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

Kommissarischer Vorstand Prof. Dr. med. E. Richter

Einfluss des Paraoxonase-Phänotyps auf die Abbaugeschwindigkeit hochtoxischer Phosphoryloxime

Ein pharmakogenetischer Faktor, der die Wirksamkeit der Obidoxim-Therapie bei Organophosphat-Vergiftungen beeinflusst.

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

vorgelegt von

Jochen Stenzel

aus
Wolfratshausen

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter Eyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. L. v. Meyer
	Priv. Doz. Dr. A. Eberharter
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	15.11.2007

Danksagung

Meinem Doktorvater Herren Professor Dr. Eyer möchte ich ganz herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen und die zu jeder Zeit exzellente Betreuung danken. Seine engagierte Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas hat mir Fähigkeiten zu systematischem, wissenschaftlichem Denken und Arbeiten vermittelt und hat mein Interesse an der Toxikologie bestärkt. Zusätzlich habe ich durch ihn eine solide Grundausbildung in der experimentellen Pharmakologie und Toxikologie mit auf dem Weg zur Facharztausbildung erhalten. Seine fürsorgliche Anleitung, mit dem richtigen Maß an Freiraum, hat den Spaß am Forschen in jeder Phase der Arbeit neu angeregt.

Besonders möchte ich dem „EyLab-Team“, Renate Heilmair, Elisabeth Topoll und Maria „SchuSchu“ Radtke danken, die mir bei meinen ersten Schritten als Frischling im Labor geduldig geholfen haben und bei allen Problemen und Fragen zur Seite standen. Daneben waren die humorvollen Gespräche in der Kaffeerunde eine willkommene Ablenkung von der geistigen Beanspruchung und konnten zusätzlich mein (insbesondere astronomisches und botanisches) Allgemeinwissen noch erweitern.

Vielen Dank an Frau Dressnandt für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und die Bestellung diversen Arbeitsmaterials.

Vielen Dank an meine Julia, die mir trotz eigener Arbeitsbelastung jederzeit zur Seite stand. Sie hat es geschafft, auch nach dem Dienst ihre Konzentration auf PONYs und Diskussionen über deutsche Grammatik und Zeichensetzung zu lenken.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die es mir ermöglicht haben da zu stehen, wo ich jetzt bin und die mich in jeder Situation uneingeschränkt unterstützen.

Meinen Eltern und meinem Bruder
in Dankbarkeit.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1
1.1 Die Organophosphorvergiftung 1
1.2 Die Paraoxonase (PON) 10
1.3 Ziele der Arbeit 13
2 MATERIAL UND METHODEN 14
2.1 Labormaterialien und Geräte 14
2.2 Messanlagen 14
2.3 Chemikalien 16
2.3.1 Substanzen 16
2.3.2 Pufferlösungen 17
2.3.3 Reagenzien und Enzympräparate 18
2.4 Methoden 20
2.4.1 Enzymatische Bestimmungen 20
2.4.1.1 Photometrische Bestimmung der Arylesterase-Aktivität (AEase) 20
2.4.1.2 Photometrische Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität (PXase) 21
2.4.1.3 Photometrische Bestimmung der Diazoxonase-Aktivität (DZOase) 21
2.4.1.4 Photometrische Bestimmung der Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität 22
2.4.1.5 Titration von AChE-Bindungsstellen 23
2.4.1.6 Bestimmung der Hemmkinetik der AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen 23
2.4.1.7 Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität (k_e) und der nicht-enzymatischen POX-Zerfallsgeschwindigkeit (k_h) 24
2.4.1.8 Photometrische Bestimmung der Methanol (MeOH)-Konzentration mit der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) 25
2.4.2 HPLC-Methoden 26
2.4.3 Weitere Labormethoden und eingesetzte Software 27
3 ERGEBNISSE 28
3.1 Bestimmung des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps 28
3.2 Stabilität von PON1 in gefrorenem Plasma 29
3.3 Synthese von POX-methyl, POX-ethyl und POX-propyl 31
3.4 Titration von AChE-Bindungsstellen mit POX-ethyl 32
3.5 Hemmkinetik humaner AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen 33
3.6 Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität 35

3.6.1 Identifizierung und Quantifizierung von POX, Obidoxim und Obidoxim-Mononitril in einem HPLC-Lauf 35
3.6.2 Die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der enzymatischen POX-Hydrolyse als Maß für die POX-Hydrolase-Aktivität 37
3.6.3 Einfluss von Temperatur und pH Wert auf die POX-Hydrolase-Aktivität und auf den nicht-enzymatischen POX-Zerfall 39
3.6.4 Einfluss von EDTA auf die POX-Hydrolase-Aktivität der PON1 41
3.6.5 POX-Hydrolase-Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration 41
3.6.6 Einfluss von Methanol auf die PON1 42
3.7 Einfluss des $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus auf die POX-Hydrolase-Aktivität 44
4 DISKUSSION 47
4.1 Methodik und Ergebnisse 47
4.1.1 Phänotypisierung der Plasmaproben 47
4.1.2 Stabilität der Paraoxonase- und Diazoxonase-Aktivität in gefrorenem Plasma 48
4.1.3 Synthese und Isolierung von POX-ethyl, POX-methyl und POX-propyl 49
4.1.4 Hemmung humaner AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen 50
4.1.5 Bestimmung der nicht-enzymatischen POX-Zerfallsgeschwindigkeit sowie der POX-Hydrolase-Aktivität und deren Abhängigkeit vom $PON1_{Q192R}$-Phänotyp 54
4.2 Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Obidoxim-Therapie der Organophosphorvergiftung 60
5 ZUSAMMENFASSUNG 64
6 ANHANG 66
6.1 Arrhenius-Gleichung 66
6.2 Simulation der Hemmkinetik von humaner AChE durch POX-methyl mit Hilfe des Programms Maple 9.0 66
6.3 Gemessene Enzymaktivitäten 67
7 ABKÜRZUNGEN 69
8 LITERATUR 71

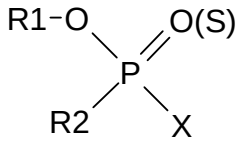
1 EINLEITUNG

1.1 Die Organophosphorvergiftung

Organophosphor-Verbindungen (OP) sind Substanzen, die als Insektizide lebensnotwendig für die Sicherung der Ernährung eines Großteils der Erdbevölkerung sind. Spielen sie, aufgrund des Klimas mitteleuropäischer Breitengrade, hier nur eine eher geringe Rolle, so ist ihr Haupteinsatzgebiet in heißen, subtropischen bis tropischen Regionen der Entwicklungsländer. Weltweit werden gegenwärtig ca. 100 Insektizide auf Organophosphorbasis eingesetzt (Kwong 2002). Gegenüber früher eingesetzten Organochlor-Verbindungen besitzen sie den Vorteil, schnell und vollständig abgebaut zu werden und sich nicht, wie z.B. DDT, in der Nahrungskette anzureichern. Dafür muss allerdings eine deutlich höhere akute Warmblüter-Toxizität in Kauf genommen werden. Pro Jahr treten schätzungsweise 3 Millionen durch Organophosphorinsektizide verursachte Vergiftungen auf, ca. 300 000 davon enden tödlich (Jeyaratnam 1990; Kwong 2002). Die letalen Vergiftungen entstehen häufig durch Einsatz in suizidaler Absicht. Nicht selten handelt es sich um Kurzschluss-Handlungen aufgrund ökonomisch oder sozial schwieriger Lage, ohne dass dem Leben ein definitives Ende gesetzt werden sollte (Phillips et al. 2002; Eddleston und Phillips 2004). Die Mehrzahl der Fälle sind jedoch akzidentelle oder chronische Expositionen, mit weniger akutem Krankheitsverlauf (Brown et al. 1989; Innes et al. 1990).

Weitere Aktualität erhielten die OP in Form von Verbindungen, die als Nervenkampfstoffe angewendet werden können (meist Phosphonsäurederivate). Ihr Einsatz im irak-iranischen Krieg (1980-1988) und gegen die kurdische Zivilbevölkerung des Iraks (1988) sowie die terroristischen Anschläge mit Sarin und VX in Japan (1994-1995) verdeutlichen ihr gegenwärtiges Bedrohungspotential (Marshall 1984; Hay und Roberts 1990; Nagao et al. 1997). Auch nach Auflage (1993) und Inkrafttreten (1997) des Chemiewaffen-übereinkommens der UNO zur Ächtung der Herstellung, Lagerung und des Einsatzes von C-Waffen, werden noch große Lagerbestände vermutet, und durch die freie Verfügbarkeit von Synthesevorschriften geht weiterhin eine Gefahr von ihnen aus.

OP sind Ester, Amide oder Thiolderivate der Phosphor-, Phosphon-, Thiophosphor- oder Thiophosphonsäure. Erste Substanzen dieser Art wurden schon Mitte des 19. Jahrhunderts synthetisiert. Sie alle besitzen die „Schradersche Acyl-Formel“ als Grundstruktur, s. Abbildung 1-1.



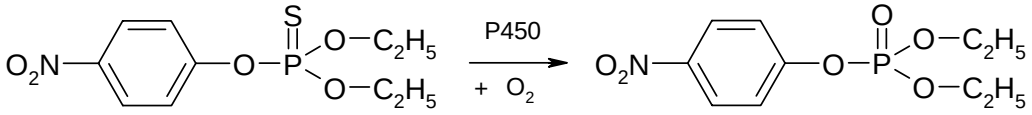
R1 = Alkyl-
R2 = Alkoxy- (Phosphorsäure),
Alkyl-, Dialkylamidogruppe (Phosphonsäure)

X = Abgangsgruppe (Acylrest):
z.B. Halogen-, Cyano-, Phenoxy-, Alkylthiogruppe

Abbildung 1-1 Schrader-Formel, die Grundstruktur phosphororganischer Verbindungen.

Ihren Namen erhielt sie durch Gerhard Schrader, der in den dreißiger Jahren Forschungen an Insektiziden durchführte, aus denen die chemische Kampfstoffe Tabun und Sarin hervorgingen. Nervenkampfstoffe besitzen eine um ein Vielfaches höhere Toxizität als Insektizide (Marquardt und Schäfer 2004).

Durch Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen vor allem der Leber werden viele OP zu aktiven, toxischen Metaboliten durch Desulfurierung der P=S-Bindung verstoffwechselt („Giftung“). Abbildung 1-2 zeigt dies am bekannten Vertreter Parathion (E605).



Parathion (E605) Paraoxon (E600)

Abbildung 1-2 Oxidative Desulfurierung von Parathion zum aktiven Metaboliten Paraoxon durch Cytochrom-P450. Parathion ist kein bedeutender Inhibitor der Cholinesterasen (ChE).

OP werden inhalativ und dermal gut resorbiert, ebenso erfolgt bei oraler Aufnahme eine nahezu vollständige Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt. Maximale Plasmakonzentrationen werden nach ca. 1 Stunde erreicht, und es findet eine rasche Verteilung in alle Organe statt. Ein großer Teil wird in einer schnellen Phase innerhalb von 48 Stunden meist nach metabolischer Umwandlung über den Harn ausgeschieden. Durch die lange Halbwertszeit der Elimination aus dem Fettgewebe kann die folgende, langsame Phase bis zu 6 Tagen dauern (Marquardt und Schäfer 2004).

Entscheidend für die Wirkung der OP ist die Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) durch kovalente Bindung einer Alkylphosphatgruppe an die Hydroxylgruppe eines Serinrestes im katalytischen Zentrum des Enzyms, welches sich am Boden einer „tiefen Schlucht“ befindet (Sussman et al. 1991). Bei der Phosphylierung der AChE (Phosphylierung als Oberbegriff für Phospho**r**ylierung, Phospho**n**ylierung oder Phosph**in**ylierung) kommt es zur Abspaltung der Abgangsgruppe. Die Bindung des Phosphylrestes ist zunächst oft noch reversibel und kann durch spontane Reaktivierung wieder gelöst werden. Je nach Gift kommt es jedoch in einem Zeitraum von Minuten bis Tagen, durch Abspaltung eines Alkylrests des

phosphylierten Enzyms, zur „Alterung“ der Cholinesterase, die dann irreversibel gehemmt ist, s. Abbildung 1-3 (Berends et al. 1959). Weitere Angriffspunkte der OP sind die „Neurotoxische Esterase“ (NTE, Neuropathy Target Esterase) des Nervengewebes und im Serum und Geweben vorhandene Carboxylesterasen. Für die Diagnostik ist die Hemmung der AChE auf den Erythrozytenmembranen sowie der Butyrylcholinesterase im Serum bedeutend (Marquardt und Schäfer 2004).

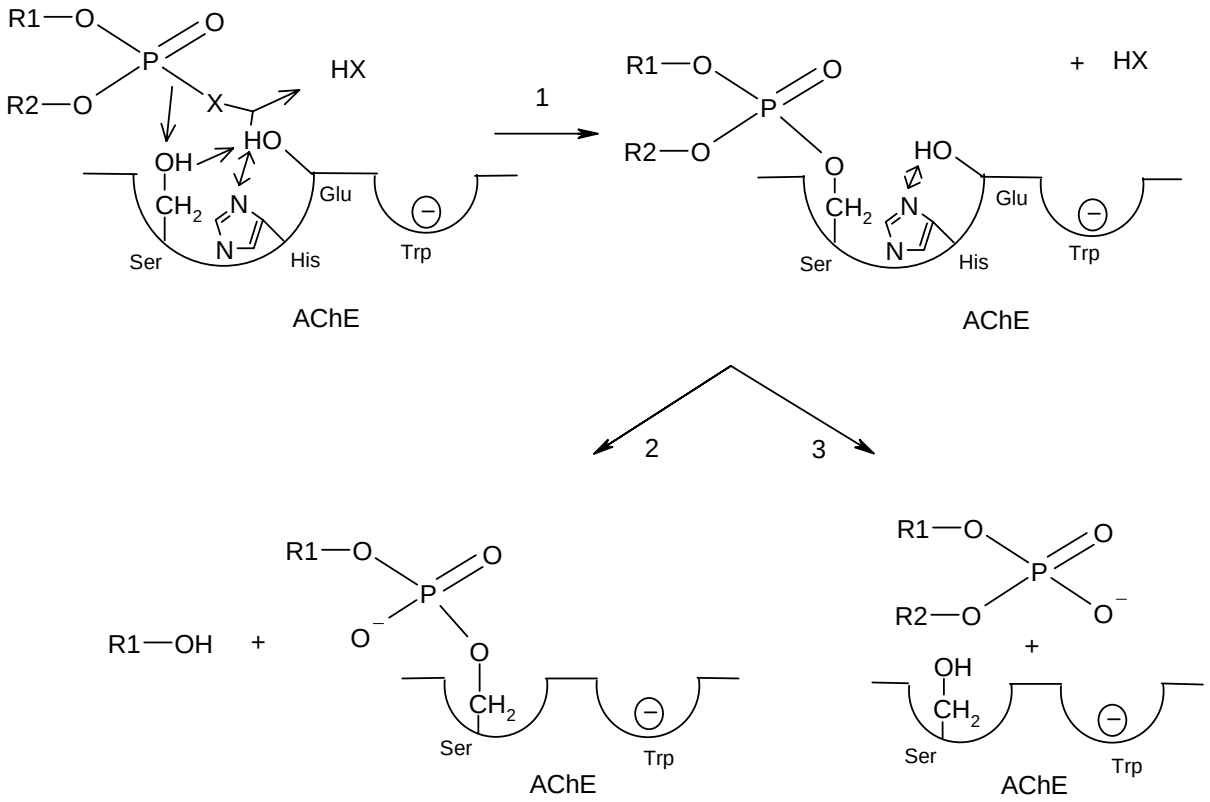


Abbildung 1-3 Hemmung der Acetylcholinesterase durch OP (1) mit Darstellung der Alterungs- (2) und spontanen Reaktivierungsreaktion (3). X = Abgangsgruppe (Eyer 1996).

Als Folge des gestörten Abbaus von Acetylcholin kommt es, durch Anhäufung des Neurotransmitters, zur Überstimulation der Zielrezeptoren. In den Synapsen der parasympatischen Nervenendigungen und im zentralen Nervensystem werden Muskarinrezeptoren erregt. Sympathische Ganglien, das Nebennierenmark, neuromuskuläre Endplatten und einige ZNS Areale sind Zielstrukturen mit Nikotinrezeptoren. Die Wirkung der Muskarinrezeptorstimulation ist lang anhaltend, im Gegensatz dazu desensibilisieren die Nikotinrezeptoren schnell. Die Unterscheidung der klinischen Symptome in muskarinische und nikotinische Wirkungen ist sinnvoll, da Anticholinergika wie Atropin nur die muskarinischen Effekte antagonisieren.

Muskarinartige Effekte äußern sich am Herzen mit negativ chrono- und inotroper Wirkung und verursachen Arrythmien wie Bradykardie, QT-Zeitverlängerung oder Torsades de Pointes. Am Kreislaufsystem zeigen sich Blutdruckschwankungen mit Hypotonie. Es kommt zur Tonuserhöhung der glatten Muskulatur von Bronchien (Bronchokonstriktion), Gastrointestinaltrakt (gastrointestinale Spasmen, Durchfall, Erbrechen), Uterus, Harnblase (Harnabgang) und Augen (Miosis, Akkomodationsstörung). Die glanduläre Sekretion der Speichel-, Bronchial-, Tränen- und Schweißdrüsen sowie im Magen-Darm-Trakt ist gesteigert. Neuropsychologische Symptome durch Angriff im ZNS sind Kopfschmerz, Schwindel, verwaschene Sprache, Ataxie, Tremor, Angst, Psychosen, Krämpfe, Koma und Atemdepression.

Nikotinartige Wirkungen manifestieren sich an der Skelettmuskulatur mit Hyperreflexie und Faszikulationen, die in Muskelschwäche bis hin zur schlaffen Lähmung übergehen können. Die Plasmakonzentration von Adrenalin ist über die Dauer von einigen Stunden nach Giftaufnahme erhöht. Es kann im Anfangsstadium der Intoxikation zu Tachykardie und Hypertonie kommen, bis die kurzfristigen nikotinischen Effekte rückläufig sind. Dies stützt die Annahme, dass die Nikotinrezeptoren des Nebennierenmarks einer vorübergehenden Stimulation unterliegen (Kauert et al. 1990).

Die Kombination aus peripherer und zentraler Atemlähmung sowie extrem gesteigerte Brochialsekretion sind die am meisten gefürchteten, lebensbedrohlichen Komplikationen der OP-Vergiftung. Nach Überwinden der akuten Intoxikation kann in einigen Fällen eine plötzliche Verschlechterung der respiratorischen Situation nach Extubation auftreten. Das klinische Bild wird als „intermediate syndrome“ bezeichnet (Senanayake und Karalliedde 1987; Karalliedde et al. 2006). Wahrscheinlich verursacht die Hemmung der NTE das Auftreten einer verzögerten Polyneuropathie nach 1-4 Wochen, die Symptome von leichten Parästhesien bis zu spastischen Lähmungen aufweisen kann (Lotti und Moretto 2005). Dies wird allerdings nur bei einigen OP beobachtet. Nach Abklingen der akuten Vergiftung kann sich ein leichtes, einige Monate dauerndes, organisches Psychosyndrom manifestieren (Eyer 1995; Johnson et al. 2000; Marquardt und Schäfer 2004).

Therapeutisch stehen bei der akuten OP-Vergiftung die allgemein unterstützenden Maßnahmen, wie Dekontaminierung der Haut, Magenspülung und die Gabe von Aktivkohle zur Verfügung. Der Wert der Magenspülung bzw. die Verabreichung von Aktivkohle wird neuerdings jedoch bezweifelt (Eddleston et al. 2007; Mohamed et al. 2007). Falls erforderlich, sollte so schnell wie möglich eine Intensivtherapie mit Überwachung und Unterstützung der

Vitalfunktionen eingeleitet werden. Spezielle Aufmerksamkeit erfordert der Schutz der Atemwege, um eine Aspiration zu vermeiden, insbesondere auch bei invasiven gastrointestinalen Maßnahmen. OP werden in Petroleum-Destillaten gelöst, die bei Aspiration eine Pneumonie mit ARDS (acute respiratory distress syndrome) auslösen können (Eddleston et al. 2007).

Zeitgleich mit den supportiven Maßnahmen sollte die medikamentöse Therapie beginnen. Dabei stehen Atropin als kompetitiver Antagonist an Muskarinrezeptoren und Benzodiazepine (Diazepam) bei Konvulsionen zur Verfügung. Durch Atropin werden lebensbedrohliche Zustände mit extremer Brochialsekretion, Bronchokonstriktion und Depression des Atemantriebs verhindert. Atropin hat allerdings keine Auswirkung auf die nikotinischen Effekte des Acetylcholinüberschusses. Darauf können die Oxime als kausales Antidot Einfuß nehmen.

Im Jahre 1955 publizierten Wilson und Ginsburg erstmals das Monopyridinium-Aldoxim Pralidoxim (2-PAM) als wirksamen Reaktivator phosphorylierter Cholinesterasen. 1964 wurde das 4-Bispyridinium-Aldoxim Obidoxim (Toxogonin®) von Lüttringhaus und Hagedorn entwickelt, es ist das einzige momentan in Deutschland zugelassene Oxim, s. Abbildung 1-4 (Lüttringhaus und Hagedorn 1964).

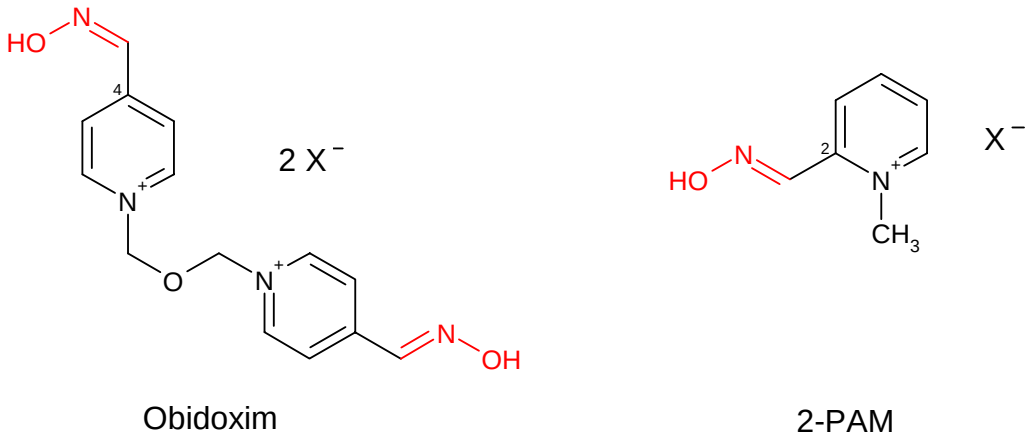


Abbildung 1-4 Strukturformeln der im Handel befindlichen Oxime Obidoxim (Toxogonin®) und Pralidoxim (2-PAM, z.B. Protopam Chloride®). –CH=N-OH zeigt die Oximgruppe.

Daneben sind noch die experimentellen Oxime HI6 und HLö7, beides Bispyridiniumverbindungen, zu erwähnen. Sie zeigen zum Teil deutliche Vorteile gegenüber den auf dem Markt befindlichen Oximen, insbesondere bei Vergiftungen durch Nervenkampfstoffe (Eyer 2003a).

Die Wirksamkeit der Oxime und ihr Einsatz bei der Therapie von OP-Vergiftungen wurden kontrovers diskutiert. Enthusiastischen Darstellungen über die klinischen Ergebnisse ihres Einsatzes (Namba und Hiraki 1958) stehen andere gegenüber, die sogar von nachteiligen Effekten ihres Einsatzes berichten (de Silva et al. 1992; Peter und Moran 2004). Für eine bessere Beurteilung der Oximtherapie sind differenziertere, möglichst evidenz-basierte Studien notwendig. Um sich diesem Ziel zu nähern, wurden die Geschwindigkeitskonstanten der ablaufenden biochemischen Reaktionen in-vitro ermittelt (Worek et al. 1996; 1997; 1998; 1999a) sowie Methoden zur standardisierten Bestimmung des Cholinesterasestatus (Thiermann et al. 1997; Worek et al. 1999b), der Plasmaoxim- (Spöhrer und Eyer 1995) und OP-Konzentration (Eyer und Eyer 1998) entwickelt. Zur Überprüfung der klinischen Wirksamkeit der Therapie steht die Überwachung der neuromuskulären Übertragung als weiterer Surrogatparameter zur Verfügung (Thiermann et al. 2005). Aufgrund gewonnener pharmakologischer Parameter wurde eine neue Dosierempfehlung der Oximverabreichung mit Aufrechterhaltung kontinuierlicher Blutspiegel angeregt (80 µmol/L für Pralidoxim bzw. 10 µmol/L für Obidoxim, solange bis kein Gift mehr präsent ist). Weiterhin konnten Empfehlungen zur Durchführung zukünftiger randomisierter klinischer Studien erarbeitet werden. Dabei sollten z.B. die individuellen Eigenschaften (wie Alterung, Pharmakokinetik) jedes Giftes und die Umstände der Vergiftung (akzidentell oder suizidal) mit berücksichtigt werden (Eddleston et al. 2002; Eyer 2003a; Eddleston et al. 2005; Thiermann et al. 2005; Eyer et al. 2007).

Der Mechanismus der Oximwirkung beruht auf einer Reaktivierung phosphorylierter Cholinesterasen. Es kommt dabei zu einem nukleophilen Angriff des Oximats auf das Phosphoratom (Wilson und Ginsburg 1955). Dabei geht der Alkylphosphatrest in einer reversiblen Reaktion unter Bildung eines Übergangszustandes auf das Oximat über. Es entstehen als Reaktionsprodukte ein Phosphoryloxim (POX) und freies Enzym. Allerdings sind Oxime nur bei bestimmten phosphororganischen Verbindungen wirksam, entscheidend ist hier der Alkylphosphatrest. Bei der Behandlung von Vergiftungen mit einigen Nervenkampfstoffen kommt der Einsatz von Oximen meist zu spät, da hier die Halbwertszeit der Alterung meist im Bereich von Minuten liegt. Gealterte ChE kann durch Oxime nicht mehr reaktiviert werden (Worek et al. 2004a).

POX kann ein zehn- bis hundertfach stärkerer Inhibitor der Acetylcholinesterase sein als das ursprüngliche OP. Dies gilt auch für Diethylphosphoryl-Obidoxim (POX-ethyl), gebildet während der Reaktivierung von Paraoxon-gehemmter AChE durch Obidoxim, s. Abbildung

1-5 (Lamb et al. 1964; Nenner 1974; de Jong und Ceulen 1978; Harvey et al. 1986; Luo et al. 1999; Kiderlen et al. 2005).

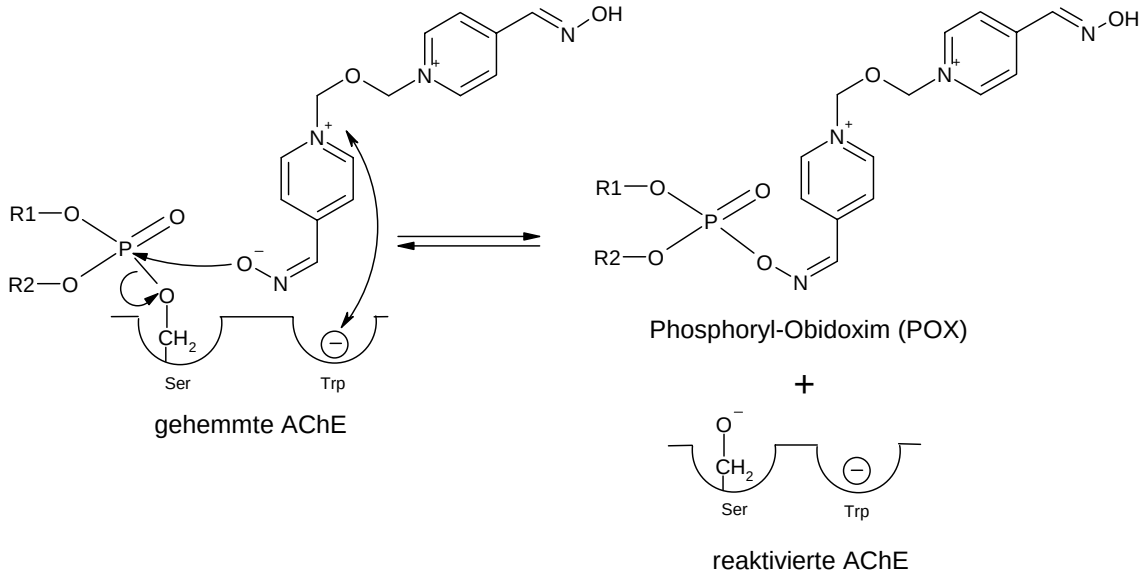


Abbildung 1-5 Reaktivierung von phosphorylierter Acetylcholinesterase (AChE) durch Obidoxim. Der positive Stickstoff steht dabei in Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Tryptophanrest, es kommt zur Übertragung des Alkylphosphatrestes auf die Oximgruppe (Eyer 1996).
Diethylphosphoryl-Obidoxim (**POX-ethyl)**: R1 u. R2 = Ethyl; Dimethylphosphoryl-Obidoxim (**POX-methyl)**: R1 u. R2 = Methyl; Diisopropylphosphoryl-Obidoxim (**POX-propyl)**: R1 u. R2 = Isopropyl.

Je nach OP und Oxim entstehen unterschiedliche Phosphoryloxime mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. POX-ethyl zerfällt ohne enzymatischen Einfluss im Wesentlichen zu Obidoxim-Mononitril. Dabei werden zwei Reaktionswege postuliert. Das Nitril kann in einer cyclischen (Hagedorn et al. 1969) oder basenkatalysierten Eliminationsreaktion entstehen (Steinberg und Solomon 1966). Es zerfällt weiter in ein Pyridon und Cyanid (s. Abbildung 1-7) oder geht bei alkalischem pH-Wert in ein Carboxamid über (Steinberg und Solomon 1966; Kiderlen et al. 2005).

Die Anhäufung von POX kann die unterschiedlichen Reaktivierungskinetiken erklären, die man bei In-vitro-Experimenten zur Reaktivierung von *verdünnten* und *konzentrierten* Lösungen gehemmter AChE durch Obidoxim beobachten kann. Im ersten Fall findet man einen monophasischen, im zweiten Fall einen biphasischen Verlauf der Reaktivierungskurven. Bei Anwesenheit von Plasma ist dagegen der Verlauf der Reaktivierungskinetik bei *konzentrierter* Enzymlösung wieder monophasisch, s. Abbildung 1-6.

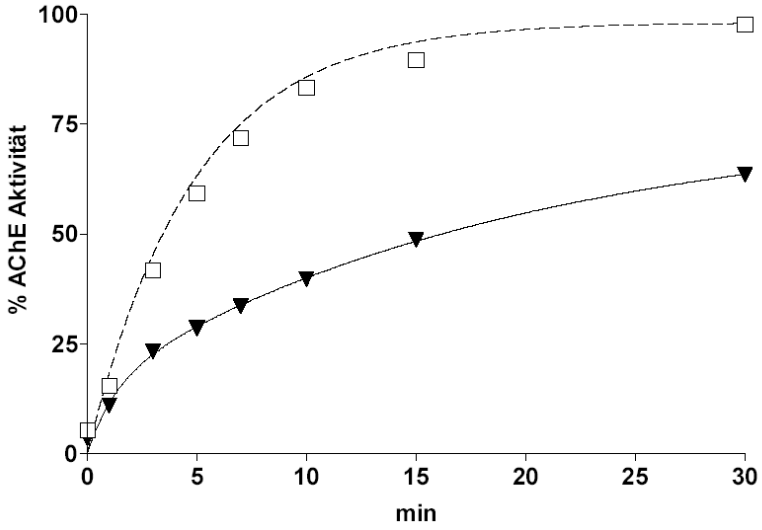


Abbildung 1-6 Reaktivierungskinetiken von Paraoxon-ethyl-gehemmter, erythrozytärer AChE durch Obidoxim. Nur bei 1:100 verdünnten EryAChE-Suspensionen (---, Messpunkte nicht gezeigt) oder Anwesenheit von Plasma des Typs $PON1_{192QQ/QR}$ (□) kommt es zu einer monophasischen Reaktivierungskinetik. Bei Abwesenheit von Plasma (▼mit —) geht die Reaktivierung von konzentrierter EryAChE, nach einer schnellen Anfangsphase, bald in eine langsame Phase über. Es ergibt sich eine biphasische Kinetik, aus Kiderlen (2004).

Diese in-vitro Beobachtungen lassen eine durch POX bedingte, schlechte Effektivität von Obidoxim in-vivo vermuten, im Gegensatz dazu aber zeigt Obidoxim eine gute Wirksamkeit bei Patienten mit Parathion-Vergiftung. Dieser Widerspruch konnte durch die Identifikation des Plasmaenzyms Paraoxonase 1 (PON1) aufgelöst werden, welches zur Hydrolyse von POX-ethyl und POX-methyl fähig ist und damit beide Phänomene erklärbar macht (Kiderlen et al. 2000). Bei der enzymatischen Hydrolyse von POX-ethyl durch PON1 kommt es zur Rückgewinnung des ursprünglichen Oxims unter Abspaltung von Dialkylphosphorsäure, s. Abbildung 1-7 (Kiderlen et al. 2005). Es erfolgt dabei vermutlich ein nukleophiler Angriff am Phosphoratom, ein Reaktionsmechanismus analog dem, der für die Phosphotriesterase (PTE) von Pseudomonas sp. beschrieben wurde (Leader et al. 1999). Allerdings gilt dies nicht für Plasmen aller Individuen, bei einigen bleibt es weiterhin bei einem biphasischen Verlauf. Eine Begründung hierfür kann der Polymorphismus für Glutamin(Q)/Arginin(R) der PON1 an Position 192 liefern, der im nächsten Kapitel ausführlicher beschrieben wird. Die Experimente von Kiderlen (2005) gaben deutliche Hinweise darauf, dass die $PON1_{Q192R}$-Alloenzyme große Unterschiede in der katalytischen Aktivität der POX-Hydrolyse zeigen. Der jeweilige $PON1_{Q192R}$-Phänotyp eines Patienten mit OP-Vergiftung könnte somit entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit einer Obidoxim-Therapie haben. Diese Erkenntnisse gaben den Anlass dafür, die Substratspezifität der POX-Hydrolase-Aktivität von PON1 näher zu untersuchen.

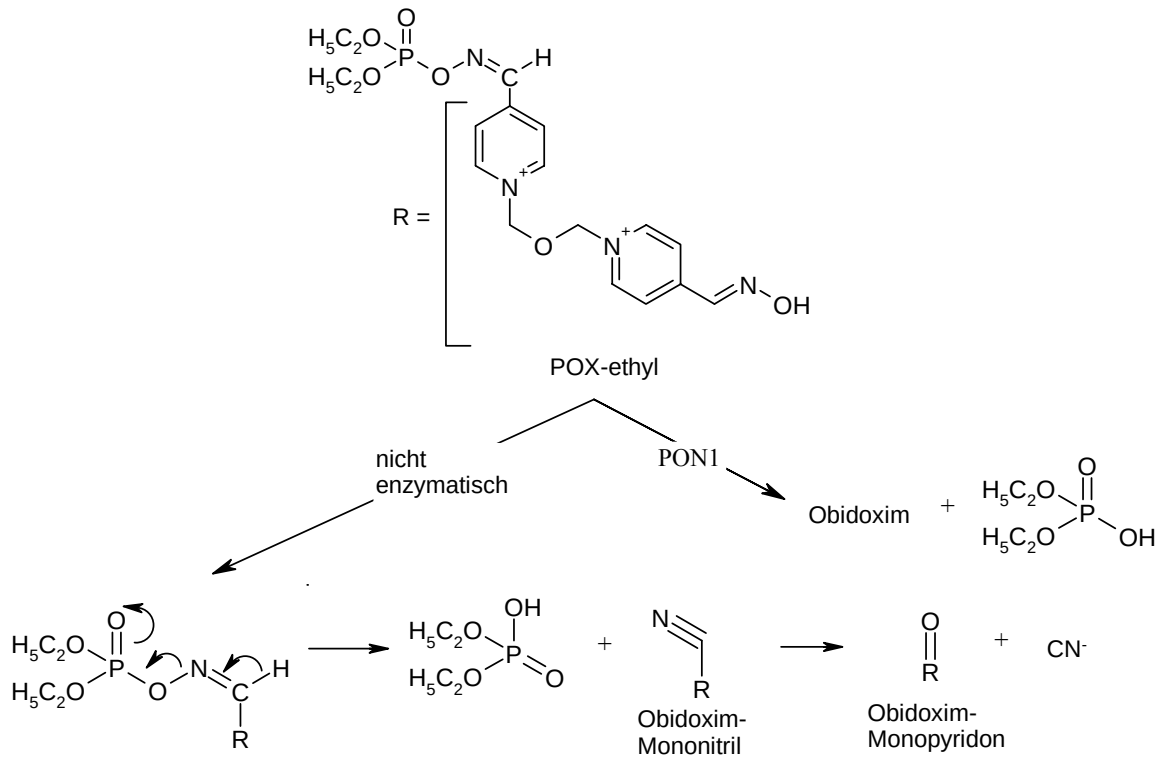
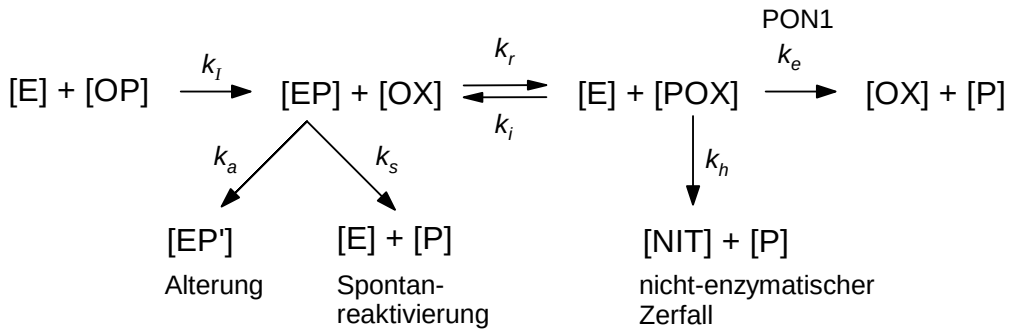


Abbildung 1-7 Enzymatische Hydrolyse von POX-ethyl zu Obidoxim und Dialkylphosphorsäure durch PON1. Nicht-enzymatisch kann POX-ethyl bis pH 11 in einer cyclischen Eliminationsreaktion zu Obidoxim-Mononitril und weiter in Obidoxim-Monopyridon und Cyanid zerfallen. Die Eliminationsreaktion ist von der Azidität des Methin-Protons abhängig (Hagedorn et al. 1969; Hagedorn et al. 1972; Kiderlen et al. 2005).

Das folgende Schema 1-1 gibt nochmals einen Überblick über alle beschriebenen Reaktionen.

Schema 1-1 Schematische Darstellung der Hemmung von ChE [E] durch Inhibitor [OP]. Durch Reaktivierung mit Oxim [OX] kommt es zur Bildung von phosphyliertem Oxim [POX], das durch PON1 wieder zu Oxim und Dialkylphosphor(on)säure [P] hydrolysiert wird. Das gehemmte Enzym kann altern [EP'] oder durch Spontanreaktivierung wiederhergestellt werden. Das Phosphyloxim kann nicht-enzymatisch zum Nitril [NIT] und [P] zerfallen. (k_{Index} = Geschwindigkeitskonstanten).



1.2 Die Paraoxonase (PON)

Die Fähigkeit unterschiedlicher Gewebe, organische Phosphatester zu spalten, wurde erstmals von Mazur (1946) beschrieben. Aldridge untersuchte in den 1950er Jahren die enzymatische Hydrolyse von Paraoxon (EC 3.1.8.1), als erstes bekanntes Substrat der PON1 näher (daher stammt der Name Paraoxonase). Er teilte die Serum-Esterasen ein in „A- und B-Esterasen“ (Aldridge 1953a; 1953b). „A-Esterasen“, zu denen PON1 zu zählen ist, besitzen die Fähigkeit die Oxon-Metaboliten einiger OP und aromatische Ester (Arylesterase-Aktivität, AEase; EC 3.1.1.2) zu spalten, ohne dadurch gehemmt zu werden. Vertreter der „B-Esterasen“ sind die Carboxylesterasen und die Cholinesterasen, diese tragen einen Serinrest im aktiven Zentrum und werden durch OP gehemmt. Die Paraoxonasen gehören einer Genfamilie an, bestehend aus drei Mitgliedern *PON1*, *PON2* und *PON3*, nebeneinander angeordnet auf dem langen Arm des Chromosom 7 (7q21-q22, Primo-Parmo et al. 1996).

Die physiologische Funktion der Paraoxonasen ist noch nicht eindeutig geklärt. Da eine Lactonase-Aktivität allen gemeinsam ist und es dafür Beispiele natürlicher Substrate gibt, geht man nach aktueller Meinung davon aus, dass dies ihre native Funktion sei (Khersonsky und Tawfik 2005). Eine weitere Rolle spielt sie beim Fremdstoffmetabolismus, in dem sie OP, Arylester und, nach neueren Erkenntnissen, auch häufig verwendete Arzneimittel hydrolysieren (Furlong et al. 2002; Draganov und La Du 2004). PON1 und PON3 werden hauptsächlich in der Leber exprimiert und ins Blut sezerniert (Hassett et al. 1991; Reddy et al. 2001; Zech und Chemnitius 2002). PON2 ist im Plasma nicht nachweisbar, wird aber in Leber, Lunge, Gehirn und Herz exprimiert (Mochizuki et al. 1998). Zur Spaltung von aromatischen Estern (z.B. Phenylacetat, Thiophenylacetat und 2-Naphthylacetat), Organophosphor-Verbindungen (z.B. Paraoxon, Diazoxon und Chlorpyrifosoxon, La Du 1992) und Nervenkampfstoffen (Sarin und Soman, Davies et al. 1996) ist nur die PON1 in der Lage. Daneben besitzen PON1 wie auch PON3 die Fähigkeit, aromatische und aliphatische Lactone, wie auch zyklische Carbonate (z.B. Dihydrocoumarin, Lactone der Homogentisinsäure, γ-Butyrolacton, Homocysteinthiolacton) zu spalten. Die Hydrolyse größerer Moleküle wie Spironolacton oder Lovastatin bleibt PON3 vorbehalten, Dihydrocoumarin ist das einzige derzeit bekannte Substrat der PON2 (Draganov et al. 2005).

PON1

PON1 ist ein aus 355 Aminosäuren bestehendes, im Serum an HDL gebundenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 43-47 kDa. Lange Zeit war nicht eindeutig geklärt, ob

Paraoxonase (PXase)- und AEase-Aktivität auf ein und dasselbe Enzym zurückzuführen sind. Durch Aufreinigung, Sequenzierung und Klonierung ließ sich jedoch zeigen, dass PON1 als einziges Enzym dafür verantwortlich ist (Gan et al. 1991; Hassett et al. 1991; Adkins et al. 1993; Sorenson et al. 1995). Eine 3-D Struktur wurde bisher nur für ein rekombinantes Enzym publiziert (Harel et al. 2004), nicht jedoch für das native humane Enzym. Ihre primär beschriebene Fähigkeit der Entgiftung von OP (Costa et al. 2005a) bzw. zum Fremdstoffmetabolismus, scheint eine „promiskuitive" Funktion zu sein (Aharoni et al. 2005). Aufgrund ihrer Fähigkeit, LDL (in-vitro) vor Oxidation zu schützen (Durrington et al. 2001), geht man davon aus, dass sie eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt (Mackness et al. 1998; Shih et al. 1998; Jarvik et al. 2000; Mackness et al. 2001; Jarvik et al. 2003). Für eine ausführliche Darstellung weiterer klinischer Aspekte sei auf andere Stellen verwiesen (Costa und Furlong 2002; Draganov und La Du 2004).

Inzwischen sind über 230 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) des menschlichen PON1-Gens bekannt (dbSNP Datenbankabfrage des NCBI, GeneID=5444). Zwei davon im kodierenden Bereich wurden besonders intensiv untersucht: Leucin(L)/Methionin(M) an Position 55 und Glutamin(Q)/Arginin(R) an Position 192. Der SNP an Stelle 192 beeinflusst, im Gegensatz zum SNP an Stelle 55 entscheidend die katalytische Aktivität und Substrat-Affinität der PON1. Jeder Phänotyp bevorzugt dabei bestimmte Substrate. So wird Paraoxon ca. 6-mal schneller durch das 192R Alloenzym gespalten als durch das 192Q Alloenzym, bei bestimmten OP und Lactonen ist die Präferenz umgekehrt (Smolen et al. 1991; Davies et al. 1996; Richter und Furlong 1999; Billecke et al. 2000). Der $PON1_{55MM}$-Typ ist mit einer niedrigeren Serumaktivität korreliert, möglicherweise bedingt durch Stabilitätsunterschiede (Leviev et al. 2001) oder auch durch Unterschiede in der Genexpression. Diese wird entscheidend mitbestimmt durch einen weiteren, wichtigen SNP für C/T in der Promotorregion an Position -108 (Brophy et al. 2001). Die Kenntnis des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps kann sich als hilfreich für die Identifizierung des individuellen kardiovaskulären Risikos, der Sensitivität gegenüber OP und als pharmakogenetischer Parameter für den Arzneistoffmetabolismus erweisen (Furlong et al. 2002).

Die Häufigkeit des Auftretens der $PON1_{Q192R}$-Alloenzyme variiert in unterschiedlichen Regionen bzw. Bevölkerungsgruppen. So ist die Aktivität der PXase in der kaukasischen Bevölkerung bimodal verteilt, in afrikanischen und asiatischen Populationen dagegen unimodal (La Du 1992). Geldmacher v. Mallinckrodt et al. (1973) schlugen erstmals als Ursache einen genetisch determinierten Polymorphismus vor, und Vererbungsstudien in

Gruppen mit bimodaler Verteilung wiesen darauf hin, dass Individuen mit niedriger PXase-Aktivität homozygot für ein „niedrig-aktives“ Allel sind (Playfer et al. 1976). Allerdings versagte die Unterscheidung der Heterozgygoten von den Homozygoten bei Individuen mit „hoch-aktivem“ Allel. Eckerson (1983a; 1983b) bildete einen Quotient aus PXase- (stimuliert durch 1 M NaCl) zu AEase-Aktivität, wodurch sich ein charakteristisches Verhältnis für die homo- bzw. heterozygoten Phänotypen ergab. Ältere Bezeichnungen sind Typ A ($PON1_{192QQ}$) mit niedriger und Typ B ($PON1_{192RR}$) mit hoher PXase-Aktivität. Die $PON1_{Q192R}$-Typisierung wurde noch verbessert durch Bestimmen des Aktivitäts-Verhältnisses von DZOase/PXase, bezeichnet als „PON1-Status“. $PON1_{192Q}$ besitzt eine höhere katalytische Aktivität für die Diazoxon-Spaltung als $PON1_{192R}$, also ein zur Paraoxon-Spaltung entgegengesetztes Verhalten. Durch Auftragen der Aktivitäten in einem Koordinatensystem wird die Unterscheidung besonders deutlich, s. Abbildung 1-8 (Richter und Furlong 1999):

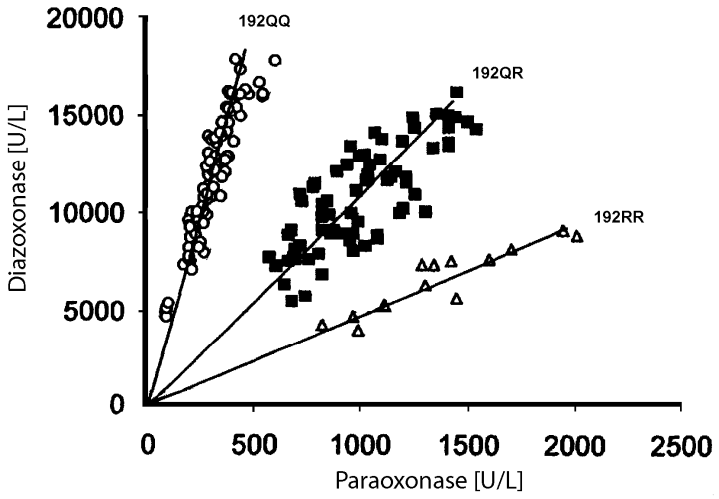


Abbildung 1-8 Bestimmung des PON1-Status. Die „zwei-Substrat“ Methode liefert eine genaue Auflösung des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps und lässt zusätzlich Rückschlüsse auf die PON1-Plasmakonzentration zu. Die Verteilung der Heterozygoten weist eine größere Streuung auf als die der Homozygoten. Dies wird mit der Tatsache erklärt, dass die jeweiligen Enzyme bei jedem Individuum unterschiedlich exprimiert werden. Modifiziert nach Brophy (2002).

Neben der Auflösung des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps, der sehr genau den Genotyp widerspiegelt („funktioneller Genotyp“), erhält man zusätzlich Informationen über den Serumlevel des Enzyms. Er kann durch genetische Interaktionen, Umwelt- und diätetische Faktoren stark variieren (Jarvik et al. 2000; Costa et al. 2003). Da im Plasma von Heterozygoten beide Enzyme vorkommen, deren molares Verhältnis aber nicht 50:50 sein muss, kommt es hier zu einer größeren Streuung des Aktivitäts-Verhältnisses (La Du et al. 2001; Brophy 2002).

1.3 Ziele der Arbeit

Intention der Dissertation war die Klärung folgender Fragestellungen: Ist es möglich, die Geschwindigkeit der Phosphorylobidoxim-Spaltung direkt zu bestimmen? Und ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse durch PON1 von dem Q/R-Polymorphismus an Position 192 abhängig? Dazu wurden im Einzelnen folgende Punkte untersucht:

1. Bestimmung des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps verschiedener Plasmaproben
2. Synthese unterschiedlicher Phosphorylobidoxim-Verbindungen (POX)
3. Bestimmung der Hemmkinetiken von AChE durch die POX-Verbindungen
4. Entwicklung einer Methodik zur Ermittlung der POX-Hydrolase-Aktivität
5. Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität der phänotypisierten Plasmaproben

Untersuchungen anhand einer großen Anzahl an Individuen haben schon den Einfluss des $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse verschiedener Substrate nachgewiesen (Eckerson et al. 1983b; Davies et al. 1996; Richter und Furlong 1999). In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, exemplarisch anhand einiger Proben, den prinzipiellen Einfluss des $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus auf die POX-Hydrolase-Aktivität zu zeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Labormaterialien und Geräte

Dialyseschläuche: Visking® dialysis tubing 20/32, 16 mm und 8/32, 6 mm (Serva, Heidelberg, Deutschland);

Eppendorfcups: 0,5-2,0 ml (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland);

Gefriertrocknungsanlage: Alpha 1-4 LSC (Martin Christ Gefriertrockungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland);

HPLC-Säule: LiChroCart 125-3 Superspher® 60 RP-select B, 125 mm x 3 mm; 4 µm (Merck, Darmstadt, Deutschland);

Luftpolsterpipetten und Direktverdrängerpipetten verschiedenen Volumens (Gilson; Langenfeld, Deutschland);

Miniature Polyethylen Vials: Pico'Hang-In'Vial (Packard, Groningen, Niederlande);

Polystyroleinmalküvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland);

Quarz-Küvetten: mikro oder halbmikro (Hellma, Freiburg i. Br., Deutschland);

Reinstwasseranlage: Aquintus LS (membraPure GmbH, Bodenheim, Deutschland);

Temperierbäder: Colora Kühlbad (Colora Messtechnik GmbH, Lorch, Deutschland); Lauda Medico 3 Wasserbad mit Thermo-Temp Einhängethermostat (MGW Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland);

Vortex Schüttelgerät (Bachofer, Reutlingen, Deutschland);

Zentrifugen: Sputnik UJ 15000 (Heraeus Christ, über IBR Laborgeräte Gräfelfing, Deutschland); Eppendorf Zentrifuge Typ 3200 (Eppendorf-Gerätebau, Hamburg, Deutschland); Reagenzglaszentrifuge UJ0 (Heraeus Christ, Osterode, Deutschland); Ultrazentrifuge Centrikon T-2060 (Kontron LTD, Zürich, Schweiz) mit Rotor SS34 (Sorvall Instruments);

2.2 Messanlagen

pH-Messgerät: Knick Digital-pH-Meter, Typ 647 (Bachofer, Reutlingen, Deutschland);
pH-Elektrode: Mettler Toledo Inlab 423 (Mettler Toledo, Deutschland), Kalibrierung mit Phosphatpuffer pH 4,0 und pH 7,0 (Merck, Darmstadt, Deutschland);

Spektrophotometer: Shimadzu UV 2401 PC (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg);

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

Pumpe: 1 ½ Kopf-Pumpe mit Niederdruckgradientenformer, Merck Hitachi L-6200 intelligent Pump (Merck, Darmstadt, Deutschland);

Injektorventil: Rheodyne 7125 mit 200 µl Probenschleife (Rheodyne, Cotati, USA);

Säule: s. 2.1;

Detektoren: *UV-Vis Spectrophotometric Detector Shimadzu SPD-6AV*, gekoppelt mit Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator (Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. *UV-VIS Diodenarray-Detector Shimadzu SPD-M6A*, gekoppelt mit einem Personal Computer Compaq ProLinea 4/66. Software Shimadzu Class LC-10, 1992. In beiden Detektoren wurde eine Shimadzu-Detektorzelle, 10 mm; 8 µl; ø 1mm (Shimadzu, Deutschland GmbH) verwendet;

Säulenofen: Gynkotek STH 585 (Gynkotek, Germering, Deutschland);

2.3 Chemikalien

2.3.1 Substanzen

Acetonitril, LiChrosolv®	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetylthiocholin Iodid (ASCh), 98 %	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Aktivkohle Norit A , pract.	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Alkohol-Dehydrogenase (ADH) aus Pferdeleber (1,33 U/mg Feststoff, 15 mg)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Ammoniak (NH_3), p.a. 25 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Barbital-Na (Veronal)	
BCA-Protein-Reagenz	Novagen/Merck (Darmstadt, Deutschland)
$CaCl_2$ x 2 H_2O, p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Diazoxon, 97 %	Chem Service Inc. (West Chester, USA)
Diisopropylfluorophosphat (DFP) ca. 60 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Essigsäure, zur Synthese 99-100 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin, p.a.	
HCl, p.a. 37 %	
Heparin Natrium (25.000 I.E./5 ml)	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
2-Isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMHP), 99,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland)
KH_2PO_4, p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol (MeOH), LiChroSolv®	
3-[Morpholino]propansulfonsäure (MOPS), 99,5 %	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Na_2HPO_4, p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl, p.a	
NaOH, p.a.	
Natriumpyrophosphat Decahydrat, p.a.	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Nikotinamid-adenin-dinukleotid Trihydrat (NAD), 100 %	Boeringer Mannheim (Mannheim, Deutschland)
Obidoximdichlorid	Duphar (Amsterdam, Holland)
Paraoxon-ethyl, 99,1 % und Paraoxon-methyl, 95 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Deutschland)
Phenylacetat	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
PIC B7® (0,2 M 1-Heptansulfonsaures Natrium-Reagenz) und PIC A® low UV (0,25 M Tetrabutylammonium-Phosphat-Reagenz)	Waters (Milford, USA)
$PON1_{192QQ}$, gereinigte humane Paraoxonase	Prof. P. Masson (La Tronche, Frankreich)
Semicarbazidhydrochlorid 99+% (alkoholfrei)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
Titriplex® III (EDTA), p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trichloressigsäure (TCA), p.a.	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), p.a.	

Das verwendete Wasser wurde einer Reinstwasseranlage entnommen (Leitfähigkeit >18 MOhm x cm).

Plasmaproben stammten von gesunden menschlichen Spendern aus dem Mitarbeiterkreis mit deren Einverständnis.

2.3.2 Pufferlösungen

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 / RT (PP)

Stammlösung I: Na_2HPO_4, MG 142,0 (14,2 g in 1000 ml H_2O); Stammlösung II: KH_2PO_4; MG 136,1 (13,6 g in 1000 ml H_2O). Zur Einstellung des Phosphatpuffers auf pH 7,4, wurde eine entsprechende Menge (ca. 200 ml) Lösung 2 mit 1 Liter der Lösung 1 gemischt.

0,2 M TRIS-HCl / 4 M NaCl / 4 mM Ca^{2+} / pH 8,5 / RT

12,1 g TRIS, MG 121,1; 117 g NaCl, MG 58,4; 294 mg $CaCl_2*2H_2O$, MG 147,0 in 500 ml H_2O lösen und mit HCL konz. auf pH 8,5 einstellen.

0,1 M TRIS-Acetat / 2 mM Ca^{2+} / pH 8,0 / RT

6,06 g TRIS; 147 mg $CaCl_2*2H_2O$ in 500 ml H_2O lösen und mit konz. Essigsäure auf pH 8,0 einstellen.

0,1 M MOPS-Na / 1mM Ca^{2+} pH 7,4 / 20 °C

20,9 g MOPS, MG 209,3 und 147 mg $CaCl_2*2\ H_2O$, MG 147,0 in 1000 ml H_2O lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen.

10 mM Veronal-HCl pH 7,5 / RT

103,5 mg Barbital-Na, MG 206,9 in 50 ml H_2O lösen und mit 1 M HCl auf pH 7,5 einstellen.

75 mM Pyrophosphat-Na / 21 mM Glycin pH 8,7 / RT / 75 mM Semicarbazid-HCl

10 g $Na_4P_2O_7*10\ H_2O$, 2,5 g Semicarbazid-HCl und 0,5 g Glycin in 250 ml H_2O Lösen, mit ca. 5 ml 4 N NaOH auf pH 8,7 einstellen und mit H_2O auf 300 ml auffüllen.

Die Puffer wurden mit den verschiedenen Säuren/Basen bei der angegebenen Temperatur auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. In einigen, jeweils angegebenen Fällen wichen die Reaktionstemperaturen von den aufgeführten ab, dann wurde der pH-Wert bei den erforderlichen Temperaturen eingestellt. Die angegebene, unterstrichene Molarität bezieht sich dabei auf die Konzentration des Anions.

2.3.3 Reagenzien und Enzympräparate

ASCh: (Acetylthiocholin Iodid) MG: 289,2; für eine 28,4 mM wäßrige Lösung 41,1 mg ASCh in 5,0 ml H_2O lösen.

AChE: (Acetylcholinesterase aus isolierten Erythrozytenmembranen) Heparinblut eines menschlichen Spenders wurde zentrifugiert (3000 g, 10 min) und das Plasma abpipettiert. Die Erythrozyten wurden viermal gewaschen, indem sie mit 2 Volumenanteilen 0,1 M Phosphatpuffer / pH 7,4 versetzt wurden und nach Zentrifugation der Überstand jeweils entfernt wurde. Die gepackten Erythrozyten wurden anschließend in hypotonem, 6,7 mM Phosphatpuffer / pH 7,4 hämolysiert. Das Hämolysat wurde bei 50 000 g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet jeweils in hypotonem Phosphatpuffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, gefolgt von einer letzten Zentrifugation bei 100 000 g für 45 min bei 4 °C. Das Pellet wurde in einem Volumen von ca. 3 ml 0,1 M Phosphatpuffer / pH 7,4 resuspendiert, sodass sich eine AChE-Aktivität von 3,5 bis 6 U/ml ergab. Die Suspensionen wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren (Dodge et al. 1963; Worek et al. 2004a).

ADH: (Alkoholdehydrogenase) 15 mg Protein wurden in 1 ml H_2O gelöst (20 U/ml).

Diazoxon: (O,O-Diethyl-O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinyl)phosphat) MG 288,3; für eine 69 mM Lösung wurden 100 mg in 5 ml Acetonitril gelöst.

DFP: (Diisopropylfluorophosphat) MG 184,2; Dichte: 1,07 g/ml; Wässrige Suspensionen des DFP Präparats zeigten einen stark sauren pH-Wert, erklärbar mit der Bildung von Flusssäure durch Hydrolyse von DFP. Die Titration einer wässrigen DFP-Suspension mit NaOH ließ auf eine Reinheit von ≈ 60 % schließen. *POX-propyl-Synthese*: Für eine ≈ 10 mM wässrige Suspension wurden 2,7 µl DFP in 997 µl 10 mM Veronal-Puffer / pH 7,5 gemischt. *AChE-Hemmkinetik*: 15 µl DFP wurden in 485 µl MeOH gelöst und davon 20 µl ad 10 ml H_2O gegeben, für eine Endkonzentration von ≈ 200 µM.

DTNB: (5,5`-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure) MG 396,4; für eine 10 mM Lösung wurden 396 mg DTNB in 100 ml 0,1 M Phosphatpuffer / pH 7,4 gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

IMHP: (2-Isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol) MG 152,2; Reinheit 99,5 %; für eine 10 mM Lösung wurden 7,6 mg in 5 ml MeOH gelöst.

NAD: (Nikotinamid-adenin-dinukleotid Trihydrat) MG 717,4; Für eine 24 mM Lösung wurden 50 mg NAD in 3 ml H_2O gelöst.

Obidoxim-Lösung: (1,1`-Oxybis(methylen)bis[4-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dichlorid-monohydrat) MG: 377,2; Reinheit 99%; in Wasser bzw. 10 mM Veronal-Puffer / pH 7,5 gelöst.

Paraoxon-methyl: (O,O-Dimethyl-O-4-nitrophenylphosphat) MG 247,2; Dichte: 1,383 g/ml; Reinheit >95 %; *POX-methyl-Synthese*: für eine 15 mM Suspension wurden 2,8 µl Paraoxon-methyl in 997 µl 10 mM Veronal-Puffer / pH 7,5 gemischt. *AChE-Hemmkinetik*: 6 µl Paraoxon-methyl wurden in 194 µl MeOH gelöst und davon 20,7 µl ad 100 ml H_2O gegeben für eine Endkonzentration von 33 µM.

Paraoxon-ethyl: (O,O-Diethyl-O-4-nitrophenylphosphat) MG: 275,2; Dichte: 1,3 g/ml; Reinheit: 99 %. *Gereinigtes Paraoxon-ethyl zur PXase-Aktivitätsbestimmung*: Zur Entfernung des störenden 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 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Faltenfilter filtriert, der pH-Wert des Filtrats mit 1 M TRIS auf pH 5 eingestellt und die Konzentration photometrisch bestimmt ($\varepsilon_{274\ nm}$ in $H_2O = 8{,}9 \times 10^3\ M^{-1}cm^{-1}$; Merck-Index, 1989). Die gereinigte Lösung wurde aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt (Kiderlen 2004). *POX-ethyl-Synthese*: für eine 15 mM wässrige Suspension wurden 3,2 µl des Originalpräparats in 997 µl 10 mM Veronal-Puffer / pH 7,5 gemischt. *AChE-Hemmkinetik*: 7 µl Paraoxon-ethyl wurden in 193 µl MeOH gelöst und davon 20,2 µl ad 100 ml H_2O gegeben für eine Endkonzentration von 33 µM.

Phenylacetat: MG 136,2; Dichte: 1,07 g/ml; für eine 8,1 mM Zubereitung wurden 50 µl Phenylacetat in 48,75 ml H_2O suspendiert.

Phosphoryloxime: (Phosphoryl-Obidoxim) Festes Obidoximdichlorid wurde in 10 mM Veronal-HCl-Puffer / pH 7,5 gelöst (eine Obidoxim-Konzentration von 50 mM ergab einen pH-Wert von 6,4) und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, OP wurden im selben Puffer suspendiert (15 mM). Es wurden 240 µl 15 mM OP-Suspension mit 72 µl 50 mM Obidoxim-Lösung und 48 µl Veronal-Puffer gemischt. Der Reaktionsansatz von 360 µl mit 10 mM Obidoxim und 10 mM OP in 10 mM Veronal-HCl / pH 7,5 wurde über Nacht (16 h) auf Eis inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50-100 µl des Ansatzes nach HPLC-Methode A chromatographiert und der POX-Peak aufgefangen (POX-methyl: R_t 8-10 min, POX-ethyl:

R_t 17-19 min, POX-propyl: R_t 22-24 min). Die Fraktionen wurden vereinigt, Aliquote per HPLC auf Reinheit geprüft und spektrophotometrisch vermessen (de Jong und Ceulen 1978; Kiderlen et al. 2005). Um die MeOH-Konzentration auf unter 5 ‰ zu senken, wurde das Volumen der POX-Lösung bei -1 °C Stellflächentemperatur durch Abdampfen (im Gefriertrockner) auf ein Zehntel reduziert. Das Restvolumen wurde mit auf Eis gekühltem H_2O, dem eine geringe Menge 0,1 M Essigsäure bis zu einem pH-Wert von 4,5 zugegeben wurde, erneut verdünnt und auf eine POX-Konzentration von 10-15 µM eingestellt. Hierzu wurde für alle drei POX-Verbindungen ein Extinktionskoeffizient von 31,6 mM^{-1} cm^{-1} bei 274 nm herangezogen (Kiderlen et al. 2005).

Vorsichtshinweis: Phosphoryloxime sind hochpotente Hemmstoffe der AChE. Ein Umgang mit ihnen erfordert besondere Sorgfalt und eine entsprechende Laborausstattung.

PIC B7/NH_3-Lösung: 1ml PIC B7 wurden mit 120 µl konz. NH_3 gemischt.

Plasmaproben: Frisch gewonnenes Spenderblut wurden mit Heparin versetzt, zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Ein Teil älterer Plasmaproben wurde mit 10 µM Soman versetzt bei 37 °C für 30 min inkubiert, um BChE zu hemmen. Die Behandlung mit Soman erfolgte im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, wofür ich Herrn PD Dr. Worek herzlich danke (Worek et al. 1999b). Alle Plasmaproben wurden tiefgefroren bei -20 °C gelagert.

Für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität wurden Plasmen, die aufgrund geringer Aktivität konzentriert eingesetzt werden mussten, gegen 0,1 M MOPS / 1mM Ca^{2+} / pH 7,4 bei +6 °C für mindestens 18 Stunden dialysiert.

2.4 Methoden

2.4.1 Enzymatische Bestimmungen

Alle Bestimmungen wurden, wenn erforderlich, um den Wert der spontanen Substrathydrolyse korrigiert.

2.4.1.1 Photometrische Bestimmung der Arylesterase-Aktivität (AEase)

Die Arylesterase wurde modifiziert nach Junge und Klees (1984) und Kitchen (1973) in

50 mM TRIS-Acetat-Puffer / 1 mM Ca^{2+} mit
3,6 mM Phenylacetat als Substrat

bei pH 8,0 und 37 °C in einem Volumen von 3 ml bestimmt. Verfolgt wurde die enzymatisch freigesetzte Menge an Phenol bei 270 nm, $\varepsilon_{270\,nm} = 1{,}45 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$ (Hesse et al. 1987), korrigiert um den Wert der spontanen Substrathydrolyse. Die Reaktion wurde mit 45 µl 1:30 in 50 mM TRIS-Acetat-Puffer / 1 mM Ca^{2+} verdünntem Plasma gestartet.

2.4.1.2 Photometrische Bestimmung der Paraoxonase-Aktivität (PXase)

Die Aktivität der PXase wurde bei 37 °C und pH 8,5 in

0,1 M TRIS-HCl-Puffer / 2 M NaCl / 2 mM $CaCl_2$ / pH 8,5 mit
1,2 mM Paraoxon-ethyl als Substrat

bestimmt. 500 µl doppelt konzentrierter Puffer wurden mit 400 µl einer 3 mM Paraoxon-ethyl-Lösung (gereinigt) und 80 µl H_2O gemischt. Die Reaktion wurde mit 20 µl unverdünntem Plasma gestartet und die Freisetzung von p-Nitrophenol bei 405 nm spektrophotometrisch verfolgt, $\varepsilon_{405nm} = 18 \times 10^3\ M^{-1}\ cm^{-1}$. (Furlong et al. 1988; Richter und Furlong 1999).

2.4.1.3 Photometrische Bestimmung der Diazoxonase-Aktivität (DZOase)

Die Aktivität der Diazoxonase wurde bei 37 °C und pH 8,5 in

0,1 M TRIS-HCl Puffer / 2 M NaCl / 2 mM $CaCl_2$ / pH 8,5 mit
500 µM Diazoxon (DZO) als Substrat,

bestimmt. Eine 69,4 mM DZO-Stammlösung mit Acetonitril als Lösungsmittel wurde bei 6 °C gelagert und daraus täglich eine wässrige Verdünnung von 13,9 mM (1:5 v/v) hergestellt. 960 µl Puffer wurden mit 36 µl DZO-Verdünnung (13,9 mM) gemischt und mit 5 µl unverdünntem Plasma gestartet. Der Umsatz von Diazoxon zu 2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidin (IMHP) wurde bei 270 nm ($\varepsilon_{270\,nm} = 3{,}03\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) verfolgt (Richter und Furlong 1999). Die Acetonitril-Konzentration im Test lag dabei unter 1 %.

Um die Diazoxon-Konzentration zu prüfen, wurde in einem Experiment eine 0,25 mM Lösungen von Diazoxon spektroskopisch vermessen und anschließend mit Hilfe der PON1 zu IMHP umgesetzt. Das von Richter und Furlong (1999) veröffentlichte Diazoxon-Spektrum zeigt für die angegebenen Konzentration von 0,25 mM eine etwa doppelt so hohe Extinktion über den gesamten Wellenlängenbereich (300 bis 210 nm), als das hier ermittelte Spektrum. Qualitativ unterschieden sich die Spektren jedoch nicht. Zur Kontrolle stand IMHP in

Festsubstanz zur Verfügung. Eine 0,25 mM Lösung wurde durch Einwaage hergestellt und als Referenzlösung verwendete, s. Abbildung 2-1.

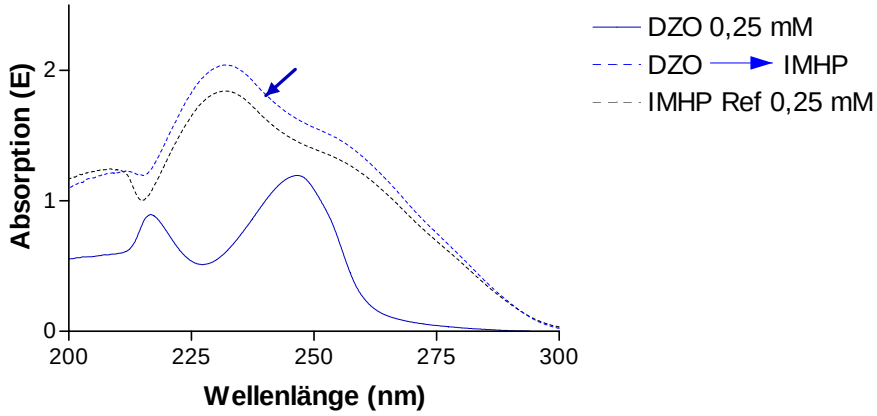


Abbildung 2-1 Spektren von Diazoxon (DZO, durchgezogen) und IMHP (unterbrochen). Die unterbrochene, mit Pfeil markierte Linie ergab sich nach vollständigem, enzymatischem Umsatz von 0,25 mM DZO zu IMHP bei 10 °C. Die unterbrochene Linie ohne Pfeil ist ein IMHP-Spektrum einer 0,25 mM Referenzlösung.

Das Spektrum von 0,25 mM IMHP zeigte keine bedeutenden Unterschiede. Die berechnete Zunahme von 3,03 mM^{-1} cm^{-1} Absorptionseinheiten bei 270 nm (Richter und Furlong 1999), während der Umformung von Diazoxon zu IMHP, wurde bestätigt und zur Aktivitäts-berechnung herangezogen.

2.4.1.4 Photometrische Bestimmung der Acetylcholinesterase (AChE)-Aktivität

Die Aktivität der AChE wurde standardmäßig durch modifizierte Methode nach Ellman bei 37 °C in

0,1 M Phosphatpuffer / pH 7,4 und 0,28 mM DTNB mit
452 µM Acetylthiocholin (ASCh) als Substrat

in einem Volumen von 3,14 ml bestimmt. Nach Zugabe von 200 µl einer 1:40 verdünnten AChE-Suspension wurde die Reaktion mit 50 µl ASCh gestartet und bei 436 nm die Bildung von TNB^- verfolgt. Für Berechnungen wurde ein Extinktionskoeffizient von $\varepsilon_{436\,nm}$ = 11,28 mM^{-1} cm^{-1} angewendet (Eyer et al. 2003b). Bei Einsatz abweichender AChE-Proben wurden die Volumina entsprechend angepasst, wobei sich die Konzentrationen der Reagenzien nur geringfügig änderten (Ellman et al. 1961; Worek et al. 1999b).

ASCh wird durch die AChE in Thiocholin und Acetat gespalten. Thiocholin reagiert sehr schnell mit Dithiobisnitrobenzoesäure (DTNB) wobei der gelbe Farbstoff 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB^-) entsteht, dessen Bildung als Indikator für den zeitlichen Ablauf der enzymatische Reaktion genützt wird.

2.4.1.5 Titration von AChE-Bindungsstellen

Die Konzentration katalytischer AChE-Bindungsstellen einer Membran-Suspension wurde durch Titration mit POX-ethyl abgeschätzt (eine exakte Titration ist aufgrund des POX-Zerfalls problematisch). Dabei wurde davon ausgegangen, dass die aktiven Zentren stöchiometrisch 1:1 blockiert werden (Levy und Ashani 1986). AChE von ca. 6 U/ml wurde mit POX-ethyl-Konzentrationen zwischen 0,5 - 12 nM in 0,1 M PP / pH 7,4 bei 10 °C solange inkubiert, bis sich die Aktivität nicht mehr änderte. Durch Auftragen der prozentualen Restaktivität gegen die POX-ethyl-Konzentration, konnte aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse die Konzentration der AChE-Bindungsstellen ermittelt werden.

2.4.1.6 Bestimmung der Hemmkinetik der AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen

Die Hemmkinetik wurde unter Reaktionsbedingungen pseudo-1. Ordnung bei Hemmstoff-überschuss ermittelt (Aldridge 1950). Dabei wurde für den Hemmansatz ca. 0,2-0,3 nM AChE (entsprach 50-70 mE/min, vgl. Ansatz von 2.4.1.4) mit den POX-Verbindungen bzw. OP in geeigneter Konzentration bei 10 °C in PP 0,1 M / pH 7,4 inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Fraktion von 200 µl entnommen und zum Ansatz zur Bestimmung der initialen AChE-Restaktivität gegeben. Dadurch wurde die Giftkonzentration 1:16 verdünnt und eine weitere Hemmreaktion vernachlässigbar verlangsamt, s. Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1 AChE-Hemmansatz. Die POX-Stammlösungen wurden in H_2O von 0 °C, versetzt mit 0,1 M Essigsäure / pH 4,5 verdünnt (s. a. 2.3.3).

Reagenz	**Konzentration**	**Volumen [µl]**	**Endkonzen-tration**
AChE-Suspension (in 0,1 M PP / pH 7,4)	0,2-0,3 nM	1600 (Vortemperiert bei 10 °C für 10 min)	0,19-0,29 nM
POX-ethyl bzw. -methyl	66 nM	50	2 nM
POX-propyl	990 nM		30 nM
Paraoxon-ethyl bzw. -methyl	33 µM		1 µM
DFP	200 µM		6 µM

An die abnehmende Enzymaktivität gegenüber der Zeit wurde folgende Gleichung angepasst:

$$E_t = E_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} + Plateau$$

Gleichung 2-1 Exponentialfunktion zur Ermittlung der Hemmkonstanten pseudo-1. Ordnung k_{obs}. E_t = Aktivität zum Zeitpunkt t; E_0 = Anfangsaktivität.

2.4.1.7 Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität (k_e) und der nicht-enzymatischen POX-Zerfallsgeschwindigkeit (k_h)

Die POX-Lösungen wurden 2 min im Wasserbad auf die Reaktionstemperatur von 20 °C gebracht, und durch Zugabe zu einer Plasmaprobe (1:1 v/v) wurde POX im pH-Bereich 7,35-7,45 bei 20 °C enzymatisch hydrolysiert. Plasma mit hoher Aktivität wurde mit 0,1 M MOPS-Puffer / 1 mM Ca^{2+} / pH 7,4 verdünnt, bei niedriger Aktivität wurde es dialysiert gegen den genannten Verdünnungspuffer und konzentrierter eingesetzt. Zu geeigneten Zeitintervallen wurden 10 Teile eines Aliquots mit 3 Teilen 1,0 M TCA versetzt und zentrifugiert. Vom Überstand wurden 2 Teile mit 1 Teil PIC B7/NH_3-Lösung versetzt, auf das HPLC-System injiziert und nach Methode B bzw. C (s. 2.4.2) quantifiziert. Bis zur Messung wurden die Aliquots auf Eis bei 0 °C gelagert.

> *Um festzustellen, ob POX unter diesen Bedingungen bis zur Messung stabil war, wurde ein größeres Volumen über einen Zeitraum von 17 Stunden bei 0 °C aufbewahrt und wiederholt gemessen. Es ließ sich kein Abfall der POX Konzentration über 17 Stunden im entsprechenden Medium feststellen.*

Die Abnahme der POX-Konzentration wurde als Maß für die POX-Hydrolase-Aktivität herangezogen. An die gewonnen Daten wurde die folgende Exponentialfunktion durch nicht-lineare Regression angepasst:

$$[POX]_t = [POX]_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Gleichung 2-2 POX-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit. POX_t = POX-Konzentration zum Zeitpunkt t; POX_0 = POX-Anfangskonzentration; k= Geschwindigkeitskonstante (k_{el} bei enzymatischer Hydrolyse, k_h bei nicht-enzymatischem Zerfall s.u.). Bei $t \rightarrow \infty$ wurde $[POX]_t$ als konstant Null gesetzt (Plateau=0).

Von der Eliminationskonstante k_{el} wurde die Geschwindigkeitskonstante k_h des nicht-enzymatischen Zerfalls abgezogen, um k_e zu erhalten, s. a. 3.6.2.

Bestimmung des nicht-enzymatischen POX-Zerfalls (k_h)

Die Plasmaprobe wurde durch Pufferlösung ersetzt und die Bestimmung analog der Ermittlung der POX-Hydrolase-Aktivität durchgeführt. 1 Teil POX-Lösung wurden 2 min im

Wasserbad auf Reaktionstemperatur gebracht und mit 1 Teil Puffer im pH-Bereich 7,35-7,45 bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Zu geeigneten Zeiten wurden Aliquots entnommen und in gleicher Weise, wie bei Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse weiter verarbeitet und per HPLC-Methode B bzw. C chromatographiert.

2.4.1.8 Photometrische Bestimmung der Methanol (MeOH)-Konzentration mit der Alkohol-Dehydrogenase (ADH)

Da MeOH ein sehr schlechtes Substrat für die Leber-ADH ist und die Michaelis-Konstante weit über der zu messenden MeOH-Konzentration liegt, wurde die Anfangsgeschwindigkeit des Umsatzes als Maß der MeOH-Konzentration herangezogen. Eine entsprechende Eichkurve mit MeOH-Standards folgte einer Kinetik 1. Ordnung. Die initiale Aktivität der ADH wurde bei 37 °C und pH 8,7 mit

68 mM Pyrophosphat-Na / 68 mM Semicarbazid / 19 mM Glycin / 0,65 mM NAD

in einem Volumen von 1110 µl gemessen. Zu 1000 µl Puffer wurden 30 µl NAD-Lösung und 60 µl einer MeOH-Probe gegeben. Die Reaktion wurde mit 20 µl ADH-Lösung gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm verfolgt (modifiziert nach Bernt und Gutmann 1970). Anhand einer erstellten Eichkurve wurde die MeOH-Konzentration in Abhängigkeit von der initialen ADH-Aktivität bestimmt.

2.4.2 HPLC-Methoden

Bei allen Methoden wurde die Säule LiChroCart 125-3 Superspher® 60 RP-select B (125 mm x 3 mm ID; 4 µm) verwendet (Spöhrer und Eyer 1995; Kiderlen 2004).

<table>
<tr><td>Methode</td><td colspan="4"></td></tr>
<tr><td>A</td><td colspan="4">Isolierung von POX
Eluent A: 10 mM NH_4acetat, pH 4,5, in H_2O
Eluent B: 10 mM NH_4acetat, pH 4,5, in 50 % MeOH/H_2O (v/v)
Fluss: 0,6 ml / min
Detektorwellenlängen: 220 und 285 nm
Säulenofentemperatur: RT</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2">Pumpenprogramm A1: Isolierung von POX-ethyl (R_t 17-19 min) und POX-propyl (R_t 22-24 min)</td><td colspan="2">Pumpenprogramm A2: Isolierung von POX-methyl (R_t 8-10 min)</td></tr>
<tr><td></td><td>Zeit [min]</td><td>% B</td><td>Zeit [min]</td><td>% B</td></tr>
<tr><td></td><td>0</td><td>0</td><td>0</td><td>0</td></tr>
<tr><td></td><td>20</td><td>40</td><td>12</td><td>24</td></tr>
<tr><td></td><td>30</td><td>100</td><td>21</td><td>100</td></tr>
<tr><td></td><td>42</td><td>100</td><td>33</td><td>100</td></tr>
<tr><td></td><td>45</td><td>0</td><td>36</td><td>0</td></tr>
<tr><td></td><td>50</td><td>0</td><td>45</td><td>0</td></tr>
<tr><td>B</td><td colspan="4">Detektion und Quantifizierung von Obidoxim, POX, Obidoxim-Mononitril
Eluent A: 4% (v/v) Waters PIC-B7® und 0,35% (v/v) Waters PIC-A® low UV in H_2O
Eluent B: 4% (v/v) Waters PIC-B7® und 0,35% (v/v) Waters PIC-A® low UV in 20 % Acetonitril/H_2O (v/v)
Fluss: 0,8 ml / min
Detektorwellenlänge: 285 nm
Säulenofentemperatur: 40 °C</td></tr>
<tr><td></td><td colspan="2">Pumpenprogramm B1: POX-methyl und POX-ethyl</td><td colspan="2">Pumpenprogramm B2: POX-propyl</td></tr>
<tr><td></td><td>Zeit [min]</td><td>% B</td><td>Zeit [min]</td><td>% B</td></tr>
<tr><td></td><td>0</td><td>10</td><td>0</td><td>10</td></tr>
<tr><td></td><td>12</td><td>25</td><td>20</td><td>60</td></tr>
<tr><td></td><td>15</td><td>60</td><td>25</td><td>80</td></tr>
<tr><td></td><td>20</td><td>60</td><td>30</td><td>80</td></tr>
<tr><td></td><td>22</td><td>10</td><td>35</td><td>10</td></tr>
<tr><td></td><td>32</td><td>10</td><td>42</td><td>10</td></tr>
<tr><td>C</td><td colspan="4">Isolierte Quantifizierung von POX
Isokratischer Eluent aus 4% (v/v) Waters PIC-B7®, 0,35% (v/v) Waters PIC-A® low UV und
16 % (v/v) Acetonitril in H_2O für POX-propyl, Säulenofentemp.: 30 °C
12 % (v/v) Acetonitril in H_2O für POX-ethyl, Säulenofentemp.: 30 °C
6 % (v/v) Acetonitril in H_2O für POX-methyl, Säulenofentemp.: RT</td></tr>
</table>

Eluent B wurde zwischen den angegebenen Zeiten linear geändert.

2.4.3 Weitere Labormethoden und eingesetzte Software

Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem BCA-Protein-Reagenz nach Herstellervorschrift bestimmt.

Software

Die Datenverarbeitung erfolgte mit Microsoft Excel 2002 für Windows (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Berechnungen und die Erstellung von Grafiken wurden mit GraphPad Prism®, Version 3.02 für Windows (San Diego, USA, http://www.graphpad.com) und Maple 9.00 (Maplesoft, Waterloo, Kanada) durchgeführt. Für die Visualisierung von Strukturformeln kam MDL ISIS / Draw™ 2.5 zum Einsatz (Elsevier MDL, San Ramon, USA, http://www.mdli.com).

3 ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung des PON1$_{Q192R}$-Phänotyps

Das Messen der PON1-Aktivität für die enzymatische Hydrolyse mit den zwei Substraten Diazoxon und Paraoxon ermöglicht es, den PON1$_{Q192R}$-Phänotyp zu bestimmen. Es wurde vorgeschlagen, diese Vorgehensweise als "Bestimmung des **PON1-Status**" zu bezeichnen. Diazoxonase- (DZOase) und Paraoxonase-Aktivität (PXase) zeigen eine Abhängigkeit vom PON1$_{Q192R}$-Phänotyp und von der Salzkonzentration, s. a. Abbildung 1-8 (Richter und Furlong 1999).

Es ergab sich für jeden PON1$_{Q192R}$-Phänotyp ein charakteristisches Aktivitäts-Verhältnis von DZOase-/PXase-Aktivität. So konnte jeder untersuchten Probe eindeutig ein PON1$_{Q192R}$-Phänotyp zugeordnet werden. In Abbildung 3-1 wurde die DZOase- gegenüber der PXase-Aktivität für alle untersuchten Proben aufgetragen.

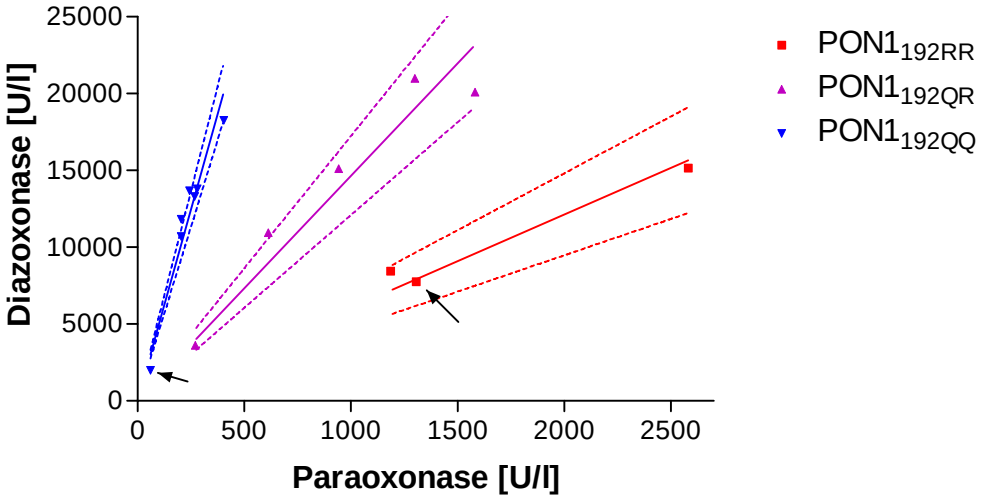


Abbildung 3-1 Graphische Auftragung der Diazoxonase- gegen die Paraoxonase-Aktivität zur Ermittlung der PON1$_{Q192R}$-Phänotypen. Die Phänotypen der mit Pfeilen markierten Proben wurden vom Labor Masson (Frankreich) bestätigt. Die Geraden wurden durch lineare Regression ermittelt und durch den Ursprung gezwungen, die unterbrochenen Linien geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Die mittleren Quotienten DZOase-/PXase-Aktivität zeigt Tabelle 3-1. Eine ausführliche Zusammenstellung aller Messergebnisse ist im Anhang zu finden, s. a. Tabelle 6-2.

Tabelle 3-1 Mittelwerte des Quotienten DZOase-/PXase-Aktivität [U/L]. (Probe 9 wurde aufgrund geringer Aktivität ausgeschlossen, s. a. Anhang 6.3).

PON1-Phänotyp	$\frac{\text{DZOase}}{\text{PXase}}$ (Mittelwerte)
$PON1_{192QQ}$ (n=6)	52
$PON1_{192QR}$ (n=5)	15
$PON1_{192RR}$ (n=3)	6

Die Bildung des Quotienten aus den Aktivitäten der PON1 gegenüber zwei Substraten und deren zweidimensionale Auftragung zur Bestimmung des $PON1_{Q192R}$-Phänotyps, wurde erstmals von Eckerson (1983b) für die Substrate Phenylacetat und Paraoxon beschrieben. Da die Aktivität der Phenylacetat-Hydrolyse (AEase) nicht vom $PON1_{Q192R}$-Phänotyp abhängt ("non-discriminating substrate"), war die Auftrennung der Phänotypen mit hoher PXase-Aktivität hier weniger scharf. Es wurde die AEase-Aktivität für einige Plasmen bestimmt und gegen die PXase-Aktivität aufgetragen, s. Abbildung 3-2.

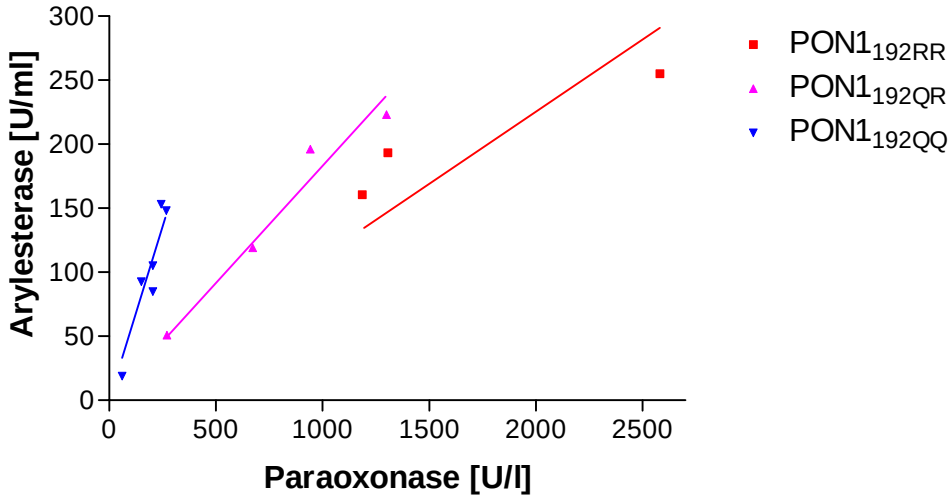


Abbildung 3-2 Arylesterase- gegen Paraoxonase-Aktivität. Die Trennung der Phänotypen $PON1_{192QR/RR}$ ist hier weniger scharf.

3.2 Stabilität von PON1 in gefrorenem Plasma

Es standen einige Plasmaproben aus den Jahren zurückreichend bis 1999 zur Verfügung. Die Proben wurden damals heparinisiert, zum Teil mit Soman behandelt und bei -20 °C gelagert. Die Behandlung mit Soman zeigte keinen Einfluss auf die Stabilität der PON1. Die Aktivitäten der AEase, DZOase und PXase wurden auf den Proteingehalt des Plasmas bezogen. Auch in den Proben mit einem Alter von 84 Monaten waren eindeutige, unerwartet hohe Aktivitäten bestimmbar. Es zeigte sich für die homozygoten (192QQ bzw. 192RR) wie

auch die heterozygoten (192QR) Phänotypen gleichermaßen, dass die absoluten Aktivitäten in Abhängigkeit von der Dauer der Lagerung kontinuierlich geringer wurden, die berechneten Quotienten PXase-/AEase-Aktivität und DZOase-/PXase-Aktivität blieben hingegen altersunabhängig konstant.

Um eine Halbwertszeit der PON1 bei den genannten Bedingungen abschätzen zu können wurden die prozentualen Restaktivitäten zweier homozygoter Proben gegenüber allen Substraten in Abhängigkeit vom Alter aufgetragen. Zusätzlich wurden die Werte der PXase-Aktivität von Eckerson (1983a) mit einbezogen. Dabei wurden die Aktivitäten von bis zu 4 Monate altem Plasma auf 100 % gesetzt. Bei diesem Alter zeigte sich noch kein eindeutiger Aktivitätsverlust. In Erwartung einer exponentiellen Abnahme der Aktivität wurde eine entsprechende Funktion per Regressionsanalyse errechnet und so eine Halbwertszeit von 115 Monaten bzw. 9,5 Jahren gefunden. (95 % Konfidenzintervall: 140 bis 97 Monate, Abbildung 3-3). Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen von Eckerson et al. (1983a) und Brackley et al. (1983).

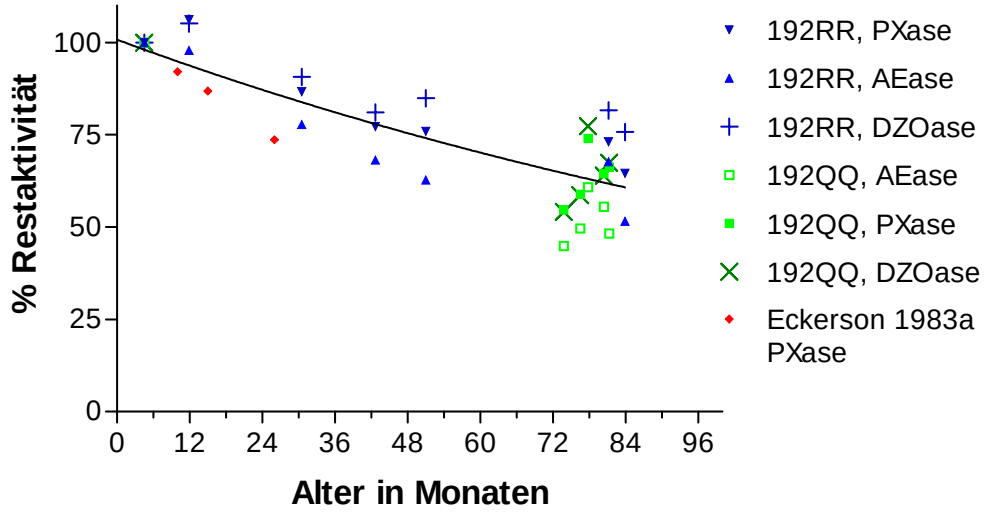


Abbildung 3-3 Aktivitätsverlust der PON1 in Prozent. Es wurden die Enzymaktivitäten der beiden homozygoten Phänotypen 192QQ und 192RR sowie die Werte von Eckerson (1983a) aufgetragen. Plasma mit einem Alter von bis zu 4 Monaten wurde auf 100 % gesetzt. Es ergibt sich so eine Halbwertszeit von durchschnittlich 115 Monaten bzw. 9,5 Jahren.

Der Quotient aus DZOase/PXase zeigte für den $PON1_{192RR}$-Phänotyp mit zunehmendem Alter einen signifikanten Anstieg, für den $PON1_{192QQ}$-Typ hingegen nicht. Ebenfalls änderte sich der Quotient aus PXase/AEase für beide PON1-Phänotypen im Laufe der Zeit nicht signifikant (s. a. Tabelle 6-3 im Anhang).

3.3 Synthese von POX-methyl, POX-ethyl und POX-propyl

Die Synthese und Isolierung von POX-ethyl wurde nach den Angaben von Kiderlen (2005) durchgeführt (vgl. 2.3.3). Nach demselben Verfahren konnte Dimethylphosphoryl-Obidoxim (POX-methyl) und Diisopropylphosphoryl-Obidoxim (POX-propyl) in einer direkten Reaktion von Obidoxim mit Paraoxon-methyl bzw. DFP gewonnen werden. Die DFP-Lösung war stark sauer, wahrscheinlich durch die Bildung von Flusssäure und die Pufferkapazität des Veronalpuffers im Syntheseansatze reichte nicht aus. Deswegen wurde der pH des Reaktionsansatzes mit 0,1 M NaOH (ca. 5-6 µl) auf 7,5 angehoben, ohne dieses Vorgehen entstand bei pH 3,5 so gut wie kein POX-propyl. Die synthetisierten Substanzen wurden primär über den neu aufgetretenen HPLC-Peak mit charakteristischer Retentioszeit und DAD-Spektrum identifiziert. Nach chromatographischer Trennung und Auffangen der Fraktion konnten die Spektren der beiden Substanzen spektrophotometrisch vermessen werden, s. Abbildung 3-4.

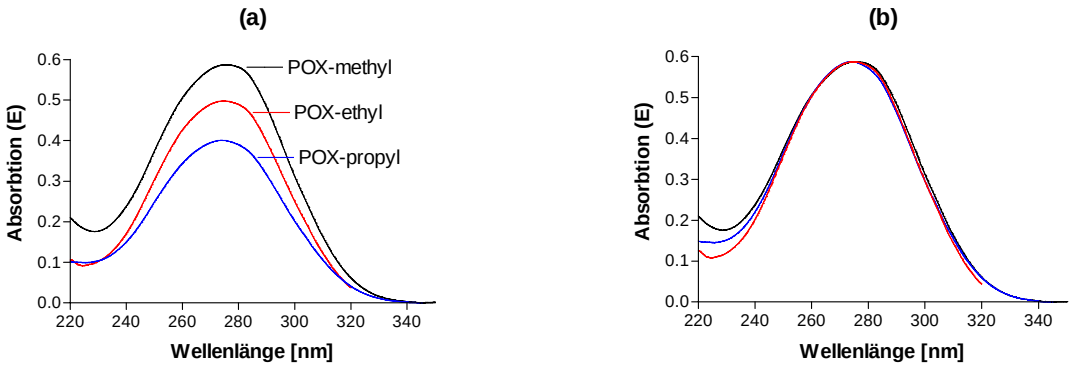


Abbildung 3-4 (a) UV-Spektren von POX-methyl (18,6 µM, E_{max}=275,3 nm), POX-ethyl (15,7 µM, E_{max}=274,3 nm) und POX-propyl (12,7 µM, E_{max}=274,2 nm) gelöst in HPLC-Eluent: 10mM NH_4Acetat / pH 4,5 mit einem Methanolanteil von 2 % (POX-methyl), 10 % (POX-ethyl) bzw. 36 % (POX-propyl). Für die Berechnung der Konzentrationen wurde $\varepsilon_{274\,nm}$ = 31,6 mM^{-1} cm^{-1} zugrunde gelegt (Kiderlen 2005). **(b)** Spektren rechnerisch angeglichen ($E_{max\ 274\,nm}$ von POX-methyl = 100 %).

Die große Übereinstimmung der Spektren von POX-ethyl, -methyl und -propyl wurde als Hinweis betrachtet, dass es sich bei den neu isolierten Substanzen um POX-Verbindungen handelte. Die Absorptionsmaxima unterschieden sich nur geringfügig, im kürzerwelligen Bereich waren die Abweichungen etwas größer. Um die Identität weiter zu untermauern, wurde die Hemmaktivität gegenüber der AChE herangezogen (s. 3.4 u. 3.5). Weiterhin stellten sie Substrate für die $PON1_{192QQ/QR}$ dar, wobei in beiden Fällen Obidoxim als Produkt nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.7).

Die Aufreinigung von POX per HPLC brachte es mit sich, dass ein recht hoher Methanolanteil in der aufgefangenen Fließmittelfraktion vorhanden war. Der Methanolanteil konnte durch Abdampfen und erneutes Verdünnen in Wasser von 0 °C / pH 4,5 (angesäuert durch ein paar Tropfen 0,1 M Essigsäure) auf < 0,5 % gesenkt werden. Dabei war zu beobachten, dass bei vollständiger Trocknung die Ausbeute an POX deutlich geringer war, als bei Reduktion auf ein Restvolumen von z.B. 50-100 µl. Der Restgehalt an MeOH wurde enzymatisch im ADH-Test ermittelt.

3.4 Titration von AChE-Bindungsstellen mit POX-ethyl

Für die Bestimmung einer Hemmkinetik unter Bedingungen pseudo-1. Ordnung war es notwendig, die Konzentration an AChE-Bindungsstellen der eingesetzten Membran-Suspension abzuschätzen. Dazu wurde die AChE mit POX-ethyl als Inhibitor titriert. Durch den Einsatz möglichst hoher Enzymkonzentrationen zur Erhöhung der Reaktions-geschwindigkeit wurde versucht, den durch POX-Zerfall entstehenden Fehler gering zu halten. Die Reaktion lief unter diesen Bedingungen in einem Zeitraum < 10 min vollständig ab. Für die Zerfallgeschwindigkeit von POX-ethyl im entsprechenden Medium wurde eine Halbwertszeit von 53 min ermittelt (s. 3.5). Die Auftragung der prozentualen Restaktivität gegen die POX-ethyl-Konzentration ergab eine lineare Abhängigkeit, s. Abbildung 3-5.

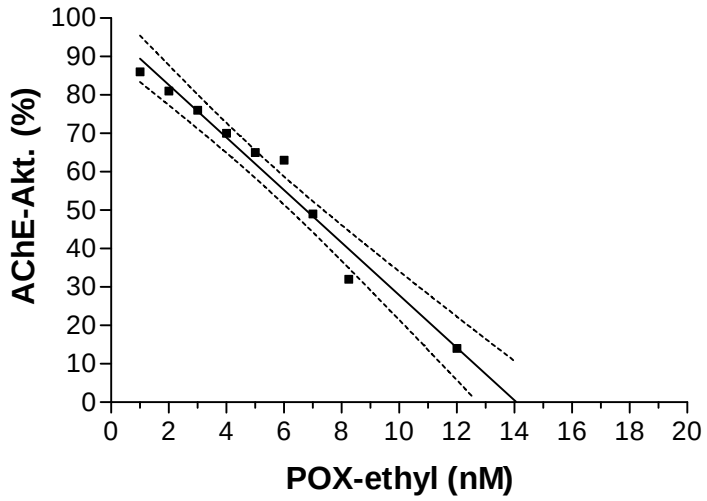


Abbildung 3-5 Titration aktiver AChE-Bindungsstellen mit POX-ethyl in 0,1 M PP/ pH 7,4 bei 10 °C. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse gibt die AChE-Konzentration im Hemmansatz an, unter Voraussetzung einer Hemmung durch POX-ethyl im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 und eines nicht zu schnellen POX-Zerfalls. Die unterbrochene Linie gibt das 95 % Konfidenzintervall (KI) an (x-Abschnitt des KI von 12,7 bis 15,9 nM).

Aus dem Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse konnte eine Konzentration an AChE-Bindungsstellen von 14 nM (95 % KI von 12,7 bis 15,9 nM) im Ansatz ermittelt werden. Die Zugabe der POX-Lösung erforderte eine Korrektur um den Verdünnungsfaktor von 1,143. Folglich ergab sich eine Konzentration von 16 nM für eine AChE-Suspension mit einer Aktivität von 6 mU/ml.

3.5 Hemmkinetik humaner AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen

Die Hemmkonstanten pseudo-1. Ordnung k_{obs} [min^{-1}] wurde mit humaner AChE bei 10 °C in Abwesenheit von Substrat bestimmt. Diese Temperatur wurde gewählt, um die Zerfallsgeschwindigkeit der spontanen POX-Hydrolyse so gering wie möglich zu halten. Die AChE-Suspension wurde stark verdünnt, damit die sehr schnell ablaufende Reaktion verfolgt werden konnte. Die Konzentration der AChE-Bindungsstellen wurde vorher durch Titration abgeschätzt (vgl. 3.4). Aus einem Ansatz wurde zu definierten Zeiten ein Aliquot entnommen und die Restaktivität bestimmt. Bei der unmittelbar folgenden Bestimmung der initialen AChE-Aktivität wurde die POX-Konzentration in der Küvette ca. 1:16 verdünnt und eine weitergehende Hemmung dadurch stark verlangsamt. An die Datenpunkte wurde eine monoexponentielle Funktion angepasst, um k_{obs} zu ermitteln. Die Hemmkonstante 2. Ordnung k_i [M^{-1} min^{-1}] erhielt man dann durch Teilen von k_{obs} durch die Inhibitor-Konzentration. Zum Vergleich wurde bei identischen Bedingungen (bis auf die Giftkonzentration) die Hemmung

durch Paraoxon-ethyl, Paraoxon-methyl und DFP untersucht, s. Abbildung 3-6 und Tabelle 3-2.

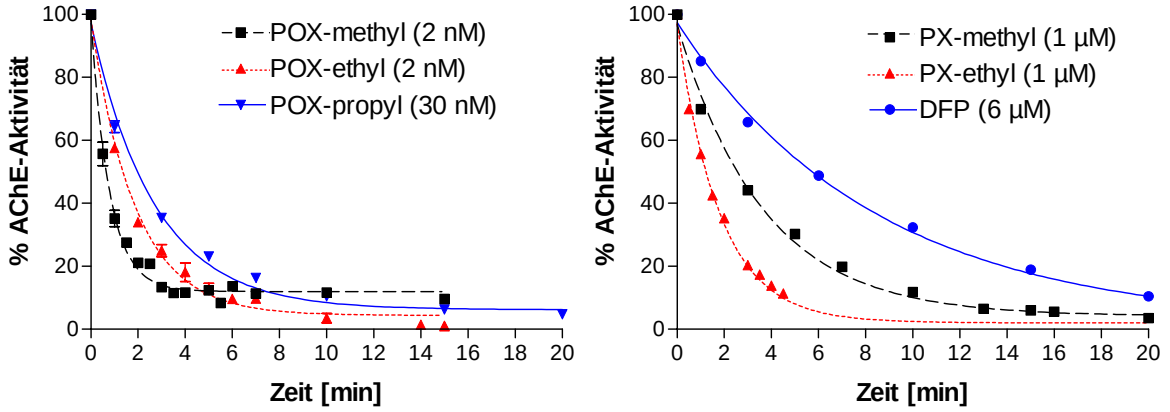


Abbildung 3-6 Hemmung humaner AChE (ca. 0,2-0,3 nM) in 0,1 M PP/pH 7,4 bei 10 °C durch Dialkylphosphorylobidoxim (POX; links) im Vergleich zur Hemmung der AChE durch OP (rechts) unter Reaktionsbedingungen pseudo-1. Ordnung. Jede Kurve ergibt sich aus 3 Bestimmungen. Mit POX-methyl konnte nur eine Hemmung bis zu einer verbleibenden Restaktivität von 10 % erreicht werden (Restaktivität POX-ethyl 4,3 %, POX-propyl 6,2 %; PX = Paraoxon).

Tabelle 3-2 Konstanten für die Hemmung membrangebundener AChE pseudo-1. (k_{obs}) und 2. Ordnung (k_i) durch POX und OP, sowie Zerfallskonstanten von POX-methyl und -ethyl, bestimmt in 0,1 M PP / pH 7,4 bei 10 °C. Vergleich von Literaturwerten: [a]0,1 M PP/pH 7,4; hämolysierte Erythrozytensuspension. [b]0,1 M PP/pH 7,4; isolierte EryAChE. [c]0,05 M PP/pH 8; rekombinante Wildtyp-AChE. [d]4 mM PP/pH 7,6; bovine EryAChE.

Gift (mit Konz.)	**k_{obs} [min^{-1}]**	**k_i [M^{-1} min^{-1}]**	**k_h [min^{-1}]**	**k_i [M^{-1} min^{-1}] (Literaturwerte)**
POX-methyl (2 nM)	1,26	6,3 x 10^8	0,023	
POX-ethyl (2 nM)	0,53	2,65 x 10^8	0,013	[a]1,2 x 10^8; 10 °C (Kiderlen et al. 2005)
POX-propyl (30 nM)	0,37	0,12 x 10^8		
Paraoxon-methyl (1 µM)	0,28	28 x 10^4		[b]120 x 10^4; 37 °C (Worek et al. 1999a)
Paraoxon-ethyl (1 µM)	0,55	55 x 10^4		[a]35 x 10^4; 10 °C (Kiderlen et al. 2005) [a]220 x 10^4; 37 °C (Mast 1997)
DFP (6 µM)	0,12	2 x 10^4		[c]14 x 10^4; 27 °C (Ordentlich et al. 1996) [d]1,38 x 10^4; 15 °C (Main1966)

POX-methyl war ein potenterer Hemmstoff als POX-ethyl, entgegengesetzt dem Verhalten von Paraoxon-methyl im Vergleich zu Paraoxon-ethyl. POX-propyl wies die geringste Hemmaktivität der POX-Verbindungen auf, wie auch das korrespondierende DFP die geringste Hemmkonstante der untersuchten OP zeigte.

Die Hemmkinetik mit POX-methyl ergab ein Plateau von 10 % Restaktivität. Versuche, das Phänomen durch die Spontanreaktivierung von DMP-AChE oder eine Reaktivierung durch

die Bildung von Obidoxim zu erklären, waren nicht erfolgreich. Die experimentell bestimmten Geschwindigkeitskonstanten des spontanen Zerfalls von POX-methyl und -ethyl zeigten auch keine entsprechend hohen Werte, um das Plateau damit erklären zu können (s. Tabelle 3-2 und Diskussion, 4.1.4).

3.6 Entwicklung einer Methodik zur Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität

3.6.1 Identifizierung und Quantifizierung von POX, Obidoxim und Obidoxim-Mononitril in einem HPLC-Lauf

Es wurde versucht, mit HPLC-Methode B die Konzentrationen von POX, Obidoxim und Obidoxim-Mononitril in einem Messlauf nachzuweisen. Problematisch dabei war die Trennung des Obidoxims von Obidoxim-Mononitril. Zunächst wurde ein Experiment zum nicht-enzymatischen Zerfall von POX-ethyl zu Obidoxim-Mononitril durchgeführt, Abbildung 3-7 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm.

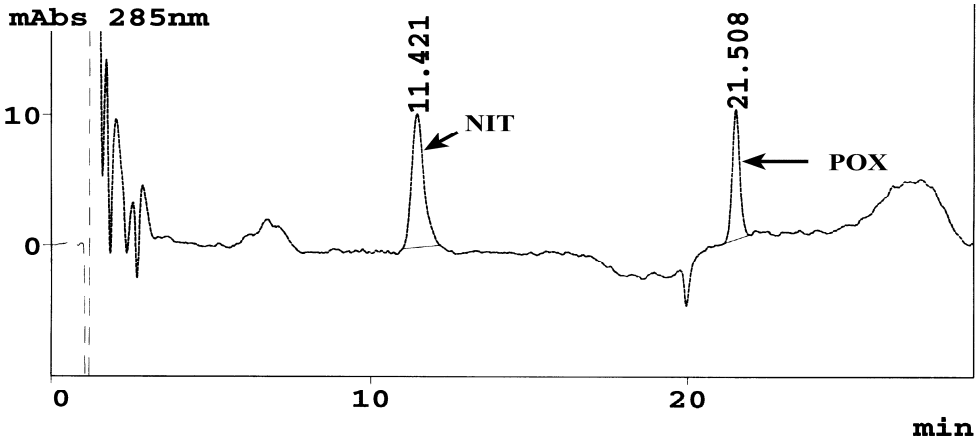


Abbildung 3-7 HPLC-Chromatogramm (Methode B). Durch nicht-enzymatischen Zerfall von POX-ethyl entsteht Obidoxim-Mononitril (NIT). Der Zerfall wurde in 50 mM TRIS-Puffer / 1 mM Ca^{2+}/pH 7,4/37 °C bestimmt.

Um Obidoxim gleichzeitig darzustellen, wurde einer äquivalenten Probe eine auf die Nitril-Konzentration abgestimmte Menge an Obidoxim hinzugefügt und erneut chromatographiert („spiked“, s. Abbildung 3-8).

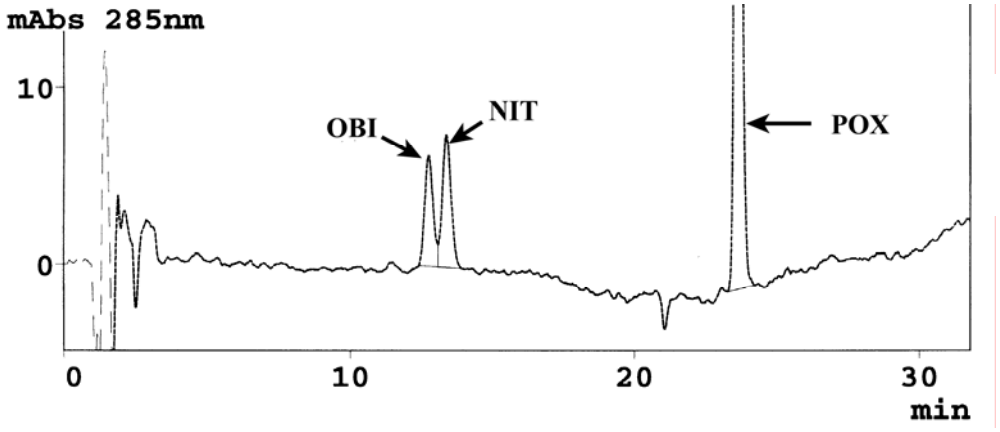


Abbildung 3-8 HPLC-Chromatogramm (Methode B). Ansatz analog zu dem in Abbildung 3-7, es wurde Obidoxim (OBI) hinzugefügt, um die chromatographische Trennung von Obidoxim-Mononitril (NIT) darzustellen. Die Versuche wurden in 50 mM TRIS-Puffer/1 mM Ca^{2+}/pH 7,4/37 °C durchgeführt.

Eine 100%ige Trennung konnte nicht erreicht werden. Dennoch war der Nachweis, ob und in welchem Verhältnis die genannten Substanzen bei der enzymatischen Hydrolyse entstehen, während eines Messlaufes möglich, s. Abbildung 3-9.

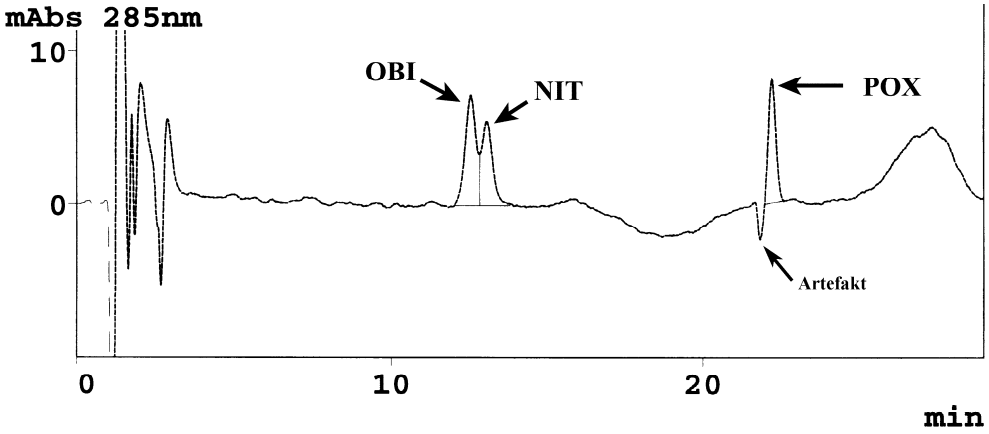


Abbildung 3-9 HPLC-Chromatogramm (Methode B) einer enzymatische POX-Hydrolyse durchgeführt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4/37 °C. In diesem Fall entsteht neben Obidoxim auch relativ viel Obidoxim-Mononitril, da hier die Temperatur des Ansatzes 37 °C betrug und das eingesetzte Enzym dem weniger aktiven $PON1_{192R}$-Typ entsprach.

Abbildung 3-10 zeigt zwei gemessenen Reaktionskinetiken für die enzymatische Hydrolyse von POX-ethyl durch beide homozygoten $PON1_{Q192R}$-Phänotypen, unter Anwendung der beschriebenen Methode.

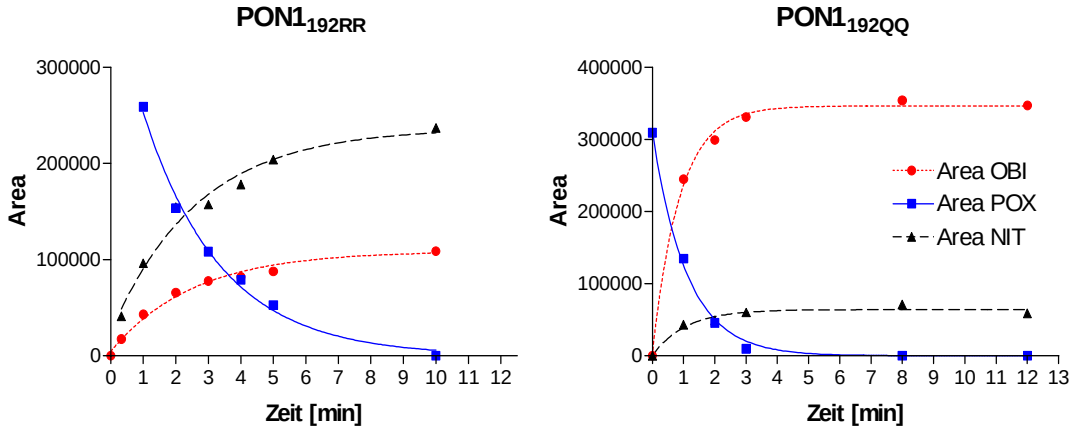


Abbildung 3-10 Bestimmung der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit von ca. 8µM POX-ethyl (■, POX) zu Obidoxim (●, OBI) in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/ pH 7,4 bei 37 °C sowie der Zerfallsgeschwindigkeit zu Obidoxim-Mononitril (▲, NIT) durch HPLC-Analyse (Wellenlänge 285 nm). Folgende Exponentialfunktion wurde an die zunehmenden Konzentrationen von NIT und OBI angepasst: $Area=Area_{max} \times (1-e^{-k \times t})$. **$PON1_{192RR}$** (Verdünnung 1:2): Man konnte eine deutliche Bildung von NIT durch nicht-enzymatischen Zerfall von POX-ethyl beobachten. Die enzymatische Hydrolyse von POX-ethyl zu OBI verläuft in diesem Fall sehr langsam. **$PON1_{192QQ}$** (Verdünnung 1:20): In diesem Fall konnte eine deutlich schnellere Bildung von OBI und eine geringe Bildung von NIT beobachtet werden. Später wurde die Temperatur auf 20 °C abgesenkt, um den Zerfall von POX zu NIT zu verlangsamen.

Auch für den enzymatischen Umsatz von POX-methyl für alle $PON1_{Q192R}$-Typen und POX-propyl für die Typen 192QQ/QR ließ sich Obidoxim als Produkt nachweisen. Als elegantes Maß für Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität weiterer Plasmaproben, erwies sich die Verfolgung der POX-Abnahme (s. 3.6.2).

3.6.2 Die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der enzymatischen POX-Hydrolyse als Maß für die POX-Hydrolase-Aktivität

Aufgrund der technischen Gegebenheiten und der hohen Toxizität von POX war es nicht möglich, POX in beliebig hoher Konzentration herzustellen und einzusetzen. Somit waren Messungen der Enzymaktivität bei Bedingungen der Substratsättigung nicht durchführbar. Vielmehr ist anzunehmen, dass sich die Substratkonzentration [POX] von 6-8 µM in einem Bereich weit unter der Michaelis-Menten-Konstante K_m befand. Man bewegt sich somit in einer Region der Geschwindigkeits-Substrat-Kurve, in der die Reaktionsgeschwindigkeit der Substratkonzentration direkt proportional ist. Hier liegt eine Kinetik erster Ordnung vor, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit abnimmt und bei $t \rightarrow \infty$ Null anstrebt. Die Kurve der POX-Abnahme (und dem daraus geformten Produkt) gegenüber der

Zeit folgt einer exponentiellen Gesetzmäßigkeit, wobei k_{el} die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion erster Ordnung repräsentiert, s. Gleichung 3-1 (Segel 1975).

$$[\mathrm{POX}]_t = [\mathrm{POX}]_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t}$$

Gleichung 3-1 Substratabnahme gegenüber der Zeit bei einer Kinetik 1. Ordnung (POX_t = POX-Konzentration zum Zeitpunkt t; POX_0 = POX-Anfangskonzentration; Plateau wurde bei Regressionsanalysen als konstant Null gesetzt).

Die Geschwindigkeitskonstante k_{el} setzt sich aus den beiden parallel ablaufenden Prozessen des nicht-enzymatischen Zerfalls k_h und der enzymatischen Hydrolyse k_e zusammen, s. Schema 3-1.

Schema 3-1 Zerfall und enzymatische Hydrolyse von Phosphoryloxim [POX] ([NIT] = Obidoxim-Mononitril, [OX] = Oxim, [P] = Dialkylphosphat).

Um nun die Geschwindigkeitskonstante k_e für die enzymatische Hydrolyse von POX zu berechnen, wurde die Geschwindigkeitskonstante k_h für den nicht-enzymatischen POX-Zerfall zu Obidoxim-Mononitril bestimmt (Abbildung 3-11, Tabelle 3-3) und von der Geschwindigkeitskonstanten der POX-Elimination k_{el} abgezogen:

$$k_e = k_{el} - k_h$$

Die Geschwindigkeit der Abnahme der POX Konzentration durch enzymatisch katalysierte Hydrolyse, die in k_e zum Ausdruck kommt, wurde schließlich als Maß für die Enzymaktivität herangezogen. Die errechneten Werte für k_e wurden um die Verdünnung des Plasmas korrigiert.

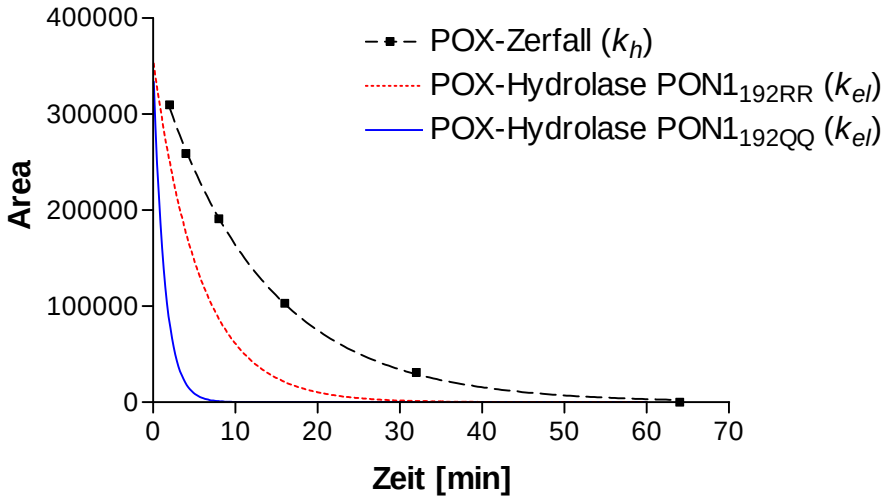


Abbildung 3-11 Kinetik des nicht-enzymatischen POX-ethyl-Zerfalls und der enzymatischen POX-ethyl-Hydrolyse bei 20 °C in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4; 5% MeOH (v/v) aufgrund der HPLC-Isolierung. (■) Nicht-enzymatischer POX-Zerfall k_h = 0,079 min^{-1}, POX-Abbau einer Probe des Phänotyps (---) PON1$_{192RR}$ k_{el} = 0,18 min^{-1} (Verdünnung 1:2) bzw. (–) PON1$_{192QQ}$ k_{el} = 0,73 min^{-1} (Verdünnung 1:20), die Kurven wurden anhand gemittelter k_{el} Werte berechnet.

Tabelle 3-3 Geschwindigkeitskonstanten des spontanen POX-Zerfalls in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+} /pH 7,4 bei 20 °C, Methanolanteil < 5 ‰. (Dreifachbestimmung)

POX-Verbindung	**k_h [min^{-1}]**	**t½ [min]**
POX-methyl	0,12; 0,11 (n=2)	6,3
POX-ethyl	0,088 ± 0,01 (n=3) (0,079 bei 5% MeOH)	7,9 (8,8 bei 5 % MeOH)
POX-propyl	0,070 ± 0,004 (n=3)	9,9

Da die Verfolgung der POX-Konzentration für die Ermittlung der Enzymaktivität ausreichend war, wurde auf die Bestimmung von entstandenem Obidoxim bzw. Obidoxim-Mononitril verzichtet und das HPLC-Programm so angepasst, dass allein die Abnahme des POX-Peaks optimal verfolgt werden konnte (HPLC-Methoden C).

3.6.3 Einfluss von Temperatur und pH Wert auf die POX-Hydrolase-Aktivität und auf den nicht-enzymatischen POX-Zerfall

Die Stabilität der POX-Verbindungen ist stark abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert der Lösung. Um die Reaktionsbedingungen optimieren zu können, wurde anhand der Plasmaprobe eines Individuums des Typs PON1$_{192QR}$ der Einfluss der Temperatur (Abbildung 3-12) und des pH-Wertes (Abbildung 3-13) auf den nicht-enzymatischen Zerfall und die enzymatische Hydrolyse von POX experimentell überprüft. Die Daten zur Temperaturabhängigkeit wurden nach Arrhenius ausgewertet, s. Anhang Gleichung 6-1.

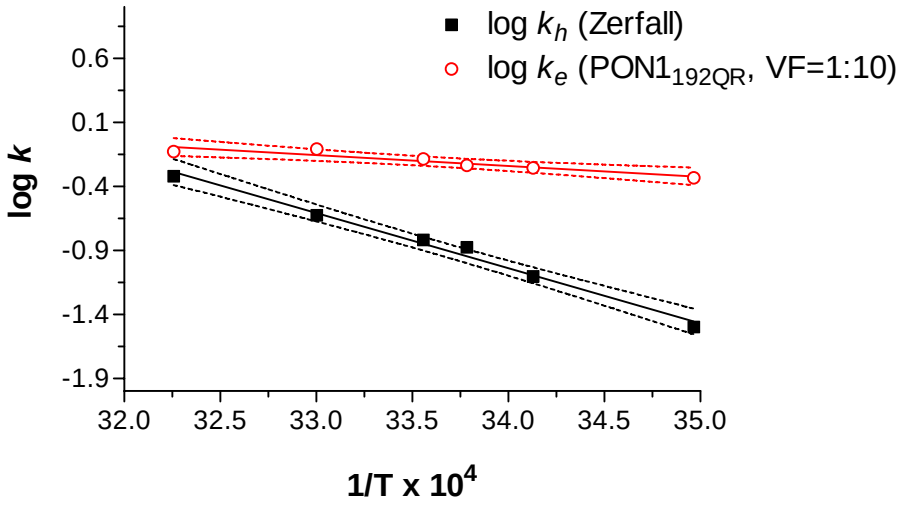


Abbildung 3-12 Arrhenius-Diagramm der enzymatisch katalysierten Hydrolyse (k_e ○) sowie des nicht-enzymatischen Zerfalls (k_h■) von POX-ethyl. Aktivitäten bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/ 0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4. Steigung (k_h ■) = -4312 ± 227, Steigung (k_e ○) = -847 ± 156, die unterbrochenen Linien geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Für die enzymatische Hydrolyse ergab sich eine Aktivierungsenergie E_a von 16,2 kJ/mol (3,9 kcal/mol) und für den nicht-enzymatischen Zerfall eine E_a von 82,5 kJ/mol (19,7 kcal/mol), vgl. Kiderlen (2005). Der nicht-enzymatische Zerfall von POX-ethyl zeigte eine stärkere Abhängigkeit von der Temperatur als die enzymatische Hydrolyse. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die *Temperatur des Reaktionsansatzes zur Messung der POX-Hydrolase-Aktivität auf 20 °C eingestellt*, um ein besseres Signal-Rauschverhältnis für die Enzymaktivitätsbestimmung zu erreichen.

Beim Einfluss des pH-Wertes drehte sich die Sensitivität um. Es zeigte sich ein größerer Einfluss auf die enzymatisch katalysierte Reaktion als auf den nicht-enzymatischen Zerfall, s. Abbildung 3-13.

In Gegenwart von 100 µM Obidoxim bzw. TMB-4 konnte bei ansonsten identischen Reaktionsbedingungen (pH 7,4 und 20 °C, s. 2.4.1.7) keine Beschleunigung des nicht-enzymatischen Zerfalls (k_h) von POX-ethyl beobachtet werden.

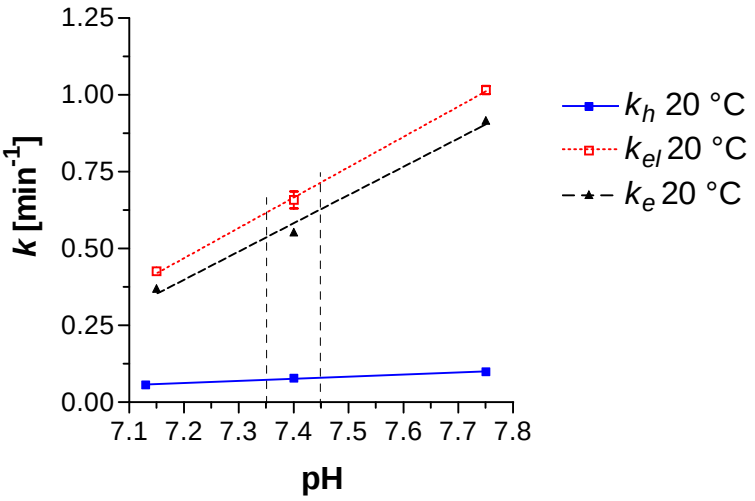


Abbildung 3-13 Abhängigkeit der enzymatischen POX-Hydrolyse k_e (▲) bzw. der nicht-enzymatischen Zerfallsgeschwindigkeit k_h (■) vom pH-Wert, bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}, bei 20 °C. Das eingesetzte Plasma ($PON1_{192QR}$) wurde 1:10 in Puffer verdünnt. Ermittlung der Steigung $k_h = 0.07 \pm 0.005$, $k_e = 0.92 \pm 0.08$ per linearer Regressionsanalyse. Die senkrechten Geraden zeigen das Intervall von pH 7,35 bis 7,45 an, welches bei den Aktivitätsbestimmungen eingehalten wurde.

3.6.4 Einfluss von EDTA auf die POX-Hydrolase-Aktivität der PON1

Um zu zeigen, dass die POX-Hydrolase-Aktivität unter den Messbedingungen durch Inaktivierung der PON1 nicht mehr vorhanden ist, wurde ein Ansatz mit einer Endkonzentration von 2 mM EDTA ohne Zugabe von Ca^{2+} gemessen. Die restlichen Bedingungen wurden, wie im Methodenteil für die POX-Hydrolase-Aktivität beschrieben, eingehalten (die PON1 ist ein Ca^{2+}-abhängiges Enzym (Erdös und Boggs 1961)). *Es ergab sich ein Wert von k_{el} = 0,07 min^{-1}, dieser entsprach praktisch der Geschwindigkeit k_h = 0,078 min^{-1} des nicht-enzymatischen Zerfalls*. Nach Inaktivierung der PON1 war somit keine POX-Hydrolase-Aktivität mehr vorhanden.

3.6.5 POX-Hydrolase-Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Die polymorphen $PON1_{Q192R}$-Typen zeigten große Unterschiede in ihrer POX-Hydrolase-Aktivität. POX konnte, aus Gründen der Verfügbarkeit und Toxizität, nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden. Plasmaproben mit hoher Aktivität ($PON1_{192QQ/QR}$) mussten verdünnt werden, da ansonsten die Reaktion zu schnell ablief. Proben des Typs $PON1_{192RR}$ hingegen zeigten eine so geringe Aktivität, dass sie nur in konzentrierter Form verwendet werden konnten. Aus diesem Grund wurde anhand einer Plasmaprobe ($PON1_{192QR}$) überprüft, ob die Enzymaktivität dem Verdünnungsgrad direkt proportional ist. Wie die

Abbildung 3-14 zeigt, konnte man von einer linearen Beziehung ausgehen. Unterschiedlich Verdünnungen der PON1 konnten so, nach Korrektur um den entsprechenden Faktor miteinander verglichen werden.

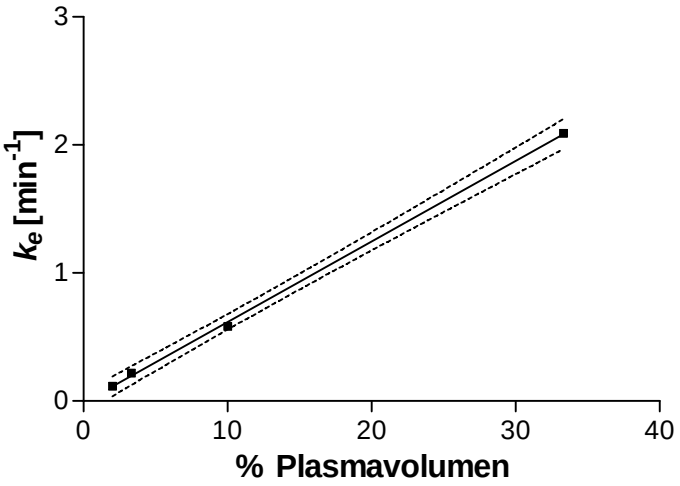


Abbildung 3-14 Abhängigkeit der POX-Hydrolase-Aktivität (k_e) von der Enzymkonzentration ($PON1_{192QR}$), bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C; unterbrochene Linie gibt das 95 % Konfidenzintervall an; die Gerade wurde durch lineare Regressionsanalyse bestimmt.

3.6.6 Einfluss von Methanol auf die PON1

Die Methode der Isolierung unterschiedlicher POX-Verbindungen per HPLC brachte es mit sich, dass aufgrund verschiedener Retentionszeiten der POX-Verbindungen, die POX-Stammlösungen einen abwechselnden Gehalt an Methanol aufwiesen (POX-methyl ca. 2,5 %, POX-ethyl ca. 10 %, POX-isopropyl ca. 36 % MeOH). Durch Kontrolle des HPLC-Gradienten mit einer Farbstofflösung sowie durch die enzymatische Methode mit der ADH, konnte die Methanol-Konzentration ermittelt werden. Im Folgenden wurde der Einfluss der MeOH-Konzentration auf die PXase- und POX-Hydrolase-Aktivität untersucht, s. Abbildung 3-15.

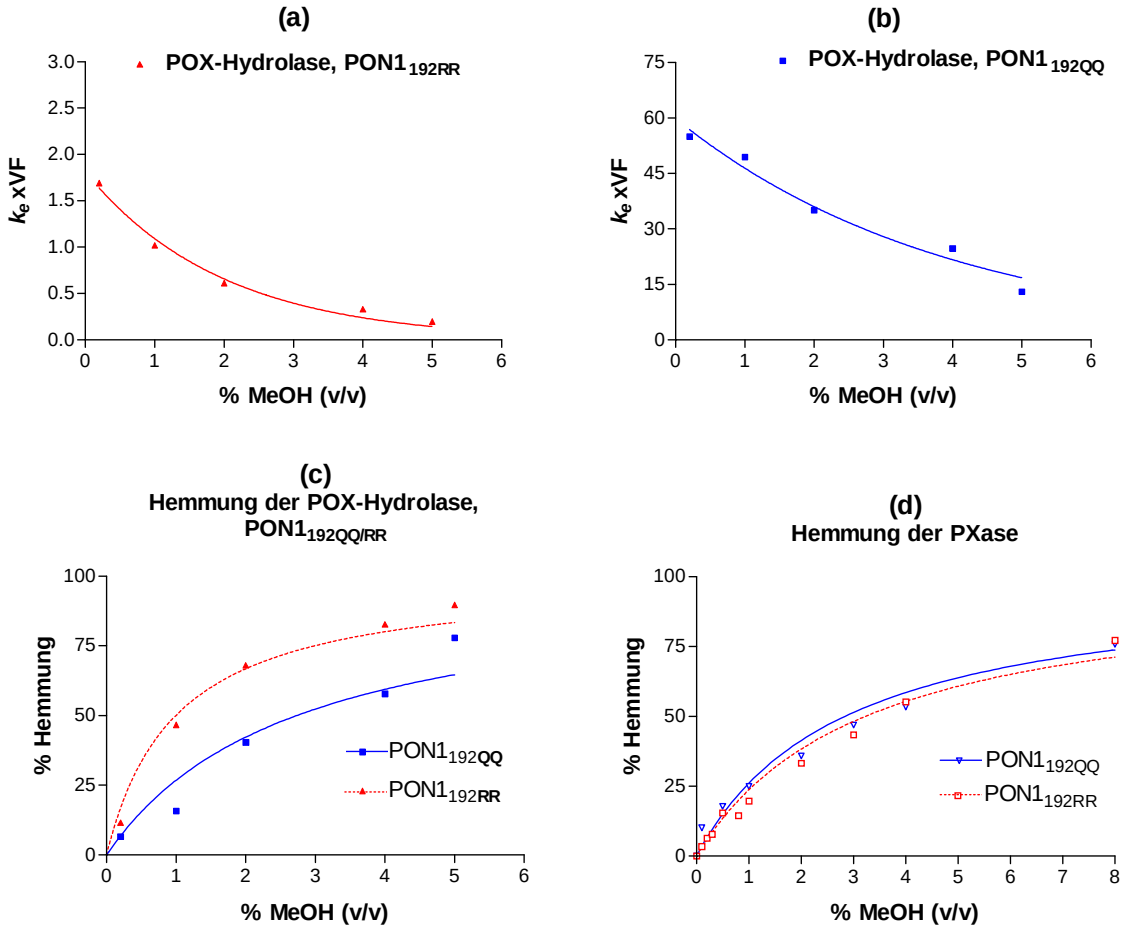


Abbildung 3-15 Einfluss der Methanol-Konzentration auf die POX-Hydrolase- (a-c) und auf die PXase-Aktivität (d) der $PON1_{192QQ\ bzw.\ RR}$. Die POX-Hydrolase wurde in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C, die PXase bei 37 °C (s. 2.4.1.2) bestimmt. Die monophasischen Exponentialfunktionen der Diagramme (a) und (b) wurden auf die Ordinate extrapoliert und als ungehemmte POX-Hydrolase-Aktivität angenommen. Daraus wurde die prozentuale Hemmung der POX-Hydrolase berechnet (c). An die Datenpunkte in (c) und (d) wurde eine Hyperbelfunktion angepasst ($Y=Y_{max}*X/KD+X$), wobei Y_{max} gleich 100 % gesetzt wurde.

Schon eine MeOH-Konzentration von 1 % verursachte eine deutliche Hemmung der PXase- sowie POX-Hydrolase. Im Gegensatz zur PXase-Aktivität zeigte sich bei der POX-Hydrolase-Aktivität ein Unterschied im Hemmverhalten durch MeOH zwischen den Typen $PON1_{192QQ}$ und $PON1_{192RR}$. Für 5 % MeOH ergab sich eine Hemmung der POX-Hydrolase von 75 % für den 192QQ-Typ, eine 50%ige Hemmung (IC_{50}) zeigte er bei 2,7 % MeOH. Diese lag in der Größenordnung der IC_{50} für die Hemmung PXase beider untersuchten Phänotypen (IC_{50} 192QQ: 2,8 %; 192RR: 3,2 %). Die POX-Hydrolase-Aktivität des 192RR-Typs wurde bei 5 % MeOH zu 89 % gehemmt und es ergab sich hier eine IC_{50} von 1 % MeOH. Der stark hemmende Einfluss von Methanol wurde allerdings erst bei Bestimmung der POX-propyl-Hydrolase-Aktivität erkannt. Die POX-ethyl-Hydrolase-Aktivitäten von 15 Plasmaproben

waren zu diesem Zeitpunkt schon bei einem MeOH Gehalt von 5 % untersucht worden. Durch Korrektur mit einem Faktor von 4 für den 192QQ-Typ bzw. 9 für 192RR-Typ, lässt sich auf die ungehemmte Aktivität rückrechnen.

3.7 Einfluss des PON1$_{Q192R}$-Polymorphismus auf die POX-Hydrolase-Aktivität

Die Geschwindigkeit der POX-ethyl Hydrolyse wurde bei 15 Plasmaproben unterschiedlichen PON1$_{Q192R}$-Phänotyps ermittelt, hier war allerdings eine Menge von 5 % MeOH im Ansatz vorhanden. Für alle untersuchten POX-Verbindungen wurde weiterhin die POX-Hydrolyse-Aktivität bei einem MeOH-Gehalt von unter 5 ‰ mit jeweils einem Stellvertreter der PON1$_{Q192R}$-Phänotypen gemessen, s. Tabelle 3-4.

Tabelle 3-4 POX-Hydrolase-Aktivitäten k_e jeweils eines Vertreters der drei PON1$_{Q192R}$-Phänotypen für POX-methyl,-ethyl und –propyl bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C und bei einem **MeOH-Anteil unter 5 ‰**. Die Enzymaktivität wurde auf unverdünntes Plasma bezogen (k_e x VF). Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens 2 Bestimmungen. [a]Bei 5 % MeOH-Anteil, [b]PXase-Aktivität s. Tabelle 3-5.

Probe	PON1$_{Q192R}$-Phänotyp	Substrat	k_e x VF [min^{-1}]	[b] PXase [U/L] / k_e x VF
1	192RR	POX-methyl	0,12	21667
7	192QR		6,8	192
11	192QQ		9,6	30
1	192RR	POX-ethyl	1,7 [a](0,20)	1530
7	192QR		41 [a](11,08)	32
11	192QQ		55 [a](13,03)	6
1	192RR	POX-propyl	0	-
7	192QR		0,32	4063
11	192QQ		0,13	2154

Der 192RR-Typ zeigte für alle POX-Verbindungen eine um ein Vielfaches geringere Aktivität, als die Typen 192QR bzw. 192QQ. POX-propyl schien er gar nicht umzusetzen, denn es konnte kein Unterschied zur spontanen Zerfallsgeschwindigkeit ermittelt werden. POX-ethyl erwies sich als das beste Substrat für die Typen 192QQ/QR, gefolgt von POX-methyl und mit deutlichem Abstand von POX-propyl. Auf dieses Ergebnis hatte auch die Anwesenheit von 5 % MeOH keinen Einfluss. Tabelle 3-5 zeigt die gemessenen POX-ethyl-Hydrolase-Aktivitäten k_e bei 5 % MeOH und die zugehörige DZOase- bzw. PXase-Aktivitäten der jeweiligen PON1$_{Q192R}$-Phänotypen.

Tabelle 3-5 POX-ethyl-Hydrolase-Aktivität k_e, Diazoxonase- (DZOase) und PXase-Aktivitäten bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C **und 5 % MeOH**. Die Enzymaktivität wurde auf unverdünntes Plasma bezogen (k_e x VF). Angegeben sind die Mittelwerte aus mindestens 2 Bestimmungen. [a]Gereinigte $PON1_{192QQ}$ (Präparat von 10/2002).

Probe	$PON1_{Q192R}$-Phänotyp	k_e x VF [min^{-1}]	DZOase-Aktivität [kU/L]	PXase-Aktivität [kU/L]	DZOase [kU/L] / PXase [kU/L]	PXase [U/L] / k_e x VF
1	192RR	**0,20**	15,2	2,60	5,9	13000
2	192RR	**0,12**	7,8	1,30	6,0	10884
3	192RR	**0,06**	8,5	1,20	7,1	20000
4	192QR	**16,0**	20,1	1,60	12,6	100
5	192QR	**1,2**	3,6	0,27	13,4	225
6	192QR	**8,2**	15,1	0,94	16,1	115
7	192QR	**11**	21	1,30	16,2	118
8	192QR	**8,2**	11	0,61	18,1	75
[a]9	192QQ	**0,64**	2	0,06	33,4	93
10	192QQ	**18**	18,3	0,40	45,8	23
11	192QQ	**13,0**	13,8	0,28	49,3	22
12	192QQ	**12,6**	13,3	0,27	49,3	22
13	192QQ	**8,6**	10,7	0,20	53,5	23
14	192QQ	**13**	13,7	0,24	57,1	19
15	192QQ	**9,6**	11,8	0,20	59,0	21

Wie der Quotient DZOase-/PXase-Aktivität, zeigte auch der Quotient PXase-Aktivität/k_e für den jeweiligen Phänotyp einen charakteristischen Mittelwert. Zur besseren Anschaulichkeit wurde die PXase-Aktivität in diesem Fall in den Zähler gestellt, wobei sich mittlere Werte von 21 für 192QQ, 128 für 192QR und 14511 für 192RR ergaben (Probe 9 wurde aufgrund geringer Aktivität für die Berechnung der Durchschnittswerte ausgeschlossen).

Die Werte der POX-ethyl-Hydrolase-Aktivität k_e wurden in einem Koordinatensystem gegenüber der PXase-Aktivität aufgetragen (vgl. PON1-Status Abbildung 3-1). Eine Abbildung, mit Berücksichtigung einer Korrektur um den Grad der Hemmung durch MeOH, ist im Diskussionsteil zu finden (s. a. Abbildung 4-2). Es stellte sich eine signifikante Auftrennung der drei $PON1_{Q192R}$-Phänotypen dar, s. Abbildung 3-16.

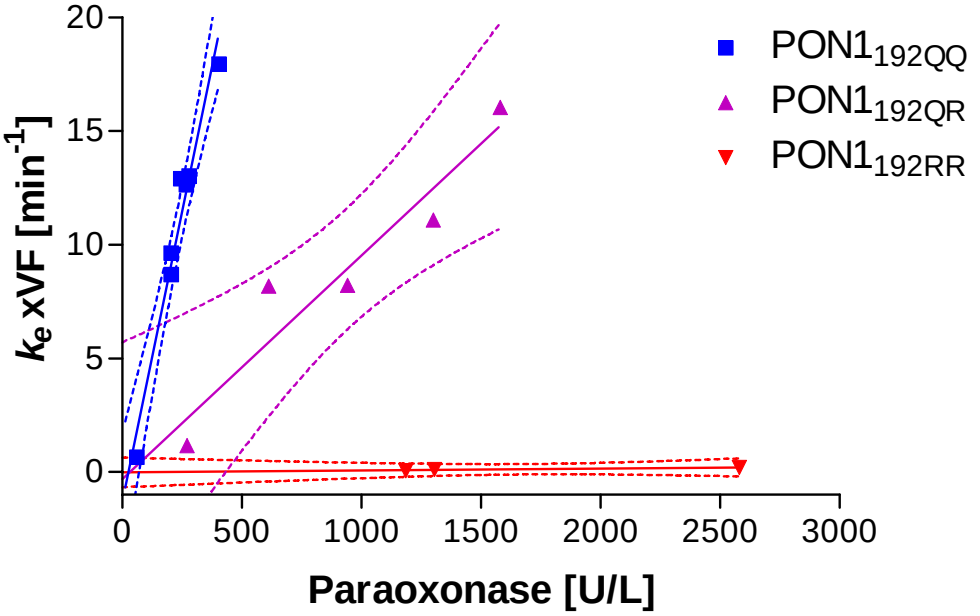


Abbildung 3-16 Verhältnis der POX-ethyl-Hydrolase-Aktivität k_e zur Paraoxonase-Aktivität. (k_e korrigiert um Verdünnungsfaktor; bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C und 5 % MeOH). In Analogie zum PON1-Status erhält man eine Auftrennung der PON1$_{Q192R}$-Phänotypen. Die unterbrochenen Linien zeigen die 95 % Konfidenzintervalle an. Die drei durch lineare Regression ermittelten Steigungen der Geraden unterscheiden sich signifikant.

4 DISKUSSION

4.1 Methodik und Ergebnisse

4.1.1 Phänotypisierung der Plasmaproben

Die Polymorphismen der PON1 (die wichtigsten sind Q192R, L55M, C-108T) können mit molekularbiologischen Methoden genau untersucht werden. Der Genotyp allein gibt jedoch wenig Aufschluss über die tatsächliche Konzentration der PON1 im Plasma. Die PON1-Aktivität kann bis zum 40-fachen in einer Population variieren, die Plasmakonzentration um das 13-fache innerhalb eines $PON1_{Q192R}$-Genotyps (Costa et al. 2005a). Die Messung der DZOase- und PXase-Aktivität ermöglicht es, sowohl die quantitative PON1-Ausstattung als auch den Polymorphismus an Position 192 zu untersuchen, welcher die katalytische Aktivität beeinflusst. Man hat diese Methode zur Bestimmung des „PON1-Status“ vorgeschlagen (Richter und Furlong 1999). Der PON1-Status hat sich beispielsweise für die Vorhersage von vaskulären Erkrankungen als aussagekräftiger erwiesen als die Bestimmung des $PON1_{Q192R}$-Genotyps allein (Jarvik et al. 2000). Vergleiche mit PCR-Analysen konnten zeigen, dass $PON1_{Q192R}$-Phänotypen, die aus dem enzymatischen Test abgeleitet wurden, auch den $PON1_{Q192R}$-Genotyp widerspiegeln. Bei wenigen Ausnahmen wurden Heterozygote als Homozygote eingestuft. Jedoch ergab die komplette Sequenzierung des PON1-Gens dieser Patienten Mutationen in einem Allel, die zur Folge haben, dass nur ein Alloenzym der $PON1_{Q192R}$ im Serum vorhanden war (Jarvik et al. 2003). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf die Genotypisierung der PON1-Allele verzichtet.

Die Bestimmung des PON1-Status nach Richter und Furlong (1999) ließ sich problemlos durchführen. Kleine Unstimmigkeiten traten beim Vergleich des publizierten Diazoxon-Spektrums mit dem hier ermittelten auf. Die von Richter et. al. zitierte Arbeit von Shishido (1972) bestätigt allerdings die hier vorgelegten Ergebnisse. Zu beachten ist, dass die eingesetzte Substratmenge bei der Messung der DZOase nahe dem K_m-Wert liegt. Ungenauigkeiten der Diazoxon-Konzentration können sich somit auf die Aktivität auswirken, daneben beginnt die Geschwindigkeit des Substratumsatzes schon früh abzunehmen. Sowohl bei der Bestimmung der DZOase-, als auch der PXase-Aktivitäten ergab sich ein Variationskoeffizient von 4 %.

4.1.2 Stabilität der Paraoxonase- und Diazoxonase-Aktivität in gefrorenem Plasma

Um auch ältere Plasmaproben hinsichtlich ihrer PON1-Aktivität mit in die Untersuchungen einbeziehen zu können, war die Frage nach der Stabilität der PON1 in Plasmaproben, welche über größere Zeiträume bei -20 °C gelagerten wurden, von Interesse. Es sollte geprüft werden, ob sich ein Unterschied in der Haltbarkeit der PON1-Aktivitäten gegenüber den unterschiedlichen Substraten zwischen den Phänotypen 192QQ, 192RR und 192QR zeigte. Hinsichtlich dieser Fragestellung sind nur wenige Informationen in der Literatur vorhanden, wobei Angaben zur Stabilität bei Lagerung unter Raumtemperatur, -70 °C (Mueller et al. 1983) und -20 °C (Brackley et al. 1983; Eckerson et al. 1983a) zu finden sind. Eine mögliche Einflussgröße stellt die intraindividuelle Variabilität der PON1 dar. Diese erreicht jedoch im Alter von 2 Jahren das Erwachsenenniveau und bleibt über Jahre konstant (Geldmacher-von Mallinckrodt und Diepgen 1988), falls es nicht durch Pharmaka, Krankheit oder Änderung des Lebensstils zu einer Beeinflussung kommt (Costa et al. 2005b).

Es zeigte sich, dass sich in Plasmaproben mit einem Lager-Alter (-20 °C) von bis zu 84 Monaten eindeutig eine Aktivität der PON1 gegenüber allen verwendeten Substraten messen ließ. Diese war verglichen mit den Werten von Eckerson (1983a) relativ hoch. Sie nahm gleichermaßen für alle Phänotypen (192QQ, 192RR und 192QR) kontinuierlich ab. Für den Quotienten DZOase/PXase konnte beim $PON1_{192RR}$-Phänotyp ein leichter, signifikanter Anstieg über die Zeit festgestellt werden, nicht jedoch beim $PON1_{192QQ}$-Typ. Das Verhältnis PXase/AEase änderte sich bei beiden Phänotypen hingegen nicht signifikant. Den Erhalt der charakteristischen Stimulierbarkeit der PXase durch NaCl bei Lagerung (-20 °C) hat bereits Eckerson (1983a) gezeigt. Das höchste Alter der Plasmaproben, zu denen in der Literatur Angaben gemacht werden, beträgt nur 45 ± 6 Monate (Brackley et al. 1983). Die ältesten hier untersuchten Proben hatten ein Alter von bis zu 84 Monaten. Vergleichswerte bei diesem Alter fehlten also. Unsicherheitsfaktoren bestanden auch darin, dass unsere Proben nicht ganz einheitlich behandelt wurden. Es war nicht bekannt, wie häufig die Proben jeweils aufgetaut wurden, daneben wurden manche mit Soman behandelt. Bei den Aktivitätsbestimmungen ließ sich jedoch kein Einfluss von Soman auf die PON1 bzw. deren Stabilität feststellen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass auch mit älteren Plasmaproben valide Aussagen bezüglich der PON1 Phänotypen gemacht werden können.

Es wurde versucht mit den gewonnenen Daten zweier funktionell homozygoter Individuen 192QQ/192RR eine Halbwertszeit der PON1-Aktivität zu berechnen. Dabei wurde davon

ausgegangen, dass die Abnahme monoexponentiell erfolgt, bei $t \rightarrow \infty$ Null anstrebt, also keinen Plateauwert erreicht und für alle getesteten Substrate in gleicher Weise gilt. Um die Aussagekraft noch zu verbessern, wurden zusätzlich die Angaben von Eckerson (1983a) in die Berechnungen mit einbezogen. Dabei ergab sich eine Halbwertszeit von 115 Monaten bzw. 9,5 Jahren (s. a. Abbildung 3-3). Diese Halbwertszeit (bei -20 °C Lagerung) ist aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Proben, ihrer unterschiedlichen Behandlung und dem untersuchten Zeitraum von 0,6 Halbwertszeiten nur als Anhaltspunkt zu sehen.

4.1.3 Synthese und Isolierung von POX-ethyl, POX-methyl und POX-propyl

Die Synthese, Identifizierung und Charakterisierung von Phosphyloximen wird schon seit längerer Zeit untersucht. Unter anderem macht man sich eine direkte Reaktion der Oxime mit OP zunutze (Green und Saville 1956; Hackley et al. 1959; Portmann 1991; Becker et al. 1997; Leader et al. 1999). POX-ethyl und seine Abbauprodukte wurde von Kiderlen (2005) generiert, isoliert und massenspektrometrisch charakterisiert. Die Synthese konnte auf Anhieb reproduziert werden. POX-Verbindungen sind in wässriger Lösung bei saurem pH und niedrigen Temperaturen relativ stabil, wodurch Synthese und Lagerung möglich wird.

Nach demselben Verfahren wurde versucht, in einer direkten Reaktion aus Paraoxon-methyl bzw. DFP mit Obidoxim, Dimethylphosphoryl-Obidoxim (POX-methyl) bzw. Diisopropylphosphoryl-Obidoxim (POX-propyl) zu synthetisieren und zu isolieren. Aufgrund der identischen UV-Spektren von POX-ethyl und denen der neu gefundenen Substanzen, ihrer Fähigkeit, die AChE zu hemmen und der Freisetzung von Obidoxim als Produkt der Hydrolyse durch die $PON1_{192QQ/QR}$, konnte die Existenz von POX-methyl bzw. POX-propyl angenommen werden. Die minimalen Unterschiede der Spektren können durch unterschiedlichen Methanolgehalt oder geringe Unterschiede der pH-Werte verursacht worden sein. Die Ausbeute betrug für alle POX-Verbindungen ca. 1 % der OP-Konzentration, wenn man die Mengen in den aufgefangen und vereinigten HPLC-Fraktionen betrachtet. Um die Ausbeute bei der POX-ethyl- und POX-methyl-Synthese zu erhöhen, wären Diethylfluorophosphat bzw. Dimethylfluorophosphat als bessere Reaktionspartner denkbar, diese Substanzen waren aber nicht erhältlich. Nach Kiderlen (2004) zeigt Diethylchlorophosphat keine ausreichende Reaktivität gegenüber Obidoxim.

Mit zunehmender Länge der Alkylkette am Phosphatrest der POX-Verbindungen verlängerte sich ihre Retentionszeit. Infolgedessen war in den POX-Stammlösungen ein unterschiedlicher

MeOH-Gehalt vorhanden, der durch Abdampfen stark gesenkt werden konnte. Bei vollständiger Trocknung zerfielen die POX-Verbindungen zu einem großen Teil, wahrscheinlich zum Nitril. Um dies zu verhindern, wurde das Volumen nur deutlich reduziert.

4.1.4 Hemmung humaner AChE durch Phosphoryloxime und Organophosphor-Verbindungen

Bei der Reaktivierung von phosphorylierter AChE mit Oximen bestätigen viele Ergebnisse die Entstehung von Phosphoryloximen *in situ* (Wilson und Ginsburg 1955; Hackley et al. 1959; Schoene 1971; Nenner 1974; de Jong und Ceulen 1978; Harvey et al. 1986).

Schema 4-1 Reaktivierung von phosphorylierter AChE (k_r = Reaktivierungskonstante, k_i = Hemmkonstante, K_D = Dissoziationskonstante).

$$[EP] + [OX] \overset{K_D}{\rightleftharpoons} [EPOX] \overset{k_r}{\underset{k_i}{\rightleftharpoons}} [E] + [POX]$$

Die zitierten Methoden basieren auf Hemmungs- und Reaktivierungsversuchen von AChE. Der direkt Nachweis von POX während der Reaktivierung gestaltet sich schwierig, da die Konzentration an gebildetem POX äquimolar der eingesetzten Enzymkonzentration ist, sich also in der Regel im nano- bis picomolaren Bereich befindet (Schema 4-1). Luo (1999) konnte Ethoxymethyl-POX isolieren und per ^{31}P NMR-Spektrometrie nachweisen, welches bei Reaktivierung von MEPQ-gehemmter AChE mit Obidoxim bzw. TMB-4 entstanden ist. Um die Hemmung der AChE durch POX genauer untersuchen zu können, greift man zweckmäßigerweise auf synthetische POX-Verbindungen zurück (vgl. a. 4.1.3).

Bestimmungen von Hemmkonstanten unter Bedingungen pseudo-1. Ordnung setzen einen deutlichen Überschuss an stabilem Inhibitor gegenüber dem Enzym voraus. Bei einer AChE-Suspension mit einer Aktivität von 6 mU/ml konnte durch Titration mit POX-ethyl die Konzentration der AChE-Bindungstellen auf 16 nM abgeschätzt werden. Ein Vergleich des Normalwertes der AChE-Aktivität, bezogen auf die Hämoglobin (Hb)-Konzentration von ca. 600 mU/µmol Hb (Worek et al. 1999b), erlaubt Rückschlüsse auf die AChE-Konzentration im Vollblut. Nimmt man eine durchschnittliche Hb-Konzentration von 15 g/dl ≈ 9,3 µmol Fe/ml im Vollblut an, so ergibt sich daraus eine Normalaktivität von 5,58 U/ml. Zufälligerweise ist dieser Wert fast identisch mit der Aktivität der titrierten AChE-Suspension. Die Konzentration an AChE-Bindungstellen im Vollblut würde unter diesen Voraussetzungen in einem Bereich um 15 nM liegen. Zu beachten ist, dass durch Instabilität des Inhibitors ein Fehler in Richtung höherer Konzentrationen entstanden sein kann. Ein ähnliches Resultat von 13,7 nM AChE-

Bindungsstellen, für die Titration einer Membran-Suspension von 5 mU/ml mit Cyclosarin, erhielt auch Worek (1998; 2004b). Die genannten Ergebnisse stehen allerdings in deutlichem Widerspruch zu der Konzentration von 3 nM AChE im Vollblut, wie sie von Lockridge und Masson (2000) angeführt wird. An diesem Wert kamen Zweifel auf, als bei anfangs durchgeführten AChE-Hemmversuchen mit einer hämolysierten, verdünnten Erythrozyten-Suspension keine Vollständige Hemmung erreicht werden konnte und die Kinetik keinen Verlauf pseudo-1. Ordnung zeigte. Weitere Angaben zur AChE-Konzentration im Vollblut konnten in der verfügbaren Literatur nicht gefunden werden.

Da die Güte der Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an die Daten nicht immer optimal war und bei POX-methyl ein Plateauwert der Restaktivität von ca. 10 % erhalten blieb, stellte sich die Frage, welche Prozesse hier eine Rolle spielen könnten. Kinetische Modellrechnungen, in denen die Spontanreaktivierung ($t½ = 41$ min für DMP-AChE bei 37 °C (Worek et al. 1999a)) oder die Reaktivierung durch entstehendes Obidoxim unter quantitativen Aspekten mit berücksichtigt wurde, konnten das Plateau der Restaktivität nicht erklären (Eyer 2003a). Wobei die Überlegung diskutiert wurde, ob unter Umständen das zwar in sehr geringen Konzentrationen, dafür aber direkt im katalytischen Zentrum entstandene Obidoxim einen Einfluss auf die Hemmkinetik hatte. Die Hemmgeschwindigkeit und damit die Obidoxim-Freisetzung erreichte Geschwindigkeiten in der Größenordnung von Diffusions-kontrollierten Reaktionen, wodurch eine gleichmäßige Verteilung von Obidoxim verhindert werden könnte. Weiterhin in Frage kam eine nicht ausreichend Stabilität der POX-Verbindungen als ursächlicher Faktor. Anhand eines Algorithmus, der den spontanen POX-methyl-Zerfall, die Alterung und die Spontanreaktivierung der DMP-AChE mit berücksichtigt, wurde der dynamische Verlauf der AChE-Aktivität mit Hilfe des Programms Maple simuliert, s. Abbildung 4-1 und Anhang 6.2. Auch so ergab sich ein Plateau von nur 1,5 % Restaktivität. Die eingesetzten Geschwindigkeitskonstanten für die Spontan-reaktivierung und die Alterung wurden bei 37 °C bestimmt (Worek et al. 1999a). Bei 10 °C sind diese wohl niedriger anzusetzen, womit sie noch weniger ins Gewicht fallen würden. Für den spontanen Zerfall wurde die experimentell gefundene Konstante k_h (10 °C) eingesetzt (s. a. Tabelle 3-2).

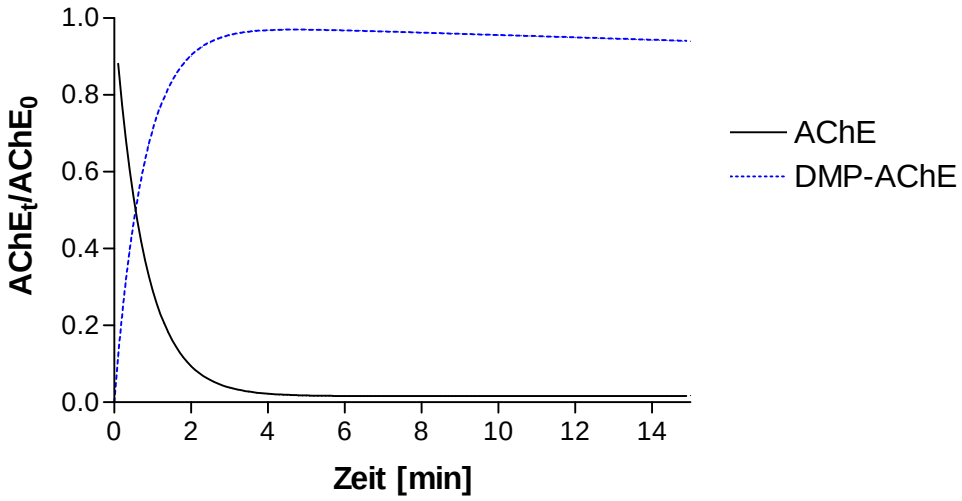


Abbildung 4-1 Simulation der Hemmkinetik humaner AChE durch POX-methyl (2 nM) unter Berücksichtigung der Alterung (k_a=0,0031 min^{-1}), Spontanreaktivierung (k_s=0,017 min^{-1}) bei 37 °C (Worek et al. 1999a) und des spontanen Zerfalls von POX-methyl (k_h=0,023 min^{-1}) mit Hilfe des Programms Maple. Die durchgezogene Linie zeigt die Fraktion des freien Enzyms (AChE), die unterbrochene die Fraktion des phosphorylierten Enzyms (DMP-AChE). Es ergab sich so ein Plateau von 1,5 % (Maple-Anweisungen s. Anhang 6.2).

Die ermittelten bimolekularen Hemmkonstanten k_i der POX-Verbindungen lagen in einer Größenordnung der stärksten bekannten Inhibitoren der AChE. Zu ihnen zählen, neben MEPQ und DEPQ (Levy und Ashani 1986) z.B. Nervenkampfstoffe und die davon abgeleiteten Phosphonyloxime, die sich aus direkten Reaktionen mit Oximen bzw. durch AChE-Reaktivierung ableiten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Hemmkonstanten für POX bei einer Temperatur von 10 °C ermittelt wurden, bei 37 ° lässt sich möglicherweise eine Steigerung um den Faktor 4 erwarten, wenn man die Messdaten von Cyclosarin zugrunde legt (Worek 2004b). Hemmkonstanten mit POX-ethyl, die bei Kiderlen (2005) zu finden sind, wurden in einer Lösung aus hämolysierten Erythrozyten bestimmt. Im Vergleich dazu sind die noch gesteigerten k_i Werte der Hemmversuche, die hier durchgeführt wurden, unter Umständen auf die Verwendung stark verdünnter AChE zurückzuführen. Überraschenderweise lag die k_i von POX-methyl höher als die von POX-ethyl. Aufgrund der höheren Hemmkonstanten von Paraoxon-ethyl im Vergleich zu Paraoxon-methyl, hätte man POX-methyl als den schwächeren Inhibitor der POX-Verbindungen vermuten können. POX-propyl erwies sich erwartungsgemäß als schwächeren Hemmstoff, wie auch das korrespondierende DFP in Gegenüberstellung mit den Paraoxon-Verbindungen eine geringere Hemmwirkung aufwies, begründbar mit sterischen Effekten der größeren Isopropylreste, s. a. Tabelle 3-2 und Tabelle 4-1 (Ordentlich et al. 1996; Mast 1997; Worek et al. 1999a).

Die Einführung von längeren Alkylketten bei Alkyl-Methyl-Phosphonyloximen zeigt im Vergleich dazu, außer beim Cyclohexylring, keine deutlichen Effekte auf k_i. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen, die mit kationischen aliphatischen OP ermittelt wurden (Hosea et al. 1995). Die hohe Reaktivität der POX-Verbindungen gegenüber der AChE erklärt man sich hauptsächlich durch Interaktionen zwischen den π-Elektronensystemen aromatischer Aminosäurereste der katalytischen „Schlucht“ der AChE, und zu einem geringeren Anteil durch die Azidität der Abgangsgruppe. Die positive Ladung, verteilt auf die große Oberfläche des planaren Pyridiniumrings, scheint einen effizienteren Kontakt mit den aromatischen Aminosäureresten im katalytischen Zentrum einzugehen (Ashani et al. 2003).

Phosphoryloxime, die aus 2-Pyridiniumaldoximen (2-POX) entstehen, sind instabiler als jene aus 4-Pyridiniumaldoximen (4-POX). Eine weitere Steigerung der Stabilität war bei einer meta-Stellung der phosphylierten Oximgruppe (3-POX) zu beobachten. Außerdem erwiesen sich die phospho**n**ylierten Oxime stabiler als die phospho**r**ylierten, s. Tabelle 4-1 (Hackley et al. 1959; de Jong und Ceulen 1978; Ashani et al. 2003). Bei AChE-Reaktivierungen mit Bildung von 2-POX-Verbindungen, wie unter Einsatz der Oxime 2-PAM, HLö7 und HI6, war im Wesentlichen keine Beeinträchtigung der Netto-Reaktivierung zu beobachten. Sie folgen, unabhängig von der AChE-Konzentration bzw. bei Abwesenheit von PON1, einem monoexponentiellen Verlauf (Worek 2004b).

Neuronale und erythrozytäre AChE wird durch das gleiche Gen kodiert und man kann davon ausgehen, dass das aktive Zentrum identisch ist. Nur die Quartärstrukturen und Arten der Membranbindung existieren in unterschiedlichen Erscheinungsformen. Dadurch lassen sich mit EryAChE experimentell gewonnene Ergebnisse auf die Verhältnisse an der Synapse übertragen, die für die klinische Situation ausschlaggebend sind (Taylor und Radic 1994; Massoulie et al. 1999; Eyer et al. 2000; Massoulie 2002; Thiermann et al. 2005).

Tabelle 4-1 Vergleich der Hemmkonstanten 2. Ordnung (k_i) und der Zerfallsgeschwindigkeit (t½) veschiedener POX-Derivate bzw. stark potenter Hemmstoffe der AChE. Die Phosphorylierung von Obidoxim durch Paraoxon-methyl, -ethyl und DFP ergab eine Steigerung der Toxizität im vgl. zum ursprünglichen OP um den Faktor 2250, 480 bzw. 600. MEPQ = 7-(O-Ethylmethylphosphinyloxy)-1-Methylquinoliniumiodid, DEP = Diethylphosphoryl, PAM = Pralidoxim, IMP = Isopropylmethyl-phosphonyl, EMP = Ethoxymethylphosphonyl, MoAChE = Maus-AChE, [a]Konzentrationsabhängig. (s.a. Hackley et al. 1959; Lamb et al. 1964; Nenner 1974)

Hemmstoff	**k_i [M^{-1} min^{-1}]**	**t½ Zerfall [min]**	**Bedingungen der AChE-Inhibition**	**Literatur**
Cyclosarin	1,22 x 10^8 4,89 x 10^8		10 °C, pH 7.4, humane AChE 37 °C, pH 7.4, humane AChE	Worek (2004b)
MEPQ	5,3 x 10^8 21 x 10^8	[a]54 - 416	25 °C, pH 7.0, Zitteraal-AChE 35 °C, pH 7.0, Zitteraal-AChE	Levy und Ashani (1986)
DEP-2-PAM	7,2 x 10^6	0,43	37 °C, pH 7.4, in Anwesenheit von Substrat	Harvey et al. (1986)
IMP-2-PAM IMP-Obidoxim	6,2 x 10^8 17 x 10^8	1,8 [a]36,5 – 57,8	25 °C, pH 7.5, in situ, bovine EryAChE	de Jong und Ceulen (1978)
EMP-Obidoxim EMP-TMB-4	130,0 x 10^8 91,2 x 10^8	71 (in PP) 133 (in PP)	? °C, pH 7.2, kontinuierliche Monitoringmethode, MoAChE	Luo et al. (1999)
DEP-2-PAM DEP-3-PAM DEP-4-PAM	2,1 x 10^8 1,6 x 10^5 6,0 x 10^6	0,18 139 16	29 °C, pH 7.8, rekombinante MoAChE	Ashani (2003)
POX-methyl POX-ethyl POX-propyl	6,3 x 10^8 2,65 x 10^8 12,0 x 10^6	53	10 °C, pH 7.4, humane AChE	hier bestimmt

4.1.5 Bestimmung der nicht-enzymatischen POX-Zerfallsgeschwindigkeit sowie der POX-Hydrolase-Aktivität und deren Abhängigkeit vom $PON1_{Q192R}$-Phänotyp

Große Mengen der POX-Verbindungen zu synthetisieren, war mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht durchführbar. Eine HPLC-gestützte Methodik bot sich aufgrund der geringen Volumina und Konzentrationen der gewonnenen POX-Stammlösungen an. Ein photometrisches Verfahren wäre außerdem durch die große Ähnlichkeit der UV-Spektren von POX und Obidoxim schwierig zu etablieren.

Man konnte annehmen, dass die eingesetzte POX-Konzentration von 6-8 µM weit unter der Michaelis-Konstante K_m lag. So liegt die K_m für die Hydrolyse von Paraoxon im Bereich von 0,50 mM für das Enzym niedriger PXase-Aktivität (Typ A entspricht $PON1_{192QQ}$), und 0,27 mM für das Enzym hoher Aktivität (Typ B entspricht $PON1_{192RR}$) (Smolen et al. 1991). Für Diazoxon liegen die K_m Werte bei 0,39 mM für die $PON1_{192QQ}$ und bei 0,20 mM für die $PON1_{192RR}$ (Richter und Furlong 1999). Bei Leader (1999) ist ein K_m-Wert von 0,78 mM für die Spaltung von DEP-4-PAM durch die PTE aus Pseudomonas sp. angegeben. An die unter diesen Bedingungen erwartete, exponentielle Abnahme der Substratkonzentration [POX]

konnte sehr gut eine monoexponentielle Funktion angepasst werden, um die Geschwindigkeitskonstante k_e zu erhalten (s. a. 3.6.2).

Die Trennung von Obidoxim und Obidoxim-Mononitril per HPLC gestaltete sich schwierig. Eine vollständige Trennung der Peaks konnte nicht erreicht werden, jedoch war sie ausreichend, um die Substanzen eindeutig zu identifizieren und relativ gut zu quantifizieren (vgl. Abbildung 3-8). Bei Einsatz von Plasmen mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität entstand beim Umsatz aller POX-Verbindungen so gut wie ausschließlich Obidoxim, bei Messungen mit Plasmen niedriger Aktivität kam es zur Bildung von Obidoxim-Mononitril, dessen Ausmaß in etwa dem von Obidoxim gleichkam. Dabei entsprach die umgesetzte Menge an POX der Summe der gebildeten Menge an Obidoxim und Obidoxim-Mononitril, soweit die Methodik eine Quantifizierung erlaubte. Als Extinktionskoeffizienten für POX-ethyl, -methyl, -propyl (s. a. Abbildung 3-4) und Obidoxim-Mononitril wurden die Werte von Kiderlen et al. (2005) verwendet. Wie schon im Ergebnisteil beschrieben, war die Messung aller drei Substanzen für die Bestimmung der POX-Hydrolase-Aktivität nicht erforderlich. Es reichte aus, die Abnahme der POX-Konzentration mit der isokratischen HPLC-Methode C zu verfolgen. Damit konnte der Nachweis von POX beschleunigt werden. Bei POX-methyl und POX-propyl beschränkte man sich auf den qualitativen Nachweis der Obidoximbildung durch PON1 und die Bestimmung der POX-Abnahme.

Einfluss von Temperatur, pH-Wert und Oximkonzentration

Bei pH 7,4 und 37 °C in 50 mM MOPS-Puffer ergab sich eine Zerfallsgeschwindigkeit k_h von 0,48 min^{-1} für POX-ethyl ($t_{½}$=1,44 min), die gelegentlich über der POX-Hydrolase-Aktivität der $PON1_{192QR}$ in verdünntem Plasma lag. Wie man aus dem Arrheniusplott (s. Abbildung 3-12) ersehen kann, war der Einfluss der Temperatur auf den Zerfall größer als auf die enzymatische Hydrolyse. Um die Störgröße k_h möglichst gering zu halten, wurde von physiologischen 37 °C abgewichen und die Temperatur der Aktivitätsmessung auf 20 °C festgelegt. Die folgende Tabelle 4-2 vergleicht die gemessen Aktivierungsenergien mit denen anderen Reaktionen, die der Literatur entnommen wurden.

Tabelle 4-2 Aktivierungsenergie der enzymatischen POX-Hydrolyse und des nicht-enzymatischen Zerfalls im Vergleich mit Werten aus der [a] Literatur. Für die meisten biologisch wichtigen und enzymatisch induzierten Vorgänge gilt, dass die Geschwindigkeit der unkatalysierten Reaktion unmessbar klein ist. Falls es jedoch möglich ist, ergeben sich selten Werte von E_a > 20 kcal/mol [a](Netter 1959).

Reaktion	Katalysator	E_a (kcal)
Nicht-enzymatischer POX-ethyl-Zerfall	OH^- Ionen	19,7 (82,5 kJ/mol)
Enzymatische POX-ethyl-Hydrolyse	$PON1_{192QR}$	3,9 (16,2 kJ/mol)
$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3$ [a]	Ø Karboanhydrase	23,1 8,9
Kaseinspaltung[a]	H^+-Ionen Trypsin	20,6 12
Äthylbutyratspaltung[a]	H^+ } Ionen	16,8
	OH^- } Ionen	10,2
	Pankreas-Lipase	4,5

Der bei Kiderlen et al. (2005) gefundene Wert für den spontanen Zerfall von POX-ethyl zum Mononitril (85 kJ/mol) liegt in der Größenordnung des hier gemessenen (82,5 kJ/mol), obgleich der pH von 7,1 dort niedriger und der eingesetzte Puffer (Ringerphosphat) nicht identisch war. Die Messung der Geschwindigkeitskonstanten der nicht-enzymatischen Hydrolyse von POX zu Obidoxim und damit der direkte Vergleich der beiden Reaktionen ist mit verfügbaren Methoden nicht möglich, da die spontane Bildung von Obidoxim ohne Enzymeinwirkung praktisch nicht stattfindet.

Bei der Messung der POX-Hydrolase-Aktivität war die Einhaltung eines konstanten pH-Wertes nicht ganz unproblematisch, da für den Ansatz der Aktivitätsbestimmung die POX-Lösung mit einem pH von ca. 4,5 und die Enzym-Lösung im Verhältnis 1:1 vereint wurden. Das Plasma sollte dabei nicht mit einem Puffer zu hoher Konzentration verdünnt bzw. dialysiert werden, um sich nicht zu stark von physiologischen Bedingungen zu entfernen. Die enzymatische Reaktion zeigte eine größere Abhängigkeit vom pH-Wert als die nicht-enzymatische. Im pH-Bereich zwischen 7,2 und 7,7 ließ sich der mögliche Fehler somit auf ein k_e-Zunahme von 0,092 min^{-1} pro 0,1 pH-Einheiten für die enzymatische Reaktion und 0,007 min^{-1} pro 0,1 pH-Einheiten für die nicht-enzymatische Reaktion abschätzen (s. a. Abbildung 3-13). Der nicht-enzymatische POX-Zerfall verläuft vermutlich in einer α,β-cis-Elimination, die weitgehend von der Azidität des Methin-Protons abhängig ist, s. a. Abbildung 1-7 (Hagedorn et al. 1969; Hagedorn et al. 1972).

Nach Berichten von Lamb (1965) und Blanch (1969) können Oximat-Ionen den Zerfall von POX-Verbindungen katalysieren. Es wurden zwei mögliche Reaktionsmechanismen in

Betracht gezogen: Erstens die schon beschriebene, basenkatalysierte α,β-cis-Eliminationsreaktion mit Nitrilbildung und zweitens ein nukleophiler Angriff auf das Phosphoratom mit dem Übergang der Alkylphosphatgruppe vom POX-Molekül auf das angreifende Oximat (Transoximierung). Das Produkt der zweiten Reaktion wäre erneut eine POX-Verbindung und somit wurde der Ablauf dieser Reaktion als unwahrscheinlich angesehen (Steinberg und Solomon 1966). Die angeführten Überlegungen sind wohl nur bei hohen Oxim-Konzentrationen, wie sie z.B. bei der POX-Synthese vorliegen, relevant. Im Bereich therapeutischer Oxim-Konzentrationen von 10 µM Obidoxim bzw. TMB-4 wurde bei pH 7,1 und 20 °C kein beschleunigter POX-Zerfall (6-8 µM) beobachtet (Kiderlen et al. 2005). Auch bei einer Erhöhung der Konzentration auf 100 µM Obidoxim bzw. TMB-4, mit identischer Konzentration von POX-ethyl bei pH 7,4 und 20 °C, war der POX-Zerfall nicht beschleunigt, s. a. 3.6.3. Bei Einsatz von TMB-4 wurde keine neu entstehende Verbindung durch HPLC Analyse nachgewiesen und somit eine Transoximierung ausgeschlossen.

Einfluss von EDTA auf die POX-Hydrolase

Es stellt sich die Frage, ob andere Plasmabestandteile als die PON1 für eine Bildung von Obidoxim aus POX in Frage kommen könnten. Dieses Problem wurde untersucht, indem man dem Reaktionsansatz kein Ca^{2+} zugesetzt hat. Stattdessen wurde EDTA zur Komplexierung des für die PON1-Aktivität unentbehrlichen Ca^{2+} zugesetzt (Erdös und Boggs 1961). Da der gemessene Konzentrationsabfall von POX dem der nicht-enzymatischen Zerfallsgeschwindigkeit entsprach, konnte man davon ausgehen, dass die PON1 vollständig inaktiviert wurde und die gemessene POX-Abnahme in diesem Fall nur durch nicht-enzymatischen Zerfall zustande kam. Sofern kein anderer Plasmabestandteil existiert, der POX abbaut und durch Kalziumentzug inaktiviert wird, kann wohl nur die PON1 für die POX-Hydrolase-Aktivität verantwortlich sein. Dies untermauert zusätzlich die starke Abhängigkeit der Hydrolyse vom $PON1_{Q192R}$-Phänotyp.

Einfluss von Methanol auf die POX-Hydrolase-Aktivität

Bei dem Versuch, die Aktivität der Hydrolyse von POX-propyl zu bestimmen, konnte zunächst keine Aktivität bei allen $PON1_{Q192R}$-Phänotypen festgestellt werden. Reaktivierungsversuche von DFP-gehemmter EryAChE deuteten allerdings darauf hin, dass die PON1 in der Lage ist, auch POX-propyl zu spalten (Kiderlen et al. 2000). Um sich dem Problem anzunähern, wurde zunächst die Wirkung von MeOH auf die Hydrolyse von Paraoxon untersucht. Es stellte sich heraus, dass Methanol schon in geringen Konzentrationen

die PXase-Aktivität reduzierte. Bei der Isolierung von POX-propyl ergab sich aufgrund der höheren Lipophilie ein Methanolanteil der POX-Stammlösung von 36 %. Im Reaktionsansatz zur Bestimmung der POX-propyl-Hydrolase-Aktivität war somit 18 % MeOH vorhanden, bei dieser MeOH Konzentration war auch die PXase fast vollständig gehemmt. Im Hemmverhalten der PON1 ergaben sich keine Unterschiede zwischen den drei $PON1_{Q192R}$-Phänotypen ($IC_{50} \approx 3$ %). Die Einwirkung von MeOH auf die AEase (IC_{50} 4 %) (Debord et al. 1998) sowie auf die Spaltung von Chlorpyrifos ($IC_{50} \approx 5$ %) (Furlong et al. 1989) verhält sich ähnlich. Für die POX-Hydrolase-Aktivitäten der beiden homozygoten Phänotypen unter MeOH-Einfluss ergaben sich allerdings Abweichungen. Der 192RR-Typ wurde stärker gehemmt als der 192QQ-Typ. Hier könnten möglicherweise die unterschiedlichen Plasmakonzentration (konzentriert bei 192RR, verdünnt bei 192QQ) die größere Rolle gespielt haben, als dass die katalytische Aktivität der beiden Phänotypen spezifisch beeinflusst wurde. Um die POX-Hydrolase-Aktivität möglichst unabhängig vom Methanoleinfluss zu bestimmen, wurde sein Anteil durch Abdampfen auf unter 5 ‰ gesenkt (s. a. 3.3). Unabhängig davon hatte ein Gehalt von 5 % MeOH keinen relevanten Einfluss auf den Quotienten der POX-Hydrolase-/PXase-Aktivität.

Abhängigkeit der POX-Hydrolase-Aktivität vom $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus

Der katalytische Mechanismus der PON1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Prinzipiell stellen viele Stoffe aus der Gruppe der Phosphotriester, Ester und Lactone Substrate für sie dar, weshalb man sie auch als „promiskuitives“ Enzym bezeichnet (Aharoni et al. 2005). Neuere Untersuchungen konnten die Struktur einer rekombinanten PON1 aufklären und vertreten die Hypothese, dass sie in ihrer ursprünglichen Funktion eine Lactonase sei. Studien mit Inhibitoren wie DFP oder 2-Hydroxychinolon lassen darauf schließen, dass alle Substrate durch dasselbe aktive Zentrum gespaltet werden. Der Arginin bzw. Glutamin Rest der Aminosäure an Position 192 scheint nicht direkt an der Katalyse mitzuwirken, befindet sich aber nahe am katalytischen Zentrum. Ähnlich wie bei der AChE könnten verschiedene Arten der Wechselwirkung (Positionierung, Bindungen) im katalytischen Zentrum für das unterschiedliche Verhalten gegenüber den Substraten verantwortlich sein (Harel et al. 2004; Khersonsky und Tawfik 2005; Yeung et al. 2005).

Einen Einfluss des Q192R-Polymorphismus auf die katalytische Aktivität kann man, neben Paraoxon, für die Substrate Diazoxon, Soman und Sarin nachweisen (Davies et al. 1996). Chlorpyrifos wird durch das 192R-Alloenzym etwas schneller gespalten (Furlong et al. 1989). Die Differenzierung kann bei hohen NaCl Konzentrationen durch unterschiedliche

Stimulation der $PON1_{Q192R}$ noch deutlicher werden (Eckerson et al. 1983a; Richter und Furlong 1999). Mit der PXase-Aktivität korreliert ist die Hydrolyse von Lipolactonen (Gaidukov et al. 2006) bzw. Homocystein-Thiolacton (Lacinski et al. 2004). Als Begründung dafür wird unter anderem die Stabilität der Bindung an das HDL Partikel angeführt, die beim 192QQ-Typ geringer ist als beim 192RR-Typ. Struktur-Funktions-Beziehungen, die eine Begründung für den Effekt des Q192R-Polymorphismus liefern, konnten in der zugänglichen Literatur nicht gefunden werden. Vergleicht man die zweidimensionalen Aktivitätsdiagramme, so zeigt Sarinase/PXase die größte Analogie mit der POX-Hydrolase/PXase (Davies et al. 1996).

POX-ethyl scheint das beste Substrat für die PON1 unter den untersuchten POX-Verbindungen zu sein (POX-ethyl > POX-methyl > POX-propyl). Hinweise darauf gaben schon vergleichende Reaktivierungsversuche bei An- bzw. Abwesenheit von Plasma mit Dimethyl-, Diethyl- bzw. Diisopropylphosphoryl-gehemmter EryAChE. Die Geschwindigkeit der Reaktivierung von DEP-EryAChE wurde durch Plasma am meisten beschleunigt (Kiderlen et al. 2000). Wie auch für die Fähigkeit zur Hemmung der AChE angenommen, verhindern wohl die sperrigen Isopropylreste eine schnelle Spaltung von POX-propyl durch die PON1 (Briseno-Roa et al. 2006).

Der 192RR-Typ zeigte eine um 24- bis 80-fach geringere Aktivität als die 192QR/QQ-Typen bei den Substraten POX-methyl bzw. -ethyl. POX-propyl scheint durch $PON1_{192RR}$ nicht gespalten zu werden, s. Tabelle 4-3. Somit unterscheidet der Quotient aus PXase-/POX-Hydrolase-Aktivität besonders trennscharf die $PON1_{Q192R}$-Phänotypen. Die geringe Aktivität des 192RR-Typs könnte auf Wechselwirkungen zwischen der bei physiologischem pH protonierten Guanidinogruppe des Argininrestes und dem positiv geladenen Pyridiniumringen beruhen.

Tabelle 4-3 Verhältnis der POX-Hydrolase-Aktivitäten (k_e x VF) der $PON1_{Q192R}$-Phänotypen bei einem MeOH-Anteil < 5 ‰.

Substrat	**Verhältnis der Aktivitäten (k_e x VF)**	
	192QR/192RR	**192QQ/192RR**
POX-methyl	57	80
POX-ethyl	24 (55 bei 5 % MeOH)	32 (65 bei 5 % MeOH)
POX-propyl	-	-

Wenn man, entsprechend dem Grad der Hemmung durch Methanol, die k_e-Werte korrigiert, veränderte dies nichts an der relativen katalytischen Aktivität und damit an der Auftrennung der Gruppen (Korrekturfaktoren s. 3.6.6 und Abbildung 4-2).

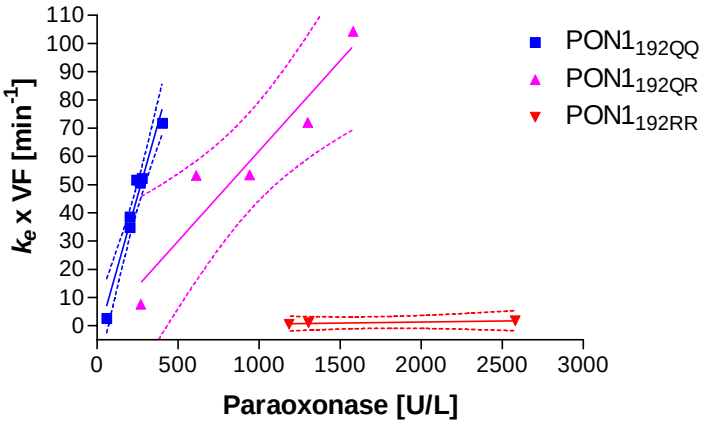


Abbildung 4-2 Verhältnis der POX-ethyl-Hydrolase- (k_e x VF) zur Paraoxonase-Aktivität. Die k_e Werte wurden um den Grad der Hemmung durch MeOH korrigiert (Korrekturfaktoren: 4 für 192QQ, 9 für 192RR, für 192QR wurde ein Mittelwert zwischen 192QQ und 192RR von 6,5 angenommen, da dieser Wert nicht bestimmt wurde, vgl. 3.6.6). Die Verteilung der Heterozygoten wies eine größere Streuung auf als die der Homozygoten. Dies wird mit der Tatsache erklärt, dass die jeweiligen Enzyme bei jedem Individuum unterschiedlich exprimiert werden (Brophy 2002). Die Regressionsgeraden wurden nicht durch den Ursprung gezwungen, schneiden ihn aber fast.

4.2 Bewertung der Ergebnisse im Hinblick auf die Obidoxim-Therapie der Organophosphorvergiftung

Wie Schema 4-1 zeigt, entsteht bei der Reaktivierung von OP-gehemmter AChE durch Oxime in äquimolarer Konzentration POX und freies Enzym. Die Rückreaktion, also die Reinhibierung durch POX, ist somit dem Quadrat der freien Enzymkonzentration proportional, vorausgesetzt das gebildete POX ist ausreichend stabil und weist eine ausreichende inhibitorische Potenz auf (Schoene 1971; de Jong und Ceulen 1978). Durch geringe AChE-Konzentrationen von 0,01-0,1 nM bei Reaktivierungsversuchen in-vitro (Worek et al. 1999b) und Abwesenheit von POX-abbauenden Enzymen fällt diese nicht so sehr ins Gewicht, anders als bei physiologischen Konzentrationen von 3 nM (Lockridge und Masson 2000) bis zu 15 nM (s. 4.1.4) im Vollblut. Hier beobachtet man die einleitend beschriebene Abweichung von einer Reaktivierungskinetik pseudo-erster Ordnung. Sobald die Reinhibierungsrate die Reaktivierungsrate erreicht, steigt die Netto-Reaktivierung nicht weiter an, es sei denn POX zerfällt. Durch Zugabe von Plasma mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität oder z.B. PTE kann man wieder eine Kinetik erster Ordnung registrieren (Ashani et al. 1998; Leader et al. 1999; Kiderlen et al. 2000; Kiderlen et al. 2005). Die vorhandene Menge an AChE in der Synapse ist wohl deutlich höher anzusetzen. Für die Muskelendplatte der Maus wird eine AChE-Dichte von 2500 aktiven Zentren pro µm^2 angegeben (Anglister 1998), bei einem Abstand der prä- von der postsynaptischen Membran von bis zu 50 nm (Koelle 1963)

könnte hier bei einmaliger Reaktivierung eine POX-Konzentration von 80 µM im synaptischen Spalt entstehen.

> *In einem Volumen von 0,05 μm^3 = 0,05 x 10^{-15} L (0,05 µm x 1μm^2) befinden sich 2500 aktive Zentren der AChE. Ein Liter enthält demnach 50 x 10^{18} aktive Zentren. Durch Dividieren durch die Avogadro-Konstante (6,23 x 10^{23}) ergibt sich ein Stoffmenge von 80 µmol (membrangebundener) AChE pro Liter Lösungsraum des synaptischen Spalts. Bei einmaliger Reaktivierung der phosphylierten AChE könnten hier lokal 80 µM POX entstehen.*

Der Einfluss der POX-Verbindungen auf die Reaktivierungsleistung scheint nur bei den 4-Oximen wie Obidoxim oder TMB-4 bedeutsam zu sein. Bei Substanzen mit Oximgruppe in Stellung 2 wie Pralidoxim, HLö 7 (besitzt zusätzlich eine Oximgruppe in 4-Stellung) und HI 6 entstehen wohl keine POX-Verbindungen mit nennenswerter Stabilität (Kiderlen et al. 2000; Ashani et al. 2003; Eyer 2003a).

Unter diesen Voraussetzungen kann man annehmen, dass die Obidoxim-Therapie von Dimethyl- bzw. Diethyl-Organophosphorvergiftungen effektiver sei, wenn ein PON1-Typ mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität anwesend ist. In einer Studie über die Therapie von Parathionvergiftungen ergaben sich dafür Anhaltspunkte. Zum einen wurde die EryAChE-Reaktivierung in-vivo, mit der Reaktivierbarkeit einer Probe desselben Patienten bei hohen Oxim-Konzentrationen in-vitro verglichen. Zum anderen wurden im Blut in-vivo ermittelte Plasma-Paraoxon-Konzentrationen jenen gegenübergestellt, die anhand eines kinetischen Modells errechnete wurden (Eyer 2003a). Bei einem Patienten mit niedriger POX-Hydrolase-Aktivität ergab sich eine höhere Reaktivierbarkeit in-vitro als in-vivo gemessen wurde. Außerdem war die errechnete Paraoxon-Konzentration deutlich höher, als die im Blut bestimmte (Eyer et al. 2006). Eine Begründung dafür könnte unter Umständen die Akkumulation von POX darstellen. Bei einem Vergiftungsfall eines Patienten mit hoher POX-Hydrolase-Aktivität stimmte die in-vitro Reaktivierbarkeit mit der in-vivo Reaktivierung, und die berechnete mit der im Blut gefundenen Paraoxon-Konzentration sehr gut überein. Dieser Fall trat deutlich öfter auf, übereinstimmend mit der Häufigkeit der einzelnen $PON1_{Q192R}$-Typen (Eyer 2003a; Kiderlen et al. 2005; Eyer et al. 2007).

Die Allelfrequenzen der $PON1_{Q192R}$ unterscheiden sich in verschiedenen Regionen und Bevölkerungsgruppen. In der kaukasischen Bevölkerung kommt der $PON1_{192RR}$-Typ relativ selten vor (< 10 %, bei Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts). Deutlich häufiger ist er dagegen in Zentralafrika und im asiatischen Raum (La Du 1992; Brophy 2002). Dennoch profitieren auch Vergiftungsfälle, die den 192RR-Typ exprimieren von der Obidoxim-Therapie, erkennbar an der EryAChE-Reaktivierung in-vivo dieser Fälle (Eyer 2003a).

Die Verteilung der AChE im Körper ist ein weiterer Diskussionspunkt. Sie ist im Körpergewebe in Clustern, besonders im post-synaptisch Bereich angereichert (Massoulie et al. 1993). So könnten hier höhere POX-Konzentrationen entstehen. Im extrahepatischen Gewebe ist aber höchstwahrscheinlich keine PON1 anzutreffen, da sie nur in der Leber synthetisiert und an HDL gebunden ins Blut sezerniert wird. Allerdings könnte durch Diffusion der POX-Verbindungen von der Synapse in das Kapillarbett ein dort befindliches 192Q-Alloenzym positiven Einfluss auf die Effektivität der 4-Pyridinium-Oxime haben.

Im Blut fungiert PON1 indes als katalytischer Bioscavenger. Das Konzept des Scavenger in Zusammenhang mit OP-Vergiftungen wurde im Rahmen der Forschung an Nervenkampfstoffen entwickelt. Darunter versteht man die i.v. Gabe von Enzymen (z.B. BChE) oder Antikörpern, welche das OP im Blut inaktivieren, bevor es seinen Wirkort erreicht. Man unterscheidet stöchimetrische, d.h. ein Scavengermolekül reagiert nur einmal mit einem OP-Molekül, von katalytischen Scavengern, die OP hydrolysieren und folglich in viel geringerer Dosierung benötigt werden. Als dritte pseudo-katalytische Variante besteht die Möglichkeit einer Kombination von ChE und einem potenten Oxim, das durch Reaktivierung die ChE kontinuierlich wieder zur Verfügung stellt. Neben der PON1 sind bakterielle Organophosphat-Hydrolasen (OPH) wie PTE aus Pseudomonas diminuta oder Organophosphorus Acid Anhydrase aus Alteromonas sp. bekannt, die Paraoxon-ethyl oder DFP deutlich schneller spalten als die PON1. Für die PTE konnte auch die Fähigkeit zur Hydrolyse von DEP-4-PAM nachgewiesen werden (Leader et al. 1999). Inzwischen versucht man durch gezielte Mutagenese der BChE, AChE, PON1 oder der bakteriellen Enzyme, Mutanten zu erzeugen und rekombinant zu exprimieren, die eine lange Plasmahalbwertszeit, sowie eine hohe Stabilität und katalytische Aktivität besitzen und möglicherweise einmal als Scavenger eingesetzt werden können (Rochu et al. 2007).

Denkbar ist, dass der Effekt der PON1 einen Anstieg der Acetylcholin-Konzentration im Blut verhindert, in dem sie dazu beiträgt, dass ein pseudo-katalytisches System aus AChE und Oxim nicht durch die Akkumulation von POX gestört wird. Eventuell ist ein Anstieg des Acetylcholin-Gehaltes im Blut über Stimulation von endothelständigen, muskarinergen Rezeptoren für die Hypotonie bei Organophosphorvergiftungen mit verantwortlich (Buckley et al. 1994; Lamping et al. 2004).

Vielleicht kann in zukünftigen klinischen Studien gezeigt werden, dass der $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus einen relevanten Einfluss auf die Effektivität der Obidoxim-Therapie hat. In diesem Fall wäre die einfache Bestimmung des PON1-Status im Rahmen einer Intoxikation

sinnvoll. So könnte anhand der pharmakogenetischen Ausstattung des Patienten eine rationale Entscheidung für die Auswahl eines geeigneten Oxims getroffen werden. Bei Vorliegen des $PON1_{192RR}$-Phänotyps wäre zu überlegen, statt Obidoxim das zwar weniger potente, in diesem Fall aber wahrscheinlich wirksamere Pralidoxim einzusetzen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Organophosphor-Verbindungen (OP) vermögen die Acetylcholinesterase (AChE) durch Phosphylierung zu hemmen und werden als Insektizide oder Nervenkampfstoffe eingesetzt. Ihr weltweiter Einsatz führt zu einer großen Zahl an akzidentellen und suizidalen Vergiftungen. Bei der Therapie der Organophosphorvergiftung kommen, neben der Erhaltung der Vitalfunktionen und einer symptomatischen Therapie mit Atropin, als spezifisches Antidot Oxime zum Einsatz.

Die Bedeutung der Oxime in der Therapie der Organophosphorvergiftung ist noch immer ein kontroverses Diskussionsthema. In manchen Berichten wird sogar ihr Nutzen generell in Frage gestellt. Um ihre Bewertung auf eine rationalere Basis zu stellen, wurden soweit wie möglich, die ablaufenden molekularen Mechanismen individuell für jedes OP in-vitro untersucht. Die Ergebnisse lieferten die Basis für die Entwicklung neuer Dosiervorschläge, in denen höhere und über einen längeren Zeitraum aufrechtzuerhaltene Plasmaspiegel empfohlen werden. Schon früh wurde auf die mögliche Entstehung von hochtoxischen Phosphyloximen (POX) bei der Reaktivierung OP-gehemmter AChE durch Oxime hingewiesen. Der Nachweis und die Synthese bestimmter POX-Verbindungen gelang erst einige Zeit später. Es stellte sich heraus, dass sie um ein Vielfaches potentere Hemmstoffe der AChE sind als das ursprüngliche OP. Die POX-Derivate der Pyridinium-4-Aldoxime, wie Obidoxim, erwiesen sich als so stabil, dass eine Akkumulation die Effektivität der Oximtherapie beeinflussen könnte. In humanem und tierischem Plasma konnte die Paraoxonase 1 (PON1) als POX-hydrolysierendes Enzym identifiziert werden. Die humane PON1 zeigt verschiedene Polymorphismen. Einer davon für Arginin(R)/Glutamin(Q) an Position 192 befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums und beeinflusst entscheidend die Substrat-Spezifität des Enzyms. Es ergaben sich Hinweise, dass auch die POX-Hydrolase-Aktivität eine Abhängigkeit vom $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus zeigt. Mit welcher $PON1_{Q192R}$ ein Patient ausgestattet ist, könnte somit ein pharmakogenetisch wichtiger Parameter für die Obidoxim-Therapie sein.

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Einfluss des $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus auf die Reaktivierung von OP-gehemmter AChE durch Obidoxim zu untersuchen. Dazu wurde von einigen menschlichen Spendern der $PON1_{Q192R}$-Phänotyp bestimmt. Es sollten weiterhin unterschiedliche Phosphorylobidoxim-Verbindungen synthetisiert werden und ihre inhibitorische Potenz gegenüber humaner AChE getestet werden. Um die POX-Hydrolase-

Aktivität der PON1 aller phänotypisierten Proben quantifizieren und bewerten zu können, war es notwendig, eine geeignete Methodik zu entwickeln die unter möglichst physiologischen Bedingungen arbeitet.

Nachdem die Plasmaproben erfolgreich phänotypisiert wurden, konnte in einer direkten Reaktion aus Obidoxim und den OP Paraoxon-methyl, -ethyl und Diisopropylfluorophosphat (DFP) die entsprechenden Dimethylphosphoryl-, Diethylphosphoryl- bzw. Diisopropyl-phosphoryl-Obidoxim-Verbindungen synthetisiert werden. Dimethylphosphoryl- und Diisopropylphosphoryl-Obidoxim sind in dieser Arbeit erstmals beschrieben. Die ermittelten bimolekularen Hemmkonstanten lagen im Bereich von 10^8 M^{-1} min^{-1} bei 10 °C und zeigten damit schon bei niedriger Temperatur eine inhibitorische Potenz in der Größenordnung der stärksten bekannten AChE-Hemmstoffe auf OP-Basis. Aufgrund der hohen Toxizität wurden nur geringe POX-Konzentrationen hergestellt und die Enzymaktivität der POX-Hydrolase unter Reaktionsbedingungen einer Kinetik erster Ordnung (Substratkonzentration << K_m) bei pH 7,4 / 20 °C gemessen (bei 37 °C war der POX-Zerfall zu schnell). Für den homozygoten $PON1_{192RR}$-Phänotyp konnte nur eine äußerst geringe Hydrolase-Aktivität gegenüber POX-ethyl bzw. POX-methyl nachgewiesen werden, mit POX-propyl als Substrat fehlte sie ganz. Die Aktivitäten der PON1-Typen 192QQ bzw. 192QR lagen in der Regel um ein Vielfaches höher. Somit ist die Selektivität der Alloenzyme 192Q und 192R für POX-ethyl bzw. -methyl als Substrat sehr viel höher als für Diazoxon, das für die Phänotypisierung gerne verwendet wird.

Die Wirksamkeit von Oximen wird weiterhin mit klarer Stratifizierung in randomisierten klinischen Studien geprüft. Man differenziert dabei genau nach den pharmakokinetischen und biochemischen Eigenschaften des involvierten OP, wie auch nach der Schwere und dem Verlauf der Vergiftung, anhand standardisierter Parameter. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der $PON1_{Q192R}$-Polymorphismus entscheidend die POX-Hydrolase-Aktivität bestimmt. Es wäre interessant, in zukünftigen klinischen Studien den $PON1_{Q192R}$-Status als weiteren Parameter mit zu berücksichtigen, um seinen Einfluss auf die Effektivität der Oximtherapie auch klinisch zu prüfen.

6 ANHANG

6.1 Arrhenius-Gleichung

Durch die Arrhenius-Gleichung wird die quantitative Beziehung zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Temperatur beschrieben:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Gleichung 6-1 E_a = Aktivierungsenergie, R = 8.314 J/(mol K), T = absolute Temperatur in Kelvin, A = Häufigkeitsfaktor der Teilchenkollisionen.

Durch Logarithmieren erhält man die lineare Form:

$$\log k = -\frac{E_a}{2{,}3R} \cdot \frac{1}{T} + \log A$$

Gleichung 6-2.

Aus der Steigung m = -E_a/2,3 x R dieser Gleichung lässt sich die Aktivierungsenergie E_a ermitteln (Segel 1975):

$$E_a = -\,2{,}3\,R \cdot \mathrm{m}$$

Gleichung 6-3

6.2 Simulation der Hemmkinetik von humaner AChE durch POX-methyl mit Hilfe des Programms Maple 9.0

Die exponentielle POX-Abnahme $\mathbf{[POX]_t} = \mathbf{[POX]_0} \cdot e^{-k_h \cdot t}$ wurde in nachstehende Differentialgleichungen integriert und diese für die Simulation zugrunde gelegt (Worek et al. 2005):

$$\frac{\mathbf{d[E]}}{\mathbf{dt}} = -k_i \cdot \mathbf{[POX]} \cdot \mathbf{[E](t)} + k_s \cdot \mathbf{[EP](t)},$$

$$\frac{\mathbf{d[EP]}}{\mathbf{dt}} = k_i \cdot \mathbf{[POX]} \cdot \mathbf{[EP](t)} - k_s \cdot \mathbf{[EP](t)} - k_a \cdot \mathbf{[EP](t)}$$

Gleichung 6-4 [POX] = POX-Konzentration zum Zeitpunkt t**;** $[E]_t$ = freie Enzymkonzentration und $[EP]_t$ = phosphoryliertes Enzym, jeweils zum Zeitpunkt t; k_i, k_s, k_a = Hemm-, spontane Reaktivierungs- und Alterungskonstante.

Folgende Maple-Anweisungen erlauben die Berechnung des dynamischen Verlaufs der AChE-Aktivität unter Anwendung der oben genannten Gleichungen:

```
> POX:=2; kh:=0.023; ks:=0.017; ka:=0.0031; ki:=0.63;
> sys :=
D(e)(t) = -ki*(POX*exp(-kh*t))*e(t)+ks*p(t),
D(p)(t) = ki*(POX*exp(-kh*t))*e(t)-ks*p(t)-ka*p(t);

> init_con:= e(0)=1, p(0)=0:
sol1 := dsolve ({sys, init_con},{e(t),p(t)}, numeric,
range=0..100);
```

6.3 Gemessene Enzymaktivitäten

Tabelle 6-1 POX-Hydrolase-Aktivitäten $k_e = k_{el}$-k_h und Zerfallsgeschwindigkeit für POX-methyl, -ethyl und -propyl jeweils eines Vertreters der drei $PON1_{Q192R}$-Phänotypen bei einem **MeOH-Anteil unter 5 ‰.** VF = Verdünnungsfaktor des Enzyms; Mittelwerte aus mindestens 2 Messungen.

Probe	$PON1_{Q192R}$	Substrat	k_h	VF	k_e [min^{-1}]	k_e x VF [min^{-1}]
1	192RR	POX-methyl	0,11	2	0,059	0,12
7	192QR			40	0,17	6,8
11	192QQ			40	0,24	9,6
1	192RR	POX-ethyl	0,088	4	0,42	1,7
7	192QR			60	0,69	41
11	192QQ			60	0,92	55
1	192RR	POX-propyl	0,070	2	0	0
7	192QR			2	0,16	0,32
11	192QQ			2	0,064	0,13

Tabelle 6-2 POX-ethyl-Hydrolase-Aktivität $k_e = k_{el}\text{-}k_h$ (k_h= 0,079 min^{-1}) bestimmt in 50 mM MOPS-Puffer/0,5 mM Ca^{2+}/pH 7,4 bei 20 °C und **5 % MeOH** (Mittelwerte aus mindestens 2 Messungen), Paraoxonase (PXase)- und Diazoxonase-Aktivität (DZOase). VF = Verdünnungsfaktor des Enzyms; [a]gereinigte $PON1_{192QQ}$ (bei den Messungen stand ein Präparat von 10/2002 zur Verfügung).

Probe	$PON1_{Q192R}$-Phänotyp	VF (POX-Hydrolase)	k_e [min^{-1}]	k_e x VF [min^{-1}]	PXase-Aktivität [kU/L]	DZOase-Aktivität [kU/L]
1	192RR	2	0,099	**0,20**	2,60	15,2
2	192RR	2	0,058	**0,12**	1,30	7,8
3	192RR	2	0,031	**0,06**	1,20	8,5
4	192QR	20	0,8	**16,0**	1,60	20,1
5	192QR	20	0,058	**1,2**	0,27	3,6
6	192QR	20	0,41	**8,2**	0,94	15,1
7	192QR	20	0,55	**11**	1,30	21
8	192QR	20	0,41	**8,2**	0,61	11
[a]9	192QQ	2	0,32	**0,64**	0,06	2
10	192QQ	20	0,9	**18**	0,40	18,3
11	192QQ	20	0,65	**13,0**	0,28	13,8
12	192QQ	20	0,63	**12,6**	0,27	13,3
13	192QQ	20	0,43	**8,6**	0,20	10,7
14	192QQ	20	0,65	**13**	0,24	13,7
15	192QQ	20	0,48	**9,6**	0,20	11,8

Tabelle 6-3 Lagerstabilität (-20 °C) der PON1. Paraoxonase- (PXase [U/L]), Diazoxonase- (DZOase [U/L]) und Arylesterase-Aktivitäten (AEase [U/mL]) wurden auf den Proteingehalt des Plasmas bezogen.

PON1-Phänotyp	Lagerdauer in Monaten	PXase / Protein [mg]	DZOase / Protein [mg]	DZOase / Protein [mg] / PXase / Protein [mg]	AEase / Protein [mg]	PXase / Protein [mg] / AEase / Protein [mg]
192RR	4,5	32	199	6,2	3,5	9,1
	11,9	34	209	6,1	3,4	9,9
	30,5	28	180	6,5	2,7	10,2
	42,7	25	161	6,5	2,4	10,4
	51,0	24	169	6,9	2,2	11,1
	81,2	23	162	6,9	2,4	9,9
	83,9	21	150	7,3	1,8	11,4
192QQ	0,4	3	182	55,6	2,1	1,6
	73,8	2	99	55,1	0,9	1,9
	76,5	2	107	55,3	1,0	1,9
	77,8	2	141	58,1	1,3	1,9
	80,4	2	117	55,1	1,2	1,8
	81,3	2	123	56,5	1,0	2,2

7 ABKÜRZUNGEN

AChE	Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7)
ADH	Alkoholdehydrogenase (EC 3.1.1.1)
AEase	Hydrolyse von Phenylacetat durch PON1 (Arylesterase, EC 3.1.1.2)
ASCh	Acetylthiocholin
BChE	Butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8)
ChE	Cholinesterase (3.1.1.8)
DAD	Diodenarraydetektor
DEP	Diethylphosphoryl
DEP-Obidoxim	Mono-Diethylphosphorylobidoxim
DEPQ	7-(O,O-Diethylphosphinyloxy)-1-Methylquinoliniummethylsulfat
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMP-/DEP-AChE	Dimethylphosphoryl-/Diethylphosphoryl-Acetylcholinesterase
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
DZO	Diazoxon
DZOase	Hydrolyse von Diazoxon durch PON1 (Diazoxonase)
E	Freies Enzym
Ery	Erythrozyten
EryAChE	Erythrozyten-Acetylcholinesterase
Hb	Hämoglobin
HDL	High-Density Lipoprotein
HI 6	1-[[[4-(Aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2-[(hydroxyimino) methyl]pyridinium-dichlorid-monohydrat
HLö7	1-[[[4-(Aminocarbonyl)pyridinio]methoxy]methyl]-2,4-bis [(hydroxyimino)methyl]pyridinium-dimethansulfonat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMHP	2-isopropyl-4-methyl-6-hydroxypyrimidin
KI	Konfidenzintervall
MeOH	Methanol
MEPQ	7-(O-Ethylmethylphosphinyloxy)-1-Methylquinoliniumiodid
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIT	Obidoxim-Mononitril
NTE	Neurotoxische Esterase
OBI	Obidoxim
OP	Organophosphor-Verbindung
OPH	Organophosphorus Hydrolase
OX	Oxim
PAM	2-Pralidoxim
PIC-A® low UV	Tetrabutylammonium-Phosphat (Ionenpaarreagenz)
PIC-B7®	1-Heptansulfonsaures Natrium (Ionenpaarreagenz)
PON, PON1	Paraoxonase, Humane Serum-Paraoxonase 1
POX	Phosphyloxim als Oberbegriff für Phosphoryl-, Phosphonyl- und Phosphinyloxim
POX-ethyl	Mono-Diethylphosphoryl-Obidoxim
POX-methyl	Mono-Dimethylphosphoryl-Obidoxim
POX-propyl	Mono-Diisopropylphosphoryl-Obidoxim
PP	Phosphatpuffer
PTE	Phosphotriesterase
PX	Paraoxon
PXase	Hydrolyse von Paraoxon durch PON1 (EC 3.1.8.1)
R_t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur

TCA	Trichloressigsäure
TMB-4	1,1’-Trimethylenbis-(4-(hydroxyiminomethyl)pyridinium Dibromid
TNB^-	5-thio-2-nitrobenzoat
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VF	Verdünnungsfaktor

8 LITERATUR

Adkins, S., Gan, K. N., Mody, M. und La Du, B. N. **(1993)**. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. Am J Hum Genet 52(3): 598-608.

Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., McQ Gould, S., Roodveldt, C. und Tawfik, D. S. **(2005)**. The 'evolvability' of promiscuous protein functions. Nat Genet 37(1): 73-6.

Aldridge, W. N. **(1950)**. Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. Biochem J 46(4): 451-60.

Aldridge, W. N. **(1953a)**. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J 53(1): 110-7.

Aldridge, W. N. **(1953b)**. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem J 53(1): 117-24.

Anglister, L. **(1998)**. Factors that determine AChE efficacy in synaptic function. In: Structure and function of cholinesterases and related proteins. B. P. Doctor, P. Taylor, D. M. Quinn, R. L. Rotundo und M. K. Gentry. New York and London, Plenum Press**:** 71-77.

Ashani, Y., Leader, H., Rothschild, N. und Dosoretz, C. **(1998)**. Combined effect of organophosphorus hydrolase and oxime on the reactivation rate of diethylphosphoryl-acetylcholinesterase conjugates. Biochem Pharmacol 55(2): 159-68.

Ashani, Y., Bhattacharjee, A. K., Leader, H., Saxena, A. und Doctor, B. P. **(2003)**. Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators. Biochem Pharmacol 66(2): 191-202.

Becker, G., Kawan, A. und Szinicz, L. **(1997)**. Direct reaction of oximes with sarin, soman, or tabun in vitro. Arch Toxicol 71(11): 714-8.

Berends, F., Posthumus, C. H., vd Sluys, I. und Deierkauf, F. A. **(1959)**. The chemical bassis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudocholinesterase. Biochim Biophys Acta 34: 567-8.

Bernt, E. und Gutmann, I. **(1970)**. Äthanol. Bestimmung mit Alkohol-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. II**:** 1457-1460.

Billecke, S., Draganov, D., Counsell, R., Stetson, P., Watson, C., Hsu, C. und La Du, B. N. **(2000)**. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab Dispos 28(11): 1335-42.

Blanch, J. H. **(1969)**. Stability of N-heterocyclic oxime derivatives. Part V. Kinetics of the reaction of 2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium iodide and isopropyl methylphosphonofluoridate in water at 15, 25 and 35³ and at pH 5.7–7.7. J Chem Soc (B): 1172-1178.

Brackley, M., Carro-Ciampi, G., Stewart, D. J., Lowden, J. A., Ray, A. K. und Kalow, W. **(1983)**. Stability of the paraoxonase phenotyping ratio in collections of human sera with differing storage times. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 41(1): 65-78.

Briseno-Roa, L., Hill, J., Notman, S., Sellers, D., Smith, A. P., Timperley, C. M., Wetherell, J., Williams, N. H., Williams, G. R., Fersht, A. R. und Griffiths, A. D. **(2006)**. Analogues

with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. J Med Chem 49(1): 246-55.

Brophy, V. H., Jampsa, R. L., Clendenning, J. B., McKinstry, L. A., Jarvik, G. P. und Furlong, C. E. **(2001)**. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. Am J Hum Genet 68(6): 1428-36.

Brophy, V. H. **(2002)**. PON1 Polymorphism. In: Paraoxonase (PON1) in health disease. C. E. Furlong. Boston, Kluwer Academic Publishers**:** 52-77.

Brown, S. K., Ames, R. G. und Mengle, D. C. **(1989)**. Occupational illnesses from cholinesterase-inhibiting pesticides among agricultural applicators in California, 1982-1985. Arch Environ Health 44(1): 34-9.

Buckley, N. A., Dawson, A. H. und Whyte, I. M. **(1994)**. Organophosphate poisoning: peripheral vascular resistance - a measure of adequate atropinization. Clin Toxicol 32(1): 61-68.

Costa, L. G. und Furlong, C. E., Eds. **(2002)**. Paraoxonase (PON1) in health and disease. Boston, Kluwer Academic Publishers.

Costa, L. G., Cole, T. B., Jarvik, G. P. und Furlong, C. E. **(2003)**. Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. Annu Rev Med 54: 371-92.

Costa, L. G., Cole, T. B., Vitalone, A. und Furlong, C. E. **(2005a)**. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. Clin Chim Acta 352(1-2): 37-47.

Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B. und Furlong, C. E. **(2005b)**. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol 69(4): 541-50.

Davies, H. G., Richter, R. J., Keifer, M., Broomfield, C. A., Sowalla, J. und Furlong, C. E. **(1996)**. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. Nat Genet 14(3): 334-6.

de Jong, L. P. und Ceulen, D. I. **(1978)**. Anticholinesterase activity and rate of decomposition of some phosphylated oximes. Biochem Pharmacol 27(6): 857-63.

de Silva, H. J., Wijewickrema, R. und Senanayake, N. **(1992)**. Does pralidoxime affect outcome of management in acute organophosphorus poisoning? Lancet 339(8802): 1136-8.

Debord, J., Dantoine, T., Bollinger, J. C., Abraham, M. H., Verneuil, B. und Merle, L. **(1998)**. Inhibition of arylesterase by aliphatic alcohols. Chem Biol Interact 113(2): 105-15.

Dodge, J. T., Mitchell, C. und Hanahan, D. J. **(1963)**. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 100: 119-30.

Draganov, D. I. und La Du, B. N. **(2004)**. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369(1): 78-88.

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R. und La Du, B. N. **(2005)**. Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. J Lipid Res 46(6): 1239-47.

Durrington, P. N., Mackness, B. und Mackness, M. I. **(2001)**. Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(4): 473-80.

Eckerson, H. W., Romson, J., Wyte, C. und La Du, B. N. **(1983a)**. The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. Am J Hum Genet 35(2): 214-27.

Eckerson, H. W., Wyte, C. M. und La Du, B. N. **(1983b)**. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. Am J Hum Genet 35(6): 1126-38.

Eddleston, M., Szinicz, L., Eyer, P. und Buckley, N. **(2002)**. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. Q J Med 95(5): 275-83.

Eddleston, M. und Phillips, M. R. **(2004)**. Self poisoning with pesticides. Brit Med J 328(7430): 42-4.

Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., von Meyer, L., Juszczak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Sheriff, M. H., Szinicz, L., Dawson, A. H. und Buckley, N. A. **(2005)**. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. Lancet 366(9495): 1452-9.

Eddleston, M., Haggalla, S., Reginald, K., Sudarshan, K., Senthilkumaran, M., Karalliedde, L., Ariaratnam, A., Rezvi Sheriff, M. H., Warrell, D. A. und Buckley, N. **(2007)**. The hazards of gastric lavage for intentional self-poisoning in a resource poor location. Clin Toxicol 45(2): 136-143.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. und Featherstone, R. M. **(1961)**. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 7: 88-95.

Erdös, E. G. und Boggs, L. E. **(1961)**. Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood. Nature 190: 716-7.

Eyer, F. und Eyer, P. **(1998)**. Enzyme-based assay for quantification of paraoxon in blood of parathion poisoned patients. Hum Exp Toxicol 17(12): 645-51.

Eyer, P. **(1995)**. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds--a review. Hum Exp Toxicol 14(11): 857-64.

Eyer, P. **(1996)**. Optimal oxime dosage regimen, a pharmacokinetic approach. In: Role of Oximes in the Treatment of Anticholinesterase Agent Poisoning. L. Szinicz, P. Eyer und R. Klimmek. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag**:** 33-51.

Eyer, P., Eyer, F., Felgenhauer, N., Haberkorn, M., Meischner, V., Thiermann, H., Worek, F. und Zilker, T. **(2000)**. Intensiviertes Monitoring des Cholinesterase-Status bei Organophosphatvergifteten Patienten. Zbl Arbeitsmedizin 50: 433.

Eyer, P. **(2003a)**. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. Toxicol Rev 22(3): 165-90.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V. und Reiner, E. **(2003b)**. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. Anal Biochem 312(2): 224-7.

Eyer, P., Kiderlen, D., Stenzel, J., Thiermann, H. und Worek, F. **(2006)**. Abstracts of the european association of poisons centres and clinical toxicologists XXVI international congress: 47. Paraoxonase polymorphism. A modifying factor that influences oxime effectiveness. Clin Toxicol 44(4): 440-441.

Eyer, P., Szinicz, L., Thiermann, H., Worek, F. und Zilker, T. **(2007)**. Testing of antidotes for organophosphorus compounds: Experimental procedures and clinical reality. Toxicology: im Druck.

Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L. und Motulsky, A. G. **(1988)**. Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. Am J Hum Genet 43(3): 230-8.

Furlong, C. E., Richter, R. J., Seidel, S. L., Costa, L. G. und Motulsky, A. G. **(1989)**. Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. Anal Biochem 180(2): 242-7.

Furlong, C. E., Cole, T. B., Jarvik, G. P. und Costa, L. G. **(2002)**. Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. Pharmacogenomics 3(3): 341-8.

Gaidukov, L., Rosenblat, M., Aviram, M. und Tawfik, D. S. **(2006)**. The 192R/Q polymorphs of serum paraoxonase PON1 differ in HDL binding, lipolactonase stimulation, and cholesterol efflux. J Lipid Res 47(11): 2492-502.

Gan, K. N., Smolen, A., Eckerson, H. W. und La Du, B. N. **(1991)**. Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab Dispos 19(1): 100-6.

Geldmacher, M., Lindorf, H. H., Petenyi, M., Flugel, M., Fischer, T. und Hiller, T. **(1973)**. [Letter: Comments in response to genetically determined polymorphism of human serum paraxonase (EC 3.1.1.2) (author's transl)]. Humangenetik 19(3): 353-6.

Geldmacher-von Mallinckrodt, M. und Diepgen, T., L. **(1988)**. The human serum paraoxonase-polymorphism and specifity. Toxicol Environ Chem 18: 79-196.

Green, A. L. und Saville, B. **(1956)**. The reaction of oximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin). J Chem Soc 3: 3887-92.

Hackley, B. J., Steinberg, G. und Lamb, J. **(1959)**. Formation of potent inhibitors of AChE by reaction of pyridinaldoximes with isopropyl methylphosphonofluoridate (GB). Arch Biochem Biophys 80: 211-4.

Hagedorn, I., Gündel, W. H. und Schoene, K. **(1969)**. [Reactivation of phosphorylated acetylcholine esterase with oximes: contribution to the study of the reaction course]. Arzneimittelforschung 19(4): 603-6.

Hagedorn, I., Stark, I. und Lorenz, H. P. **(1972)**. Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase--dependence upon activator acidity. Angew Chem Int Ed Engl 11(4): 307-9.

Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R. B., McCarthy, A., Toker, L., Silman, I., Sussman, J. L. und Tawfik, D. S. **(2004)**. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat Struct Mol Biol 11(5): 412-9.

Harvey, B., Scott, R. P., Sellers, D. J. und Watts, P. **(1986)**. In vitro studies on the reactivation by oximes of phosphylated acetylcholinesterase--I. On the reactions of P2S with various organophosphates and the properties of the resultant phosphylated oximes. Biochem Pharmacol 35(5): 737-44.

Hassett, C., Richter, R. J., Humbert, R., Chapline, C., Crabb, J. W., Omiecinski, C. J. und Furlong, C. E. **(1991)**. Characterization of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. Biochemistry 30(42): 10141-9.

Hay, A. und Roberts, G. **(1990)**. The use of poison gas against the Iraqi Kurds: analysis of bomb fragments, soil, and wool samples. J Am Med Assoc 263(8): 1065-6.

Hesse, M., Meier, H. und Zeeh, B. **(1987)**. Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Stuttgart, Thieme Verlag.

Hosea, N. A., Berman, H. A. und Taylor, P. **(1995)**. Specificity and orientation of trigonal carboxyl esters and tetrahedral alkylphosphonyl esters in cholinesterases. Biochemistry 34(36): 11528-36.

Innes, D. F., Fuller, B. H. und Berger, G. M. **(1990)**. Low serum cholinesterase levels in rural workers exposed to organophosphate pesticide sprays. S Afr Med J 78(10): 581-3.

Jarvik, G. P., Rozek, L. S., Brophy, V. H., Hatsukami, T. S., Richter, R. J., Schellenberg, G. D. und Furlong, C. E. **(2000)**. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1(192) or PON1(55) genotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol 20(11): 2441-7.

Jarvik, G. P., Jampsa, R., Richter, R. J., Carlson, C. S., Rieder, M. J., Nickerson, D. A. und Furlong, C. E. **(2003)**. Novel paraoxonase (PON1) nonsense and missense mutations predicted by functional genomic assay of PON1 status. Pharmacogenetics 13(5): 291-5.

Jeyaratnam, J. **(1990)**. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. World Health Stat Q 43(3): 139-44.

Johnson, M., Jacobsen, D., Meredith, T. und Eyer, P. **(2000)**. Evaluation of antidotes for poisoning by organophosphorus pesticides. Emerg Med 12: 22-37.

Junge, W. und Klees, H. **(1984)**. Arylesterase. In: Methods of enzymatic analysis. H. U. Bergmeyer. Weinheim, Verlag Chemie. IV**:** 8-14.

Karalliedde, L., Baker, D. und Marrs, T. C. **(2006)**. Organophosphate-induced intermediate syndrome: aetiology and relationships with myopathy. Toxicol Rev 25(1): 1-14.

Kauert, G., Schoppek, B., von Clarmann, M. und Felgenhauer, N. **(1990)**. [Plasma and urine catecholamines in a 7-day survival of parathion poisoning]. Klin Wochenschr 68(2): 96-100.

Khersonsky, O. und Tawfik, D. S. **(2005)**. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase. Biochemistry 44(16): 6371-82.

Kiderlen, D., Worek, F., Klimmek, R. und Eyer, P. **(2000)**. The phosphoryl oxime-destroying activity of human plasma. Arch Toxicol 74(1): 27-32.

Kiderlen, D. **(2004)**. Über die Phosphoryloxim-Hydrolase des Plasmas. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Kiderlen, D., Eyer, P. und Worek, F. **(2005)**. Formation and disposition of diethylphosphoryl-obidoxime, a potent anticholinesterase that is hydrolyzed by human paraoxonase (PON1). Biochem Pharmacol 69(12): 1853-67.

Kitchen, B. J., Masters, C. J. und Winzor, D. J. **(1973)**. Effects of lipid removal on the molecular size and kinetic properties of bovine plasma arylesterase. Biochem J 135(1): 93-9.

Koelle, G. B. **(1963)**. Cytological distributions and physiological functions of cholinesterases. In: Cholinesterases and anticholinesterase agents. O. Eichler und A. Farah. Berlin, Göttingen, Heidelberg, Springer. 15**:** 187-298.

Kwong, T. C. **(2002)**. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. Ther Drug Monit 24(1): 144-9.

La Du, B. N. **(1992)**. Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Pharmacogenetics of Drug Metabolism. W. Kalow. New York, Pergamon Press, Inc.**:** 51-91.

La Du, B. N., Billecke, S., Hsu, C., Haley, R. W. und Broomfield, C. A. **(2001)**. Serum paraoxonase (PON1) isozymes: the quantitative analysis of isozymes affecting individual sensitivity to environmental chemicals. Drug Metab Dispos 29(4): 566-9.

Lacinski, M., Skorupski, W., Cieslinski, A., Sokolowska, J., Trzeciak, W. H. und Jakubowski, H. **(2004)**. Determinants of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase-1 (PON1) protein in humans. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 50(8): 885-93.

Lamb, J. C., Steinberg, G. M. und Hackley, B. E., Jr. **(1964)**. Isopropyl methylphosphonylated bisquaternary oximes; powerful inhibitors of cholinesterase. Biochim Biophys Acta 89: 174-6.

Lamb, J. C., Steinberg, G. M., Solomon, S. und Hackley Jr., B. E. **(1965)**. Reaction of 4-formyl-1-methylpyridinium iodide oxime with isopropyl methylphosphonofluoridate. Biochemistry 4(11): 2475-2484.

Lamping, K. G., Wess, J., Cui, Y., Nuno, D. W. und Faraci, F. M. **(2004)**. Muscarinic (M) receptors in coronary circulation: gene-targeted mice define the role of M2 and M3 receptors in response to acetylcholine. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(7): 1253-8.

Leader, H., Vincze, A., Manisterski, B., Rothschild, N., Dosoretz, C. und Ashani, Y. **(1999)**. Characterization of O,O-diethylphosphoryl oximes as inhibitors of cholinesterases and substrates of phosphotriesterases. Biochem Pharmacol 58(3): 503-15.

Leviev, I., Deakin, S. und James, R. W. **(2001)**. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. J Lipid Res 42(4): 528-35.

Levy, D. und Ashani, Y. **(1986)**. Synthesis and in vitro properties of a powerful quaternary methylphosphonate inhibitor of acetylcholinesterase. A new marker in blood-brain barrier research. Biochem Pharmacol 35(7): 1079-85.

Lockridge, O. und Masson, P. **(2000)**. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. Neurotoxicology 21(1-2): 113-26.

Lotti, M. und Moretto, A. **(2005)**. Organophosphate-induced delayed polyneuropathy. Toxicol Rev 24(1): 37-49.

Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radic, Z., Taylor, P. und Doctor, B. P. **(1999)**. Phosphoryl oxime inhibition of acetylcholinesterase during oxime reactivation is prevented by edrophonium. Biochemistry 38(31): 9937-47.

Lüttringhaus, A. und Hagedorn, I. **(1964)**. [Quaternary hydroxyiminomethylpyridinium salts. The dischloride of bis-(4-hydroxyiminomethyl-1-pyridinium-methyl)-ether (LüH 6), a new reactivator of acetylcholinesterase inhibited by organic phosphoric acid esters.]. Arzneimittelforschung 14: 1-5.

Mackness, B., Durrington, P. N. und Mackness, M. I. **(1998)**. Human serum paraoxonase. Gen Pharmacol 31(3): 329-36.

Mackness, B., Davies, G. K., Turkie, W., Lee, E., Roberts, D. H., Hill, E., Roberts, C., Durrington, P. N. und Mackness, M. I. **(2001)**. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(9): 1451-7.

Main, A. R. und Iverson, F. **(1966)**. Measurement of the affinity and phosphorylation constants governing irreversible inhibition of cholinesterases by di-isopropyl phosphorofluoridate. Biochem J 100(2): 525-31.

Marquardt, H. und Schäfer, S. G. **(2004)**. Lehrbuch der Toxikologie. Mannheim, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Marshall, E. **(1984)**. Iraq's chemical warfare: Case proved. Science 224: 130-132.

Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. und Vallette, F. M. **(1993)**. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog Neurobiol 41(1): 31-91.

Massoulie, J., Anselmet, A., Bon, S., Krejci, E., Legay, C., Morel, N. und Simon, S. **(1999)**. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. Chem Biol Interact 119-120: 29-42.

Massoulie, J. **(2002)**. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. Neurosignals 11(3): 130-43.

Mast, U. **(1997)**. Reaktivierung der Erythrozyten-Acetylcholinesterase durch Oxime. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Mazur, A. **(1946)**. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophospates. J Biol Chem 946(64): 27 -89.

Mochizuki, H., Scherer, S. W., Xi, T., Nickle, D. C., Majer, M., Huizenga, J. J., Tsui, L. C. und Prochazka, M. **(1998)**. Human PON2 gene at 7q21.3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. Gene 213(1-2): 149-57.

Mohamed, F., Sooriyarachchi, M. R., Senarathna, L., Azhar, S., Sheriff, M. H., Buckley, N. A. und Eddleston, M. **(2007)**. Compliance for single and multiple dose regimens of superactivated charcoal: A prospective study of patients in a clinical trial. Clin Toxicol (Phila) 45(2): 132-5.

Mueller, R. F., Hornung, S., Furlong, C. E., Anderson, J., Giblett, E. R. und Motulsky, A. G. **(1983)**. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. Am J Hum Genet 35(3): 393-408.

Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., Nakajima, M., Iwase, H. und Iwadate, K. **(1997)**. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo subway. Toxicol Appl Pharmacol 144(1): 198-203.

Namba, T. und Hiraki, K. **(1958)**. PAM (pyridine-2-aldoxime methiodide) therapy for alkyl-phosphate poisoning. J Am Med Assoc 166(15): 1834-9.

Nenner, M. **(1974)**. [Phosphonylated aldoximes. Antagonism of acetylcholinesterase and hydrolytic decomposition]. Biochem Pharmacol 23(8): 1255-62.

Netter, H. **(1959)**. Theoretische Biochemie. Berlin, Springer.

Ordentlich, A., Barak, D., Kronman, C., Ariel, N., Segall, Y., Velan, B. und Shafferman, A. **(1996)**. The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. J Biol Chem 271(20): 11953-62.

Peter, J. V. und Moran, J. L. **(2004)**. Role of oximes in human organophosphate poisoning-a critical look at the evidence. In: Critical care update, 2004. New Delhi, Nayyar, V.**:** 153-163.

Phillips, M. R., Li, X. und Zhang, Y. **(2002)**. Suicide rates in China, 1995-99. Lancet 359(9309): 835-40.

Playfer, J. R., Eze, L. C., Bullen, M. F. und Evans, D. A. **(1976)**. Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paroxonase activity. J Med Genet 13(5): 337-42.

Portmann, R. **(1991)**. Synthesis of 4-{{[(isopropyloxy)methylphosphoryloxy]imino}methyl}-1-methylpyridinium iodide and its characterisation. Helv Chim Acta 74(2): 331-335.

Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J. und La Du, B. N. **(1996)**. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. Genomics 33(3): 498-507.

Reddy, S. T., Wadleigh, D. J., Grijalva, V., Ng, C., Hama, S., Gangopadhyay, A., Shih, D. M., Lusis, A. J., Navab, M. und Fogelman, A. M. **(2001)**. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(4): 542-7.

Richter, R. J. und Furlong, C. E. **(1999)**. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. Pharmacogenetics 9(6): 745-53.

Rochu, D., Chabriere, E. und Masson, P. **(2007)**. Human paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. Toxicology: im Druck.

Schoene, K. **(1971)**. Reaktivierung von O,O-diäthylphosphoryl-acetylcholinesterase: Reaktivierungs-Rephosphorylierungs-Gleichgewicht. Biochem Pharmacol 21(2): 163-170.

Segel, I. H. **(1975)**. Enzym Kinetics. New York, Wiley & Sons.

Senanayake, N. und Karalliedde, L. **(1987)**. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. N Engl J Med 316(13): 761-3.

Shih, D. M., Gu, L., Xia, Y. R., Navab, M., Li, W. F., Hama, S., Castellani, L. W., Furlong, C. E., Costa, L. G., Fogelman, A. M. und Lusis, A. J. **(1998)**. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. Nature 394(6690): 284-7.

Shishido, T. und Fukami, J. **(1972)**. Enzymatic hydrolysis of diazoxon by rat tissue homogenates. Pesticide Biochem Physiol 2: 39-50.

Smolen, A., Eckerson, H. W., Gan, K. N., Hailat, N. und La Du, B. N. **(1991)**. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. Drug Metab Dispos 19(1): 107-12.

Sorenson, R. C., Primo-Parmo, S. L., Kuo, C. L., Adkins, S., Lockridge, O. und La Du, B. N. **(1995)**. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7187-91.

Spöhrer, U. und Eyer, P. **(1995)**. Separation of geometrical syn and anti isomers of obidoxime by ion-pair high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 693(1): 55-61.

Steinberg, G. M. und Solomon, S. **(1966)**. Decomposition of a phosphonylated pyridinium aldoxime in aqueous solution. Biochemistry 5(10): 3142-50.

Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. und Silman, I. **(1991)**. Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. Science 253(5022): 872-9.

Taylor, P. und Radic, Z. **(1994)**. The cholinesterases: from genes to proteins. Annu Rev Pharmacol Toxicol 34: 281-320.

Thiermann, H., Mast, U., Klimmek, R., Eyer, P., Hibler, A., Pfab, R., Felgenhauer, N. und Zilker, T. **(1997)**. Cholinesterase status, pharmacokinetics and laboratory findings during obidoxime therapy in organophosphate poisoned patients. Hum Exp Toxicol 16(8): 473-80.

Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T. und Worek, F. **(2005)**. Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. Chem Biol Interact 157-158: 345-7.

Wilson, I. B. und Ginsburg, B. **(1955)**. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. Biochim Biophys Acta 18(1): 168-70.

Worek, F., Kirchner, T., Bäcker, M. und Szinicz, L. **(1996)**. Reactivation by various oximes of human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by different organophosphorus compounds. Arch Toxicol 70(8): 497-503.

Worek, F., Bäcker, M., Thiermann, H., Szinicz, L., Mast, U., Klimmek, R. und Eyer, P. **(1997)**. Reappraisal of indications and limitations of oxime therapy in organophosphate poisoning. Hum Exp Toxicol 16(8): 466-72.

Worek, F., Eyer, P. und Szinicz, L. **(1998)**. Inhibition, reactivation and aging kinetics of cyclohexylmethylphosphonofluoridate-inhibited human cholinesterases. Arch Toxicol 72(9): 580-7.

Worek, F., Diepold, C. und Eyer, P. **(1999a)**. Dimethylphosphoryl-inhibited human cholinesterases: inhibition, reactivation, and aging kinetics. Arch Toxicol 73(1): 7-14.

Worek, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C. und Eyer, P. **(1999b)**. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. Clin Chim Acta 288(1-2): 73-90.

Worek, F., Thiermann, H., Szinicz, L. und Eyer, P. **(2004a)**. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. Biochem Pharmacol 68(11): 2237-48.

Worek, F. **(2004b)**. In-vitro-Untersuchungen zu Interaktionen von Organophosphaten und Reaktivatoren mit Cholinesterasen als Basis für die Therapieoptimierung. Habilitationsschrift. Ludwig-Maximilians-Universität. München.

Worek, F., Szinicz, L., Eyer, P. und Thiermann, H. **(2005)**. Evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning: development of a kinetic-based dynamic model. Toxicol. Appl. Pharmacol. 209: 193-202.

Yeung, D. T., Lenz, D. E. und Cerasoli, D. M. **(2005)**. Analysis of active-site amino-acid residues of human serum paraoxonase using competitive substrates. FEBS J 272(9): 2225-30.

Zech, R. und Chemnitius, J. M. **(2002)**. PON1 in different species. In: Paraoxonase (PON1) in health disease. L. G. Costa und C. E. Furlong. Boston, Kluwer Academic Publishers**:** 137-163.

Lebenslauf

Jochen Stenzel, geboren am 23.07.1973 in Wolfratshausen
als Sohn von Klaus Stenzel und Herta Stenzel, geb. Antosch

Schulbildung

1980-1984	Grundschule: Balanschule in München
1984-1993	Gymnasium Unterhaching

Bundeswehr

1993-1994	Wehrdienst in Brannenburg

Studium

1994	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
1996	Ärztliche Vorprüfung
1997	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999	1. Staatsexamen
2003	2. Staatsexamen
2004-2005	Praktisches Jahr: *Innere Medizin*: Medizinische Klinik – Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München *Chirurgie*: Krankenhaus München Schwabing *Radiologie*: Institut für Klinische Radiologie – Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München
2005	3. Staatsexamen und Erlangung der Vollapprobation

Berufliche Tätigkeit

10/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Kommissarische Leitung: Prof. Dr. P. Eyer
06/2007	Assistenzarzt in der Abteilung für Klinische Toxikologie (II. Medizinische Klinik), Klinikum rechts der Isar, Leitung: Prof. Dr. T. Zilker