

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM School of Life Sciences

Enzymatische und biochemische Charakterisierung neuartiger
Bioscavenger zur Detoxifizierung phosphororganischer
Verbindungen

Anja Köhler, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Michael Rychlik

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arne Skerra

2. Prof. Dr. Franz Worek

Dissertation wurde am 08.08.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 28.11.2022 angenommen.

Danksagung

Als Erstes möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit mit dieser spannenden Thematik im Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM anfertigen zu können, bedanken. Seine ausgezeichnete Betreuung sowie die konstruktiven wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm haben maßgeblich dazu beigetragen, diese Arbeit mit ihren Fragestellungen erfolgreich abzuschließen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Franz Worek, für die stetige Unterstützung und die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm, für das hilfsbereite und motivierende Arbeitsumfeld, sowie für sein stetiges Interesse am Fortschritt des Kooperationsprojekts der TUM mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr. All das hat ebenfalls maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit gehabt.

Besten Dank an meine Projektpartner Benjamin Escher und Laura Job für die exzellente und kollegiale Zusammenarbeit sowie die produktiven wissenschaftlichen Diskussionen. Im Zuge dessen möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thiermann und Frau Dr. Koller für ihre professionelle Unterstützung und fachlich exzellente Zusammenarbeit bei unserer gemeinsamen Publikation bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr für das offene und stets hilfsbereite Arbeitsumfeld. Hervorheben möchte ich dabei Gülcan, Andreas, Madlen, Lisa Stigler, Simone Rothmiller und alle Doktoranden am Institut, die mich nicht nur fachlich unterstützt, sondern ebenfalls zu einer guten und kollegialen Stimmung im Laboralltag beigetragen haben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern Christine und Dr. Helmut Köhler, sowie meinen Brüdern Mark und Julian und besonders bei meinem Ehemann Milhim bedanken, die mir stets Vertrauen entgegengebracht, mich bedingungslos unterstützt, motiviert und Kraft zur Überwindung von schwierigen Phasen in dieser Zeit geschenkt haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Wissenschaftliche Artikel:

Köhler, A., Escher, B., Job, L., Koller, M., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F. (2021). Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. *Arch Toxicol.* 95, 2815-2823.

Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A. (2021). Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components. *Toxicol. Lett.* 350, 194-201.

Weitere wissenschaftliche Artikel:

Job, L., Köhler, A., Escher, B., Worek, F., Skerra, A. (2020). A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* 321, 138-145.

Escher, B., Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A. (2020). Translating the concept of bispecific antibodies to engineering heterodimeric phosphotriesterases with broad organophosphate substrate recognition. *Biochemistry* 59, 4395-4406.

Stigler, L., Köhler, A., Koller, M., Job, L., Escher, B., Potschka, H., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F., Wille, T. (2022). Post VX-exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Arch Toxicol.* 96, 571-583.

Wissenschaftliche Artikel in Vorbereitung:

Job, L., Köhler, A., Eichinger, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F., Skerra, A. (2022). Structure-function analysis of a highly active engineered phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents.

Konferenzbeiträge:

Köhler, A., Job, L., Skerra, A., Worek, F. (2019). Inhibition studies of an organophosphate-detoxifying phosphotriesterase with human plasma components. Poster GBM Herbsttagung in Tübingen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Phosphororganische Verbindungen (OPs)	1
1.2	Organophosphatvergiftungen	3
1.3	Behandlung von Vergiftung mit Organophosphaten.....	4
1.4	Alternative Therapien nach Vergiftungen mit Organophosphaten: Enzym-basierte Bioscavenger.....	5
1.5	Die Phosphotriesterase von <i>Brevundimonas diminuta</i> (BdPTE)	6
1.6	Zielsetzung dieser Dissertation.....	9
2.	Material & Methoden.....	11
2.1	Enzymkinetische Untersuchungen.....	11
2.2	Enzymhemmung.....	14
2.3	Verwendete Materialien für die enzymkinetischen Untersuchungen	15
2.3.1	Chemikalien	15
2.3.2	Präparation der Acetylcholinesterase (AChE) aus humanen Erythrozyten	16
2.3.3	Verbrauchsmaterialien	17
2.3.4	Geräte.....	17
2.3.5	Computerprogramme und Datenbanken	18
2.4	Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität verschiedener BdPTEs durch AChE-Inhibitionsassay	19
2.5	Untersuchungen der Hemmung von BdPTE durch Plasmaproteine mit Paraoxon-ethyl	23
3.	Veröffentlichungen.....	25
3.1	Veröffentlichung I: Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro.....	25
3.2	Veröffentlichung II: Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components	27

4.	Diskussion.....	29
4.1	Fortschritte und Schwierigkeiten bei der Entwicklung von BdPTEs mit breitem Substratspektrum.....	29
4.2	Möglichkeiten zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von BdPTEs	31
4.3	Faktoren, welche die enzymkinetischen Untersuchungen oder die Enzymaktivität der BdPTE beeinflussen können	33
5.	Zusammenfassung	35
6.	Literaturverzeichnis.....	37
7.	Abkürzungsverzeichnis	46
8.	Anhang: Nachdrucke der eingebundenen Veröffentlichungen	48

1. Einleitung

Der Einsatz von phosphororganischen Verbindungen (OPs) als chemische Kampfstoffe in militärischen Konflikten oder terroristischen Attentaten ist leider immer noch ein aktuelles Problem wie z. B. im Syrien-Konflikt mit dem Nervenkampfstoff Sarin (2013 und 2017) (Costanzi et al., 2018; John et al., 2018) oder den Attentaten mit VX in Malaysia (2017) (Nakagawa & Tu, 2018) bzw. mit den neuartigen Novichok-Substanzen in England (2018) und Russland (2020) (Vale et al., 2018; Steindl et al., 2021). Darüber hinaus führt die Anwendung von OP-Pestiziden in der Landwirtschaft, der Industrie oder in Haushalten jährlich weltweit zu einer Vielzahl von Vergiftungen mit geschätzt mehr als 100.000 Todesfällen (Eddleston & Phillips, 2004; Gunnell et al., 2007; Eddleston et al., 2008; Karunarathne et al., 2020). Beides zeigt die toxische Relevanz dieser Verbindungen sowie die Notwendigkeit, Vergiftungen mit Organophosphaten effizient behandeln zu können.

1.1 Phosphororganische Verbindungen (OPs)

Die erste OPs wurde bereits im 19ten Jahrhundert synthetisiert, aber über die akut toxische Wirkung von OPs, welche auf der Hemmung der Acetylcholinesterase (AChE) beruht, war damals nicht viel bekannt (Marrs, 2001). Zwischen 1934 und 1944 wurden im Zuge der Insektizidforschung von Gerhard Schrader (I. G. Farbenindustrie, Deutschland) weitere OPs mit hoch toxischen Eigenschaften hergestellt, darunter das weltweit bekannte Insektizid Parathion (E605) und die ersten G-typischen Nervenkampfstoffe Tabun (GA), Sarin (GB) und Soman (GD) (Schrader, 1950; Marrs, 2001). Die für Menschen deutlich potenter wirkenden Nervenkampfstoffe vom V-Typ wurden mit Amiton erstmals 1955 in England beschrieben (Marrs, 2001).

OPs sind Derivate von Phosphorsäureestern mit folgender generischen Struktur (Abbildung 1):

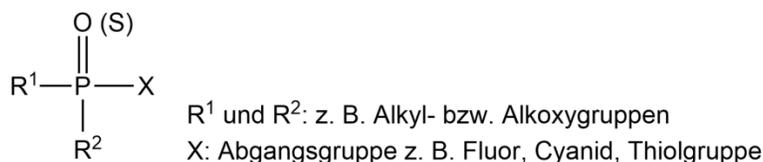


Abbildung 1: Generische Strukturformel der Phosphororganischen Verbindungen.

An einer zentralen Phosphoryl- oder Thiophosphorylgruppe sind zwei Substituenten (R^1 und R^2) und eine Abgangsgruppe (X) gebunden, welche die Toxizität wie auch die physikochemischen Eigenschaften der Substanz beeinflussen (Marrs, 2001).

G-Typ Nervenkampfstoffe, welche neben den Alkyl- oder Alkoxy-Substituenten ein Fluor oder Cyanid als Abgangsgruppe aufzeigen, sind leichtflüchtige Substanzen, währenddessen die V-Typ Nervenkampfstoffe wie z. B. VX, VR oder CVX, mit einer Thiol-haltigen Abgangsgruppe, eine hohe Persistenz und Langlebigkeit aufweisen (Abbildung 2) (Sidell & Borak, 1992). Nervenkampfstoffe besitzen neben ihrer charakteristischen Phosphorylgruppe ein chirales Zentrum am Phosphoratom, beschrieben als P(+) und P(-) (Soman hat ein weiteres chirales Zentrum im Pinacolyl-Rest) (John et al., 2015). Die verschiedenen P-Stereoisomere haben eine unterschiedliche Stabilität in biologischen Systemen und Humantoxizität (Thiermann et al., 2016), wobei generell das P(-) Enantiomer eine stärkere AChE-Hemmung als das P(+) Enantiomer aufweist (Benschop & de Jong, 1988; Reiter et al., 2008; Tenberken et al., 2010; Reiter et al., 2015).

Die Toxizität von OP-Pestiziden mit einer Thiophosphorylgruppe wird in der Literatur als gering beschrieben, erst nach Metabolisierung durch das im Körper vorhandene Cytochrom P450 System zur oxo-Form entsteht ein potentes Toxin (Jett & Richardson, 2009; Jan et al., 2016). Bei dem bekannten Insektizid Parathion besitzt der so aktivierte Metabolit Paraoxon-ethyl (PXE) die inhibierende Wirkung gegenüber der AChE (Abbildung 2) (Guilhermino et al., 1996; Arufe et al., 2000). Parathion wie auch Paraoxon sind über mehrere Tage stabil (Spencer et al., 1975) und besitzen keine chiralen Zentren. Bei anderen OP-Pestiziden, wie z. B. Malathion, treten jedoch Stereoisomere auf (Ellington et al., 2001; Nillos et al., 2010).

Aufgrund der hochtoxischen Wirkung von OPs ist mittlerweile deren Anwendung in der Landwirtschaft sowie der Verkauf im freien Handel (z. B. Pestizide) durch nationale Behörden oder auch die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit gesetzlich geregelt und in vielen Fällen verboten (EFSA, 2021). Darüber hinaus wurde ein völkerrechtlicher Abrüstungs- und Rüstungskontrollvertrag für chemische Waffen (u. a. OP-Nervenkampfstoffe) zwischen derzeit 193 Staaten geschlossen, das sogenannte Chemiewaffenübereinkommen (CWÜ) (Auswärtiges Amt, 1995-2021), das 1997 in Kraft getreten ist. Die Einhaltung des CWÜ wird durch die Organisation für das Verbot Chemischer Waffen (OVCW) überwacht (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, 2021).

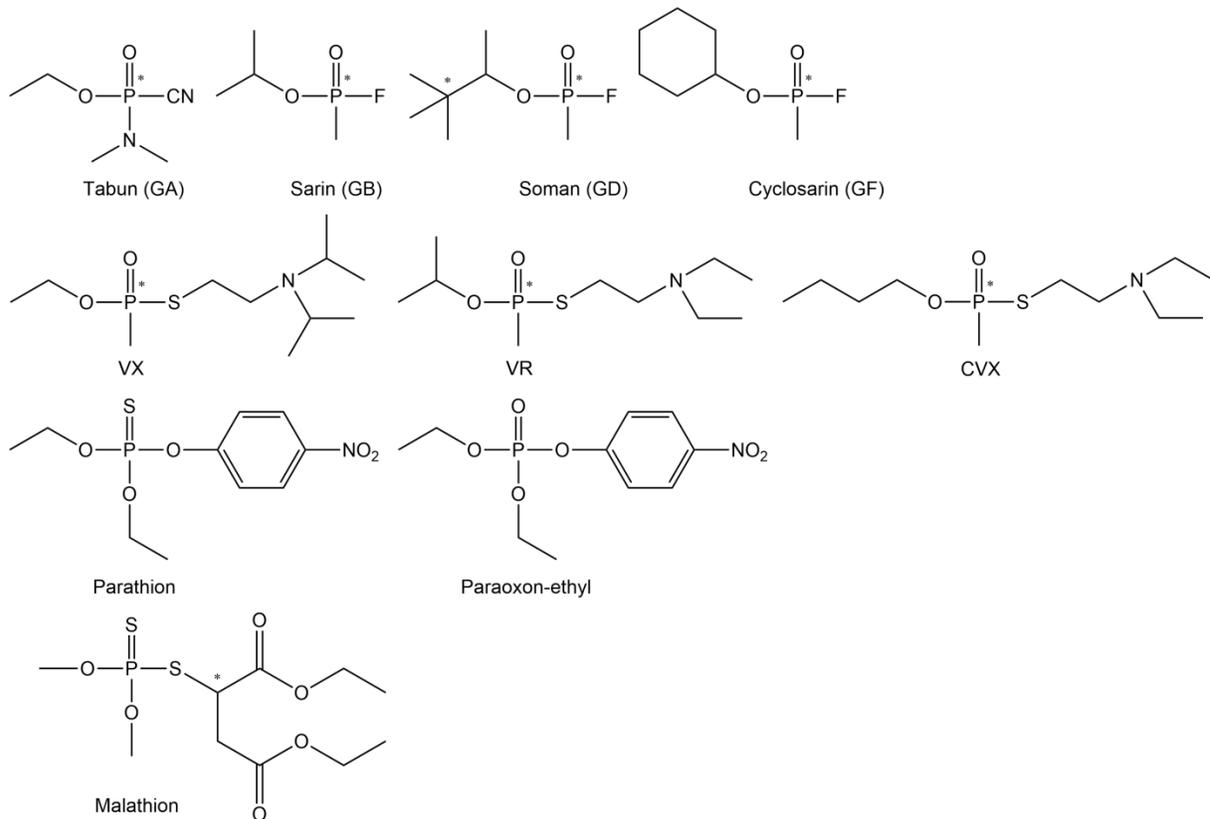


Abbildung 2: Verschiedene OP-Nervenkampfstoffe und OP-Pestizide. Die chiralen Zentren der OPs sind jeweils mit einem Stern gekennzeichnet.

1.2 Organophosphatvergiftungen

Die cholinerge Wirkung von OPs wurde erstmals 1932 von Lange und Krüger beschrieben (Lange & Krueger, 1932) und seit dem Zweiten Weltkrieg detailliert erforscht (Marrs, 2001). OPs sind hochpotente Inhibitoren von Cholinesterasen, wie insbesondere der AChE, und können entweder als Flüssigkeit über die Haut, den Gastrointestinaltrakt oder als Aerosol über die Atemwege aufgenommen werden (Sidell & Borak, 1992). Nach einer Vergiftung mit OPs wird die Hydroxyl-Gruppe des im aktiven Zentrum gelegenen Serins der Cholinesterase durch das OP irreversibel phosphoryliert (Abbildung 3). In Folge der AChE-Inhibition kann der Neurotransmitter ACh in den neuromuskulären Synapsen, in parasympathischen Erfolgsorganen oder den autonomen Ganglien nicht mehr gespalten werden. Das führt zur Akkumulation von ACh im synaptischen Spalt und damit zur Überreizung der darin gelegenen muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren und schließlich des zentralen Nervensystems. Diese cholinerge Krise wird von verschiedenen Symptomgruppen begleitet: Den

muskarinergen Symptomen (Bronchorrhö, vermehrter Speicherfluss, Miosis, Bradykardie, Peristaltik und Spasmen im Magen-Darm-Trakt) und nikotinergen Symptomen (Blässe, Muskelfaszikulation, Muskelschwäche oder -lähmung, Tachykardie, Hypotonie) sowie Symptomen des zentralen Nervensystems (Unruhe, Schwindel, Kopfschmerzen, Krämpfe, Atemdepression bzw. -stillstand), welche letztlich zum Tod führen können (Marrs, 1993; Aktories et al., 2017).

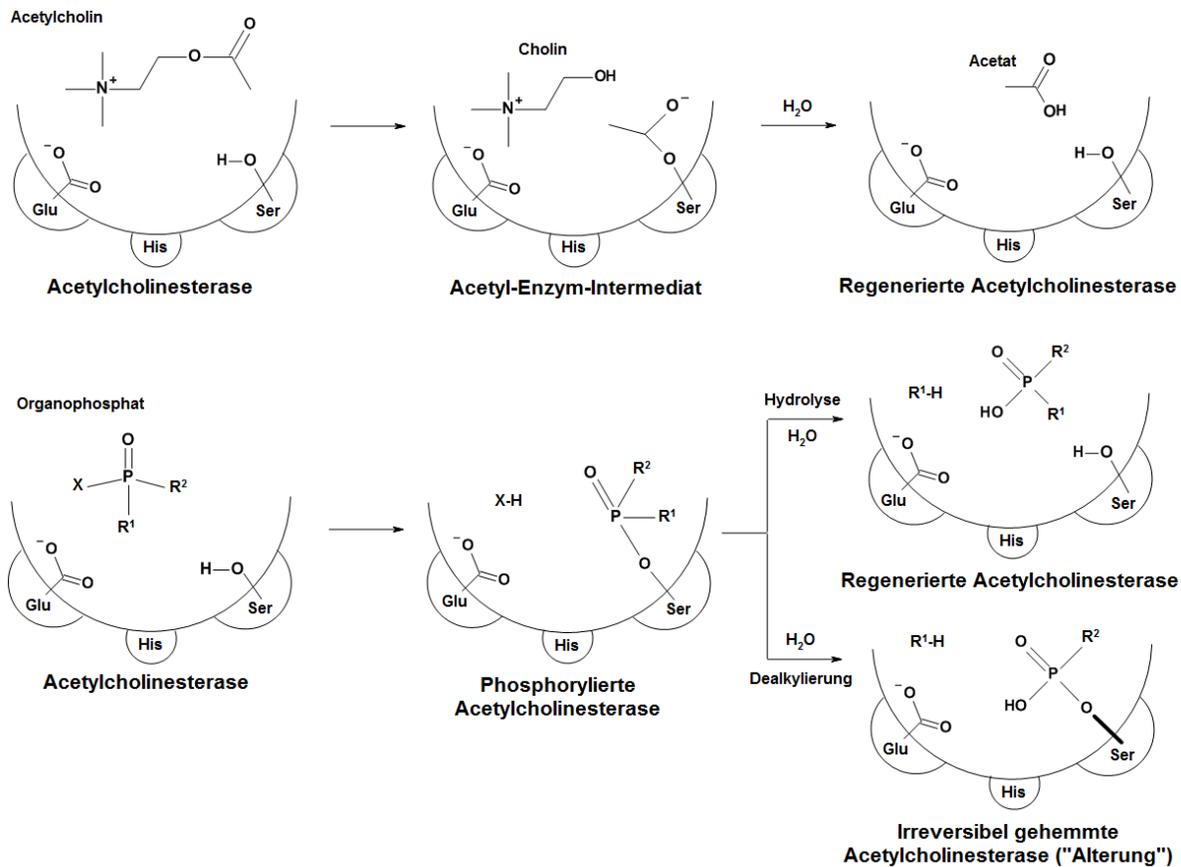


Abbildung 3: Umsetzung von Acetylcholin in Cholin und Acetat durch die AChE und deren Inhibition durch ein Organophosphat. Die phosphorylierte AChE kann sich durch spontane Hydrolyse der Serin-Phosphat-Bindung regenerieren oder, andererseits, zusätzlich durch hydrolytische Dealkylierung von R^1 irreversibel gehemmt werden. Diese sogenannte „Alterung“ ist abhängig von der Zeit und von dem gebundenen OP.

1.3 Behandlung von Vergiftung mit Organophosphaten

Die schon seit längerem angewandte Standardbehandlung nach Vergiftungen mit OPs ist eine Kombinationstherapie aus einem reversiblen muskarinergen Antagonisten (z. B. Atropin) und

einem Oxim (z. B. Obidoxim, Pralidoxim). Unterstützt wird dieser Therapieansatz durch die zusätzliche Gabe von antikonvulsiven Medikamenten zur Neuroprotektion und Linderung von Krampfanfällen (Marrs & Sellström, 2007; Thiermann et al., 2016; Newmark, 2019).

Oxime sind in der Lage, die phosphorylierte AChE mittels nukleophilen Angriffs zu reaktivieren. Diese Reaktivierung ist jedoch limitiert durch die Spezifität von Oximen gegenüber unterschiedlichen OPs. Unmöglich ist die Oxim-Reaktivierung nach der „Alterung“ der inhibierten AChE, also der spontanen und zeitabhängigen Dealkylierung der an die AChE gebundenen Phosphatgruppe (Abbildung 3) (Eddleston et al., 2002; Thiermann et al., 2016).

1.4 Alternative Therapien nach Vergiftungen mit Organophosphaten: Enzym-basierte Bioscavenger

Aufgrund der unbefriedigenden Wirksamkeit der Standardtherapie sind innovative Behandlungsmöglichkeiten dringend erforderlich. Ein innovativer Therapieansatz sind enzym-basierte Bioscavenger, welche OPs bereits in der Blutbahn inaktivieren und so eine Inhibition der AChE in den Geweben verhindern. Es werden drei verschiedene Arten von Bioscavengern unterschieden: stöchiometrische, pseudo-katalytische und katalytische (Nachon et al., 2013).

Stöchiometrische Bioscavenger sind Proteine, wie z. B. die humane Butyrylcholinesterase (BChE), die zur Prophylaxe vor einer drohenden OP-Intoxikation verabreicht werden könnten. Als selbst inhibierbare Enzyme binden sie OPs in der Blutbahn irreversibel und fangen dadurch die OPs ab, bevor diese die AChE im Gewebe erreichen. Da diese Scavenger in einem 1:1 Molverhältnis mit den OPs reagieren, werden große Proteinmengen für eine erfolgreiche Behandlung benötigt. Dies beschränkt deren Anwendung, da die BChE nur begrenzt aus humanem Plasma extrahiert werden kann und die Massenproduktion in rekombinanten Expressionssystemen sowie die anschließende Proteinreinigung sehr aufwendig sind (Masson and Rochu, 2009; Nachon et al., 2013).

Pseudo-katalytische Bioscavenger sind stöchiometrische Bioscavenger, welche mit einem zusätzlichen Reaktivator appliziert werden, wie z. B. die BChE in Kombination mit einem Oxim. Durch das Oxim wird die durch ein OP inhibierte BChE reaktiviert, so dass diese mehrfach OPs binden kann. Der Nutzen dieser Therapiestrategie ist jedoch, neben den zuvor aufgezeigten Problemen bei der Herstellung der BChE, aufgrund der Substratspezifität der Oxime und der

fortschreitenden irreversiblen Dealkylierung („Alterung“) der BChE begrenzt (Nachon et al., 2013).

Katalytische Bioscavenger sind Enzyme, welche OPs selbst in der Blutlaufbahn enzymatisch spalten und damit einer Hemmung der AChE vorbeugen. Aufgrund ihres hohen Substratumsatzes werden im Vergleich zu den stöchiometrischen Bioscavengern nur geringe Enzymdosen benötigt. Neben der humanen Paraoxonase 1 wurden vor allem Phosphotriesterasen (PTE) aus unterschiedlichen Bakterien genauer untersucht (Masson & Rochu, 2009; Nachon et al., 2013).

Die aussichtsreichste PTE mit einem der breitesten Substratspektren ist die PTE aus *Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta* (BdPTE) (Nachon et al., 2013). Sie hydrolysiert nicht nur Pestizide wie Paraoxon mit einer hohen katalytischen Aktivität (k_{cat}/K_M) von $\sim 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Omburo et al., 1992), sondern ebenfalls verschiedene Nervenkampfstoffe, z. B. Sarin (Dumas et al., 1990), und OPs mit einer P-S-Abgangsgruppe, wie z. B. Malathion oder VX (Lai et al., 1995; Raushel, 2002).

1.5 Die Phosphotriesterase von *Brevundimonas diminuta* (BdPTE)

Die BdPTE aus dem im Boden lebenden Bakterium *Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta* ist ein Homodimer mit zwei identischen Untereinheiten (Raushel, 2002). Das aktive Zentrum der BdPTE befindet sich im C-terminalen Bereich und ist im natürlichen Zustand mit Zink(II)-Kationen (Zn_α^{2+} und Zn_β^{2+}) beladen (Dumas et al., 1989; Vanhooke et al., 1996; Raushel, 2002). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Zink(II)-Ionen auch durch andere Metall(II)-Kationen (z. B. Cd(II)-, Ni(II)-, Co(II)- oder Mn(II)) ohne Verlust der enzymatischen Aktivität ($\geq 96\%$) ausgetauscht werden können (Omburo et al., 1992). Die Metall(II)-Kationen sind durch vier Histidin-Seitenketten (His 55, His 57, His 201 und His 230) und einen Aspartat-Rest (Asp 306) gebunden. Zusätzlich sind die Metallionen mit einem Hydroxidion und einer post-translational carboxylierten Lysin-Seitenkette (Lys 169) koordiniert. Der enzymatische Reaktionsmechanismus wird durch einen nukleophilen Angriff des Hydroxidions auf das zentrale Phosphatatom des OPs initiiert, dabei die OP-Abgangsgruppe (X) hydrolytisch abgespalten und das aktive Zentrum durch Protonenumlagerung regeneriert (Abbildung 4) (Vanhooke et al., 1996; Aubert et al., 2004; Wong & Gao, 2007).

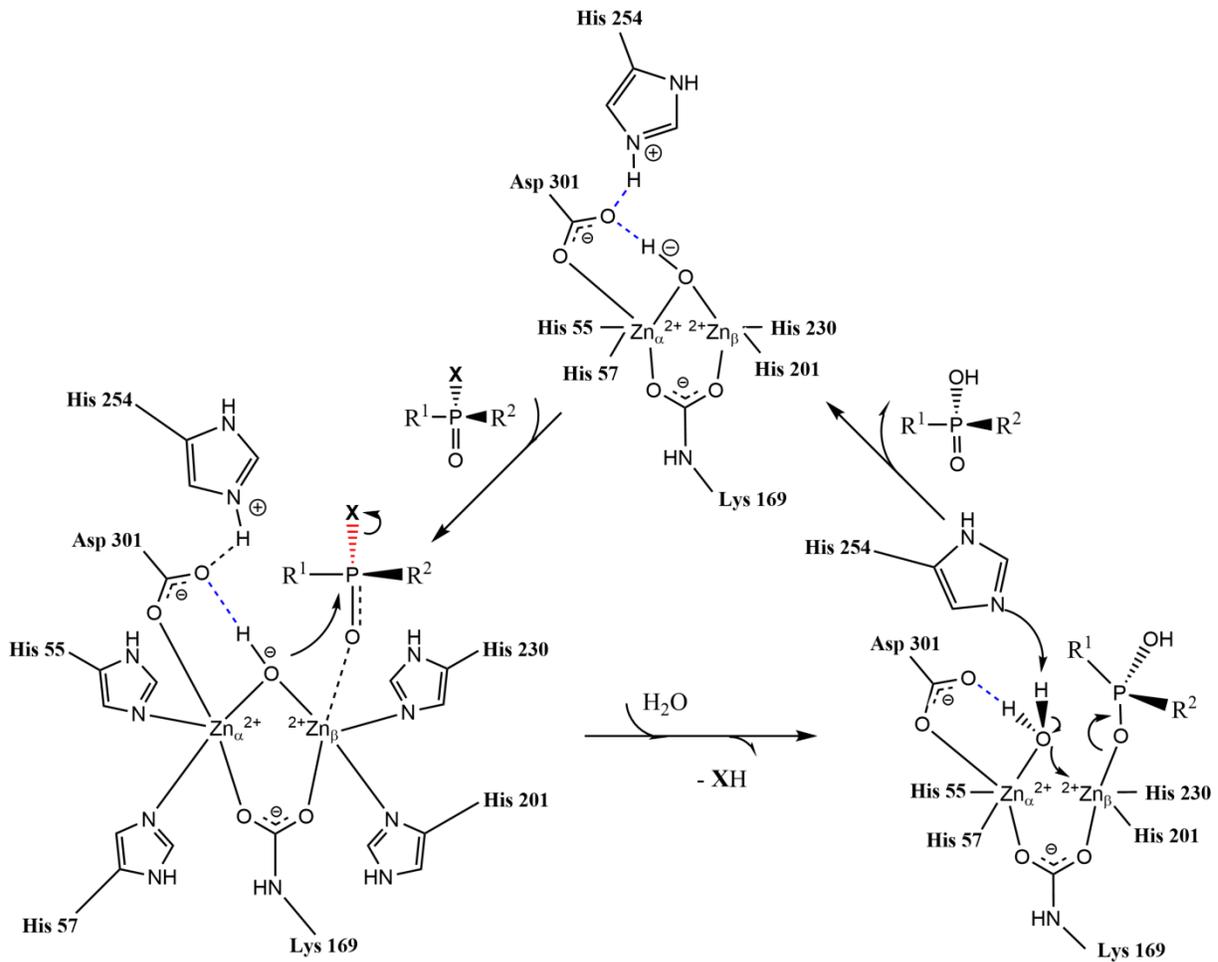


Abbildung 4: Enzymatische Hydrolyse von Organophosphaten durch die BdPTE. Durch nukleophilen Angriff des Hydroxidions auf das zentrale Phosphoratom des OP wird die Abgangsgruppe X des OP abgespalten. Nach Protonenumlagerung und Dissoziation des Hydrolyseprodukts wird das aktive Zentrum der BdPTE regeneriert (Wong & Gao, 2007).

Die BdPTE wurde über die letzten beiden Jahrzehnte von verschiedenen Arbeitsgruppen durch Protein-Engineering in mehrfacher Hinsicht optimiert und betreffend der Expressionsausbeute als rekombinantes Protein, der Proteinestabilität, der Stereopräferenz zum hochtoxischen P(-) Enantiomer und vor allem der katalytische Aktivität gegenüber Nervenkampfstoffen und verschiedenen OPs, womit das Substratspektrum der BdPTE erweitert wurde, verbessert (Chen-Goodspeed et al., 2001a; Chen-Goodspeed et al., 2001b; Roodveldt & Tawfik, 2005; Tsai et al., 2010; Gupta et al., 2011; Tsai et al., 2012; Bigley et al., 2013; Bigley et al., 2015; Goldsmith et al., 2016).

Cherny et al. (2013) fokussierten sich auf die Beschleunigung der BdPTE-Hydrolyse gegenüber V-Typ Nervenkampfstoffe, mit entsprechender P(-) Stereopräferenz. Resultierend konnte die BdPTE Variante C23 entwickelt werden, welche k_{cat}/K_M -Werte von bis zu $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gegenüber VX, VR und CVX aufzeigte (Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016) und in einem Tierversuch VX vergiftete Meerschweinchen vor systemischer Toxizität schützte (Worek et al., 2014). Optimierungsschritte ausgehend von dieser vielversprechenden Variante führten zu den BdPTEs 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A), welche erneut verbesserte k_{cat}/K_M -Werte $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gegenüber Nervenkampfstoffen vom V-Typ aufwiesen (Goldsmith et al., 2017).

Zuletzt wurden zwei aussichtsreiche Entwicklungen an der BdPTE vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM unter Leitung von Prof. Dr. Arne Skerra publiziert, die in dieser Dissertation genauer betrachtet werden. Job et al. (2020) optimierten die BdPTEs 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) durch Protein-Engineering hinsichtlich ihrer Stabilität. Hierbei wurden die reaktiven Thiolgruppen der Cysteinreste an den Positionen 59 und 227 der BdPTE durch inerte Seitenketten wie Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin oder Methionin ersetzt. Dadurch ließ sich die Ausbildung von nicht-physiologischen Disulfidbrücken, welche unter oxidativen Stress entstehen können, verhindern. Die insgesamt fünfzehn verschiedenen BdPTE-Mutanten, darunter 10-2-C3(C59M/C227A) und 10-2-C3(C59V/C227V), zeigten neben einer geringeren Tendenz zur Oxidation teils verbesserte thermische Stabilität und Expressionsausbeute in *E. coli*. Die Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) besitzt zudem einen leicht verbesserten k_{cat}/K_M -Wert von $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gegenüber den Nervenkampfstoff VX (Job et al., 2020).

Escher et al. (2020) konstruierte auf der Grundlage der BdPTE einen neuartigen bi-spezifischen Bioscavenger: Mit Hilfe eines Prolin/Alanin/Serin (PAS)-Linkers (Schlapschy et al., 2013) werden die aktiven Zentren zweier verschiedener PTE-Monomere - zwischen dem C-Terminus des einen und dem N-Terminus des anderen - kovalent miteinander verbunden und anschließend das fusionierte Heterodimer mittels gezielter elektrostatischer Steuerungsmutationen an den Positionen R152D am ersten und E71K am zweiten Monomer stabilisiert. Das so erhaltene Enzym, bestehend aus den BdPTE Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) mit einer Präferenz gegenüber der Hydrolyse von jeweils unterschiedlichen V-Typ Nervenkampfstoffen, vereinigte die besten Aktivitäten, was zu einem erweiterten Substratspektrum führte. In Weiterentwicklung dieses Ansatzes wurden weitere bi-spezifische Phosphotriesterasen bestehend aus der OpdA (*A. radiobacter*) Mutante, OpdA(S308L/Y309A), mit hoher Aktivität gegenüber OP-Pestiziden wie Malaoxon oder Mevinphos, und der BdPTE

10-2-C3(I106A) mit einer hohen Aktivität gegenüber V-Typ Nervenkampfstoffen wie VR, mit und ohne kovalenten PAS-Linker konstruiert. Diese Heterodimere zeigten neben einem erheblich erweiterten Substratspektrum hohe katalytische Aktivitäten gegenüber verschiedenen OP-Pestizide und -Nervenkampfstoffen (Escher et al., 2020).

1.6 Zielsetzung dieser Dissertation

Um BdPTE-Varianten mit hoher hydrolytischer Effizienz gegenüber einem breiten Substratspektrum sowie verlängerter Plasma-Halbwertszeit *in vivo* zu generieren, wurden am Lehrstuhl für Biologische Chemie eine Reihe von neuen Mutanten der BdPTE sowie künstliche Heterodimere mit einem breitem Substratspektrum hergestellt und gegebenenfalls mit der PAS-Technologie modifiziert. Mittels verschiedener enzymkinetischer Untersuchungen wurden diese Enzyme im Rahmen dieser Dissertation biochemisch charakterisiert, was Rückschlüsse auf deren zukünftiges Anwendungspotential gestattete. Hierzu wurden folgende Themenschwerpunkte bearbeitet:

- I. Mit der Entwicklung von oxidativ stabilisierten BdPTEs (Job et al., 2020) und des neuartigen bi-spezifischen Bioscavenger (Escher et al., 2020) wurden Enzyme mit klinischem Anwendungspotential kreiert. Um zusätzlich die Plasma-Halbwertszeiten der Enzyme im Körper zu verlängern, wurden die BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) und das Heterodimer C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K) mit einem PAS(200)-Anhängsel modifiziert. Diese zwei aussichtsreichen Kandidaten wie auch deren jeweilige nicht PASylierten Vorläufer wurden hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität gegenüber 17 relevanten Nervenkampfstoffen charakterisiert. Des Weiteren wurde die stereoselektive Hydrolyse von VX durch die PASylierten Varianten analytisch untersucht und anhand dieser Daten eine mögliche *in vivo* Anwendung diskutiert (**Veröffentlichung I**).
- II. In einer Tierstudie der BdPTE C23AL zur Behandlung von VX-Vergiftung wurde eine unerwartet niedrige Enzymaktivität *in vivo* im Vergleich zu dem Befunden *in vitro* bestimmt (Wille et al., 2016). Grund hierfür waren vermutlich unspezifische Wechselwirkungen des Enzyms mit Plasmaproteinen. Ein potenzieller Kandidat hierfür ist das in großen Mengen im Blut vorkommende Serumalbumin. Daher wurde die mögliche Inhibition der oxidativ stabilisierten BdPTE 10-2-C3(C59M/C227A) durch

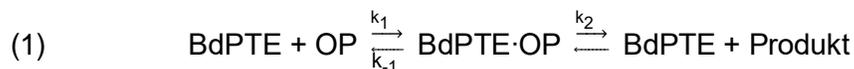
Serumalbumin wie auch durch Plasma-Thiolsubstanzen enzymkinetisch untersucht. Hierbei ergaben sich Hinweise auf eine Enzymhemmung durch Abstraktion von Zn(II)-Ionen aus dem aktiven Zentrum (**Veröffentlichung II**).

2. Material & Methoden

Diese publikationsbasierte Dissertation beruht auf zwei wissenschaftlichen Arbeiten (Köhler et al., 2021a; Köhler et al., 2021b), in denen verschiedene Methoden unter Angabe der genutzten Chemikalien, Materialien und Geräte im Detail erläutert wurden. Deshalb werden an dieser Stelle nur die konzeptionell wichtigen enzymkinetischen Methoden beschrieben.

2.1 Enzymkinetische Untersuchungen

Enzymkinetische Untersuchungen befassen sich mit der zeitabhängigen Reaktion, die von Enzymen katalysiert werden. Im Fall der hydrolytischen Spaltung der BdPTE von OPs wird die enzymatisch katalysierte Reaktion des Substrats zum Produkt nach dem Formalismus von Leonor Michaelis und Maud Menten (Michaelis et al., 2011) betrachtet (Gleichung 1):



Dabei bindet die BdPTE zunächst das Substrat OP und bildet mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 einen Enzym/Substrat-Komplex. Dieser kann einerseits mit der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} wieder in BdPTE und OP zerfallen oder andererseits mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 das Produkt bilden. Die Rückreaktion (Geschwindigkeitskonstante k_{-2}) wird unter Bedingungen der Anfangsgeschwindigkeit, also bei noch vernachlässigbarer Produktbildung, nicht berücksichtigt (Berg et al., 2017).

Im Zustand der Quasistationarität (engl. „Steady-State“), der sich kurz nach Mischung von Enzym und Substrat einstellt, sind die Geschwindigkeiten von Bildung und Zerfall des Enzym/Substrat-Komplexes gleich, was zu einer linearen Substratabnahme bzw. Produktbildung führt. Nach Gleichsetzung der Bildungsgeschwindigkeit und Zerfallsgeschwindigkeit (Gleichung 2) kann die Beziehung umgestellt (Gleichung 3) und durch die Michaelis-Konstante, K_M (Gleichung 4), vereinfacht beschrieben werden (Gleichung 5):

$$(2) \quad k_1[\text{BdPTE}][\text{OP}] = (k_{-1} + k_2)[\text{BdPTE} \cdot \text{OP}]$$

$$(3) \quad [\text{BdPTE}][\text{OP}]/[\text{BdPTE} \cdot \text{OP}] = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

$$(4) \quad K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1$$

$$(5) \quad K_M[\text{BdPTE} \cdot \text{OP}] = [\text{BdPTE}][\text{OP}]$$

K_M fasst dabei die einzelnen Geschwindigkeitskonstanten zusammen und beschreibt die apparente Affinität des Substrates zum Enzym (Berg et al., 2017).

Mit Hilfe der Massenbilanz (Gleichung 6), bei der die Gesamtkonzentration des Enzyms, $[\text{BdPTE}]_T$, gleich der Konzentration an freiem Enzym $[\text{BdPTE}]$ plus der Konzentration des Enzym/Substrat-Komplex ist,

$$(6) \quad [\text{BdPTE}]_T = [\text{BdPTE}] + [\text{BdPTE} \cdot \text{OP}]$$

kann $[\text{BdPTE}]$ in Gleichung 5 ersetzt werden, woraus sich nach Umformung Gleichung 7 ergibt:

$$(7) \quad [\text{BdPTE} \cdot \text{OP}] = [\text{BdPTE}]_T \frac{[\text{OP}]}{[\text{OP}] + K_M}$$

Wird anschließend die Definition der Katalysegeschwindigkeit (Gleichung 8) mit der Gleichung 7 verknüpft, ergibt sich Gleichung 9 und daraus die Michaelis-Menten Gleichung (Gleichung 10), welche die anfänglichen Umsatzgeschwindigkeit v_0 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration $[\text{OP}]$ beschreibt (Berg et al., 2017):

$$(8) \quad v_0 = k_2 [\text{BdPTE} \cdot \text{OP}]$$

$$(9) \quad v_0 = k_2 [\text{BdPTE}]_T \frac{[\text{OP}]}{[\text{OP}] + K_M}$$

$$(10) \quad v_0 = v_{\max} \frac{[\text{OP}]}{[\text{OP}] + K_M}$$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, v_{\max} , liegt vor, wenn bei sehr hoher Substratkonzentration, $[\text{OP}] \gg K_M$, alle katalytischen Bindungsstellen des eingesetzten Enzyms gesättigt sind, also $[\text{BdPTE} \cdot \text{OP}] = [\text{BdPTE}]_T$:

$$(11) \quad v_{\max} = k_2 [\text{BdPTE}]_T$$

In Gleichung 11 kann k_2 allgemeiner als katalytische Konstante, k_{cat} , bzw. als Wechselzahl (Turnover Number) bezeichnet werden (Berg et al., 2017).

Das Verhältnis aus k_{cat} und K_M wird dagegen als katalytische Effizienz beschrieben (Gleichung 12). Dies ist die Geschwindigkeitskonstante für die einfache Reaktion zweiter Ordnung, die sich bei sehr niedriger Substratkonzentration, $[\text{OP}] \ll K_M$, ergibt (Berg et al., 2017):

$$(12) \quad v_0 = \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} [\text{BdPTE}]_T [\text{OP}]$$

In der praktischen Anwendung der Michaelis-Menten-Kinetik führt dies zu zwei Situationen:

(a) Im Fall von Substraten, deren (Hydrolyse-)produkt spektroskopisch direkt quantifizierbar ist, können k_{cat} und K_M durch Messung der Anfangsgeschwindigkeit unter Variation der Substratkonzentration nach Michaelis-Menten bestimmt werden. Ein Beispiel dafür ist die Hydrolyse von Paraoxon durch die BdPTE-Mutante 10-2-C3(C59M/C227A), wie in Abschnitt 2.5 und Veröffentlichung II beschrieben (Köhler et al., 2021b).

(b) Wenn die Geschwindigkeit der Produktbildung dagegen nicht unmittelbar quantifizierbar ist, wie bei den meisten neurotoxikologisch relevanten OPs, bietet sich die Möglichkeit, den Abfall der Substratkonzentration im Verlauf der enzymkatalysierten Hydrolyse zu bestimmen. Dies kann beispielsweise durch Messung der verbliebenen inhibitorischen OP-Aktivität gegenüber der AChE zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen, wie in Abschnitt 2.4 näher erläutert wird und in Veröffentlichung I (Köhler et al., 2021a) praktiziert.

In diesem zweiten Fall, also bei nennenswertem Substratumsatz, ist es erforderlich, die Michaelis-Menten-Gleichung über die Zeit zu integrieren (Bisswanger, 2000; Gleichung 2.33):

$$(13) \quad K_M \ln \frac{[OP]_0}{[OP]} + [OP]_0 - [OP] = v_{max} t$$

$[OP]_0$ und $[OP]$ definieren die Substratkonzentration zum Zeitpunkt 0 (d. h. ohne Umsatz) und zur Zeit t . $[OP]_0 - [OP]$ kann gegen $[P]$, also die Produktkonzentration zum Zeitpunkt t , ersetzt werden:

$$(14) \quad \frac{v_{max}}{K_M} t = \ln \frac{[OP]_0}{[OP]} + \frac{[P]}{K_M}$$

Unter der Annahme $[P] \ll K_M$ lässt sich diese Gleichung weiter vereinfachen (Dawson et al., 2008):

$$(15) \quad \ln [OP] \approx \ln [OP]_0 - \frac{v_{max}}{K_M} t$$

Gleichung 15 zeigt, dass $\ln[OP]$ linear gegenüber der Zeit mit der Steigung v_{max}/K_M abfällt. Diese Steigung kann als Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung (k_{obs}) für die logarithmische Abnahme der OP-Konzentration angesehen werden:

$$(16) \quad k_{obs} = v_{max}/K_M$$

In Verbindung mit Gleichung 11 (hier k_{cat} statt k_2) kann daraus folgende Formel zur Berechnung der katalytischen Effizienz des OP-Umsatzes abgeleitet werden:

$$(17) \quad \frac{k_{\text{cat}}}{K_M} = \frac{k_{\text{obs}}}{[\text{BdPTE}]_T}$$

Das heißt, mittels Messung von k_{obs} für die BdPTE in einer anschließenden Inhibitionsanalyse der AChE kann die katalytische Effizienz der vorgelagerten enzymatischen Hydrolyse eines OP nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit dem OP-abbauenden Enzym bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.4).

2.2 Enzymhemmung

Die katalytische Aktivität eines Enzyms kann durch andere Liganden wie Co-Faktoren, Hemmstoffe oder Aktivatoren sowie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke beeinflusst werden. Hemmstoffe binden irreversibel oder reversibel an spezifische Zentren des Enzyms und können die Reaktionsgeschwindigkeit stark herabsetzen. Irreversible Hemmstoffe gehen mitunter kovalente Bindungen mit dem Enzym ein und verursachen einen permanenten Verlust der Enzymaktivität, wohingegen reversible Hemmstoffe vom Enzym abgelöst werden können (Bisswanger, 2000).

Bei der reversiblen Inhibition können drei verschiedene Hemmtypen unterschieden werden: kompetitive Hemmung, nicht-kompetitive Hemmung und unkompetitive Hemmung. Die Hemmtypen können anhand der Hemmkonstante K_i unterschieden werden, die bei der Messung der Katalysegeschwindigkeiten der BdPTE ($\Delta[\text{P}]/\Delta t$) bei verschiedenen OP-Konzentrationen ($[\text{OP}]$) und Inhibitor-Konzentrationen ($[\text{I}]$) bestimmt werden kann. K_i beschreibt die Affinität des Enzyms gegenüber dem Inhibitor und ist ein Maß für die Stärke der Inhibition: je niedriger der K_i -Wert, umso stärker ist die Hemmung der BdPTE durch den Inhibitor (Berg et al., 2017).

Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor mit dem OP um dessen Bindungsstelle am aktiven Zentrum der BdPTE. Folglich kann der Inhibitor bei einer erhöhten Substratkonzentration von der Bindungsstelle verdrängt und die maximale, ungehemmte, Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden. Der in Anwesenheit des kompetitiven Inhibitors

auftretende („*apparente*“) K_M -Wert des Enzyms, K_M^{app} , nimmt dabei zu, währenddessen v_{max} konstant bleibt (Gleichung 18) (Berg et al., 2017).

$$(18) \quad \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{v_{\text{max}} \cdot [OP]}{K_M^{\text{app}} + [OP]} \quad K_M^{\text{app}} = K_M \frac{1 + [I]}{K_i}$$

Die nicht-kompetitive oder allosterische Hemmung erfolgt üblicherweise, wenn der Inhibitor an einer anderen Bindungsstelle als dem katalytischen Zentrum der BdPTE bindet und indirekt die OP-Bindung oder die Katalyse behindert. Hierbei kann der Inhibitor durch eine erhöhte Substratkonzentration nicht verdrängt und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht erreicht werden. In diesem Fall bleibt K_M konstant, wohingegen sich die auftretende v_{max} ($v_{\text{max}}^{\text{app}}$) verringert (Gleichung 19) (Berg et al., 2017).

$$(19) \quad \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{v_{\text{max}}^{\text{app}} \cdot [OP]}{K_M + [OP]} \quad v_{\text{max}}^{\text{app}} = \frac{v_{\text{max}}}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Im Fall der unkompetitiven Hemmung wird der Hemmstoff dagegen erst vom Enzym-Substrat-Komplex gebunden und dadurch kein Produkt oder das Produkt nur verlangsamt ausgebildet. Hierbei senkt der unkompetitive Inhibitor v_{max} und K_M gleichermaßen (Berg et al., 2017).

Darüber hinaus können gemischte Formen zwischen zwei verschiedenen Hemmtypen auftreten (Bisswanger, 2000). Bei der gemischten Inhibition (Gleichung 20) kann der Hemmtyp der Inhibition mit Hilfe des Parameter α nachfolgendem Grundsatz bestimmt werden: wenn α gleich 1 ist, wird von einer nicht-kompetitiven Hemmung ausgegangen. Ist α sehr groß oder sehr klein (aber größer als 0), trifft eine kompetitive oder eine unkompetitive Hemmung zu (Copeland, 2013).

$$(20) \quad \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{v_{\text{max}}^{\text{app}} \cdot [OP]}{K_M^{\text{app}} + [OP]} \quad v_{\text{max}}^{\text{app}} = \frac{v_{\text{max}}}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}} \quad K_M^{\text{app}} = \frac{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}}$$

2.3 Verwendete Materialien für die enzymkinetischen Untersuchungen

2.3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Acetylthiocholiniodid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Cobalt(II)sulfat-Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cysteaminhydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Humanes Serumalbumin ($\geq 96\%$, rekombinant exprimiert in Reis)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Iodacetamid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutathion reduziert	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Meerschweinchen Serumalbumin ($\geq 96\%$)	Equitech-bio, Kerrville, TX
Natriumchlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nervenkampfstoffe (0,1 % (v/v) in Acetonitril): A1, A3, V1, V2, V3, V5, V6, V7, V10, Amiton, VX, VR, CVX, GA, GB, GD, GF	Verteidigungsministerium, Berlin, Deutschland
Paraoxon-ethyl	LGC standards, Wesel, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zinksulfat Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2 Präparation der Acetylcholinesterase (AChE) aus humanen Erythrozyten

Die Membran der roten Blutkörperchen (Erythrozyten) besteht aus Lipiden mit Proteinen und spezifischen membranständigen Enzymen, darunter die AChE, deren katalytische Domäne sich auf der äußeren Oberfläche der Erythrozytenmembran befindet (Herz & Kaplan, 1973). Die hämoglobinfreien Erythrozytenmembranen wurden nach der von (Dodge et al., 1963) beschriebenen Methode mit geringen Modifikationen (Worek et al., 2002; Bierwisch et al., 2014) isoliert und für nachfolgend beschriebene photometrische Untersuchungen als AChE-Quelle verwendet.

Hierzu wurde zunächst 10 mL heparinisiertes humanes Vollblut zentrifugiert ($3000 \times g$, 10 min) und dadurch das humane Plasma von den sedimentierten Erythrozyten abgetrennt. Die Erythrozyten wurden anschließend dreimal hintereinander gewaschen. Dazu wurden die Erythrozyten jeweils im Volumenverhältnis 1:2 in 0,1 M KP_i pH 7,4 resuspendiert, zentrifugiert ($3000 \times g$, 10 min) und der Überstand verworfen. Um die Hämolyse der gewaschenen Erythrozyten herbeizuführen, wurden diese im Volumenverhältnis 1:20 in hypo-osmolarem KP_i (6,7 mM, pH 7,4) resuspendiert, bei $50.000 \times g$ (30 min, 4 °C) ultrazentrifugiert und der

Überstand verworfen. Dies wurde zweimal mit 6,7 mM KP_i pH 7,4 bzw. 0,1 M KP_i pH 7,4 bei 50,000 x g (30 min, 4 °C) wiederholt und abschließend die Erythrozytenmembranen in 3 mL 0,1 M KP_i pH 7,4 resuspendiert.

Die initiale AChE-Aktivität der hämoglobinfreien Erythrozytenmembran wurde photometrisch bei 37 °C für 1 min im UV-2600 Photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei einer Wellenlänge von 412 nm bestimmt. Hierzu wurde 10 µL resuspendierten hämoglobinfreien Erythrozytenmembran zu 3 mL 0,1 M KP_i pH 7,4, 100 µL 10 mM DTNB und 50 µL 28,4 mM Acetylthiocholin (ATCh) gegeben, photometrisch vermessen und die Steigung (mA/min) aus den detektierten Adsorptionen innerhalb der 1 min Messzeit berechnet. Abschließend wurde die AChE-Suspension mit 0,1 M KP_i pH 7,4 bis zu einer Endadsorption von ~200 mA/min verdünnt. Die so präparierte AChE wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Aufgetaute AChE-Aliquots wurden vor ihrer Verwendung zweimal für 5 Sekunden (s), mit 30 s Pause, mit dem Sonoplus HD 2070 Ultrasonic Homogenator (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) beschallt, um sedimentierte Erythrozytenmembranen zu homogenisieren und eine gleichmäßige AChE-Matrix für die kinetischen Studien zu bewirken.

2.3.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Vacutainer Röhrchen, 17 IU/mL Lithium-Heparin, 10 mL	BD, Franklin Lakes, NJ
Slide-A-Lyzer MINI Dialysegerät, 10 K MWCO, 0,5 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Plümpers, Rührstäbchen	Selzer GmbH, Waghäusel, Deutschland
VWR Küvette PS, macro	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturplatte, 96-Well, PS, flacher Boden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.3.4 Geräte

Geräte	Hersteller
IKA, DBH 1, Trockenblockerhitzer	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
IKA Vortex, Genius 3	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland

Infinite M200 PRO, Plattenlesegerät	Tecan, Wien, Österreich
ThermoMixer C, Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Rotina 420R	Hettich, Kirchleugern, Deutschland
Ultrasonic Homogenator	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima XPN-100	Beckman-Coulter, Brea, CA
UV-2600, Photometer	Shimadzu, Kyoto, Japan

2.3.5 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramm/Datenbank	Hersteller/Quelle
BioVia Draw 18.1 für das Zeichnen von chemischen Strukturen und Reaktionen	Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, Frankreich
ChemDraw 20.1, Professional zum Zeichnen von chemischen Strukturen und Reaktionen	PerkinElmer, Waltham, MA
GraphPad Prism 5.04 für enzymkinetische Analysen und Graphiken	GraphPad Software, La Jolla, CA
UVProbe Ver. 2.5.1 Anwendungssoftware für UV-VIS Spektralphotometer	Shimadzu Software, Kyoto, Japan
NBCI (PubMed) Literaturdatenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov
UniProt Proteindatenbank	www.uniprot.org

2.4 Bestimmung der katalytischen Enzymaktivität verschiedener BdPTEs durch AChE-Inhibitionsassay

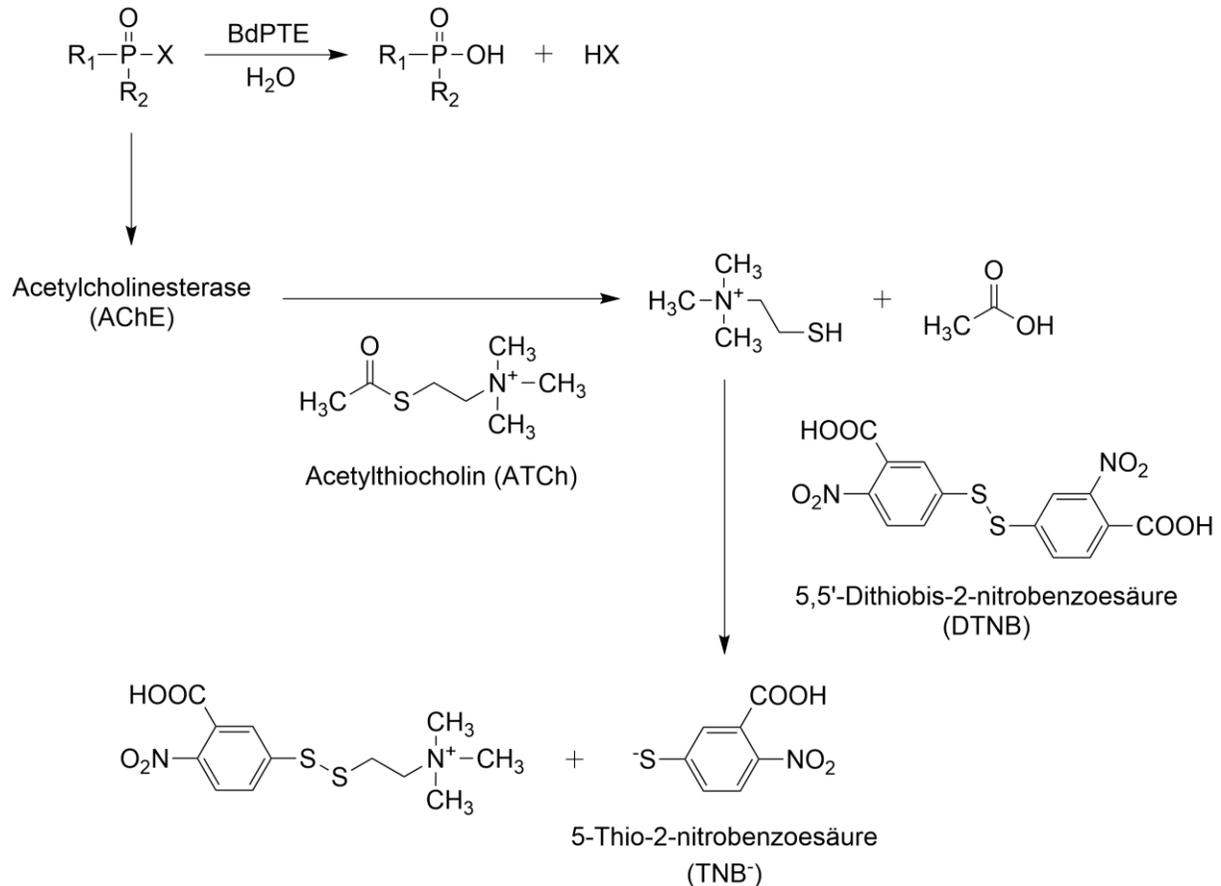


Abbildung 5: Reaktionsschema des AChE-Inhibitionsassay zur Bestimmung der katalytischen Effizienz verschiedener BdPTEs.

Um die katalytische Effizienz der verschiedenen BdPTE-Varianten gegenüber Nervenkampfstoffen des G-Typs und V-Typs sowie Amiton-OP-Analogen zu bestimmen, wurde der AChE-Inhibitionsassay angewendet (Ellman et al., 1961). Dieser dient zur Quantifizierung der nach Umsatz mit der BdPTE verbliebenen inhibitorischen OP-Konzentration in einem vorgelagerten Ansatz (Abb. 5, oben) und beruht selbst auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen (Abb. 5, Mitte und unten). Zunächst findet eine durch die AChE katalysierte Hydrolyse von Acetylthiocholin (ATCh) statt. Die freie Thiol-Gruppe des daraus resultierenden Produkts Thiocholin reagiert (unkatalysiert) mit Ellman-Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure; DTNB), wobei das chromogene Produkt 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB^-) entsteht, das anschließend bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Katalysereaktion der AChE wird in Gegenwart des

OP gehemmt, was hier genutzt wird, um die verbliebene OP-Substratkonzentration nach verschiedenen Zeiten der vorgelagerten Hydrolyse durch die BdPTE zu ermitteln. Wie im Abschnitt 2.1 dargelegt, lässt sich auf diese Weise die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) der BdPTE gegenüber verschiedenen OPs bestimmen.

Hierzu wurde zunächst 500 μL des jeweiligen OP in TN-Puffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8) mit 100 μL einer geeigneten BdPTE-Verdünnung in TN-Puffer gemischt und bei 37 °C unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. Hierbei ist zu beachten, dass für jede Kombination aus Enzymmutante und OP verschiedene Konzentrationen verwendet wurden (Tabelle 1), um optimale Regressionsanalysen nachfolgend zu gewährleisten. Nach definierten Inkubationszeitpunkten (1, 7, 14, 20, 30, 45, 60, 90, und 120 min) wurde dem Inkubationsansatz jeweils 50 μL entnommen und in einer Küvette mit 3 mL 0,1 M KPi pH 7,4 sowie 100 μL 10 mM DTNB in 0,1 M KPi pH 7,4 versetzt. Die Ellman-Reaktion wurde daraufhin durch Zugabe von 50 μL 28,4 mM ATCh und 10 μL AChE aus Erythrozytenmembranen (siehe Abschnitt 2.3.2) initiiert und bei 37 °C für 5 min in einem UV-2600 Photometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) bei einer Wellenlänge von 412 nm verfolgt.

Die zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten mit der BdPTE (t_{OPH}) aufgenommenen AChE-Aktivitätskurven wurden zunächst durch nicht-lineare Regression mittels Prism (Version 5.04. GraphPad Software, San Diego, CA) analysiert, um die Pseudokonstante 1. Ordnung $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ der partiell inhibierten AChE-Katalyse zu bestimmen (Abbildung 6, A). $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ ist abhängig von der noch vorhandenen OP-Inhibitorkonzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit der BdPTE, welche von der Effizienz und Dauer der katalysierten OP-Hydrolyse abhängt. Zur Ermittlung der apparenten Geschwindigkeitskonstante der OP-Hydrolyse durch die BdPTE, hier bezeichnet als k_{OPH} (entsprechend k_{obs} in Gleichung 15), wurden in einem neuen Diagramm die zuvor bestimmten $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ -Werte gegenüber den Inkubationszeitpunkten der BdPTE aufgetragen und mittels nicht-linearer Regression durch exponentiellen Abfall mit Prism angepasst (Abbildung 6 B). Mit Hilfe des daraus resultierenden Wertes für k_{OPH} konnte abschließend k_{cat}/K_M anhand von Gleichung 17 (siehe Abschnitt 2.1.) für jede Kombination aus BdPTE-Mutante und OP-Substrat berechnet werden

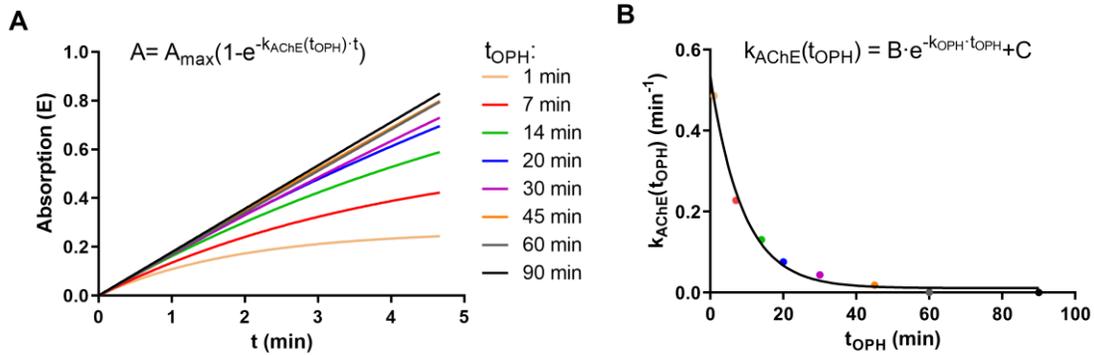
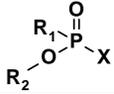


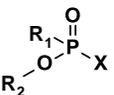
Abbildung 6: Im linken Graph (A) sind die Primärdaten der AChE-Aktivität dargestellt, gewonnen aus dem Inkubat aus BdPTE und OP zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Unter Verwendung der Gleichung (A) wurden die jeweils aufgenommenen AChE-Aktivitäten mittels nicht-linearer Regressionsanalyse durch das Graphikprogramm Prism analysiert. Daraus erhaltene Werte für $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ wurden als Maß der noch vorhandenen inhibitorischen OP-Konzentration in der rechten Grafik (B) gegenüber den jeweiligen Inkubationszeitpunkten der BdPTE-Reaktion aufgetragen und mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand der Gleichung (B) analysiert. Der daraus berechnete k_{obs} -Wert wurde anschließend mit Hilfe der verwendeten Enzymkonzentration und Gleichung 17 (Abschnitt 2.1) zur Berechnung der katalytischen Effizienz der BdPTE-Mutante verwendet.

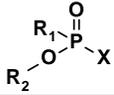
Tabelle 1: Angegeben sind die Strukturen der verwendeten OP-Substrate und deren relevante Substituenten sowie die verwendeten OP- und BdPTE-Konzentrationen in [M] in den jeweiligen Inkubationsansätzen für die quantitative Bestimmung der katalytischen Aktivität mittels AChE-Inhibitionsassay.

	A1	A2 (Amiton)	A3
X	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]	S-[2-(diethylamino)ethyl]	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
[OP]	1.3×10^{-4}	7.5×10^{-5}	2.1×10^{-4}
[BdPTE-1]	1.80×10^{-7}	3.60×10^{-6}	3.60×10^{-6}
[BdPTE-2]	5.96×10^{-8}	3.58×10^{-7}	1.07×10^{-7}
[BdPTE-3]	3.42×10^{-7}	6.83×10^{-7}	3.42×10^{-6}
[BdPTE-4]	1.50×10^{-7}	5.01×10^{-7}	7.52×10^{-7}
[BdPTE-5]	4.00×10^{-7}	2.00×10^{-6}	2.00×10^{-6}
[BdPTE-6]	4.71×10^{-7}	4.71×10^{-7}	4.71×10^{-7}
[BdPTE-7]	1.14×10^{-6}	2.28×10^{-6}	2.28×10^{-6}

	Tabun	Sarin	Cyclosarin	Soman
R1	O-ethyl	Methyl	Methyl	Methyl
R2	Dimethylamino	O-isopropyl	O-cyclohexyl	O-pinacolyl
X	CN	F	F	F
[OP]	2.5×10^{-5}	1.3×10^{-5}	0.8×10^{-6}	1.7×10^{-6}
[BdPTE-1]	1.28×10^{-9}	3.00×10^{-9}	7.21×10^{-8}	4.34×10^{-8}
[BdPTE-2]	3.50×10^{-10}	8.90×10^{-10}	2.68×10^{-8}	1.79×10^{-8}
[BdPTE-3]	1.70×10^{-10}	6.80×10^{-10}	2.28×10^{-8}	1.14×10^{-8}
[BdPTE-4]	3.76×10^{-10}	7.52×10^{-10}	1.50×10^{-8}	1.07×10^{-8}
[BdPTE-5]	9.90×10^{-10}	4.44×10^{-9}	9.99×10^{-9}	5.00×10^{-8}
[BdPTE-6]	1.18×10^{-9}	3.92×10^{-9}	9.41×10^{-9}	5.89×10^{-8}
[BdPTE-7]	5.71×10^{-10}	7.61×10^{-10}	1.10×10^{-8}	2.85×10^{-8}

	V1	V2	V3
R1	Ethyl	Ethyl	Ethyl
R2	Ethyl	Ethyl	Ethyl
X	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]	S-[2-(diethylamino)ethyl]	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
[OP]	0.8×10^{-5}	1.7×10^{-5}	3.3×10^{-5}
[BdPTE-1]	6.00×10^{-9}	1.20×10^{-8}	3.00×10^{-8}
[BdPTE-2]	7.60×10^{-10}	1.07×10^{-9}	1.07×10^{-8}
[BdPTE-3]	1.70×10^{-9}	3.41×10^{-9}	1.71×10^{-8}
[BdPTE-4]	2.51×10^{-9}	5.01×10^{-9}	3.76×10^{-8}
[BdPTE-5]	3.99×10^{-9}	7.99×10^{-9}	2.00×10^{-8}
[BdPTE-6]	8.56×10^{-9}	1.68×10^{-8}	4.71×10^{-8}
[BdPTE-7]	3.81×10^{-9}	6.52×10^{-9}	1.90×10^{-8}

	V4 (VX)	V5	V6	V7
R1	Methyl	Methyl	Methyl	Methyl
R2	Ethyl	Ethyl	Ethyl	Ethyl
X	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]	S-[2-(di-n-propylamino)ethyl]	S-[2-(diethylamino)ethyl]	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
[OP]	3.3×10^{-6}	4.2×10^{-6}	6.7×10^{-6}	2.5×10^{-5}
[BdPTE-1]	1.80×10^{-8}	1.80×10^{-8}	1.80×10^{-8}	1.45×10^{-8}
[BdPTE-2]	4.47×10^{-9}	6.70×10^{-9}	5.96×10^{-9}	1.92×10^{-8}
[BdPTE-3]	3.41×10^{-9}	1.71×10^{-8}	6.83×10^{-9}	4.27×10^{-8}
[BdPTE-4]	2.51×10^{-9}	7.52×10^{-9}	4.42×10^{-9}	1.88×10^{-8}
[BdPTE-5]	5.71×10^{-9}	2.50×10^{-8}	7.99×10^{-9}	6.66×10^{-8}
[BdPTE-6]	7.84×10^{-9}	3.14×10^{-8}	2.35×10^{-8}	1.57×10^{-7}
[BdPTE-7]	5.50×10^{-9}	1.14×10^{-8}	1.14×10^{-8}	2.85×10^{-8}

	V8 (VR)	V9 (CVX)	V10
R1	Methyl	Methyl	Methyl
R2	Isobutyl	n-butyl	Methyl
X	S-[2-(diethylamino)ethyl]	S-[2-(diethylamino)ethyl]	S-[2-(diethylamino)ethyl]
[OP]	0.8×10^{-6}	0.8×10^{-6}	2.1×10^{-5}
[BdPTE-1]	1.80×10^{-7}	3.44×10^{-8}	3.60×10^{-7}
[BdPTE-2]	1.79×10^{-8}	1.79×10^{-8}	1.07×10^{-7}
[BdPTE-3]	2.28×10^{-8}	1.71×10^{-8}	1.37×10^{-7}
[BdPTE-4]	1.50×10^{-8}	1.50×10^{-8}	1.88×10^{-7}
[BdPTE-5]	6.66×10^{-9}	6.66×10^{-9}	5.71×10^{-8}
[BdPTE-6]	5.54×10^{-9}	9.42×10^{-9}	2.35×10^{-7}
[BdPTE-7]	7.61×10^{-9}	7.61×10^{-9}	9.13×10^{-8}

2.5 Untersuchungen der Hemmung von BdPTE durch Plasmaproteine mit Paraoxon-ethyl

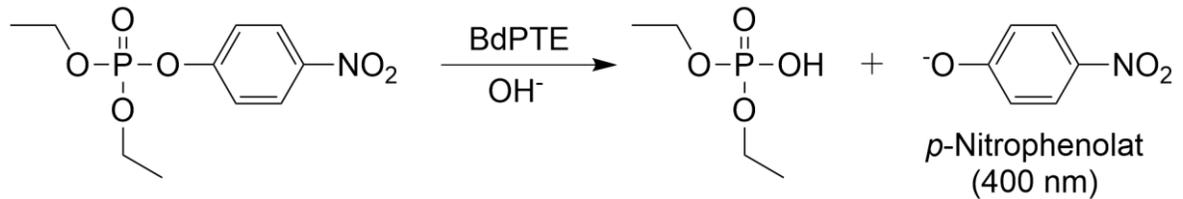


Abbildung 7: Hydrolyse von PXE unter Freisetzung der chromogenen Abgangsgruppe *p*-Nitrophenol durch die BdPTE.

Die Enzymhemmung durch Plasmakomponenten wurde mit der oxidativ stabilisierten BdPTE Mutante 10-2-C3(C59M/C227A) photometrisch nach Michaelis-Menten untersucht. Neben der normalerweise im aktiven Zentrum Zink(II)ionen beladenen Variante (Dumas et al., 1989; Vanhooke et al., 1996; Raushel, 2002) wurde die BdPTE 10-2-C3(C59M/C227A) alternativ mit Cobalt(II)ionen beladen und ebenfalls getestet (Bigley et al., 2013).

Aufgrund des direkt möglichen photometrischen Nachweises und der Analyse nach Michaelis und Menten (siehe Abschnitt 2.1) wurde das Insektizid Paraoxon-ethyl (PXE) als Substrat verwendet. Von PXE wird durch BdPTE hydrolytisch die chromogene Abgangsgruppe *p*-Nitrophenolat abgespalten, welche eine photometrische Bestimmung bei 400 nm ermöglicht (Abbildung 7). Die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Substratumsetzung wurde in Anwesenheit der Inhibitoren Cysteamin (0, 10, 50, 100 μM), L-Glutathion (0, 10, 80, 400 μM) oder Serumalbumin (0, 50, 150, 350 μM) bei 37 °C für 10 min in 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl in einer 96-Well Mikrotiterplatte (PS, flat bottom; s. Abschnitt 2.2.3) im Infinite M200 PRO Photometer bestimmt.

Die Inhibitionsstudien mit Cysteamin, L-Glutathion oder nicht-modifizierten humanem Serumalbumin (HSA) wurden mit verschiedenen PXE Konzentrationen (0,1, 0,5, 1, 3, 5, 8 mM) in einem Gesamtvolumen von 250 μL durchgeführt. Weitere Inhibitionsstudien mit modifizierten HSA oder Meerschweinchen Serumalbumin (GSA) fanden mit 0,3, 1, 4 oder 8 mM PXE in einem Gesamtvolumen von 130 μL statt. Optional wurde für diese Untersuchungen 4 mM HSA mit 40 mM Iodacetamid in 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl bei Raumtemperatur für 2,5 Stunden inkubiert gefolgt von einer Dialyse gegen 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, um das freie Cys-34 zu alkylieren, oder HSA wurde mit 4 mM ZnSO_4 für 5 min inkubiert und dialysiert gegen 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, um frei Zink-Bindungsstellen von HSA zu belegen. Initiiert wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 μL der BdPTE

10-2-C3(C59M/C227A) mit einer Endkonzentration von 100 pM (Gesamtvolumen 250 μL) bzw. 250 pM (Gesamtvolumen 130 μL).

Die Konzentration des freigesetzten p-Nitrophenols wurde mit Hilfe des Lambert Beer'schen-Gesetzes (Gleichung 21) aus der gemessenen Absorption (A_{400}) mit der verwendeten Schichtdicke (d ; 0,7 bzw. 0,3 cm) und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) von $14,938 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omburo et al., 1992) berechnet.

$$(21) \quad A_{400 \text{ nm}} = \epsilon cd$$

Die resultierenden zeitabhängigen p-Nitrophenol-Konzentrationen wurden durch nicht-lineare Regression (Prism Version 5.04) analysiert, daraus berechnete Anfangsgeschwindigkeiten ($\Delta[\text{P}]/\Delta t$) gegenüber der eingesetzten PXE-Substratkonzentrationen aufgetragen und entsprechend den Hemmtypen der nicht-kompetitiven Inhibition (Cysteamin, L-Glutathion, modifiziertes HSA) oder der gemischten Inhibition (HSA, GSA) nach Michaelis-Menten mit Hilfe des Graphikprogramms Prism ausgewertet (siehe Abschnitt 2.2 und Abbildung 8).

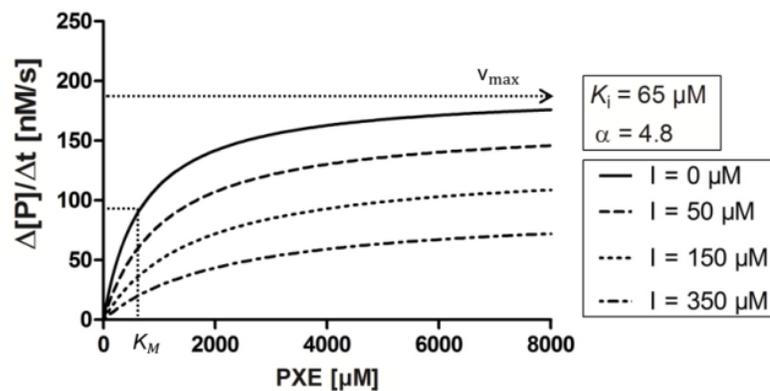


Abbildung 8: Eine beispielhafte graphische Darstellung für die nicht-lineare Regression einer gemischten oder nicht-kompetitiven Hemmung erstellt durch das Grafikprogramm Prism.

3. Veröffentlichungen

Die in dieser kumulativen Dissertation eingebrachten wissenschaftlichen Artikel wurden durch Gutachter im Auftrag der jeweiligen Fachzeitschrift geprüft (engl.: Peer Review).

3.1 Veröffentlichung I: **Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro**

Diese wissenschaftliche Publikation wurde am 23. Juni 2021 (online Version) in der Fachzeitschrift "Archives of Toxicology" veröffentlicht.

Zitat:

Köhler, A., Escher, B., Job, L., Koller, M., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F. 2021. Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. Arch Toxicol 95, 2815-2823. Doi: 10.1007/s00204-021-03094-0.

Zusammenfassung der Veröffentlichung I:

Trotz weitreichender Entwicklung des rekombinanten Enzym BdPTE ist dessen therapeutische Anwendung als katalytischer Bioscavenger aufgrund seiner Substratspezifität und der kurzen Plasma-Halbwertszeit begrenzt. Die oxidativ stabilisierte Variante 10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200) (BdPTE-4) wie auch das neu konstruierte Heterodimer C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200) (BdPTE-7), beide modifiziert durch PASylation, sind dagegen vielversprechende Kandidaten für zukünftige Untersuchungen *in vivo*.

In dieser Publikation wurden die zuvor beschriebenen Varianten BdPTE-4 und BdPTE-7 sowie fünf nicht PASylierte Vorläufer-Varianten gegenüber drei Amiton-OP-Analogen, vier G-Typ- und 10 V-Typ-Nervenkampfstoffen enzymkinetisch charakterisiert und die resultierenden k_{cat}/K_M -Werte zur Einschätzung des individuellen Substratprofils miteinander verglichen. Zusätzlich wurde die stereoselektive Hydrolyse von VX durch BdPTE-4 und BdPTE-7 mittels chiraler LC-MS/MS analytisch untersucht und daraufhin die mögliche Anwendung der Bioscavenger *in vivo* anhand theoretischer Betrachtungen diskutiert.

Die enzymkinetischen Untersuchungen der BdPTE-4 und BdPTE-7 im gekoppelten Assay mit AChE belegten hohe Effizienz ($k_{cat}/K_M \geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) gegenüber G-Typ- und V-Typ-Nervenkampfstoffen, welche vergleichbar oder leicht verbessert gegenüber ihrer jeweiligen Vorläufer-Varianten sind. Das Heterodimer BdPTE-7 besitzt aufgrund der Fusion zweier verschiedener PTE-Monomere ein erheblich erweitertes Substratspektrum. Die analytischen Untersuchungen zeigten zudem eine stereoselektive Hydrolyse des toxischen P(-) VX-Enantiomers für beide Enzyme auf.

Die Ergebnisse dieser Veröffentlichung zeigen das Potential für eine therapeutische Anwendung bei geringen Enzymdosierungen auf, welche neben der möglichen vermutlich verlängerten Plasma-Halbwertszeit dieser BdPTEs durch Untersuchungen *in vivo* künftig zu bestätigen ist.

Beitrag des Autors zu dieser wissenschaftlichen Veröffentlichung:

Die Erst-Autorin dieser Publikation hat maßgeblich die Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen sowie die Interpretation der Daten ausgeführt. Sie war federführend beim Verfassen des Manuskripts sowie dessen Überarbeitung. Sie führte die enzymkinetische Charakterisierung der verschiedenen BdPTE Varianten sowie die Probenvorbereitung für die stereoselektiven Analysen durch. Die chiralen Quantifizierungen mittels LC-MS/MS wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr von Frau Dr. Koller durchgeführt. Die verwendeten BdPTE-Varianten, BdPTE-1 bis BdPTE-7, wurden vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM unter Leitung von Prof. Dr. Arne Skerra durch Frau Job und Herrn Escher entwickelt und produziert.

3.2 Veröffentlichung II: Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components

Diese wissenschaftliche Publikation wurde am 22. Juli 2021 (online Version) in der Fachzeitschrift "Toxicology Letters" veröffentlicht.

Zitat:

Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A. 2021. Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components. *Toxicol Lett* 350, 194-201. Doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.011

Zusammenfassung der Veröffentlichung II:

In einem Tiermodell zum Nachweis therapeutischer Effizienz der BdPTE C23AL nach einer Nervenkampfstoffvergiftung mit VX wurde in einer Vorpublikation eine verringerte Enzymaktivität *in vivo* im Vergleich zu Untersuchungen *in vitro* festgestellt. Dies wurde durch unspezifische Bindungen oder Adsorption des Enzyms an Plasmaproteine erklärt. Serumalbumin ist das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein und unter anderem ein Transportprotein für essenzielle Metallionen wie Zink. Demnach waren Wechselwirkungen zwischen Serumalbumin und den zwei im aktiven Zentrum gebundenen Zink(II)ionen der BdPTE denkbar, welche hemmenden Einfluss auf die katalytische Effizienz des Enzyms *in vivo* haben könnte.

Diese Publikation untersuchte mittels enzymkinetischer Messungen die potenzielle Inhibition durch zink komplexierende Plasmakomponenten, wie Cysteamin, L-Glutathion sowie Serumalbumin verschiedener Spezies gegenüber der oxidativ stabilisierten Variante BdPTE 10-2-C3(C59A/C227M). Als Ergebnis wurde für das humane- wie auch das Meerschweinchen-Serumalbumin inhibitorische Wirkung auf BdPTE 10-2-C3(C59A/C227M) festgestellt, wohingegen die Hemmung des Enzyms durch Cysteinamin und reduziertem L-Glutathion unter den relevanten Konzentrationen unbedeutend war. Die Verwendung der BdPTE 10-2-C3(C59A/C227M) beladen mit Cobalt(II)ionen statt Zink(II)ionen im aktiven Zentrum führte zu einer leicht geringeren Hemmung durch HSA.

Weitere Inhibitionsstudien zum Inhibitionsmechanismus von HSA gegenüber der Zink-BdPTE zeigten auf, dass dessen Hemmwirkung auf die Abstraktion der bivalenten Zink(II)ionen vom aktiven Zentrum des Enzyms zurückzuführen ist. Die Hemmung wird mutmaßlich durch die

Komplexierung von Zink an der freien Thiolgruppe (Cys 34) oder durch die hochaffine Metall-Bindungsstelle (His 67, Asn 99 und His 247, Asp 249) des Serumalbumins bewirkt. Bestätigt wurde dieser Mechanismus durch chemische Blockierung von Cys 34 oder eine Zink-gesättigte Metall-Bindungsstelle am HSA, welche einzeln jeweils zu verringerter Inhibition führten, während die Kombination beider Maßnahmen die Hemmung der BdPTE durch HSA komplett aufhob. Dieser reversible Inhibitionsmechanismus von HSA gegenüber der BdPTE steht in Einklang mit einer theoretischen Modellrechnung, welche ein kompetitives Gleichgewicht bezüglich Zinkbindung zwischen Enzym und HSA voraussetzt.

Diese Veröffentlichung zeigt, dass Zinkionen essenziell für die katalytische Aktivität der BdPTE sind und die im Blut verfügbare Zinkkonzentration für die weitere Entwicklung bzw. die pharmazeutische Formulierung und therapeutische Anwendung von katalytischen Bioscavengern *in vivo* berücksichtigt werden sollte.

Beitrag des Autors zu dieser wissenschaftlichen Veröffentlichung:

Die Erst-Autorin dieser Publikation war maßgeblich an der Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen. Sie führte die Inhibitionsexperimente selbst durch, analysierte bzw. interpretierte die erhaltenen Daten und war federführend beim Verfassen des Manuskripts sowie dessen Überarbeitung. Die Herstellung der optimierten BdPTE 10-2-C3(C59A/C227M) wurde vom Lehrstuhl für Biologische Chemie der TUM unter Leitung von Prof. Dr. Arne Skerra von Frau Job durchgeführt; das vereinheitlichte enzymkinetische Modell bei kompetitiver Zinkbindung durch Albumin stammte von Prof. Dr. Arne Skerra.

4. Diskussion

Wichtige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Therapie mit katalytischen Bioscavengern nach einer OP-Vergiftung sind zum einen ein hoher k_{cat}/K_M -Wert der Enzyme gegenüber strukturell unterschiedlichen OPs bei einem breiten Substratspektrum. Zum anderen ist für eine effektive Behandlung von Vergiftungen durch hydrolytisch stabile OPs wie z. B. V-Typ-Nervenkampfstoffe mit langer Verweilzeit *in vivo* eine ausreichende Plasma-Halbwertszeit des Enzyms nötig (Worek et al., 2016). Zusätzlich sollte eine mögliche Inhibition der BdPTE durch Komponenten des Plasmas berücksichtigt werden, um eine effiziente Therapie sicherzustellen.

4.1 Fortschritte und Schwierigkeiten bei der Entwicklung von BdPTEs mit breitem Substratspektrum

Um eine effiziente Therapie nach OP-Vergiftungen zu gewährleisten, wird in der Literatur ein k_{cat}/K_M -Wert von $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ der BdPTE gegenüber den toxischeren P(-) Enantiomeren der OPs bei einer 1 mg kg^{-1} Enzymdosis gefordert (Ashani et al., 2016; Worek et al., 2016).

Die katalytische Aktivität ist abhängig von der Substraterkennung der BdPTE, welche durch elektrostatische oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Substratbindungstasche des Enzyms und strukturell unterschiedlichen Resten und Abgangsgruppen, bei variierender Stereochemie der OPs beeinflusst wird (Vanhook et al., 1996; Hong & Raushel, 1999a; Bigley et al., 2013; Despotović et al., 2019). Generell werden durch die ursprüngliche bakterielle BdPTE P-S-Bindungen schlechter gespalten als P-O-Bindungen (Lai et al., 1995; Di Sioudi et al., 1999) und die Hydrolyse der ungiftigeren P(+) Enantiomere von OP-Nervenkampfstoffen favorisiert (Hong & Raushel, 1999b; Chen-Goodspeed et al., 2001a; Chen-Goodspeed et al., 2001b; Tsai et al., 2010).

Aufgrund der durch Protein-Engineering angepassten Substrat-Bindungstasche der Varianten C23 und 10-2-C3 bzw. 10-2-C3-I106A, hydrolysierten die BdPTEs die P(-) Enantiomere der Nervenkampfstoffen VX und VR mit unterschiedlicher Leistung. Währenddessen C23 und 10-2-C3 jeweils höhere K_{cat}/K_M -Werte gegenüber VX erzielten, wies die 10-2-C3-I106A eine höhere Aktivität gegenüber VR auf (Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2017). Eine Schlüsselfunktion hat dabei die Mutation I106A. Durch Substitution von Isoleucin an der

Position 106 durch das kleinere Alanin konnte die Substratbindungstasche von BdPTE 10-2-C3-I106A für strukturell größere OPs, wie VR mit dem größeren Isobutyl-Rest, erweitert werden, was in einen verbesserten k_{cat}/K_M -Wert gegenüber VR resultierte. Die gute Wechselwirkung zwischen BdPTE und OPs mit kleineren Resten, wie beobachtet bei den Varianten C23 und 10-2-C3 im Fall des Ethyl-Rests von VX, wurde dabei jedoch verschlechtert und so die enzymatische Aktivität von BdPTE 10-2-C3-I106A im Vergleich zur Variante 10-2-C3 gegenüber VX deutlich verringert (Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016; Goldsmith et al., 2017). Fortgesetzte Bemühungen, die Enzymaktivität hinsichtlich einem erweiterten Substratspektrums mittels computerbasiertem Protein-Engineering zu verbessern, führten allerdings zu sogenannten Optimierungsplateaus (Goldsmith et al., 2017). Dagegen konnte im Rahmen dieser Studie Enzymstabilität erzielt werden (Goldsmith et al., 2017; Job et al., 2020).

In den Untersuchungen der Veröffentlichung I wurden korrespondierende Varianten zu C23, 10-2-C3 und 10-2-C3-I106A (BdPTE-1, BdPTE-2 und BdPTE-5) – ohne N-terminalem Maltosebindendem Protein –, sowie oxidativ-stabilisierte Varianten (BdPTE-3 und BdPTE-6) und mit der PASylation-Technologie modifizierte (BdPTE-4 und BdPTE-7) Enzyme gegenüber einem erweiterten OP-Nervenkampfstoff Substratspektrum charakterisiert. BdPTE-1, BdPTE-2 und BdPTE-5 zeigten, meist übereinstimmend zur Literatur, effiziente Enzymaktivitäten von $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ gegenüber einzelnen G- und V-Typ Nervenkampfstoffen. Der Einfluss der Mutation I106A bei der BdPTE-5 zu VR ist ebenfalls erkennbar (Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016; Goldsmith et al., 2017; Köhler et al., 2021a). Die eingeführten Stabilitätsmutationen C59V und C227V bei den Varianten BdPTE-3 und BdPTE-6 konnten unerwartet vereinzelt Verbesserungen des k_{cat}/K_M -Werts bewirken, wie bei der BdPTE-3 gegenüber VX (Job et al., 2020; Köhler et al., 2021a). Die invertierte stereoselektive Hydrolyse des toxischeren P(-) Enantiomers konnte durch analytische Untersuchungen mit VX-Enantiomeren bei den Varianten BdPTE-4 und BdPTE-7 bestätigt werden. Weitere Verbesserungen hinsichtlich der Enzymaktivität gegenüber einem breiten OP-Spektrum sind nötig, um eine effiziente Breitbandtherapie nach OP-Vergiftungen gewährleisten zu können (Köhler et al., 2021a).

Ein einzelnes Enzym zu entwickeln, welches allein ein breites Substratspektrum abdeckt, ist aufgrund der strukturellen Variationen der OPs jedoch höchst unwahrscheinlich (Worek et al., 2016; Despotović et al., 2019). Alternativ könnten Gemische aus mehreren optimierten BdPTE-Varianten, welche zusammen ein breiteres Substratspektrum abdecken, angewendet werden (Despotović et al., 2019). Nachteil eines solchen Enzyms-Cocktails ist, dass nach GMP (Good Manufacturing Practice)-Richtlinien die Enzyme einzeln produziert und in klinischen Studien

validiert werden müssten, was die Entwicklungs- und Herstellungskosten erheblich erhöht (Lagassé et al., 2017; Escher et al., 2020). Ein vielversprechender Ausweg wurde demgegenüber durch die Entwicklung der BdPTE-Heterodimere geschaffen, bei dessen zwei unterschiedliche Substratspektren, ohne Beeinträchtigung ihrer jeweiligen Enzymaktivität, miteinander verbunden werden (Escher et al., 2020). Dies konnte mit der Veröffentlichung I bestätigt werden. Durch die Fusion der Varianten BdPTE-1 und BdPTE-6 zum Heterodimer BdPTE-7 wurden die spezifischen katalytischen Aktivitäten beider Varianten miteinander kombiniert und damit das OP-Substratspektrum insgesamt vergrößert. Während die einzelnen Mutanten nur jeweils 7 oder 8 verschiedene Nervenkampfstoffe effizient hydrolysieren konnten, konnte das Heterodimer 10 verschiedene Nervenkampfstoffe mit einer Aktivität $\geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ abbauen (Köhler et al., 2021a).

4.2 Möglichkeiten zur Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit von BdPTEs

Persistierende OPs besitzen eine hohe perkutane Toxizität und lange biologische Halbwertszeiten, daher können toxisch relevante Konzentrationen *in vivo* über viele Stunden nachgewiesen werden (Benschop & de Jong, 2001; van der Schans et al., 2003; Tenberken et al., 2010). Die native bakterielle BdPTE besitzt im Blut von verschiedenen Tiermodellen (Maus, Ratte, Meerschweinchen) eine durchschnittlich Plasma-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von weniger als 60 min (Novikov et al., 2010; Zhang et al., 2019; Stigler et al., 2022), und auch optimierte Varianten wie die BdPTE C23 und C23AL, oder die His₆-OPH, zeigen einen $t_{1/2}$ -Wert von nur 120-180 min (Worek et al., 2014; Wille et al., 2016; Efremenko et al., 2017). Eine wirksame Therapie nach OP-Vergiftungen mit persistierenden Substanzen über mehrere Stunden mit verträglichen Enzymkonzentrationen ist daher wahrscheinlich nicht ausreichend gegeben (Worek et al., 2014).

In der Literatur sind verschiedene Methoden beschrieben, um die Zirkulationsdauer der BdPTE im Blutplasma zu verlängern, welche auch schon erfolgreich in Tiermodellen angewendet wurden. Die Modifikation der BdPTE durch Blockcopolymere (Efremenko et al., 2017) oder das Ummanteln der Enzymoberfläche mit einem Poly(carboxybetain)-Polymerfilm, zeigten im Tiermodell drastische Verlängerungen der $t_{1/2}$ von bis zu einer Woche (Zhang et al., 2019), befinden sich jedoch derzeit noch in einem experimentellen Stadium und erscheinen im Hinblick auf eine biopharmazeutische Wirkstoffentwicklung als sehr aufwendig.

Eine in der Pharmaindustrie häufig angewendete und von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassene Methode, um die systemische Zirkulation von Proteinen im Organismus zu verlängern, ist die PEGylierung (Strohl, 2015). Hierbei wird eine synthetische Polymerkette aus Polyethylenglykol (PEG) kovalent an das Enzym gebunden, dadurch das hydrodynamische Volumen des Proteins abhängig von der Länge der Polymerkette vergrößert und folglich die renale Ausscheidung verlängert (Fishburn, 2008; Strohl, 2015). Novikov et al. (2010) konnte nach PEGylierung der BdPTE die $t_{1/2}$ *in vivo* um das 50-fache verlängern. Die katalytische Aktivität sowie die strukturelle und thermische Stabilität des Enzyms wurden dabei nicht beeinflusst. Nachteil der PEGylierung sind neben der kostspieligen Herstellung von PEG-Proteinen die biologisch nicht abbaubaren Polymerketten, welche im Organismus akkumulieren und zudem eine Immunreaktion hervorrufen können (Schlapschy et al., 2013; Binder & Skerra, 2017; Schilz et al., 2021).

Eine alternative und in Tiermodellen wiederholt erfolgreich angewendete Methode zur Verlängerung der Zirkulationsdauer von Proteinen ist die PASylation-Technologie (Schlapschy et al., 2013; Gebauer & Skerra, 2018), welche in der Veröffentlichung I Anwendung bei den Varianten BdPTE-4 und BdPTE-7 fand (Köhler et al., 2021a). Durch eine konformationell ungeordnete Polypeptidkette bestehend aus den hydrophilen und ungeladenen Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin kann das hydrodynamische Volumen von Proteinen drastisch vergrößert und die renale Ausscheidung über die Niere erheblich verringert werden (Schlapschy et al., 2013). Im Gegensatz zur PEGylierung, welche das gleiche biophysikalische Prinzip nutzt, ist die PAS-Sequenz biologisch abbaubar, was eine Akkumulation der Proteine im Gewebe verhindert (Schlapschy et al., 2013). Die Veröffentlichung I demonstriert, dass die PASylierung keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität oder Stereoselektivität der untersuchten BdPTE-Varianten hat (Köhler et al., 2021a). Zudem konnte das PAS-Polypeptid als flexibler Linker zwischen zwei verschiedenen BdPTE-Monomeren eingesetzt werden, um das neuartige Heterodimer BdPTE-7 zu kreieren (Escher et al., 2020; Köhler et al., 2021a). In einer kürzlich veröffentlichten Tierstudie mit den PAS-modifizierten Varianten BdPTE-4 und BdPTE-7 (in der zitierten Studie PTE-3 und PTE-2) konnte in einem Rattenmodell die Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit wie auch die therapeutische Wirksamkeit nach VX-Vergiftung gezeigt werden. Die pharmakokinetischen Untersuchungen der Studie zeigten ein nahezu 3-fach bzw. 4-fach verlängerte $t_{1/2}$ der BdPTE-4 und BdPTE-7 im Vergleich zur nativen bakteriellen BdPTE. Eine weitere Verlängerung der $t_{1/2}$ der BdPTEs ist bei Verwendung von längeren PAS-Sequenzen zu erwarten (Stigler et al., 2022).

4.3 Faktoren, welche die enzymkinetischen Untersuchungen oder die Enzymaktivität der BdPTE beeinflussen können

Die katalytische Effizienz der BdPTE gegenüber OPs wurde in der Literatur meist durch enzymkinetische Untersuchungen, konkret einem AChE Inhibitionsassay basiert auf einen modifizierten Ellman-Assay bestimmt (z. B. Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016; Goldsmith et al., 2017; Job et al., 2020; Köhler et al., 2021a) oder bei OP-Substraten mit einer chromogenen Abgangsgruppe die Hydrolyse direkt anhand der Abgangsgruppe verfolgt (z. B. Omburo et al., 1992; Efremenko et al., 2017; Köhler et al., 2021b).

Die enzymatische Aktivität kann jedoch durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Wie unter anderem in der Veröffentlichung I gezeigt werden konnte, können Konditionen wie pH-Wert, Temperatur, ein Wechsel der Messmethode sowie unterschiedliche Schritte in der Proteinherstellung und -reinigung oder die Verwendung von Fusionsproteinen (z. B. Maltose-Bindungsprotein; Roodveldt & Tawfik, 2005) zu unterschiedlichen k_{cat}/K_M -Werten führen (Goldsmith et al., 2016; Köhler et al., 2021a). Darüber hinaus können bei Untersuchungen *in vitro* zugegebene Co-Faktoren wie freie Zinkionen ($> 10 \mu\text{M}$; Goldsmith et al., 2016) oder HSA (Köhler et al., 2021b) die enzymatische Aktivität des Enzyms positiv oder negativ beeinflussen.

In der Veröffentlichung II wurde die Inhibition der BdPTE durch Plasmathiolkomponenten mittels enzymkinetischer Studien bestätigt (Köhler et al., 2021b). Die Untersuchung der oxidations-stabilisierten Variante BdPTE 10-2-C3(C59M/C227A) zeigte eine gemischte Hemmung bei systemisch vorliegenden HSA-Konzentrationen. Der Inhibitionsmechanismus beruht dabei höchst wahrscheinlich auf einer reversiblen Abstraktion der essenziellen Zink(II)ionen aus dem katalytischen Zentrum der BdPTE durch die hochaffine Zink-Bindungsstelle und/oder den freien Thiolrest Cys 34 vom HSA. Dies lässt vermuten, dass die BdPTE nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* von HSA inhibiert werden kann. Abhängig von der vorliegenden Zinkkonzentration im Blutplasma wäre HSA also in der Lage, die enzymatische Aktivität der BdPTE *in vivo* zu beeinflussen (Köhler et al., 2021b). Ein Beispiel hierfür könnten Beobachtungen aus dem Tierversuch mit BdPTE C23AL liefern. In diesem wurde eine verminderte Enzymaktivität *in vivo* im Vergleich zu zuvor bestimmten Werten *in vitro* beobachtet (Wille et al., 2016).

Da in einem anderen Tierversuch mit der BdPTE keine solchen Diskrepanzen beobachtet wurden (Worek et al., 2014), könnten auch andere Faktoren die Enzymaktivität *in vivo* beeinflusst haben. Coverdale et al. (2019) zeigten beispielsweise, dass freie Fettsäuren die

Bildungskapazität von HSA gegenüber Zinkionen herabsetzt, was theoretisch eine Inhibition durch HSA *in vivo* reduzieren könnte. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Variationen der Enzymstruktur Ursache für die unterschiedlichen Befunde bei den beschriebenen Tierversuchen sind. Untersuchungen legen nahe, dass Mutationen auf der Enzymoberfläche der BdPTE die Bindungsstärke für die essenziellen Zink(II)ionen im katalytischen Zentrum beeinflussen können (Foo et al., 2010).

5. Zusammenfassung

In verschiedenen publizierten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Standardtherapie aus Atropin und Oximen hinsichtlich ihrer Effektivität gegenüber einigen neurotoxischen Organophosphaten begrenzt ist. Ziel dieser Arbeit war es, eine alternative Therapiemöglichkeit nach Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen (OPs) zur Verfügung zu stellen. Dazu wurden verschiedene durch Protein-Engineering verbesserte Mutanten der Phosphotriesterase von *Brevundimonas diminuta* (BdPTE) gegenüber zahlreichen relevanten OPs durch enzymkinetische Untersuchungen biochemisch charakterisiert, was Rückschlüsse auf deren zukünftige Anwendbarkeit *in vivo* gestattete.

In der Veröffentlichung I wurden Substratprofile von 7 BdPTE-Varianten gegenüber 17 Nervenkampfstoffen bestimmt und die stereoselektive Hydrolyse gegenüber VX von zwei aussichtsreichen, am Lehrstuhl für Biologische Chemie entwickelten Varianten - 10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200) (BdPTE-4) und das Heterodimer C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200) (BdPTE-7) - untersucht. Die Mutante BdPTE-7 erscheint vielversprechend für eine mögliche therapeutische Anwendung nach OP-Vergiftungen. Das durch die PASylation-Technologie modifizierte Heterodimer vereint als künstliches heterodimeres Enzym nicht nur die Substratspektren von zwei verschiedenen BdPTE-Varianten, sondern besitzt auch eine verlängerte Plasma-Halbwertszeit, was theoretisch ausreichend zur Behandlung von Vergiftungen mit langlebigen OPs sein sollte. Da das Heterodimer jedoch nur gegenüber wenigen OPs eine effiziente k_{cat}/K_M von $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufweist, bedarf es bei der Auswahl der beiden zu kombinierenden Varianten weiterer Optimierung hinsichtlich hoher k_{cat}/K_M -Werte gegenüber einem breiteren OP-Spektrum.

Durch die enzymkinetischen Untersuchungen bei der Veröffentlichung II konnte zudem gezeigt werden, dass die BdPTE-Variante 10-2-C3(C59A/C227M) durch systemisch im Blutplasma relevante Konzentrationen an HSA inhibiert werden kann. Die reversible Hemmung durch HSA beruht auf der Abstraktion der essenziellen Zink(II)ionen aus dem aktiven Zentrum der BdPTE. Infolgedessen sollte die bei der Formulierung und im Plasma vorhandene Zinkkonzentration bei der therapeutischen Entwicklung wie auch während einer Behandlung von OP-Vergiftungen mit der BdPTE berücksichtigt werden, um den Erhalt der kompletten enzymatischen Aktivität zu gewährleisten.

Auch wenn künftig weitere Verbesserungen für eine BdPTE mit effizientem k_{cat}/K_M -Wert gegenüber einem breitem Substratspektrum erforderlich sind, sind die hier studierten

Heterodimere aussichtsreiche Kandidaten für eine mögliche Breitbandtherapie nach OP-Vergiftungen. Im Hinblick auf den Einsatz der BdPTE konnte diese Arbeit relevante Ergebnisse und Anhaltspunkte liefern, um eine effiziente Therapie *in vivo* besser planen zu können.

6. Literaturverzeichnis

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. 2017. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 12th ed. Urban & Fischer in Elsevier. ISBN: 9783437425257.
- Arufe, M., Romero, J., Gamero, J., Moreno, M. 2000. Oxidation of cholinesterase-inhibiting pesticides: A simple experiment to illustrate the role of bioactivation in the toxicity of chemicals. *Biochem Educ* 28, 174–177. Doi: 10.1016/s0307-4412(99)00148-x.
- Ashani, Y., Leader, H., Aggarwal, N., Silman, I., Worek, F., Sussman, J., Goldsmith, M. 2016. In vitro evaluation of the catalytic activity of paraoxonases and phosphotriesterases predicts the enzyme circulatory levels required for in vivo protection against organophosphate intoxications. *Chem Biol Interact* 259, 252–256. Doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.039.
- Aubert, S., Li, Y., Raushel, F. 2004. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 43, 5707–5715. Doi: 10.1021/bi0497805.
- Auswärtiges Amt. 1995-2021. Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen (CWÜ). <https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/themen/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffen-node/-/207106>. Accessed 1 December 2021.
- Benschop, H., de Jong, L. 1988. Nerve agent stereoisomers: Analysis, isolation and toxicology. *Acc Chem Res* 21, 368–374. Doi: 10.1021/ar00154a003.
- Benschop, H., de Jong, L. 2001. Chemical Warfare Agents: Toxicity at Low Levels: Toxicokinetics of nerve agents. CRC Press Inc.
- Berg, J., Tymoczko, J., Gatto, G., Jr., Stryer, L. 2017. Stryer Biochemie: Enzyme: Grundlegende Konzepte und Kinetik, 8th ed. Springer Spektrum. ISBN 9783662546192.
- Bierwisch, A., Zengerle, M., Thiermann, H., Kubik, S., Worek, F. 2014. Detoxification of alkyl methylphosphonofluoridates by an oxime-substituted β -cyclodextrin — an in vitro structure-activity study. *Toxicol Lett* 224, 209–214. Doi: 10.1016/j.toxlet.2013.10.024.
- Bigley, A., Mabanglo, M., Harvey, S., Raushel, F. 2015. Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR. *Biochemistry* 54, 5502–5512. Doi: 10.1021/acs.biochem.5b00629.
- Bigley, A., Xu, C., Henderson, T., Harvey, S., Raushel, F. 2013. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J Am Chem Soc* 135, 10426–10432. Doi: 10.1021/ja402832z.

- Binder, U., Skerra, A. 2017. PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 31, 10–17. Doi: 10.1016/j.cocis.2017.06.004.
- Bisswanger, H. 2000. *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBN: 3527300961.
- Chen-Goodspeed, M., Hong, S., Raushel, F., Sogorb, M., Wu, F. 2001a. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry* 40, 1325–1331. Doi: 10.1021/bi001548l.
- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M., Wu, F., Raushel, F. 2001b. Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry* 40, 1332–1339. Doi: 10.1021/bi001549d.
- Cherny, I., Greisen, P., Ashani, Y., Khare, S., Oberdorfer, G., Leader, H., Baker, D., Tawfik, D. 2013. Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem Biol* 8, 2394–2403. Doi: 10.1021/cb4004892.
- Copeland, R. 2013. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, 2nd ed. Wiley & Sons. ISBN: 9781118488133.
- Costanzi, S., Machado, J.-H., Mitchell, M. 2018. Nerve agents: what they are, how they work, how to counter them. *ACS Chem Neurosci* 9, 873–885. Doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00148.
- Coverdale, J., Barnett, J., Adamu, A., Griffiths, E., Stewart, A., Blindauer, C. 2019. A metalloproteomic analysis of interactions between plasma proteins and zinc: elevated fatty acid levels affect zinc distribution. *Metallomics* 11, 1805–1819. Doi: 10.1039/c9mt00177h.
- Dawson, R., Pantelidis, S., Rose, H., Kotsonis, S. 2008. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA). *J Hazard Mater* 157, 308–314. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.099.
- Despotović, D., Aharon, E., Dubovetskyi, A., Leader, H., Ashani, Y., Tawfik, D. 2019. A mixture of three engineered phosphotriesterases enables rapid detoxification of the entire spectrum of known threat nerve agents. *Protein Eng Des Sel* 32, 169–174. Doi: 10.1093/protein/gzz039.
- Di Sioudi, B., Miller, C., Lai, K., Grimsley, J., Wild, J. 1999. Rational design of organophosphorus hydrolase for altered substrate specificities. *Chem Biol Interact* 119-120, 211–223. Doi: 10.1016/s0009-2797(99)00030-7.
- Dodge, J., Mitchell, C., Hanahan, D. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100, 119–130. Doi: 10.1016/0003-9861(63)90042-0.

- Dumas, D., Caldwell, S., Wild, J., Raushel, F. 1989. Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem* 264, 19659–19665. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)47164-0.
- Dumas, D., Durst, H., Landis, W., Raushel, F., Wild, J. 1990. Inactivation of organophosphorus nerve agents by the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Arch Biochem Biophys* 277, 155–159. Doi: 10.1016/0003-9861(90)90564-f.
- Eddleston, M., Buckley, N., Eyer, P., Dawson, A. 2008. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet* 371, 597–607. Doi: 10.1016/S0140-6736(07)61202-1.
- Eddleston, M., Phillips, M. 2004. Self poisoning with pesticides. *BMJ* 328, 42–44. Doi: 10.1136/bmj.328.7430.42.
- Eddleston, M., Szinicz, L., Eyer, P., Buckley, N. 2002. Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: A systematic review of clinical trials. *QJM* 95, 275–283. Doi: 10.1093/qjmed/95.5.275.
- Efremenko, E., Lyagin, I., Klyachko, N., Bronich, T., Zavyalova, N., Jiang, Y., Kabanov, A. 2017. A simple and highly effective catalytic nanozyme scavenger for organophosphorus neurotoxins. *J Control Release* 247, 175–181. Doi: 10.1016/j.jconrel.2016.12.037.
- EFSA. 2021. European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/de>. Accessed 1 December 2021.
- Ellington, J., Evans, J., Prickett, K., Champion, W. 2001. High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of organophosphorus pesticides on polysaccharide chiral stationary phases. *J Chromatogr A* 928, 145–154. Doi: 10.1016/S0021-9673(01)01138-4.
- Escher, B., Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A. 2020. Translating the Concept of Bispecific Antibodies to Engineering Heterodimeric Phosphotriesterases with Broad Organophosphate Substrate Recognition. *Biochemistry* 59, 4395–4406. Doi: 10.1021/acs.biochem.0c00751.
- Fishburn, C. 2008. The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics. *J Pharm Sci* 97, 4167–4183. Doi: 10.1002/jps.21278.
- Foo, J., Jackson, C., Carr, P., Kim, H., Schenk, G., Gahan, L., Ollis, D. 2010. Mutation of outer-shell residues modulates metal ion co-ordination strength in a metalloenzyme. *Biochem J* 429, 313–321. Doi: 10.1042/BJ20100233.

- Gebauer, M., Skerra, A. 2018. Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action. *Bioorg. Med. Chem.* 26, 2882–2887. Doi: 10.1016/j.bmc.2017.09.016.
- Goldsmith, M., Aggarwal, N., Ashani, Y., Jubran, H., Greisen, P., Ovchinnikov, S., Leader, H., Baker, D., Sussman, J., Goldenzweig, A., Fleishman, S., Tawfik, D. 2017. Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng Des Sel* 30, 333–345. Doi: 10.1093/protein/gzx003.
- Goldsmith, M., Eckstein, S., Ashani, Y., Greisen, P., Leader, H., Sussman, J., Aggarwal, N., Ovchinnikov, S., Tawfik, D., Baker, D., Thiermann, H., Worek, F. 2016. Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. *Arch Toxicol* 90, 2711–2724. Doi: 10.1007/s00204-015-1626-2.
- Guilhermino, L., Lopes, M., Carvalho, A., Soared, A. 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia Magna*. *Chemosphere* 32, 727–738. Doi: 10.1016/0045-6535(95)00360-6.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M., Konradsen, F. 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. *BMC public health* 7, 357. Doi: 10.1186/1471-2458-7-357.
- Gupta, R., Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Mullokandov, G., Bar, H., Ben-David, M., Leader, H., Margalit, R., Silman, I., Sussman, J., Tawfik, D. 2011. Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication. *Nat Chem Biol* 7, 120–125. Doi: 10.1038/nchembio.510.
- Herz, F., Kaplan, E. 1973. A review: Human erythrocyte acetylcholinesterase. *Pediatr Res* 7, 204–214. Doi: 10.1203/00006450-197304000-00024.
- Hong, S., Raushel, F. 1999a. Stereochemical constraints on the substrate specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry* 38, 1159–1165. Doi: 10.1021/bi982204m.
- Hong, S., Raushel, F. 1999b. Stereochemical preferences for chiral substrates by the bacterial phosphotriesterase. *Chem Biol Interact* 119-120, 225–234. Doi: 10.1016/S0009-2797(99)00031-9.
- Jan, Y.-H., Richardson, J., Baker, A., Mishin, V., Heck, D., Laskin, D., Laskin, J. 2016. Novel approaches to mitigating parathion toxicity: targeting cytochrome P450-mediated metabolism with menadione. *Ann N Y Acad Sci* 1378, 80–86. Doi: 10.1111/nyas.13156.
- Jett, D., Richardson, J. 2009. *Clinical Neurotoxicology: Syndromes, Substances, Environments*. Chapter 44: Neurotoxic Pesticides. Elsevier Inc. ISBN: 9780323052603.

- Job, L., Köhler, A., Escher, B., Worek, F., Skerra, A. 2020. A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. *Toxicol Lett* 321, 138–145. Doi: 10.1016/j.toxlet.2019.12.030.
- John, H., Balszuweit, F., Kehe, K., Worek, F., Thiermann, H. 2015. Chapter 56 - Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, 2nd ed. Elsevier Inc. ISBN: 9780128004944.
- John, H., van der Schans, M., Koller, M., Spruit, H., Worek, F., Thiermann, H., Noort, D. 2018. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: Forensic verification within an international laboratory network. *Forensic toxicol* 36, 61–71. Doi: 10.1007/s11419-017-0376-7.
- Karunaratne, A., Gunnell, D., Konradsen, F., Eddleston, M. 2020. How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution? *Clin Toxicol (Phila)* 58, 227–232. Doi: 10.1080/15563650.2019.1662433.
- Köhler, A., Escher, B., Job, L., Koller, M., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F. 2021a. Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. *Arch Toxicol* 95, 2815–2823. Doi: 10.1007/s00204-021-03094-0.
- Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A. 2021b. Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components. *Toxicol Lett* 350, 194–201. Doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.011.
- Lagassé, H., Alexaki, A., Simhadri, V., Katagiri, N., Jankowski, W., Sauna, Z., Kimchi-Sarfaty, C. 2017. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Res* 6, 113. Doi: 10.12688/f1000research.9970.1.
- Lai, K., Stolowich, N., Wild, J. 1995. Characterization of P-S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase. *Arch Biochem Biophys* 318, 59–64. Doi: 10.1006/abbi.1995.1204.
- Lange, W., Krueger, G. 1932. Über Ester der Monofluorphosphorsäure. *Ber Dtsch Chem Ges* 65, 1598–1601. Doi: 10.1002/cber.19320650910.
- Marrs, T. 1993. Organophosphate Poisoning. *Pharmac. Ther* 58, 51–56. Doi: 10.1016/0163-7258(93)90066-m
- Marrs, T. 2001. *Organophosphates and Health: Organophosphates: History, Chemistry, Pharmacology*. Imperial College Press. ISBN: 9781848161443.

- Marrs, T., Sellström, A. 2007. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment: Chapter 16: The Use of Benzodiazepines in Organophosphorus Nerve Agent Intoxication*, 2nd ed. Wiley. ISBN:9780470013595.
- Masson, P., Rochu, D. 2009. *Handbook of toxicology of chemical warfare agents: Catalytic bioscavengers: the next generation of bioscavenger-based medical countermeasures*. Academic Press Inc. ISBN: 9780123744845.
- Michaelis, L., Menten, LD., Johnson, KA., Goody, RS. 2011. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 50, 8264-8269. Doi: 10.1021/bi201284u.
- Nachon, F., Brazzolotto, X., Trovaslet, M., Masson, P. 2013. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem Biol Interact* 206, 536–544. Doi: 10.1016/j.cbi.2013.06.012.
- Nakagawa, T., Tu, T. 2018. Murders with VX: Aum Shinrikyo in Japan and the assassination of Kim Jong-Nam in Malaysia. *Forensic Toxicol* 36, 542–544. Doi: 10.1007/s11419-018-0426-9.
- Newmark, J. 2019. Therapy for acute nerve agent poisoning: An update. *Neurol Clin Pract* 9, 337–342. Doi: 10.1212/CPJ.0000000000000641.
- Nillos, M., Gan, J., Schlenk, D. 2010. Chirality of organophosphorus pesticides: Analysis and toxicity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 1277–1284. Doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.022.
- Novikov, B., Grimsley, J., Kern, R., Wild, J., Wales, M. 2010. Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol. *J Control Release* 146, 318–325. Doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.003.
- Omburo, G., Kuo, J., Mullins, L., Raushel, F. 1992. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem* 267, 13278–13283. Doi: 10.1016/S0021-9258(18)42207-7.
- Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. 2021. OPCW. <https://www.opcw.org/>. Accessed 1 December 2021.
- Raushel, F. 2002. Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Curr Opin Microbiol* 5, 288–295. Doi: 10.1016/s1369-5274(02)00314-4.
- Reiter, G., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F. 2008. Chromatographic resolution, characterisation and quantification of VX enantiomers in hemolysed swine blood samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 873, 86–94. Doi: 10.1016/j.jchromb.2008.08.001.

- Reiter, G., Müller, S., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., Mikler, J. 2015. In vitro and in vivo toxicological studies of V nerve agents: Molecular and stereoselective aspects. *Toxicol Lett* 232, 438–448. Doi: 10.1016/j.toxlet.2014.11.010.
- Roodveldt, C., Tawfik, D. 2005. Directed evolution of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* for heterologous expression in *Escherichia coli* results in stabilization of the metal-free state. *Protein Eng Des Sel* 18, 51–58. Doi: 10.1093/protein/gzi005.
- Schilz, J., Binder, U., Friedrich, L., Gebauer, M., Lutz, C., Schlapschy, M., Schiefner, A., Skerra, A. 2021. Molecular recognition of structurally disordered Pro/Ala-rich sequences (PAS) by antibodies involves an Ala residue at the hot spot of the epitope. *J Mol Biol* 433, 167113. Doi: 10.1016/j.jmb.2021.167113.
- Schlapschy, M., Binder, U., Börger, C., Theobald, I., Wachinger, K., Kisling, S., Haller, D., Skerra, A. 2013. PASylation: A biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26, 489–501. Doi: 10.1093/protein/gzt023.
- Schrader, G. 1950. Organische Phosphorverbindungen als neuartige Insektizide. *Angew Chem* 62, 471–473. Doi: 10.1002/ange.19500622002.
- Sidell, F., Borak, J. 1992. Chemical warfare agents: II. nerve agents. *Ann Emerg Med* 21, 865–871. Doi: 10.1016/S0196-0644(05)81036-4.
- Spencer, W., Cliath, M., Davis, K. 1975. Persistence of parathion and its oxidation to paraoxon on the soil surface as related to worker reentry into treated crops. *Bull Environ Contam Toxicol* 14, 265–272. Doi: 10.1007/BF01685633.
- Steindl, D., Boehmerle, W., Körner, R., Praeger, D., Haug, M., Nee, J., Schreiber, A., Scheibe, F., Demin, K., Jacoby, P., Tauber, R., Hartwig, S., Endres, M., Eckardt, K.-U. 2021. Novichok nerve agent poisoning. *Lancet* 397, 249–252. Doi: 10.1016/S0140-6736(20)32644-1.
- Stigler, L., Köhler, A., Koller, M., Job, L., Escher, B., Potschka, H., Thiermann, H., Skerra, A., Worek, F., Wille, T. 2022. Post-VX exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Arch Toxicol* 96, 571–583. Doi: 10.1007/s00204-021-03199-6.
- Strohl, W. 2015. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs* 29, 215–239. Doi: 10.1007/s40259-015-0133-6.
- Tenberken, O., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H., Worek, F., Reiter, G. 2010. Toxicokinetics of tabun enantiomers in anaesthetized swine after intravenous tabun administration. *Toxicol Lett* 198, 177–181. Doi: 10.1016/j.toxlet.2010.06.012.

- Thiermann, H., Aurbek, N., Worek, F. 2016. Chapter 1 - Treatment of nerve agent poisoning: Chemical Warfare Toxicology. Volume 2: Management of Poisoning. Royal Society of Chemistry. Doi: 10.1039/9781782628071-00001.
- Tsai, P., Bigley, A., Li, Y., Ghanem, E., Cadieux, C., Kasten, S., Reeves, T., Cerasoli, D., Raushel, F. 2010. Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 49, 7978–7987. Doi: 10.1021/bi101056m.
- Tsai, P., Fox, N., Bigley, A., Harvey, S., Barondeau, D., Raushel, F. 2012. Enzymes for the homeland defense: Optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Biochemistry* 51, 6463–6475. Doi: 10.1021/bi300811t.
- Vale, J., Marrs, T., Maynard, R. 2018. Novichok: A murderous nerve agent attack in the UK. *Clin Toxicol (Phila)* 56, 1093–1097. Doi: 10.1080/15563650.2018.1469759.
- Van der Schans, M., Lander, B., van der Wiel, H., Langenberg, J., Benschop, H. 2003. Toxicokinetics of the nerve agent (\pm)-VX in anesthetized and atropinized hairless guinea pigs and marmosets after intravenous and percutaneous administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 191, 48–62. Doi: 10.1016/S0041-008X(03)00216-3.
- Vanhooke, J., Benning, M., Raushel, F., Holden, H. 1996. Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. *Biochemistry* 35, 6020–6025. Doi: 10.1021/bi960325l.
- Wille, T., Neumaier, K., Koller, M., Ehinger, C., Aggarwal, N., Ashani, Y., Goldsmith, M., Sussman, J., Tawfik, D., Thiermann, H., Worek, F. 2016. Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: Intraosseous versus intravenous injection. *Toxicol Lett* 258, 198–206. Doi: 10.1016/j.toxlet.2016.07.004.
- Wong, K., Gao, J. 2007. The reaction mechanism of paraoxon hydrolysis by phosphotriesterase from combined QM/MM simulations. *Biochemistry* 46, 13352–13369. Doi: 10.1021/bi700460c.
- Worek, F., Seeger, T., Reiter, G., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J., Aggarwal, N., Thiermann, H., Tawfik, D. 2014. Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study. *Toxicol Lett* 231, 45–54. Doi: 10.1016/j.toxlet.2014.09.003.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T. 2016. Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: A promising approach? *Toxicol Lett* 244, 143–148. Doi: 10.1016/j.toxlet.2015.07.012.
- Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Szinicz, L. 2002. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch Toxicol* 76, 523–529. Doi: 10.1007/s00204-002-0375-1.

Zhang, P., Liu, E., Tsao, C., Kasten, S., Boeri, M., Dao, T., DeBus, S., Cadieux, C., Baker, C., Otto, T., Cerasoli, D., Chen, Y., Jain, P., Sun, F., Li, W., Hung, H., Yuan, Z., Ma, J., Bigley, A., Raushel, F., Jiang, S. 2019. Nanoscavenger provides long-term prophylactic protection against nerve agents in rodents. *Sci Transl Med* 11, eaau7091. Doi: 10.1126/scitranslmed.aau7091.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ATCh	Acetylthiocholin
AChE	Acetylcholinesterase
BChE	Butyrylcholinesterase
BdPTE	Phosphotriesterase aus <i>Brevudimonas diminuta</i>
CWÜ	Chemiewaffenübereinkommen
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E605	Parathion
FDA	U. S. Food and Drug Administration
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyclosarin
GSA	Meerschweinchen-Serumalbumin
HSA	Humanes Serumalbumin
K	Gleichgewichtskonstante
$k_{\text{AChE}(\text{TOPH})}$	Pseudokonstante Reaktionsgeschwindigkeit 1. Ordnung
k_{cat}	Katalytische Konstante
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	Katalytische Effizienz
K_{i}	Hemmkonstante
K_{M}	Michaelis Menten-Konstante
$K_{\text{M}}^{\text{app}}$	Apparente Michaelis-Menten-Konstante
KP _i	Kalium-Phosphat-Puffer
OP	Organophosphat Verbindung

OVCW	Organisation für das Verbot Chemischer Waffen
PAS	Prolin/Alanin/Serin
PDB	Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
PTE	Phosphotriesterase
PXE	Paraoxon-ethyl
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
$t_{1/2}$	Plasma-Halbwertszeit
v	Umsetzungsgeschwindigkeit
v_{\max}	Halbmaximale Geschwindigkeit
v_{\max}^{app}	Apparente Halbmaximale Geschwindigkeit
ϵ	Extinktionskoeffizient
[E]	Enzymkonzentration
[I]	Inhibitorkonzentration
$\frac{\Delta[\text{P}]}{\Delta t}$	Initiale Reaktionsgeschwindigkeit

8. Anhang: Nachdrucke der eingebundenen Veröffentlichungen

Veröffentlichung I

Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro

Autoren: Köhler, A., Escher, B., Job, L., Koller, M., Thiermann, H.,
Skerra, A., Worek, F.
Fachzeitschrift: Archives of Toxicology 95, 2815–2823
Verlag: Springer Nature
Publikationsdatum: 23.06.2021 (online Version)
Doi: 10.1007/s00204-021-03094-0

Der Originalartikel ist ein „Open Access“ Artikel und darf unter den Bedingungen der „Creative Commons Attribution 4.0 International License“ ohne weitere Einwilligungen des Verlages Springer Nature vollständig nachgedruckt werden. Der Artikel ist ebenfalls unter folgendem Link abrufbar: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-021-03094-0#rightslink>.



Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro

Anja Köhler^{1,2} · Benjamin Escher² · Laura Job² · Marianne Koller¹ · Horst Thiermann¹ · Arne Skerra² · Franz Worek¹ Received: 7 May 2021 / Accepted: 15 June 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Highly toxic organophosphorus nerve agents, especially the extremely stable and persistent V-type agents such as VX, still pose a threat to the human population and require effective medical countermeasures. Engineered mutants of the *Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase (BdPTE) exhibit enhanced catalytic activities and have demonstrated detoxification in animal models, however, substrate specificity and fast plasma clearance limit their medical applicability. To allow better assessment of their substrate profiles, we have thoroughly investigated the catalytic efficacies of five BdPTE mutants with 17 different nerve agents using an AChE inhibition assay. In addition, we studied one BdPTE version that was fused with structurally disordered PAS polypeptides to enable delayed plasma clearance and one bispecific BdPTE with broadened substrate spectrum composed of two functionally distinct subunits connected by a PAS linker. Measured k_{cat}/K_M values were as high as 6.5 and $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ with G- and V-agents, respectively. Furthermore, the stereoselective degradation of VX enantiomers by the PASylated BdPTE-4 and the bispecific BdPTE-7 were investigated by chiral LC–MS/MS, resulting in a several fold faster hydrolysis of the more toxic P(–) VX stereoisomer compared to P(+) VX. In conclusion, the newly developed enzymes BdPTE-4 and BdPTE-7 have shown high catalytic efficacy towards structurally different nerve agents and stereoselectivity towards the toxic P(–) VX enantiomer in vitro and offer promise for use as bioscavengers in vivo.

Keywords Bispecific bioscavenger · Detoxification · Mutant · Nerve agent · PASylation · Phosphotriesterase

Introduction

Organophosphorus (OP) nerve agents are extremely hazardous compounds that were repeatedly used in military conflicts and by terrorists. Recent nerve agent attacks with sarin in Syria since 2013, assassinations with VX in Malaysia 2017 and with Novichok agents in UK 2018 and Russia 2020 underline the ongoing threat and the necessity for effective medical countermeasures (Costanzi et al. 2018; John et al. 2018; Steindl et al. 2021).

The acute toxicity of nerve agents is based on the covalent binding to a serine residue at the active site of acetylcholinesterase (AChE) that leads to inhibition of AChE activity and inadequate breakdown of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in the synaptic clefts of the peripheral and central nervous system. In consequence, muscarinic and nicotinic receptors become overstimulated, resulting in severe signs of cholinergic crisis, which may ultimately lead to death by suffocation (Grob 1963; Holmstedt 1959; Worek et al. 2016b).

OP nerve agents can be divided into two major groups: the volatile G-agents, which include tabun (GA), sarin (GB), soman (GD), and cyclosarin (GF), and the highly persistent and less volatile V-agents such as VX, Russian VX (VR) and Chinese VX (CVX) (Rice 2016). A common characteristic of nerve agents is a chiral center at the phosphorus atom that leads to P(+) and P(–) stereoisomers, whereas soman has a second chiral center in a side chain, leading to four diastereomers (Benschop and de Jong 1988). These stereoisomers exhibit different biological properties such as a higher

✉ Arne Skerra
skerra@tum.de

✉ Franz Worek
franzworek@bundeswehr.org

¹ Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr, 80937 Munich, Germany

² Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

biological stability and a higher inhibitory potency towards human AChE for the P(−) isomers (Benschop and de Jong 1988; Tenberken et al. 2010a). In case of VR(−), the inhibitory potency is 22,000-fold higher than that of VR(+) and with VX the ratio VX(−)/VX(+) is 380 (Tenberken et al. 2010b; Reiter et al. 2015).

Standard treatment of OP poisoning consists of rapid administration of a muscarinic antagonist, usually atropine, and an oxime (e.g., obidoxime) to reactivate inhibited AChE. This basic therapy may be supplemented by an anticonvulsant drug for neuroprotection and termination of seizures (Thiermann et al. 2016; Marrs and Sellström 2007). Unfortunately, oxime efficacy is limited by narrow OP substrate specificity and inadequate blood–brain-barrier penetration, which results in insufficient treatment of poisonings by different nerve agents (Worek et al. 2020).

A potentially promising therapeutic approach is the use of catalytic bioscavengers that can detoxify various OPs via enzymatic hydrolysis (Nachon et al. 2013). During the last decades, mutants of the naturally occurring phosphotriesterase from *Brevundimonas (Pseudomonas) diminuta* (BdPTE) were generated to serve as catalytic bioscavengers against OP nerve agents. The metal-dependent hydrolase is a homodimer of 329 amino acids per subunit. The active site is formed by a pair of zinc ions that are bound by several His side chains and a carbamylated Lys side chain and are bridged by a nucleophilic hydroxide ion. OP hydrolysis is induced by the nucleophilic attack of this hydroxide at the phosphorus center, whereby in case of OP nerve agents a preferential degradation of P(+) enantiomers by the wild-type BdPTE was shown (Tsai et al. 2010; Cherny et al. 2013; Goldsmith et al. 2017).

Several research groups have optimized native BdPTE with regard to expression yield, stability (Roodveldt and Tawfik 2005) as well as substrate specificity, most importantly by inverting the stereopreference to the more toxic P(−) enantiomer (Chen-Goodspeed et al. 2001b, 2001a; Bigley et al. 2013, 2015; Goldsmith et al. 2016; Tsai et al. 2010, 2012). Subsequent optimization of the BdPTE mutant C23 (Cherny et al. 2013) by Goldsmith et al. (2017) resulted in the variants 10-2-C3 and 10-2-C3(I106A) which exhibit even higher catalytic activity towards V-agents. Furthermore, Job et al. (2020) increased the oxidation stability of BdPTE 10-2-C3 by replacing two free Cys to Val, resulting in the variant 10-2-C3(C59V/C227V). Recent investigations by Escher et al. (2020) led to an enlarged substrate spectrum by creating bispecific enzymes, e.g., by fusing two different PTE monomers via a 100-residue Pro/Ala/Ser (PAS) linker (Schlupschy et al. 2013) to obtain a heterodimeric single-chain PTE (scPTE).

Notably, PTEs with catalytic efficiencies $\geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ towards the more toxic P(−) nerve agent enantiomers should enable a rapid break down in vivo at low bioscavenger

doses ($< 1 \text{ mg kg}^{-1}$); however, the BdPTE enzymes suffer from a short circulation half-life of merely $\sim 1 \text{ h}$ in rodents (Despotović et al. 2019; Worek et al. 2016a; Ashani et al. 2016). Therefore, BdPTE mutants with markedly improved biological stability are needed for a successful post-exposure therapy, especially in case of percutaneous poisoning by V-type nerve agents with prolonged persistence (Worek et al. 2014, 2016a). A proven strategy to delay clearance of pharmacologically active proteins in vivo is the PASylation technology (Binder and Skerra 2017). Depending on the length of the conformationally disordered and biochemically inert polypeptide chain comprising the amino acids Pro, Ala, and Ser the hydrodynamic volume of the protein drug increases dramatically, thus delaying kidney filtration (Schlupschy et al. 2013).

In the present study, we have characterized the catalytic activities of diverse BdPTE mutants as well as the PASylated BdPTE-4 and the newly engineered scPTE, dubbed BdPTE-7, towards a spectrum of four G- and 10 V-type nerve agents as well as three amiton OP analogues. Moreover, the stereoselective degradation of VX by the PASylated BdPTE candidates was analyzed by chiral LC–MS/MS.

Materials and methods

Chemicals

17 V- and G-type nerve agents as well as amiton analogues were made available by the German Ministry of Defence, prepared as 0.1% v/v stock solution in acetonitrile and stored at ambient temperature. Pursuant to regulations of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPWC), OP nerve agents were handled exclusively within the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS), acetylthiocholine (ATCh) and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), whereas acetylcholinesterase (AChE) was prepared from human erythrocytes according to Bierwisch et al. (2014) and Dodge et al. (1963). All other chemicals were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) or Carl Roth (Karlsruhe, Germany).

Plasmid construction

The synthetic genes encoding the BdPTE homodimer variants BdPTE-1 and BdPTE-2 (Table 1) were obtained from a previous study (Job et al. 2020) and cloned on the expression plasmid pASK-IBA5(+), also encoding the N-terminal *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra 2007). Amino acid substitutions were introduced into BdPTE-2 by QuikChange site-directed mutagenesis (Agilent, Santa Clara, CA) with

Table 1 Overview of tested BdPTE variants

BdPTE-1	C23 ^(a)
BdPTE-2	10-2-C3 ^(b)
BdPTE-3	10-2-C3(C59V/C227V) ^(c)
BdPTE-4	10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200)
BdPTE-5	10-2-C3(I106A) ^(b)
BdPTE-6	10-2-C3(I106A/C59V/C227V) ^(c)
BdPTE-7	BdPTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200)

Published by (a) Cherny et al. (2013); (b) Goldsmith et al. (2017); (c) Job et al. (2020)

appropriate oligodeoxynucleotide pairs (Eurofins, Ebersberg, Germany) to yield BdPTE-3, BdPTE-5 and BdPTE-6 (see Table 1). The *SapI* restriction site in front of the stop-codon of the variant BdPTE-3 was used to insert a PAS#1(200) gene cassette according to Schlapschy et al. (2013), yielding BdPTE-4. The expression plasmid encoding the heterodimeric variant BdPTE-7 composed of BdPTE-1 and BdPTE-6 subunits, fused by a PAS(100) linker between the C-terminus of BdPTE-1 and the N-terminus of BdPTE-6 and complemented by electrostatic steering mutations R152E as well as E71K to stabilize the heterodimerization, was constructed according to Escher et al. (2020). For the additional C-terminal PASylation, two inverted *SapI* restriction sites were inserted upfront of the stop-codon via PCR, followed by the seamless insertion of a PAS#1(200) gene cassette as above.

Protein expression and purification

The BdPTE variants were produced in *E. coli* BL21 and purified as previously described (Escher et al. 2020; Job et al. 2020). Briefly, bacteria were cultivated in shake flasks with 2 L LB medium supplemented with 100 mg L⁻¹ ampicillin and 0.2 mM ZnSO₄ and induced with 200 µg L⁻¹ anhydrotetracycline. Bacteria harboring the homo-dimeric BdPTE versions were induced at OD₅₅₀ ≈ 0.6 and incubated at 30 °C for up to 5 h, whereas the PASylated BdPTE variants were cultivated in TB medium at 22 °C and induced at OD₅₅₀ ≈ 1.8–2.2 for up to 15 h. Bacteria were harvested by centrifugation (40 min, 4500 rpm, 4 °C) and the cell pellet was resuspended in 3 mL affinity chromatography buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.1 mM ZnSO₄, pH 8.0) per 1 g wet weight and disrupted with a high pressure homogenizer (GEA Niro Soavi, Lübeck, Germany). The soluble cell extract was loaded onto a *Strep-Tactin* column for streptavidin affinity chromatography (SAC) according to Schmidt and Skerra (2007). In case of BdPTE-4, the SAC eluate was dialyzed overnight against 20 mM Bis-Tris/HCl, 20 mM NaCl, 10 µM ZnSO₄

at pH 6.0 and loaded onto a 6 mL ResQ anion-exchange chromatography (AEX) column (GE Healthcare, Freiburg, Germany), equilibrated with the same buffer used during dialysis. In this case, the enzyme did not bind to the column and was collected in the flow-through. For BdPTE-7, a buffer containing 20 mM Hepes/HCl, 20 mM NaCl, 10 µM ZnSO₄ at pH 7.0 was used for dialysis as well as AEX. Bound scPTE was eluted by a linear concentration gradient from 20 to 250 mM NaCl in running buffer over 20 column volumes. Subsequently, all BdPTE mutants were subjected to size-exclusion chromatography (SEC), performed on a 120 mL HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade column or 320 mL HiLoad Superdex 200 26/60 prep grade column (GE Healthcare) using SEC running buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.01 mM ZnSO₄, pH 8.0). NaHCO₃ was omitted for BdPTE-4 and BdPTE-7. Protein concentration of BdPTE-7 was determined by measuring the absorbance at 280 nm on a NanoDrop 2000 spectrometer (Thermo Scientific, Rockford, IL), whereas the concentrations of all other BdPTE variants were measured using an Ultrospec 2100 pro UV/Vis spectrophotometer (GE Healthcare). Molar absorption coefficients of enzyme variants were calculated according to Wilkins et al. (1999) and Gasteiger et al. (2005). All enzyme variants were obtained with > 95% purity, as confirmed by Coomassie-stained sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the buffer system of Fling and Gregerson (1986).

Enzyme activity measurement

Detoxification of OP by BdPTE variants was quantified by a human AChE inhibition assay in duplicates as previously described (Job et al. 2020; Goldsmith et al. 2016). 500 µL OP solution was added to 100 µL of the appropriately diluted purified recombinant enzyme in TN-buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8) and incubated at 37 °C. After specific time points (1, 7, 14, 20, 30, 45, 60, 90, and 120 min), 50 µL incubate was transferred to a polystyrol cuvette (PS macro, VWR, Darmstadt, Germany) pre-filled with 3 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.1 mL DTNB (10 mM). Then, 10 µL AChE and 50 µL ATCh (28.4 mM) were added and AChE inhibition curves were recorded for 5 min at 37 °C and 412 nm (UV-2600, Shimadzu, Kyoto, Japan). Inhibition curves were analyzed by non-linear regression analysis to obtain the pseudo first-order rate constant $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$. The first-order OP degradation constant of the BdPTE variant k_{OPH} was obtained from a plot of $k_{\text{AChE}}(t_{\text{OPH}})$ versus time, and the corresponding second-order rate constant (the catalytic efficiency k_{cat}/K_M) was calculated using the following equation, wherein $[E]$ is the final concentration of BdPTE in the incubate with OP:

$$k_{\text{cat}}/K_M = \frac{k_{\text{OPH}}}{[E]} \quad (1)$$

Stereoselective detoxification of VX enantiomers by BdPTE variants

To investigate the stereoselective hydrolysis of VX by BdPTE-4 or BdPTE-7, a mixture of 1250 μL VX and 250 μL diluted enzyme in TN-buffer (pH 8.0; $n=3$) with final concentrations of 3.3×10^{-6} M VX and 2.89×10^{-9} M BdPTE-4 or 5.5×10^{-9} M BdPTE-7 was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$. The enzymatic hydrolysis of VX was stopped at defined incubation time points (1, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480, 1440, and 2880 min) by adding 10 μL acetonitrile to 90 μL incubate. Samples were shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80 $^{\circ}\text{C}$ until processing.

For the quantitative analysis of the individual VX enantiomers, samples (100 μL) were diluted in 900 μL deionized water, spiked with 5 ng mL^{-1} VR as internal standard and purified by a preconditioned (1 mL methanol, 1 mL water) SPE cartridge (Strata-X PRP, 30 mg, 1 mL, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) followed by a wash with 1 mL deionized water and elution with 500 μL acetonitrile. Solvent was evaporated from the eluate for 60 min at ambient temperature using a rotating vacuum centrifuge (RVC 2-18 CD plus, Christ, Osterode, Germany) and reconstituted in 100 μL purified water. 10 μL of the solution was injected into an LC-MS/MS system comprising an LC 1260 (binary pump, autosampler, degasser, column oven) and a 6420 Triple-Quad mass spectrometer (both from Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). VX enantiomers were base-line separated using a Reprosil-AGP column (150 \times 2.0 mm; Altmann Analytics, Munich, Germany) at 30 $^{\circ}\text{C}$ at a flow rate of 175 $\mu\text{L min}^{-1}$ with a gradient of solvent A (25 mM ammonium formate, pH 8.5 in water) and solvent B (25 mM ammonium formate, pH 8.5 in 1:1 methanol-water): 10/10, 20/10–50, 10/50, 1/50–10, 4/10 t (min)/B (%). The mass fragments as well as fragmentor voltage and collision energies (at a cell accelerator voltage of 7 V) were recorded for the precursor ions of VX m/z 268.2 \rightarrow 128.2 (105 V, 13 V), m/z 268.2 \rightarrow 79.1 (105 V, 37 V) or VR m/z 268.2 \rightarrow 100.2 (110 V, 17 V), m/z 268.2 \rightarrow 72.2 (110 V, 29 V) via MS after positive electrospray ionization (ESI) at 1.75 kV using the following conditions: 30 psi ion source gas at a flow of 9 L min^{-1} with a temperature (TEM) of 300 $^{\circ}\text{C}$ and Dwell time of 1000 ms. The LC-MS/MS system was operated using the Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition for Triple-Quad and data analysis was performed using Agilent MassHunter Qualitative Analysis software.

Data analysis

Data analysis, calculations and statistical comparisons were performed using GraphPad Prism Version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA). Generally, data are presented as mean \pm standard deviation (SD).

Results

The in vitro catalytic efficiencies of various BdPTE mutants (Table 1) towards a broad spectrum of OP substrates (Table 2) were investigated using the well-established AChE inhibition assay (Goldsmith et al. 2016; Job et al. 2020). To this end, all enzymes were produced in the cytoplasm of *E. coli* and purified as functional dimers from the total cell lysate via *Strep*-tag II affinity chromatography as well as ion exchange chromatography as appropriate. Of note, in contrast with earlier studies (Goldsmith et al. 2016, 2017; Cherny et al. 2013), our constructs did not contain the maltose-binding protein (MBP, N-terminal) as fusion partner. The catalytic activities of the variants BdPTE-1 to BdPTE-7 are summarized in Tables 3, 4 and 5.

In comparison to BdPTE-1, the further improved variant BdPTE-2 exhibited the highest activities towards GA, GB, GD, most of the V-type nerve agents [V1, V2, V3, VX (V4), V5, V6, V7] as well as several amiton derivatives, whereas the mutant BdPTE-5, with a single amino acid exchange, revealed the highest catalytic efficiencies towards GF, VR (V8), CVX (V9) and V10.

The corresponding variants BdPTE-3 and BdPTE-6, respectively, which were stabilized by eliminating the free thiol side chains, generally showed comparable or even slightly enhanced catalytic activities. Exceptions were the ≥ 2 -fold diminished hydrolysis rates of BdPTE-3 for nerve agents with substituents carrying an ethyl and/or O-ethyl group on R1 or rather R2, such as the amiton analogues or the V-agents V1, V2 and V3, and the 6-fold slower degradation rate of V10 by BdPTE-6.

BdPTE-4 (molecular weight: 54,075.93 Da), the C-terminally PASylated version of BdPTE-3, degraded the set of V-type nerve agents with k_{cat}/K_M values between 0.56 and $49.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, G-type nerve agents between 4.87 and $313 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and amiton analogues between 0.06 and $0.66 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Thus, in contrast to BdPTE-3, this variant showed comparable or slightly decreased degradation rates across the entire set of OP substrates investigated here.

The heterodimeric variant BdPTE-7 (molecular weight: 98,502.26 Da), with the subunits of the mutants BdPTE-1 and BdPTE-6 was designed to combine the active sites of each subunit by intramolecular association, and a C-terminal PAS(200)-tag was appended to potentially increase clearance

Table 2 Chemical structures of OPs investigated in this study

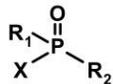
	R1	R2	X
Tabun (GA)	O-ethyl	Dimethylamido	CN
Sarin (GB)	Methyl	O-isopropyl	F
Cyclosarin (GF)	Methyl	O-cyclohexyl	F
Soman (GD)	Methyl	O-pinacolyl	F
A1	O-ethyl	O-ethyl	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]
A2 (Amiton)	O-ethyl	O-ethyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]
A3	O-ethyl	O-ethyl	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
V1	Ethyl	O-ethyl	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]
V2	Ethyl	O-ethyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]
V3	Ethyl	O-ethyl	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
V4 (VX)	Methyl	O-ethyl	S-[2-(diisopropylamino)ethyl]
V5	Methyl	O-ethyl	S-[2-(di-n-propylamino)ethyl]
V6	Methyl	O-ethyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]
V7	Methyl	O-ethyl	S-[2-(dimethylamino)ethyl]
V8 (VR)	Methyl	O-isobutyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]
V9 (CVX)	Methyl	O-n-butyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]
V10	Methyl	O-methyl	S-[2-(diethylamino)ethyl]

Table 3 Catalytic efficiencies of BdPTE mutants towards G-type nerve agents

k_{cat}/K_M ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	BdPTE-1	BdPTE-2 ^b	BdPTE-3	BdPTE-4	BdPTE-5 ^b	BdPTE-6	BdPTE-7
GA	225 ± 11.6	647 ± 11.6	582 ± 8.29	313 ± 3.99	136 ± 0.10	133 ± 3.19	380 ± 6.74
GB	106 ± 0.48	165 ± 2.70 ^a	200 ± 3.68 ^a	142 ± 1.93	52.0 ± 0.82	71.1 ± 1.28	205 ± 11.8
GF	2.14 ± 0.05	5.31 ± 0.21 ^a	6.37 ± 0.21 ^a	5.03 ± 0.04	10.2 ± 1.49	9.72 ± 0.31	13.6 ± 0.23
GD	4.51 ± 0.08	5.06 ± 0.29	6.80 ± 0.11	4.87 ± 0.08	1.99 ± 0.01	3.23 ± 0.14	7.18 ± 0.05

^aData from Job et al. (2020)^bData from Escher et al. (2020)

time after in vivo application. Observed k_{cat}/K_M values of BdPTE-7 were between 7.18 and $380 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for G-type and between 0.90 and $38.10 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for V-type nerve agents as well as between 0.05 and $0.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for amiton analogues. Hence, the substrate spectrum of the fusion protein was significantly broadened compared with the individual BdPTE-1 and BdPTE-6 mutants. For example, 10 nerve agents were hydrolyzed with $k_{\text{cat}}/K_M \geq 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ by BdPTE-7, in contrast to only 7 or 8 nerve agents, respectively, by BdPTE-1 or BdPTE-6.

Finally, the stereoselective hydrolysis of racemic VX by the most promising variants BdPTE-7 and BdPTE-4 was analyzed using chiral LC-MS/MS (Fig. 1). These measurements revealed a marked stereopreference towards the more toxic P(-) VX enantiomer. At the applied experimental

conditions, i.e., a 1142-fold excess of VX with BdPTE-4 and a 600-fold excess with BdPTE-7, BdPTE-4 completely degraded VX(-) within 90 min ($t_{1/2}$ of 3.6 min) and BdPTE-7 within 45 min ($t_{1/2}$ of 2.8 min). Degradation of VX(+) was markedly slower, resulting in $t_{1/2}$ values of 63 and 42 min, respectively.

Discussion

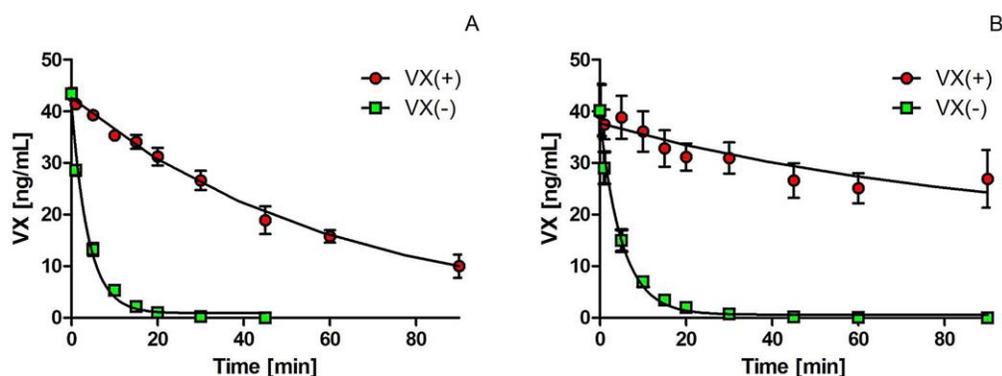
The present study has demonstrated the potential of further improvement of previously engineered BdPTE mutants, resulting in variants with high catalytic activity towards a broad spectrum of OP nerve agents and preferential degradation of the toxic P(-) enantiomer.

Table 4 Catalytic efficiencies of BdPTE mutants towards V-type nerve agents

k_{cat}/K_M ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	BdPTE-1	BdPTE-2 ^b	BdPTE-3	BdPTE-4	BdPTE-5 ^b	BdPTE-6	BdPTE-7
V1	26.40 ± 0.24	146 ± 4.01	69.4 ± 1.56	49.9 ± 1.56	26.90 ± 0.45	17.20 ± 0.20	38.10 ± 0.36
V2	14.9 ± 0.39	87.6 ± 3.68	38.2 ± 0.51	23.6 ± 0.26	14.50 ± 0.12	9.94 ± 0.16	12.80 ± 0.11
V3	4.21 ± 0.17	16.1 ± 0.03	5.26 ± 0.50	3.05 ± 0.03	3.12 ± 0.09	2.17 ± 0.08	4.33 ± 0.14
V4 (VX)	11.30 ± 0.35	45.9 ± 0.76 ^a	63.1 ± 0.24 ^a	38.1 ± 0.36	11.80 ± 0.17	16.80 ± 0.47	20.70 ± 0.48
V5	4.41 ± 0.06	10.2 ± 0.03	5.43 ± 0.18	5.21 ± 0.11	1.71 ± 0.02	1.57 ± 0.07	3.45 ± 0.02
V6	5.61 ± 0.43	28.3 ± 0.34	21.8 ± 0.84	16.1 ± 0.04	4.74 ± 0.55	4.24 ± 0.05	9.62 ± 0.39
V7	2.74 ± 0.10	5.69 ± 0.03	2.73 ± 0.13	3.58 ± 0.03	1.18 ± 0.02	1.44 ± 0.04	4.03 ± 0.11
V8 (VR)	1.03 ± 0.004	5.68 ± 0.07	6.06 ± 0.05 ^a	5.89 ± 0.26	21.40 ± 0.14	26.20 ± 0.98	22.20 ± 0.66
V9 (CVX)	2.00 ± 0.06	5.98 ± 0.19	6.49 ± 0.22	5.24 ± 0.24	10.60 ± 0.22	11.10 ± 0.34	9.60 ± 0.22
V10	0.30 ± 0.01	0.64 ± 0.01	0.66 ± 0.06	0.56 ± 0.01	2.01 ± 0.003	0.33 ± 0.006	0.90 ± 0.03

^aData from Job et al. (2020)^bData from Escher et al. (2020)**Table 5** Catalytic efficiencies of BdPTE mutants towards amiton analogues

k_{cat}/K_M ($\times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$)	BdPTE-1	BdPTE-2 ^a	BdPTE-3	BdPTE-4	BdPTE-5 ^a	BdPTE-6	BdPTE-7
A1	0.25 ± 0.005	0.97 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.12 ± 0.002	0.15 ± 0.005	0.22 ± 0.01
A2 (amiton)	0.05 ± 0.001	0.22 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.005	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.0004	0.08 ± 0.002
A3	0.02 ± 0.001	0.26 ± 0.004	0.02 ± 0.001	0.06 ± 0.003	0.01 ± 0.0003	0.02 ± 0.0004	0.05 ± 0.0004

^aData from Escher et al. (2020)**Fig. 1** Detoxification of VX by BdPTE-4 (A) and BdPTE-7 (B): degradation of VX enantiomers was investigated by chiral LC-MS/MS. Red circles VX(+), green squares VX(-). Data are shown as means ± SD ($n=3$) (color figure online)

The BdPTE variants C23, 10-2-C3 and 10-2-C3(I106A), here corresponding to BdPTE-1, BdPTE-2 and BdPTE-5, were previously characterized in the form of fusion proteins with the 42.5 kDa MBP with regard to their hydrolytic activity towards different OP nerve agents (Goldsmith et al. 2016, 2017; Cherny et al. 2013). A comparison of

the previously published k_{cat}/K_M values with those measured in the present study for the variants BdPTE-1, BdPTE-2, BdPTE-5—devoid of a large fusion partner and only equipped with the nine-residue *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra 2007)—revealed differences in catalytic activities. Inter-laboratory variations may be due to multiple factors

such as experimental conditions (e.g., assay temperature, concentrations of essential cofactors), protein purity and the use of the N-terminal MBP-tag (Roodveldt and Tawfik 2005).

Generally, a catalytic bioscavenger requires a high k_{cat}/K_M for efficient detoxification of OPs in vivo. Ashani et al. (2016) compared different animal studies that investigated OP degrading enzymes to define their required circulatory levels. Accordingly, a minimal k_{cat}/K_M value of $50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ at an enzyme dose of 1 mg kg^{-1} was proposed to fully protect the animals from intoxication, whereas smaller protein doses ($< 1 \text{ mg kg}^{-1}$) or degradation rates (e.g. $25 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) prevented mortality but not toxic effects. Notably, the enzyme variants BdPTE-1, BdPTE-2 and BdPTE-5 prepared and investigated in the present study showed a catalytic efficiency $\geq 50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ towards the nerve agents GA, GB, V1, V2 and V4 (VX). However, these bioscavenger candidates need further enhancement to cover a broad spectrum of potential threat agents.

To further improve stability of BdPTEs, the mutants 10-2-C3(C59V/C227V) and 10-2-C3(C59V/I106A/C227V) were constructed. By elimination of the two free thiol groups, with the additional substitutions C59V/C227V, the thermal stability of 10-2-C3(C59V/C227V) was raised by 2°C in comparison with the parental mutant: $T_m = 65.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$ versus $T_m = 63.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$ and, in particular, the enzyme was less susceptible to oxidative damage, which may occur in the strongly oxidative environment of the blood stream (Job et al. 2020). Remarkably, the corresponding mutants BdPTE-3 and BdPTE-6 exhibited almost the same catalytic activities as their precursors (BdPTE-2 and BdPTE-5, respectively); however, still only a few nerve agents were efficiently degraded with the desired k_{cat}/K_M value of $\geq 50 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Tables 3, 4).

Efficient detoxification of persistent V-type nerve agents requires not only high catalytic efficiencies but also a long biological half-life (Goldsmith et al. 2017). Methods to prolong circulation of enzymes in vivo, such as chemical coupling with the synthetic polymer poly-ethylene glycol (PEGylation), were previously applied to a BdPTE mutant, thus achieving a mean residence time of 50 h instead of 1 h for the unmodified enzyme (Novikov et al. 2010). An innovative approach to extend the plasma half-life of pharmacologically active proteins including enzymes is PASylation technology, which shares with PEGylation the biophysical effect of retarded glomerular filtration (Schlapschy et al. 2013). However, PASylation offers several advantages over PEGylation (Gebauer and Skerra 2018; Schlapschy et al. 2013): in particular, the ease of manufacturing the PASylated compound as a fusion protein, thus obviating the need for chemical coupling, and the intracellular degradability of the PAS polypeptide, in contrast to PEG, which over time accumulates in cells and tissues. To take

benefit of this technology, a PAS tag with 200 residues was appended to BdPTE-3, yielding BdPTE-4, to potentially increase its circulation time in vivo. Moreover, introduction of the flexible PAS sequence as a linker proved useful in the recent investigation of Escher et al. (2020) with the aim to generate a bispecific catalytic bioscavenger. The resulting heterodimer BdPTE-7 combines the substrate profiles of its constituent subunits, BdPTE-1 and BdPTE-6, without impairing their individual catalytic activities. Apart from the PAS(100) linker between the two subunits, the additionally appended PAS(200)-tag should further slowdown clearance in vivo. Although BdPTE-7 did not quite reach the desired k_{cat}/K_M values, its extended substrate spectrum, with $k_{\text{cat}}/K_M \geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for several G- and V-type nerve agents, and its anticipated prolonged circulation make this enzyme a promising drug candidate to protect against OP nerve agent intoxications.

The investigation of the catalytic activities of the PASylated BdPTE-4 and the PASylated fusion protein BdPTE-7 towards VX resulted in k_{cat}/K_M values of $38.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $20.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively, both variants with markedly higher stereochemical preference towards the more toxic VX(-) enantiomer. The knowledge of the substrate-specific k_{cat}/K_M values, together with an estimation of BdPTE concentrations after administration in vivo, enables the calculation of OP detoxification half-times using the equation $t_{1/2} = 0.69/(k_{\text{cat}}/K_M \times [\text{BdPTE}])$, an approach which was previously validated with guinea pig in vivo data (Worek et al. 2014). Intravenous injection of 1 mg kg^{-1} BdPTE-4 or BdPTE-7 into a 400 g guinea pig, having 39 mL kg^{-1} plasma volume (Wille et al. 2016), would result in an estimated peak BdPTE plasma concentration of 474 and 260 nM, respectively. On the base of determined k_{cat}/K_M values (Table 4), a VX degradation $t_{1/2}$ of 2.3 and 7.7 s can be calculated for BdPTE-4 and BdPTE-7. Hence, at the selected BdPTE dose, BdPTE-4 would meet the postulated requirement of a degradation half-time of < 5 s being necessary to preserve survival and to prevent signs of poisoning while BdPTE-7 is close to this requirement.

In conclusion, BdPTE-4 and BdPTE-7 exhibited comparable or slightly enhanced catalytic activities in comparison to their precursor mutants. Further research should be directed towards optimization of catalytic efficiency against a broader spectrum of structurally diverse OP nerve agents. Therefore, the new approach of a heterodimeric scavenger by combination of subunits from different organophosphate hydrolases is considered promising. In fact, the bispecific BdPTE-7 showed a reasonable to high catalytic efficiency towards a broad spectrum of G- and V-type nerve agents and is expected to have a reduced clearance time in vivo due to PASylation. Further in vivo studies are needed to verify the therapeutic efficacy and

prolonged circulation times of BdPTE-4 and BdPTE-7 in nerve agent-poisoned animals.

Acknowledgements The authors wish to thank the German Ministry of Defence for financial support and S. Hänel for skillful technical assistance.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that there are no conflicts of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Ashani Y, Leader H, Aggarwal N, Silman I, Worek F, Sussman J, Goldsmith M (2016) In vitro evaluation of the catalytic activity of paraoxonases and phosphotriesterases predicts the enzyme circulatory levels required for in vivo protection against organophosphate intoxications. *Chem Biol Interact* 259:252–256
- Benschop HP, de Jong LPA (1988) Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation, and toxicology. *Acc Chem Res* 21:368–374
- Bierwisch A, Zengerle M, Thiermann H, Kubik S, Worek F (2014) Detoxification of alkyl methylphosphonofluoridates by an oxime-substituted β -cyclodextrin—an in vitro structure-activity study. *Toxicol Lett* 224:209–214
- Bigley A, Xu C, Henderson T, Harvey S, Raushel F (2013) Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J Am Chem Soc* 135:10426–10432
- Bigley A, Mabanglo M, Harvey S, Raushel F (2015) Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR. *Biochemistry* 54:5502–5512
- Binder U, Skerra A (2017) PASylation®: a versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 31:10–17
- Chen-Goodspeed M, Hong S, Raushel F, Sogorb M, Wu F (2001a) Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry* 40:1325–1331
- Chen-Goodspeed M, Sogorb M, Wu F, Raushel F (2001b) Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry* 40:1332–1339
- Cherny I, Greisen P, Ashani Y, Khare S, Oberdorfer G, Leader H, Baker D, Tawfik D (2013) Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem Biol* 8:2394–2403
- Costanzi S, Machado JH, Mitchell M (2018) Nerve agents: what they are, how they work, how to counter them. *ACS Chem Neurosci* 9:873–885
- Despotović D, Aharon E, Dubovetskiy A, Leader H, Ashani Y, Tawfik D (2019) A mixture of three engineered phosphotriesterases enables rapid detoxification of the entire spectrum of known threat nerve agents. *Protein Eng Des Sel* 32:169–174
- Dodge J, Mitchell C, Hanahan D (1963) The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 100:119–130
- Escher B, Köhler A, Job L, Worek F, Skerra A (2020) Translating the concept of bispecific antibodies to engineering heterodimeric phosphotriesterases with broad organophosphate substrate recognition. *Biochemistry* 59:4395–4406
- Fling S, Gregerson D (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155:83–88
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins AR, Bairoch A (2005) The proteomics protocols handbook: protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. Humana Press Inc., Totowa
- Gebauer M, Skerra A (2018) Prospects of PASylation® for the design of protein and peptide therapeutics with extended half-life and enhanced action. *Bioorg Med Chem* 26:2882–2887
- Goldsmith M, Eckstein S, Ashani Y, Greisen P, Leader H, Sussman J, Aggarwal N, Ovchinnikov S, Tawfik D, Baker D, Thiermann H, Worek F (2016) Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. *Arch Toxicol* 90:2711–2724
- Goldsmith M, Aggarwal N, Ashani Y, Jubran H, Greisen P, Ovchinnikov S, Leader H, Baker D, Sussman J, Goldenzweig A, Fleishman S, Tawfik D (2017) Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng Des Sel* 30:333–345
- Grob D (1963) Anticholinesterase intoxication in man and its treatment. In: Koelle GB (ed) *Cholinesterases and anticholinesterase agents*. Springer, Berlin, pp 989–1027
- Holmstedt B (1959) Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev* 11:567–688
- Job L, Köhler A, Escher B, Worek F, Skerra A (2020) A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. *Toxicol Lett* 321:138–145
- John H, van der Schans MJ, Koller M, Spruit HET, Worek F, Thiermann H, Noort D (2018) Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. *Forensic Toxicol* 36:61–71
- Marrs TC, Sellström A (2007) The use of benzodiazepines in organophosphorus nerve agent intoxication. In: Marrs TC, Maynard RL, Sidell FR (eds) *Chemical warfare agents: toxicology and treatment*, 2nd edn. Wiley, Chichester, pp 331–342
- Nachon F, Brazzolotto X, Trovaslet M, Masson P (2013) Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem Biol Interact* 206:536–544
- Novikov B, Grimsley J, Kern R, Wild J, Wales M (2010) Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol. *J Control Release* 146:318–325
- Reiter G, Müller S, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F, Mikler J (2015) In vitro and in vivo toxicological studies of V nerve agents: molecular and stereoselective aspects. *Toxicol Lett* 232:438–448
- Rice H (2016) Toxicology of organophosphorus nerve agents. In: Worek F, Jenner J, Thiermann H (eds) *Chemical warfare toxicology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 81–116

- Roodveldt C, Tawfik D (2005) Directed evolution of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta* for heterologous expression in *Escherichia coli* results in stabilization of the metal-free state. *Protein Eng Des Sel* 18:51–58
- Schlapschy M, Binder U, Börger C, Theobald I, Wachinger K, Kissling S, Haller D, Skerra A (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26:489–501
- Schmidt T, Skerra A (2007) The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2:1528–1535
- Steindl D, Boehmerle W, Körner R, Praeger D, Haug M, Nee J, Schreiber A, Scheibe F, Demin K, Jacoby P, Tauber R, Hartwig S, Endres M, Eckardt K-U (2021) Novichok nerve agent poisoning. *Lancet* 397:249–252
- Tenberken O, Mikler J, Hill I, Weatherby K, Thiermann H, Worek F, Reiter G (2010a) Toxicokinetics of tabun enantiomers in anaesthetized swine after intravenous tabun administration. *Toxicol Lett* 198:177–181
- Tenberken O, Thiermann H, Worek F, Reiter G (2010b) Chromatographic preparation and kinetic analysis of interactions between tabun enantiomers and acetylcholinesterase. *Toxicol Lett* 195:142–146
- Thiermann H, Aurbek N, Worek F (2016) Treatment of nerve agent poisoning. In: Worek F, Jenner J, Thiermann H (eds) *Chemical warfare toxicology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 1–42
- Tsai P, Bigley A, Li Y, Ghanem E, Cadieux C, Kasten S, Reeves T, Cerasoli D, Raushel F (2010) Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 49:7978–7987
- Tsai P, Fox N, Bigley A, Harvey S, Barondeau D, Raushel F (2012) Enzymes for the homeland defense: optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Biochemistry* 51:6463–6475
- Wilkins M, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez J, Williams K, Appel R, Hochstrasser D (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112:531–552
- Wille T, Neumaier K, Koller M, Ehinger C, Aggarwal N, Ashani Y, Goldsmith M, Sussman JL, Tawfik DS, Thiermann H, Worek F (2016) Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: intraosseous versus intravenous injection. *Toxicol Lett* 258:198–206
- Worek F, Seeger T, Reiter G, Goldsmith M, Ashani Y, Leader H, Sussman J, Aggarwal N, Thiermann H, Tawfik D (2014) Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: a proof-of-concept study. *Toxicol Lett* 231:45–54
- Worek F, Thiermann H, Wille T (2016a) Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? *Toxicol Lett* 244:143–148
- Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H (2016b) Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Arch Toxicol* 90:2131–2145
- Worek F, Thiermann H, Wille T (2020) Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Arch Toxicol* 94:2275–2292

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Veröffentlichung II

Inhibition of an organophosphate-detoxifying bacterial phosphotriesterase by albumin and plasma thiol components

Autoren: Köhler, A., Job, L., Worek, F., Skerra, A.
Fachzeitschrift: Toxicology Letters 350, 194-201
Verlag: Elsevier
Publikationsdatum: 22.07.2021 (online Version)
Doi: 10.1016/j.toxlet.2021.07.011

Der Originalartikel darf nicht im Folgenden nachgedruckt werden. Das Copyright liegt beim Verlag Elsevier.