-1}cm^{-1}$ ])				
pH 4-5	285 (4,54)	273 (4,50)	282 (4,35)	267; 285 (S) (4,39)
pH 9-11	354 (4,67)	Zerfall in Pyridon	Zerfall in Pyridon	354 (4,37)

(S) = Schulter

\* aus: Spöhrer 1994

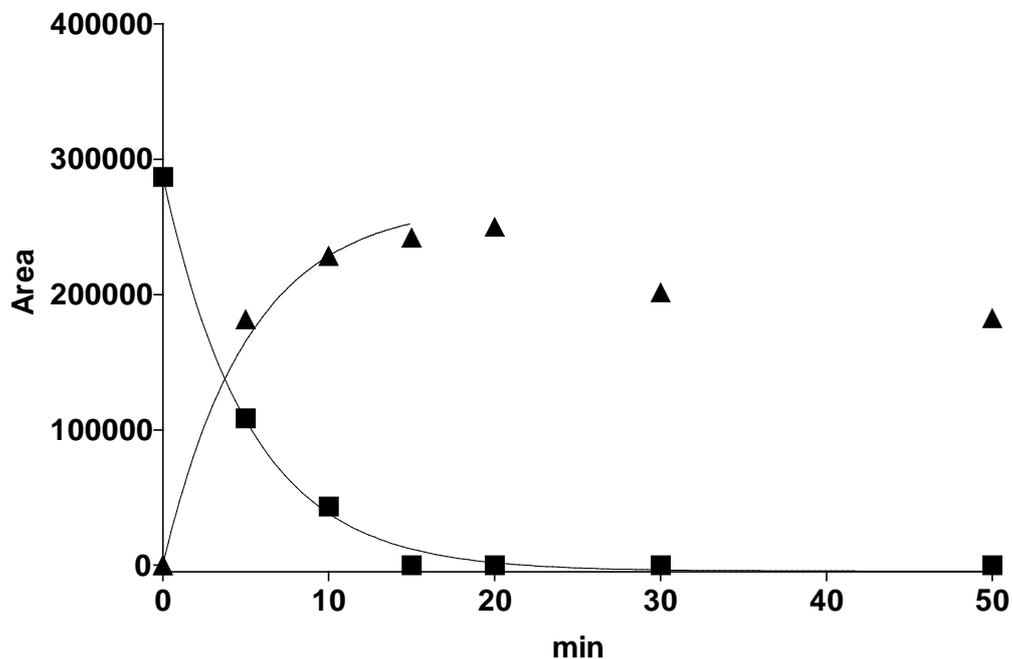
### 3.9.2 Einflüsse auf das Zerfallsmuster von DEP-Obidoxim

Bei vollständigem Zerfall von DEP-Obidoxim in 0,1 M MOPS, pH 7,4, und 1 mM  $CaCl_2$  wurden bei 37 °C 49% Cyanid und 80% des Monopyridon-Derivates von Obidoxim gefunden. Eine Hydrolyse von DEP-Obidoxim unter Rückbildung von Obidoxim fand praktisch nicht statt. Wurde DEP-Obidoxim im gleichen Puffer bei 0 °C inkubiert, entstand zunächst nahezu vollständig (94,8%) das Mononitrilderivat des Obidoxims, das bei weiterer Inkubation bei 37 °C in 66,8% Monopyridon (n = 4; SD = 5,8) und 51,8% Cyanid (n = 4; SD = 6,8) zerfiel. Ferner bildete sich ein zweites hydrophiles Produkt mit einer Ausbeute von 27% (n = 2); (für seine Quantifizierung wurde der halbe

Extinktionskoeffizient von Obidoxim bei pH 4,5 zugrundegelegt). Das UV-Maximum dieses Moleküls lag im Sauren bei 282 nm, demnach könnte es sich hierbei entweder um das Monoisonicotinamid- oder das Mononicotinsäure-Derivat des Obidoxims handeln. Die Bilanz für diese Ansätze blieb unvollständig, vor allem hinsichtlich der Cyanid-Ausbeute.

Ein völlig anderes Zerfallsmuster trat zutage, wenn DEP-Obidoxim in obigem Puffer mit dialysiertem Plasma, dessen BChE irreversibel blockiert war, bei 37 °C versetzt wurde. Jetzt entstand praktisch quantitativ Obidoxim, während Cyanid nur in Spuren (1-2%) nachweisbar war. Unter diesen Bedingungen wurde DEP-Obidoxim hydrolysiert bevor es in sehr geringem Maße über das Mononitril zerfiel.

Verfolgte man die Kinetik, mit der der Abbau von DEP-Obidoxim bzw. die Bildung von Mononitril erfolgte, so ergaben sich für beide Vorgänge übereinstimmende Halbwertszeiten (3,6 min in **Abb. 3-17**), deren Höhe jedoch stark abhängig vom verwendeten Inkubationsmedium war.

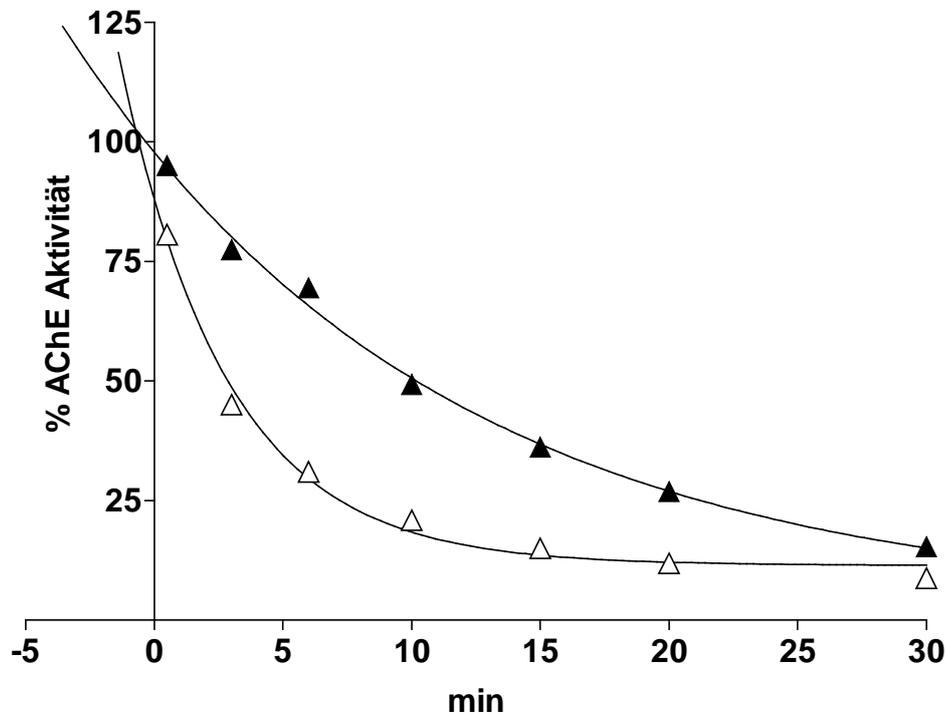


**Abb. 3-17:** Zerfall von DEP-Obidoxim (n) und Entstehung von Obidoxim-Mononitril (s) in 40 mM MOPS/0,4 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4, bei 37 °C. Quantifizierung nach HPLC-Analyse Methode D, Detektion bei 285nm.

### 3.9.3 Wirkungen von DEP-Obidoxim und seiner Zerfallsprodukte

Von DEP-Obidoxim war zu erwarten, daß es die AChE hemmt (De Jong & Ceulen 1978). Um zu verhindern, daß DEP-Obidoxim rasch zerfällt, wurde es bei 10 °C mit humaner EryAChE (1,5 g Hb/dL, ca. 0,3 nM AChE) in 0,1 M PP, pH 7,4, inkubiert. Anschließend wurde die AChE-Aktivität bei 37 °C gemessen. Zum Vergleich erfolgte die AChE-Hemmung bei verschiedenen Paraoxon-ethyl-Konzentrationen. Bei diesen Versuchen wurden die Erythrozyten mit DTNB vorinkubiert, um die Matrix-SH-Gruppen zu maskieren. Dadurch konnte die Initialgeschwindigkeit der AChE-Reaktion erfaßt werden. Durch Verdünnen des Inkubats bei der Enzymreaktion (1:32) wurde versucht, eine Nachhemmung in der Küvette deutlich zu verlangsamen (Faktor 1000).

Wie **Abb. 3-18** zeigt, verläuft die Hemmung der AChE durch 2 nM DEP-Obidoxim schneller als durch 200 nM Paraoxon-ethyl.

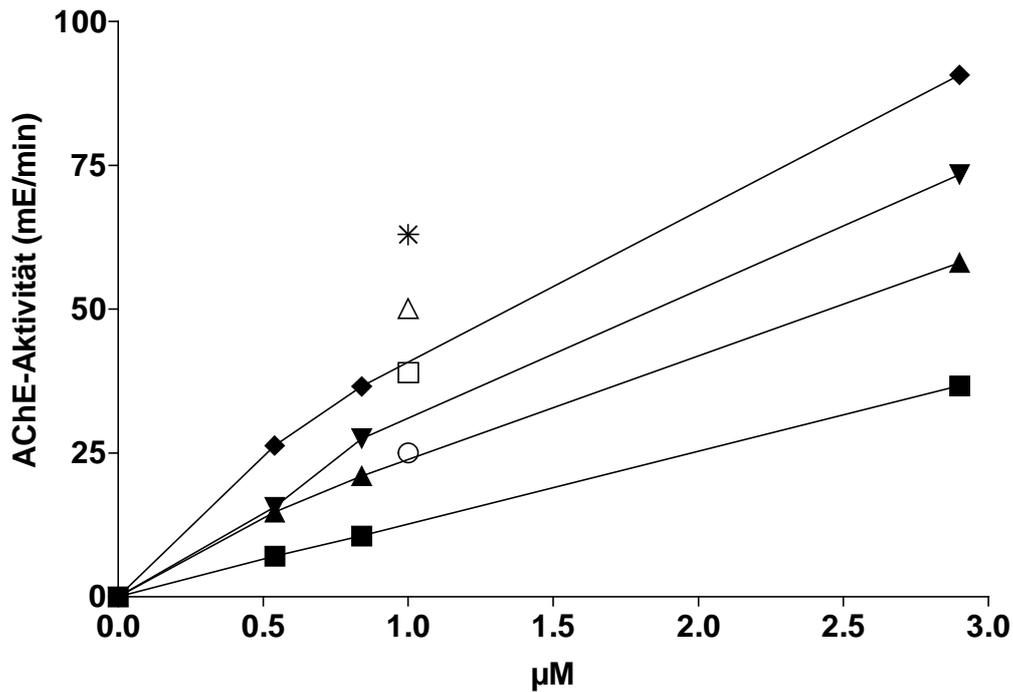


**Abb. 3-18:** Hemmung von humaner EryAChE (Endkonzentration 1,5 g Hb/dL) durch 200 nM Paraoxon-ethyl (S) und 2 nM DEP-Obidoxim (E) in 0,1 M PP, pH 7,4, bei 10 °C. Erythrozyten-Suspensionen wurden mit DTNB vorinkubiert, anschließend Gift zugesetzt und bei 10 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde ein Aliquot entnommen und die AChE-Aktivität bei 37 °C nach der modifizierten Ellman-Methode bestimmt.

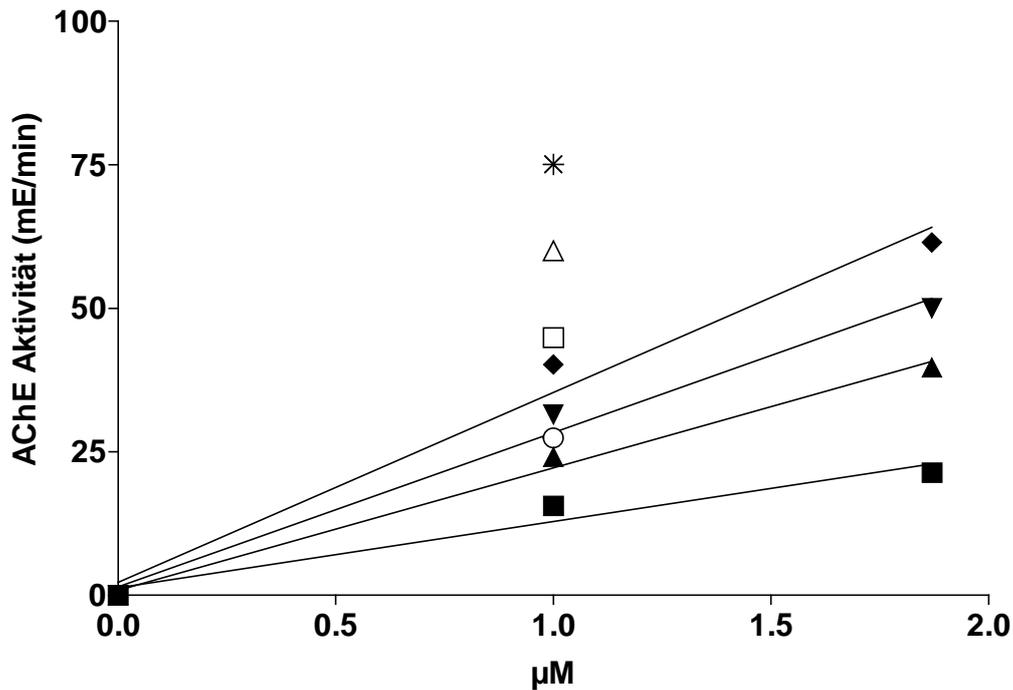
An die Meßdaten läßt sich gut eine Exponentialfunktion anpassen, woraus sich Geschwindigkeitskonstanten von  $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  für DEP-Obidoxim und  $3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  für die Hemmung durch Paraoxon-ethyl errechnen. (Für diese Berechnung ist Voraussetzung, daß die Anhäufung eines Michaeliskomplexes vernachlässigt werden kann (Aldridge & Reiner 1972)). Der Unterschied von einem Faktor 350 entspricht den Angaben von De Jong und Ceulen, die das Phosphoryloxim aus Paraoxon-ethyl oder Diethylfluorophosphat und Obidoxim in

situ generierten und an Rindererythrozyten-AChE testeten (De Jong & Ceulen 1978).

Schließlich war interessant zu prüfen, ob die Zerfallsprodukte von DEP-Obidoxim, das Mononitril- und das Monopyridon-Derivat des Obidoxims, durch den verbleibenden Pyridinium-4-aldoxim-Anteil noch gute Reaktivatoreigenschaften haben. Diese Untersuchungen wurden an Paraoxon-ethyl-gehemmter Zitteraal-AChE in 0,1 M MOPS, pH 7,4, bei 37 °C durchgeführt und mit der Wirkung äquimolarer Obidoxim-Konzentrationen verglichen. **Abb. 3-19** zeigt, daß für eine gleiche Reaktivierung das Mononitril-Derivat 2,5 bis 3 mal länger einwirken muß als Obidoxim. Demgegenüber ist die Reaktivierungsleistung des Monopyridon-Derivats noch etwas schlechter, hiermit wird im Vergleich zu Obidoxim etwa die 4fache Zeit benötigt (**Abb. 3-20**).



**Abb. 3-19:** Reaktivatoreigenschaften von Obidoxim-Mononitrid. Paraoxon-ethyl-gehemmte Zitteraal-AChE wurde mit verschiedenen Konzentrationen Obidoxim-Mononitrid (*schwarze Symbole*) bzw. mit 1 µM Obidoxim (*weiße Symbole*) in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine, pH 7,4, bei 37 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die AChE-Aktivität in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine, pH 7,4, bei 37 °C bestimmt. Obidoxim-Mononitrid 2 min (◆), 6 min (▼), 10 min (▲), 15 min (■); Obidoxim 2 min (○), 6 min (◊), 10 min (◐), 15 min (◑).



**Abb. 3-20:** Reaktivatoreigenschaften von Obidoxim-Monopyridon. Paraoxon-ethyl-gehemmte Zitteraal-AChE wurde mit verschiedenen Konzentrationen Obidoxim-Monopyridon (*schwarze Symbole*) bzw. mit 1 µM Obidoxim (*weiße Symbole*) in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine, pH 7,4, bei 37 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde die AChE-Aktivität in 0,1 M MOPS/0,02% Gelatine, pH 7,4, bei 37 °C bestimmt. Obidoxim-Monopyridon 2 min (r), 6 min (s), 10 min (t), 15 min (u); Obidoxim 2 min (m), 6 min (p), 10 min (ê), 15 min (w).

### 3.10 Versuche mit gereinigter humaner Paraoxonase (hPON), Typ AA

Die Errungenschaft, isoliertes DEP-Obidoxim stabil in Händen zu halten, ermöglichte es jetzt, humane isolierte und phenotypisierte Paraoxonase (hPON) vom Typ AA auf ihre Fähigkeit hin zu analysieren, DEP-Obidoxim abzubauen. Zu diesem Zweck wurde isoliertes DEP-Obidoxim mit dem hPON-Präparat (in 25 mM TRIS-HCl/1mM CaCl<sub>2</sub>/0,1% Triton X-100/0,15 M NaCl, pH 8,0) bzw. mit ungereinigtem Soman-gehemmten, dialysierten Plasma bei 37 °C für 60 Sekunden inkubiert, wobei sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte. Hierbei kamen identische Konzentrationen an Arylesterase-Aktivität in den Ansatz. Die

gebildeten Abbauprodukte wurden per HPLC nach **Methode D** analysiert. In **Tabelle 3-5** finden sich die Enzymaktivitäten der zu vergleichenden Präparate, während **Tabelle 3-6** die Produktmengen anführt, die sich durch die DEP-Obidoxim-Inkubation bei 37 °C gebildet hatten. Hieraus läßt sich ein Maß für die POX-Hydrolase-Aktivität ableiten.

Es ist bekannt, daß sich die verschiedenen humanen PON1-Phenotypen durch den Zusatz von NaCl unterschiedlich stark stimulieren lassen, Paraoxon-ethyl zu hydrolysieren (Eckerson et al. 1983a/b). Hierbei läßt sich der Typ BB am besten durch NaCl stimulieren, Typ AA hingegen am geringsten. Die Ermittlung des sogenannten NaCl-Faktors dient daher der Eingruppierung des Probanden in den entsprechenden Phenotyp. In diesem Zusammenhang wurden die Aktivitäten der Präparate, Paraoxon-ethyl zu hydrolysieren, in An- und Abwesenheit von 1 M NaCl bestimmt.

**Tabelle 3-5:** Arylesterase und Paraoxonase Aktivitäten

Proband	Aryl- esterase (U/ml)	Paraoxonase (mU/ml) (ohne NaCl)	Paraoxonase (mU/ml) (mit 1 M NaCl)	Paraoxonase (mit 1 M NaCl)/ Arylesterase *1000	Paraoxonase (ohne NaCl)/ Arylesterase *1000	NaCl - Faktor
PE	213,5	502,5	1256	5,88	2,35	2,5
GH	118,5	241	615,6	5,19	2,03	2,55
DK	198	253	570,3	2,88	1,28	2,25
hPON AA	210,4	149,7	290,5	1,38	0,71	1,9

**Tabelle 3-6:** Abbauprodukte von 8,2  $\mu\text{M}$  DEP-Obidoxim nach Inkubation mit Probandenplasmen bei pH 7,4 und 37 °C für 60 Sekunden

Proband	Obidoxim	Obidoxim-Nitril	DEP- Obidoxim	$\Sigma$
PE 1:10	-----	-----	7,1 $\mu\text{M}$	7,1 $\mu\text{M}$
PE conc.	1,3 $\mu\text{M}$	-----	6,1 $\mu\text{M}$	7,4 $\mu\text{M}$
GH conc.	0,4 $\mu\text{M}$	-----	6,8 $\mu\text{M}$	7,2 $\mu\text{M}$
DK 1:10	1,3 $\mu\text{M}$	-----	6,3 $\mu\text{M}$	7,6 $\mu\text{M}$
DK conc.	7,6 $\mu\text{M}$	-----	-----	7,6 $\mu\text{M}$
hPON AA 1:10	2,3 $\mu\text{M}$	-----	5,2 $\mu\text{M}$	7,5 $\mu\text{M}$
hPON AA conc.	5,6 $\mu\text{M}$	-----	1,5 $\mu\text{M}$	7,1 $\mu\text{M}$
Verdünnungs Medium	-----	0,9 $\mu\text{M}$	8,1 $\mu\text{M}$	9 $\mu\text{M}$

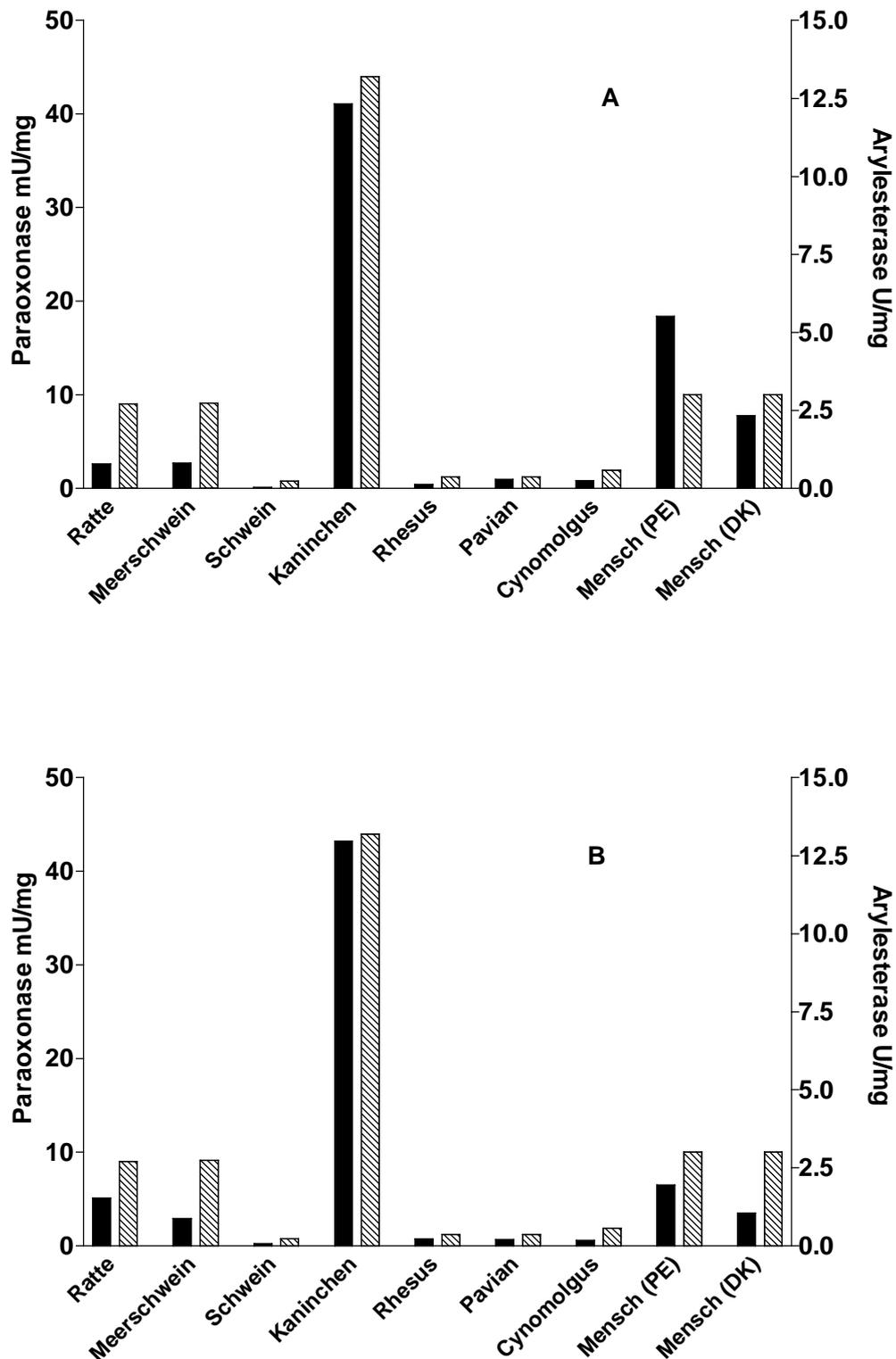
Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus den Versuchen zur Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität im in-situ-Meßsystem (POX-Hydrolase-Aktivität mit Methode nach AChE-Reaktivierung bestimmt, **Abb. 3-7**), so ist der Einfluß der Probandenplasmen PE und GH auf DEP-Obidoxim vergleichbar einzustufen, im Gegensatz zu DK und hPON. Es bestätigte sich auch bei dieser Art der Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität, daß Probanden mit relativ hohen Paraoxonase/Arylesterase-Aktivitätsquotienten wenig POX-Hydrolase-Aktivität aufweisen, wohingegen DK und hPON nur vergleichsweise niedrige Paraoxonase/Arylesterase-Aktivitätsquotienten, jedoch ausgeprägte POX-Hydrolase-Aktivität besitzen. Desweiteren drängt sich der Eindruck auf, daß die Probanden PE und GH dem gleichen Enzymtyp angehören, DK und hPON sollten hingegen jeweils

voneinander unterschiedlichen **Phenotypen** zugeordnet werden. Den Beweis für diese Hypothese kann allerdings nur eine Sequenzanalyse des jeweiligen Plasmapräparates liefern.

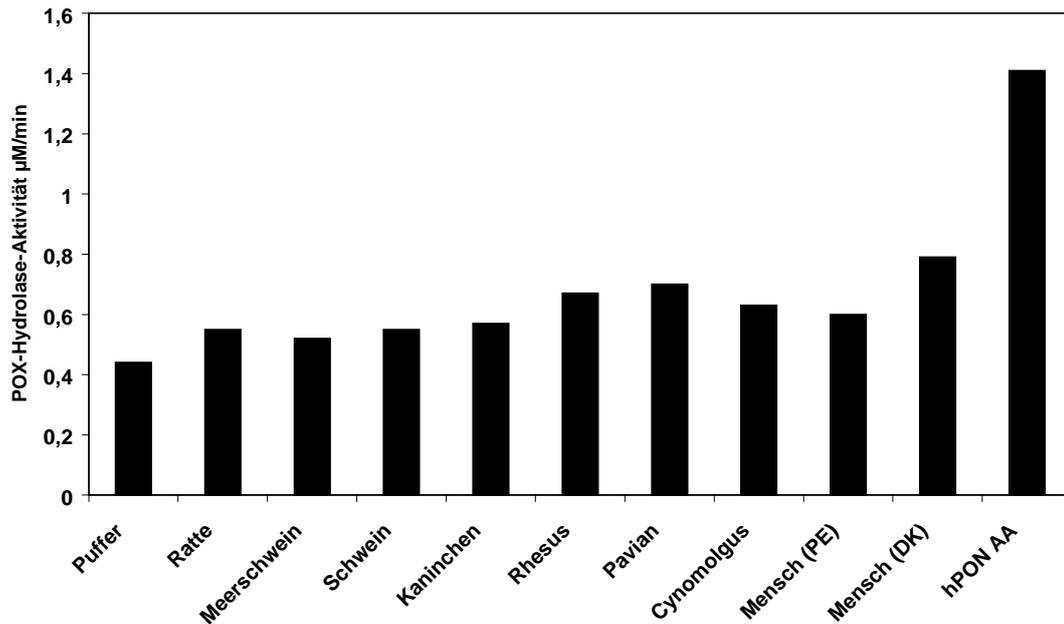
### 3.11 POX-Hydrolase in verschiedenen Spezies

Der überwiegende Teil der Untersuchungen zur Wirksamkeit von Oximen wird am Tiermodell durchgeführt. Aufgrund unterschiedlich exprimierter Enzymsysteme in verschiedenen Spezies, sind durchaus voneinander abweichende Kernaussagen zu erwarten. In diesem Zusammenhang wurden daher exemplarisch die Enzymaktivitäten der Paraoxonase, Arylesterase und POX-Hydrolase (**Abb. 3-21** und **Abb. 3-22**) in Soman-behandelten Plasmen verschiedener Tierspezies bestimmt, um so einen Vergleich zu Humanwerten ziehen zu können. Die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität erfolgte durch Inkubation von isoliertem DEP-Obidoxim mit jeweils identischer Menge an Arylesterase-Aktivität aus den einzelnen dialysierten Soman-Plasmen. Für die Quantifizierung wurde die Abnahme von DEP-Obidoxim (6,4  $\mu\text{M}$ ) herangezogen, das bei 37 °C für 3 min mit 13,9 U/ml Arylesterase-Aktivität inkubiert wurde, wobei sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte.

*Die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität in Soman-behandeltem Rattenplasma war nur durch Verwendung von "titriertem" Soman-Plasma (4  $\mu\text{M}$  Soman) möglich, da andernfalls Restgift Soman weder durch mehrmalige Dialyse noch durch Baker Bond C18-Behandlung zu entfernen war. Diese Beobachtung erinnerte an das Phänomen des Soman-Depots, das Wolthuis et al. 1981 für Ratten beschrieben hatten und dessen Existenz durch einen Soman-Simulator (Som-Sim) verifiziert wurde.*



**Abb. 3-21:** Verteilung der Paraoxonase- und der Arylesterase-Aktivität bei verschiedenen Spezies in Soman-behandelten, dialysierten (gegen 25 mM TRIS-HCl/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /0,15 M NaCl/0,1% Triton X-100, pH 8,0) Plasmen; *Schwarze Balken:* Paraoxonase **A** mit 1M NaCl/ **B** ohne NaCl-Zusatz; *Schraffierte Balken:* Arylesterase; die Aktivitäten beziehen sich auf den Proteingehalt des Soman-behandelten und dialysierten Plasmas und wird als mU/mg Protein ausgedrückt ( $\mu\text{mol}/\text{min pro g}$ ).



**Abb. 3-22:** Verteilung der POX-Hydrolase-Aktivität bei verschiedenen Spezies in Soman-behandelten, dialysierten (gegen 25 mM TRIS-HCl/1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ /0,15 M NaCl/0,1% Triton X-100, pH 8,0) Plasmen; Für die Quantifizierung wurde die Abnahme von DEP-Obidoxim (6,4 µM) herangezogen, das bei 37 °C für 3 min mit 13,9 U/ml Arylesterase-Aktivität inkubiert wurde, wobei sich ein pH-Wert von 7,4 einstellte.

## 4 DISKUSSION

Die unterschiedlichen Reaktivierungskinetiken von konzentrierter Paraoxon-ethyl-gehemmter EryAChE durch Obidoxim im Vergleich zu zunehmend verdünnten Enzympräparaten standen am Anfang der Beobachtungen der vorgelegten Arbeit. Dieses Verhalten diente als Hinweis für die Anhäufung von Phosphyloxim, die bei Verwendung hoher Enzymkonzentrationen auftritt (Ashani et al. 1998). Phosphyloxime selbst, hier zunächst mit dem Vertreter des DEP-Obidoxim, gelten als hochpotente Cholinesterase-Hemmstoffe. Das Schlüsselexperiment war schließlich die Reaktivierung von konzentrierter EryAChE unter Zusatz von Human-Plasma, das den erwarteten nachteiligen Effekt durch DEP-Obidoxim ganz offensichtlich ausschaltete.

Um den Mechanismus der DEP-Obidoxim-Inaktivierung näher zu charakterisieren, wurde die Isolierung dieses labilen Produkts angestrebt.

### **Generierung von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten**

Mono(diethylphosphoryl)-Obidoxim (Pyridinium,1-[[[4-(diethoxyphosphoryloxy)imino]methyl]pyridinio]methoxy]methyl-4-[(hydroxyimino)methyl]-diacetat) ist unserer Kenntnis nach bisher noch nicht in Substanz isoliert und charakterisiert worden. Dennoch wurde seine intermediäre Existenz mehrfach postuliert (de Jong & Ceulen 1978; Kiderlen et al. 2000; Leader et al. 1999; Schoene 1972), da die Reaktivierung von diethylphosphorylierter AChE in Gegenwart von Obidoxim biphasisch verlief, wenn die Enzymquelle stärker konzentriert war. Eine analoge Verbindung, Diethylphosphoryl-4-PAM, wurde dagegen isoliert und per  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$ -NMR, sowie durch SIMS (liquid single ion mass spectroscopy) charakterisiert. Diese Verbindung war in Wasser bei pH 4,5 relativ stabil, zerfiel jedoch in 10 mM TRIS-

Puffer, pH 7,8, rasch in das Nitril. Ferner war bekannt, daß das POX-Derivat von 4-PAM in alkalischer Lösung in das Pyridon- und Isonicotinamid-Derivat zerfiel (Leader et al. 1999).

Inzwischen wurde auch Ethoxymethylphosphonyl-Obidoxim in Substanz dargestellt, per HPLC gereinigt und mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR charakterisiert (Luo et al. 1999). Auch in diesem Fall war das UV-Maximum von 286 nach 276 nm hypsochrom verschoben, was der Beobachtung von Waser et al. (1992) entsprach, die bei Reaktion von überschüssigem Sarin mit Obidoxim eine hypsochrome Verschiebung der Obidoxim-Absorption von 284 nach 278 nm beobachteten (Waser et al. 1992). Interessanterweise mißlang Luo et al. die Darstellung von DEP-Obidoxim, so daß sie vermuteten, die Verbindung sei zu instabil, um sie isolieren zu können.

Daß in der vorliegenden Arbeit die Isolierung von DEP-Obidoxim und seinem ebenfalls labilen Mononitril-Derivat gelang, ist dem Umstand zu verdanken, daß diese Verbindungen in der Kälte unerwartet stabil sind, bzw. der Zerfall eine hohe Aktivierungsenergie benötigt. Die Ergebnisse aus Massenspektrometrie, der Quantifizierung von Cyanid bzw. Obidoxim und die charakteristische Oximatabsorption im Alkalischen werden als Bestätigung dafür gesehen, daß sich in den Versuchen das "Mono(Diethylphosphoryl)-Obidoxim" und nicht das doppelt phosphorylierte Obidoxim-Derivat gebildet hatte.

Die vermutete hohe Giftigkeit von DEP-Obidoxim veranlaßte uns, jeweils nur geringe Mengen herzustellen, die keiner besonderen Sicherheitsvorkehrungen bedurften (ca. 2 mg Paraoxon eingesetzt, ca. 20 µg POX gebildet). HPLC-gereinigtes DEP-Obidoxim ließ sich ohne Zerfall einfrieren und für die geplanten Versuche nach Bedarf verwenden.

Der spontane Zerfall von DEP-Obidoxim erfolgte bei neutralem pH nahezu ausschließlich über das Mononitril. Die übereinstimmenden Halbwertszeiten für die Abnahme an DEP-Obidoxim und im Gegenzug die Zunahme an Mononitril untermauern diese Aussage. Diese Reaktion erfolgt entweder Basen-katalysiert als Eliminationsreaktion (Steinberg & Solomon 1966) oder nach einem synchron ablaufenden cyclischen Mechanismus (Hagedorn et al. 1969). Das Nitril seinerseits hydrolysiert zum Pyridon unter Cyanidfreisetzung oder bildet das Carboxamid-Derivat (Steinberg & Solomon 1966).

Direkte Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten von 1-Methyl-4-cyanopyridinium Ionen ergaben, daß der cyanogene Zerfall unter Pyridon-Bildung mit steigendem pH zunahm. Äquimolare Mengen an Pyridon und Carboxamid wurden dabei erst bei pH 11,7 erreicht (Kosower & Patton 1966). Bis(4-cyano-1-pyridiniomethyl)etherdichlorid hydrolysierte schon bei pH 5-6 überwiegend zum Carboxamid- und bei pH 7 zum Pyridon-Derivat; diese Untersuchungen wurden aber zum Teil bei deutlich höheren Temperaturen (85 °C) durchgeführt (Christenson 1968). Im Fall von DEP-Obidoxim oder dem isolierten Mononitril-Derivat wurde der cyanogene Weg schon bei pH 7,4 besritten, bei dem ca. 50% Cyanid zusammen mit einer geringfügig höheren Menge an Monopyridon gebildet wurden. Das Carboxamid-Derivat ist bisher noch nicht isoliert worden, es entspricht dem HI 2, das im Freiburger Arbeitskreis synthetisiert wurde (Stark 1968; Stark 1971).

Der Enzym-katalysierte Zerfall von DEP-Obidoxim durch die POX-Hydrolase aus menschlichem Plasma (Kiderlen et al. 2000) verlief hingegen nach einem anderen Mechanismus. Hier erfolgt offensichtlich ein nucleophiler Angriff am Phosphoratom mit der Folge eines hydrolytischen Zerfalls, wie auch für die Hydrolyse von O-(O,O-

Diethylphosphoryl)-1-methyl-4-pyridiniumaldoxim durch Phosphotriesterase aus *Pseudomonas sp.* beschrieben wurde (Leader et al. 1999). Dabei entsteht bei ausreichender Enzymaktivität quantitativ Obidoxim. Auf den Nachweis von Diethylphosphat wurde in diesem Zusammenhang verzichtet. Das Vorkommen von POX-Hydrolase in menschlichem Plasma ist für eine optimale Reaktivierung von Diethylphosphoryl-AChE durch Obidoxim wichtig, da andernfalls gebildetes DEP-Obidoxim zu einer sehr schnellen Wiedervergiftung des reaktivierten Enzyms führen könnte und somit die Reaktivierung verzögert (vgl. **Abb. 3-1**).

### **Hemmaktivität von DEP-Obidoxim**

Die gemessene Geschwindigkeitskonstante der Hemmung menschlicher EryAChE durch DEP-Obidoxim lag bei pH 7,4 und 10 °C bei  $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  und übertraf damit Paraoxon-ethyl um den Faktor 350. Geht man davon aus, daß die Temperaturabhängigkeit der Hemmung durch DEP-Obidoxim und Paraoxon-ethyl vergleichbar ist, so errechnet sich für 37 °C eine Hemmkonstante für DEP-Obidoxim von  $7,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

Dieser Wert entspricht der Konstanten, die für die Hemmung von rekombinanter Maus-AChE durch 7-(O,O-Diethylphosphinyloxy)-1-methylchinolinium-methylsulfat gefunden wurde (29 °C, 10 mM TRIS, pH 7,8) (Ashani et al. 1998). Eine gleich große Konstante wurde für die Hemmung humaner EryAChE (pH 7,4, 37 °C) durch Cyclosarin bestimmt (Worek et al. 1998). Nachdem DEP-Obidoxim und reaktivierte AChE in äquimolarer Konzentration gebildet werden, läßt sich die Halbwertszeit der Wiederhemmung errechnen, sie beträgt für  $1 \times 10^{-9} \text{ M}$  AChE (ca. 30% der Gesamt-AChE-Konzentration) etwa 1,3 min ( $t_{1/2} = 1/A_0 \times k_2$ ). Bei einer Reaktivierungshalbwertszeit von etwa 4 min

bei therapeutischer Obidoximkonzentration (10  $\mu\text{M}$ ) wären nach Einstellen eines topochemischen Gleichgewichtes nur 1/3 der AChE reaktivierbar, was auch experimentell gefunden wurde (Kiderlen et al. 2000). Erst die Anwesenheit ausreichender Mengen von POX-Hydrolase bringt die Reaktivierungsleistung von Obidoxim voll zur Geltung.

### **Reaktivierungspotential der DEP-Obidoxim-Zerfallsprodukte**

Schließlich interessierte, ob die DEP-Obidoxim-Zerfallsprodukte des nichtenzymatischen Abbaus noch reaktivieren können. Tatsächlich stören weder die Nitrilgruppe, noch die Pyridonstruktur die Reaktivierung durch die verbleibende 4-Aldoxim-Funktion. Die Effizienz ist allerdings etwas geringer als der verbleibenden Oximgruppe entspricht. Ähnliches wurde auch für HI 2, das 4-Aldoxim-Analogon von HI-6 gefunden, seine Potenz bei Paraoxon-vergifteten Mäusen war um den Faktor 2,5 - 2,8 geringer als die des Obidoxims (Oldiges & Schoene 1970).

### **Charakterisierung der POX-Hydrolase**

Der Plasmabestandteil mit der Eigenschaft, DEP-Obidoxim zu inaktivieren, entpuppte sich als Enzymprotein mit einem Molekulargewicht von  $> 100$  kDa. Es wurde nicht durch Soman oder Paraoxonethyl inaktiviert, wodurch es sich in die Klasse der A-Esterasen einordnen ließ (Aldridge 1953 a/b) und als POX-Hydrolase bezeichnet wurde. Für die enzymatische Aktivität benötigte es  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die nicht durch  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  ersetzt werden konnten und erinnerte damit an die humane Paraoxonase (hPON1).

Nach Isolierung der POX-Hydrolase über die Chromatographie an Cibacron Blue 3GA, einer Methode, mit der sich auch die gesamte

Paraoxonase/Arylesterase in identischen Fraktionen wiederfand, wurde eine Charakterisierung des Plasmaproteins vorgenommen.

Im Vordergrund stand hierbei der Einfluß verschiedener gruppenspezifischer Reagenzien auf die POX-Hydrolase, die v.a. bei Josse et al. (1999a/b) zur Strukturcharakterisierung des aktiven Zentrums der Paraoxonase (PON1) eingesetzt wurden. Am Aufbau des aktiven Zentrums der PON1 ist zumindest ein Tryptophanrest beteiligt. So hemmte  $Tb^{3+}$  (0,1 mM), das mit Tryptophan einen Komplex eingeht, die  $Ca^{2+}$ -abhängige (1 mM) PON1-Aktivität vollständig. Gleiches widerfuhr auch der POX-Hydrolase.

Erfolgte eine Modifizierung von Tryptophan durch N-Bromsuccinimid (NBS), zeigte sich eine vergleichbare Empfindlichkeit der Paraoxonase/Arylesterase und der POX-Hydrolase.

Identisches Verhalten der POX-Hydrolase und der Arylesterase erwies sich auch bei den Versuchen mit Carbodiimiden als Reagenzien zur spezifischen Modifizierung der Carboxylgruppen von peptidisch gebundener Asparaginsäure und Glutaminsäure sowie bei den Quecksilberverbindungen PMA und p-OHMB als Reagenzien zur Blockierung von SH-Gruppen. Beide Enzymaktivitäten waren in gleichem Maße herabgesetzt oder vollständig ausgeschaltet.

Aufgrund der durchweg ähnlichen Empfindlichkeit der POX-Hydrolase und der Paraoxonase/Arylesterase gegenüber den eingesetzten Reagenzien lassen sich Tryptophan, Asparaginsäure/Glutaminsäure, und SH-Gruppen-tragende Aminosäuren im aktiven Zentrum der POX-Hydrolase vermuten.

### **Substratspezifität der POX-Hydrolase**

Die Reaktivierung mit TMB-4 (10  $\mu$ M), einem anderen Bis-Pyridinium-4-aldoxim mit guten Reaktivierungseigenschaften (Schoene & Strake 1971) als Alternative zu Obidoxim, zeigte die gleiche biphasische Kinetik für DEP-AChE wie mit Obidoxim, wenn die Enzymkonzentration hoch gewählt war. Dies diente wieder als Hinweis für die Entstehung von POX, in diesem Fall von DEP-TMB-4, dessen Wirkung ebenfalls durch ausreichende Mengen an POX-Hydrolase aufgehoben wurde.

Eine Aussage hinsichtlich der Spaltung von DEP-HI-6 durch POX-Hydrolase ließ sich nicht treffen. DEP-HI-6 wurde entweder nicht gebildet oder war derart instabil, daß eine Enzymhemmung nicht eintrat. Man geht davon aus, daß Phosphyloxime, die sich aus einem Organophosphat und einem Pyridinium-2-aldoxim wie Pralidoxim und HI-6 bilden, und nicht aus einem Pyridinium-4-aldoxim, wegen der acideren Methinprotonen deutlich instabiler sind (Hackley et al. 1959, Hagedorn et al. 1969, de Jong & Ceulen 1978, Leader et al. 1999). Ihre potentiell inhibierende Wirkung kommt somit nicht zum Ausdruck. Worek et al. (2000) kamen in diesem Zusammenhang zu dem Ergebnis, daß bei der Reaktivierung Sarin-gehemmter Erythrozyten-AChE mit HI-6 keine wirksame Phosphyloximanhäufung stattfindet. Davon abweichend zeigte sich das Phosphonyloxim, das während der Reaktivierung von Sarin-gehemmter EryAChE und BChE durch 2-PAM entstand, stabiler.

HLö 7 als gemischtes Bis-Pyridinium-2,4-dialdoxim nahm bei der Reaktivierung von DEP-AChE eine Zwischenstellung ein: in Abwesenheit von Plasma war ein, wenn auch weniger stark ausgeprägter, biphasischer Verlauf zu beobachten, der durch Plasma-Zusatz in eine Kinetik 1. Ordnung überging. Die Entstehung von DEP-HLö 7 ist

wahrscheinlich, der geringere Hemmeffekt läßt sich im Falle einer Phosphorylierung der Pyridinium-2-aldoxim-Funktion mit dessen höherer Instabilität erklären. Dieses Verhalten stand nur scheinbar im Widerspruch zu der Aussage von Worek et al. (2000), die keinerlei Phosphonyloximanhäufung mit HLö 7 feststellten. So ist denkbar, daß phosphonylierte AChE bevorzugt von der 2-Pyridiniumaldoximgruppe reaktiviert wird. Das wurde vor allem bei Cyclosarin-gehemmter AChE deutlich (Worek et al. 2002). Diese Beobachtung könnte ihre Erklärung allerdings auch im Aufbau des aktiven Zentrums oder der katalytischen Triade der AChE finden, die auf dem Grund einer tiefen Schlucht angeordnet sind und somit nicht allen Oximen, die sich in ihrer sterischen Anordnung und Molekülwinkeln voneinander unterscheiden, gleich guten Zugang zu dieser Einheit erlauben (Taylor et al. 1999, Wong et al. 2000).

Die POX-Hydrolase zeigte sich gegenüber verschiedenen Substraten relativ spezifisch hinsichtlich des Organophosphatrests. Als klinisch relevante Substrate wurden die Phosphoryloxime in-situ generiert und der POX-Hydrolase angeboten, die bei der Reaktivierung von insektizidvergifteter AChE durch das in Deutschland als einziges zur Therapie zugelassene Oxim Obidoxim (Toxogonin<sup>®</sup>) entstehen: Diethylphosphoryl-Obidoxim, Dimethylphosphoryl-Obidoxim und Diisopropylphosphoryl-Obidoxim. Tatsächlich wurde auch die Reaktivierung dimethylphosphorylierter und diisopropylphosphorylierter AChE durch Obidoxim in Anwesenheit von POX-Hydrolase verbessert, wobei der Effekt bei dimethylphosphorylierter schwächer als bei diethylphosphorylierter AChE war und für diisopropylphosphorylierte AChE nur sehr gering ausfiel.

Von den POX-Verbindungen mit Obidoxim stellt Diethylphosphoryl-Obidoxim daher das beste der hier untersuchten Substrate für die POX-

Hydrolase dar, gefolgt von Dimethylphosphoryl-Obidoxim und dem schlechten Substrat Diisopropylphosphoryl-Obidoxim.

Anzuführen ist noch, daß die POX-Hydrolase offensichtlich nicht in der Lage ist, Phosphonyloxime zu spalten, die sich bei der Reaktivierung von Nervenkampfstoff-inhibierter AChE bilden (Worek et al. 2000).

### **Identität der POX-Hydrolase und der humanen PON1?**

Die humane PON1 (hPON1) existiert in zwei genetisch determinierten, unterschiedlich aktiven Formen. Sie unterscheiden sich in ihrer Aktivität aufgrund eines Polymorphismus an Position 192, der auf dem Aminosäuren-Austausch von Arginin gegen Glutamin beruht. Diese Aminosäuren sollten sich daher direkt im aktiven Zentrum befinden oder so positioniert sein, daß sie maßgeblich den Substratumsatz regulieren.

Man kann anhand der verschiedenen Ergebnisse geneigt sein, die hPON1 und die POX-Hydrolase als identisches Enzym zu betrachten, wäre da nicht die sehr stark voneinander abweichende Verteilung der beiden Enzymaktivitäten in einzelnen Individuen. Als Erklärung für die unterschiedlichen Substratumsatzraten kann folgende Überlegung dienen: beim hochaktiven hPON1-Typ BB liegt mit Arginin als der am stärksten basischen Aminosäure bei physiologischem pH-Wert die protonierte Form vor; bei diesem Typ ist ein schlechterer Zutritt für positiv geladene Substrate wie das DEP-Obidoxim zum aktiven Zentrum denkbar. Im Falle des niedrig aktiven hPON1-Typ AA liegt hingegen unter physiologischen Bedingungen das neutrale Glutamin vor und stört vielleicht weniger den Zutritt von geladenen Molekülen. Mit dieser Vorstellung ließe sich die fehlende POX-Hydrolase-Aktivität bei den Probanden PE und GH mit hoher PON1-Aktivität erklären, die, vorbehaltlich einer bestätigenden Sequenzanalyse, den hochaktiven hPON1-Typ BB repräsentieren sollten. Bei den anderen Individuen

hingegen sollten eher die hPON1-Mischformen AB vorliegen mit unterschiedlich hohem Anteil der beiden Allele. Daß sich der Substratumsatz durch die polymorphen humanen PON1-Typen hinsichtlich verschiedener Organophosphate unterscheidet, ist bekannt. So spaltet der hPON1-Typ BB am effektivsten Paraoxon-ethyl, wohingegen die Spaltung von Diazoxon, Soman und Sarin deutlich schwächer ausfällt als beim hPON1-Typ AA (Davies et al. 1996). Das bi- bzw. trimodale Verteilungsmuster der humanen PON1-Aktivität läßt sich allerdings nicht auf alle Substrate übertragen. So findet man in humanem Serum für die A-Esterase-Aktivität hinsichtlich der Substrate Chlorpyrifos-oxon und Malaoxon (Sams & Mason 1999) eine unimodale Verteilung, wie sie auch für Phenylacetat zutrifft. Der Inhomogenität nicht genug, findet sich das bi- bzw. trimodale Verteilungsmuster für EDTA-sensitive PON1 nur bei Humanserum, und selbst da nicht bei allen ethnischen Bevölkerungsgruppen (Geldmacher-von Mallinckrodt & Diepgen 1988). In anderen Tierspezies gestaltet sich die Verteilung der PON1-Aktivität unimodal (Zech & Zürcher 1974), wobei die Höhe der PON1-Aktivität stark schwankt; so zeigt die Maus kaum Aktivität, um Paraoxon-ethyl zu spalten (Furlong et al. 2000), während die PON1 des Kaninchens in ihrer Aktivität von keiner anderen Spezies überboten wird (Aldridge 1953b; Zech & Zürcher 1974).

Die NaCl-Stimulation der humanen PON1 findet sich bei der Paraoxon-ethyl-Hydrolyse, aber nicht bei allen anderen Substraten. Dies führte zur Einstufung von Paraoxon-ethyl als "discriminating substrate" im Vergleich zu Phenylacetat (Eckerson et al. 1983b). Dies trifft aber nur auf Humanplasma und nicht auf Plasmen anderer Spezies zu (Beltowski et al. 2002).

In dieser Arbeit wurde nur exemplarisch die Ausstattung des Plasmas einzelner Spezies mit Paraoxonase- bzw. Arylesterase-Aktivität

bestimmt. Hier bestehen vermutlich deutliche Unterschiede in der Exprimierung der POX-Hydrolase in den verschiedenen Spezies. So scheinen die Nager, das Schwein und das Kaninchen nahezu keine POX-Hydrolase-Aktivität zu besitzen, wenn man die Arylesterase-Aktivität als Bezugsgröße heranzieht. Die Primaten hingegen lassen sich eher mit der POX-Hydrolase aus Humanplasma vom vermeintlichen PON1-Typ AB (DK) auf eine Stufe stellen.

Zusammenfassend läßt sich anhand der bisherigen Befunde postulieren, daß hPON1-Typ AA nennenswerte POX-Hydrolase-Aktivität aufweist, während hPON1-Typ BB nur sehr niedrige Aktivität besitzt. Gleiches gilt für Ratte, Meerschwein, Schwein und Kaninchen und wahrscheinlich auch für Primaten, da sie nur geringe PON1-Aktivität aufweisen.

### **Einfluß der POX-Hydrolase-Aktivität auf die Wirksamkeit von Obidoxim bei Organophosphat-Vergiftungen**

Überträgt man die Befunde auf Vergiftungssituationen, in denen Patienten ein Oxim erhalten, bleiben viele Fragen weiterhin offen: bildet sich anticholinerges POX "nur" bei der Reaktivierung gehemmter AChE mit Oximen, oder entsteht es auch durch direkte Reaktion des Oxons mit Oxim? Hierfür müßten beide Reaktionspartner am identischen Ort vorliegen. Wird dieses POX sehr schnell von verschiedenen Scavengern unwirksam gemacht oder ist es unter physiologischen Bedingungen sehr instabil? Welche Phosphyloxime stellen Substrate der POX-Hydrolase dar? In welchen Geweben befindet sich die POX-Hydrolase, befindet sie sich nur im Plasma oder auch in der Umgebung der cholinergen Synapsen, dem eigentlich wichtigen Angriffspunkt der Oxime? Wie und wo ist die POX-Hydrolase in verschiedenen Spezies exprimiert, v.a. bei den Arten, mit denen Untersuchungen zur Wirksamkeit von Oximen durchgeführt werden? Wie wirkt sich dieser Faktor auf die seit langem

bekannten Speziesunterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit von Oximen aus?

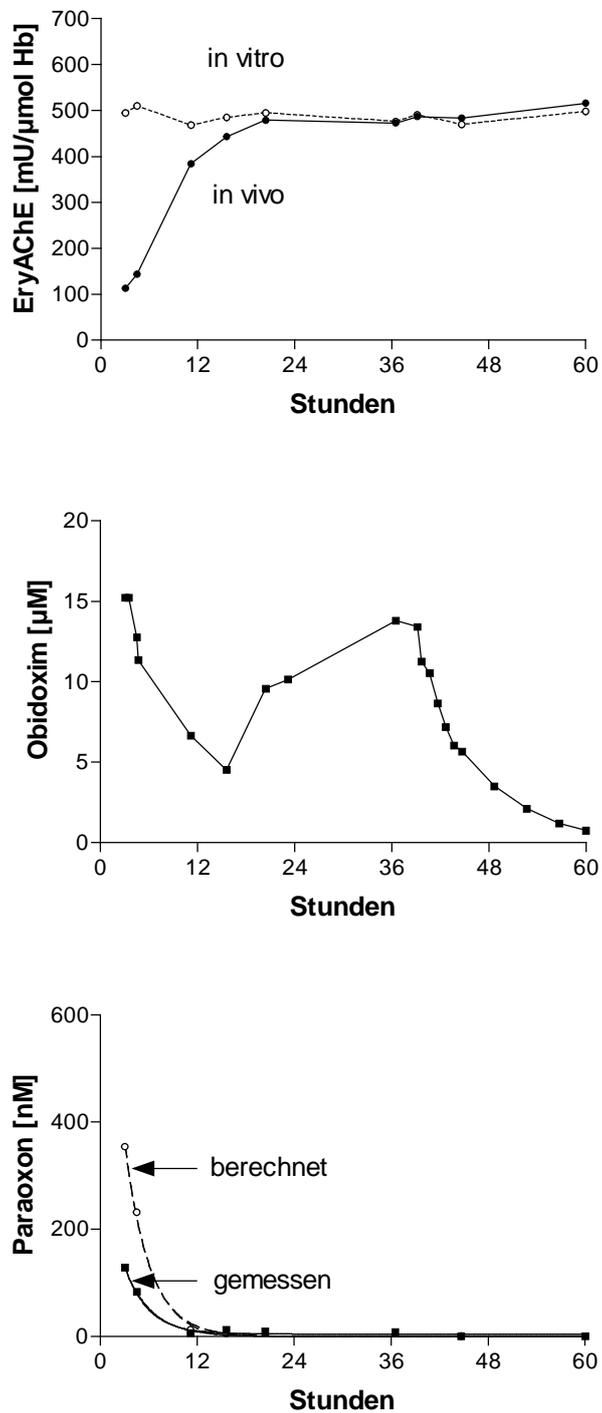
Überträgt man diese Aspekte auf den Therapieerfolg mit Obidoxim bei Diethyl- oder Dimethylphosphat-vergifteten Patienten, so sollten die Patienten mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität auch mehr von der Behandlung mit Obidoxim profitieren. Hinweise darauf, daß dies auch in vivo wirklich eine Rolle spielt, gibt es aus Humandaten, die im Rahmen einer Studie mit Insektizid-vergifteten Patienten erhoben worden sind.

Bei dieser Studie wurden Untersuchungen an Patienten mit einer Insektizid-Vergiftung durchgeführt, die mit Atropin und Obidoxim als Dauerinfusion therapiert wurden. Der Verlauf der EryAChE-Aktivität in vivo und die maximal erreichbare Reaktivierbarkeit in vitro wurde verfolgt (Mast 1997), außerdem wurde die Obidoxim-Konzentration (Spöhrer et al. 1994, Spöhrer et al. 1995) und als weiteres wichtiges Kriterium die Paraoxon-Konzentration (Eyer F. 2000) im Plasma der Patienten bestimmt. Anhand der kinetischen Parameter  $K_D$ ,  $k_r$  und  $k_i$  (Mast 1997) und mit Hilfe der gemessenen Konzentrationen an freiem Enzym, gehemmtem Enzym und Obidoxim ließ sich überdies die theoretisch zu erwartende Giftkonzentration berechnen (Eyer F. 2000).

**Abb. 4-1** zeigt den Verlauf der Parameter bei dem Parathion-Patienten SG25; dieser Patient wies nur niedrige POX-Hydrolase-Aktivität auf (37,2%, Methode durch AChE-Reaktivierung). Betrachtet man hier die berechneten mit den gemessenen Paraoxonkonzentrationen, so liegt die berechnete Paraoxonkonzentration höher als die gemessene. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorliegen eines potenteren Giftes sein, wie bei Phosphoryloximanhäufung erwartet. Ein anderes Bild präsentierte sich bei dem Parathion-Patienten LR31 (**Abb. 4-2**). Hier lag nun die berechnete Paraoxonkonzentration niedriger als die gemessene und die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität ergab für diesen Patienten

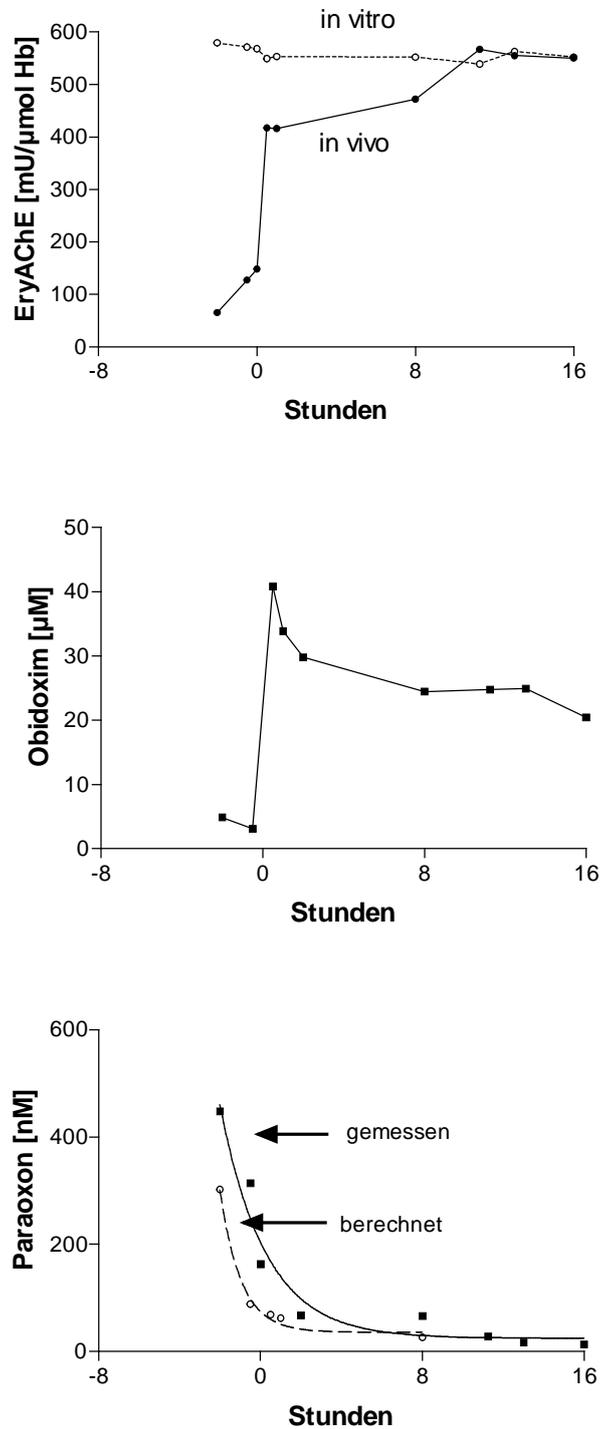
einen ausgesprochen hohen Wert (88,8%, Methode durch AChE-Reaktivierung). (Eine um ca. 50% niedrigere berechnete Paraoxonkonzentration war bei kompletter POX-Inaktivierung zu erwarten, da Paraoxon zu ca. 50% an Blutproteine gebunden vorliegt (Eyer F. 2000). Bei der Bestimmung wird dieser Anteil wegen der Etherextraktion dagegen miterfaßt.)

## Parathion Vergiftung SG 25



**Abb. 4-1:** Patient SG25: Aktivität *in vivo* und Reaktivierbarkeit der EryAChE *in vitro* über die Behandlungszeit (oben); Plasmakonzentrationen von Obidoxim (Mitte) und Paraoxon (unten).

## Parathion Vergiftung LR 31



**Abb. 4-2:** Patient LR31: Aktivität *in vivo* und Reaktivierbarkeit der EryAChE *in vitro* über die Behandlungszeit (oben); Plasmakonzentrationen von Obidoxim (Mitte) und Paraoxon (unten).

Diese beiden Beispiele zeigen, daß die POX-Hydrolase-Aktivität tatsächlich einige Bedeutung für die Wirksamkeit der Oximtherapie beim Menschen haben kann. So scheint der Polymorphismus von PON1 ein weiterer Faktor zu sein, der den individuellen Verlauf einer Organophosphat-Vergiftung und der Therapie beeinflussen kann.

Über die physiologische Bedeutung dieses Enzyms (Konzentration im Serum immerhin ca. 1  $\mu$ M (Jakubowski 2001)) ist viel spekuliert worden. So wurde PON1 mit dem Metabolismus von oxidierten Lipiden in Zusammenhang gebracht (La Du et al. 1999, Mackness et al. 1991) und eine Bedeutung für den Homocystein-Stoffwechsel vermutet (Jakubowski 2000). Die unphysiologische Wirkung als Paraoxonase oder POX-Hydrolase ist demgegenüber ein Nebenbefund.

Es hat bereits nicht an Versuchen gefehlt, POX auch mit anderen Hydrolasen zu inaktivieren. Hierzu wurden bakterielle Enzyme verwendet (Leader et al. 1999), wie eine Phosphotriesterase aus *Pseudomonas diminuta* und eine Organophosphat-Hydrolase aus *Alteromonas* (Josse et al. 2001). Diese Enzyme spalten Paraoxon-ethyl und DFP um 3 Größenordnungen schneller als PON1 und inaktivieren wohl auch Phosphoryloxime. Die Anwendung von Enzymzubereitungen bakteriellen Ursprungs am Menschen ist allerdings aufgrund von Antikörperbildung und einer nicht abzuschätzenden toxischen Gefährdung mit einigen Risiken verbunden. Es wäre aber reizvoll, hochaktive humane POX-Hydrolase herzustellen, und zu prüfen, ob die Therapie durch Obidoxim bei Patienten mit niedriger POX-Hydrolase-Aktivität tatsächlich deutlich verbessert werden kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die bereits vor langer Zeit gemachte Beobachtung, daß die Reaktivierung von Organophosphat-gehemmter Acetylcholinesterase (AChE) in vitro durch die hochpotenten Pyridinium-4-aldoxime nach einer schnellen Anfangsphase sehr rasch zum Erliegen kommt, wird auf die Anhäufung von Reaktionsprodukten zurückgeführt, die noch toxischer sind als die Organophosphate selbst.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde ein derartiges Produkt, das Diethylphosphoryl-Obidoxim (DEP-Obidoxim) generiert, isoliert und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert. Die Geschwindigkeit der Hemmung der EryAChE durch DEP-Obidoxim lag mit einem Faktor von 350 über dem Wert für Paraoxon-ethyl und unterstreicht somit die überaus hohe Giftigkeit. DEP-Obidoxim weist eine hohe Instabilität auf und zerfällt unter physiologischen Bedingungen bei einem pH von 7,4 und 37 °C mit einer Halbwertszeit von Minuten zunächst in das ebenfalls instabile Mononitril-Derivat des Obidoxims, das schließlich unter Freisetzung von Cyanid das Monopyridon-Derivat des Obidoxims bildet. Diese Zerfallsprodukte wurden isoliert und durch massenspektrometrische Analyse identifiziert. Die Reaktivierung von Organophosphat-gehemmter, humaner EryAChE durch Pyridinium-4-aldoxime verlief nur dann biphasisch und zögerlich, wenn die Enzymquelle isoliert von Humanplasma vorlag. Wurde hingegen die EryAChE aus humanem Vollblut reaktiviert, so zeigte sich ein monophasischer Verlauf, den man auch aus In-vivo-Beobachtungen erwarten konnte. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit haben ergeben, daß im humanen Plasma ein Enzym existiert, das in der Lage ist, die Reaktivierungsleistung der hochaktiven Pyridinium-4-aldoxime zu steigern, wenn es sich um eine Vergiftung der AChE mit insektiziden

Phosphorsäureestern handelt. Dieses Enzym trägt hierzu durch Hydrolyse der sich bildenden, hochtoxischen Phosphoryloxime bei, wodurch das Oxim zurückgewonnen und das entsprechende, inaktive Phosphorsäurederivat gebildet wird. Die einzelnen Phosphoryloxime, die sich sowohl in ihrer Organophosphat- als auch in ihrer Oximkomponente voneinander unterscheiden können, stellen sich nicht als einheitlich gute Substrate für dieses Enzym, die POX-Hydrolase, dar. Die unterschiedliche Ausstattung einzelner Individuen mit der POX-Hydrolase ist ein kritisches Kriterium für den Behandlungserfolg von insektizidvergifteten Patienten. Diejenigen Patienten, die gut mit POX-Hydrolase-Aktivität ausgestattet waren, profitierten mehr von der Therapie mit Obidoxim als die mit geringerer POX-Hydrolase-Aktivität. Offensichtlich fand hier der Abbau des in vivo entstandenen Phosphoryloxims in größerem Ausmaß statt. Inwieweit die POX-Hydrolase bei Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen positiven Einfluß nimmt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beurteilt werden.

Aufgrund des Verhaltens gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und EDTA entstand die Frage nach der Identität der POX-Hydrolase und der Paraoxonase (hPON1) als polymorph exprimierte Enzyme. Die beiden Enzymaktivitäten verhielten sich während der Aufreinigung und gegenüber verschiedenen Protein-modifizierenden Reagenzien ähnlich, so daß vermutlich am Aufbau der aktiven Zentren gleiche Aminosäuren beteiligt sind. Gereinigte hPON1 Typ AA zeigte sehr hohe POX-Hydrolase-Aktivität, aber nur geringe Aktivität, Paraoxon-ethyl zu hydrolysieren. Das hPON1 A-Allel kann demnach für das Allel mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität verantwortlich gemacht werden. Denkt man an die mannigfachen Variationsmöglichkeiten hinsichtlich der Ausstattung einzelner Individuen mit den beiden Allelen, läßt sich das

unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Enzymaktivitäten erklären, das im Plasma verschiedener Probanden gefunden wurde.

Interessanterweise wies das Plasma von Ratte, Meerschwein, Schwein, Kaninchen, Cynomolgus, Pavian und Rhesusaffe wesentlich geringere POX-Hydrolase-Aktivität auf als das Plasma des Menschen mit dem A-Allel. Das weist einmal mehr darauf hin, daß Ergebnisse, die am Tiermodell gewonnen wurden, durch Vergleich mit Humandaten abgesichert werden müssen, bevor sie für den Menschen verallgemeinert werden.

## 6 LITERATUR

**Aldridge, WN. (1953a)**

Serum esterases - 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem J 53: 110-117

**Aldridge, WN. (1953b)**

Serum esterases - 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem J 53: 117-124

**Aldridge, WN. und Reiner, E. (1972)**

Enzyme inhibitors as substrates- interactions of esterases with esters of organophosphorus and carbamic acids.

North-Holland Publishing Company, Amsterdam London

**Ashani, Y., Leader, H., Rothschild, N., Dosoretz, C. (1998)**

Combined effect of organophosphorus hydrolase and oxime on the reactivation rate of diethylphosphoryl-acetylcholinesterase conjugates.

Biochem Pharmacol 55: 159-168

**Becker, G., Kawan, A., Szinicz, L. (1997)**

Direct reaction of oximes with sarin, soman, or tabun in vitro.

Arch Toxicol 71: 714-718

**Belitz, H.D. und Grosch, W. (1987)**

In: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer Verlag

**Beltowski, J., Wojcicka, G., Marciniak, A. (2002)**

Species- and substrate-specific stimulation of human plasma paraoxonase 1 (PON1) activity by high chloride concentration.

Acta Biochimica Polonica 49(4): 927-936

**Bernasconi, R. (1965)**

Untersuchungen über die Stabilität von N,N-Dimethylenoxid-bis-(pyridinium-4-aldoxim)-dichlorid in wäßriger Lösung.

Pharmaceutica Acta Helvetiae 40: 564-574

**Brown, SK., Ames, RG., Mengle, DC. (1989)**

Occupational illness from cholinesterase-inhibiting pesticides among agricultural applicators in California.

Arch Environ Health 44: 35-39

**Christenson, I. (1968)**

Hydrolysis of bis(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridiniummethyl)etherdichloride (Toxogonin®). I. Decomposition products.

Acta Pharm Suec 5: 23-36

**D'Agostino, PA., Provost, LR., Hancock, JR., Boulet CA. (1996)**

Electrospray mass spectrometric characterization of six therapeutic oximes: HI-6, HS-6, obidoxime, 2-PAM, TMB-4 and HLö-7.

Rapid Commun Mass Spectrom 10 (7): 805-810

**Davies, HG., Richter, RJ., Keifer, M., Broomfield, CA., Sowalla, J., Furlong, CE. (1996)**

The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin.

Nat Genet 14: 334-336

**La Du, BN. (1992)**

Human serum paraoxonase/arylesterase.

in: Kalow W. (ed) Pharmacogenetics of drug metabolism, Pergamon Press, New York 51-91

**La Du, BN., Aviram, M., Billecke, S., Navab, M., Primo-Parmo, S., Sorenson, RC., Standiford, TJ. (1999)**

On the physiological role(s) of the paraoxonases.

Chem Biol Interact 119-120: 379-388

**Eckerson, HWC., Romson, J., Wyte, CM., La Du, BN. (1983a)**

The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Identification of phenotypes by their response to salts.

Am J Hum Genet 35: 214-227

**Eckerson, HWC., Wyte, C., La Du, BN. (1983b)**

The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism.

Am J Hum Genet 35: 1126-1138

**Ellman, GL., Courtney, KD., Andres, V., Featherstone, RM. (1961)**

A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochem Pharmacol 7: 88-95

**Erdmann, WD. und von Clarmann, M. (1963)**

Ein neuer Esterase-Reaktivator für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten.

Dtsch Med Wochenschr 88: 2201-2206

**Erdös, EG., Debay, CR., Westerman, MP. (1960)**

Arylesterases in blood: effect of calcium and inhibitors.

Biochem Pharmacol 5: 173-186

**Erdös, EG. und Boggs, LE., (1961)**

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.

NATURE 190: 716-17

**Eyer, F. (2000)**

Einfache quantitative Bestimmung von Paraoxon (1-50 ng) aus Blut mit Hilfe eines biologischen Tests.

Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München; Medizinische Fakultät

**Eyer, P. (1996)**

Optimal oxime dosage regimen, a pharmacokinetic approach.

In: Szinicz, L., Eyer, P., Klimmek, R. (eds.) Role of oximes in the treatment of anticholinesterase agent poisoning.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 33-51

**Eyer, P., Kawan, A., Ladstetter, B. (1987)**

Formation of cyanide after i.v. administration of the oxime HI 6 to dogs.

Arch Toxicol 61: 63-69

**Eyer, P., Eyer, F., Felgenhauer, N., Haberkorn, M., Meischner, V., Thiermann, H., Worek, F., Zilker, T. (2000)**

Intensiviertes Monitoring des Cholinesterase-Status bei Organophosphatvergifteten Patienten.

Zbl Arbeitsmed 50: 433

**Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003)**

Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment.

Anal Biochem 312(2): 224-227

**Furlong, CE., Li, WF., Brophy, VH., Jarvik, GP., Richter, RJ., Shih, DM., Lusic, AJ., Costa, LG. (2000)**

The PON1 gene and detoxication.  
NeuroToxicology 21(4): 581-588

**Gan, KN., Smolen, A., Eckerson, HW., La Du, BN. (1991)**

Purification of human serum paraoxonase/arylesterase.  
Drug Metab Disp 19(1): 100-106

**Geldmacher-von Mallinckrodt, M. und Diepgen, TL. (1988)**

The human serum paraoxonase-polymorphism and specificity.  
Toxicological and Environmental Chemistry 18: 79-196

**Green, AL. und Saville, B. (1956)**

The reaction of oximes with isopropylmethylphosphonofluoridate (sarin).  
J Chem Soc 3887-3892

**Haas, A. und Geldmacher-von Mallinckrodt, M. (1990)**

Enzyme visualization with partially dehydrated agarose substrate layers: Detection of paraoxonase after thin layer isoelectric focusing in agarose.  
Electrophoresis 11: 621-626

**Hackley, BE., Steinberg, GM., Lamb, JC. (1959)**

Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (GB).  
Arch Biochem Biophys 80: 211-214

**Hahn, HL. und Henschler, D. (1969)**

Zur Reaktivierbarkeit phosphorylierter Cholinesterasen durch Obidoximchlorid (Toxogonin) in vivo.  
Arch Toxikol 24: 147-163

**Hagedorn, I., Gündel, WH., Schoene, K. (1969)**

Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholin-Esterase mit Oximen: Beitrag zum Studium des Reaktionsablaufes.  
Arzneim-Forsch 19: 603-606

**Harvey, B., Scott, RP., Sellers, DJ., Watts, P. (1986)**

In vitro studies on the reactivation by oximes of phosphorylated acetylcholinesterase - I.  
Biochem Pharmacol 35: 737-744

**Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (1987)**

Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.  
Thieme Verlag Stuttgart

**Howells, DJ. und Coult, DB. (1971)**

Ions of the rare earths as possible reactivators of acetylcholinesterase inhibited by some organophosphorus compounds.  
Biochim Biophys Acta 244: 427-431

**Innes, DF., Fuller, BH., Berger, GMB. (1990)**

Low serum cholinesterase levels in rural workers exposed to organophosphate pesticide sprays.  
S Afr Med J 78: 581-583

**Jakubowski, H. (2000)**

Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase: a protective mechanism against protein N-homocysteinylation.  
J Biol Chem 275: 3957-3962

**Jakubowski, H. (2001)**

Biosynthesis and reactions of homocysteine thiolactone.  
In: Carmel, R., Jacobsen, DW. (eds.) Homocysteine in Health and Disease;  
Cambridge University Press, Cambridge, 21-31

**Johnson, MK., Jacobsen, D., Meredith, TJ., Eyer, P., Heath, AJ., Ligtenstein, DA., Marrs, TC., Szinicz, L., Vale, JA., Haines, JA. (2000)**

Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides.  
Emergency Medicine 12: 22-37

**de Jong, LPA. und Ceulen, DI. (1978)**

Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphorylated oximes.  
Biochem Pharmacol 27: 857-863

**Josse, D., Xie, W., Masson, P., Lockridge, O. (1999a)**

Human serum paraoxonase (PON1): identification of essential amino acid residues by group-selective labelling and site-directed mutagenesis.  
Chem Biol Interact 119-120: 71-78

**Josse, D., Xie, W., Masson, P., Schopfer, LM., Lockridge, O. (1999b)**  
Tryptophan residue(s) as major components of the human serum paraoxonase active site.

Chem Biol Interact 119-120: 79-84

**Josse, D., Lockridge, O., Xie, W., Barthels, CF., Schopfer, LM., Masson, P. (2001)**

The active site of human paraoxonase (PON1).

J Appl Toxicol 21: 7-11

**Junge, W. und Klees, H. (1984)**

Arylesterase.

In: Bergmeyer, HU., Bergmeyer, J., Graßl, M. (eds); Methods of enzymatic analysis, Verlag Chemie, Weinheim: 8-14

**Kiderlen, D., Worek, F., Klimmek, R., Eyer, P. (2000)**

The phosphoryl oxime-destroying activity of human plasma.

Arch Toxicol 74: 27-32

**Kosower, EM. und Patton, JW. (1966)**

The products and kinetics of hydrolysis of cyanopyridinium ions.

Tetrahedron 22: 2081-2093

**Kunkel, GJ., Busch, KL., Dunphy, R., Burinsky, DJ., Barak, R., Bel, P., Amitai, G., Vincze, A. (1995)**

Liquid secondary ion mass spectra and fast atom bombardment mass spectra of diquaternary pyridinium oxime salts.

Journal of Mass Spectrometry 30: 282-289

**Kuo, CL. und La Du, BN. (1998)**

Calcium binding by human and rabbit serum paraoxonases- structural stability and enzymatic activity.

Drug Metab Dispos 26: 653-660

**Lamb, JC., Steinberg, GM., Hackley, BE. (1964)**

Isopropyl methylphosphonylated bisquaternary oximes, powerful inhibitors of cholinesterase.

Biochim Biophys Acta 89: 174-176

**Leader, H., Vincze, A., Manisterski, B., Rothschild, N., Dosoretz, C., Ashani, Y. (1999)**

Characterization of O,O-diethylphosphoryl oximes as inhibitors of cholinesterases and substrates of phosphotriesterases.

Biochem Pharmacol 58: 503-515

**Lockridge, O. und Masson, P. (2000)**

Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk.

Neurotoxicology 21(1-2): 113-126

**Lundblad, RL. (1991)**

Chemical Reagents for Protein Modification, 2<sup>nd</sup> edition

CRC Press, Inc.; Boston London

**Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radic, Z., Taylor, P., Doctor, BP. (1999)**

Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium.

Biochemistry 38: 9937-9947

**Mackness, MI., Arrol, S., Durrington, PN. (1991)**

Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein.

FEBS Lett 286: 152-154

**Marquis, JK. (1984)**

Terbium binding to rat brain acetylcholinesterase. A fluorescence probe of anionic sites.

Comp Biochem Physiol 78C(2): 335-338

**Masson, P. und Goasdoue, JL. (1986)**

Evidence that the conformational stability of 'aged' organophosphate-inhibited cholinesterase is altered.

Biochim Biophys Acta 869: 304-313

**Mast, U. (1997)**

Reaktivierung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase durch Oxime. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München; Medizinische Fakultät

**Merck Index (1989)**

An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals; 11<sup>th</sup> Edition.  
Merck & Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A.: p.1112.

**Nagashima, S. (1978)**

Spectrophotometric determination of cyanide with sodium isonicotinate and sodium barbiturate.

Anal Chim Acta 99: 197-201

**Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Nakajima, M., Iwase, H., Iwadate, K. (1997)**

Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway.

Toxicol Appl Pharmacol 144: 198-203

**Nenner, M. (1974)**

Phosphonylierte Aldoxime. Hemmwirkung auf Acetylcholinesterase und hydrolytischer Abbau.

Biochem Pharmacol 23: 1255-1262

**Nozaki, H., Aikawa, N., Shinozawa, Y., Hori, S., Fujishima, S., Takuma, K., Sagoh, M. (1995)**

Sarin poisoning in Tokyo subway.

Lancet 345: 980-981

**Oldiges, H. und Schoene, K. (1970)**

Pyridinium- und Imidazoliumsalze als Antidote gegenüber Soman- und Paraoxonvergiftungen bei Mäusen.

Arch Toxicol 26: 293-305

**Portmann, R., Niederhauser, A., Hofmann, W., Frey, A. (1991)**

Synthesis of 4-{{[(isopropoxy)methylphosphoryloxy]imino}methyl}-1-methylpyridinium iodide and its characterisation.

Helv Chim Acta 74: 331-335

**Raveh, L., Grunwald, J., Marcus, D., Papier, Y., Cohen, E., Ashani, Y. (1993)**

Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. *In vitro* and *in vivo* quantitative characterization.

Biochem Pharmacol 45 (12): 2465-2474

**Sams, C., Mason, HJ. (1999)**

Detoxification of organophosphates by A-Esterases in human serum.  
Hum Exp Toxicol 18: 653-658

**Schoene, K. und Strake, EM. (1971)**

Reaktivierung von Diäthylphosphoryl-Acetylcholinesterase - Affinität und Reaktivität einiger Pyridiniumoxime.  
Biochem Pharmacol 20: 1041-1051

**Schoene, K. (1972)**

Reaktivierung von O,O-Diäthylphosphoryl-Acetylcholinesterase.  
Reaktivierungs-Rephosphorylierungs-Gleichgewicht.  
Biochem Pharmacol 21: 163-170

**Schoene, K. (1973)**

Phosphonylbildung aus Soman: Bildung und Reaktion mit Acetylcholinesterase in vitro.  
Biochem Pharmacol 22: 2997-3003

**Spande, TF. und Witkop, B. (1967)**

Determination of the tryptophane content of proteins with N-Bromosuccinimide.  
Methods Enzymol 11: 498-506

**Spöhrer, U. (1994)**

HPLC-analytische Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Pyridiniumaldoximen.  
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München; Fakultät für Chemie und Pharmazie

**Spöhrer, U., Thiermann, H., Klimmek, R., Eyer, P. (1994)**

Pharmacokinetics of the oximes HI 6 and HLö 7 in dogs after i.m. injection with newly developed dry/wet autoinjectors.  
Arch Toxicol 68: 480-489

**Spöhrer, U. und Eyer, P. (1995)**

Separation of geometrical syn/anti isomers of obidoxime by ion-pair high-performance liquid chromatography.  
Chromatogr A 693: 55-61

**Sri Lankan Ministry of Health. (2001)**

Annual Health Bulletin, Sri Lanka 1999.  
Colombo: Ministry of Health

**Stark, I. (1968)**

Versuche zur Darstellung eines L<sub>ü</sub>H<sub>6</sub> (Toxogonin) überlegenen Acetylcholinesterase-Reaktivators.

Dipl. Arbeit, Univ. Freiburg

**Stark, I. (1971)**

Reaktivierung phosphorylierter Acetylcholinesterase mit quaternierten Pyridiniumaldoximen: Ermittlung eines Zusammenhangs zwischen Oximacidität und Reaktivierungsvermögen.

Thesis, Univ. Freiburg

**Steinberg, GM. und Solomon, S. (1966)**

Decomposition of a phosphonylated pyridinium aldoxime in aqueous solution.

Biochemistry 5: 3142-3150

**Sussman, JL., Harel, M., Frolow, F., Oefner, Ch., Goldman, A., Toker, L., Silman, I. (1991)**

Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein.

Science 253: 872-879

**Suzuki, T., Morita, H., Ono, K., Maekawa, K., Nagai, R., Yazaki, Y. (1995)**

Sarin poisoning in Tokyo subway.

Lancet 345: 980

**Taylor, P., Wong, L., Radic, Z., Tsigelny, I., Brüggemann, R., Hosea, NA., Berman, HA. (1999)**

Analysis of cholinesterase inactivation and reactivation by systematic structural modification and enantiomeric selectivity.

Chem Biol Interact 119-120: 3-15

**Thiermann, H., Mast, U., Klimmek, R., Eyer, P., Hibler, A., Pfab, R., Felgenhauer, N., Zilker, T. (1997)**

Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients.

Hum Exp Toxicol 16: 473-480

**Volkova, RI. und Kochetova, LM. (1981)**

Effect of carbodiimides on the catalytic properties of cholinesterases.

Biokhimia 46(10): 1823-1831

**Walmsley, TA., Abernethy, MH., Fitzgerald, HP. (1987)**

Effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman`s reagent, 5,5`-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

Clin Chem 33(10): 1928-1931

**Waser, PG., Alioth-Streichenberg, CM., Hopff, WH., Portmann, R., Hofmann, W., Niederhauser, A. (1992)**

Interaction of obidoxime with sarin in aqueous solution.

Arch Toxicol 66: 211-215

**Wilson, IB. und Ginsburg, S. (1955)**

A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase.

Biochim Biophys Acta 18: 168-170

**Wolthuis, OL., Benschop, HP., Berends, F. (1981)**

Persistence of the anti-cholinesterase soman in rats; antagonism with a non-toxic simulator of this organophosphate.

European Journal of Pharmacology 69(3): 379-383

**Wong, L., Radic, Z., Brüggemann, JM., Hosea, N., Berman, HA., Taylor, P. (2000)**

Mechanism of oxime reactivation of acetylcholinesterase analyzed by chirality and mutagenesis.

Biochemistry 39: 5750-5757

**World Health Organization (WHO) in Kooperation mit United Nations Environment Programme (1990).**

Public Health Impact of Pesticides used in Agriculture.

Genf: World Health Organization

**Worek, F., Bäcker, M., Thiermann, H., Szinicz, L., Mast, U., Klimmek, R., Eyer, P. (1997)**

Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning.

Hum Exp Toxicol 16: 466-472

**Worek, F., Eyer, P., Szinicz, L. (1998)**

Inhibition, reactivation, and aging kinetics of cyclohexylmethylphosphonofluoridate-inhibited human cholinesterases.

Arch Toxicol 72: 580-587

**Worek, F., Diepold, C., Eyer, P. (1999a)**

Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterase: inhibition, reactivation, and aging kinetics.

Arch Toxicol 73: 7-14

**Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P. (1999b)**

Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood.

Clin Chim Acta 288: 73-90

**Worek, F., Eyer, P., Kiderlen, D., Thiermann, H., Szinicz, L. (2000)**

Effect of human plasma on the reactivation of sarin-inhibited human erythrocyte acetylcholinesterase.

Arch Toxicol 74: 21-26

**Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Szinicz, L. (2002)**

Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates.

Arch Toxicol 76: 523-529

**Zech, R. und Zürcher, K. (1974)**

Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals.

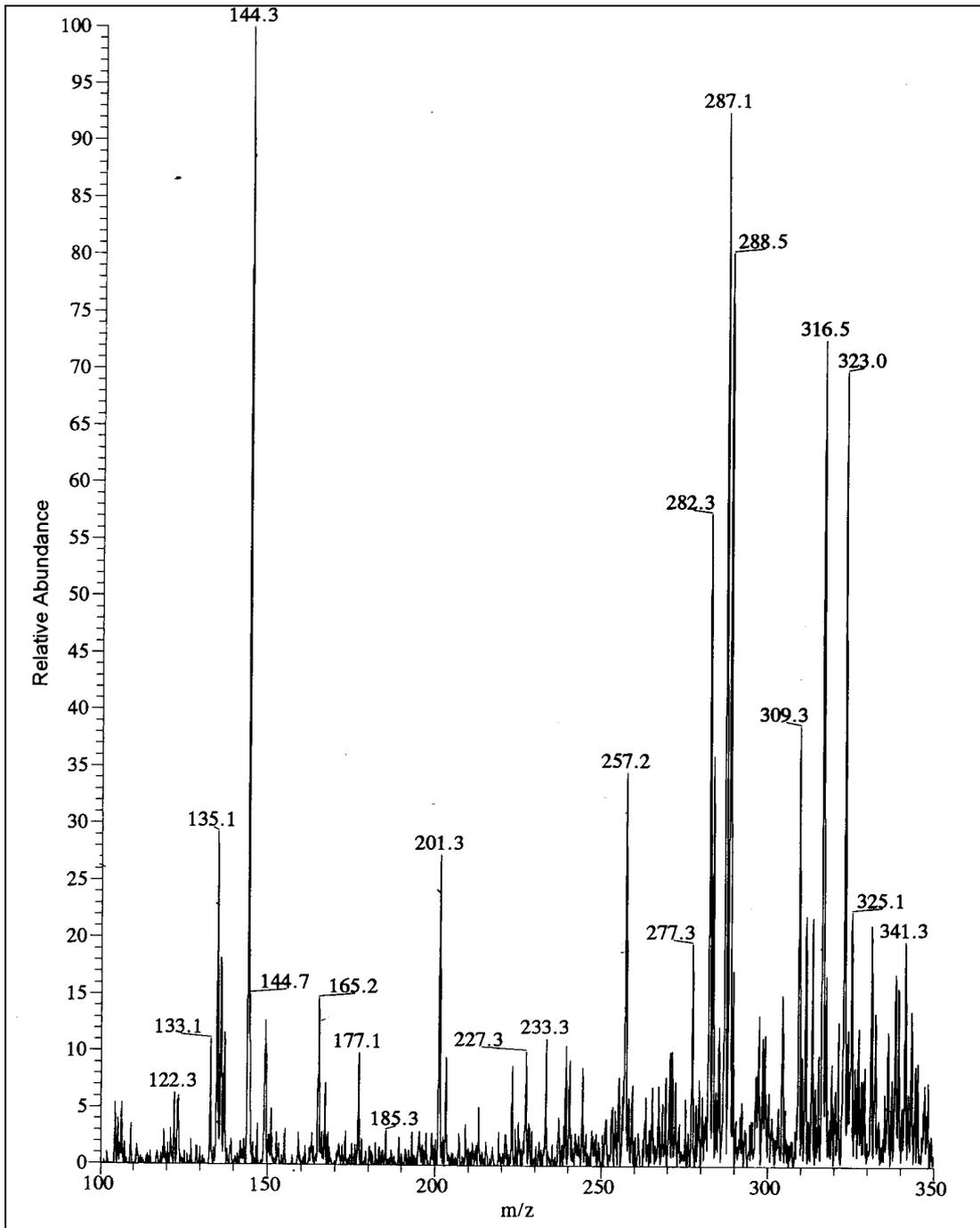
Comp Biochem Physiol 48B: 427-433

## 7 Anhang

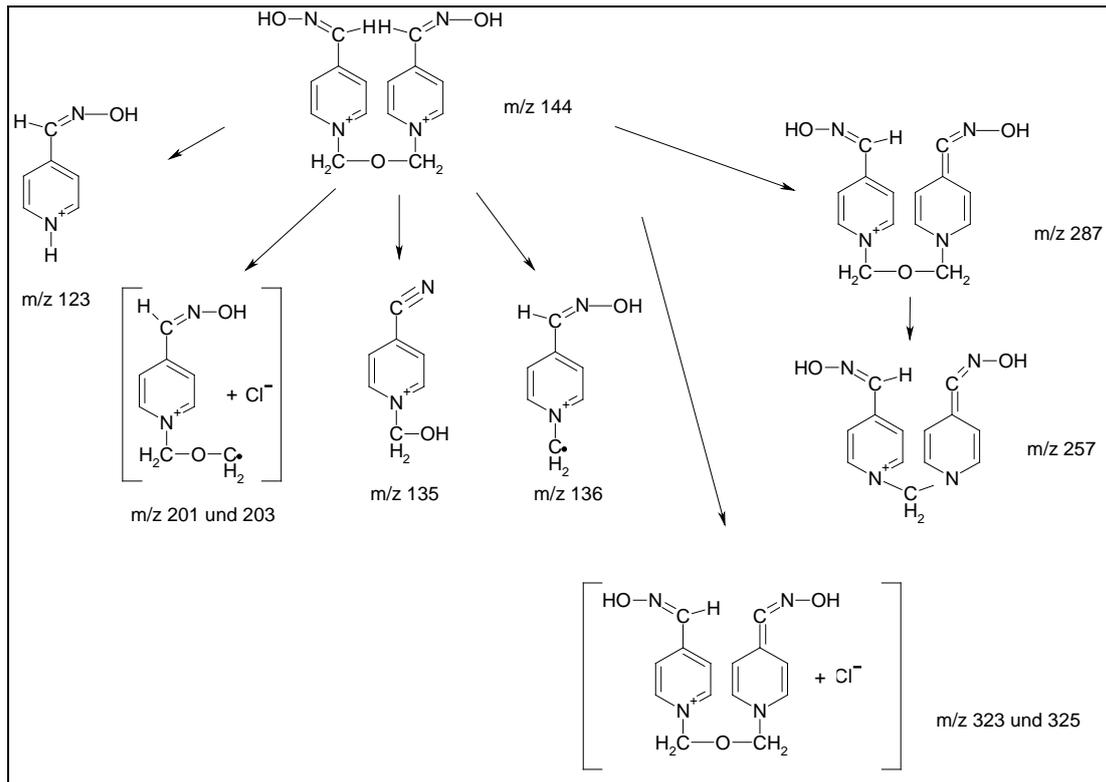
### 7.1 Massenspektrometrische Analyse im ESI<sup>+</sup> - Modus

Die Analyse von DEP-Obidoxim und seinen Abbauprodukten im ESI<sup>+</sup>-Modus mit Obidoxim-dichlorid als Standard wurde jeweils in der HPLC-Fließmittelmatrix durchgeführt, was zu Massenpeaks bei  $m/z$  149,1, 194,6, 244,5, 272,5, 282,4 und 288,5 führte, die durch den Eluenten bedingt waren. Diese Massenpeaks blieben bei der Auswertung unberücksichtigt woraus sich folgende Resultate ergaben:

**Abb. 7-1** zeigt zunächst das Massenspektrum von Obidoxim-dichlorid. Neben dem Molekülpeak von  $m/z$  144 finden sich Signale bei  $m/z$  123, 135, 136, 201, 257, 287 und 323, die den in **Abb. 7-2** gezeigten Molekülstrukturen entsprechen (D`Agostino et al. 1996, Kunkel et al. 1995).

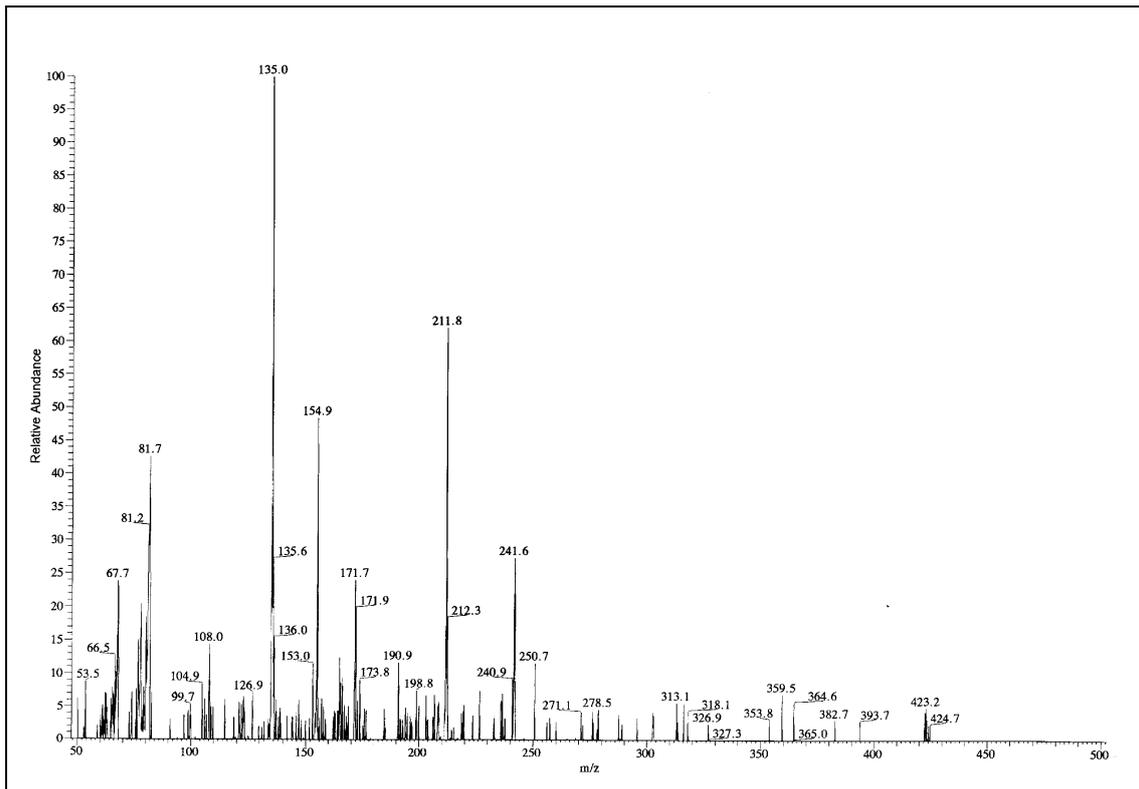


**Abb. 7-1:** Massenspektrum von Obidoxim-dichlorid in 10 mM NH<sub>4</sub>acetat/20% MeOH, pH 4,5, im ESI<sup>+</sup> - Modus.

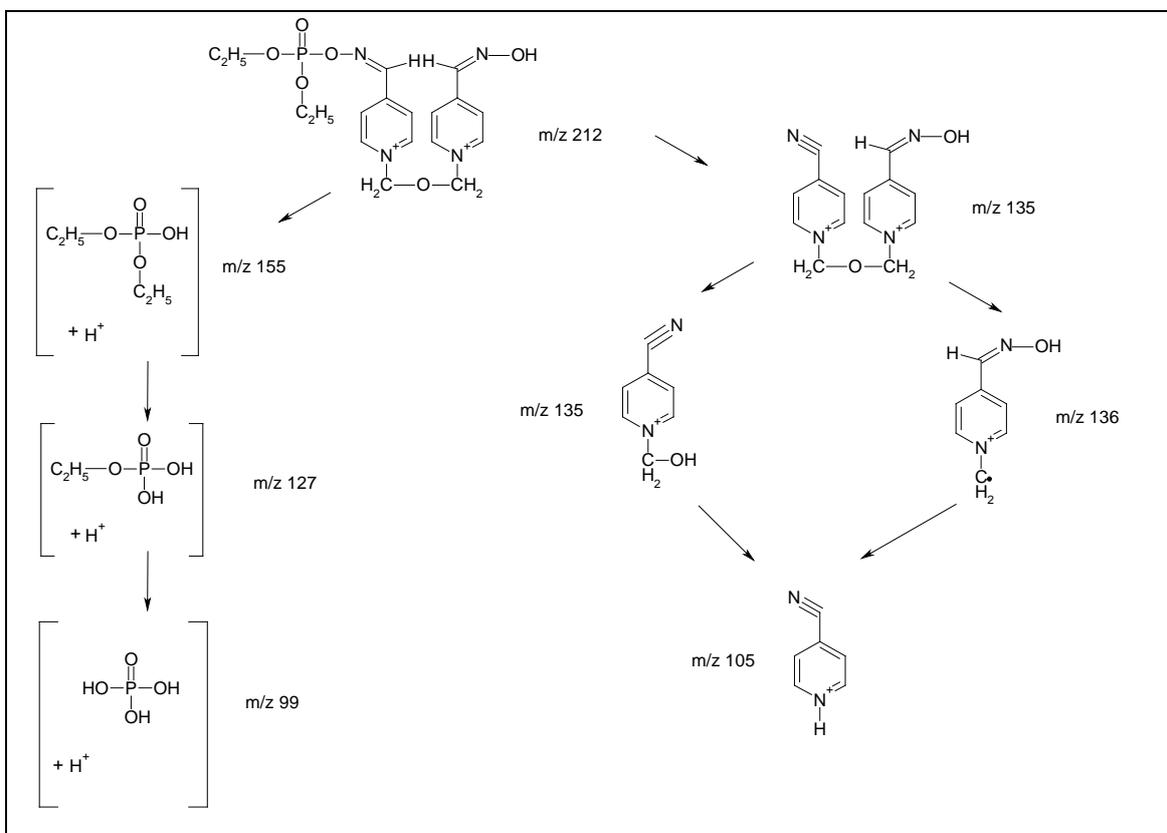


**Abb. 7-2:** Molekülstrukturen des Massenpeaks und der Fragmente von Obidoxim-dichlorid nach MS- bzw. MSMS-Analyse.

Im Vergleich dazu weist DEP-Obidoxim (**Abb. 7-3**) einen Molekülpeak m/z von 212 auf, und die Massenpeaks von m/z 135 und 155, die den Fragmenten des Mononitrils und der Diethylphosphorsäure zugeordnet werden können. Die möglichen Zerfallswege mit den Massen ihrer Produkte zeigt **Abb. 7-4**.



**Abb. 7-3:** Massenspektrum von DEP-Obidoxim in 10 mM  $\text{NH}_4\text{acetat}/20\%$  MeOH, pH 4,5, im  $\text{ESI}^+$ -Modus.



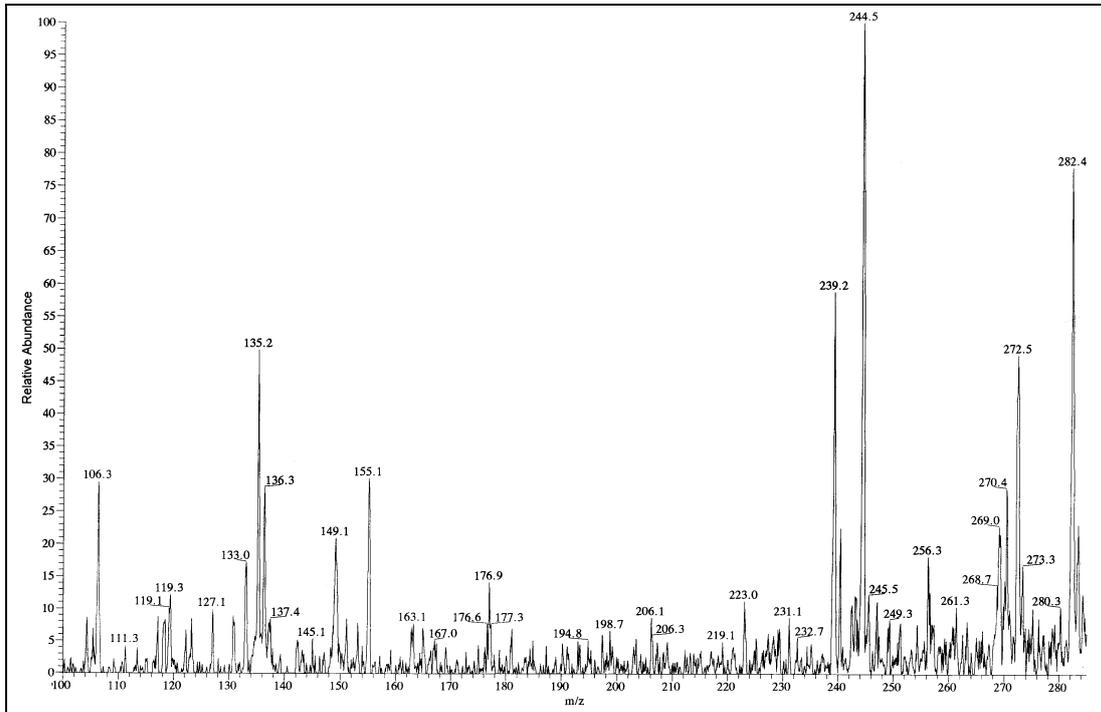
**Abb. 7-4:** Molekülstrukturen des Massenpeaks und der Fragmente von DEP-Obidoxim nach MS- bzw. MSMS-Analyse.

Die MSMS-Analyse ergab folgende Fragmente (**Tabelle 7-1**):

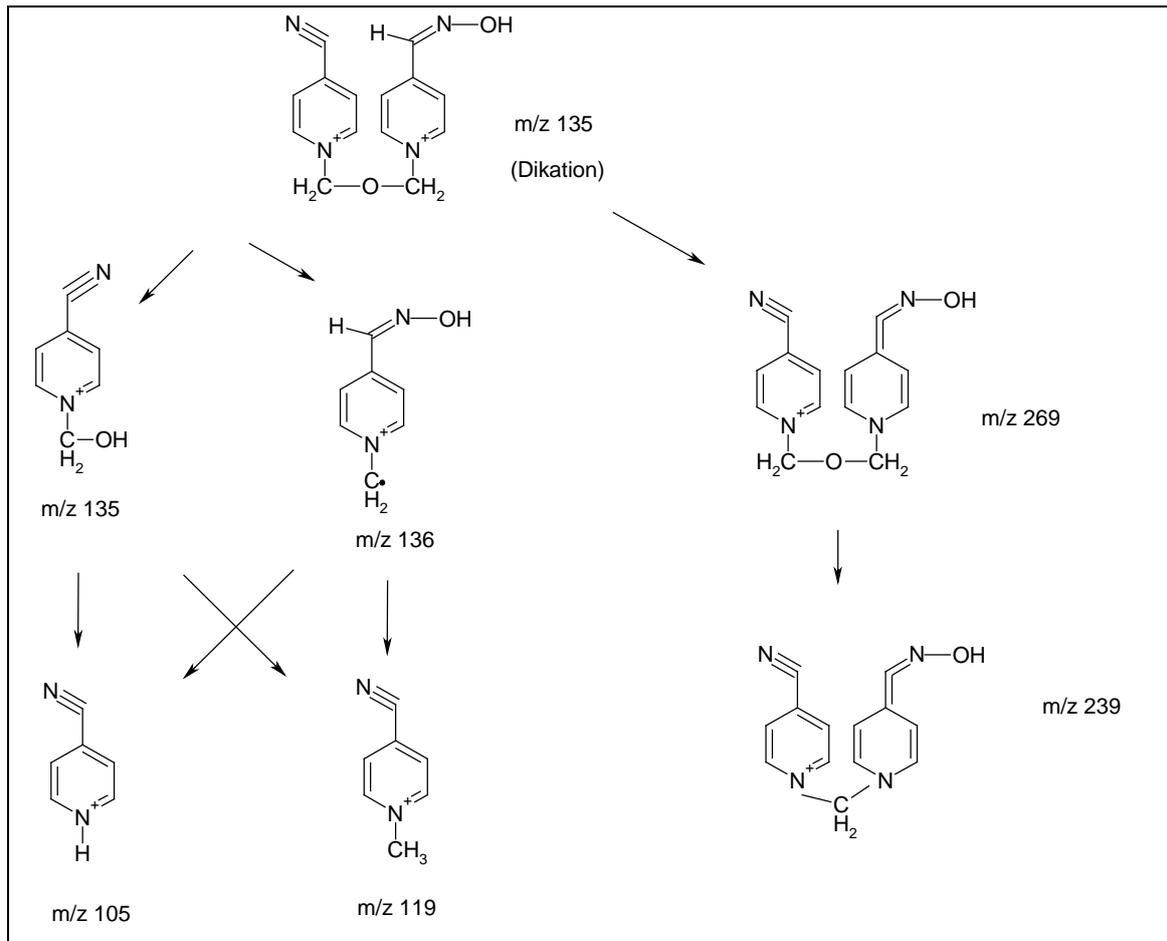
**Tabelle 7-1:** MSMS von DEP-Obidoxim

Fullscan 1000ms		MSMS	
Massenpeak	m/z (%)	Energie (%)	Fragmente: m/z (%)
[Dikation] <sup>2+</sup>	211.8 (62) 170 °C	12.00	135 (100); 154,5 (30); 211,9 (94) 200 °C
[Nitril-Dikation] <sup>2+</sup>	135 (100) 170 °C	12.00	135 (100) 200 °C
		20.00	135 (100); 105,1 (11)
[Diethylphosphor- säure + H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	154,9 (49) 170 °C	10.00	154,8 (100) 220 °C
		20.00	154,9 (33); 126,9 (100); 99,1 (5)
		30.00	126,9 (100); 99 (8)

Das Massenspektrum des isolierten Mononitrils findet sich in **Abb. 7-5** mit dem Molekülpeak von  $m/z$  135 und den Fragmenten  $m/z$  119, 135, 136, 239 und 269, die mit den in **Abb. 7-6** gezeigten Molekülstrukturen kompatibel sind und mit den Fragmenten nach MSMS-Analyse (**Tabelle 7-2**) übereinstimmen.



**Abb. 7-5:** Massenspektrum von Obidoxim-Mononitril in 10 mM  $\text{NH}_4$ acetat/20% MeOH, pH 4,5, im  $\text{ESI}^+$  - Modus.

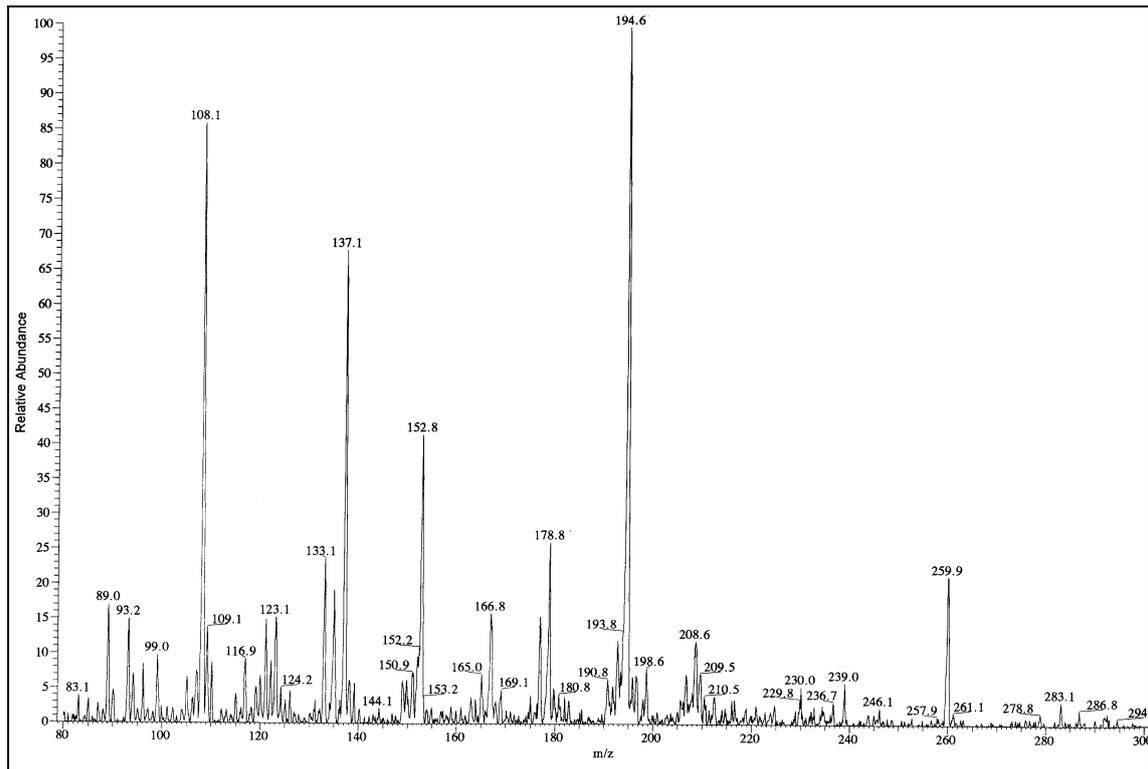


**Abb. 7-6:** Molekülstrukturen des Massenpeaks und der Fragmente von Obidoxim-Mononitril nach MS- bzw. MSMS-Analyse.

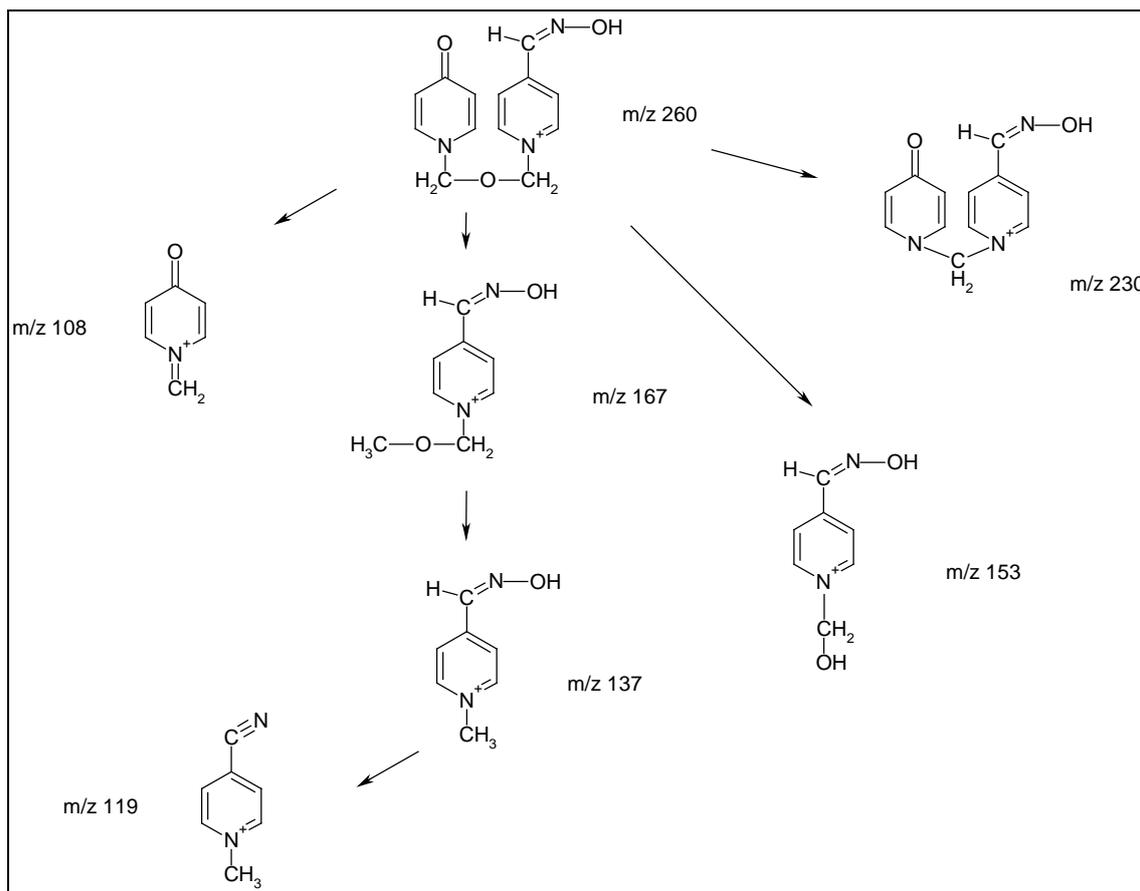
**Tabelle 7-2:** MSMS von Obidoxim-Mononitril

LC-MS		MSMS	
Fullscan 1000ms, 200 °C			
Massenpeak	m/z (%)	Energie (%)	Fragmente: m/z (%)
[Dikation] <sup>2+</sup>	135.2 (50)	20.00	136,2 (100)
		30.00	136,3 (100); 119 (22); 105,3 (71)
	136	30.00	136,2 (100); 119,1 (30); 105,2 (23)

Das Massenspektrum des Monopyridons (**Abb. 7-7**) zeigt den Molekülpeak von  $m/z$  260 und die Massen der Fragmente  $m/z$  108, 137, 153, und 167, die den in **Abb. 7-8** gezeigten Molekülstrukturen zugeordnet werden können.



**Abb. 7-7:** Massenspektrum von Obidoxim-Monopyridon in 10 mM  $\text{NH}_4$ acetat/20% MeOH pH 4,5 im  $\text{ESI}^+$  - Modus.



**Abb. 7-8:** Molekülstrukturen des Massenpeaks und der Fragmente von Obidoxim-Monopyridon nach MS- bzw. MSMS-Analyse.

**Tabelle 7-3** faßt die Ergebnisse der MSMS-Analyse zusammen.

**Tabelle 7-3:** MSMS von Obidoxim-Monopyridon

Fullscan 1000ms, 200 °C		MSMS	
Massenpeak	m/z (%)	Energie (%)	Fragmente: m/z (%)
[Monokation] <sup>+</sup>	259.9 (22)	40.00	229,9 (100); 108 (24)
s. Abb. 7-8	166.8 (16)	20.00	166,6 (100); 136,8 (82)
s. Abb. 7-8	137.1 (68)	20.00	137,1 (100)
		30.00	136 (99); 119 (100)

Somit sind die Massenspektren mit den angenommenen Strukturen von Mono(Diethylphosphoryl)-Obidoxim, dem daraus entstandenen Mononitril- und dem Monopyridon-Derivat kompatibel. Eine eindeutige Abgrenzung der einzelnen Produkte voneinander war somit möglich. Die

Daten aus der Literatur stimmten mit den für Obidoxim erhaltenen gut überein.

## 7.2 Einfluß von Licht auf die Stabilität von DTNB

Die Überprüfung des molaren Extinktionskoeffizienten von  $\text{TNB}^-$  und der Linearität der  $\text{TNB}^-$ -Entwicklung erfolgte durch Reaktion von DTNB mit steigenden Glutathion-Konzentrationen (Eyer et al. 2003). Hierbei zeigte sich, daß die Absorption der DTNB-haltigen Referenz-Küvette im Laufe der Zeit zunahm, dieser Effekt war bei 37 °C stärker ausgeprägt als bei 25 °C. Da die Inkubation von DTNB im  $\text{H}_2\text{O}$ -Bad zu keiner Extinktionszunahme bei 410 nm führte, wurde ein Lichteinfluß auf die Extinktionszunahme vermutet. Diese Vermutung bestätigte sich, als eine DTNB-haltige Lösung, die dem Sonnenlicht ausgesetzt war, eine ausgeprägte Gelbfärbung zeigte. Dieses Phänomen sollte sich allerdings als noch komplexer erweisen, da hierbei zusätzlich die Anwesenheit von Sauerstoff eine entscheidende Rolle spielte. So führte die Lichtexposition einer 300  $\mu\text{M}$  DTNB-Lösung für 30 min unter Sauerstoff-Ausschluß (in Argon-begastem Puffer) zu einer stark gelb gefärbten Lösung. DTNB war komplett zerfallen, wobei 21  $\mu\text{M}$   $\text{TNB}^-$  und hauptsächlich zwei weitere Produkte entstanden waren, bei denen es sich vermutlich um Polymerisationsprodukte handelt. Die Lichtexposition einer 300  $\mu\text{M}$  DTNB-Lösung für 30 min unter Sauerstoff hingegen resultierte in einer deutlich weniger gelb gefärbten Lösung verglichen mit der unter Argon belichteten Probe. DTNB war nicht mehr nachweisbar, auch  $\text{TNB}^-$  konnte nicht detektiert werden. Stattdessen hatte sich hauptsächlich ein im Vergleich zu DTNB hydrophileres Produkt gebildet und zu einem geringeren Anteil lipophilere Substanzen.

Die Beobachtung des vollständigen Zerfalls von DTNB-Lösungen unter Sonnenlichtexposition entsprach den Befunden von Walmsley et al. (1987), die das Phänomen als homolytische Disulfidspaltung unter Bildung freier Thiyl-Radikale gedeutet haben. Folgt man diesem Konzept, dann sind Reaktionen des Thiyl-Radikals mit  $O_2$  und H-Abstraktionsreaktionen zu erwarten, die zu Additionsprodukten führen können. Es war aber nicht Ziel dieser Arbeit, die Zerfallsprodukte im einzelnen zu identifizieren.

Die wichtige praktische Konsequenz dieser Beobachtungen ist die strikte Vermeidung stärkerer Lichtexposition von DTNB-Lösungen. Diese kann auch bei längerer Reaktionszeit im Photometer auftreten, insbesondere bei Meßwellenlängen im Bereich der DTNB-Absorption. So ist nicht auszuschließen, daß die Spontanhydrolyse von Thiocholinestern im Ellman-Test der Cholinesterase-Bestimmung zum Teil auch auf einer Gelbfärbung durch DTNB-Zerfall beruht. Dieser Effekt sollte bei einer Meßwellenlänge von 405 nm stärker ausgeprägt sein als bei einer Einstrahlung mit längerwelligem Licht. Schließlich kann die starke Hämoglobin-Absorption die Photolyse des DTNB verhindern, so dass die tatsächliche Blank-Reaktion bei Messung der Cholinesterase-Aktivität in Hämoglobin-haltigen Lösungen geringer ist als die in Abwesenheit von Hämolysat gemessene. Der Effekt wird auch bei Verwendung von Zweistrahlphotometern nicht kompensiert. Diese Problematik fällt bei der Bestimmung hoher Cholinesterase-Aktivitäten sicher nicht ins Gewicht, könnte aber bei geringen Aktivitäten wie z.B. bei Nager-Erythrozyten eine Fehlerquelle darstellen, die durch variierende Gerätespezifikationen unterschiedlich stark ausfallen kann (Intensität des eingestrahlten Lichts, Spaltbreite und durchstrahlte Fläche).

Ein wichtiger Befund war außerdem, daß, im Gegensatz zu den Schlußfolgerungen von Walmsley et al. (1987), lichtexponiertes DTNB keinen Einfluß auf die Aktivität menschlicher Blutcholinesterase nahm.

---

Schließlich ist noch festzuhalten, daß im Gegensatz zu DTNB  $\text{TNB}^-$  weit weniger lichtempfindlich war.

## LEBENS LAUF

Daniela Vera Kiderlen, geboren am 08.05.1970 in Regensburg  
als Tochter der Eheleute Dr. Hellmut und Leonore Kiderlen, geb. Knothe.

Schulausbildung:	1976 - 1980	Grundschule am Napoleonstein, Regensburg
	1980 – 1989	Albrecht-Altdorfer-Gymnasium, Regensburg Abitur 1989
Studium:	1990 - 1994	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Praktika:	November 1994 – April 1995	Hexal AG, Holzkirchen
	Mai 1995 - Oktober 1995	Kranich-Apotheke, München
Approbation:	1995	Approbation als Apothekerin
Berufstätigkeit:	1996 - 1998	Vertretung als Apothekerin in der Winthir-Apotheke, München und der Brahms-Apotheke, Regensburg

Seit Anfang 1998 arbeite ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am  
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-  
Maximilians-Universität München (kommissar. Leiter Prof. Dr. P. Eyer)  
unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Eyer an der vorliegenden Dissertation.