

5. ZUSAMMENFASSUNG

Paraoxon (E 600), ein zu den Organophosphaten gehörendes Insektizid, wird durch die Paraoxonase (E.C.3.1.8.1) hydrolytisch gespalten und damit entgiftet.

Bei 10 verschiedenen Säugetierspezies wurde die Paraoxonaseaktivität mit eigens dafür entwickelten Testsystemen im Serum untersucht.

Kinetische Untersuchungen im Serum von Affen und Hunden zeigten eine für Enzyme ungewöhnliche Abhängigkeit der Paraoxonase vom pH-Wert und Puffersystem mit maximalen Umsatzraten bei pH 7 im Triethanolamin (TE)-Puffer, bei pH 8,5 und pH 10 im Monoethanolamin (ME)-Puffer.

Die unterschiedliche pH-Abhängigkeit in Gegenwart von Kochsalz und bei verschiedenen Pufferkonzentrationen (0,1 mol/l bis 1 mol/l Ethanolamin-Puffer) führten zur Entwicklung von vier Testsystemen für die Bestimmung der Paraoxonaseaktivitäten:

(1) 7er Paraoxonase in TE-Puffer, (2) 8,5er Paraoxonase in ME-Puffer mit 1 mol/l NaCl, (3) 10er Paraoxonase in ME-Puffer ohne NaCl und (4) NaCl-10er Paraoxonase in ME-Puffer mit 1 mol/l NaCl.

In allen in den vier Testsystemen untersuchten Säugetierseren (10 verschiedene Spezies) war wie beim Menschen eine Paraoxonhydrolysierende und damit entgiftende Enzymaktivität nachweisbar, die bei den einzelnen Tierarten in Abhängigkeit von dem jeweils optimalen Testsystem sehr unterschiedlich ausgeprägt war (von 0,044 U/ml Serum beim Meerschweinchen bis 2,9 U/ml Serum beim Hund). Es ergeben sich enge Korrelationen zwischen den in den verschiedenen Testsystemen gemessenen Paraoxonaseaktivitäten bei Krallenaffe und Hund mit Korrelationskoeffizienten, die größer als $r = 0,973$ sind.

Die Arylesterase (E.C.3.1.1.2) katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phenylacetat. Ihre Aktivität ist nicht so stark durch das Puffersystem beeinflussbar, wie die Paraoxonase. In 0,1 molarem Triethanolamin-Puffer liegt das pH-Optimum der Arylesterase bei pH 7.

An 38 Krallenaffenseren und 30 Hundeseren wurden Häufigkeitsverteilungen der in den verschiedenen Testsystemen ermittelten Enzymaktivitäten untersucht.

Im Unterschied zum Menschen sind alle untersuchten Paraoxonaseaktivitäten bei Krallenaffen und Hunden unimodal verteilt. Eine Differenzierung wie beim Menschen in Individuen mit hoher Paraoxonaseaktivität (sogenannte "Hochentgifter") und mit niedriger Paraoxonaseaktivität (sogenannte "Niedrigentgifter") ist bei Krallenaffen und Hunden, d.h. innerhalb der jeweiligen Tierart, nicht möglich, kann aber beim Vergleich verschiedener Tierarten untereinander vorgenommen werden.

Die Arylesterase von Krallenaffe und Hund zeigt sich wie beim Menschen unimodal verteilt.

Die Paraoxonaseaktivitäten von Krallenaffen und Hunden korrelieren so streng ($r > 0,880$, $p \leq 0,001$) mit deren Arylesteraseaktivitäten, daß mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen ist, daß beide Substrate von einem Enzym umgesetzt werden.

Versuche, in denen die Fällbarkeit durch Lipoproteinfällungsreagenzien und die Kopräzipitation durch tierische Antikörper gegen Human Apolipoprotein A I untersucht wurden, ergaben, daß Paraoxonase und Arylesterase an das α -Lipoprotein im Serum gebunden sind.

Zwischen den Paraoxonaseaktivitäten und dem HDL-Cholesteringehalt ergeben sich signifikante Korrelationen mit Koeffizienten von $r = 0,589$ für den Krallenaffen und $r = 0,545$ für den Hund. Korrelationen der Arylesteraseaktivität mit dem HDL-Cholesteringehalt ergeben signifikante Korrelationskoeffizienten von $r = 0,552$ für den Krallenaffen und $r = 0,554$ für den Hund.

Katharina Kluge:

Paraoxonase, arylesterase and α -lipoproteins in serum of different mammals

6. SUMMARY

Paraoxonase (E.C.3.1.8.1) among other aryldialkylphosphatases hydrolyzes and thus detoxicates the organophosphorus compound paraoxon (E 600).

In 10 mammalian species paraoxonase activities were studied using different test-systems, which had to be developed.

Kinetic analysis in monkey and dog sera revealed that the pH-dependence of paraoxonase in different buffer-systems was unusual for hydrolytic enzymes. pH-optima of serum-paraoxonase were determined at pH 7 in triethanolamine (TE)-buffer and at both pH 8,5 and pH 10 in monoethanolamine (ME)-buffer.

Influences of both sodium chloride and buffer concentrations on paraoxonase activities led to the development of four paraoxonasetest-systems: (1) pH 7-paraoxonase in TE-buffer, (2) pH 8,5-paraoxonase in ME-buffer with 1 M NaCl, (3) pH 10-paraoxonase in ME-buffer without NaCl, and (4) pH 10-paraoxonase in ME-buffer with 1 M NaCl.

Paraoxonase activities as determined in test-systems 1-4, showed strong inter-test correlation (correlation coefficients greater than 0.973) and in sera of humans and 10 mammalian species ranged from 0.044 U/ml (guinea pig) to 2.9 U/ml (dogs).

Arylesterase activity (E.C.3.1.1.2) measured with phenylacetate as substrate, as compared to paraoxonase, was less susceptible to various buffer-systems. In 0.1 M triethanolamine-buffer, the pH-optimum was determined at pH 7.

With respect to paraoxonase activity, human individuals can be classified into a high activity group ("high detoxicators") and a low activity group ("low detoxicators").

In contrast, frequency distribution of paraoxonase activity in 38 monkey sera (*Callitrix jacchus*) as well as 30 sera of dogs showed a unimodal distribution.

However, in comparison to other animal species, a given species, according to its paraoxonase serum activity, may be classified as high detoxicator or low detoxicator, respectively.

Like in humans, arylesterase activity in monkey as well as in dog sera was significantly correlated to paraoxonase activities (correlation coefficients greater than 0.880). The close correlation of paraoxonase and arylesterase activities in individual sera of dogs and monkeys gives strong evidence for both activities being related to a single enzyme protein.

Since in sera of dogs and monkeys both paraoxonase and arylesterase activities were co-precipitating by precipitation reagents (magnesium/heparine, polyethylene glycol) and by polyclonal and monoclonal antibodies against human apolipoprotein A, paraoxonase/arylesterase activity was demonstrated to be integral part of high-density lipoprotein.

In individual sera of monkeys and dogs paraoxonase activity is significantly correlated to HDL-cholesterol concentrations with correlation coefficients of $r = 0.589$ in monkeys and $r = 0.545$ in dogs, respectively.

For the significant correlation of arylesterase activity to HDL-cholesterol, coefficients of $r = 0.552$ in monkeys and $r = 0.554$ in dogs were obtained.