

Konstruktion und gentechnische Herstellung
katalytischer Bioscavenger zur Detoxifizierung
phosphororganischer Verbindungen

Laura Job, M. Sc.

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences
der Technischen Universität München zur Erlangung einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Michael Rychlik

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Dr. Franz Worek

Die Dissertation wurde am 04.07.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 10.10.2023 angenommen.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können. Ich danke Ihm für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen sowie kritischen Fragen, die so maßgeblich zum Erfolg des Projektes beigetragen haben.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Franz Worek für die anregenden Projekttreffen, Hilfestellungen und die Bereitstellung des spannenden Kooperationsprojektes mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr und der zur Bearbeitung notwendigen Mittel dieses Projektes.

Besonders möchte ich meinen beiden Teamkollegen Benjamin Escher und Anja Köhler für die wertvolle Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt bedanken. Danke dir Anja, dass du durch deine schnellen Messungen stets zum zügigen Fortschritt des Projektes beigetragen hast und danke dir Benny für den steten regen Austausch von Ideen und Konstrukten. Die unproblematische und freundschaftliche Zusammenarbeit hat mir stets Freude bereitet.

Besonderer Dank gebührt ebenfalls Dr. Andreas Eichinger, da ohne ihn die Strukturaufklärung der BdPTE Mutante nicht so leicht möglich gewesen wäre. Danke Andreas für deine Bemühungen.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Biologische Chemie für ihre Hilfsbereitschaft und Aufrichtigkeit im Laboralltag bedanken. Vielen Dank an Theresia Wiedemann und Martina Dotzauer, ohne eure kompetente Herstellung von Medien und Puffern hätten sich viele Experimente hinausgezögert. Besonders möchte ich mich bei meinen langjährigen Mitstreitern Fabian Rodewald, Elena Jerschke, Carina Sommer, Julia Martin, Christian Deuschle, Jonas Schilz, Emanuel Peplau, Corinna Brandt, Lea Nästle und Volker Morath bedanken. Ohne Euch wäre die Zeit im und außerhalb des Labors nur halb so schön gewesen.

Mein Dank gilt auch Stefan Achatz, Klaus Wachinger, André Schiefner, Ina Theobald, Christopher Graf und Dr. Martin Schlapschy für die kompetente und hilfsbereite Unterstützung bei technischen oder auswertungsbedingten Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei Mauricio Testanera für seine unkomplizierte und selbständige Mithilfe im Kontext seiner Bachelorarbeit bedanken.

Dem Team der XL-protein GmbH, besonders Uli Binder, gilt mein Dank für die Zusammenarbeit bezüglich der PASylation®-Technologie und den zahlreichen „Tipps und Tricks“ in diesem Rahmen.

Ein riesiges Dankeschön gilt Robert, meinen Eltern Birgit und Bernhard und meiner Schwester Verena, da ohne euer aller Unterstützung nichts hiervon möglich gewesen wäre. Danke.

Teile dieser Arbeit (sowie weitere Teilprojekte) wurden veröffentlicht:

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.

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.

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.

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.

Job, L., Köhler, A., Eichinger, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2023) Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop. *Biochemistry* 62, 942–955.

Wissenschaftliche Artikel in Vorbereitung:

Job, L., Köhler, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (202x) Engineering of a phosphotriesterase with improved stability and enhanced activity towards malaoxon.

Konferenzbeiträge:

Köhler, A., Job, L., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2018) Katalytische Bioscavenger mit verlängerter Plasma-Halbwertszeit zur Behandlung akuter Vergiftungen durch neurotoxische phosphororganische Verbindungen, 7. Arbeitstagung Medizinischer C-Schutz. München (24.04. - 25.04.2018)

Köhler, A., Job, L., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2019) Catalytic bioscavenger with improved substrate profile, stability and plasma half-life to treat acute poisoning with neurotoxic organophosphorous compounds (OPs), 17th Medical Chemical Defense Conference: Chemical Warfare Agents - old problems and new challenges. München (27.03. - 28.03.2019)

Job, L., Köhler, A., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2019) Catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation to treat acute poisoning with neurotoxic organophosphorous compounds (OPs), 33rd Annual Symposium of The Protein Society, Seattle (02.07.2019)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Phosphororganische Verbindungen	1
1.1.1	Geschichte phosphororganischer Nervenkampfstoffe	1
1.1.2	Geschichte Phosphororganischer Pestizide.....	2
1.1.3	Struktur und chemische Eigenschaften	4
1.2	Vergiftungsreaktion und klinische Symptome	6
1.3	Behandlungsmöglichkeiten.....	10
1.4	Die Phosphotriesterase aus <i>Brevundimonas diminuta</i> (BdPTE).....	12
1.4.1	Geschichte der BdPTE.....	12
1.4.2	Eigenschaften und Reaktionsmechanismus der BdPTE.....	12
1.4.3	Fortschritte beim Engineering der BdPTE	15
1.4.4	Entwicklung der BdPTE als medizinisches Antidot	17
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	18
2	Methodenüberblick	19
2.1	Bakterienstämme und Vektoren	19
2.2	Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR.....	19
2.3	Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Enzymen	20
2.3.1	Herstellung von BdPTE-Varianten mit dem <i>Strep</i> -tag II.....	20
2.3.2	Herstellung von BdPTE-Varianten mit dem His ₆ -tag.....	21
2.4	Electrospray-Ionization Massenspektrometrie (ESI-MS)	22
2.5	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie und thermische Denaturierung.....	23
2.6	Enzymaktivitätsmessung	23
2.7	Proteinkristallographische Methoden	24
2.8	Computerprogramme und Datenbanken.....	25
3	Veröffentlichungen	27
3.1	Veröffentlichung in Toxicology Letters (2019) - Überblick und eigener Beitrag	27
3.2	Veröffentlichung in Biochemistry (2023) - Überblick und eigener Beitrag.....	29
4	Diskussion	31
4.1	Rationales Stabilitäts-Engineering der BdPTE	31

4.2	Potential hochaktiver Biokatalysatoren für den therapeutischen Einsatz	33
4.3	Einblicke in die Kristallstruktur der Mutante 10-2-C3(C59V/C227V)	39
4.4	Reaktionsmechanismen der BdPTE	43
5	Zusammenfassung	47
6	Abkürzungen	49
7	Literatur	51
8	Anhang	63
8.1	Veröffentlichung 1	63
8.2	Veröffentlichung 2	72

1 Einleitung

1.1 Phosphororganische Verbindungen

1.1.1 Geschichte phosphororganischer Nervenkampfstoffe

Die Geschichte der phosphororganischen Nervenkampfstoffe begann 1936 mit Dr. Gerhard Schrader, einem deutschen Chemiker bei der IG Farben in Leverkusen. Er hatte zur Aufgabe, neue Insektizide zu entwickeln, um Deutschland unabhängiger von importierten Lebensmitteln zu machen. 1936 machte er erste Versuche mit Stickstoff-Phosphorsäure-Verbindungen, und im Dezember 1936 synthetisierte er unter der Stoffbezeichnung 9/91 erstmalig das Nervengas Dimethylphosphoramidocyansäureethylester, welches später in Tabun (GA) umbenannt wurde (Schmaltz, 2006; Schrader, 1945). Nachdem dessen insektizide Wirkung auch in geringer Konzentration festgestellt wurde, untersuchte ein Labor der IG Farben anschließend die toxische Wirkung. Hierbei wurde festgestellt, dass Tabun höchst toxisch für Warmblüter und daher als Insektizid ungeeignet ist. Jedoch erschien es als chemischer Kampfstoff für das Militär geeignet. Schon im Mai 1942 begann die großtechnische Produktion von Tabun des deutschen Militärs in Dyhernfurth mit einer Kapazität von rund 1000 t/Monat (Schmaltz, 2006).

Ende 1938 gelang es Schrader, das Nervengas Sarin (GB; Methanfluorphosphonsäureisopropylester) herzustellen, welches eine noch wesentlich stärkere toxische Wirkung als Tabun zeigte (Schmaltz, 2006). Am Kaiser Wilhelm Institut (KWI) für Medizinische Forschung wurde schließlich 1944 bei der Vitamin-Antagonisten-Forschung von Dr. Richard Kuhn der Nerven-kampfstoff Soman (GD; Methanfluorphosphonsäure(1,2,2-trimethylpropyl)ester) entdeckt. Dieses Nervengas war wiederum um einiges toxischer als Tabun und Sarin (Schmaltz, 2006). Cyclosarin (GF; Methanfluorphosphonsäureisocyclohexylester), welches im Jahre 1949 von Schrader und Kollegen synthetisiert wurde, komplettierte die in Deutschland entwickelten und bekanntesten Kampfstoffe (Schmaltz, 2006). Die Gesamtproduktion der Nervengase bis 1945 wurde auf fast 13.000 Tonnen Tabun, 61 Tonnen Sarin und 3 Tonnen Soman geschätzt (Hahn, 1986); jedoch gibt es keine Hinweise, dass Deutschland sie jemals einsetzte (Schmaltz, 2006).

Einige Jahre später, 1952, wurden die sogenannten V-Stoffe von Ranjit Ghosh und J. F. Newman in den Pflanzenschutz Laboren des britischen Unternehmens Imperial Chemical Industries entdeckt. Auch hier wurde schnell festgestellt, dass diese Stoffe zu toxisch sind, um als Pflanzenschutzmittel eingesetzt zu werden. Daher wurden diese V-Stoffe in der Porton Down Forschungseinrichtung (UK) vom britischen Militär weiter untersucht, wo im Jahre 1954 VX (Ethyl-2-diisopropylaminoethylmethylphosphonothiolat) synthetisiert wurde. Etwa zur

gleichen Zeit wurde in der UDSSR ein Isomer von VX „Russian VX“ (RVX; [2-(Diethylamino)ethyl](2-methylpropyl)methylphosphonothiolat)) synthetisiert. Ein weiteres bekanntes Isomer von VX ist „Chinese VX“ (CVX; Butyl-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat)) (Gupta, 2020). Der Unterschied von V-Stoffen gegenüber den G-Stoffen ist, dass sie schwer flüchtig sind, d.h. sie können lange Zeit auf der Haut oder an Oberflächen haften. Außerdem sind die V-Stoffe rund 10mal toxischer als Sarin (Schmaltz, 2006).

In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts änderte sich die weltweite Einstellung gegenüber chemischen Waffen. 1997 wurden mit dem „Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen“ (CWÜ) die Entwicklung und Herstellung sowie Besitz, Weitergabe und Einsatz chemischer Kampfstoffe verboten. Mittlerweile wurde das CWÜ von 193 Mitgliedern angenommen, nur vier Mitgliedstaaten der Vereinten Nationen sind noch nicht beigetreten. Dazu gehören Ägypten, Israel, Nordkorea und Süd Sudan (Auswärtiges Amt, 2020). Trotz dieses Übereinkommens setzte das syrische Regime bzw. die syrischen Streitkräfte Sarin oder eine Sarin-ähnliche Substanz bei einem Angriff in Khan Shaykhun am 4. April 2017 ein. Hierbei kamen rund 100 Menschen ums Leben (OPCW, 2017). Der Sicherheitsrat der Vereinten Nationen konnte sich jedoch noch nicht auf Sanktionen gegenüber Syrien einigen (Auswärtiges Amt, 2022). Aus diesem Grund ist es nach wie vor ein wichtiges Thema, ein wirksames Antidot gegen Vergiftungen mit Nervenkampfstoffen zu entwickeln.

1.1.2 Geschichte phosphororganischer Pestizide

Zwischen 1938 und 1944 synthetisierte Schrader neben den Fluor enthaltenden Nerven-
kampfstoffen auch einige Insektizide auf Basis der Phosphorsäureester, wie Parathion, Pota-
san und Systox (Matolcsy *et al.*, 1988). Nach dem 2. Weltkrieg gelangten amerikanische Fir-
men an die Informationen aus Schraders Labor und begannen ebenfalls Organophosphat-
(OP)-Pestizide in großen Mengen herzustellen. Heutzutage ist eine große Auswahl an OP-
Stoffen mit einer Vielfalt an biologischen Eigenschaften bekannt, welche als Insektizide, Ne-
matozide, Akarizide, Fungizide, usw. eingesetzt werden können. Zu den ersten vermarkteten
OP-Pestiziden gehörten Parathion, Malathion und Azinphosmethyl. Der Einsatz dieser Pesti-
zide in der Landwirtschaft nahm stark zu, nachdem Chlorkohlenwasserstoff-Insektizide wie
DDT und Heptachlor in den 1970ern verboten wurden (Soltaninejad und Shadnia, 2014).

Von phosphororganischen Pestiziden geht ebenfalls ein hohes Vergiftungsrisiko aus. Bei
Landarbeitern kann die andauernde Exposition zu gesundheitlichen Schäden führen. Vor al-
lem in Entwicklungsländern werden noch viele, sonst mittlerweile verbotene OP-Pestizide ein-
gesetzt (Hertz-Picciotto *et al.*, 2018). Daher schätzen die Vereinten Nationen die mit Pestizi-
den assoziierten Todesfälle auf rund 200.000 pro Jahr, wobei 99 % davon in Entwicklungs-
ländern auftreten, wo die Gesundheits-, Sicherheits- und Umwelt-Regularien weniger strikt

eingehalten werden (UN, 2017). Zudem sind rund 110.000 Fälle pro Jahr davon auf Suizide zurückzuführen (Mew *et al.*, 2017). Die hohe Vergiftungsrate in Entwicklungsländern lässt sich auf unzureichendes Training, niedrigere Bildung, unzureichenden Zugang zu Informationen (wie z. B. weniger toxische Alternativen zur Schädlingsbekämpfung), die schlechte Qualität oder das Fehlen von persönlicher Schutzkleidung, schlecht gewartete Arbeitsgeräte und den höheren in der Landwirtschaft beschäftigten Bevölkerungsanteil zurückführen (Eddleston *et al.*, 2002). Außerdem haben Unfälle sowie übermäßiger und falscher Gebrauch zu Toden bei Schulkindern geführt, wie z. B. 2013 in Indien, wobei 23 Kinder nach einer Mahlzeit, die mit einem hoch gefährlichen phosphororganischen Pestizid kontaminiert war, starben (Reuters, 2013; UN, 2017).

In einer Studie von Soltaninejad *et al.* (2007) wurden 51 forensische Fälle zwischen 2003 und 2004 am Rechtsmedizinischen Zentrum Teheran untersucht, welche durch eine Pestizid-Vergiftung herbeigeführt waren. Davon waren 53 % auf Suizid zurückzuführen. 63 % gingen auf Insektizide zurück, wobei die phosphororganischen Insektizide die häufigste Ursache waren (17 Fälle). Das größtenteils detektierte phosphororganische Insektizid war Malathion mit 8 Fällen, während in einem Fall Chlorpyrifos festgestellt wurde (Soltaninejad *et al.*, 2007). Diese Studie zeigt, dass Malathion trotz seiner Einstufung als nur „leicht gefährlich“ einen großen Anteil der phosphororganischen Insektizid Vergiftungen ausmacht und daher das Gefährdungspotential dieses in den meisten Ländern noch legalen Insektizids nicht unterschätzt werden sollte.

Zu den bekanntesten OP-Pestiziden gehören unter anderem Parathion (Diethyl-(*p*-nitrophenyl)thiophosphorsäureester), auch bekannt als E 605, welches ebenfalls von Schrader 1944 entwickelt wurde und dessen Metabolit Paraoxon (Diethyl-(*p*-nitrophenyl)phosphat; Matolcsy *et al.*, 1988; Schrader, 1950). Parathion wurde ab 1947 in den USA und ein Jahr später auch in Deutschland industriell hergestellt. In den 90er Jahren gehörte Parathion zu den wichtigsten Insektiziden, was die Produktionskapazitäten betraf. Jedoch entschied 2001 die Europäische Union (EU), die Abgabe, Einfuhr, Anwendung und Zulassung von Parathion enthaltenden Pflanzenschutzmitteln zu verbieten. Bereits erteilte Zulassungen mussten binnen 6 Monaten zurückgenommen werden (Kommission der EG, 2001). Mittlerweile wurde Parathion von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als hoch gefährlich eingestuft (Morris *et al.*, 2014; Soltaninejad und Shadnia, 2014) und die Anwendung in 142 Ländern verboten (PAN, 2022).

Ein weiteres relevantes OP-Pestizid ist Malathion ([1,2-Bis(ethoxycarbonyl)ethyl]-dimethyldithiophosphat), welches 1950 synthetisiert und 1951 von der American Cyanamid Company patentiert wurde (Cassaday and Stamford, 1951; Matolcsy *et al.*, 1988). Da Malathion als nur leicht gefährlich von der WHO eingestuft wurde (Morris *et al.*, 2014), ist derzeit erst in 32

Ländern (inklusive EU) die Nutzung verboten (PAN, 2022). Das Metabolit von Malathion ist Malaaxon (Diethyl-2-[(dimethoxyphosphoryl)thio]succinat).

Ebenso wichtig ist das Pestizid Mevinphos ((2-Methoxycarbonyl-1-methylvinyl)dimethylphosphat), welches 1954 von der Shell Development Company patentiert wurde (Stiles, 1954). Die Nutzung von Mevinphos wurde bislang in 43 Ländern (inklusive EU) verboten, nachdem es von der WHO ebenfalls als hoch gefährlich eingestuft wurde (Morris *et al.*, 2014; PAN, 2022).

Chlorpyrifos-oxon (Diethyl-(3,5,6-trichlorpyridin-2-yl)phosphat), ein Metabolit von Chlorpyrifos (Diethyl-(3,5,6-trichlorpyridin-2-yl)thiophosphat) stellt ebenfalls eine große Gefahr dar. Chlorpyrifos wurde 1966 von der Dow Chemical Co. patentiert (Rigterink, 1966). Seit Februar 2020 ist die Verwendung von Chlorpyrifos, welches als moderat gefährlich von der WHO eingestuft wurde (GHS Klasse 3, oral: LD₅₀ in Ratten 50-300 mg/kg Körpergewicht), in der EU verboten (Europäische Kommission, 2020). Ein Verbot gilt auch in zwölf weiteren Staaten (PAN, 2022).

1.1.3 Struktur und chemische Eigenschaften

Phosphororganischen Verbindungen beinhalten ein fünfwertiges Phosphoratom, welches eine 3s²3p³ Elektronen Konfiguration besitzt. Wie schon oben erwähnt, werden die Kampfstoffe in V- und G-Stoffe eingeteilt.

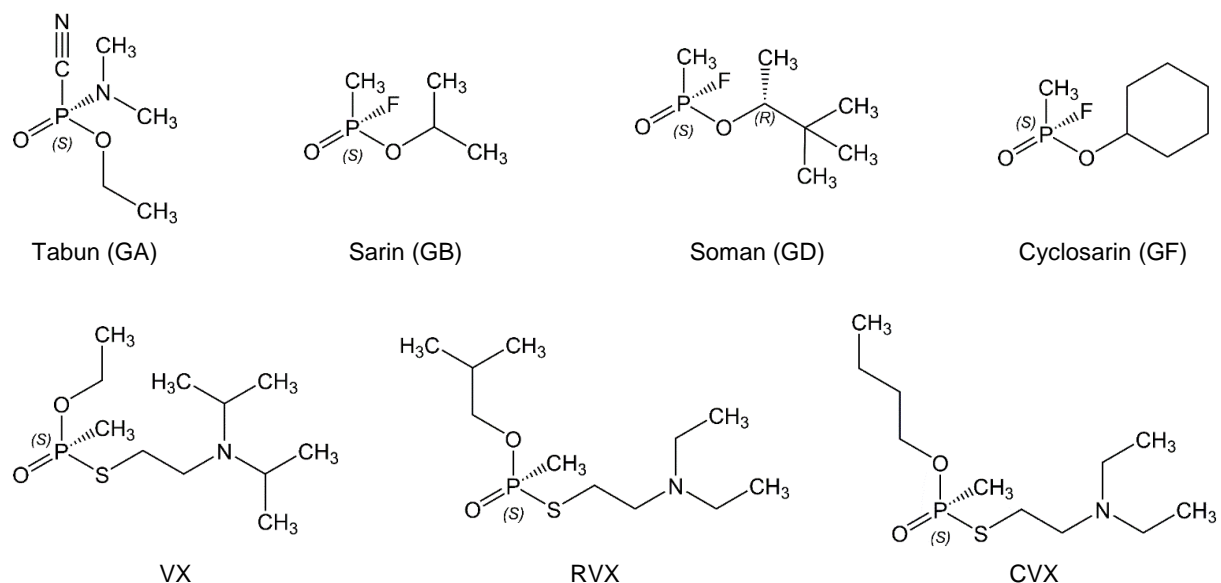


Abbildung 1: Strukturformeln der relevanter Nervenkampfstoffe.

Bei den V-Stoffen handelt es sich um Schwefel-substituierte und bei den G-Stoffen meist um Fluor-substituierte Methylphosphonate mit einem chiralen Phosphoratom (Abbildung 1), wobei die S_P-Isomere meist die toxischere Komponente sind (Benschop und De Jong, 1988).

Die V-Stoffe besitzen dementsprechend eine Thiolabgangsgruppe, während Sarin, Soman und Cyclosarin Flourabgangsgruppen und Tabun eine Nitrilabgangsgruppe tragen.

Die G-Stoffe sind viskose Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Flüchtigkeiten (Dampfdruck zwischen 5,9 und 197 Pa bei 20 °C) und schwachen Gerüchen (Tabelle 1). Die Dämpfe der Nervenkampfstoffe besitzen wenig bis gar keine geruchlichen Wareigenschaften. Da der Dampfdruck und die akute Toxizität der G-Stoffe ausreichend hoch sind, sind die Dämpfe schnell tödlich (Mioduszewski *et al.*, 1998; Young und Watson, 2020). Durch die hohe Volatilität der G-Stoffe verläuft die wahrscheinlichste Expositionsroute über direkten Kontakt der Augen und der oberen Atemwege mit den Dämpfen (Dabisch *et al.*, 2008; Gupta, 2020; Young und Watson, 2020).

VX hingegen ist eine bernsteinfarbige, geruchlose Flüssigkeit und RVX ist eine farblose Flüssigkeit, beide mit geringerer Flüchtigkeit. Aufgrund der geringeren Volatilität der V-Stoffe gelten diese jedoch eher als Kontaktgift, welches über einige Tage auf Oberflächen bestehen kann, solange kalte Wetterbedingungen vorherrschen oder wenn große Flüssigkeitsmengen vorliegen. Obwohl die V-Stoffe nicht leicht flüchtig sind, sind V-Stoff Dämpfe (nach Akkumulation) potenter als diejenigen von GB oder anderen G-Stoffen (Mioduszewski *et al.*, 1998; Young und Watson, 2020). Von VX geht eine geringere Gefahr durch Inhalation aus (ausgenommen Temperaturen größer 40 °C), jedoch wird es gut über die Haut absorbiert (Dunn, 1989; Gupta, 2020; Young und Watson, 2020).

Die Eigenschaften der verschiedenen Nervenkampfstoffe sind in Tabelle 1 zusammengefasst, wobei für das VX Isomer CVX kaum Daten vorliegen.

Phosphororganische Pestizide besitzen ein Schwefel- oder Sauerstoffatom, welches über eine Doppelbindung mit dem zentralen Phosphoratom verknüpft ist, und jeweils zwei einfach gebundene Ethoxy-Gruppen. Die Strukturen relevanter Pestizide sind in Abbildung 2 zu sehen.

Die Oxo-Formen der Pestizide sind nicht zu vernachlässigen, da zuvor gezeigt wurde, dass in der Leber von Ratten eine durch die Cytochrom P-450 Monooxygenase vermittelte Oxidation von Parathion zu Paraoxon stattfindet (Kamataki *et al.*, 1976). Die Metabolisierung von Chlorpyrifos zu Chlorpyrifos-oxon wurde später auch in Maus-Lebermikrosomen nachgewiesen (Sultatos und Murphy, 1983). Zudem haben die Oxo-Formen höhere inhibitorische Wirkung auf die Acetylcholinesterase und sind somit toxischer (Huff *et al.*, 1994; Myers *et al.*, 1952). Dies ist auch den letalen Dosen in Tabelle 2 zu entnehmen.

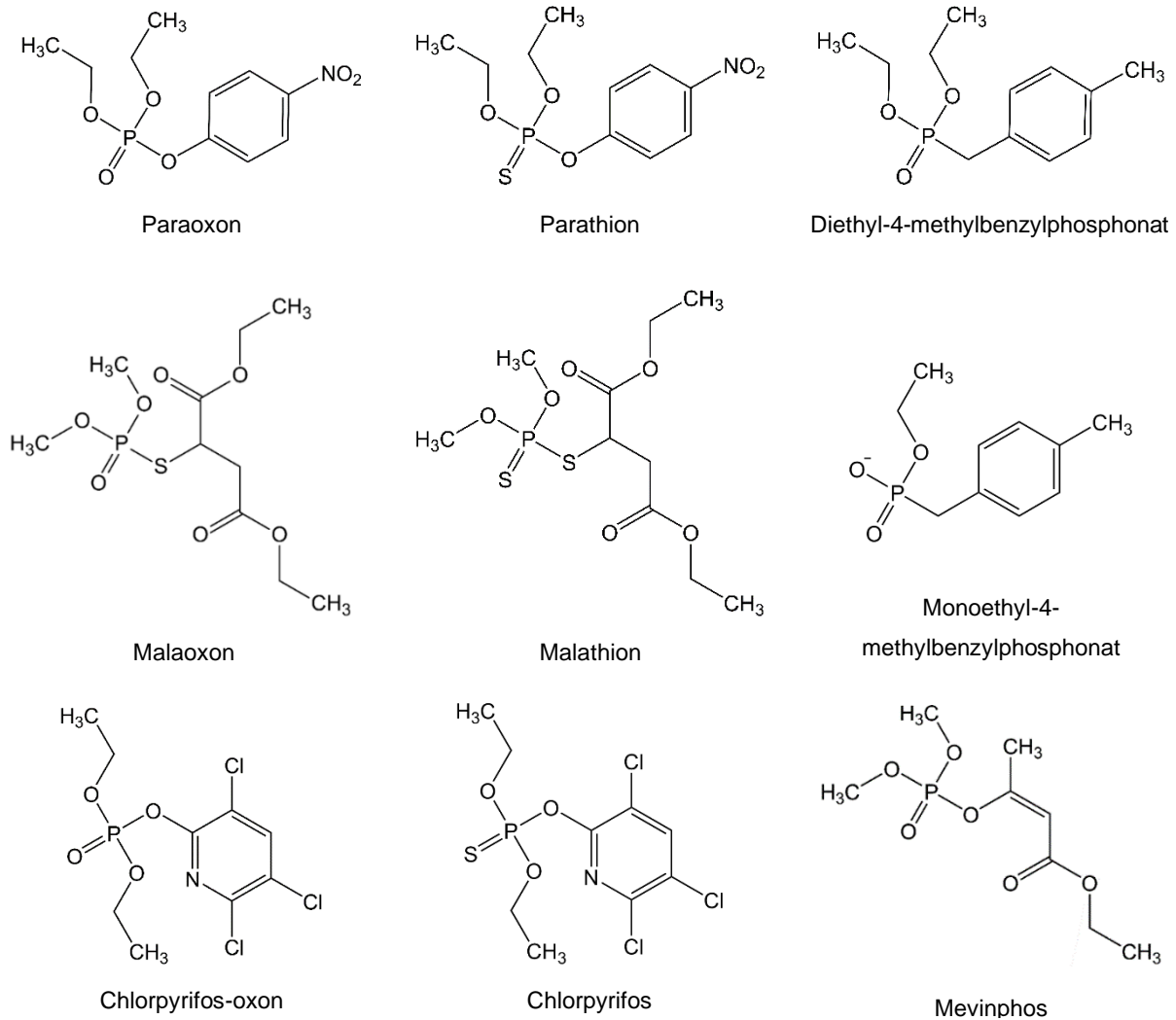


Abbildung 2: Strukturformel relevanter Pestizide bzw. ihrer Metabolite und Analoga.

1.2 Vergiftungsreaktion und klinische Symptome

Alle erwähnten OP-Nervenkampfstoffe und -Pestizide sind Cholinesteraseinhibitoren, die die Acetylcholinesterase (AChE) an einem Serin-Rest im aktiven Zentrum phosphorylieren. Dadurch wird verhindert, dass der Neurotransmitter Acetylcholin im synaptischen Spalt oder in der neuromuskulären Endplatte inaktiviert wird. Dies führt zur Akkumulation von Acetylcholin an den Synapsen, was zunächst die cholinerge synaptische Reizweiterleitung stimuliert und später lähmt. Abhängig von der absorbierten Menge des OPs und dem Aufnahmeweg kann das periphere oder das zentrale Nervensystem betroffen sein. Die Folgen sind entweder muskarinerg vermittelte Effekte wie Speichel- und Tränenfluss, Bronchorrhö, Urinieren, Darmentleerung, Magen-Darm-Krämpfe und Erbrechen oder nikotinerg vermittelte Effekte wie Pupillenverengung, Herzrasen, Schwäche, Bluthochdruck/Hyperglykämie und Faszikulation. (Sidell und Borak, 1992)

Tabelle 1: Physikalische und chemische Eigenschaften der phosphororganischen Kampfstoffe sowie toxikologische Daten.

	GA (Tabun)	GB (Sarin)	GD (Soman)	GF (Cyclosarin)	VX	Russisches VX
CAS Nr. ^{a,b}	77-81-6	107-44-8	96-64-0	329-99-7	50782-69-9	159939-87-4
Chemischer Name ^{a,b}	Dimethylphosphoramido- cyansäureethylester	Methanfluorophosphon- säureisopropylester	Methanfluorophos- phonsäure(1,2,2- trimethylpropyl)ester	Methanfluorophosphon- säureisocyclohexylester	Ethyl-2-diisopropyl- aminoethylmethyl- phosphonothiolat	2-(Diethylamino)ethyl-(2- methylpropyl)methyl- phosphonothiolat
Summenformel ^{a,b}	C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₂ P	C ₄ H ₁₀ FO ₂ P	C ₇ H ₁₆ FO ₂ P	C ₇ H ₁₄ FO ₂ P	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ PS	C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ PS
Molare Masse (g/mol) ^{a,b}	162,13	140,09	182,18	180,16	267,37	267,37
Dampfdruck (Pa) ^{a,d}	9,7 (20 °C)	197,3 (20 °C)	53 (25 °C)	5,9 (20 °C)	0,12 (20 °C)	0,08 ^c (20 °C)
Dichte (g/mL) ^{a,b}	1077	1089	1022	1,13	1008	1.008
Wasserlöslichkeit ^{a,b,d}	72 g/L (20 °C)	1000 g/L (25 °C)	21 g/L (20 °C)	3,7 g/L	30 g/L (25 °C)	Schlecht
Hydrolyse Halbwerts- zeit (20 °C, pH 7) ^d	8,5 h	39-41 h; 80 h	80-83 h	42 h	400-1000 h	--
Aussehen ^{a,b,d}	Farblose bis bräunliche Flüssigkeit	Farblose bis gelbbraune Flüssigkeit	Farblose Flüssigkeit	Farblose Flüssigkeit	Bernsteinfarbene Flüssigkeit	Farblose Flüssigkeit
Geruch ^{a,b,d}	Schwach fruchtig, ge- ruchlos im reinen Zustand	Geruchlos im reinen Zustand	Fruchtig, nach Kampfer, wenn verunreinigt	Geruchlos im reinen Zustand	Geruchlos	Nach gebrannten Sonnenblumenkernen
LD₅₀ Ratte ^{a,b}	3,7 mg/kg (oral)	0,55 mg/kg (oral)	0,4 mg/kg (oral)	0,23 mg/kg (subkutan)	9-56 µg/kg (subkutan)	11,3 µg/kg (subkutan Meerschweinchen)
LD₅₀ dermal Kaninchen ^{a,b}	2,5 mg/kg	0,925 mg/kg	--	--	0,25 mg/kg	--

^a (IFA, 2020)

^b (NCBI, 2020)

^c (Kuca *et al.*, 2006)

^d (Gupta, 2020)

Tabelle 2: Physikalische und chemische Eigenschaften der phosphororganischen Pestizide und deren Oxo-Formen sowie toxikologische Daten.

	Parathion	Paraoxon	Malathion	Malaoxon	Chlorpyrifos	Chlorpyrifos-oxon	Mevinphos
CAS Nr.^a	56-38-2	311-45-5	121-75-5	1634-78-2	2921-88-2	5598-15-2	7786-34-7
Chemischer Name^{a,f}	Diethyl-(p-nitrophenyl)thiophosphat	Diethyl-(p-nitrophenyl)phosphat	(1,2-Bis(ethoxycarbonyl)ethyl)dimethyl-dithiophosphat	Diethyl 2-[(dimethoxyphosphoryl)thio]succinat	Diethyl-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)thiophosphat	Diethyl-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)phosphat	(2-Methoxycarbonyl-1-methylvinyl)-dimethylphosphat
Summenformel^a	C ₁₀ H ₁₄ NO ₅ PS	C ₁₀ H ₁₄ NO ₆ P	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	C ₁₀ H ₁₉ O ₇ PS	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₄ P	C ₇ H ₁₃ O ₆ P
Molare Masse (g/mol)^a	291,26	275,19	330,4	314,29	350,6	334,5	224,15
Dampfdruck (Pa)^a	0,89 (20 °C)	0,15 (25 °C)	0,45 (25 °C)	1,3 (20 °C)	2,5 (25 °C)	0 kPa (25 °C)	16 (25 °C)
Dichte (g/mL)^a	1,26	1,27	1,23	1,24	1,44	~ 1,44	1,25
Wasserlöslichkeit^a	11 mg/L (20 °C)	2,4 g/L (25 °C) ^c	143 mg/L (20 °C)	5-10 g/L (22 °C)	1,4 mg/L (25 °C)	--	600 g/L
Hydrolyse Halbwertszeit	108 d (20 °C, pH 7,4) ^b	144 d (20 °C, pH 7,4) ^b	8,3 d (25 °C, pH 7,2, Erde) ^b 6 d (25 °C, pH 7, Wasser) ^c	5,1 d (25 °C, pH 7,2, Erde) ^c 9 d (25 °C, pH 7, Wasser) ^d	72-81 d (25 °C, pH 7) ^d	5 d (20 °C, pH 7) ^e	35 d (20 °C, pH 7) ^a
Aussehen^a	Braune bis gelbe Flüssigkeit	Rötlich bis gelbe ölige Flüssigkeit	Gelb bis dunkelbraune Flüssigkeit	Farblose viskose Flüssigkeit	Weißer bis strohfarbener kristalliner Feststoff	Farbloser Feststoff	Helgelbe bis orange Flüssigkeit
Geruch^a	Schwach nach Knoblauch	Schwach fruchtig	Nach Knoblauch	Unangenehmer Geruch	Schwach mercaptanartiger Geruch	--	Schwacher Geruch
LD₅₀ Ratte^{a,f}	2 mg/kg (oral)	1,8 mg/kg (oral)	290 mg/kg (oral)	158 mg/kg (oral)	82-155 mg/kg (oral) ^g	135 mg/kg (oral)	3 mg/kg (oral)
LD₅₀ dermal Kaninchen^c	15 mg/kg	5 mg/kg	4100 mg/kg	119 mg/kg	2000 mg/kg	--	4,7 mg/kg

^a (NCBI, 2020)

^b (Gomaa und Faust, 1972)

^c (Paschal und Neville, 1976)

^d (Mastrota et al., 2010)

^e (USEPA, 2016)

^f (IFA, 2020)

^g (Gaines, 1969)

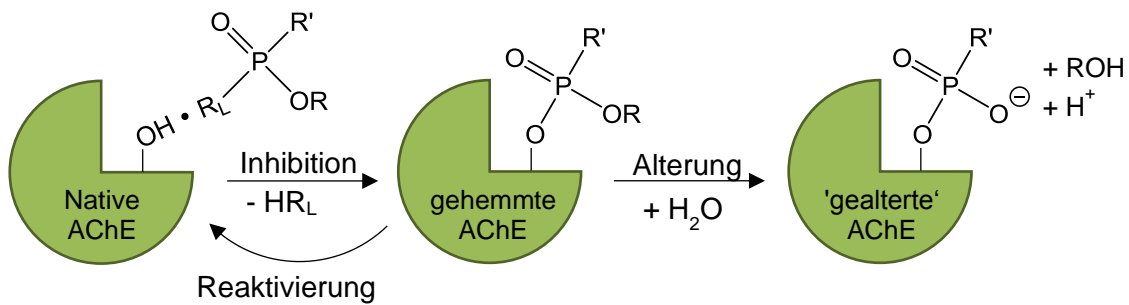


Abbildung 3: Reaktion zwischen Acetylcholinesterase (AChE) und Organophosphat. R_L steht für die Abgangsgruppe, die bei der Inhibition verloren geht. Die inhibierte AChE kann reaktiviert werden, solange der Alterungs-Schritt nicht stattgefunden hat.

Es wurden ebenso Interaktionen mit anderen Esterasen berichtet, z. B. können manche OP-Insektizide zur Inaktivierung der Neurotoxischen Esterase führen, was wiederum zu peripheren neuropathischen Wirkungen führt (Soliman *et al.*, 1982). Bei der Aufnahme von akut toxischen OP-Dosen können Lähmung, Bewusstseinsverlust, Zuckungen, Hypoventilation und schließlich Tod eintreten (Sidell und Borak, 1992; Young und Watson, 2020). Zum Tod führt zumeist eine Kombination aus Bronchokonstriktion und Bronchorrhö, Lähmung des Zwerchfells/der Atemhilfsmuskulatur und Hemmung des zentralen Atemantriebs (Wille *et al.*, 2019).

Die Reaktion zwischen Organophosphat und AChE ist in Abbildung 3 dargestellt. Zuerst bildet sich ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex. Die Komplex-Bildungsrate ist abhängig vom Organophosphat, wobei vor allem die Größe und Form der Reste R und R' eine Rolle spielen. Im nächsten Schritt wird die AChE durch Phosphorylierung kovalent inaktiviert, wobei die Abgangsgruppe R_L durch die Hydroxylgruppe des Serin-Restes im aktiven Zentrum der AChE substituiert wird. Die Kinetik dieser Reaktion ist abhängig von der Abgangsgruppe. Der nächste Schritt ist eine zeitabhängige Dealkylierungsreaktion, welche den Enzym-Inhibitor-Komplex soweit modifiziert, dass das Enzym nicht mehr reaktiviert werden kann. In diesem als Alterung bezeichneten Schritt wird ein Monophosphonsäure-Ester gebildet. Vor diesem Alterungs-Schritt, kann das Enzym durch nukleophile Oxime, wie z. B. Pralidoximchlorid, reaktiviert werden. Die Alterungsrate variiert stark unter den Nervenkampfstoffen (Sidell und Borak, 1992). Nach Kontakt mit Soman ist die Halbwertszeit der Alterung nur Minuten (Sidell, 1974), bei Sarin rund 5 h und mehr als 40 Stunden nach Tabun- und VX-Exposition (Sidell und Borak, 1992; Sidell und Groff, 1974).

1.3 Behandlungsmöglichkeiten

Es ist ein beständiges Ziel, die Behandlung von OP-Vergiftungen zu verbessern. Während bei milden Expositionen mit Nervenkampfstoff-Dämpfen eine Dekontamination und anschließende medizinische Beobachtung ausreichen kann, erfordert die schwerwiegende Exposition mit Dämpfen und Flüssigkeiten neben sofortiger Dekontamination auch Antidot-Verabreichung, künstliche Beatmung, Überwachung und unterstützende Behandlungen über Stunden bis Tage (Sidell und Borak, 1992; Young und Watson, 2020). Die standardisierte Behandlungsstrategie besteht aus der Verabreichung von Atropin, um den parasymphatischen Symptomen entgegenzuwirken (Wille *et al.*, 2019), und einem Oxim (meist Pralidoxim oder Obidoxim; Aas, 2003), um die gehemmte AChE zu reaktivieren (Wille *et al.*, 2019). Meist sind hohe und wiederholte Atropin-Dosen notwendig, bis eine stabile Kreislaufsituation erreicht und der Speichelfluss und die Bronchorrhö beendet sind (Eddleston *et al.*, 2004). Danach reichen in der Regel geringere Dosen von ca. 1 mg Atropin/Stunde als Erhaltungsdosis aus (Wille *et al.*, 2019). Atropin kann jedoch den nikotinergen Symptomen, die durch die Überstimulation der neuromuskulären Endplatte entstehen und zur Muskelschwäche bzw. -lähmung führen, nicht entgegenwirken. Daher wird zusätzlich ein Oxim verabreicht, zuerst als Bolusinjektion und dann als Dauerinfusion (Eyer *et al.*, 2009). Das Ziel der Oxim-Gabe ist die Reaktivierung der gehemmten AChE, um den Acetylcholinüberfluss an den nikotinergen und muskarinergen Rezeptoren abzubauen (Wille *et al.*, 2019). Eine gute Reaktivierungswirkung durch Oxime lässt sich bei durch Sarin oder VX gehemmter AChE beobachten, jedoch zeigen diese bei Vergiftungen mit Tabun oder Cyclosarin nur geringe Wirksamkeit (Worek *et al.*, 2004). Ebenso sind Oxime nicht mehr wirksam, wenn der Alterungs-Schritt der inhibierten AChE bereits stattgefunden hat. Als Begleittherapie werden Benzodiazepine zur Neuroprotektion eingesetzt, so dass die Übererregung im zentralen Nervensystem abgemildert wird. Zur Überbrückung der Zeit, in der keine ausreichende Spontanatmung vorliegt, kann eine künstliche Beatmung helfen (Wille *et al.*, 2019).

Die bereits im Einsatz befindlichen Oxime haben jedoch einige Nachteile. Zum einen sind sie teilweise unzureichend effektiv gegenüber bestimmten Organophosphaten, zum anderen können sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und haben nur begrenzte Stabilität in wässrigen Lösungen. Daher wurde in den letzten Jahren intensiv an neuartigen Reaktivatoren geforscht, wobei die Fortschritte nur langsam sind. (Worek *et al.*, 2020) Zudem wird an Möglichkeiten der Prophylaxe geforscht. Zum Beispiel können Carbamate verabreicht werden, um das aktive Zentrum der AChE durch pseudo-irreversible Inhibition vor dem Organophosphat zu schützen (Nachon *et al.*, 2013). Weitere vorbeugende Maßnahmen betreffen NMDA-Rezeptorantagonisten (Gupta und Dettbarn, 1992). Schließlich stellt der Einsatz von stöchiometrischen Bioscavengern, wie humane Butyrylcholinesterase (hBChE) oder Carboxylesterase,

welche Organophosphate im Plasma binden, bevor sie die AChE in Geweben erreichen können, eine interessante Strategie dar (Ashani *et al.*, 1991b; Maxwell *et al.*, 1987).

Eine demgegenüber vielversprechendere Behandlungsmethode ist der Einsatz von katalytischen Bioscavengern, welche die Organophosphate, bevor sie die AChE erreichen, hydrolysieren. Diese können also in wesentlich geringeren Dosen als die stöchiometrischen Bioscavenger eingesetzt werden und versprechen demnach eine bessere Schutzwirkung (Nachon *et al.*, 2013). Hierfür wurde versucht, humane Cholinesterasen in OP-Hydrolasen umzuwandeln und eine Vielzahl entsprechender Mutanten der hBChE und hAChE konstruiert, jedoch wurden noch keine Kandidaten mit pharmakologischem Interesse identifiziert (Masson *et al.*, 2008; Masson und Lockridge, 2010).

Andere Enzym-Kandidaten zur Hydrolyse von OPs sind die Phosphotriester-Hydrolasen (auch Organophosphat-Hydrolasen, kurz OPHs oder Phosphotriesterasen, kurz PTEs genannt - EC 3.1.8), die in einer Vielzahl von Organismen vorkommen. Diese können in zwei Gruppen untergliedert werden, einmal die Enzyme mit der Präferenz, P-O Bindungen zu spalten, als Aryldialkylphosphatasen bezeichnet (EC 3.1.8.1) und jene, die bevorzugt P-F oder P-CN Bindungen spalten, die Diisopropylfluorophosphatasen (EC 3.1.8.2; Worek *et al.*, 2016). Als bekanntester Vertreter der Diisopropylfluorophosphatasen wurde ein Enzym aus Tintenfischen (*Loligo vulgaris*) isoliert und dessen stereochemische Präferenz durch Protein-Engineering abgewandelt (Melzer *et al.*, 2009).

Zu den Aryldialkylphosphatasen gehört unter anderem die humane Paraoxonase 1 (hPON-1), die verschiedene OPs mit durchaus hohen Raten hydrolysiert (Masson und Rochu, 2009), jedoch schwierig aus dem Plasma zu reinigen und deren Stabilität von Apolipoprotein-Partnern abhängig ist (Renault *et al.*, 2010; Trovaslet-Leroy *et al.*, 2011). Um die Stereoselektivität und die Hydrolaseaktivität zu verbessern, wurden auch von diesem Enzym verbesserte Mutanten hergestellt (Goldsmith *et al.*, 2012; Kirby *et al.*, 2013) wobei sich das rekombinante Enzym bzw. dessen Mutanten nur schwer in Säugerzellen, *Escherichia coli* (Stevens *et al.*, 2008) oder Insektenlarven (Otto *et al.*, 2010) exprimieren lassen.

Weitere Aryldialkylphosphatasen wurden dagegen aus Bakterien gewonnen und intensiv studiert sowie hinsichtlich ihrer Stabilität, Stereoselektivität und Aktivität gegenüber OPs weiterentwickelt. Dazu zählen die zur β -Lactamase-Superfamilie gehörende PTE aus *Pseudomonas oleovorans* (PoOPH; Luo *et al.*, 2016), und die zu 90 % identischen PTEs aus *Agrobacterium radiobacter* (ArPTE, in der Literatur oft als OpdA abgekürzt; Jackson *et al.*, 2009) und *Brevundimonas diminuta* (BdPTE; Goldsmith *et al.*, 2017).

1.4 Die Phosphotriesterase aus *Brevundimonas diminuta* (BdPTE)

1.4.1 Geschichte der BdPTE

Ab den 1940er Jahren wurden Organophosphat-Pestizide in der Landwirtschaft eingesetzt; dabei stieg die Produktion aller Pestizide weltweit jährlich um rund 11 %, beginnend mit 0.2 Millionen Tonnen in den 1950er zu rund 5 Millionen Tonnen in den 2000er Jahren (Carvalho, 2017). Schon in den 1950er-Jahren wurden Mikroorganismen in Erdproben entdeckt, die fähig waren, OP-Pestizide abzubauen (Ahmed und Casida, 1958). Insbesondere wurden in den 1970er Jahren Bakterien gefunden, die unter anderem Parathion hydrolysieren. Das war zum einen die Gattung der *Flavobacterium*, wobei der Abbau in *p*-Nitrophenol endet (Sethunathan und Yoshida, 1973) und zum anderen die Gattung *Pseudomonas*, bei der der Abbau über *p*-Nitrophenol in Nitrit endet (Siddaramappa *et al.*, 1973). Nach Adaptierung einer gemischten mikrobiellen Kultur aus Abwasser und Erde an das Wachstum auf dem Substrat Parathion im Fermenter wurden die Gattungen *Pseudomonas*, *Azotomonas* und *Brevibacterium* identifiziert (Munnecke und Hsieh, 1974). Ein Parathion hydrolysierender Organismus wurde daraufhin angereichert und als *Pseudomonas diminuta* klassifiziert (Serdar *et al.*, 1982), welcher später zu *Brevundimonas diminuta* umklassifiziert wurde. Bei diesem Mikroorganismus handelt es sich um ein aerobes, nicht sporenbildendes, Gram-negatives, monotrich polar begeißeltes Bakterium, welches -ursprünglich aus einem Bach isoliert- erstmalig 1954 beschrieben wurde (Leifson und Hugh, 1954). Das Gen für die Parathion-Hydrolase liegt auf einem Plasmid vor (Serdar *et al.*, 1982). Einige Jahre später wurde von der Klonierung und Expression dieses Gens in *E. coli* berichtet (Serdar und Gibson, 1985). Nach Subklonierung auf vielfältigen Expressionsvektoren (McDaniel *et al.*, 1988) konnte das Enzym in verschiedenen Wirten, u. a. Insektenzellen (Dumas *et al.*, 1989) und *Streptomyces lividans* (Rowland *et al.*, 1991), hergestellt und zur Homogenität gereinigt werden. Später wurde das Gen für die Parathion-Hydrolase auch aus dem Bakterienstamm *Flavobacterium sp.* sequenziert und als identisch charakterisiert (Mulbry und Karns, 1989; Serdar *et al.*, 1989). Mittlerweile ist der Name Phosphotriesterase der in der Literatur gängige Begriff für diese Parathion-Hydrolase (EC 3.1.8.1; Lewis *et al.*, 1988). Um dabei zwischen den Phosphotriesterasen aus verschiedenen Organismen unterscheiden zu können, wird in der vorliegenden Arbeit die Abkürzung BdPTE, für das Enzym aus *Brevundimonas diminuta* verwendet.

1.4.2 Eigenschaften und Reaktionsmechanismus der BdPTE

Die BdPTE wird im Ursprungsorganismus als Prä-Protein translatiert, bevor das 29 Aminosäuren lange Signalpeptid abgespalten wird (Mulbry und Karns, 1989). Allerdings können höhere Expressionsausbeuten erzielt werden, wenn die Sequenz für das Signalpeptid deletiert und das Enzym direkt im Cytoplasma produziert wird (Mulbry und Karns, 1989; Serdar *et al.*,

1989). In diesem reduzierenden Milieu ist die Proteinfaltung des an sich sekretorischen Proteins nicht gehemmt, da dieses keine strukturellen Disulfidbindungen trägt, wohl aber zwei ungepaarte Cysteinreste.

Die BdPTE hydrolysiert Paraoxon und verwandte OP-Pestizide mit hohen Raten (Paraoxon: $k_{\text{cat}} \approx 2400 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M \approx 1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Dumas *et al.*, 1989; Omburo *et al.*, 1992). Ebenso kann die Wildtyp-(wt)-BdPTE auch eine Reihe an OP-Nervenkampfstoffen abbauen, wobei die G-Stoffe mit k_{cat}/K_M Werten zwischen 10^5 und $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ hydrolysiert werden (Tsai *et al.*, 2012). V-Stoffe hydrolysiert die wt-BdPTE dagegen mit niedrigeren Raten (VX: $k_{\text{cat}} \approx 0,3 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M \approx 4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Kolakowski *et al.*, 1997; Rastogi *et al.*, 1997).

Die dreidimensionale Struktur der wt-BdPTE wurde als Apoenzym (Benning *et al.*, 1994) und als Holoenzym mit verschiedenen Metallionen (Benning *et al.*, 2001) und mit Substratanaloga durch Röntgen-Beugungsmessung von Proteinkristallen bestimmt (Vanhooke *et al.*, 1996). Das Enzym liegt als Homodimer mit C_2 -Symmetrie und 329 Aminosäuren je Monomer vor. Die Faltung des Monomers weist ein $(\alpha\beta)_8$ -Fass Motiv auf, mit zwei zusätzlichen antiparallelen β -Strängen am N-Terminus. Das aktive Zentrum befindet sich am Carboxyende des zentralen β -Fasses und besteht aus einem binuklearen Metallzentrum, wobei zwei Zink-Kationen in einem Cluster aus vier Histidin-Resten, einem Aspartat-Rest und einem carboxylierten Lysin-Rest koordiniert sind (Abbildung 4).

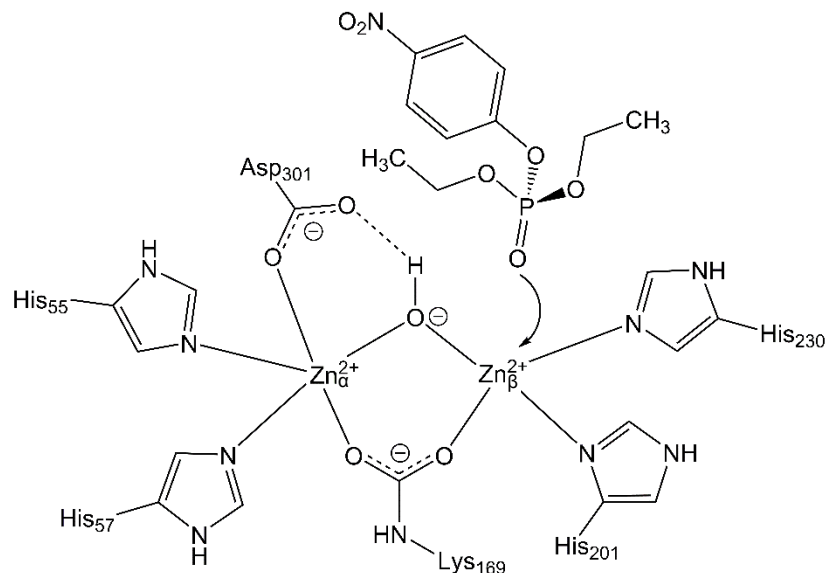


Abbildung 4: Schema des aktiven Zentrums der wt-BdPTE nach (Wong und Gao, 2007).

Zn_α^{2+} wird durch His55, His57 und Asp301 koordiniert und ist in der Bindetasche begraben, während Zn_β^{2+} durch His201 und His230 gebunden wird und teilweise dem Lösemittel ausgesetzt ist. Außerdem werden die zwei Zink-Ionen durch ein Hydroxidion (bzw. Wassermolekül) und ein N^ϵ -carboxyliertes Lys169 verbrückt (Benning *et al.*, 1995). Solche binuklearen Metallzentren, verbrückt durch eine post-translationale Carbaminatgruppe, wurden in aktiven

Zentren auch von anderen Enzymen, die Phosphatester spalten, gefunden (Mitić *et al.*, 2006). Es wurde experimentell gezeigt, dass die Zink-Ionen durch verschiedene andere bivalente Kationen (z. B. Cadmium, Mangan oder Cobalt) ohne signifikanten Verlust der enzymatischen Aktivität ersetzt werden können (Aubert *et al.*, 2004; Omburo *et al.*, 1992).

Neben diesem Metallzentrum gehören noch drei Bindetaschen, die für die Orientierung des Substrates verantwortlich sind, zum aktiven Zentrum der BdPTE. Diese wurden durch das gebundene Substratanalogon Diethyl-4-methylbenzylphosphonat (dEBP) in der dreidimensionalen Struktur der Zn/Zn-BdPTE identifiziert (Vanhooker *et al.*, 1996) und als kleine, große und Abgangsgruppen-Tasche definiert (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a). Die kleine Tasche wird hauptsächlich durch die Seitenketten der Aminosäuren G60, I106, L303 und S308 gebildet, während C59 und S61 nahe dieser Bindetasche liegen, ihre Seitenketten jedoch weg vom aktiven Zentrum zeigen. Die Seitenketten von H254, H257, L271 und M317 bilden die Tasche für den großen Substratrest, und die Abgangsgruppen-Tasche ist hauptsächlich durch die Reste W131, F132, F306, und Y309 definiert (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a).

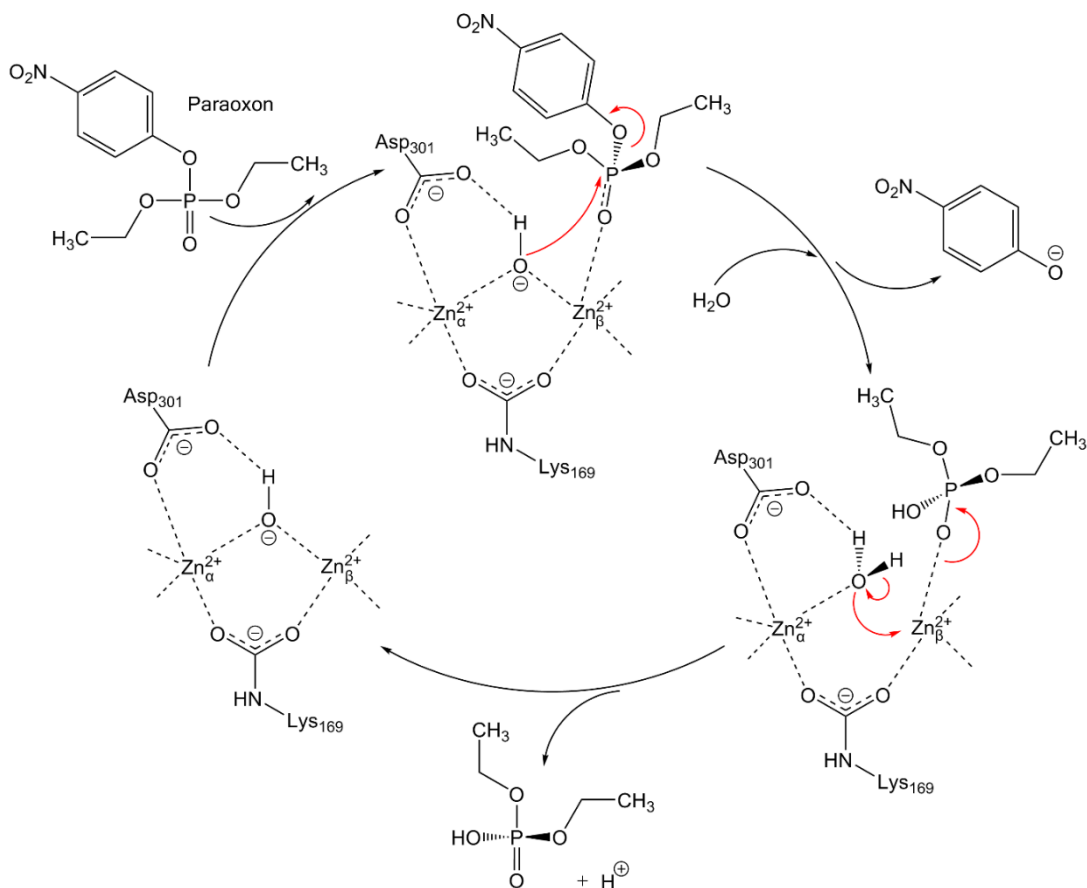


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der BdPTE für die Hydrolyse von Paraoxon (oben links; nach Wong und Gao, 2007).

Aus Molekulardynamik-Simulationen (Wong und Gao, 2007) ergab sich folgender Reaktionsmechanismus (Abbildung 5): Zuerst bindet das Substrat, hier Paraoxon, im aktiven Zentrum,

indem das β -Zinkion den Phosphoryl-Sauerstoff koordiniert. Zu diesem Zeitpunkt sind die beiden Zink-Ionen über die Carbaminatgruppe (Lys169) und das nukleophile Hydroxidion verbrückt, wobei jedes Zinkion fünf Liganden in einer verzerrten trigonalen bipyramidalen Geometrie hat. Daraufhin erfolgt der nukleophile Angriff des Hydroxid-Anions am Phosphorzentrum, wobei der Phosphoryl-Sauerstoff eine festere Koordinierung mit dem β -Zinkion eingeht und die P=O Bindung polarisiert wird. Gleichzeitig wird die Nukleophilie des Hydroxidions gestärkt (Aubert *et al.*, 2004; Wong und Gao, 2007). Der S_N2 -Angriff des Hydroxidions wird von dem Verlust der Bindungen zu beiden Zink-Ionen begleitet. Dabei wird p-Nitrophenolat als Abgangsgruppe freigesetzt und das Proton verbleibt unmittelbar nach der Reaktion am Nukleophil. Im nächsten Schritt nimmt ein Wassermolekül, ursprünglich verbunden über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Asp301, den Platz des Hydroxidions ein, indem es zunächst das α -Zinkion koordiniert. Dabei wird der Abstand zwischen den beiden Zink-Ionen von 3,5 auf 5,3 Å durch elektrostatische Abstoßung vergrößert.

Der nächste Schritt ist die Regenerierung des aktiven Nukleophils, des zweifach koordinierten Hydroxidions, im Ausgangszustand. Da das verbrückende Wassermolekül sehr sauer ist, ist es wahrscheinlich, dass das Proton direkt an das Lösungsmittel abgegeben wird, ohne Beteiligung von His254. Die Koordination beider Zink-Ionen durch das Hydroxidion führt zur Verkürzung der Zink/Zink-Distanz auf ca. 3,5 Å und der Ablösung des Phosphoryl-Sauerstoff-Liganden vom β -Zinkion. Nun liegt das Enzym wieder im aktiven Zustand vor und ist bereit für den nächsten Substratumsatz (Wong und Gao, 2007).

1.4.3 Fortschritte beim Engineering der BdPTE

Ein Problem für die Anwendung als katalytischer Bioscavenger zur Detoxifizierung relevanter OPs ist, dass die wt-BdPTE bei den chiralen Substraten wie GB, GD und GF die Hydrolyse des R_P -Enantiomers bevorzugt (Harvey *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2010), wohingegen das S_P -Enantiomer die wesentlich toxischere Komponente darstellt (Benschop und De Jong, 1988). Ebenso ließ sich die wt-BdPTE bislang nicht in großen Mengen als stabiles Enzym herstellen (Shimazu *et al.*, 2001). Ebenso stellt die allgemein niedrige Hydrolyse-Rate gegenüber OP-Kampfstoffen einen Nachteil für die therapeutische Anwendung dar. Um vernünftige Dosen eines solchen Biopharmazeutikums verabreichen zu können, ist eine katalytische Effizienz von $k_{cat}/K_M > 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erforderlich (Worek *et al.*, 2016). Außerdem besteht der Wunsch nach einem Breitband-Enzym, welches eine Vielzahl an toxikologisch relevanten OPs mit hohen Hydrolyse-Raten abbauen kann. Aufgrund dieser Nachteile haben schon mehrere Arbeitsgruppen Protein Engineering an der BdPTE mit verschiedenen Zielsetzungen betrieben.

Eine Arbeitsgruppe der Universität von Kalifornien um Wilfred Chen versuchte die wt-BdPTE durch DNA Shuffling und Sättigungsmutagenese hinsichtlich der Hydrolyse von Methyl-Parathion sowie Chlorpyrifos zu verbessern (Cho *et al.*, 2002; 2004; 2006). Dabei wurden schon früh Schlüsselmutationen (A80V, K185R und I274N) gefunden, die nicht im aktiven Zentrum liegen, aber trotzdem die allgemeine Hydrolyse-Rate erhöhen.

Die Arbeitsgruppe von Frank M. Raushel an der Texas A&M Universität befasste sich ebenfalls intensiv mit dem Engineering der BdPTE. Ein Problem, das diese Gruppe durch rationales Design angeht, war die unvorteilhafte Stereoselektivität des Enzyms. Systematische, experimentelle Modellierung verschiedener Aminosäurereste in der kleinen und großen Substrat-Bindetasche lieferten Hinweise auf dramatische Veränderungen der stereochemischen Präferenz der BdPTE (Nowlan *et al.*, 2006). Zum Beispiel führte die Vergrößerung der kleinen Bindetasche kombiniert mit der Verkleinerung der großen Bindetasche zu einer Umkehr der enantiomeren Selektivität. So konnte die Stereoselektivität der BdPTE letztlich um 8 Größenordnungen verändert werden (Chen-Goodspeed *et al.*, 2001b; Nowlan *et al.*, 2006).

Durch zielgerichtete Mutagenese an ausgewählten Aminosäure-Resten des aktiven Zentrums der BdPTE wurde zudem deren hydrolytische Aktivität gegenüber den G-Stoffen verbessert. Hierbei wurde eine Doppelmutante (H257Y/L303T) gefunden, die mit den getesteten Substraten GB, GD und GF verbesserte Aktivitäten und S_P -Enantioselektivität aufwies (Tsai *et al.*, 2012). Ebenso wurden mehrere Sättigungsmutagenesen-Runden an jeweils zwei Positionen zur Verbesserung der Hydrolyse von VX durchgeführt. Die daraus resultierende Mutante VRN-VQFL (A80V/K185R/I274N/F132V/H254Q/H257F/S308L) zeigte eine 233-fache verbesserte VX-Hydrolyse mit einer katalytischen Effizienz von $4,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Bigley *et al.*, 2013). Durch Error-Prone PCR wurden gezielt Mutationen in die Schlaufe des aktiven Zentrums (Loop 7) eingeführt. Die daraus resultierende Mutante L7ep3a (I106C/F132V/H254Q/H257F/A270V/L272M/I274N/S308L) zeigte zuerst nur eine 100-fache Verbesserung der VX-Hydrolyse im Vergleich zur wt-BdPTE mit einer katalytischen Effizienz von $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Später wurde gezeigt, dass die Mutante VRN-VQFL das favorisierte Enantiomer mit einer katalytischen Effizienz von $6,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und die Mutante L7ep3a mit einer Effizienz von $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ umsetzt, was jeweils einer 1300- bzw. einer 9900-fachen Verbesserung entspricht (Bigley *et al.*, 2015). Beide Mutanten scheinen das S_P -Enantiomer zu favorisieren (Bigley *et al.*, 2013). Die Mutante L7ep3a wurde für weiteres rationales Design zur verbesserten VR-Hydrolyse herangezogen. Die beste entwickelte Mutante, mit Präferenz für das S_P -Enantiomer L7ep3a(I106G), hydrolysiert S_P -VR mit einer katalytischen Effizienz von $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was eine 600-fache Verbesserung gegenüber dem Wildtyp darstellt (Bigley *et al.*, 2015).

Eine weitere Arbeitsgruppe, die große Anstrengungen in das BdPTE Engineering gesteckt hat, war die um Dan S. Tawfik am Weizmann Institut in Israel. Zu Beginn nutzte dieses Labor

DNA Shuffling, um randomisierte BdPTE-Bibliotheken herzustellen und Mutanten zu selektieren, die verbesserte Proteinstabilität wie auch erhöhte enzymatische Aktivität aufwiesen. Eine dieser Mutanten, S5, zeigte drei Mutationen weit entfernt von der Bindetasche (K185R, D208G und R319S) und verglichen mit dem Wildtyp eine 20-fach erhöhte Proteinexpression als cytoplasmatisches Maltose-Bindeprotein-(MBP)-Fusionsprotein in *E. coli* (Roodveldt und Tawfik, 2005). In einem darauffolgenden Ansatz wurden Bibliotheken aus früheren Mutanten zusammengefügt und mit rechnergestütztem Design kombiniert. Dabei wurde die Mutante C23 (K77A/A80V/F132E/T173N/G208D/H254G/I274N) gefunden, mit einer katalytischen Effizienz von $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für S_P -VX, sowie A53 (K77A/A80V/I106A/F132E/T173Q/G208D/A203F/H254G/I274N), mit einer katalytischen Effizienz von $1,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für S_P -VR, was eine 5800-fache Verbesserung gegenüber dem Wildtyp darstellt (Cherny *et al.*, 2013). Weitere Kombination von Mutationen in Verbindung mit rechnergestütztem Design, brachte erneut eine bessere Mutante für die VR-Hydrolyse hervor. Die Mutante IVAI (A53 + C59M/T173N/F203A/D233G/ Δ 266/P342S) zeigte für S_P -VR eine weiter erhöhte katalytische Effizienz von $5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Goldsmith *et al.*, 2016). Darauffolgende Arbeiten fokussierten sich auf die Stabilisierung der Proteinstruktur, wiederum durch rechnerbasiertes Design. So wurde die bisher beste VR-hydrolysierende Mutante gefunden: d1-IVA1 (IV-A1 + Y309W/R118E/A203D/S222D/S238D/M293V/S342P/G348T/T352E), mit einer katalytischen Effizienz von $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für S_P -VR. Um auch verbesserte Mutanten für die VX-Hydrolyse zu finden, wurde versucht, die stabilisierte Mutante d1-C23(Y309W) durch Error-Prone PCR weiter zu optimieren. In die dabei erhaltene Mutante wurden zusätzlich zwei bzw. drei rechnergestützt vorhergesagte Mutationen eingebracht, um schließlich die Mutanten 10-2-C3 (C23 + A80M/A270S/L271M/Y309W/R118E/A203D/S222D/S238D/M293V/G348T/T352E) und 10-1-D11 (10-2-C3 + S267M) zu erhalten. Beide Mutanten hydrolysieren S_P -VX mit katalytischen Effizienzen $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, was einer 10.000-fachen Verbesserung gegenüber der wt-BdPTE entspricht (Goldsmith *et al.*, 2017).

1.4.4 Entwicklung der BdPTE als medizinisches Antidot

In Tierstudien wurde gezeigt, dass die wt-BdPTE fähig ist, Versuchstiere vor Vergiftungen mit Pestiziden (Tuovinen *et al.*, 1994) und Tabun (Raveh *et al.*, 1992) zu retten, jedoch kann das Wildtyp-Enzym nicht ausreichend vor Vergiftungen mit potenteren OP-Kampfstoffen schützen. Hierfür bieten die neu entwickelten Enzymkandidaten eine Lösung. So gelang es Worek und Kollegen die Variante C23 als Antidot nach einer VX-Exposition von Meerschweinchen anzuwenden (Worek *et al.*, 2014b). Die Injektion des MBP-Fusionsproteins von 2-5 mg/kg Körpergewicht reichte aus, um den Tod der Versuchstiere zu verhindern und die Vergiftungssymptome erheblich zu lindern, wenn das Enzym bis zu 15 min nach Exposition mit sonst letalen VX-Dosen intravenös verabreicht wurde (Worek *et al.*, 2014b).

Eine weitere Studie von Zhang und Kollegen zeigte, dass eine BdPTE Mutante, welche in eine zwitterionische Polymerschicht eingebettet war, als sogenannter Nanoscavenger, eine wesentlich längere Plasma Halbwertszeit zeigt als das native Enzym ($t_{1/2}$ von 26,2 h gegenüber 0,43 h) (Zhang *et al.*, 2019). Damit konnte eine präventive bzw. therapeutische Wirkung des Nanoscavengers gezeigt werden. Ebenso überlebten die Tiere, die mit dem Nanoscavenger behandelt wurden, wiederholte Sarin-Dosen über eine Woche (Zhang *et al.*, 2019).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die BdPTE hinsichtlich ihrer Aktivität und Stabilität verbessert werden, so dass sie als Antidot bei Vergiftungen mit OP-Pestiziden oder Nervenkampfstoffen eingesetzt werden kann. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die folgenden zwei Inhalte bearbeitet:

- (1) Aufgrund der beobachteten oxidativen Empfindlichkeit der BdPTE sollte die Variante 10-2-C3 dahingehend engineert werden, dass sie eine geringere Oxidationsempfindlichkeit bei gleichbleibender bzw. verbesserter Enzymaktivität aufweist. (Veröffentlichung 1; Job *et al.*, 2020)
- (2) Aufgrund der Relevanz für die Entwicklung katalytisch verbesserter Enzymvarianten sollte die Struktur der Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) aufgeklärt und durch rationales Design die Funktion wichtiger Aminosäurereste anhand der Struktur geklärt werden. (Veröffentlichung 2; Job *et al.*, 2023)

2 Methodenüberblick

Diese publikationsbasierte Doktorarbeit basiert auf zwei wissenschaftlichen Studien, in denen verschiedene gentechnische, molekularbiologische, proteinbiochemische und strukturelle Methoden zum Einsatz kamen. In den Methodenabschnitten der hier eingebundenen Veröffentlichungen sind die durchgeführten Arbeiten mit Angabe der Hersteller für genutzte Chemikalien, Materialien und Geräte im Detail aufgeführt. Daher wird hier nur eine Übersicht der wichtigsten verwendeten Methoden aufgeführt. Gentechnische, molekularbiologische und proteinchemische Standardverfahren, welche im Labor von Prof. Dr. A. Skerra bereits etabliert waren (insbesondere die Kultivierung und Transformation von *E. coli*-Stämmen, die Klonierung von Vektoren, Modifizierungen doppelsträngiger DNA, Polymerase-Kettenreaktionen, Agarose-Gelelektrophorese oder SDS-PAGE), können vorangegangenen Dissertationen, die am Lehrstuhl für Biologische Chemie (TU München) angefertigt wurden, entnommen werden (beispielsweise denen von Dr. M. Schlapschy, Dr. M. Gebauer, Dr. L. Friedrich oder Dr. E. Eggenstein). Hier dargestellte Methoden, die hauptsächlich von an diesem Projekt mitbeteiligten Kollegen durchgeführt wurden, sind als solche gekennzeichnet.

2.1 Bakterienstämme und Vektoren

Alle *E. coli*-Stämme und Plasmide stammten aus der Sammlung von Prof. Dr. A. Skerra (TU München).

Escherichia coli Stämme:

XL1-Blue *E. coli* K12 *recA1 endA1 gyrA9 (Nal^R) thi-1 hsdR17 glnV44 relA1 lac*
F'[proAB lac^q lacZΔM15 Tn10(Tet^R)] (Bullock *et al.*, 1987)

BL21 *E. coli* B *F⁻ fhuA2 lon dcm ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal[malB⁺]_{K-12}(λ^S)* (Studier und Moffatt, 1986)

Vektoren:

pASK-IBA5(+) IBA, Göttingen

pASK-IBA35(+) IBA, Göttingen

pASK75 Prof. Dr. Arne Skerra, TU München (Skerra, 1994)

2.2 Ortsgerichtete Mutagenese durch QuikChange PCR

Um die Vielzahl an Mutanten der BdPTE herzustellen, wurde die QuikChange PCR verwendet. Hierbei erfolgt der zielgerichtete Austausch von Basentriplets mittels PCR in Anlehnung

an das Protokoll des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Zheng *et al.*, 2004). Dazu wurden zueinander komplementäre Primerpaare mit mindestens 28 bp Länge eingesetzt, die in der Mitte jeweils die auszutauschenden Basen enthielten. Mit der *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase wurde das als Matrize genutzte Plasmid entsprechend den Herstellerangaben in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Hierzu wurde 10 ng Plasmid-DNA, isoliert aus *E. coli* XL1-Blue, mit folgendem Protokoll in 19 Zyklen amplifiziert. Üblicherweise fand die Denaturierung der doppelsträngigen DNA zunächst bei 95 °C für 30 s statt, und die Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrix erfolgte bei 54 °C für 1 min. Je nach Länge des zu amplifizierenden Abschnitts erfolgte die Synthese der DNA bei 72 °C für 4 bis 5 min. Zur Vervollständigung der Syntheseprodukte wurde der Ansatz abschließend für 2 min bei 72 °C inkubiert. Durch analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde anschließend der Erfolg der PCR überprüft. Daraufhin wurde die methylierte Matrizen-DNA durch Inkubation des PCR-Ansatzes bei 37 °C mit 30 U *DpnI* für 2 Stunden abgebaut. 5 µl der Lösung der resultierenden neu synthetisierten, doppelsträngigen DNA wurde zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue Zellen nach dem CaCl₂ Protokoll (Cohen *et al.*, 1972) eingesetzt.

2.3 Gentechnische Herstellung und chromatographische Reinigung von Enzymen

Zur Verringerung der Oxidationsempfindlichkeit, für proteinkristallographische Untersuchungen, Funktionsuntersuchungen sowie Engineering für Substratspezifität wurden unterschiedliche Mutanten der wt-BdPTE (UniProt ID P0A434) und der Variante 10-2-C3 (Goldsmith *et al.*, 2017) in *E. coli* exprimiert und zur Homogenität gereinigt.

2.3.1 Herstellung von BdPTE-Varianten mit dem *Strep*-tag II

Die Biosynthese der wt-BdPTE, der Variante 10-2-C3 und deren Mutanten mit dem N-terminalen *Strep*-tag II (Schmidt und Skerra, 2007) wurde in *E. coli* BL21 (New England Biolabs, Frankfurt am Main) unter Nutzung der Expressionsplasmide pASK-IBA5(+)-*Strep*-wt-BdPTE und pASK-IBA5(+)-*Strep*-10-2-C3 bzw. modifizierter Versionen dieser Plasmide durchgeführt. Da der Expressionsvektor pASK-IBA5(+) auf dem Plasmid pASK75 (Skerra, 1994) basiert, trägt dieser ebenfalls das chemisch induzierbare tet-Promotor/Operator-System. So kann die Bakterienkultur ohne Belastung durch heterologe Genexpression angezüchtet werden und anschließend, bei ausreichender Zelldichte, durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (aTc) auf die Überexpression des Zielgens umgeschaltet werden. Ausgehend von einer Einzelkolonie des transformierten *E. coli* BL21 Stammes wurden die BdPTE-Proteine in 2 L Luria Bertani (LB)-Medium im Schüttelkolben-Maßstab hergestellt. Dazu wurde 50 mL LB/Amp-Medium (100 mg/L Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Aus dieser

Vorkultur wurde im Verhältnis 1:40 eine 2 L Hauptkultur, supplementiert mit 0,2 mM ZnSO₄, beimpft. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C mit 180 rpm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6-0,8 inkubiert und daraufhin die Genexpression durch die Zugabe von 0,2 mg/L aTc (Acros Organics, Geel, Belgien) für 5 h bei 30 °C induziert. Anschließend erfolgte die Bakterien-Ernte durch Zentrifugation. Das erhaltene Zellpellet wurde in 25 mL *StrepTactin*-Affinitätschromatographie-(SA)-Puffer (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0,1 mM ZnSO₄ pH 8,0) resuspendiert und mit dem French Press-Zellhomogenisator aufgeschlossen (1000 lb/in², vier Passagen). Nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer und Aggregate wurden daraufhin durch Zentrifugation vom Lysat abgetrennt. Der zellfreie Proteinextrakt wurde zunächst mit 2 nmol Streptavidin (Eigenproduktion) pro 1 nmol Biotin (unter der Annahme, dass 1 L *E. coli* Kultur mit OD₅₅₀ = 1 ca. 1 nmol Biotin-Carboxyl-Carrierprotein enthält) versetzt, um in einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C freies Biotin oder biotinylierte Proteine zu komplexieren. Anschließend wurde die Proteinlösung filtriert (0,45 µm) und durch *StrepTactin* Affinitätschromatographie mit dem oben genannten SA-Puffer gereinigt (Schmidt und Skerra, 2007). Die Chromatographie wurde bei 4 °C mit einer 8 mL *Strep-Tactin-Superflow* (IBA, Göttingen) Säule durchgeführt. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration in einer Amicon Zentrifugationseinheit (MWCO: 10 kDa; Merck Millipore, Billerica, MA) auf das gewünschte Volumen für die Größenausschlusschromatographie (SEC) eingengt. Die SEC erfolgte mit einer in 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0,01 mM ZnSO₄ pH 8,0 äquilibrierten 120 mL Superdex S200 16/60 Säule (GE Healthcare). Bei den Chromatographie-Schritten wurden jeweils Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE (Fling und Gregerson, 1986) unter reduzierenden (mit β-Mercaptoethanol) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen analysiert und entsprechend der gewünschten Reinheit (> 95 %) vereint. Das gereinigte und in Aliquots aufgeteilte Protein wurde zuerst bei -80 °C eingefroren und dann bei -20 °C bis zu weiteren Messungen gelagert.

2.3.2 Herstellung von BdPTE-Varianten mit dem His₆-tag

Um die BdPTE-Variante 10-2-C3(C59V/C227V) mit Hexahistidinanhängsel (His₆-tag) herzustellen, erfolgte zuerst eine Umklonierung des Struktur-Gens aus dem Vektor pASK-IBA5(+) in pASK-IBA35(+). Die Spaltung der doppelsträngigen DNA erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *KasI* und *HindIII* (New England Biolabs) nach Empfehlungen des Herstellers in einem 20 µl Ansatz mit 3 µg Plasmid-DNA. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden zunächst durch präparative Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll gereinigt. Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden die erhaltenen Fragmente mittels T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot) kovalent verknüpft und anschließend zur Transformation von chemokompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen verwendet. Nach Isolierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA

und Überprüfung durch Restriktionsanalyse wurden zum Zweck der Proteinproduktion chemokompetente *E. coli* BL21 Zellen transformiert.

Wie zuvor beschrieben, erfolgte die Expression im 2 L Schüttelkolbenmaßstab und der Zellaufschluss mittels French Press-Zellhomogenisator, wobei die Zellen zuvor in Chromatographie-Puffer (40 mM NaP_i, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol pH 7,5) gelöst wurden. Die Reinigung erfolgte dann über Zn²⁺ vermittelte Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*, IMAC; Skerra *et al.*, 1991). Hierfür wurde der zellfreie Proteinextrakt auf eine zuvor mit Chromatographie-Puffer äquilibrierte Zink beladene 5 ml HisTrap HP Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Nach Erreichen der Basislinie wurde die BdPTE Variante durch einen linearen Imidazolgradienten (5 bis 500 mM Imidazol über 25 ml) eluiert. Fraktionen, die reine BdPTE enthielten, wurden vereint und weiter durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die SEC erfolgte mit einer in (10 mM Tris/HCl, 0,1 mM ZnSO₄ pH 8,3) äquilibrierten 320 ml Superdex S200 26/60 Säule (GE Healthcare). Nach der SDS-PAGE Analyse der Fraktionen wurden diese mit gewünschter Reinheit vereint und mittels Amicon Ultra Zentrifugationseinheit (MWCO: 10 kDa) auf 10 mg/ml konzentriert. Daraufhin wurde das Protein entweder mit 18 mM Diethyl-4-methylbenzylphosphonate (dEBP; Merck Millipore) oder mit 18 mM O-ethyl-[3-(diisopropylamino)propyl]-methylphosphinat (Synthese am Lehrstuhl aus Ethyl-(3-aminopropyl)-methylphosphinat (FCH Group, Ukraine)), vermischt und für Kristallisationsansätze verwendet.

2.4 Electro spray-Ionization Massenspektrometrie (ESI-MS)

Für die exakte Bestimmung der molekularen Masse rekombinanter Proteine und ihrer Derivate wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Hierfür wurde eine 5-20 µM Lösung des gereinigten Proteins zweimal gegen das 10.000-fache Volumen an 10 mM Ammoniumacetat pH 6,6 (Sigma-Aldrich, München) dialysiert und daraufhin mit Ultrafree Zentrifugenfiltereinheiten (0,45 µM; Merck) filtriert. Die Probe wurde anschließend auf 50 % (v/v) Methanol und 1 % (v/v) Essigsäure eingestellt, um die Massenanalyse im Positiv-Ionenmodus – unter denaturierenden Bedingungen – durchzuführen. Über eine mit 180 µL/h betriebene Spritzenpumpe erfolgte die Applikation der Probe in das mit einer Electro spray Ionization (ESI)-Quelle ausgerüstete maXis Time of Flight (TOF)-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen). Der Ionentransfer fand unter folgenden Bedingungen statt: Kapillarspannung: 3,6 kV; Spannungsdifferenz zur Endplatte: 500 V; Verdampfungsdruck: 0,3 bar; Flussgeschwindigkeit des Trockengases: 3,5 L/min; Temperatur des Trockengases: 200 °C; Kollisionsenergie: 10 eV bei nicht modifizierten Proteinen bzw. 5 eV bei mit H₂O₂ behandelten Proteinen.

2.5 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie und thermische Denaturierung

Die CD-Spektren und die thermische Entfaltung gereinigter BdPTE-Varianten wurden mit einem J-810-Spektropolarimeter (Jasco, Pfungstadt), ausgestattet mit einem PT423S Peletier-Element, gemessen. Hierzu wurden die Proteine mit einer Konzentration von 2,5 μM gegen 20 mM KPi , 50 mM K_2SO_4 pH 7,5 dialysiert und in einer 1 mm Pfadlänge Quarzküvette (Hellma, Mühlheim) vermessen. Für thermische Denaturierungsstudien wurde zunächst die Wellenlänge mit der maximalen Änderung der Elliptizität bestimmt, indem Spektren von 190 bis 250 nm zuerst bei 20 °C und dann bei 90 °C aufgenommen wurden. Für die thermische Entfaltung der BdPTE-Varianten wurden daraufhin bei einer Wellenlänge von 210 nm die Proben von 25 °C auf bis zu 90 °C mit einem Temperaturgradienten von 60 K/h erhitzt und mit folgenden Parametern vermessen: Bandbreite 1 nm, Response 1 s, Data Pitch 0,1 °C. Durch Auftragen der gemessenen Elliptizität gegen die Temperatur erhält man eine sigmoidale Denaturierungskurve. Daraus kann auf Grundlage eines Zwei-Zustands-Modells anhand der Änderung der freien Enthalpie ΔH_m beim Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand die Schmelztemperatur T_m berechnet und die thermodynamische Stabilität ΔG des gefalteten Zustands des Enzyms extrapoliert werden (Schlehuber und Skerra, 2002).

2.6 Enzymaktivitätsmessung (Anja Köhler)

Die hydrolytische Inaktivierung der Organophosphat-Verbindungen durch die BdPTE-Mutanten wurde durch einen AChE-Hemmungstest bestimmt. Hierfür kommen hämoglobinfreie Erythrozytenmembranen als AChE-Quelle zum Einsatz, um Acetylthiocholin zu hydrolysieren, wobei die frei werdende Thiolgruppe mit dem chromogenen Ellmanns-Reagenz quantifiziert wird (Worek *et al.*, 2014a). Die Assays wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Bundeswehr München) durchgeführt. Dazu wurden die Nervenkampfstoffe, Pestizide und die BdPTE-Mutanten jeweils in TN-Puffer (50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl pH 8.0) in geeigneter Weise verdünnt. 100 μL BdPTE-Lösung und 500 μL OP-Lösung (VX: 4 μM ; VR: 1 μM ; GF: 1 μM ; GB: 15 μM) wurden vermischt und bei 37 °C für verschiedene Zeiten (t_{PTE}) inkubiert. Von dieser Lösung wurde zu definierten Zeitpunkten jeweils eine Probe entnommen und gleichzeitig mit dem Acetylthiocholin zum AChE-Hemmungsansatz hinzugegeben. Von jeder Probe eines Zeitpunktes der OP-Hydrolyse (t_{PTE}) wurde die zeitabhängige (t)AChE-Aktivitätskurve durch nicht-lineare Regression mit GraphPad Prism 5 analysiert, um die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung $k_{\text{AChE}}(t_{\text{PTE}})$ für die partiell gehemmte AChE zu bestimmen (Gl. 1; Job *et al.*, 2020; Köhler *et al.*, 2021a). Daraufhin wurde die Konstante erster Ordnung des OP-Abbaus, k_{PTE} bestimmt, indem die $k_{\text{AChE}}(t_{\text{PTE}})$ -Werte gegen die anfänglichen Inkubationszeitpunkte der BdPTE mit dem OP (t_{PTE}) aufgetragen und angepasst wurden (Gl. 2). Daraus

wurde die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M mithilfe der Gl. 3 berechnet, wobei $[E]$ für die BdPTE-Konzentration steht. Beispielhafte Graphiken können der Veröffentlichung 1 (Job *et al.*, 2020) entnommen werden.

$$A = A_{max}(1 - e^{-k_{ACHE}(t_{PTE}) \times t}) \quad (1)$$

$$k_{ACHE}(t_{PTE}) = B \times e^{-k_{PTE} \times t_{PTE}} + C \quad (2)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{PTE}}{[E]} \quad (3)$$

2.7 Proteinkristallographische Methoden (Dr. Eichinger)

Für die strukturbiochemische Untersuchung der BdPTE-Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) mit einem Substratanalogon wurden entsprechende Komplexe kristallisiert. Zur Identifizierung geeigneter initialer Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *Sparse-Matrix Screens* angewandt (Jancarik und Kim, 1991). Hierfür wurde der aus 480 Kristallisationsbedingungen bestehende Vector Screen verwendet, der am Lehrstuhl für Biologische Chemie zusammengestellt wurde. Um die Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem Tropfen in 96-Well Crystal-Quick-Platten (Thermo Fisher Scientific) durchführen zu können, wurde unter Zuhilfenahme des Kristallisationsroboters FreedomEvo (Tecan, Männedorf, Schweiz) 200 nL der konzentrierten Proteinlösung (5-10 mg/mL) mit 200 nL des Kristallisationspuffer vermischt und gegen 100 μ L Reservoirlösung (Fällungsmittel) äquilibriert. Der Kristallisationsverlauf wurde mit dem RockImager System (Formulatrix, Bedford, MA) in den durch transparente Klebefolie luftdicht verschlossenen Platten bei 20 °C verfolgt.

Mit Hilfe anschließender Fine Screens wurden vielversprechende Bedingungen des Vector Screens hinsichtlich Größe und Streufähigkeit der Kristalle optimiert. Hierfür wurden die Konzentration des Proteins, des Fällungsmittels, der pH-Wert sowie die Konzentration von Pufferkomponenten variiert. Die Fine Screens wurden ebenfalls nach der Dampfdiffusionsmethode angesetzt, indem hängende Tropfen, bestehend aus 0,5–1,0 μ L Proteinlösung und 0,5–1,0 μ L des Kristallisationspuffers, auf silanisierten Deckgläschen gemischt wurden. Diese wurden kopfunter auf 24-Well Platten (Crystalgen, Commack, NY), befüllt mit jeweils 1 mL der entsprechenden Reservoirlösung, platziert und mit einer Öl/Vaseline-Mischung abgedichtet. Die Platten wurden bei 20 °C gelagert und regelmäßig hinsichtlich Kristallbildung untersucht.

Nach erfolgreicher Kristallisation eines Proteinkomplexes wurde die Datensammlung am BESSY II Synchrotron (Helmholtz-Zentrum Berlin) und die Strukturbestimmung mittels molekularen Ersatzes durchgeführt. Bei der Strukturbestimmung wurde das am Lehrstuhl für Biologische Chemie weitestgehend standardisierte Vorgehen angewandt, welches ausführlich in der hier eingebundenen Veröffentlichung 2 (Job *et al.*, 2023) beschrieben ist. Die im Rahmen

dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur wurde mit den Atomkoordinaten und Strukturparametern in der Protein Data Bank (PDB) unter folgendem Code hinterlegt: 7P85.

2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme:

Adobe Creative Suite 4	Erstellen von Abbildungen und Bildbearbeitung (Adobe, San José, CA)
ANTICALIGN	Analyse und Annotation von Proteinsequenzen (Jarasch <i>et al.</i> , 2016)
Biocapt MW	Fotodokumentation von Gelen (Vilber Lourmat, Eberhardzell)
ChemDraw 22.0	Zeichnen chemischer Strukturen und Darstellung von Reaktionsgleichungen (PerkinElmer, Waltham, MA)
Compass Data Analysis	Analyse und Dekonvolierung von Massenspektren (Bruker Daltonik, Bremen)
Coot 0.8.9	3D-Modellierung und Analyse von Proteinstrukturen (Emsley und Cowtan, 2004)
Citavi 6.14.4.0	Literaturverwaltung (Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz)
Geneious 9.1.3	Planung, Visualisierung und Annotation von DNA- Sequenzen (Biomatters, Auckland, NZ)
GraphPad Prism 5/6	Statistische Analysen und Schaubilder (GraphPad Software, La Jolla, CA)
Office Professional 2016	Textverarbeitung und Tabellenkalkulation (Microsoft, Redmond, WA)
PyMOL 1.7.4 und 2.5.4	3D-Darstellung und Analyse von Proteinstrukturen (Schrödinger, New York, NY)
UNICORN 5.20 und 7.04	Steuerung der ÄKTA-Anlagen und Analyse von Chromatogrammen (GE Healthcare, München)

Datenbanken/Server:

ExPASy	Proteindatenbank und Analyseprogramme www.expasy.org (Gasteiger <i>et al.</i> , 2005)
NCBI	Literaturdatenbank; www.ncbi.nlm.nih.gov
PISA	Programm zur Analyse makromolekularer Grenzflächen www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa (Krissinel und Henrick, 2007)
Protein Data Bank (PDB)	Datenbank für Proteinstrukturen www.rcsb.org/pdb (Berman <i>et al.</i> , 2000)
UniProt	Datenbank für Proteine www.uniprot.org (Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

3 Veröffentlichungen

Alle in dieser publikationsbasierten Dissertation eingebrachten Veröffentlichungen wurden durch Gutachter auf dem entsprechenden Fachgebiet im Auftrag der jeweiligen Fachzeitschrift geprüft (engl.: Peer Review).

3.1 Veröffentlichung in *Toxicology Letters* (2019) - Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel: "A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds" wurde am 28. Dezember 2019 (online Version) in der Fachzeitschrift "Toxicology Letters" veröffentlicht.

Zitat:

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.

Zusammenfassung der Veröffentlichung:

Da Organophosphat Verbindungen eine große Bedrohung darstellen, wird eine Behandlungsmethode benötigt, die das Organophosphat abbaut, bevor die Acetylcholinesterase im Gehirn oder in der Muskulatur gehemmt werden kann. Hydrolytische Enzyme, wie die Phosphotriesterase aus *Brevundimonas diminuta* (BdPTE), bieten eine vielversprechende Lösung. Die BdPTE wurde schon früher dem Enzym-Engineering unterzogen, so dass Varianten mit verbesserter katalytischen Effizienz gegenüber Nervenkampfstoffen vorliegen. Jedoch sind deren biochemische Stabilitäten noch nicht ausreichend für die *in vivo* Applikation.

In dieser Publikation wurde rationales Protein-Design angewendet, um die BdPTE Variante 10-2-C3 gegenüber oxidativem Stress zu stabilisieren. Hierfür wurden die zwei ungepaarten Cystein-Reste gegen verschiedene inerte Aminosäuren (Alanin, Leucin, Isoleucin, Methionin und Valin) substituiert. Die Einzel- und Doppelmутanten wurden in *Escherichia coli* produziert und zur Homogenität gereinigt. Daraufhin wurden sie hinsichtlich ihrer biochemischen und enzymologischen Eigenschaften untersucht. Dabei wurden die Expressionsausbeute, die thermische Stabilität, die katalytische Effizienz gegenüber VX, VR, GB und GF und die Oxidationsstabilität mittels Massenspektrometrie bestimmt.

Einige Mutanten wiesen erhöhte thermische Stabilität auf und waren ebenfalls weniger anfällig für oxidativen Stress. Der Austausch der beiden Cystein- gegen Valin-Reste führte zudem zum Erhalt der katalytischen Effizienz der Vorgänger-Version. Die so erhaltene verbesserte

Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) gilt aufgrund ihres breiten Wirkspektrums gegenüber Substraten und dank der verbesserten Oxidationsunempfindlichkeit als vielversprechender Kandidat zur Behandlung von akuten Vergiftungen durch Organophosphat Verbindungen, wie Nervenkampfstoffe oder Pestizide.

Beitrag der Autorin dieser Dissertation:

Die Autorin dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Studie beteiligt. Die Autorin führte den Großteil der Experimente selbst durch (beispielsweise Klonierung von Plasmiden, ortsgerichtete Mutagenese, Expression, Reinigung und Charakterisierung der Proteine sowie die Probenvorbereitung für den H₂O₂-Oxidationsassay), sie analysierte die Daten und war federführend am Verfassen des Manuskripts sowie der Überarbeitung beteiligt. Die Beiträge der weiteren Autoren waren wie folgt: Anja Köhler führte die Enzymassays und deren Auswertung durch, Benjamin Escher stellte die gereinigte wt-BdPTE für die CD- und Aktivitätsmessungen zur Verfügung, Franz Worek war an der Überarbeitung des Manuskripts und Arne Skerra an der Konzeption der Studie und am Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts beteiligt.

3.2 Veröffentlichung in Biochemistry (2023) - Überblick und eigener Beitrag

Der wissenschaftliche Artikel mit dem Titel: “Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop” wurde am 08.02.2023 (online Version) in der Fachzeitschrift “Biochemistry” veröffentlicht.

Zitat:

Job, L., Köhler, A., Eichinger, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2023) Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop. *Biochemistry* 62, 942–955.

Zusammenfassung der Veröffentlichung:

Neurotoxische Organophosphat-Verbindungen bergen ein hohes Risiko für die Bevölkerung, wenn sie z. B. durch Terroristen oder in militärischen Konflikten eingesetzt werden. Die Gabe von hydrolytischen Enzymen, welche diese Verbindungen zu nicht-toxischen Metaboliten abbauen können, stellen ein Gegenmittel in Aussicht. Die gut studierte homo-dimere Phosphotriesterase aus dem Organismus *Brevundimonas diminuta* (BdPTE) ist hierfür ein vielversprechender Kandidat, da sie durch rationales und kombinatorisches Protein-Design bereits weiterentwickelt wurde. Einige dieser Varianten, mit bis zu 22 Mutationen pro Enzymuntereinheit, zeigen erhöhte katalytische Effizienz gegenüber medizinisch relevanten Organophosphaten.

Die Akkumulation an Mutationen macht es jedoch schwierig, weitere Enzymvarianten basierend auf ungenauen Computermodellen zu generieren. Daher wurde die Struktur der hoch aktiven Variante 10-2-C3(C59V/C227V), welche zuvor gegenüber Oxidation durch Austausch zweier ungepaarter Cysteine stabilisiert wurde, im Komplex mit einem Substrat-Analogen durch Röntgen-Strukturanalyse mit einer Auflösung von 1,5 Å aufgeklärt. Hierbei wurde entdeckt, dass das lange Loop-Segment (Reste 253 bis 276), welches das aktive Zentrum abdeckt, überraschenderweise gegenüber dem Wildtyp-Enzym eine völlig andere Konformation annimmt. Diese Veränderung, mit strukturellen Abweichungen von bis zu 19 Å, wurde weder in vorherigen Protein-Designstudien vorhergesagt noch in kristallographischen Analysen weniger weit entwickelter Varianten gesehen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden weitere Aminosäureaustausche in die BdPTE 10-2-C3 eingebracht und deren Effekt auf die Proteinstabilität und die katalytische Effizienz gegenüber relevanten Organophosphat-Nervenkampfstoffen untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie

zeigen, dass die hier untersuchte Variante 10-2-C3(C59V/C227V), obwohl sie aufgrund teilweise falscher struktureller Annahmen entstanden ist, eine bereits gut optimierte Variante für die Hydrolyse von Organophosphat-Verbindungen darstellt.

Beitrag der Autorin dieser Dissertation:

Die Autorin dieser Dissertation war maßgeblich an der Konzeption und Durchführung der wissenschaftlichen Studie beteiligt. Die Autorin führte den Großteil der Experimente selbst durch (beispielsweise Klonierung von Plasmiden, ortsgerichtete Mutagenese, Expression, Reinigung und Charakterisierung der Proteine), sie analysierte die Daten, interpretierte die Kristallstruktur und war federführend am Verfassen des Manuskripts sowie der Überarbeitung beteiligt. Die Beiträge der weiteren Autoren waren wie folgt: Anja Köhler führte die Enzymassays und deren Auswertung durch, Andreas Eichinger führte die Kristallisationsversuche, die Synchrotron-Messung und die Strukturbestimmung durch und war an der Interpretation der Kristallstruktur beteiligt. Mauricio Testanera unterstützte bei der Klonierung und Proteinreinigung der His-tag Variante, Benjamin Escher stellte die gereinigte wt-BdPTE für die CD- und Aktivitätsmessungen zur Verfügung, Franz Worek lieferte die ursprüngliche Projektidee und Arne Skerra war an der Konzeption der Studie und am Verfassen und Überarbeiten des Manuskripts beteiligt.

4 Diskussion

4.1 Rationales Stabilitäts-Engineering der BdPTE

Die BdPTE wurde zuvor intensiv dem Protein-Engineering unterzogen, wobei sich verschiedene Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Zielen dieses Enzyms angenommen haben. In Abbildung 6 sind die wichtigsten Mutanten im Rahmen der Verbesserung der hydrolytischen Aktivität gegenüber OP-Nervenkampfstoffen dargestellt.

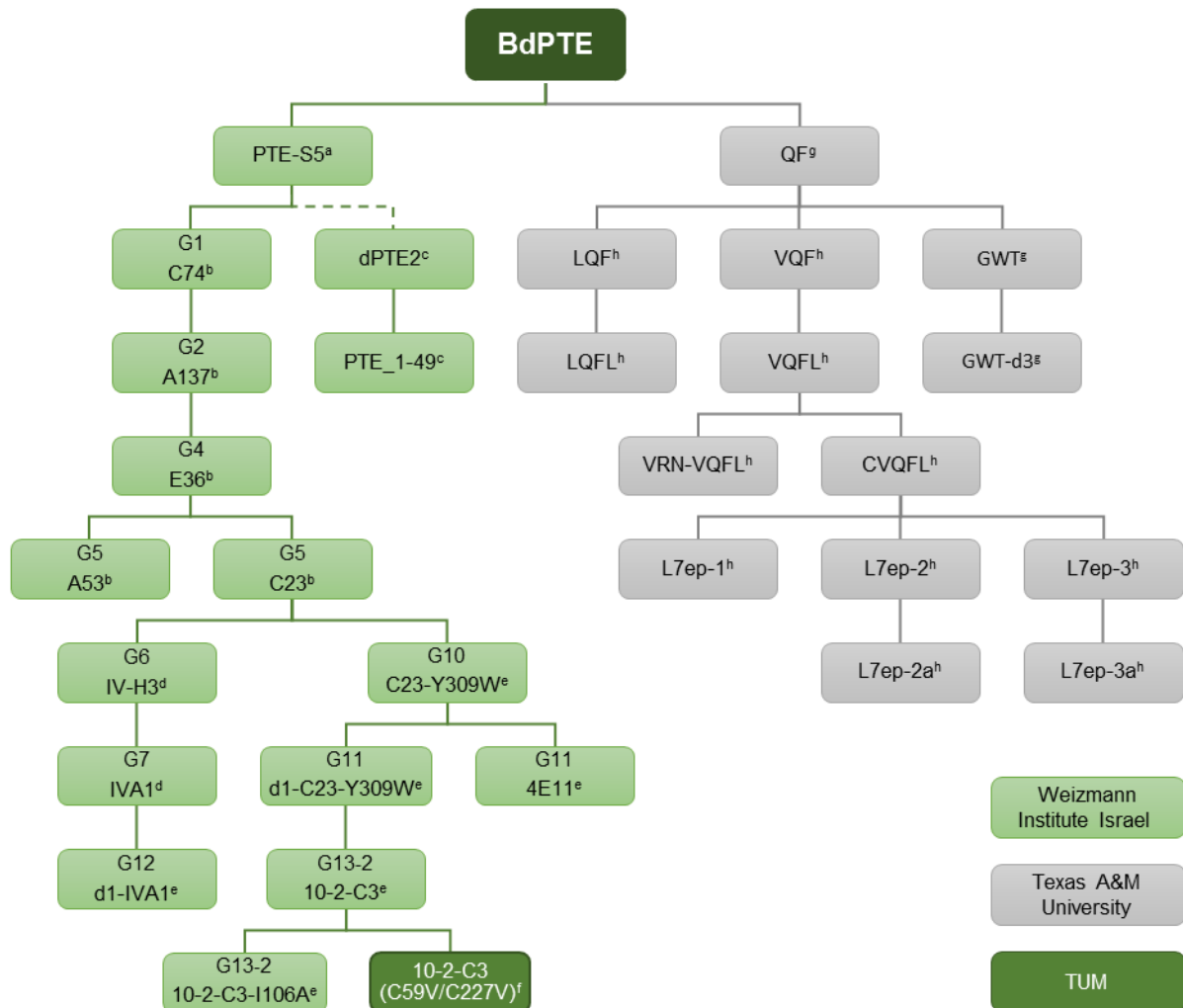


Abbildung 6: Stammbaum der BdPTE-Varianten mit verbesserter hydrolytischer Aktivität gegenüber OP-Nervenkampfstoffen. Die verschiedenen Generationen an gerichteter Enzymevolution des Weizmann Instituts sind als G(N) bezeichnet. Für Referenzen siehe ^a: (Roodveldt und Tawfik, 2005); ^b: (Cherny *et al.*, 2013); ^c: (Khersonsky *et al.*, 2018); ^d: (Goldsmith *et al.*, 2016); ^e: (Goldsmith *et al.*, 2017); ^f: (Job *et al.*, 2020), ^g: (Tsai *et al.*, 2012); ^h: (Bigley *et al.*, 2013). Nach (Job *et al.*, 2023).

Zwei Arbeitsgruppen haben bislang optimierte Kandidaten für die VX-Hydrolyse hervorgebracht. An der Texas A&M Universität wurde mit nur 7 Mutationen die vielversprechende Mutante VRN-VQFL und mit 8 teilweise anderen Mutationen die Mutante L7ep3a entwickelt, welche beide gute VX-Hydrolyseraten für das favorisierte S_P-Enantiomer zeigen (K_{cat}/K_M von

$6,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Bigley *et al.*, 2015). Jedoch wurden diese Mutanten nur auf ihre Fähigkeiten zur Hydrolyse von VX, VR und VX-Analoga untersucht, was die Studien der Arbeitsgruppe des Weizmann Instituts in Israel interessanter macht. Hier wurden insgesamt 13 Stufen zielgerichteter Evolution durchgeführt, wobei einige nennenswerte Mutanten auftraten (siehe Abbildung 6; Cherny *et al.*, 2013; Goldsmith *et al.*, 2016; Goldsmith *et al.*, 2017). Nach 5 Runden der gerichteten Mutagenese wurde die Mutante C23 mit 7 Mutationen selektiert, welche bereits ein breites Spektrum an OP-Kampfstoffen (VX, RVX, CVX, GA, GB, GD und GF) mit Hydrolyseraten $> 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ abdeckt (Cherny *et al.*, 2013).

Nach 10 Runden der gerichteten Evolution schien allerdings ein Optimierungs-Plateau erreicht, so dass für die S_P -VX-Hydrolyse keine verbesserten Mutanten mehr gefunden wurden. Daher wurden in der 11. Evolutionsrunde stabilisierende Mutationen eingefügt, die durch die Verbesserung der Löslichkeit bereits die S_P -VX-Hydrolyse um Faktor zwei verbessern konnten und das Enzym bereit für weitere Mutationen machte (Goldsmith *et al.*, 2017).

Die Mutante 10-2-C3 (Goldsmith *et al.*, 2017) zeigte nach 13 Generationen des Enzym-Engineerings und mit insgesamt 19 Mutationen bereits sehr hohe katalytische Effizienz gegenüber S_P -VX, mit $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, und auch beachtliche katalytische Effizienzen gegenüber weiteren relevanten OP-Nervenkampfstoffen (G-Stoffe: zwischen $1,4$ und $279 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; S_P -RVX und CVX mit jeweils $3,2$ und $3,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Goldsmith *et al.*, 2017). Daher wurde diese Mutante ausgewählt, um in dieser Arbeit weitere Optimierungen hinsichtlich ihrer Stabilität und ihrer katalytischen Effizienz vorzunehmen. Ein Nachteil dieser Mutante war jedoch, dass sie, wie schon die wt-BdPTE, zwei ungepaarte Cys-Reste trägt, die gegenüber Oxidation sehr empfindlich sind. Dies kann bereits bei der zytoplasmatischen Produktion in *E. coli* aufgrund des reduzierenden Milieus zu Problemen führen. Ebenso können oxidative Proteinmodifikationen während der Verarbeitung und Lagerung auftreten, sodass freie Cys-Reste als generelles Problem für die Entwicklung biopharmazeutischer Produkte angesehen werden (Shacter, 2000).

Zu Beginn dieser Arbeit mit der Mutante 10-2-C3 wurde diese Oxidationsempfindlichkeit in SDS-Gelen unter denaturierenden Bedingungen festgestellt. Bei Analyse des Enzyms unter nicht reduzierenden Bedingungen wurden zusätzliche Banden im Vergleich zu den reduzierenden Bedingungen beobachtet, was auf inter- und intramolekulare Disulfidbindungen hinwies (Job *et al.*, 2020). Daher wurden die beiden Cys-Reste an den Positionen 59 und 227 durch inerte Reste substituiert und hierbei versucht, die katalytische Aktivität der Vorgänger-mutante nicht negativ zu beeinflussen. Dies war bei der 10-2-C3(C59V/C227V) Mutante der Fall, wobei die katalytische Effizienz gegenüber allen getesteten OP-Kampfstoffen sogar leicht verbessert werden konnte und ebenso die thermische Stabilität (T_m) um $2 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht ist. Nach Behandlung mit dem Oxidationsmittel H_2O_2 wurden in ESI-MS-Messungen für diese

Mutante auch weniger modifizierte Spezies gefunden als für die Vorgängermutante. Da für das Enzym mit einer zusätzlichen M317L Mutation noch weniger oxidierte Spezies im Vergleich zur C59V/C227V-Mutante gefunden wurden und die thermische Stabilität weiter erhöht war, erscheint es möglich ein noch oxidationsresistenteres Enzym zu entwickeln, indem alle vorhandenen Met-Reste substituiert sind. Jedoch führte bereits der erste Methionin-Austausch bei der C59L/C227A/M317L-Mutante zu geringeren Ausbeuten und katalytischen Aktivitäten (Job *et al.*, 2020). Met314 ist ebenfalls in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums, so dass die Substitution dieses Restes zu ähnlichen nachteiligen Effekten führen sollte. Die Met-Reste 138 und 325 sind von der Proteinoberfläche nicht zugänglich, daher sind diese vermutlich weniger oxidationsempfindlich. Met80 ist dagegen dem Lösemittel ausgesetzt und daher ein möglicher Kandidat für eine weitere Substitution. Auch wurde diese Seitenkette erst in der 13. Generationsrunde in die Mutante 10-2-C3 eingeführt, anstelle von Ala bzw. Val und so könnte eine Rückmutation zu Val eine weitere Stabilisierung gegenüber Oxidation bewirken.

Zuvor wurde schon angenommen, dass die Variante 10-2-C3 als Wirkstoff für die Prophylaxe oder zur Post-Expositions-Therapie eingesetzt werden kann (Goldsmith *et al.*, 2017). Durch die Reduktion der Oxidationsempfindlichkeit ist die in dieser Arbeit generierte C59V/C227V-Mutante, ein weiterer vielversprechender Kandidat für die *in vivo* Applikation.

4.2 Potential hochaktiver Biokatalysatoren für den therapeutischen Einsatz

Schon früh wurde gezeigt, dass die BdPTE ein vielversprechender Kandidat als Antidot bei Vergiftungen mit phosphororganischen Verbindungen ist. In einer Maus-Studie waren die Tiere, die mit hohen Dosen an wt-BdPTE (100 mg/kg Körpergewicht, intravenös, (i.v.)) vorbehandelt wurden, nicht von Soman-Dosen beeinträchtigt, die mehr als doppelt so hoch waren wie die Dosen, die die Kontrolltiere im Zeitraum von 2-5 h töteten (Broomfield, 1992). In einer anderen Maus-Studie konnte gezeigt werden, dass bereits geringe Dosen wt-BdPTE (0,25 - 3 mg/kg Körpergewicht, i.v.) als Prophylaxe ausreichen, um die 50-fache Paraoxon-Dosis zu tolerieren, während kein schützender Effekt gegenüber geringen Sarin- und Soman-Dosen beobachtet wurde (Tuovinen *et al.*, 1994). Daher reichten die geringen Enzymdosen hier nicht aus, um eine schützende Wirkung gegenüber Soman zu erreichen. In einer weiteren Maus-Studie hingegen reichten 0,6-1 mg/kg Körpergewicht (i.v.) wt-BdPTE als Prophylaxe aus, um die 4 - 5,7 x LD₅₀ Dosis an Tabun zu überleben (Raveh *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer verbesserten BdPTE-Variante mit höheren katalytischen Aktivitäten gegenüber einem breiterem Spektrum an Nervenkampfstoffen und Pestiziden, da bei höheren Aktivitäten die Enzymdosis signifikant reduziert werden kann.

Bei Meerschweinchen-Studien mit BdPTE-Mutanten zeigte sich (Worek *et al.*, 2014b), dass 5 mg/kg der Variante C23 (fusioniert mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP); k_{cat}/K_M gegenüber S_P -VX: $0,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) i.v. verabreicht, 5 min nach der VX-Gabe ($\sim 2 \times \text{LD}_{50}$; 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$, subkutan (s.c.)) ausreichen, um die Tiere ohne bzw. mit nur geringen Symptomen den Versuchszeitraum (180 min) überleben zu lassen. Die gleiche Dosis reichte auch bei späterer Gabe (15 min nach VX) aus, um die Tiere den Versuchszeitraum überleben zu lassen, wobei diese jedoch mit Symptomen wie Speichelfluss / Bronchorrhö, Krämpfen und veränderter Atmung zu kämpfen hatten (Worek *et al.*, 2014b).

Dies legt nahe, dass die Behandlung mit der BdPTE so schnell wie möglich nach Exposition mit einem Kampfstoff erfolgen sollte. Hierbei besteht jedoch das Problem, dass eine intravenöse Injektion Zeit kostet und trainiertes Personal erfordert. Daher wurden in einer weiteren Studie alternative Applikationsmethoden mit einer weiter verbesserten Variante (C23AL; ohne MBP; k_{cat}/K_M gegenüber S_P -VX von $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) untersucht (Wille *et al.*, 2016). Unter anderem wurde die intramuskuläre (i.m., Injektion in den Muskel) und die intraossäre (i.o., Injektion in die Knochenmarkshöhle) mit der intravenösen Verabreichung verglichen. Die intramuskuläre Injektion führte jedoch im gesamten Versuchszeitraum von 180 min (erste Messung nach 1 min) zu keiner detektierbaren Plasmakonzentration der BdPTE-Variante; daher scheint dieser Applikationsweg für das Enzym ungeeignet. Im Gegensatz hierzu scheint die intraossäre sehr gut vergleichbar mit der intravenösen Injektion, sowohl den Schutz der AChE in Erythrozyten und im Zwerchfell betreffend als auch die C23AL Plasma-Konzentration (jeweils 0,6 $\mu\text{mol}/\text{L}$ nach 1 min für i.o. und i.v.; Wille *et al.*, 2016). Da für die intraossäre Applikation kommerzielle Systeme zur Verfügung stehen, deren Handhabung leicht erlernt werden kann (Calkins *et al.*, 2000), scheint dies eine gute Alternative zur intravenösen Applikation darzustellen.

Beim Vergleich der Studien von C23 und C23AL wurde festgestellt, dass das Verteilungsvolumen von C23AL etwa doppelt so groß ist, wie das von C23, was auf deren Fusion mit MBP zurückzuführen ist. Ebenso wurde die theoretische Hydrolyse-Halbwertszeit des toxischen S_P -VX für C23 und C23AL bestimmt, welche 7,3 s (Worek *et al.*, 2014b) bzw. 5,4 s (Wille *et al.*, 2016) betrug. Dies korrelierte jedoch nicht mit den experimentellen Befunden *in vivo*, bei denen 5 mg/kg C23 S_P -VX schneller hydrolysierten als 2 mg/kg C23AL (Wille *et al.*, 2016). Daher ergab sich die Frage, ob Plasmaproteine die BdPTE inhibieren.

Dieser Fragestellung ging eine weitere Studie auf den Grund, wobei die potentiell hemmende Wirkung von Albumin und die zugrundeliegenden biochemischen Mechanismen mit einer BdPTE-Mutante mit erhöhter OP-Hydrolyseaktivität untersucht wurden (Köhler *et al.*, 2021b). Da die zwei Zink-Ionen im aktiven Zentrum der BdPTE für die katalytische Aktivität eine wichtige Rolle spielen, wurde die inhibitorische Wirkung von Humanem Serum Albumin (HSA), welches mehrere Zink-Binde-Stellen besitzt (Kratz, 2008), Meerschweinchen Serum Albumin

(GSA), ohne die hoch-affine Zink-Binde-Stelle (Blindauer *et al.*, 2009) und verschiedenen niedermolekularen Thiolverbindungen, welche Komplexe mit Zink einzugehen vermögen (Besouw *et al.*, 2013; Turell *et al.*, 2013), untersucht. Mit allen Stoffen konnte eine inhibitorische Wirkung festgestellt werden, und die detaillierte Untersuchung von HSA *in vitro* zeigte, dass der inhibierende Mechanismus auf die Metall-Bindestelle sowie den freien Cys-Rest zurückzuführen ist, da beide die funktionellen Zink-Ionen dem aktiven Zentrums der BdPTE entziehen können. Daher sollten derlei inhibitorische Effekte bei der therapeutischen Entwicklung und der Formulierung für klinische Studien in Betracht bezogen werden (Köhler *et al.*, 2021b).

Ein weiteres Problem stellt die relativ ausgeprägte Spezifität der BdPTE und ihrer Mutanten dar; wie auch schon zuvor für die Variante 10-2-C3 festgestellt (Despotović *et al.*, 2019), hydrolysiert die für S_P-VX- verbesserte Variante 10-2-C3(C59V/C227V) die OPs RVX, CVX, GB und GF mit deutlich geringerer Aktivität ($k_{cat}/K_M < 0,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Job *et al.*, 2020; Köhler *et al.*, 2021a). In der Notfallsituation einer OP-Vergiftung ist jedoch oft nicht bekannt, mit welcher Substanz der Patient vergiftet wurde, und daher ist es essentiell ein weites Spektrum an OPs abzudecken, da die Behandlung so schnell wie möglich erfolgen muss. Um diesem Nachteil entgegenzuwirken wurde in einer Studie ein Enzymmix, bestehend aus drei BdPTE-Mutanten, welche zusammen alle bekannten V- und G-Kampfstoffe im Bereich von $0,2 \times 10^7$ bis zu $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ hydrolysieren, betrachtet (Despotović *et al.*, 2019). Deren Sequenzidentität beträgt 96 %, so dass die Autoren davon ausgehen, dass die Enzymmischung von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) als ein einziges biologisches Produkt angesehen würde (Despotović *et al.*, 2019). Jedoch würde sich dennoch die biopharmazeutische Entwicklung sehr aufwendig und kostspielig gestalten, da für jeden einzelnen Arzneimittelkandidaten die GMP-Produktion sowie eine klinische Studie gemäß den behördlichen Richtlinien erfolgen muss (Escher *et al.*, 2020).

Eine alternative Lösung stellt dem gegenüber eine heterodimere PTE-Variante dar, bei der die hoch homologe Aminosäuresequenz der BdPTE und der ArPTE und deren jeweils homodimere Quartärstruktur ausgenutzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass ein solches einzelkettiges heterodimeres Enzym bestehend entweder aus zwei unterschiedlichen BdPTE-Mutanten oder einer BdPTE- und ArPTE-Untereinheit, verlinkt über einen Pro/Ala/Ser- (PAS-) Linker, bei verschiedenen Substraten jeweils die Aktivität der aktiveren Untereinheit aufweist. Daher scheint ein solches homogenes bispezifisches Enzym eine generelle Lösung für die Breitbandhydrolyse von OP-Stoffen darzustellen (Escher *et al.*, 2020).

Für die *in vivo* Applikation ist letztlich die absolute katalytische Aktivität des Bioscavengers von Bedeutung für den erfolgreichen klinischen Einsatz, z. B. müsste man 350 mg BdPTE C23 für die Behandlung eines 70 kg schweren Menschen einsetzen (Worek *et al.*, 2016). Solche hohen Dosen wären nur mit hohem Aufwand herzustellen und auch nur begrenzt praktikabel für eine Bolus Injektion. Daher sind aktivere BdPTE, wie die hier vorgestellte 10-2-

C3(C59V/C227V) notwendig. In mehreren Studien wird von einer Enzymaktivität von k_{cat}/K_M von $\geq 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ausgegangen, um bei praktikablen Enzymdosen ($< 1 \text{ mg/kg}$) einen Schutz ohne Vergiftungssymptome zu erreichen (Ashani *et al.*, 2016; Worek *et al.*, 2016), was auf die Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) in Bezug auf VX zutrifft. Jedoch besitzt die wt-BdPTE bzw. wt-ArPTE in Mäusen bzw. Ratten nur eine Plasma-Halbwertszeit von $< 1 \text{ h}$ (Ashani *et al.*, 1991a; Gresham *et al.*, 2010), was insbesondere bei perkutanen Vergiftungen mit V-Stoffen ein Problem darstellen kann, da diese eine längere Persistenz besitzen (Worek *et al.*, 2014b; Worek *et al.*, 2016).

Um die Blood Clearance aktiver Proteine *in vivo* zu verzögern, kann die PASylierungstechnologie angewendet werden (Binder und Skerra, 2017). Je nach Länge der fusionierten strukturell ungeordneten und biochemisch inerten Polypeptidkette aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser vergrößert sich das hydrodynamische Volumen des Proteinwirkstoffs drastisch, was die Nierenfiltration verzögert (Schlapschy *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde daher ein PAS(200)-Tag an die vielversprechende Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) angehängt, um deren Plasmahalbwertszeit zu erhöhen (Variante 10-2-C3(C59V/C227V)-PAS(200), im nachfolgenden Text als PASylierte BdPTE bezeichnet; Köhler *et al.*, 2021a). Beim Aktivitätstest mit einem Spektrum an Substraten (vier G-Stoffe, sieben V-Stoffe und drei Amiton-Analoga) zeigte die PASylierte Mutante ein vergleichbares Aktivitätsprofil wie die Version, ohne PAS-Tag (Köhler *et al.*, 2021a). Auch die zuvor beschriebene Methode um heterodimere, bispezifische BdPTE zu erhalten (Escher *et al.*, 2020) wurde hier angewandt, indem die Mutanten C23 (Cherny *et al.*, 2013) und 10-2-C3(I106A/C59V/C227V) (Job *et al.*, 2020) über einen PAS(100) Linker miteinander fusioniert wurden. In dieser sogenannten PTE-C23(R152E)-PAS(100)-10-2-C3(I106A/C59V/C227V/E71K)-PAS(200) (im folgenden Text als heterodimere BdPTE bezeichnet) wurde ebenso die Dimerisierung mit Hilfe von Steuerungsmutationen (R152E und E71K) stabilisiert und das hydrodynamische Volumen über einen zusätzlichen PAS(200)-Tag vergrößert (Köhler *et al.*, 2021a). Diese beiden Mutanten (PASylierte und heterodimere BdPTE) schienen vielversprechend für den therapeutischen Einsatz, da sie beide hoch aktiv (k_{cat}/K_M -Werte $\geq 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für mehrere G- und V-Stoffe) waren und aufgrund der PASylierung eine längere Plasma-Halbwertszeit versprachen. Für den VX-Abbau wurden basierend auf der oben genannten Meerschweinchen-Studie (Worek *et al.*, 2014b), $t_{1/2}$ -Werte von 2,3 und von 7,7 s für die PASylierte BdPTE bzw. die heterodimere BdPTE abgeschätzt. Daher dürfte die PASylierte BdPTE bei einer Dosis von 1 mg/kg die geforderte Zeit $< 5 \text{ s}$ zum Abbau des OP einhalten, während die heterodimere BdPTE nahe an diesen Wert herankommt (Köhler *et al.*, 2021a).

Daher wurden diese beiden vielversprechenden Mutanten im Vergleich zur wt-BdPTE in einer Post-Expositions-Studie mit VX-vergifteten Ratten untersucht (Stigler *et al.*, 2022). In diesem

Rahmen wurde auch eine Pharmakokinetik-Studie nach i.v. Gabe der drei BdPTEs durchgeführt. Für die nicht PASylierte wt-BdPTE (1,0 mg/kg) wurde eine Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$ PTE) von 39 min, für die PASylierte BdPTE (1,4 mg/kg) von 94 min und für die heterodimere BdPTE (1,3 mg/kg) von 165 min bestimmt. So wurde erwartungsgemäß nachgewiesen, dass die PASylierungstechnologie eine bedeutsame Verlängerung der Plasmahalbwertszeit erwirkt (Stigler *et al.*, 2022). Dieser Effekt war bei der heterodimeren BdPTE am größten, wo beide Untereinheiten einmal über einen PAS(100)-Linker verbunden und mit einem PAS(200)-Anhängsel fusioniert waren (insgesamt 300 PAS-Reste), während bei der PASylierten BdPTE zwei Untereinheiten mit jeweils einem PAS(200)-Anhängsel vorlagen (insgesamt 400 PAS-Reste). Demzufolge scheint neben der Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens auch die Stabilisierung des Dimers durch den PAS-Linker zwischen den Untereinheiten zur verlängerten Plasmahalbwertszeit beizutragen.

Mit der bekannten katalytischen Aktivität und der aus der Pharmakokinetik-Analyse bekannten maximalen Plasmakonzentration (C_{\max}) der Enzyme konnte ebenfalls die Halbwertszeit der VX-Hydrolyse *in vivo* abgeschätzt werden, welche demnach für die PASylierte BdPTE 2,4 s betrug (1,4 mg/kg, $C_{\max} = 4,6 \times 10^{-7}$ mol/L; $k_{\text{cat}}/K_M = 3,8 \times 10^7$ M⁻¹ min⁻¹; Stigler *et al.*, 2022), also vergleichbar mit der zuvor ermittelten $t_{1/2}$ von 2,3 s (1 mg/kg) (Köhler *et al.*, 2021a). Für die heterodimere BdPTE (1 mg/kg; $k_{\text{cat}}/K_M = 2,1 \times 10^7$ M⁻¹ min⁻¹) wurde ein $t_{1/2}$ -Wert von 7,7 s vorhergesagt (Köhler *et al.*, 2021a), was wiederum vergleichbar war mit den *in vivo* bestimmten Werten von 8,2 s (1,3 mg/kg; $C_{\max} = 2,4 \times 10^{-7}$ mol/L) bzw. 3,1 s (2,6 mg/kg; $C_{\max} = 6,3 \times 10^{-7}$ mol/L). Dies sind im Vergleich zur wt-BdPTE (1 mg/kg, $C_{\max} = 5,7 \times 10^{-7}$ mol/L; $k_{\text{cat}}/K_M = 0,002 \times 10^7$ M⁻¹ min⁻¹) mit $t_{1/2}$ von 3632 s vielversprechende Eigenschaften (Stigler *et al.*, 2022).

Dies zeigte sich auch in der Pharmakodynamik-Studie, in der die Versuchstiergruppe, die mit der wt-BdPTE (i.v.) 5 min nach Gabe von $\sim 2 \times \text{LD}_{50}$ VX (25 µg/kg, s.c.; Misik *et al.*, 2015) behandelt wurden, über den Versuchszeitraum schwere Vergiftungssymptome und Kreislaufdepression vergleichbar mit der VX-Kontrollgruppe zeigten. Tatsächlich starben in der VX-Kontrollgruppe alle Tiere spätestens nach 71 min (Mittelwert: 46 ± 17 min) und in der wt-BdPTE-Gruppe nach 97 min (Mittelwert: 54 ± 19 min). Im Gegensatz dazu überlebten alle Versuchstiere, die mit der heterodimeren BdPTE (1,3 und 2,6 mg/kg) oder der PASylierten BdPTE (1,4 mg/kg) behandelt wurden, den Versuchszeitraum von 180 min. Bei der initialen Dosis der heterodimeren BdPTE (1,3 mg/kg) zeigten die Ratten jedoch Symptome wie Krämpfe und Atembeschwerden, wohingegen die doppelte Dosis (2,6 mg/kg) davor schützte. Bei der PASylierten BdPTE (1,3 mg/kg) wurden im Versuchszeitraum auch bei der niedrigeren Dosis keine schweren klinischen Anzeichen wie Krämpfe und Atemnot beobachtet.

Die Stereospezifität der beiden BdPTE Varianten für S_P-VX konnte, wie schon *in vitro* (Köhler *et al.*, 2021a), auch *in vivo* durch die Analyse der VX-Enantiomere nachgewiesen werden,

wobei die S_P-VX Konzentration bereits nach kurzer Zeit (ca. 5 min) unter der Bestimmungsgrenze lag. Die R_P-VX Konzentration begann im Fall des Heterodimers (2,6 mg/kg) und der PASylierten BdPTE nach rund 5 min abzunehmen, wobei die Nachweisgrenze nach 90 - 120 min unterschritten wurde. Die AChE-Aktivität im Zwerchfell und verlängerten Rückenmark zeigte, dass die Verteilung des gemessenen VX vom zentralen Blutkreislauf in das Gewebe nicht vollständig verhindert werden konnte, jedoch war diese im Vergleich zur Behandlung mit wt-BdPTE im Fall der hochdosierten Heterodimeren und der PASylierten BdPTE signifikant reduziert (Stigler *et al.*, 2022). So konnte diese Studie eine erfolgreiche Behandlung der vergifteten Versuchstiere nachweisen, wobei die verlängerte Plasmahalbwertszeit bei VX offenbar eine wichtige Rolle spielt, da dieses OP eine hohe biologische Stabilität und lange Verweildauern *in vivo* zeigt (Reiter *et al.*, 2011; Reiter *et al.*, 2015).

Bei der Atropin- und Oxim-Behandlung ist dagegen eine wiederholte Gabe notwendig, um ein ausreichendes Niveau an aktiver AChE zu erhalten (Wille *et al.*, 2019). Die PASylierungstechnologie könnte eine wiederholte Gabe des katalytischen Bioscavengers vermeiden, vor allem wenn das PAS-Anhängsel noch verlängert (z. B. auf 600 Reste) und so das hydrodynamische Volumen und somit die Zirkulationsdauer weiter vergrößert wird (Binder und Skerra, 2017; Schlapschy *et al.*, 2013; Stigler *et al.*, 2022). Es wurde zwar schon zuvor mit einer PEGylierten Version der wt-BdPTE (0,075 mg/kg, i.v.) in Meerschweinchen gezeigt, dass die Zirkulationshalbwertszeit $t_{1/2}$ von 52 min auf fast 4 h mit linearem PEG und auf bis zu 32,5 h mit verzweigtem PEG verlängert werden kann (Novikov *et al.*, 2010), jedoch hat die PASylierung gegenüber der PEGylierung einige Vorteile. Zum einen ist ein PASyliertes Protein leichter herzustellen, da es als Fusionsprotein direkt in der Zelle produziert wird und so die chemische Kopplung entfällt. Zum anderen akkumulieren die PAS-Polypeptide über die Zeit nicht in den Zellen und im Gewebe, wie dies bei PEG der Fall ist (Gebauer und Skerra, 2018; Schlapschy *et al.*, 2013).

In einer weiteren Studie wurde die wt-BdPTE bzw. eine Mutante mit einer dünnen hydrophilen Poly(carboxybetain)-(PCB)-Polymerschicht überzogen, was in einem sogenannten Nanoscavenger resultierte (Zhang *et al.*, 2019). Auch hier konnte das hydrodynamische Volumen signifikant vergrößert werden, so dass in Ratten eine Plasmahalbwertszeit $t_{1/2}$ von 26,2 h gegenüber 0,43 h für das native Enzym (jeweils 1 mg/kg, i.v.) erreicht wurde. Jedoch hat auch dieser Nanoscavenger Nachteile, da noch kein Prozess für eine technische Herstellung verfügbar ist. Zudem besteht der Nanoscavenger aus nicht abbaubaren PCB Polymeren, für welche noch keine Langzeitstudien *in vivo* über deren Metabolismus und Langzeitsicherheit durchgeführt wurden (Zhang *et al.*, 2019).

Dabei reichte eine Dosis von 10 - 20 µg/kg wt-BdPTE in Form des Nanoscavengers aus, um mit 2 x LD₅₀ von Paraoxon (0,86 mg/kg) vergiftete Ratten ohne Symptome überleben zu lassen (Zhang *et al.*, 2019). Im Gegensatz hierzu mussten mit wiederholten Dosen 2 x LD₅₀

an Sarin (87 µg/kg) vergiftete Meerschweinchen mit 5 mg/kg eines mutierten Nanoscavenger (BdPTE(H257Y/L303T), BdPTE-YT; Tsai *et al.*, 2012) behandelt werden (Zhang *et al.*, 2019). Hieran sieht man, wie wichtig die Aktivität für eine geringe Dosis ist, da die wt-BdPTE für Paraoxon einen k_{cat}/K_M Wert von $1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ besitzt, während die BdPTE-YT gegenüber Sarin einen k_{cat}/K_M Wert von $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ zeigt (Tsai *et al.*, 2012) und so bei Paraoxon-Vergiftungen um einiges geringere wt-BdPTE Dosen ausreichen.

Um die in dieser Arbeit konstruierte Mutante BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) weiter gegenüber VX oder anderen OP-Kampfstoffen verbessern zu können, ist es essenziell, die genaue Struktur des Enzyms zu kennen, da dies die Grundlage für das rationale Protein-Engineering darstellt.

4.3 Einblicke in die Kristallstruktur der Mutante 10-2-C3(C59V/C227V)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) im Komplex mit dem Übergangszustand-Analogen für Paraoxon (Diethyl-4-methylbenzylphosphonat (dEBP); Abbildung 2) kristallisiert und mittels Röntgenbeugung am Synchrotron konnte die Struktur mit einer Auflösung von 1,5 Å aufgeklärt werden (Abbildung 7A; Job *et al.*, 2023). Hierbei wurde festgestellt, dass im aktiven Zentrum ein partiell hydrolysiertes Monoethyl-Derivat des Substrat-Analogons (mEBP; Abbildung 2) vorlag. In der Proteinfaltung waren alle essenziellen Sekundärstrukturen im Vergleich zur wt-BdPTE konserviert, obwohl mittlerweile 22 Aminosäureaustausche aufgrund des intensiven Enzym-Engineerings vorlagen. Wenn man jedoch die wt-BdPTE (PDB: 1DPM; Vanhooke *et al.*, 1996) im Detail mit der neuen Struktur der BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) verglich, fiel auf, dass die oberflächenexponierte Schleife 7 (in der Literatur und folgend als Loop 7 bezeichnet), welche von Rest 253 bis 276 reicht, eine starke Abweichung vom ursprünglichen Enzym zeigt (Abbildung 7B).

Diese Schleife deckt das aktive Zentrum mit dem gebundenen Substrat ab, und die maximale Abweichung zwischen den beiden Kristallstrukturen beträgt bei Rest Gly261 zwischen den C α -Atomen 19,0 Å. Während des computergestützten Designs der 10-2-C3 Mutante unter Nutzung der Programme Rosetta (Cherny *et al.*, 2013; Goldsmith *et al.*, 2016; Richter *et al.*, 2011) und PROSS (Goldenzweig *et al.*, 2016) wurden solche strukturellen Veränderungen weder vorhergesagt noch in Betracht gezogen; daher ist diese Strukturveränderung sehr bemerkenswert und wurde wahrscheinlich durch die Akkumulation mehrerer Mutationen hervorgerufen. Als verantwortliche Mutation für die Umstrukturierung des Loops kommen mehrere Mutationen in Betracht: D233G, H254G, A270S, L271W, I274N und Y309W. Wenn man die Umgebung um diese Aminosäurepositionen genauer betrachtet, wird deutlich, dass diese Mutationen nur zusammen zur Umstrukturierung geführt haben, da einige Kristallstrukturen

vorhanden sind, die einzelne dieser Mutationen tragen und trotzdem die ursprüngliche Struktur des Loop 7 beibehalten (Abbildung 7C).

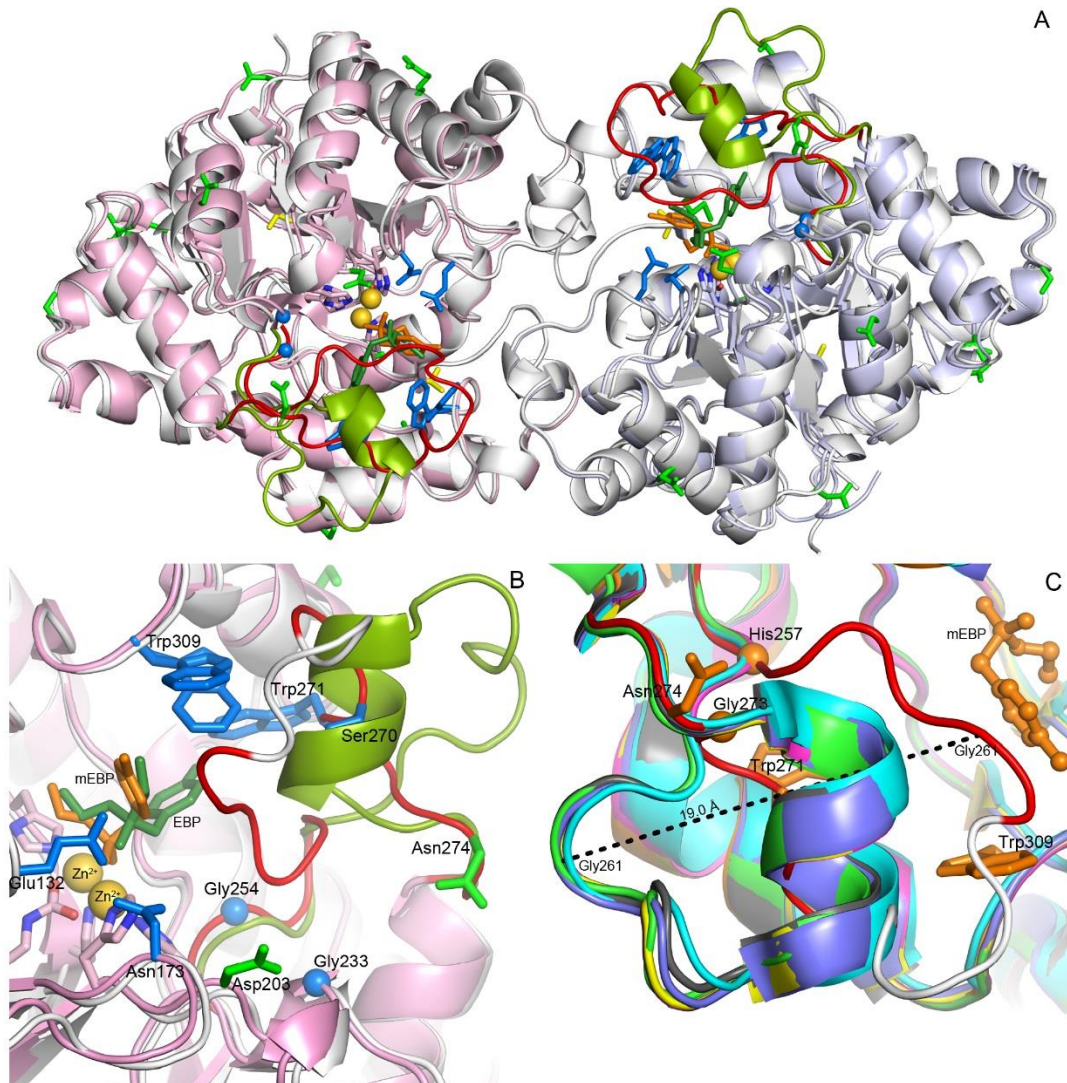


Abbildung 7: Dreidimensionale Struktur der BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V). (A) Das Dimer mit den Untereinheiten in hellem Pink und Hellblau, überlagert mit der in Grau dargestellten wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM). Mutierte Reste sind als „Sticks“ (Glycin-Reste als Kugeln) dargestellt. Von diesen sind mutierte Reste im aktiven Zentrum in Blau, mutierte Reste für die Enzymstabilisierung in Grün und die beiden mutierten Cystein-Reste (Val59 und Val227) in Gelb gefärbt. Zn^{II}-Ionen sind als goldene Kugeln dargestellt. Loop 7 ist in der BdPTE Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) in Rot und in der wt-BdPTE in Grün gefärbt. mEBP ist orange und dEBP dunkelgrün gefärbt. (B) Zoom in das aktive Zentrum. (C) Vergleich der Loop 7 Konformationen (Reste 257-273; diese Struktur orange und Loop 7 rot/weiß), mit der wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM; grün) und andere Enzymmutanten mit bekannter 3D-Struktur: A53 (PDB ID: 6FEI; magenta), C23 (PDB ID: 6FU6; gelb), L7ep-3a (PDB ID: 4ZST; cyan), PTE_27 (PDB ID: 6GBK; grau), und GWT-d3 (PDB ID: 3URA; lila). Die C α -Atome der Reste His257 und Gly273, bei denen die Abweichung von Loop 7 beginnt bzw. endet, sind als Kugeln, der Ligand mEBP als Stab-Kugel-Modell (orange) dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die Entfernung zwischen den beiden C α Positionen von Gly261 in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) und in wt-BdPTE. Abbildung zusammengestellt aus (Job *et al.*, 2023).

Zum Beispiel trägt die Mutante PTE_27 (PDB: 6GBK; Goldenzweig *et al.*, 2016) nur die Mutation H254G, und die Loop-Struktur zeigt trotzdem nur eine mittlere Abweichung (RMSD) von 0,45 Å gegenüber dem Wildtyp-Enzym (PDB: 1DPM; Vergleich der C α Atome Asp253-Ser276 des Loop 7 im Kontext der überlagerten Hauptstruktur; Job *et al.*, 2023). Für die Mutante GWT-d3 (PDB: 3URA) mit den Mutationen H245G und I274N zeigt der Loop mit dem Wildtyp sogar eine noch größere Strukturübereinstimmung mit RMSD = 0,34 Å. Die Mutanten C23 (Cherny *et al.*, 2013; PDB: 6FU6) und A53 (Goldsmith *et al.*, 2016; PDB: 6FEI) tragen ebenfalls diese beiden Mutationen und ergeben eine ebenso gute Übereinstimmung mit dem Wildtyp (Abbildung 7C; Job *et al.*, 2023). Bei der Mutante L7ep-3a (PDB: 4ZST) hatten die Autoren sogar eine Umstrukturierung des Loop 7 beabsichtigt, indem neben den Mutationen A270V, H254Q und I274N auch die beiden Mutationen H257Y und L272M in den Loop 7 eingeführt wurden (Bigley *et al.*, 2015). Allerdings erkennt man in Abbildung 7C, dass der Loop noch immer die gleiche Konformation wie beim Wildtyp-Enzym einnimmt, wobei jedoch die α -Helix O innerhalb des Loops näher zum aktiven Zentrum gerückt ist.

Die strukturelle Umgebung der Mutationen D233G, H254G, A270S, L271W, I274N und Y309W wird in der Veröffentlichung 2 (Job *et al.*, 2023) detailliert beschrieben. Nach genauer Betrachtung erscheint die Mutation D233G ein wahrscheinlicher Kandidat, der zur Umstrukturierung von Loop 7 geführt haben könnte, da diese Platz für die Aminosäure Ala259 schafft. Zudem tritt diese Mutation zum ersten Mal in der Mutante IVA1 auf, welche verbesserte VR-Hydrolyse zeigte mit $k_{cat}/K_M = 0,53 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Goldsmith *et al.*, 2016), während die noch weiter entwickelte Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) mit neun zusätzlichen Mutationen (inklusive der beiden Cys-Substitutionen) ähnliche VR-Hydrolyse-Raten zeigt, mit k_{cat}/K_M von $0,61 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, wobei diese einem anderen Evolutionszweig entstammt (Abbildung 6). Leider fehlen für diesen Zweig der VR-favorisierenden BdPTEs strukturelle Informationen; jedoch scheint das Substrat VR genauso gut in das aktive Zentrum von IVA1 zu passen wie in das der Mutante 10-2-C3(C59V/C227V), so dass die Umstrukturierung des Loop 7 vermutlich bereits in der Mutante IVA1 stattgefunden hat (Job *et al.*, 2023).

Außerdem scheint der Loop 7 vor allem an der Spitze sehr flexibel zu sein, was daran zu erkennen ist, dass für die Reste Glu263 bis Ser267 keine Elektronendichte erkennbar war. Zudem weist der gesamte Loop 7 im Vergleich zur restlichen Protein-Struktur hohe kristallographischen B-Faktoren auf. Schon früher wurde gezeigt, dass die Region Gly251-Ser276 in Abwesenheit von Metallionen in der Kristallstruktur der Apo-BdPTE (PDB ID: 1PTA) teilweise ungeordnet ist (Gly261-Ser269; Benning *et al.*, 1994; Benning *et al.*, 1995).

Außerdem konnte durch eine Normalmoden-Analyse eines vereinfachten elastischen Netzmodells der BdPTE gezeigt werden, dass eine sogenannte „Breathing“-Bewegung auftritt, in der Loop 7 eine koordinierte Umstrukturierung zwischen einem offenen und einem geschlossenen Konformationszustand eingeht (Jackson *et al.*, 2009). Ähnlich dazu wurde auch in einer

Molekulardynamik-Studie, in welcher der Bindemechanismus der wt-BdPTE für Paraoxon und Sarin untersucht wurde, gezeigt, dass eine wesentliche Konformationsänderung stattfindet, bei der das Gateway zum aktiven Zentrum geöffnet wird. Diese flexible Öffnung ist von der Substratgruppe abhängig, die in der Bindetasche für die Abgangsgruppen vorliegt, und wird von einer kurbelwellenähnlichen Bewegung des Rests Phe132 begleitet (Koca *et al.*, 2001). In der Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) liegt zwar die Mutation F132E vor, aber die Seitenkette von Glu132 nimmt eine ähnliche Konformation ein, so dass dieser Mechanismus in der für VX verbesserten Mutante ebenfalls stattfinden könnte.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, wird das aktive Zentrum der BdPTE neben dem Metallzentrum von drei Bindetaschen, die für die Orientierung des Substrates verantwortlich sind, geprägt. Die "kleine" Tasche wird hauptsächlich durch die Seitenketten der Aminosäuren G60, I106, L303 und S308 gebildet, wohingegen die Seitenketten von H254, H257, L271 und M317 die Tasche für den großen Substratrest auskleiden. Die Abgangsgruppen-Tasche wird hauptsächlich durch die Reste W131, F132, F306, und Y309 geformt (identifiziert nach Vanhooke *et al.*, 1996 und benannt nach Chen-Goodspeed *et al.*, 2001a).

Wenn man das aktive Zentrum in der neu gelösten Kristallstruktur genauer betrachtet, sieht man, dass das Substratanalogon mEBP eine andere Lage einnimmt als dEBP in der wt-BdPTE Struktur (PDB: 1DPM): Die beiden Sauerstoffatome der Phosphatgruppe weisen eine Distanz von 2 Å zu den Zn^{II}-Ionen auf, während die pro-*R* Ethoxygruppe vom mEBP in der "kleinen" Bindetasche liegt, vergleichbar mit dEBP in der wt-BdPTE Struktur (Abbildung 7B). In der wt-BdPTE Struktur liegt die Methylbenzyl-Gruppe jedoch in der "großen" Bindetasche, während in der hier diskutierten neuen Struktur Loop 7 diesen Platz versperrt und so die Methylbenzyl-Gruppe in der Abgangsgruppen-Bindetasche zu liegen kommt (für eine detaillierte Erläuterung siehe Veröffentlichung 2; Job *et al.*, 2023). Dies ist mechanistisch plausibel, da die Methylbenzylgruppe im eigentlichen Substrat der Nitrophenoxy-Abgangsgruppe entspricht.

Da die Konformationsänderung des Loop 7 bereits bei dem Substratanalogon mEBP zu einer Veränderung der Ligand/Substrat-Bindung geführt hat, waren die Docking-Ergebnisse von VX in das aktive Zentrum der Mutante 10-2-C3 (C59V/C227V) von Interesse. Hier zeigte sich, dass die *N,N*-Dialkylaminoethyl-Abgangsgruppe wiederum in der Abgangsgruppen-Bindetasche zu liegen kommt, was bei dem vergleichbaren Docking mit der wt-BdPTE nicht zu beobachten war, da hier die Abgangsgruppe in der "großen" Bindetasche vorlag. Mit der neuen Loop-Konformation ist die "große" Bindetasche jedoch viel zu klein, um die Abgangsgruppen von Paraoxon oder VX zu beherbergen. Glu132, welches durch die Mutation F132E eingeführt wurde, scheint zu einer ähnlichen Coulomb Wechselwirkung wie Asp233 (nun zu Gly mutiert) in der wt-BdPTE zu führen und bildet zusammen mit Asp203 ein anionisches Cluster, welches die Bindung der protonierten *N,N*-Dialkylaminoethyl-Gruppe in der neuen

Position favorisiert (Veröffentlichung 2; Job *et al.*, 2023). Dass Glu132 elektrostatisch mit der positiv geladenen *N,N*-Dialkylaminoethyl-Gruppe interagieren kann, wurde auch schon zuvor bei der Mutante A137 vermutet (Cherny *et al.*, 2013).

Interessanterweise liegt mEBP in der neuen Struktur sehr nahe an den katalytischen Zink-Ionen, mit Distanzen von 3,0 und 3,1 Å zum Phosphoratom. Dies passt auch zur Kristallstruktur der wt-BdPTE mit Diethyl-Phosphat (DEP) im aktiven Zentrum (Kim *et al.*, 2008), bei der das Phosphorzentrum mit dem der neuen Struktur nahezu perfekt überlagert werden kann und eine Ethoxygruppe analog in der "kleinen" Bindetasche liegt, wohingegen die zweite Ethoxygruppe in der Abgangsgruppen-Bindetasche zu liegen kommt. Daher lohnt es sich, vor dem Hintergrund der neuen Kristallstruktur erneut den Reaktionsmechanismus der BdPTE zu betrachten.

4.4 Reaktionsmechanismen der BdPTE

In Abschnitt 1.4.2 wurde für die BdPTE der Reaktionsmechanismus von Wong und Gao (2007) vorgestellt, bei dem der Enzym/Produkt-Komplex asymmetrisch an das β -Zinkion gebunden ist und die beiden Metall-Ionen 5,3 Å voneinander entfernt sind. Dieser S_N2 -ähnliche Reaktionsmechanismus ist allgemein anerkannt (Aubert *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Vanhooke *et al.*, 1996; Wong und Gao, 2007; Zhang *et al.*, 2009), jedoch bestehen Kontroversen in Bezug auf die beteiligten allgemeinen Basen und die Protonenübertragungswege.

Für die ArPTE wurde basierend auf den Kristallstrukturen verschiedener Komplexe (u. a. mit Dimethyl-thiophosphat, DMTP, und Diethyl-4-methoxyphenylphosphat, EPO) ein Reaktionsmechanismus vorgestellt, bei dem eine μ -Hydroxo-Brücke durchgehend während des katalytischen Zyklus zwischen den beiden Metallionen besteht (Jackson *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2008). Dieses verbrückende Hydroxidion dient allerdings nicht als Nukleophil sondern als allgemeine Base, welches bei einem an das α -Metallion zusätzlich gebundenen Wassermolekül den pK_S erniedrigt, so dass daraus das eigentliche nukleophile Hydroxidion generiert wird. Nach dessen nukleophilem Angriff wird die entstehende negative Ladung des Übergangszustands durch eine engere Wechselwirkung mit dem positiv geladenen binuklearen Metallzentrum stabilisiert und so die Aktivierungsenergie herabgesetzt. Dabei wird das Proton des Wassermoleküls über die μ -Hydroxo-Brücke aus dem aktiven Zentrum geleitet. Nach Austritt der Abgangsgruppe überbrückt der Phosphodiester die Metallionen, neben der μ -Hydroxo-Brücke (Jackson *et al.*, 2008).

Dies kann jedoch bei der hier analysierten Struktur, wie auch beim wt-BdPTE/DEP-Komplex (Kim *et al.*, 2008), nicht zutreffen, da die sechsfache Koordinierung des α -Zinkions selten ist und ein experimenteller Nachweis für ein zusätzliches Wassermolekül, welches durch das

verbrückende Hydroxidion aktiviert wird, für die BdPTE fehlt (Kim *et al.*, 2008). Da im ArPTE/DMTP-Komplex beide Metallbindestellen durch Cadmium-Ionen (Jackson *et al.*, 2005) und im ArPTE/EPO-Komplex durch je ein Eisen- und ein Cadmium-Ion besetzt sind (Jackson *et al.*, 2008), ist dieser Reaktionsmechanismus auch nur bedingt auf die BdPTE mit zwei Zink-Ionen im aktiven Zentrum übertragbar.

In einer früheren Studie wurde auf der Grundlage der kinetischen Untersuchungen der wt-BdPTE und verschiedener Mutanten (an den Positionen Asp233, His254 und Asp301) die Hypothese aufgestellt (Aubert *et al.*, 2004), dass der nukleophile Angriff auf das Phosphorzentrum durch das brückenbildende Hydroxidion mit einem Protonentransfer vom Hydroxidion auf Asp301 einhergeht und das Phosphatanion nach Verlust der Abgangsgruppe die beiden Zink-Ionen verbrückt. Anschließend wird das übertragene Proton von Asp301 über His254 zu Asp233 und letztendlich in das Lösemittel transportiert. Nach Freisetzung des Produkts, wird das aktive Zentrum mit dem zweifach koordinierten Hydroxidion regeneriert (Aubert *et al.*, 2004). Zwei Molekulardynamik-Simulationen mit der wt-BdPTE konnten jedoch einen Protonentransfer vom Hydroxidion zu Asp301 nicht nachweisen (Wong und Gao, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

In einer neueren Molekulardynamik-Simulation (Zhang *et al.*, 2009), welche optimierte Parameter für das Phosphoratom und die Zink-Ionen nutzte, wurden mehrere Übergangszustände und Intermediate beobachtet, die alle Schritte der Reaktion von der Substratbindung über die Hydrolyse bis zur Produktfreisetzung beinhalten (Abbildung 8). Im Gegensatz zu der früheren Studie (Wong und Gao, 2007) wurde gezeigt, dass die Koordination des nukleophilen Hydroxydsauerstoffs mit Zn^{II} erst relativ spät (sobald die freie Energie steil ansteigt) im Reaktionsverlauf bricht. Hier wurde ebenfalls ein Intermediat identifiziert, wobei das Hydroxydion seine Bindung zum β -Zinkion löst und an das Phosphorylzentrum bindet. Ein ähnliches Intermediat wurde auch unter Anwendung einer hybriden Dichtefunktionaltheorie identifiziert (Chen *et al.*, 2007). Dieses Intermediat zeigt eine Sauerstoff/Metall-Distanz von 2,1 und 2,0 Å und eine Metall/Metall-Distanz von 4,5 Å (Zhang *et al.*, 2009), was vergleichbar mit dem wt-BdPTE/DEP-Komplex (Kim *et al.*, 2008) wie auch der hier gelösten Struktur ist. Da es weder in der hier gelösten Struktur noch beim wt-BdPTE/DEP-Komplex (Kim *et al.*, 2008) einen Hinweis auf die zusätzliche Bindung eines Hydroxidions zu den beiden Zinkionen gibt, erscheint der durch Molekulardynamik-Simulation aufgeklärte Reaktionsmechanismus (Abbildung 8) insbesondere für die Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) sehr wahrscheinlich.

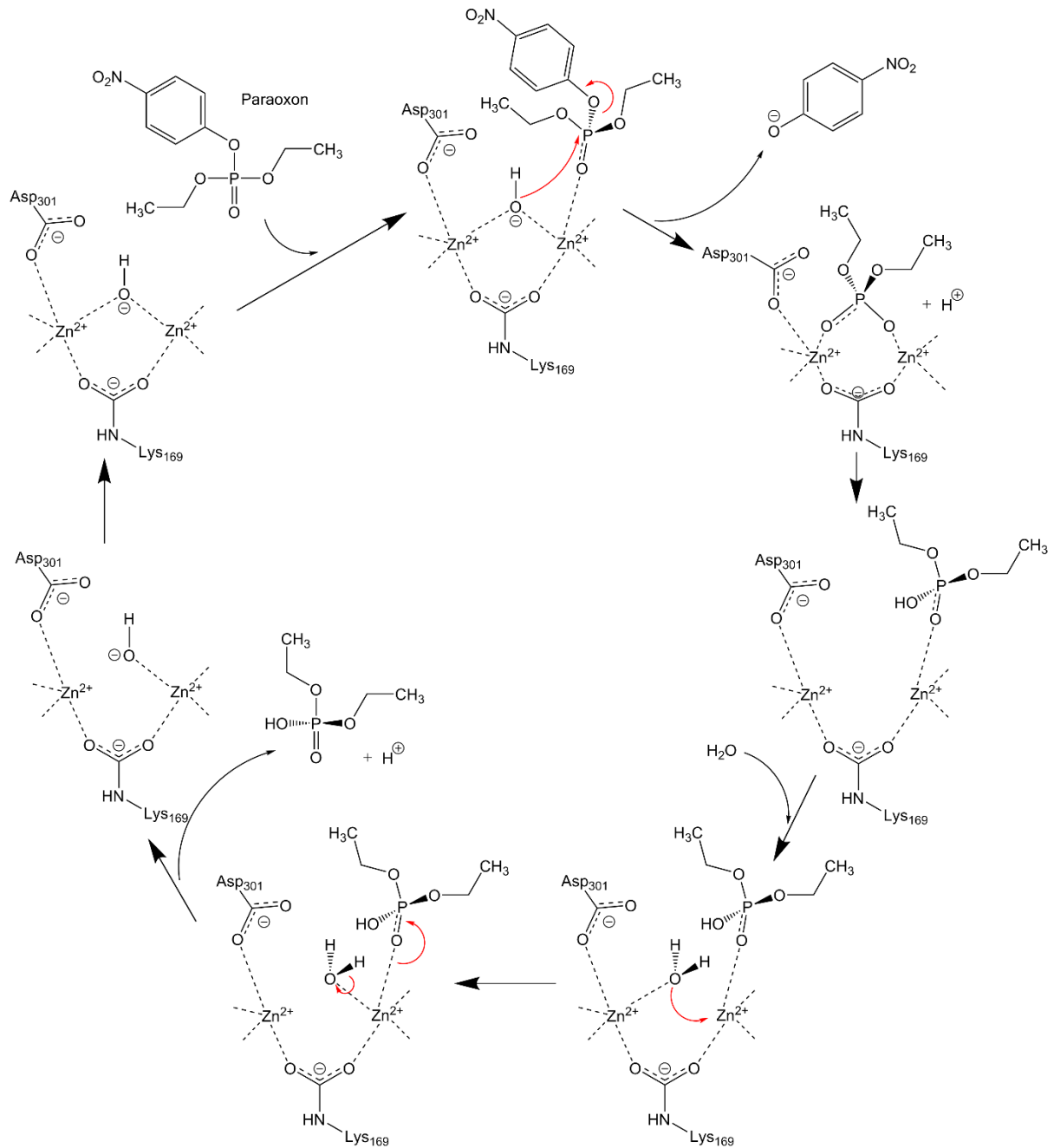


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der wt-BdPTE für die Hydrolyse von Paraoxon (links oben) in Anlehnung an die Beschreibung von Zhang *et al.* (2009). $Zn^{\alpha 2+}$ ist jeweils links und $Zn^{\beta 2+}$ jeweils rechts dargestellt.

Im Fall der wt-BdPTE wird in manchen Studien angenommen, dass His254 benötigt wird, um das Proton, das bei der Bindung des Hydroxydions (aus einem Wassermolekül) freigesetzt wird, aus dem aktiven Zentrum zu leiten (Aubert *et al.*, 2004; Wong und Gao, 2007). Bei der hier analysierten BdPTE Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) ist diese Position jedoch zu Gly mutiert. Alternativ könnte His257 diese Funktion als Protonenakzeptor übernehmen, da dieses nur 3,9 Å von Asp301 entfernt ist und beobachtet wurde, dass bei zusätzlicher Mutation von His257 zu Phe bzw. Trp in BdPTE 10-2-C3(C59L/C227A) bzw. 10-2-C3(C59V/C227V) die

Aktivität gegenüber allen untersuchten Nervenkampfstoffen (VX, VR, GB und GF) signifikant erniedrigt ist (Faktor 2 bis 7,5; Veröffentlichung 2; Job *et al.*, 2023).

Die Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) erscheint als geeigneter Kandidat für die pharmazeutische Anwendung, da sie hohe katalytische Aktivitäten gegenüber einem breiten Spektrum an OP-Nervenkampfstoffen besitzt (Köhler *et al.*, 2021a) und aufgrund der Cystein-Substitutionen weniger sensibel gegenüber Oxidation ist (Job *et al.*, 2020). Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung der PASylierungstechnologie die Plasma-Halbwertszeit dieser Mutante verlängert werden kann und durch VX vergiftete Versuchstiere behandelt mit niedrigen Enzymdosen (1,4 mg/kg) ohne Symptome überleben (Stigler *et al.*, 2022). Außerdem kann diese Mutante zu einem bispezifischen Enzym kombiniert und somit das Wirkspektrum zusätzlich erweitert werden (Escher *et al.*, 2020). Mit der hier aufgeklärten Kristallstruktur wurde außerdem die Grundlage geschaffen, um gezielt weitere verbessernde Mutationen einzufügen, da nun die Substratbindung und der Reaktionsmechanismus bekannt sind (Job *et al.*, 2023).

5 Zusammenfassung

Neurotoxische Organophosphatverbindungen (OPs) stellen eine große Gefahr dar, wenn sie in militärischen Konflikten oder durch Terroristen missbraucht werden. Ebenso werden noch immer OP-Pestizide vor allem in ärmeren Ländern in der Landwirtschaft eingesetzt und bringen so ein hohes Gesundheitsrisiko bei Langzeitexposition oder als Giftstoff bei Suiziden mit sich. Daher wird eine akute Behandlungsmethode benötigt, welche die OPs abbaut, bevor die Acetylcholinesterase in der Muskulatur oder im Gehirn irreversibel gehemmt werden kann. Ein vielversprechendes Antidot hierfür bieten hydrolytische Enzyme, welche die OP-Verbindungen zu nicht-toxischen Metaboliten abbauen können. Hierfür eignet sich besonders die homodimere Phosphotriesterase aus *Brevundimonas diminuta* (BdPTE), da sie bereits gut studiert und durch rationales und kombinatorisches Protein-Design weiterentwickelt wurde, so dass Varianten mit bis zu 22 Mutationen pro Enzymuntereinheit vorliegen. Einige dieser Varianten zeigen erhöhte katalytische Effizienz gegenüber medizinisch relevanten OPs, jedoch reicht deren biochemische Stabilität für eine erfolgreiche Applikation *in vivo* noch nicht aus.

Daher sollte in dieser Arbeit die BdBTE-Variante 10-2-C3 in Bezug auf ihre Aktivität und Stabilität weiterentwickelt werden, um später als katalytisches Gegenmittel bei Vergiftungen mit OP-Pestiziden und Nervenkampfstoffen eingesetzt werden zu können. Hierfür sollte zum einen die oxidative Empfindlichkeit des Enzyms reduziert und zum anderen die Struktur einer vielversprechenden Mutante aufgeklärt werden.

Um das Enzym gegenüber oxidativem Stress zu stabilisieren, wurde rationales Protein-Design angewendet, indem die zwei ungepaarten Cys-Reste 59 und 227 gegen verschiedene inerte Aminosäuren substituiert wurden. Die in *Escherichia coli* produzierten Einzel- und Doppelmutanten wurden daraufhin bezüglich ihrer biochemischen und enzymologischen Eigenschaften, wie Expressionsausbeute, thermische Stabilität, katalytische Effizienz gegenüber VX, VR, GB und GF sowie Oxidationsstabilität mittels Massenspektrometrie getestet. Für einige dieser Mutanten konnte eine erhöhte thermische Stabilität und eine verminderte Oxidationsempfindlichkeit gezeigt werden. Schließlich wurde die Mutante 10-2-C3(C59V/C227V) ausgewählt, welche zwei Valin-Substitutionen trägt, da sie die katalytische Effizienz der Vorgängerversion beibehalten hatte und eine um 2 °C erhöhte thermische Stabilität aufwies. Da diese Mutante aufgrund der verbesserten Oxidationsresistenz und des breiten Wirkspektrums gegenüber OP-Substraten ein vielversprechender Kandidat für die Behandlung von akuten Vergiftungen durch diese Stoffe erschien, wurde sie in Tierstudien eingesetzt. Dabei wurde zudem gezeigt, dass durch die Anwendung der PASylierungstechnologie das hydrodynamische Volumen erhöht und somit die Plasma-Halbwertszeit des Enzyms verlängert werden

kann. Als Ergebnis wurden durch VX vergiftete Ratten schon mit einer niedrigen Enzymdosis (1,4 mg/kg) erfolgreich behandelt, so dass sie den Versuchszeitraum symptomfrei überlebten.

Da die Akkumulation der großen Zahl an Mutationen es schwierig macht, weitere Enzymvarianten gestützt auf Computermodellen zu entwickeln, wurde die Kristallstruktur der Variante 10-2-C3(C59V/C227V) im Komplex mit dem Substratanalogon Diethyl-4-methylbenzylphosphonat durch Röntgen-Strukturanalyse mit einer Auflösung von 1,5 Å aufgeklärt. Hierbei wurde überraschenderweise eine gegenüber der wt-BdPTE dramatisch veränderte Loop-Konformation der Reste 253 bis 276 aufgedeckt. Dieses Loop-Segment deckt das aktive Zentrum des Enzyms ab, und mit strukturellen Abweichungen von bis zu 19 Å wird eine andere Substratbindung induziert als bisher angenommen. Da diese neue Konformation in vorangegangenen Protein-Designstudien nicht vorhergesagt wurde und auch in den Kristallstrukturen von weniger weit entwickelten Varianten nicht zu sehen war, erschien es im Licht der neuen Erkenntnisse möglich, weitere Aminosäureaustausche in die BdPTE 10-2-C3 einzuführen. Die Bedeutung dieser Substitutionen für die Proteinstabilität konnte anhand von günstigen Effekten auf die Expressionsausbeute und die thermische Stabilität gezeigt werden. Auch deren Bedeutung für die katalytische Effizienz gegenüber relevanten Organophosphat-Nervenkampfstoffen konnte durch vergleichende Aktivitätsmessungen nachgewiesen werden.

Da nun die Substratbindung und der Reaktionsmechanismus der optimierten BdPTE bekannt sind, ist mit der hier aufgeklärten Kristallstruktur die Grundlage geschaffen, um eventuell gezielt weitere verbessernde Mutationen einzufügen. Dabei zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die hier untersuchte Variante 10-2-C3(C59V/C227V) eine bereits gut optimierte Variante für die Hydrolyse von Organophosphat-Verbindungen darstellt, auch wenn deren schrittweise Konstruktion durch Protein-Engineering teilweise auf falschen strukturellen Annahmen beruhte.

6 Abkürzungen

AChE	Acetylcholinesterase
Amp	Ampicillin
ArPTE	PTE aus <i>Agrobacterium radiobacter</i>
aTc	Anhydrotetracyclin
BdPTE	PTE aus <i>Brevundimonas diminuta</i>
CD	Circulardichroismus
CVX	Chinese VX - Butyl-[2-(diethylamino)ethyl]methylphosphonothiolat
CWÜ	Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
dEBP	Diethyl-4-methylbenzylphosphonat
DEP	Diethyl-Phosphat
DMTP	Dimethyl-thiophosphat
EPO	Diethyl-4-methoxyphenylphosphat
ESI-TOF MS	Electrospray Ionization – Time of Flight Massenspektrometrie
FDA	U.S. Food and Drug Administration
GA	Tabun
GD	Soman
GF	Cyclosarin
GMP	Good Manufacturing Practice
hBChE	humane Butyrylcholinesterase
His ₆ -tag	Hexahistidinhängsel
hPON-1	humane Paraoxonase 1
i.m.	intramuskulär
i.o.	intraossär
i.v.	intravenös
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
$k_{\text{AChE}(t_{\text{PTE}})}$	Geschwindigkeitskonstante der AChE Enzymaktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt der OP-Hydrolyse durch die PTE
k_{cat}	Wechselzahl
$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$	katalytische Effizienz
K_{M}	Michaeliskonstante
k_{PTE}	Konstante des OP-Abbaus durch die PTE
KWI	Kaiser Wilhelm Institut
LB-Medium	Luria/Bertani-Medium
MBP	Maltose-Bindeprotein

mEBP	Monoethyl-4-methylbenzylphosphonat
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 550
OP	Organophosphat
OPH	Organophosphat-Hydrolase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Pro/Ala/Ser-Biopolymer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
pK _s	Säurekonstante
PoOPH	PTE aus <i>Pseudomonas oleovorans</i>
PTE	Phosphotriesterase
RMSD	Root Mean Square Deviation
RVX	Russian VX - [2-(Diethylamino)ethyl](2-methylpropyl)methylphosphono- thiolat
s.c.	subkutan
SAC	<i>Strep</i> Tactin Affinitätschromatographie
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
T _m	Schmelztemperatur
v/v	Volume per Volume
VX	Ethyl-2-diisopropylaminoethylmethylphosphonothiolat
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp

7 Literatur

- Aas, P. (2003), Future considerations for the medical management of nerve-agent intoxication. *Prehosp Disaster Med* 18, 208–216.
- Ahmed, M. K. & Casida, J. E. (1958), Metabolism of some organophosphorus insecticides by microorganisms. *J Econ Entomol* 51, 59–63.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M. J., Natale, D. A., O'Donovan, C., Redaschi, N. & Yeh, L.-S. L. (2004), UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 32, D115-9.
- Ashani, Y., Leader, H., Aggarwal, N., Silman, I., Worek, F., Sussman, J. L. & 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.
- Ashani, Y., Rothschild, N., Segall, Y., Levanon, D. & Raveh, L. (1991a), Prophylaxis against organophosphate poisoning by an enzyme hydrolysing organophosphorus compounds in mice. *Life Sci* 49, 367–374.
- Ashani, Y., Shapira, S., Levy, D., Wolfe, A. D., Doctor, B. P. & Raveh, L. (1991b), Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase prophylaxis against soman poisoning in mice. *Biochem Pharmacol* 41, 37–41.
- Aubert, S. D., Li, Y. & Raushel, F. M. (2004), Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 43, 5707–5715.
- Auswärtiges Amt (2020) Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen (CWÜ) [Online]. Verfügbar auf: <https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/themen/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffen-node/-/207106> (Zuletzt geprüft am 01.07.23).
- Auswärtiges Amt (2022) Aufklärung der Chemiewaffen-Einsätze in Syrien [Online]. Verfügbar auf: <https://www.auswaertiges-amt.de/de/aussenpolitik/sicherheitspolitik/abruestung-ruestungskontrolle/uebersicht-bcwaffen-node/-/207108> (Zuletzt geprüft am 23.06.2023).
- Benning, M. M., Kuo, J. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (1994), Three-dimensional structure of phosphotriesterase: *An enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents*. *Biochemistry* 33, 15001–15007.
- Benning, M. M., Kuo, J. M., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (1995), Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* 34, 7973–7978.
- Benning, M. M., Shim, H., Raushel, F. M. & Holden, H. M. (2001), High resolution X-ray structures of different metal-substituted forms of phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* 40, 2712–2722.
- Benschop, H. P. & De Jong, L. P. A. (1988), Nerve agent stereoisomers: *Analysis, isolation and toxicology*. *Accounts Chem Res* 21, 368–374.

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000), The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235–242.
- Besouw, M., Masereeuw, R., van den Heuvel, L. & Levtchenko, E. (2013), Cysteamine: an old drug with new potential. *Drug Discov Today* 18, 785–792.
- Bigley, A. N., Mabanglo, M. F., Harvey, S. P. & Raushel, F. M. (2015), Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR. *Biochemistry* 54, 5502–5512.
- Bigley, A. N., Xu, C., Henderson, T. J., Harvey, S. P. & Raushel, F. M. (2013), Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J Am Chem Soc* 135, 10426–10432.
- Binder, U. & Skerra, A. (2017), PASylation®: A versatile technology to extend drug delivery. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 31, 10–17.
- Blindauer, C. A., Harvey, I., Bunyan, K. E., Stewart, A. J., Sleep, D., Harrison, D. J., Berezenko, S. & Sadler, P. J. (2009), Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. *J Biol Chem* 284, 23116–23124.
- Broomfield, C. A. (1992), A purified recombinant organophosphorus acid anhydrase protects mice against soman. *Pharmacol Toxicol* 70, 65–66.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M. (1987), XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio-Techniques* 5, 376–379.
- Calkins, M. D., Fitzgerald, G., Bentley, T. B. & Burris, D. (2000), Intraosseous infusion devices: a comparison for potential use in special operations. *J Trauma* 48, 1068–1074.
- Carvalho, F. P. (2017), Pesticides, environment, and food safety. *Food Energy Secur* 6, 48–60.
- Cassaday, J. T. & Stamford, C. (1951) Verfahren zur Herstellung von Dithiophosphorsäure-triestern. *US2578652A*.
- Chen, S.-L., Fang, W.-H. & Himo, F. (2007), Theoretical study of the phosphotriesterase reaction mechanism. *J Phys Chem B* 111, 1253–1255.
- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M. A., Wu, F., Hong, S. B. & Raushel, F. M. (2001a), Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry*, 1325–1331.
- Chen-Goodspeed, M., Sogorb, M. A., Wu, F. & Raushel, F. M. (2001b), Enhancement, relaxation, and reversal of the stereoselectivity for phosphotriesterase by rational evolution of active site residues. *Biochemistry*, 1332–1339.
- Cherny, I., Greisen, P., Jr., Ashani, Y., Khare, S. D., Oberdorfer, G., Leader, H., Baker, D. & Tawfik, D. S. (2013), Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem Biol* 8, 2394–2403.

- Cho, C. M.-H., Mulchandani, A. & Chen, W. (2002), Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl Environ Microb* 68, 2026–2030.
- Cho, C. M.-H., Mulchandani, A. & Chen, W. (2004), Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. *Appl Environ Microb* 70, 4681–4685.
- Cho, C. M.-H., Mulchandani, A. & Chen, W. (2006), Functional analysis of organophosphorus hydrolase variants with high degradation activity towards organophosphate pesticides. *Protein Eng Des Sel* 19, 99–105.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972), Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *P Natl Acad Sci USA* 69, 2110–2114.
- Dabisch, P. A., Hulet, S. W., Kristovich, R. & Mioduszewski, R. J. (2008) Inhalation toxicology of nerve agents. In Romano, J. A., Lukey, B. J. and Salem, H. (Eds.) *Chemical Warfare Agents: Chemistry, pharmacology, toxicology, and therapeutics*, 2nd edn, Boca Raton, Fla.: CRC Press, 233–246.
- Despotović, D., Aharon, E., Dubovetskyi, A., Leader, H., Ashani, Y. & Tawfik, D. S. (2019), A mixture of three engineered phosphotriesterases enables rapid detoxification of the entire spectrum of known threat nerve agents. *Protein Eng Des Sel*, 169–174.
- Dumas, D. P., Caldwell, S. R., Wild, J. R. & Raushel, F. M. (1989), Purification and properties of the phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem* 264, 19659–19665.
- Dunn, M. A. (1989), Progress in medical defense against nerve agents. *JAMA* 262, p. 649.
- Eddleston, M., Buckley, N. A., Cheeketts, H., Senarathna, L., Mohamed, F., Sheriff, M. H. R. & Dawson, A. (2004), Speed of initial atropinisation in significant organophosphorus pesticide poisoning - a systematic comparison of recommended regimens. *J Toxicol, Clin Toxicol* 42, 865–875.
- Eddleston, M., Karalliedde, L., Buckley, N., Fernando, R., Hutchinson, G., Isbister, G., Konradsen, F., Murray, D., Piola, J. C., Senanayake, N., Sheriff, R., Singh, S., Siwach, S. B. & Smit, L. (2002), Pesticide poisoning in the developing world - a minimum pesticides list. *Lancet* 360, 1163–1167.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004), Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 2126–2132.
- 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.
- Europäische Kommission (2020) Durchführungsverordnung zur Nichterneuerung der Genehmigung des Wirkstoffs Chlorpyrifos gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Eu-

- ropäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 der Kommission (Reg. (EU) 2020/18).
- Eyer, F., Worek, F., Eyer, P., Felgenhauer, N., Haberkorn, M., Zilker, T. & Thiermann, H. (2009), Obidoxime in acute organophosphate poisoning: 1 - clinical effectiveness. *Clin Toxicol (Phila)* 47, 798–806.
- Fling, S. P. & Gregerson, D. S. (1986), Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155, 83–88.
- Gaines, T. B. (1969), Acute toxicity of pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* 14, 515–534.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In Walker, J. M. (Ed.) *The proteomics protocols handbook*, Totowa, NJ: Humana Press, 571–607.
- 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.
- Goldenzweig, A., Goldsmith, M., Hill, S. E., Gertman, O., Laurino, P., Ashani, Y., Dym, O., Unger, T., Albeck, S., Prilusky, J., Lieberman, R. L., Aharoni, A., Silman, I., Sussman, J. L., Tawfik, D. S. & Fleishman, S. J. (2016), Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability. *Mol Cell* 63, 337–346.
- Goldsmith, M., Aggarwal, N., Ashani, Y., Jubran, H., Greisen, P., Jr., Ovchinnikov, S., Leader, H., Baker, D., Sussman, J. L., Goldenzweig, A., Fleishman, S. J. & Tawfik, D. S. (2017), Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng Des Sel* 30, 333–345.
- Goldsmith, M., Ashani, Y., Simo, Y., Ben-David, M., Leader, H., Silman, I., Sussman, J. L. & Tawfik, D. S. (2012), Evolved stereoselective hydrolases for broad-spectrum G-type nerve agent detoxification. *Chem Biol* 19, 456–466.
- Goldsmith, M., Eckstein, S., Ashani, Y., Greisen, P., Jr., Leader, H., Sussman, J. L., Aggarwal, N., Ovchinnikov, S., Tawfik, D. S., 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.
- Gomaa, H. M. & Faust, S. D. (1972) Chemical hydrolysis and oxidation of parathion and paraoxon in aquatic environments. In Faust, S. D. (Ed.) *Fate of organic pesticides in the aquatic environment*, Washington, D.C.: American chemical society, 189–209.
- Gresham, C., Rosenbaum, C., Gaspari, R. J., Jackson, C. J. & Bird, S. B. (2010), Kinetics and efficacy of an organophosphorus hydrolase in a rodent model of methyl-parathion poisoning. *Acad Emerg Med* 17, 736–740.
- Gupta, R. C. (2020) Handbook of toxicology of chemical warfare agent, 3rd edn.

- Gupta, R. C. & Dettbarn, W. D. (1992), Potential of memantine, D-tubocurarine, and atropine in preventing acute toxic myopathy induced by organophosphate nerve agents: soman, sarin, tabun and VX. *Neurotoxicology* 13, 649–661.
- Hahn, F. (1986) *Waffen und Geheimwaffen des deutschen Heeres 1933 - 1945*. Koblenz: Bernard u. Graefe.
- Harvey, S. P., Kolakowski, J. E., Cheng, T.-C., Rastogi, V. K., Reiff, L. P., Defrank, J. J., Raushel, F. M. & Hill, C. (2005), Stereospecificity in the enzymatic hydrolysis of cyclo-sarin (GF). *Enzyme Microb Technol* 37, 547–555.
- Hertz-Picciotto, I., Sass, J. B., Engel, S., Bennett, D. H., Bradman, A., Eskenazi, B., Lanphear, B. & Whyatt, R. (2018), Organophosphate exposures during pregnancy and child neurodevelopment: *Recommendations for essential policy reforms*. *PLoS Med* 15, e1002671.
- Huff, R. A., Corcoran, J. J., Anderson, J. K. & Abou-Donia, M. B. (1994), Chlorpyrifos oxon binds directly to muscarinic receptors and inhibits cAMP accumulation in rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 269, 329–335.
- Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA) (2020) GESTIS-Stoffdatenbank [Online]. Verfügbar auf: www.dguv.de/ifa/stoffdatenbank (Zuletzt geprüft am 01.07.23).
- Jackson, C., Kim, H.-K., Carr, P. D., Liu, J.-W. & Ollis, D. L. (2005), The structure of an enzyme-product complex reveals the critical role of a terminal hydroxide nucleophile in the bacterial phosphotriesterase mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1752, 56–64.
- Jackson, C. J., Foo, J.-L., Kim, H.-K., Carr, P. D., Liu, J.-W., Salem, G. & Ollis, D. L. (2008), In crystallo capture of a Michaelis complex and product-binding modes of a bacterial phosphotriesterase. *J Mol Biol* 375, 1189–1196.
- Jackson, C. J., Foo, J.-L., Tokuriki, N., Afriat, L., Carr, P. D., Kim, H.-K., Schenk, G., Tawfik, D. S. & Ollis, D. L. (2009), Conformational sampling, catalysis, and evolution of the bacterial phosphotriesterase. *P Natl Acad Sci USA* 106, 21631–21636.
- Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991), Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J Appl Crystallogr* 24, 409–411.
- Jarasch, A., Kopp, M., Eggenstein, E., Richter, A., Gebauer, M. & Skerra, A. (2016), ANTICALIGN: *Visualizing, editing and analyzing combined nucleotide and amino acid sequence alignments for combinatorial protein engineering*. *Protein Eng Des Sel* 29, 263–270.
- Job, L., Köhler, A., Eichinger, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2023), Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop. *Biochemistry* 62, 942–955.
- 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.

- Kamataki, T., Lee Lin, M. C., Belcher, D. H. & Neal, R. A. (1976), Studies of the metabolism of parathion with an apparently homogeneous preparation of rabbit liver cytochrome P-450. *Drug Metab Dispos* 4, 180–189.
- Khersonsky, O., Lipsh, R., Avizemer, Z., Ashani, Y., Goldsmith, M., Leader, H., Dym, O., Rogotner, S., Trudeau, D. L., Prilusky, J., Amengual-Rigo, P., Guallar, V., Tawfik, D. S. & Fleishman, S. J. (2018), Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires. *Mol Cell* 72, 178-186.e5.
- Kim, J., Tsai, P.-C., Chen, S.-L., Himo, F., Almo, S. C. & Raushel, F. M. (2008), Structure of diethyl phosphate bound to the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* 47, 9497–9504.
- Kirby, S. D., Norris, J. R., Richard Smith, J., Bahnson, B. J. & Cerasoli, D. M. (2013), Human paraoxonase double mutants hydrolyze V and G class organophosphorus nerve agents. *Chem-Biol Interact* 203, 181–185.
- Koca, J., Zhan, C. G., Rittenhouse, R. C. & Ornstein, R. L. (2001), Mobility of the active site bound paraoxon and sarin in zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation. *J Am Chem Soc* 123, 817–826.
- 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.
- 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.
- Kolakowski, J. E., Defrank, J. J., Harvey, S. P., Szafraniec, L. L., Beaudry, W. T., Lai, K. & Wild, J. R. (1997), Enzymatic hydrolysis of the chemical warfare agent VX and its neurotoxic analogues by organophosphorus hydrolase. *Biocatalysis and Biotransformation* 15, 297–312.
- Kommission der Europäischen Gemeinschaft (Kommission der EG) (2001) Entscheidung der Kommission vom 9. Juli 2001 über die Nichtaufnahme von Parathion in Anhang I der Richtlinie 91/414/EWG des Rates und die Aufhebung der Zulassungen für Pflanzenschutzmittel mit diesem Wirkstoff (2001/520/EG).
- Kratz, F. (2008), Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release* 132, 171–183.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007), Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372, 774–797.
- Kuca, K., Jun, D., Cabal, J., Hrabínova, M., Bartosova, L. & Opletalova, V. (2006), Russian VX: inhibition and reactivation of acetylcholinesterase compared with VX agent. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98, 389–394.
- Leifson, E. & Hugh, R. (1954), A new type of polar monotrichous flagellation. *J Gen Microbiol* 10, 68–70.

- Lewis, V. E., Donarski, W. J., Wild, J. R. & Raushel, F. M. (1988), Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 27, 1591–1597.
- Luo, X.-J., Zhao, J., Li, C.-X., Bai, Y.-P., Reetz, M. T., Yu, H.-L. & Xu, J.-H. (2016), Combinatorial evolution of phosphotriesterase toward a robust malathion degrader by hierarchical iteration mutagenesis. *Biotechnol Bioeng* 113, 2350–2357.
- Masson, P. & Lockridge, O. (2010), Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys* 494, 107–120.
- Masson, P., Nachon, F., Broomfield, C. A., Lenz, D. E., Verdier, L., Schopfer, L. M. & Lockridge, O. (2008), A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chem-Biol Interact* 175, 273–280.
- Masson, P. & Rochu, D. (2009), Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae* 1, 68–79.
- Mastrota, N., Wentz, S. P. & Khan, F. (2010) Risks of malathion use to the federally threatened delta smelt (*Hypomesus transpacificus*) and California tiger salamander (*Ambystoma californiense*), Central California distinct population segment, and the federally endangered California tiger salamander, Santa Barbara County and Sonoma County distinct population segments: *Pesticide effects determinations*. PC Code: 057701. Verfügbar auf: <https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/2010/malathion/assessment2.pdf> (Zuletzt geprüft am 01.07.23).
- Matolcsy, G., Nádasy, M. & Andriská, V. (1988) Pesticide chemistry. Amsterdam: Elsevier 32.
- Maxwell, D. M., Brecht, K. M. & O'Neill, B. L. (1987), The effect of carboxylesterase inhibition on interspecies differences in soman toxicity. *Toxicol Lett* 39, 35–42.
- McDaniel, C. S., Harper, L. L. & Wild, J. R. (1988), Cloning and sequencing of a plasmid-borne gene (opd) encoding a phosphotriesterase. *J Bacteriol* 170, 2306–2311.
- Melzer, M., Chen, J. C.-H., Heidenreich, A., Gäb, J., Koller, M., Kehe, K. & Blum, M.-M. (2009), Reversed enantioselectivity of diisopropyl fluorophosphatase against organophosphorus nerve agents by rational design. *J Am Chem Soc* 131, 17226–17232.
- Mew, E. J., Padmanathan, P., Konradsen, F., Eddleston, M., Chang, S., Phillips, M. R. & Gunnell, D. (2017), The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *J Affect Disorders*, 93–104.
- Mioduszewski, R. J., Reutter, S. A., Miller, L. L., Olajos, E. J. & Thomson, S. A. (1998) Evaluation of airborne exposure limits for G-agents: Occupational and general population exposure criteria. *ERDEC-TR-489*.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J. & Kuca, K. (2015), Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem Toxicol* 38, 32–36.
- Mitić, N., Smith, S. J., Neves, A., Guddat, L. W., Gahan, L. R. & Schenk, G. (2006), The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. *Chem Rev* 106, 3338–3363.

- Morris, C. M., Savy, C., Judge, S. J. & Blain, P. G. (2014) Acute toxicity of organophosphorus compounds. In Balali-Mood, M. and Abdollahi, M. (Eds.) *Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds*, London: Springer London, 45–78.
- Mulbry, W. W. & Karns, J. S. (1989), Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *J Bacteriol* 171, 6740–6746.
- Munnecke, D. M. & Hsieh, D. P. (1974), Microbial decontamination of parathion and p-nitrophenol in aqueous media. *Appl Microbiol* 28, 212–217.
- Myers, D. K., Mendel, B., Gersmann, H. R. & Ketelaar, J. A. A. (1952), Oxidation of thiophosphate insecticides in the rat. *Nature* 170, 805–807.
- 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.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2020) PubChem [Online]. Verfügbar auf: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Zuletzt geprüft am 01.07.23).
- Novikov, B. N., Grimsley, J. K., Kern, R. J., Wild, J. R. & Wales, M. E. (2010), Improved pharmacokinetics and immunogenicity profile of organophosphorus hydrolase by chemical modification with polyethylene glycol. *J Control Release* 146, 318–325.
- Nowlan, C., Li, Y., Hermann, J. C., Evans, T., Carpenter, J., Ghanem, E., Shoichet, B. K. & Raushel, F. M. (2006), Resolution of chiral phosphate, phosphonate, and phosphinate esters by an enantioselective enzyme library. *J Am Chem Soc* 128, 15892–15902.
- Omburo, G. A., Kuo, J. M., Mullins, L. S. & Raushel, F. M. (1992), Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem* 267, 13278–13283.
- OPCW (2017) Report of the OPCW Fact-Finding Mission in Syria regarding an alleged incident in Khan Shaykhun, Syrian Arab Republic April 2017. *S/1510/2017*. Verfügbar auf: https://www.opcw.org/sites/default/files/documents/Fact_Finding_Mission/s-1510-2017_e_.pdf (Zuletzt geprüft am 23.06.23).
- Otto, T. C., Kasten, S. A., Kovaleva, E., Liu, Z., Buchman, G., Tolosa, M., Davis, D., Smith, J. R., Balcerzak, R., Lenz, D. E. & Cerasoli, D. M. (2010), Purification and characterization of functional human paraoxonase-1 expressed in *Trichoplusia ni* larvae. *Chem-Biol Interact* 187, 388–392.
- Paschal, D. C. & Neville, M. E. (1976), Chemical and microbial degradation of malaoxon in an Illinois soil. *J environ qual* 5, 441–443.
- Pesticide Action Network International (PAN) (2022) Consolidated list of banned pesticides: 6th Edition. Verfügbar auf: <http://pan-international.org/pan-international-consolidated-list-of-banned-pesticides/> (Zuletzt geprüft am 23.06.23).
- Rastogi, V. K., DeFrank, J. J., Cheng, T. C. & Wild, J. R. (1997), Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 294–296.
- Raveh, L., Segall, Y., Leader, H., Rothschild, N., Levanon, D., Henis, Y. & Ashani, Y. (1992), Protection against tabun toxicity in mice by prophylaxis with an enzyme hydrolyzing organophosphate esters. *Biochem Pharmacol* 44, 397–400.

- Reiter, G., Mikler, J., Hill, I., Weatherby, K., Thiermann, H. & Worek, F. (2011), Simultaneous quantification of VX and its toxic metabolite in blood and plasma samples and its application for in vivo and in vitro toxicological studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879, 2704–2713.
- 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.
- Renault, F., Carus, T., Cléry-Barraud, C., Elias, M., Chabrière, E., Masson, P. & Rochu, D. (2010), Integrative analytical approach by capillary electrophoresis and kinetics under high pressure optimized for deciphering intrinsic and extrinsic cofactors that modulate activity and stability of human paraoxonase (PON1). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878, 1346–1355.
- Reuters (2013) Pesticide found in meals that killed Indian children, official says. *The New York Times*. Verfügbar auf: <https://www.nytimes.com/2013/07/22/world/asia/pesticide-found-in-meals-that-killed-india-children-official-says.html> (Zuletzt geprüft am 01.07.23).
- Richter, F., Leaver-Fay, A., Khare, S. D., Bjelic, S. & Baker, D. (2011), De novo enzyme design using Rosetta3. *PLoS One* 6, e19230.
- Rigterink, R. H. (1966) Omicron-pyridyl phosphates and phosphorothioates. *US3244586A*.
- Roodveldt, C. & Tawfik, D. S. (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.
- Rowland, S. S., Speedie, M. K. & Pogell, B. M. (1991), Purification and characterization of a secreted recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microb* 57, 440–444.
- Schlapschy, M., Binder, U., Borger, 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.
- Schlehuber, S. & Skerra, A. (2002), Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant—a so-called ‘anticalin’—using a molecular random approach. *Biophys Chem* 96, 213–228.
- Schmaltz, F. (2006), Neurosciences and research on chemical weapons of mass destruction in Nazi Germany. *J Hist Neurosci* 15, 186–209.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (2007), The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2, 1528–1535.
- Schrader, D. R. G. (1950), Organische Phosphor-Verbindungen als neuartige Insektizide (Auszug). *Angew Chem* 62, 471–473.
- Schrader, G. (1945) Nr. 13 — Arbeiten aus der Tabun-, Sarin- und Somanreihe. *Dustbin FO 1031/239*, p. 7.

- Serdar, C. M. & Gibson, D. T. (1985), Enzymatic hydrolysis of organophosphates: Cloning and expression of a parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta*. *Nat Biotechnol* 3, 567–571.
- Serdar, C. M., Gibson, D. T., Munnecke, D. M. & Lancaster, J. H. (1982), Plasmid Involvement in Parathion Hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Appl Environ Microb* 44, 246–249.
- Serdar, C. M., Murdock, D. C. & Rohde, M. F. (1989), Parathion hydrolase gene from *Pseudomonas diminuta* MG: Subcloning, complete nucleotide sequence and expression of the mature portion of the enzyme in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 7, 1151–1155.
- Sethunathan, N. & Yoshida, T. (1973), A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol* 19, 873–875.
- Shacter, E. (2000), Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32, 307–326.
- Shimazu, M., Mulchandani, A. & Chen, W. (2001), Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and p-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnol Bioeng* 76, 318–324.
- Siddaramappa, R., Rajaram, K. P. & Sethunathan, N. (1973), Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Appl Microbiol* 26, 846–849.
- Sidell, F. R. (1974), Soman and sarin: clinical manifestations and treatment of accidental poisoning by organophosphates. *Clin Toxicol* 7, 1–17.
- Sidell, F. R. & Borak, J. (1992), Chemical warfare agents: II. nerve agents. *Ann Emerg Med*, 865–871.
- Sidell, F. R. & Groff, W. A. (1974), The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol Appl Pharmacol* 27, 241–252.
- Skerra, A. (1994), Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131–135.
- Skerra, A., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1991), The functional expression of antibody Fv fragments in *Escherichia coli*: improved vectors and a generally applicable purification technique. *Biotechnology (N Y)* 9, 273–278.
- Soliman, S. A., Farmer, J. & Curley, A. (1982), Is delayed neurotoxicity a property of all organophosphorus compounds? A study with a model compound: parathion. *Toxicology* 23, 267–279.
- Soltaninejad, K., Faryadi, M. & Sardari, F. (2007), Acute pesticide poisoning related deaths in Tehran during the period 2003-2004. *J Forensic Leg Med* 14, 352–354.
- Soltaninejad, K. & Shadnia, S. (2014) History of the use and epidemiology of organophosphorus poisoning. In Balali-Mood, M. and Abdollahi, M. (Eds.) *Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds*, London: Springer London, 25–43.
- Stevens, R. C., Suzuki, S. M., Cole, T. B., Park, S. S., Richter, R. J. & Furlong, C. E. (2008), Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia*

- VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: Intraosseous versus intravenous injection. *Toxicol Lett* 258, 198–206.
- Wille, T., Steinritz, D., Worek, F. & Thiermann, H. (2019), Vergiftungen durch chemische Kampfstoffe. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 62, 1370–1377.
- Wong, K.-Y. & Gao, J. (2007), The reaction mechanism of paraoxon hydrolysis by phosphotriesterase from combined QM/MM simulations. *Biochemistry* 46, 13352–13369.
- Worek, F., Seeger, T., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J. S., Tawfik, D., Thiermann, H. & Wille, T. (2014a), Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro. *Arch Toxicol* 88, 1257–1266.
- Worek, F., Seeger, T., Reiter, G., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J. L., Aggarwal, N., Thiermann, H. & Tawfik, D. S. (2014b), 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., Szinicz, L. & Eyer, P. (2004), Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem Pharmacol* 68, 2237–2248.
- Worek, F., Thiermann, H. & Wille, T. (2016), Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: A promising approach? *Toxicol Lett* 244, 143–148.
- Worek, F., Thiermann, H. & Wille, T. (2020), Organophosphorus compounds and oximes: a critical review. *Arch Toxicol* 94, 2275–2292.
- Young, R. A. & Watson, A. (2020) Organophosphate nerve agents. In Gupta, R. C. (Ed.) *Handbook of toxicology of chemical warfare agent*, 3rd edn, 97–126.
- Zhang, P., Liu, E. J., Tsao, C., Kasten, S. A., Boeri, M. V., Dao, T. L., DeBus, S. J., Cadieux, C. L., Baker, C. A., Otto, T. C., Cerasoli, D. M., Chen, Y., Jain, P., Sun, F., Li, W., Hung, H.-C., Yuan, Z., Ma, J., Bigley, A. N., Raushel, F. M. & Jiang, S. (2019), Nanoscavenger provides long-term prophylactic protection against nerve agents in rodents. *Sci Transl Med* 11.
- Zhang, X., Wu, R., Song, L., Lin, Y., Lin, M., Cao, Z., Wu, W. & Mo, Y. (2009), Molecular dynamics simulations of the detoxification of paraoxon catalyzed by phosphotriesterase. *J Comput Chem* 30, 2388–2401.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.-L. (2004), An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* 32, e115.

8 Anhang

8.1 Veröffentlichung 1

Autoren: Laura Job, Anja Köhler, Benjamin Escher, Franz Worek und Arne Skerra

Fachzeitschrift: Toxicology Letters, 321, 138-145

Verlag: Elsevier Ltd.

Publikationsdatum: 28. Dezember 2019 (online Version)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.030>



A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds

Author: Laura Job, Anja Köhler, Benjamin Escher, Franz Worek, Arne Skerra

Publication: Toxicology Letters

Publisher: Elsevier

Date: 15 March 2020

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)
| [For California Residents](#) | [Terms and Conditions](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customer-care@copyright.com

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Autoren Rechte des Verlags Elsevier Ltd. (s.o.) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet

A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds

Laura Job^a, Anja Köhler^{a,b}, Benjamin Escher^a, Franz Worek^b, Arne Skerra^{a,*}

^a Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany

^b Bundeswehr Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Neuherbergstr. 11, 80937 München, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

Bioscavenger
Enzyme engineering
Organophosphate hydrolase
Organophosphorus compound
Phosphotriesterase
Protein oxidation

ABSTRACT

Organophosphorus (OP)¹ nerve agents pose a severe toxicological threat, both after dissemination in military conflicts and by terrorists. Hydrolytic enzymes, which may be administered into the blood stream of victims by injection and can decompose the circulating nerve agent into non-toxic metabolites *in vivo*, could offer a treatment. Indeed, for the phosphotriesterase found in the bacterium *Brevundimonas diminuta* (BdPTE),² engineered versions with improved catalytic efficiencies have been described; yet, their biochemical stabilities are insufficient for therapeutic use. Here, we describe the application of rational protein design to develop novel mutants of BdPTE that are less susceptible to oxidative damage. In particular, the replacement of two unpaired cysteine residues by more inert amino acids led to higher stability while maintaining high catalytic activity towards a broad spectrum of substrates, including OP pesticides and V-type nerve agents. The mutant BdPTE enzymes were produced in *Escherichia coli*, purified to homogeneity, and their biochemical and enzymological properties were assessed. Several candidates both revealed enhanced thermal stability and were less susceptible to oxidative stress, as demonstrated by mass spectrometry. These mutants of BdPTE may show promise for the treatment of acute intoxications by nerve agents as well as OP pesticides.

1. Introduction

Organophosphorus compounds (OPs) are highly toxic substances that act as nerve agents and, therefore, pose a severe toxicological threat if misused in military conflicts or by terrorists. On the other hand, OPs are widely applied in agriculture as pesticides, and worldwide about 300,000 deaths per year are associated with corresponding intoxications (Gunnell and Eddleston, 2003; Bertolote et al., 2006). Most nerve agents are sulfur- or fluorine-substituted methylphosphonates with a chiral phosphorus center; usually the *S_P*-isomer constitutes the more toxic component. These substances can be divided into the V-type and G-type agents (Table 1).

OPs can enter the body via mucous membranes (e.g. in the lung) or through the skin and, after distribution in the blood, act on the central and peripheral nervous system by irreversibly (covalently) inhibiting acetylcholinesterase (AChE)³ in the synaptic cleft, thus provoking

cholinergic overflow. The resulting interference with neuro-transmission may ultimately lead to death by suffocation (upon acute exposure) or to severe long-term effects due to brain damage (Marrs, 2007). For decades, treatment of OP poisoning remained insufficient as the conventional combination of atropine (as muscarinic antagonist) and oximes (for reactivation of inhibited AChE) is not effective for all OP types and dosages (Worek and Thiermann, 2013).

A promising novel approach is the biocatalytic scavenging or inactivation of OPs, where an enzyme hydrolyzes the toxic agent already in the blood before it reaches its target (Worek et al., 2016). In this regard, biocatalysts are advantageous over stoichiometric bioscavengers, such as the soluble human butyrylcholinesterase, because they can be applied at low doses (Masson and Rochu, 2009). In nature, there are several enzyme candidates to be employed for catalytic OP scavenging, for example the mammalian paraoxonase (PON1), the organophosphate hydrolases from *Brevundimonas diminuta* (also called

* Corresponding author.

E-mail addresses: laura.job@tum.de (L. Job), Anja1Koehler@bundeswehr.org (A. Köhler), b.escher@tum.de (B. Escher), franzworek@bundeswehr.org (F. Worek), skerra@tum.de (A. Skerra).

¹ Organophosphorus Compound (OP).

² *Brevundimonas diminuta* phosphotriesterase (BdPTE).

³ Acetylcholinesterase (AChE).

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.12.030>

Received 22 September 2019; Received in revised form 23 December 2019; Accepted 25 December 2019

Available online 28 December 2019

0378-4274/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Chemical structures of typical nerve agents.

V-type agents		G-type agents	
	R	R'	R
VX	ethyl	isopropyl	GB (Sarin)
VR	isobutyl	ethyl	GD (Soman)
CVX	n-butyl	ethyl	GF (Cyclosarin)
			isopropyl
			pinacolyl
			cyclohexyl

phosphotriesterase, PTE, here dubbed BdPTE) and from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA) as well as organophosphorus acid anhydride (OpaA) from *Alteromonas* sp. (Masson and Rochu, 2009).

BdPTE is a particularly promising candidate because it hydrolyzes the pesticide substrate paraoxon already very fast ($k_{\text{cat}} \approx 2200 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_M \approx 4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Caldwell and Rauschel, 1991). However, one caveat is that in the case of nerve agents as substrates the wild-type enzyme prefers the R_P -isomer (Bigley et al., 2013). Unfortunately, the R_P -isomer usually constitutes the less toxic component in the racemic mixture (Benschop and De Jong, 2002). Furthermore, BdPTE has low catalytic efficiency towards VX ($k_{\text{cat}}/K_M \approx 0.004 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Rastogi et al., 1997).

Of note, to achieve effective *in vivo* detoxification with a practically useful therapeutic enzyme dose of $\leq 1 \text{ mg/kg}$ body weight, a catalytic efficiency of $> 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ is required (Worek et al., 2016). Therefore, considerable effort was made to engineer BdPTE for both higher enzymatic activity and the potential to hydrolyze a range of nerve agents with the relevant stereoselectivity (Bigley et al., 2013, 2015; Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016, 2017). So far, the most promising BdPTE variant with regard to S_P -VX is 10-2-C3, which shows a catalytic efficiency $k_{\text{cat}}/K_M = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ *in vitro* (Goldsmith et al., 2017). In fact, its predecessor mutant C23 was demonstrated to prevent systemic toxicity in VX-intoxicated guinea pigs if administered as a post-exposure therapy at low enzyme dose (Worek et al., 2014b).

However, the variant 10-2-C3 has one disadvantage because it contains two free Cys residues (like the wild-type enzyme, wt-BdPTE). The Cys side chain presents a terminal thiol (-SH) functional group with an electron-rich sulfur atom, whose d-orbitals allow for multiple oxidation states (Chung et al., 2013). Hence, under oxidative stress a diverse range of Cys post-translational modifications can be observed, with (non-physiological) disulfide bond formation constituting the prevalent initial thiol oxidation product. This reaction can progress via two general pathways, (i) the thiol–disulfide exchange or (ii) the condensation of a thiol with sulfenic acid (Gupta and Carroll, 2014). Susceptibility of the two Cys residues in the BdPTE variant 10-2-C3 to oxidation was observed in our laboratory during initial attempts to purify and characterize this protein.

Thus, in the present study several single and double mutants of the BdPTE variant 10-2-C3 were constructed, wherein each of the Cys residues at positions 59 and 227 was substituted by a more inert side chain, like Ala, Val, Leu, Ile and Met. The enzyme candidates were tested in an oxidation assay with subsequent mass spectrometric analysis, their catalytic efficiency against four typical nerve agents was tested and the thermal stability was investigated *via* circular dichroism (CD).⁴

⁴ Circular dichroism (CD).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Racemic OP substances VX, VR, GB and GF (> 98 % by GC–MS, ¹H NMR and ³¹P NMR) were made available by the German Ministry of Defense and were exclusively handled in specialized laboratories in the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology. Nerve agent stock solutions (1 % v/v) were prepared in acetonitrile and stored at ambient temperature.

2.2. Plasmid construction

The gene encoding the BdPTE variant 10-2-C3 was synthesized as a double-stranded DNA string with preferred *Escherichia coli* codon usage (Eurofins, Ebersberg, Germany) and inserted between the *KasI* and *HindIII* restriction sites of the expression plasmid pASK-IBA5(+) (IBA, Göttingen, Germany), which also encodes an N-terminal *Strep*-tag II (Schmidt and Skerra, 2007). Amino acid substitutions were introduced using the QuikChange site-directed mutagenesis method (Agilent, Santa Clara, CA, USA) with oligodeoxynucleotide pairs (Eurofins) carrying the appropriate codons.

2.3. Protein expression and purification

The recombinant proteins were produced in *E. coli* BL21 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) harboring the corresponding expression plasmid. Bacteria were cultivated in shake flasks containing 2 L LB medium (Sambrook and Russell, 2001) supplemented with 100 mg/L ampicillin. Recombinant gene expression was induced with 200 µg/L anhydrotetracycline (Skerra, 1994) at OD₅₅₀ ≈ 0.6 for up to 5 h at 30 °C. Bacterial cells were harvested by centrifugation, resuspended in affinity chromatography buffer (100 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.1 mM ZnSO₄ pH 8.0) and disrupted with a French Pressure cell (SLM Aminco, Urbana, IL, USA). The BdPTE mutants were purified from the bacterial cell extract by *Strep*-Tactin affinity chromatography (Schmidt and Skerra, 2007). Finally, size-exclusion chromatography (SEC) was performed on a 120 mL HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade column (GE Healthcare, Freiburg, Germany) using SEC running buffer (50 mM Tris–HCl, 100 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.01 mM ZnSO₄ pH 8.0). Protein concentrations were determined using an Ultrospec 2100 pro UV–vis spectrophotometer (GE Healthcare) with a calculated molar absorption coefficient of 44,460 M⁻¹ cm⁻¹ (Gasteiger et al., 2005). Protein purity was determined by SDS-PAGE using the buffer system of Fling and Gregerson (1986).

2.4. Enzyme activity determination

The hydrolytic detoxification of OPs by the BdPTE mutants was investigated with an AChE inhibition assay, using human erythrocyte ghosts as AChE source to hydrolyze acetylthiocholine. The resulting thiol group reacts with the chromogenic Ellman's reagent (Worek et al., 2014a). Assays with nerve agents were performed as previously described (Goldsmith et al., 2016) at the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology (Munich, Germany). Nerve agents and BdPTE mutants were appropriately diluted in TN buffer (50 mM Tris–HCl, 50 mM NaCl pH 8.0). Then, 100 µL BdPTE and 500 µL OP (VX: 4 µM; VR: 1 µM; GF: 1 µM; GB: 15 µM) solutions were mixed, followed by incubation at 37 °C for a varied period up to 120 min. An aliquot of this reaction solution from a defined time point was added, together with the acetylthiocholine substrate, to the AChE inhibition assay. For each sample per time point from the OP hydrolysis reaction, t_{OPH}, the time-dependent AChE activity curve was analyzed by non-linear regression using Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) to obtain the first-order rate constant k_{AChE(t_{OPH})} for the partially inhibited AChE (Eq. (1), Fig. 1A) (Aurbek et al., 2006). After that, the first-order OP degradation

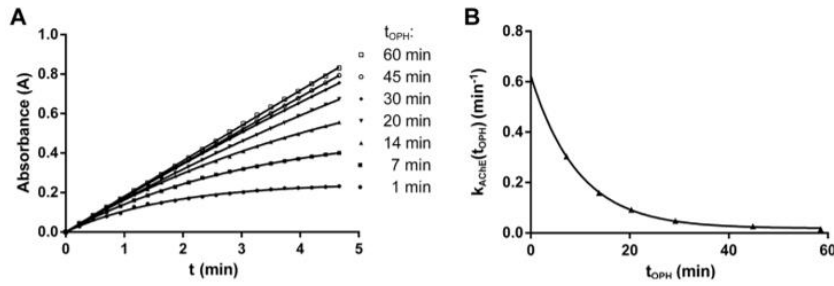


Fig. 1. Time-dependent detoxification of VX by the BdPTE mutant 10-2-C3(C59V/C227V). A) Substrate conversion catalyzed by AChE over time and the effect of its partial inhibition by VR after preceding incubation with the mutant BdPTE for varied periods (1 – 60 min). B) Plot of the apparent catalytic constant from each curve in (A) versus the period of VR pre-incubation with BdPTE to determine the first-order OP degradation constant, k_{OPH} .

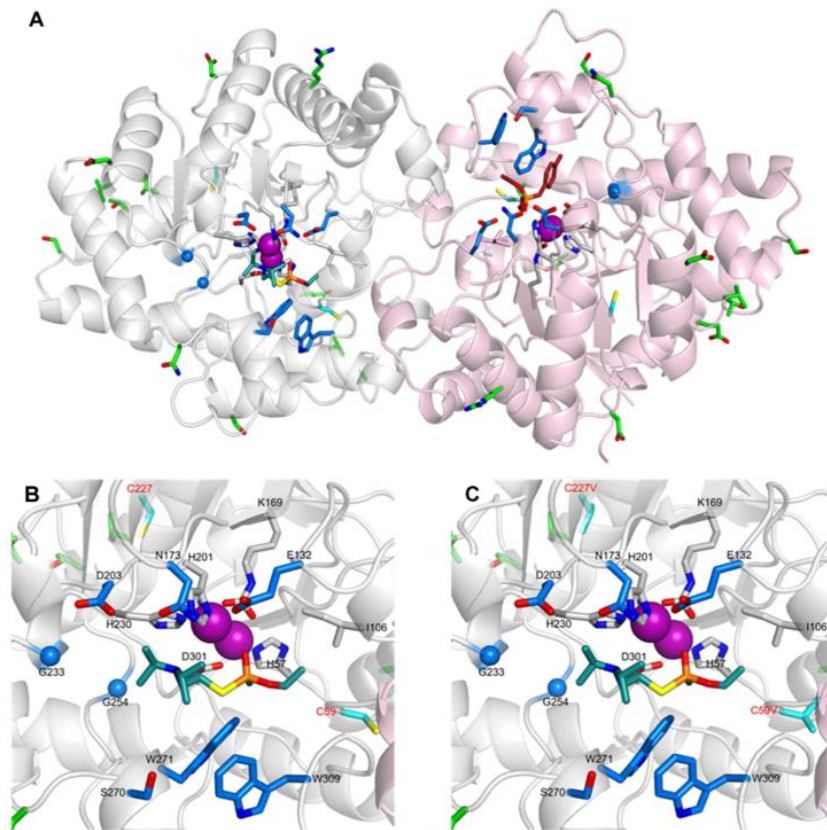


Fig. 2. Structural model of the homodimer of the BdPTE variant 10-2-C3 (based on PDB ID 1DPM) with VX placed at the active site of one subunit and diethyl 4-methylbenzylphosphonate at the other one (A). (B) Close-up view of the active site of 10-2-C3 and (C) of 10-2-C3(C59V/C227V) illustrating the mutated Cys residues. Active site mutations in 10-2-C3 compared to wt-BdPTE are colored blue while stabilizing mutations are colored green (according to Goldsmith et al., 2017). The Cys positions are highlighted cyan and the side chains complexing the pair of zinc ions (purple), including the carbamoylated Lys 169, are depicted in light gray.

constant, k_{OPH} , was determined from a curve fit of the $k_{AChE}(t_{OPH})$ values versus the initial incubation time of the OP with the BdPTE, t_{OPH} (Eq. (2), Fig. 1B). Finally, the catalytic efficiency, k_{cat}/K_M , was calculated using Eq. (3), wherein $[E]$ is the BdPTE concentration (Dawson et al., 2008):

$$A = A_{max}(1 - e^{-k_{AChE}(t_{OPH}) \cdot t}) \quad (1)$$

$$k_{AChE}(t_{OPH}) = B \cdot e^{-k_{OPH} \cdot t_{OPH}} + C \quad (2)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{OPH}}{[E]} \quad (3)$$

2.5. H_2O_2 oxidation assay

Forced oxidation of BdPTE mutants was performed at 37 °C in SEC buffer for about 19 h. 2 μ L H_2O_2 (100 mM) was added to 100 μ L of enzyme solution (8 μ M) based on the procedure described by Liu et al. (1998). A control experiment without addition of H_2O_2 was conducted in parallel. Afterwards, the mass spectra of the BdPTE samples were measured on a maXis mass spectrometer with electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). To measure the intact protein mass (under denaturing conditions), the protein samples were dialyzed against 10 mM ammonium acetate pH 6.6, followed by the addition of 50 % (v/v) methanol as well as 1 % (v/v) acetic acid and

application to the mass spectrometer via a syringe pump operated at 180 $\mu\text{L}/\text{h}$. The following conditions for the ion-transfer were used: 3600 V capillary voltage, 500 V endplate offset, 3.5 L/min dry gas at 200 °C temperature, 0.3 bar nebulizer pressure and 5 eV collision energy. Mass spectra were recorded in the positive ion mode and deconvoluted with the Bruker Compass Data Analysis Software using the MaxEnt algorithm (Ferrige et al., 1991).

2.6. Circular dichroism measurements

Protein secondary structure was analyzed using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Pfungstadt, Germany) equipped with a 1 mm path length quartz cuvette (106-QS; Hellma, Müllheim, Germany). For thermal unfolding, solutions of BdPTE mutants (2.5 μM) in 50 mM K_2SO_4 , 20 mM K-Pi, pH 7.5 were applied in the thermostated cuvette, which was sealed with a teflon lid. The sample was heated from 25 °C to 85 °C at a constant temperature gradient of 60 K/h. Data were collected each 0.1 K step at a wavelength of 210 nm, where maximal spectral change upon unfolding was observed. Data were fitted by non-linear least-squares regression using GraphPad Prism 6 and an equation for a two-state model of the unfolding transition as previously described (Schlehuber and Skerra, 2002). Using the parameters from the corresponding curve fit, the normalized unfolded fraction, $f(u)$, was plotted as a function of temperature, and ΔG° was extrapolated to 25 °C.

3. Results

3.1. Role of Cys residues in the BdPTE variant 10-2-C3

When we started with investigation of the mutated enzyme BdPTE 10-2-C3 (Goldsmith et al., 2017) it became evident that the two Cys residues present at positions 59 and 227 (Fig. 2A), originating from the wild-type enzyme, are susceptible to oxidation. Under denaturing conditions a second band appeared in the SDS-PAGE, which indicated that non-physiological intramolecular disulfide bonds between both thiol side chains had formed (Fig. 3A). Therefore, the susceptibility to oxidation of the BdPTE variant 10-2-C3 was studied under oxidative stress conditions with hydrogen peroxide. To this end, the enzyme was incubated over night with 2 mM H_2O_2 and the resulting oxidized protein was investigated by ESI mass spectrometry. Up to 8 oxidized species were prominently visible for the variant 10-2-C3 (Fig. 4A), such that only a small portion of the non-oxidized enzyme remained. The untreated sample revealed the non-oxidized form as main species, accompanied by two small peaks representing water adducts (Fig. 4A inset).

To investigate the role of the two unpaired Cys residues in this context, thirteen single and double mutants of the enzyme were designed, expressed in *Escherichia coli* and purified to homogeneity via *Strep*-Tactin affinity chromatography and SEC. Interestingly, when the single side chain exchanges C59M or C227M were introduced into the BdPTE 10-2-C3 variant, even more bands appeared in the SDS-PAGE (Fig. 3B and C). Presumably, intermolecular disulfide bonds between two subunits were then formed under the denaturing alkaline conditions. Also, total yields after purification were not satisfactory with 6.3 and 4.1 mg per 2 L culture for the C59M and the C227M mutant, respectively, compared to 10.9 mg for BdPTE 10-2-C3. Similar observations were made for the single mutants C227L, C227A and C227I, whose yields were between 0.9 and 5.1 mg per 2 L culture. Remarkably, the double mutant C59M/C227M (Fig. 2B) did not show any additional bands in SDS-PAGE (Fig. 3D), which provided first indication that such double Cys mutants of the enzyme are less susceptible to oxidation.

The mutant enzymes were further investigated with the hydrogen peroxide assay. When the BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) mutant was incubated over night with 2 mM H_2O_2 , only up to 5 oxidized species were visible in the ESI mass spectrum (Fig. 4B). Of note, the amino acid sequence of this protein reveals 5 Met residues, which also are prone to

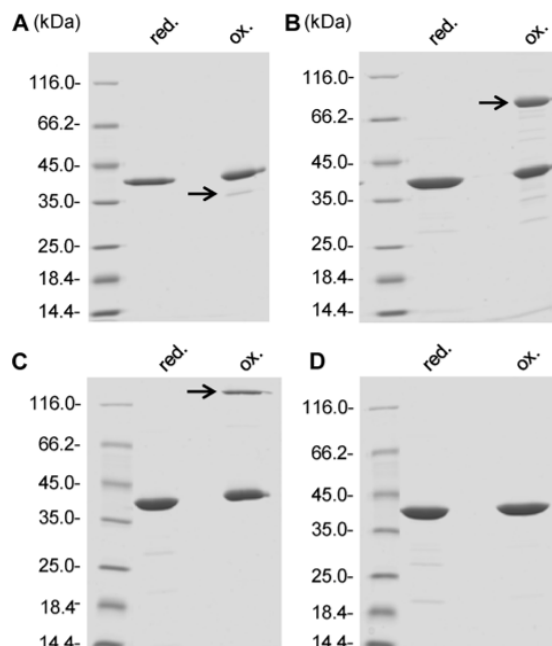


Fig. 3. 12 % SDS-PAGE of the BdPTE mutants 10-2-C3 (A), 10-2-C3(C227M) (B), 10-2-C3(C59M) (C) and 10-2-C3(C59M/C227M) (D) using reducing versus non-reducing sample buffer. Arrows show additional bands occurring as a result of intramolecular disulfide bond formation in the case of 10-2-C3 as well as intermolecular disulfide bonds in case of the single mutants C227M and C59M. The double Cys mutant did not reveal any disulfide species.

oxidation (Shacter, 2000). This notion is supported by the mutant 10-2-C3(C59V/C227V/M317L), which lacks one Met residue and, indeed, showed fewer peaks in this experiment (Fig. 4C).

3.2. Activities of the optimized BdPTE mutants

All Cys-deficient double mutants of BdPTE 10-2-C3 were tested for catalytic efficiency towards the nerve agents sarin (GB), cyclosarin (GF), VX and VR (Fig. 5, Table 2) using a coupled AChE inhibition assay (Worek et al., 2014a). Some of the mutants showed lowered catalytic activity compared to the parental enzyme variant 10-2-C3. For example, the mutant C59A/C227A had 70 % efficiency towards GB ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 11.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) and 40 % efficiency towards VR ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 0.205 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) as well as GF ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 0.215 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), whereas VX was only partially degraded. Other double Cys mutants had more selectively decreased efficiencies for GF, VX and VR (Table 2). The three best mutants in this assay were C59V/C227A, C59L/C227V and C59V/C227V, which exhibited efficiencies comparable with or even better than the parental enzyme variant towards all four nerve agents that were tested (Table 2).

In particular, the mutant 10-2-C3(C59V/C227V) showed moderately increased efficiency towards these nerve agents, with a 1.4 fold elevated hydrolytic activity towards VX ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 6.31 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$; Fig. 5, Table 2). Hence, even higher catalytic efficiency towards the measured nerve agents could be achieved for this mutant while the stability against oxidation was considerably improved.

3.3. Biochemical analysis of the Cys-free BdPTE mutants

Finally, the expression yield and thermal stability of the BdPTE 10-2-C3 mutants were compared. The parental engineered enzyme 10-2-C3 was obtained from a 2 L LB culture of *E. coli* with a total yield of about

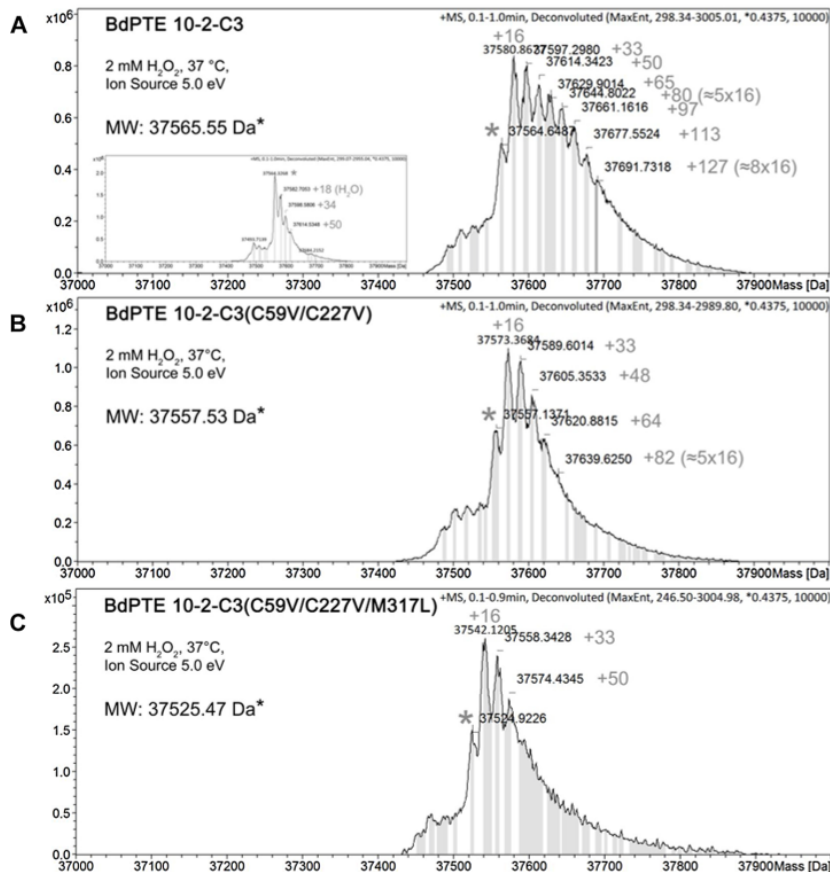


Fig. 4. ESI mass spectrum illustrating the oxidation profile of selected BdPTE 10-2-C3 mutants after incubation with 2 mM H₂O₂ over night: (A) 10-2-C3 (inset: negative control without H₂O₂), (B) 10-2-C3(C59V/C227V), (C) 10-2-C3(C59V/C227V/M317L). The number of oxygen atoms incorporated, approximated in multiples of 16 atomic units, can be deduced from the mass increase in comparison with the unmodified protein.

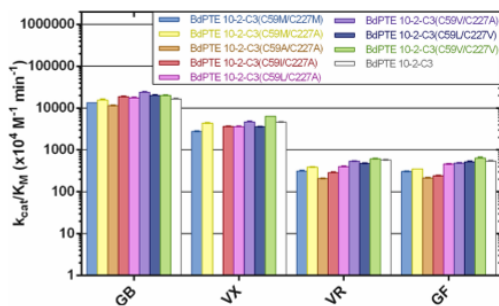


Fig. 5. Catalytic efficiency profile of the Cys-free mutants of BdPTE 10-2-C3 towards selected nerve agents.

11 mg purified protein. For all single Cys mutants the total yields were significantly lower, between 6.3 and 0.9 mg per 2 L culture. The best yields were obtained for the double mutants C59I/C227A, C59V/C227V and C59M/C227A, with 12, 13 and 14.5 mg per 2 L culture, respectively.

When investigating the thermal unfolding *via* CD measurement (Schlehuber and Skerra, 2002), most of the single Cys mutants showed decreased melting temperatures, T_m , from 59.8 to 64.3 °C, compared with the parental BdPTE variant 10-2-C3 (T_m = 63.6 °C; Fig. 6 and

Table 3); only the single mutant C59M revealed an increased thermal stability (T_m = 66 °C). In contrast, most of the double Cys mutants exhibited improved thermal stability, with C59V/C227A as the most thermostable mutant (T_m = 67.5 °C). The mutant with the overall highest catalytic efficiency, C59V/C227V, also showed elevated thermal stability, with T_m = 65.5 °C. Interestingly, the additional substitution M317L led to a further increase in thermostability to T_m = 69 °C. However, this did not correlate with the expression yield, as only 1.3 mg purified protein per 2 L culture were recovered in this case. Also, the catalytic efficiency of this mutant towards VX and VR was inferior.

As a proof of concept, the pair of mutations that resulted in the best enzyme properties, C59V/C227V, was introduced into another BdPTE variant, 10-2-C3(I106A) (Goldsmith et al., 2017), which had been engineered for improved catalytic efficiency predominantly with regard to VR. Again, this led to higher catalytic efficiency (by a factor 1.3–1.4) towards GB, VX and VR, and the expression yield of the mutant enzyme was also higher, with an increase from 9.1 to 14.3 mg per 2 L culture, while the catalytic efficiency towards GF remained nearly the same. Only the thermostability decreased slightly (T_m = 66.6 °C), considering that BdPTE 10-2-C3(I106A) represents the most stable version (T_m = 69.9 °C) apart from wt-BdPTE, which has a T_m = 71.6 °C (Table 3).

Taken together, the double mutant C59V/C227V unites all beneficial properties (Fig. 7) as it shows high total yield, elevated thermostability, the overall highest catalytic efficiency with regard to the

Table 2
Catalytic efficiencies of BdPTE mutants towards selected nerve agent substrates.

	10-2-C3 (C59A/C227A) k_{cat}/K_M ($\times 10^7$ M ⁻¹ min ⁻¹ \pm SD)	10-2-C3 (C59I/C227A)	10-2-C3 (C59V/C227A)	10-2-C3 (C59L/C227V)	10-2-C3 (C59V/C227V)	10-2-C3
GB	11.4 \pm 0.3	18.6 \pm 0.4	23.8 \pm 0.6	20.1 \pm 0.5	20.0 \pm 0.4	16.5 \pm 0.3
VX	—*	3.62 \pm 0.06	4.65 \pm 0.12	3.54 \pm 0.04	6.31 \pm 0.02	4.59 \pm 0.08
VR	0.205 \pm 0.004	0.284 \pm 0.008	0.537 \pm 0.003	0.471 \pm 0.004	0.606 \pm 0.005	0.567 \pm 0.008
GF	0.215 \pm 0.001	0.239 \pm 0.004	0.482 \pm 0.006	0.514 \pm 0.015	0.637 \pm 0.020	0.531 \pm 0.021

Values are given as mean \pm SD (N = 2); *incomplete degradation.

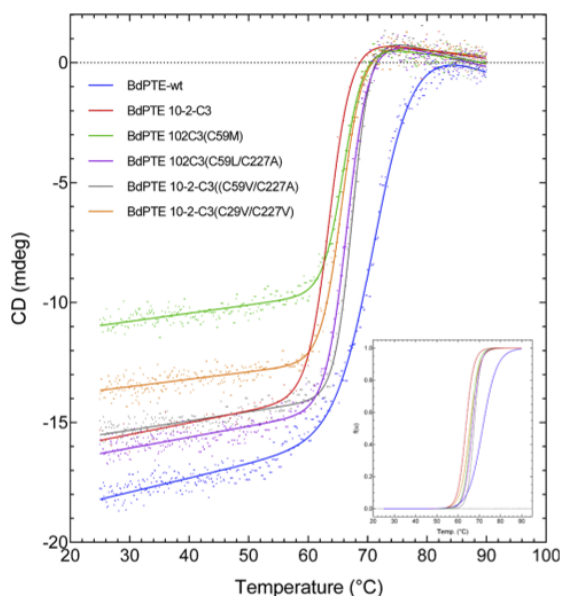


Fig. 6. Melting curves of the most stable mutants of BdPTE 10-2-C3 in comparison with the parental variant as well as wt-BdPTE measured by circular dichroism spectroscopy. The CD signal is plotted versus the temperature. The inset depicts normalized plots of the fraction unfolded $f(u)$ versus temperature (using the same coloring scheme).

Table 3
Melting temperatures and stability parameters of the most stable enzyme mutants deduced from the CD unfolding curves (mean; N = 3; cf. Fig. 6).

	T_m (°C)	ΔH_m (kJ/mol)	$\Delta G^{\circ}_{25^{\circ}\text{C}}$ (kJ/mol)
wt-BdPTE	71.6 \pm 0.3	296.4 \pm 28.5	40.0 \pm 4.0
BdPTE 10-2-C3	63.6 \pm 0.3	507.6 \pm 34.7	58.2 \pm 3.6
BdPTE 10-2-C3(C59M)	66.0 \pm 0.3	476.4 \pm 53.5	57.4 \pm 6.3
BdPTE 10-2-C3(C59L/C227A)	66.7 \pm 0.2	474.9 \pm 27.9	58.7 \pm 3.4
BdPTE 10-2-C3(C59V/C227A)	67.5 \pm 0.3	643.2 \pm 49.8	80.2 \pm 6.0
BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V)	65.5 \pm 0.3	461.1 \pm 43.4	54.6 \pm 5.4

nerve agents investigated here and, importantly, it is less susceptible to oxidation as demonstrated in the hydrogen peroxide assay.

4. Discussion

Preliminary work in our laboratory on the bacterial production and characterization of the published variant 10-2-C3 of BdPTE (Goldsmith et al., 2017) indicated that this enzyme is susceptible to oxidation due to the presence of two unpaired Cys residues in its primary structure at positions 59 and 227. Oxidative protein modification, which can occur during processing and storage, is a well known cause of variability in protein manufacturing and constitutes a general problem for

biopharmaceutical development (Shacter, 2000). Cys is the proteinogenic amino acid most susceptible to oxidation, because it carries a highly reactive thiol group (Araki et al., 2016). Consequently, the two free Cys residues were replaced by inert amino acids in the present study. However, as Cys 59 is in close proximity to the active site of the enzyme and Cys 227 is located in the second shell around it, substitution of both residues might alter the catalytic efficiency.

When testing in total thirteen single and double mutants, most of them showed decreased catalytic efficiency. Also, the C59M mutation, which was demonstrated to have improved catalytic efficiency towards VR in the published variant VI-A1 (Goldsmith et al., 2016) compared to the variant C23 (Cherny et al., 2013), did not show better catalytic efficiency in the context of the variant 10-2-C3 investigated here, as the activity towards VX was lowered by a factor \sim 2. Unexpectedly, with the C59V/C227V double mutation an increase in catalytic efficiency towards all tested nerve agents was observed. Whether this functional improvement is due to changes in the protein structure, or a consequence of the increased enzyme stability, is difficult to assess in the absence of a high resolution crystal structure of both the 10-2-C3 and 10-2-C3(C59V/C227V) mutants of BdPTE. The last crystal structure published for a BdPTE variant with improved catalytic activity towards V-type nerve agents is that of L7ep-3a (Bigley et al., 2015), which carries only 8 amino acid exchanges, compared to 10-2-C3 with its 20 mutations (Goldsmith et al., 2017).

Notably, the double mutant C59V/C227V of BdPTE 10-2-C3 developed here was one of the best in terms of expression yield and also showed by 2 °C higher thermostability (T_m). In particular, this mutant was less susceptible to oxidation in a hydrogen peroxide stress assay, where fewer modified protein species were identified by ESI-MS analysis than for the parental variant, in line with the initial goal of this study. When Met 317 was additionally mutated to Leu, even fewer oxidized species were observed, together with further increased thermostability. However, this mutation led to lower expression yield and diminished catalytic efficiency towards VX and VR.

To engineer a fully oxidation-resistant enzyme, ideally all Met residues (whose thioether groups are susceptible to oxidation) would have to be replaced in addition to the Cys residues. However, the Met side chains at positions 314 and 317 are in close proximity to the active site, such that their replacement may hamper catalytic efficiency, as it was observed here for the mutant C59L/C227A/M317L. The Met residues at positions 136 and 325 are not accessible at the protein surface; therefore, these buried amino acids are probably less reactive towards oxidants than Met 293, which is exposed to the solvent.

Goldsmith et al. (2017) postulated that their best engineered BdPTE variant 10-2-C3 may offer a drug candidate for the effective prophylaxis or post-exposure therapy of OP intoxication, due to its high catalytic efficiency towards a spectrum of nerve agents. Here, we further addressed potential problems with damage by oxidation, which should be beneficial not only during the biopharmaceutical manufacturing process, where undesired disulfide bonds and mixed disulfides (Hu, 1994; Shacter, 2000) are prevented, but also after administration to the blood stream, which constitutes a strongly oxidative environment. Therefore, our mutant BdPTE enzyme with two Cys substitutions (C59V/C227V) offers an improved version that is less susceptible to oxidation while maintaining high catalytic efficiency ($k_{cat}/K_M \approx 6.3 \times 10^7$ M⁻¹ min⁻¹

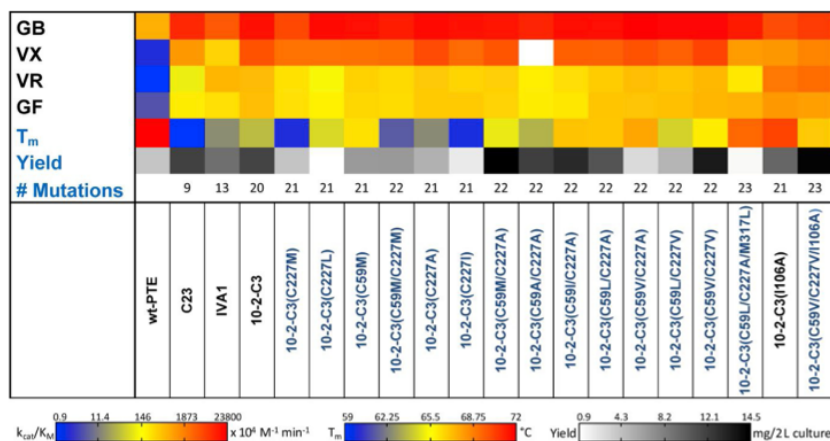


Fig. 7. Overview of enzyme properties for the BdPTE mutants from this study: catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) for the nerve agents GB, VX, VR and GF, melting temperature (T_m) measured via CD and expression yield from a 2 L *E. coli* culture in LB medium.

for VX), thus offering a catalytic bioscavenger with potential as a novel therapeutic agent to treat OP poisoning.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors wish to thank Stefan Achatz (Technische Universität München) for performing the mass spectrometry measurements and the Bundesamt für Ausrüstung, Informationstechnik und Nutzung der Bundeswehr (Germany) for financial support.

References

- Araki, K., Kusano, H., Sasaki, N., Tanaka, R., Hatta, T., Fukui, K., Natsume, T., 2016. Redox sensitivities of global cellular cysteine residues under reductive and oxidative stress. *J. Proteome Res.* 15, 2548–2559. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00087>.
- Aurbek, N., Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Worek, F., 2006. Analysis of inhibition, reactivation and aging kinetics of highly toxic organophosphorus compounds with human and pig acetylcholinesterase. *Toxicology* 224, 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.04.030>.
- Benschop, H.P., De Jong, L.P.A., 2002. Nerve agent stereoisomers: analysis, isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.* 21, 368–374. <https://doi.org/10.1021/ar00154a003>.
- Bertolote, J.M., Fleischmann, A., Eddleston, M., Gunnell, D., 2006. Deaths from pesticide poisoning: a global response. *Br. J. Psychiatry* 189, 201–203. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.105.020834>.
- Bigley, A.N., Mabanglo, M.F., Harvey, S.P., Raushel, F.M., 2015. Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VX. *Biochemistry* 54, 5502–5512. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00629>.
- Bigley, A.N., Xu, C., Henderson, T.J., Harvey, S.P., Raushel, F.M., 2013. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 10426–10432. <https://doi.org/10.1021/ja402832z>.
- Caldwell, S.R., Raushel, F.M., 1991. Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 31, 59–73. <https://doi.org/10.1007/BF02922126>.
- Cherny, I., Greisen Jr., P., Ashani, Y., Khare, S.D., Oberdorfer, G., Leader, H., Baker, D., Tawfik, D.S., 2013. Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem. Biol.* 8, 2394–2403. <https://doi.org/10.1021/cb4004892>.
- Chung, H.S., Wang, S.-B., Venkatraman, V., Murray, C.I., Van Eyk, J.E., 2013. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 112, 382–392. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268680>.

- Dawson, R.M., Pantelidis, S., Rose, H.R., Kotsonis, S.E., 2008. Degradation of nerve agents by an organophosphate-degrading agent (OpdA). *J. Hazard. Mater.* 157, 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.099>.
- Ferrige, A.G., Seddon, M.J., Jarvis, S., Skilling, J., Aplin, R., 1991. Maximum entropy deconvolution in electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5, 374–377. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290050810>.
- Fling, S.P., Gregerson, D.S., 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155, 83–88. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90228-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90228-9).
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S.e., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A., 2005. Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In: Walker, J.M. (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607.
- Goldsmith, M., Aggarwal, N., Ashani, Y., Jubran, H., Greisen Jr., P., Ovchinnikov, S., Leader, H., Baker, D., Sussman, J.L., Goldenzweig, A., Fleishman, S.J., Tawfik, D.S., 2017. Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng. Des. Sel.* 30, 333–345. <https://doi.org/10.1093/protein/gzx003>.
- Goldsmith, M., Eckstein, S., Ashani, Y., Greisen Jr., P., Leader, H., Sussman, J.L., Aggarwal, N., Ovchinnikov, S., Tawfik, D.S., 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. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1626-2>.
- Gunnell, D., Eddleston, M., 2003. Suicide by intentional ingestion of pesticides: a continuing tragedy in developing countries. *Int. J. Epidemiol.* 32, 902–909. <https://doi.org/10.1093/ije/dyg307>.
- Gupta, V., Carroll, K.S., 2014. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 847–875. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.05.040>.
- Hu, M.-L., 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 233, 380–385. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33044-1](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33044-1).
- Liu, J.L., Lu, K.V., Eris, T., Katta, V., Westcott, K.R., Narhi, L.O., Lu, H.S., 1998. In vitro methionine oxidation of recombinant human leptin. *Pharm. Res.* 15, 632–640. <https://doi.org/10.1023/a:1011998331254>.
- Marrs, T.C., 2007. Toxicology of organophosphate nerve agents. In: Marrs, T.C., Maynard, R.L., Sidell, F.R. (Eds.), *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. Wiley, Chichester, UK, pp. 191–221.
- Masson, P., Rochu, D., 2009. Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae* 1, 68–79.
- Rastogi, V.K., DeFrank, J.J., Cheng, T.C., Wild, J.R., 1997. Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 294–296. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7569>.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schlehuber, S., Skerra, A., 2002. Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called ‘anticalin’ – using a molecular random approach. *Biophys. Chem.* 96, 213–228. [https://doi.org/10.1016/s0301-4622\(02\)00026-1](https://doi.org/10.1016/s0301-4622(02)00026-1).
- Schmidt, T.G.M., Skerra, A., 2007. The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528–1535. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.209>.
- Shacter, E., 2000. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.* 32, 307–326. <https://doi.org/10.1081/DMR-100102336>.
- Skerra, A., 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151, 131–135. [https://doi.org/10.1016/0304-3864\(94\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0304-3864(94)90003-9).

- [1016/0378-1119\(94\)90643-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90643-2).
- Worek, F., Seeger, T., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J.S., Tawfik, D., Thiermann, H., Wille, T., 2014a. Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro. *Arch. Toxicol.* 88, 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1204-z>.
- Worek, F., Seeger, T., Reiter, G., Goldsmith, M., Ashani, Y., Leader, H., Sussman, J.L., Aggarwal, N., Thiermann, H., Tawfik, D.S., 2014b. Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: a proof-of-concept study. *Toxicol. Lett.* 231, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.09.003>.
- Worek, F., Thiermann, H., 2013. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol. Ther.* 139, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.009>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016. Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? *Toxicol. Lett.* 244, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.012>.

8.2 Veröffentlichung 2


Autoren: Laura Job, Anja Köhler, Andreas Eichinger, Mauricio Testanera, Benjamin Escher, Franz Worek und Arne Skerra

Fachzeitschrift: Biochemistry, 62, 942-955

Verlag: ACS Publications

Publikationsdatum: 08. Februar 2023 (online Version)

DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00666>



Structural and Functional Analysis of a Highly Active Designed Phosphotriesterase for the Detoxification of Organophosphate Nerve Agents Reveals an Unpredicted Conformation of the Active Site Loop

Author: Laura Job, Anja Köhler, Andreas Eichinger, et al

Publication: Biochemistry

Publisher: American Chemical Society

Date: Feb 1, 2023

Copyright © 2023, American Chemical Society

Quick Price Estimate

This service provides permission for reuse only. If you do not have a copy of the portion you are using, you may copy and paste the content and reuse according to the terms of your agreement. Please be advised that obtaining the content you license is a separate transaction not involving RightsLink.


Permission for this particular request is granted for print and electronic formats, and translations, at no charge. Figures and tables may be modified. Appropriate credit should be given. Please print this page for your records and provide a copy to your publisher. Requests for up to 4 figures require only this record. Five or more figures will generate a printout of additional terms and conditions. Appropriate credit should read: "Reprinted with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.

I would like to... ?	<input type="text" value="reuse in a Thesis/Dissertation"/>	Number of languages ?	<input type="text" value="1"/>
Requestor Type ?	<input type="text" value="Author (original work)"/>	Select your currency	<input type="text" value="EUR - €"/>
Portion ?	<input type="text" value="Full article"/>	Quick Price	Click Quick Price
Format ?	<input type="text" value="Print and Electronic"/>	<input type="button" value="QUICK PRICE"/> <input type="button" value="CONTINUE"/>	

To request permission for a type of use not listed, please contact the publisher directly.

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)

Structural and Functional Analysis of a Highly Active Designed Phosphotriesterase for the Detoxification of Organophosphate Nerve Agents Reveals an Unpredicted Conformation of the Active Site Loop

 **ACS Publications**
Most Trusted. Most Cited. Most Read.

Author: Laura Job, Anja Köhler, Andreas Eichinger, et al
Publication: Biochemistry
Publisher: American Chemical Society
Date: Feb 1, 2023

Copyright © 2023, American Chemical Society

PERMISSION/LICENSE IS GRANTED FOR YOUR ORDER AT NO CHARGE

This type of permission/license, instead of the standard Terms and Conditions, is sent to you because no fee is being charged for your order. Please note the following:

- Permission is granted for your request in both print and electronic formats, and translations.
- If figures and/or tables were requested, they may be adapted or used in part.
- Please print this page for your records and send a copy of it to your publisher/graduate school.
- Appropriate credit for the requested material should be given as follows: "Reprinted (adapted) with permission from {COMPLETE REFERENCE CITATION}. Copyright {YEAR} American Chemical Society." Insert appropriate information in place of the capitalized words.
- One-time permission is granted only for the use specified in your RightsLink request. No additional uses are granted (such as derivative works or other editions). For any uses, please submit a new request.

If credit is given to another source for the material you requested from RightsLink, permission must be obtained from that source.

[BACK](#) [CLOSE WINDOW](#)

© 2023 Copyright - All Rights Reserved | [Copyright Clearance Center, Inc.](#) | [Privacy statement](#) | [Data Security and Privacy](#)
| [For California Residents](#) | [Terms and Conditions](#) Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Der vollständige Originalartikel wurde unter den Bedingungen der Lizenz des Verlags ACS Publications (s.o.) in dieser Dissertation eingebunden und ist im Folgenden nachgedruckt.

„Reprinted with permission from Job, L., Köhler, A., Eichinger, A., Testanera, M., Escher, B., Worek, F. & Skerra, A. (2023) Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop. *Biochemistry* 62, 942–955. Copyright 2023 American Chemical Society.”

Structural and Functional Analysis of a Highly Active Designed Phosphotriesterase for the Detoxification of Organophosphate Nerve Agents Reveals an Unpredicted Conformation of the Active Site Loop

Laura Job, Anja Köhler, Andreas Eichinger, Mauricio Testanera, Benjamin Escher, Franz Worek, and Arne Skerra*



Cite This: *Biochemistry* 2023, 62, 942–955



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

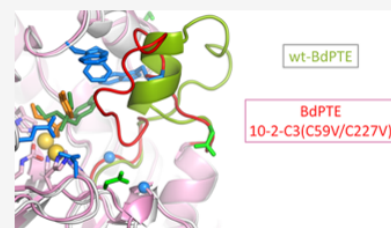


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Neurotoxic organophosphorus compounds (OPs) pose a severe threat if misused in military conflicts or by terrorists. Administration of a hydrolytic enzyme that can decompose the circulating nerve agent into non-toxic metabolites in vivo offers a potential treatment. A promising candidate is the homo-dimeric phosphotriesterase originating from the bacterium *Brevundimonas diminuta* (BdPTE), which has been subject to several rational and combinatorial protein design studies. A series of engineered versions with much improved catalytic efficiencies toward medically relevant nerve agents was described, carrying up to 22 mutations per enzyme subunit. To provide a basis for further rational design, we have determined the crystal structure of the highly active variant 10-2-C3(C59V/C227V)—stabilized against oxidation by substitution of two unpaired Cys residues—in complex with a substrate analogue at 1.5 Å resolution. Unexpectedly, the long loop segment (residues 253–276) that covers the active site shows a totally new conformation, with drastic structural deviations up to 19 Å, which was neither predicted in any of the preceding protein design studies nor seen in previous crystallographic analyses of less far evolved enzyme versions. Inspired by this structural insight, additional amino acid exchanges were introduced and their effects on protein stability as well as on the catalytic efficiency toward several neurotoxic OPs were investigated. Somewhat surprisingly, our results suggest that the presently available engineered version of BdPTE, in spite of its design on the basis of partly false structural assumptions, constitutes a fairly optimized enzyme for the detoxification of relevant OP nerve agents.



INTRODUCTION

The organophosphate (OP) hydrolase from *Brevundimonas diminuta* (also known as phosphotriesterase, PTE, therefore dubbed BdPTE; UniProtKB P0A434) catalyzes the detoxification of several chemical warfare agents, such as VX, VR, sarin (GB), and cyclosarin (GF) (Scheme 1), as well as some OP pesticides, by way of hydrolysis. While wild-type (wt) BdPTE hydrolyzes the pesticide paraoxon (Scheme 1) very fast, with a catalytic efficiency of $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 2.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, only low catalytic activity toward the nerve agent VX ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} \approx 4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) has been observed.² Furthermore, wt-BdPTE prefers the R_p isomer of nerve agents as substrates,³ which represent the less toxic component for humans in the racemic mixture.⁴ On the other hand, for the effective enzymatic in vivo detoxification with an acceptable therapeutic dose ($\leq 1 \text{ mg/kg}$ body weight), a catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) $> 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ is required.⁵

Several laboratories have invested considerable effort into the engineering of BdPTE for higher enzymatic activity and stability as well as the potential to hydrolyze a broader range of nerve agents with relevant stereoselectivity. Raushel and colleagues constructed various mutant libraries using different

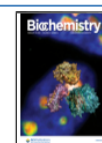
approaches, like double-substitution libraries, targeted error-prone libraries, and site-directed mutagenesis.^{3,6,7} With regard to the hydrolysis of S_p-VX, they identified some promising candidates (Scheme 2), for example the variants VRN-VQFL and L7ep-3a, with $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (for racemic VX) of 4.2×10^6 and $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively.³ L7ep-3a, which carries eight mutations, was crystallized to elucidate its three-dimensional structure, but only minor deviations of the enzyme backbone structure (including loop 7; see below) from wt-BdPTE were observed.⁷

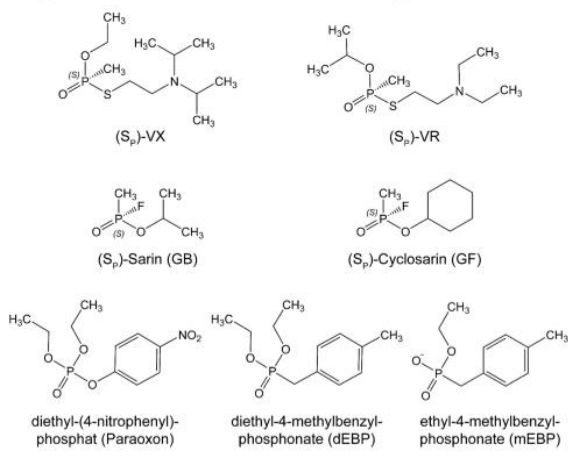
In another endeavor, Tawfik and colleagues performed altogether 13 rounds of library screening with BdPTE using different strategies such as site-specific substitution, gene shuffling of selected variants, and whole-gene random mutagenesis, in part aided by computational design.^{8–10} This

Received: November 28, 2022

Revised: January 19, 2023

Published: February 8, 2023



Scheme 1. Chemical Formulas of OP Nerve Agents and Enzyme Inhibitors Relevant in This Study

effort culminated in one particularly promising variant, 10-2-C3, which carries 19 mutations per subunit (comprising 347 residues in total) compared with wt-BdPTE (Scheme 2) and exhibits high catalytic efficiency of $k_{\text{cat}}/K_M = 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for the hydrolysis of S_P -VX.¹⁰ Crystal structures of two BdPTE variants from earlier stages of this series of mutagenesis campaigns, C23 and A53,⁸ with 9 and 10 amino acid exchanges, respectively, were elucidated (unpublished, PDB

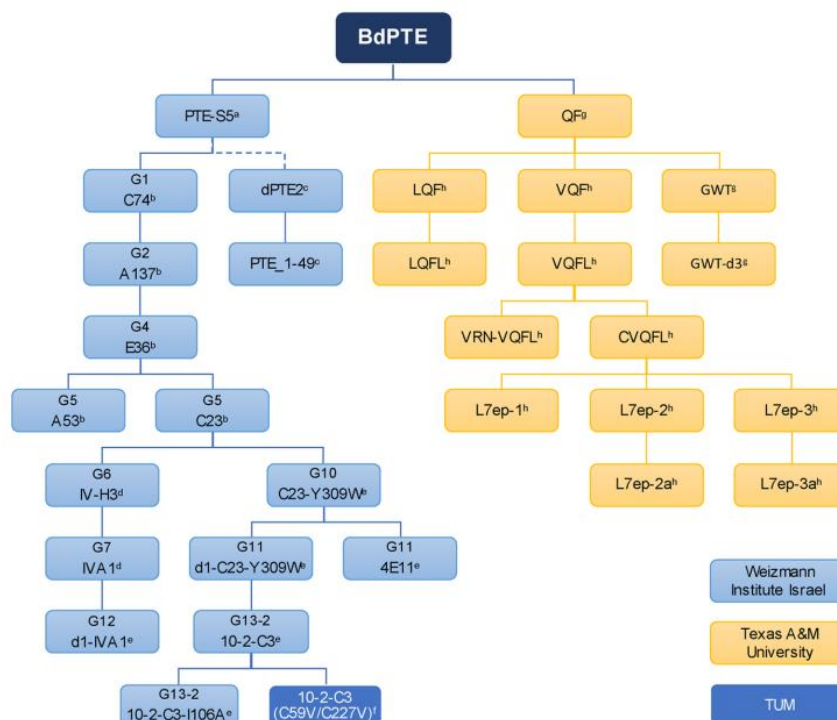
IDs: 6FU6, 6FEI). Again, these studies revealed only minor changes of the enzyme backbone structure, whereas structural data for the most advanced BdPTE variant 10-2-C3 are missing to date.

In a previous study, we have stabilized BdPTE 10-2-C3 against oxidative stress by substituting the two free Cys residues per subunit by inert aliphatic side chains. The resulting mutant, 10-2-C3(C59V/C227V), showed unimpaired catalytic efficiency of $6.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ against racemic VX but improved thermal stability ($T_m = 65.5 \text{ }^\circ\text{C}$).¹³ Moreover, we found that this mutant exhibits high hydrolytic activities toward several other nerve agents, including GD,¹⁴ and a PASylated version of this BdPTE variant with an extended plasma half-life showed promising results in vivo in a rat treatment study after VX poisoning.¹⁵ To better understand the role of some enzyme active site residues for the phosphorothioester bond cleavage in VX and related OP substrates, we set out to examine the crystal structure of this mutant BdPTE and, based on this information, we constructed 30 new mutants and analyzed their hydrolytic activities toward a representative set of four nerve agents: VX, VR, GB, and GF (Scheme 1).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Racemic OP substances VX, VR, GB, and GF (>98% by GC-MS, ¹H NMR, and ³¹P NMR) were made available by the German Ministry of Defense and were exclusively handled in specialized laboratories at the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology in

Scheme 2. Pedigree of BdPTE Variants with Improved Hydrolytic Activity toward OP Substrates. The Different Generations of Directed Enzyme Evolution Performed at the Weizmann Institute Are Designated G(N). For References, see a,¹¹ b,⁸ c,¹² d,⁹ e,¹⁰ f,¹³ g,⁶ and h³



line with the regulations of the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPWC). Nerve agent stock solutions (1% v/v) were prepared in acetonitrile and stored at ambient temperature.

Plasmid Construction. The structural gene encoding BdPTE 10-2-C3 was synthesized as a double-stranded DNA string with preferred *Escherichia coli* codon usage (Eurofins, Ebersberg, Germany) and inserted between the *KasI* and *HindIII* restriction sites of the vector pASK-IBAS(+) (IBA, Göttingen, Germany), which encodes an N-terminal *Strep*-tag II.¹⁶ Subsequently, amino acid substitutions were introduced into this gene using the QuikChange site-directed mutagenesis method (Agilent, Santa Clara, California) with oligodeoxynucleotide primer pairs (Eurofins) carrying the appropriate mutated codons. Although not explicitly listed in the set of amino acid mutations described for BdPTE 10-2-C3,¹⁰ the “unselected” substitution P342S was present in the preceding version C23 as well as related mutants^{8,9} and, thus, also chosen for our structural study. For expression of the mutant BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) with an N-terminal His₆-tag, its coding region¹³ was subcloned via *KasI* and *HindIII* on the vector pASK-IBA35(+) (IBA), which encodes an N-terminal His₆-tag instead of the *Strep*-tag II.

Protein Expression and Purification. All recombinant proteins were produced in *E. coli* BL21 (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) harboring the corresponding expression plasmid. Bacteria were cultivated in shake flasks containing 2 L LB medium¹⁷ supplemented with 0.2 mM ZnSO₄ and 100 mg/L ampicillin. Recombinant gene expression was induced with 200 μg/L anhydrotetracycline¹⁸ at OD₅₅₀ ≈ 0.6 for up to 5 h at 30 °C. Bacteria were harvested by centrifugation, resuspended in affinity chromatography buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.1 mM ZnSO₄), and disrupted with a French pressure cell (SLM Aminco, Urbana, Illinois). Purification from the bacterial cell extract was achieved by *Strep*-Tactin affinity chromatography,¹⁶ followed by size exclusion chromatography (SEC) on a 120 mL HiLoad Superdex 200 16/60 prep grade column (GE Healthcare, Freiburg, Germany) using SEC running buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 0.01 mM ZnSO₄). Protein concentrations were determined by measuring the absorbance at 280 nm using an Ultrospec 2100 pro UV-vis spectrophotometer (GE Healthcare) with a calculated molar absorption coefficient of 44,460 M⁻¹ cm⁻¹ for all mutants, except for the ones carrying an additional Tyr or Trp side chain, for which a calculated molar absorption coefficient of 45,950 or 49,960 M⁻¹ cm⁻¹, respectively, was applied.¹⁹ Protein purity was determined by SDS-PAGE.²⁰

For protein crystallization, BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) carrying an N-terminal His₆-tag was produced in *E. coli* as described above, and the cell extract was applied to a 5 mL bed volume HisTrap HP column (GE Healthcare) charged with Zn^{II} using IMAC buffer (40 mM NaH₂PO₄ pH 7.5, 300 mM NaCl) supplemented with 5 mM imidazole/HCl. The bound enzyme was eluted in a linear concentration gradient of 5–500 mM imidazole/HCl in IMAC buffer. Finally, SEC was performed on a 340 mL HiLoad Superdex 200 26/60 prep grade column (GE Healthcare) in the presence of 10 mM Tris/HCl pH 8.3, 0.1 mM ZnSO₄ (here with a higher Zn^{II} concentration for the purpose of protein crystallization). The purified protein was concentrated to a final concentration of 10 mg/mL using a 10 kDa cutoff Amicon Ultra-15 Centrifugal

Filter Unit (Merck, Darmstadt, Germany). Then, the protein solution was mixed at a 1:100 ratio with diethyl-(4-methylbenzyl)phosphonate (dEBP, 99% liquid; Merck; Scheme 1), to achieve a 18 mM final concentration, and subjected to crystallization trials (see below). After 30 min incubation with slight mixing, undissolved dEBP was removed by filtration through a 0.45 μm spin filter (PVDF, Merck).

Enzyme Activity Determination. The detoxification of OPs by BdPTE variants was investigated using an acetylcholinesterase (AChE) inhibition assay with human erythrocyte ghosts.²¹ Nerve agents and BdPTE variants carrying the *Strep*-tag II were appropriately diluted in TN buffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl). 100 μL of a suitably diluted BdPTE solution (purified via SEC as described above) was mixed with 500 μL OP solution (4 μM VX, 1 μM VR, 1 μM GF or 15 μM GB) and incubated at 37 °C for a varying period prior to application to the AChE inhibition assay. Assays and data analysis were performed at the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology as previously described.¹³ See the Supporting Information (SI) for a detailed method description.

Circular Dichroism Measurements. The protein secondary structure was analyzed using a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Pfungstadt, Germany) equipped with a 1 mm path length quartz cuvette (106-QS; Hellma, Müllheim, Germany). For thermal unfolding, solutions of BdPTE mutants (2.5 μM) in 50 mM K₂SO₄, 20 mM KP_i pH 7.5, were applied in the thermostated cuvette, which was sealed with a teflon lid. The sample was heated at a constant temperature gradient of 60 K/h from 25 to 85 °C. Data were collected each 0.1 K step at a wavelength of 210 nm, where maximal spectral change upon unfolding was observed.¹³ Data were fitted by non-linear least-squares regression using Prism 6 software (GraphPad, San Diego, California) and a published equation for a two-state model of the unfolding transition.²² Using the parameters from the corresponding curve fit, the normalized unfolded fraction, $f(u)$, was plotted as a function of temperature, and ΔG° was extrapolated to 25 °C.

Protein Crystallization, Data Collection, and Structure Determination. BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V)¹³ in complex with dEBP was crystallized using the sitting drop vapor diffusion technique with an in-house precipitant screen comprising 480 different conditions. Due to frequent amorphous precipitation events in the initial crystallization trials, the protein/inhibitor solution was further diluted 1:1 with 10 mM Tris/HCl pH 8.3, 0.1 mM ZnSO₄. After 4 months at 20 °C, crystals were obtained with 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 25% (v/v) glycerol as precipitant in drops made from 1 μL protein/inhibitor solution and 0.5 μL precipitant solution. The crystals were harvested and immediately frozen in liquid nitrogen without additional cryoprotection.

Single-wavelength synchrotron X-ray diffraction data at 100 K were collected at beam line BL14.2 of the BESSY II electron storage ring operated by the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany (Table 1).²⁷ The diffraction data were processed with MOSFLM and SCALA.²⁸ Molecular replacement was carried out with Phaser (CCP4)²⁸ using the crystal structure of wt-BdPTE (PDB ID: 1PSC)²⁹ as search model. The structural model of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) was manually adjusted with Coot, including placement of mono-ethyl-(4-methylbenzyl)phosphonate (mEBP) in the active site.³⁰ Water molecules were added with ARP/wARP,³¹ and the protein model was refined with Refmac5³² in iterative cycles, including

Table 1. Crystallographic Analysis and Refinement Statistics

	BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V)•mEBP
<i>Crystal data</i>	
space group	P4 ₃ 2 ₁ 2
unit cell dimensions <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> [Å]; $\alpha = \beta = \gamma$ [°]	69.3, 69.3, 186.9; 90.0
molecules per asymmetric unit	1 subunit/1 ligand
<i>Data collection</i>	
wavelength [Å]	0.91840
resolution range [Å] ^a	49.00–1.47 (1.55–1.47)
<i>I</i> / σ [<i>I</i>] ^a	1.8 (0.8)
<i>R</i> _{merge} [%] ^b	19.6 (96.4)
unique reflections	78,996
multiplicity ^a	22.5 (23.3)
completeness ^a	100.0 (100.0)
<i>Refinement</i>	
<i>R</i> _{cryst} / <i>R</i> _{free} ^b	15.7/17.4
CC _{1/2}	0.998
protein atoms	2617
ligand atoms	14
water atoms	251
average <i>B</i> -factor [Å ²]:	
protein	18.3
ligand	12.8
water	26.5
<i>Geometry</i>	
r.m.s.d. bond lengths, angles [Å, °]	0.013, 1.812
Ramachandran analysis ^c : core, allowed, generously allowed, disallowed [%]	88.3, 10.3, 0.7, 0.7

^aValues in parentheses are for the highest-resolution shell. ^b*R*_{merge}, *R*_{cryst} and *R*_{free} according to refs 23, 24, and 25, respectively. ^cCalculated with PROCHECK.²⁶

model correction with the PDB_REDO server.³³ The final structural model was validated with PROVE,³⁴ ERRAT,³⁵ Verify3D,³⁶ PROCHECK,²⁶ and WHAT_CHECK³⁷ and by using the MolProbity server.³⁸ Secondary structure elements were assigned using DSSP.³⁹ Crystal contact sites were analyzed with PISA,⁴⁰ and graphics were prepared with PyMOL (Schrödinger, New York, New York).

Computational Docking and Modeling. The chemical structure of the substrate VX was energy-minimized with ChemDraw Professional 16.0 (PerkinElmer, Waltham, MA) and then computationally docked to the three-dimensional structures of wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM) and of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) from the present study using the AutoDock Vina Plugin⁴¹ for PyMOL. The grid center was placed around dEBP/mEBP as selection (parameters: Spacing 0.375, X-/Y-/Z-points 60). The protein coordinate file was prepared by deleting all atoms related to water, Zn^{II}, and dEBP/mEBP, and the docking was performed with no flexible side chains. Protein modeling on the basis of the amino acid sequence of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) was performed in an automated manner with the AlphaFold v2.0 system⁴² running on a local desktop computer (Max template date: July 20, 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

Structural Analysis of the Engineered BdPTE. The BdPTE variant 10-2-C3(C59V/C227V) shows the highest catalytic efficiency for the hydrolysis of VX described so far.^{10,13} To better understand its improved substrate recognition compared with wt-BdPTE, as well as with its

earlier engineered versions, knowledge of the precise protein structure is essential. Therefore, the mutated enzyme was crystallized in complex with the paraoxon transition state analog diethyl-4-methylbenzylphosphonate (dEBP; Scheme 1). Crystals with high diffraction quality were grown in the presence of 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 25% (v/v) glycerol, and a synchrotron X-ray data set was collected at 1.5 Å resolution (Figure 1, Table 1). Crystals belonged to the space group

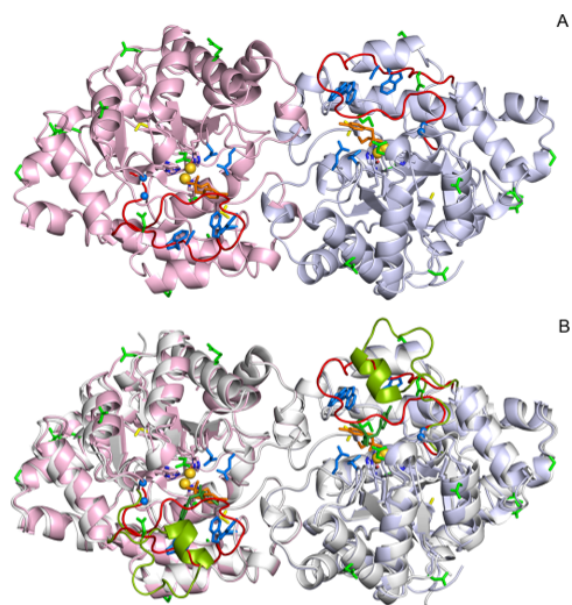


Figure 1. Three-dimensional structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V). (A) The dimer with subunits shown in light pink and light blue. (B) Superposition with the wt-BdPTE structure (PDB ID: 1DPM) shown in light gray. Mutated residues are depicted as sticks (Gly residues as spheres). Of those, mutated residues in the active site are colored marine, mutated residues for protein stabilization are colored green, and the mutated Cys residues (Val59 and Val227) are colored yellow. Zn^{II} ions are depicted as spheres (gold), and loop 7 is colored red in the BdPTE mutant 10-2-C3(C59V/C227V) and green in the wt-BdPTE structure. mEBP is colored orange and dEBP is colored darker green.

P4₃2₁2 with one enzyme subunit in the asymmetric unit such that the homodimer emerged by applying the twofold crystallographic symmetry. Interestingly, the active site appeared to contain a partially hydrolyzed monoethyl derivative of the substrate analog, mEBP (see Scheme 1).

Overall, the crystal structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) is highly similar to the one of wt-BdPTE (Figure 1B), which was previously crystallized in a different space group, C2, with the entire homodimer in the asymmetric unit (PDB ID: 1DPM).⁴³ In this case, the precipitant solution contained 13% (w/v) poly(ethylene glycol) 8000, 100 mM CHES pH 9.0, 5 mM NaN₃, and 1% (v/v) dEBP, which was also seen bound in that crystal structure. The superposition of both protein homodimers (*C* α positions of residues 35–363; see Figure 2) led to a root mean square deviation (RMSD) of 2.47 Å. With essentially all secondary structures conserved (Figure 1), this is a relatively high overall deviation, even when considering the total 22 amino acid exchanges per subunit that

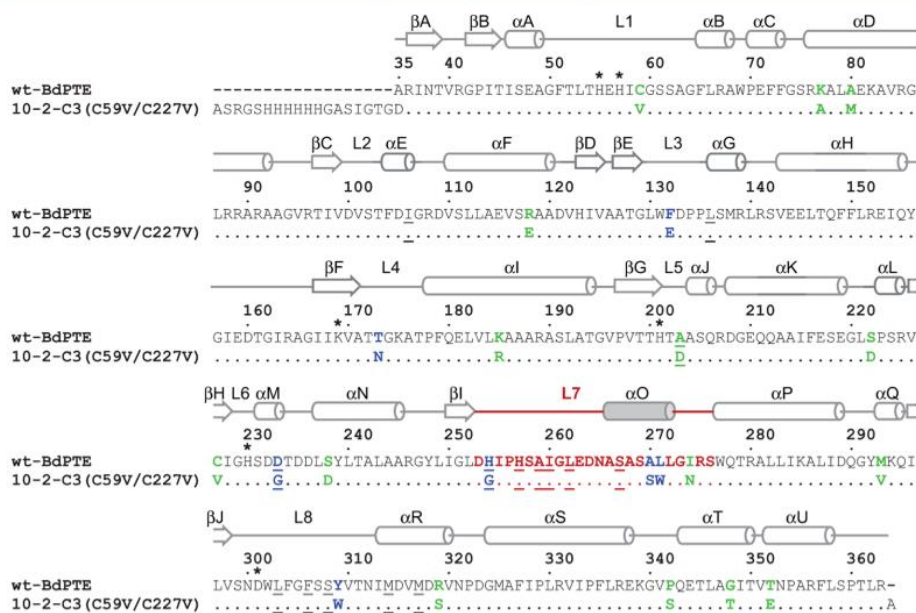


Figure 2. Amino acid sequence alignment of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) with the wild-type enzyme. Mutated positions are shown in blue for active site residues and in green for stabilizing residues. Loop 7 is highlighted in red; residues investigated by mutagenesis in the present study are underlined. The secondary structure elements are based on the crystal structure of wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM). α -Helix O is not present in the crystal structure of the mutant 10-2-C3(C59V/C227V) due to the strongly altered conformation of loop 7 and shown in gray; otherwise, secondary structures are conserved. Zn^{II}-coordinating residues are marked with asterisks.

had accumulated during the successive engineering of the enzyme.^{10,13} However, more detailed analysis revealed a strong deviation in the conformation of the surface-exposed loop 7, comprising residues 253–276, earlier defined as 257–275 in wt-BdPTE.⁴⁴ This loop connects β -strand I and α -helix P (Figure 2) and covers the active site with the bound substrate analog (Figures 3B,C and 4B,C). Indeed, superposition of both enzyme homodimers excluding loop 7 (i.e., $C\alpha$ positions Asp35–Leu252 and Trp277–Arg363) resulted in a considerably lower RMSD of 0.82 Å. This demonstrates that, despite of the numerous mutations, the general protein fold of BdPTE remained highly conserved in the variant 10-2-C3(C59V/C227V). Therefore, all following analyses are based on the same superposition of the core region.

Upon closer inspection, the long loop 7 reveals a series of changes in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) compared with the structure of the wild-type enzyme (Figure 3B,C). The polypeptide segment from His257 to Gly273 is stretched out in length and tilted toward the active site. Starting at residue Ser258, loop 7 bends toward the active site and covers it. At position Gly261, the deviation from wt-BdPTE reaches its maximum, with 19.0 Å distance between the two corresponding $C\alpha$ atoms. According to an analysis with PISA, residues Ile260 to Leu262 in this loop region contact the bound substrate analog. In the following stretch comprising residues Glu263 to Ser267, the electron density is missing, which indicates enhanced flexibility at the solvent-exposed tip of the loop around Asn265 (Figure 3A and SI Figure 2). In contrast, residues Ala266 to Leu272 in wt-BdPTE form α -helix O. At residue Asn274 of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), loop 7 finally coincides again with the wt-BdPTE structure, leading into α -helix P (Figures 2 and 3C).

Structural Reasons for the New Conformation of Loop 7. The structural rearrangement of loop 7 is in so far remarkable as the optimization of the BdPTE variant 10-2-C3 was aided by computational design using the Rosetta^{8,10,45} and PROSS⁴⁶ program suites, and during this process gross conformational changes were neither predicted nor taken into consideration. Of note, even a three-dimensional structure prediction based on the amino acid sequence of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) with the AlphaFold v2.0 system⁴² did not provide a hint on the new loop conformation as the first four ranked models reproduced the loop structure of wt-BdPTE; only the fifth model indicated a shift of the loop, but in the opposite direction. Thus, it seems that the significant local rearrangement in the structure of the enzyme was provoked in an unexpected manner by a series of critical amino acid substitutions (Scheme 2), as discussed in the following.

The mutation D233G in α -helix M was first introduced during round seven (G7, cf. Scheme 2) of the directed evolution for improved VR hydrolysis into the variant IVA1.⁹ In a parallel branch, the mutation D233N independently occurred in round 13-1, whereas in round 13-2, the mutation D233G was intentionally introduced, leading to the BdPTE variant 10-2-C3 that showed improved VX hydrolysis.¹⁰ This mutation creates space for Ala259 in loop 7 with its new conformation. Moreover, the H254G mutation, which occurred in loop 7 during round 2 in the variant A137,⁸ leaves another gap close to the active site, which provides more space for the new backbone conformation of loop 7. The backbone $C\alpha$ atom of Gly254 is 1.1 Å closer to the active site compared to His254 and, thus, a His side chain would clash with the side chains of His230 and Asp301 in the new loop conformation. Previously, it was hypothesized that the mutation H254G would enable a better accommodation of

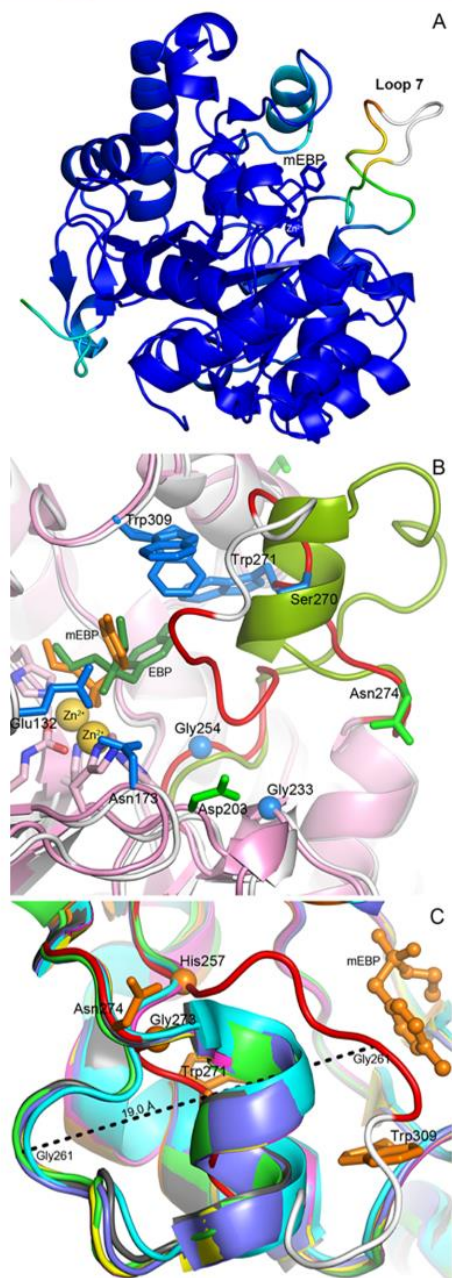


Figure 3. Conformational change of loop 7 in the BdPTE mutant 10-2-C3(C59V/C227V). (A) B-factor coloring of one enzyme subunit illustrates enhanced dynamics of loop 7 (with B-factors colored from deep blue, low, to red, high) despite mostly unambiguous electron density for its backbone (except for residues Glu263, Asp264, Asn265, Ala266, and Ser267, with their tentatively modeled $C\alpha$ trace depicted in white color). (B) Strong changes in the conformation of loop 7. Superposition of the BdPTE mutant 10-2-C3(C59V/C227V) via alignment of its core structure ($C\alpha$ -positions 35–256 and 274–361) with wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM). Coloring is as in Figure 1. For Trp309, two alternative side chain rotamers are shown. (C) Comparison between the conformation of loop 7 (residues 257–273) in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) (this study, orange, loop 7

Figure 3. continued

red/white) with the ones in wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM; green) and other enzyme mutants with a known 3D structure: A53 (PDB ID: 6FEI; magenta), C23 (PDB ID: 6FU6; yellow), L7ep-3a (PDB ID: 4ZST; cyan), PTE_27 (PDB ID: 6GBK; gray), and GWT-d3 (PDB ID: 3URA; slate). The $C\alpha$ positions of residues His257 and Gly273, where deviations start and end in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), are shown as spheres; the side chains of residues Ser270 (hidden), Trp271, Asn274, and Trp309, whose substitutions seem mostly responsible for the rearrangement of loop 7, are depicted as sticks. The mEBP ligand is shown as ball and sticks (orange). The dotted line indicates the large distance between the $C\alpha$ position of Gly261 (showing well defined electron density) in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) versus the wild-type enzyme.

V-agent substrates (which, however, are positioned too far away), but it could also lead to a conformational change of loop 7 and thereby modulate substrate binding⁸—as, in fact, it appears from the present crystal structure.

The mutation I274N, introduced during round 4 in variant E36 at the C-terminal end of loop 7,⁸ provides a polar side chain which is largely solvent exposed and forms a hydrogen bond to a crystallographically defined water molecule, which is in H-bond distance to three other side chains: Arg275 (one of two alternative side chain conformations), Arg280, and Ser258. The mutation L271W in loop 7, which was first introduced during round 11 in the BdPTE variant 4E11,¹⁰ lies in a hydrophobic pocket together with Met317 (in α -helix R), surrounded by Trp309, Ile313, Phe306, Leu303, Ile260, Leu272, Val320, and Trp302, while the carbonyl backbone of Trp271 forms a hydrogen bond to the amide backbone of Ser258, thus stabilizing the new loop conformation.

The substitution Y309W, which appeared during round 10 in the variant C23-Y309W in loop 8,¹⁰ abolishes the hydrogen bond to the carbonyl backbone of Ser267 in loop 7, whereas the new indole side chain—with two resolved rotamers—gives rise to a hydrogen bond with the carbonyl backbone of Ala268, which again stabilizes the new loop conformation. The A270S substitution in loop 7 occurred in the mutant 4E11 during the subsequent direct evolution screening round 11.¹⁰ The Ser270 side chain forms a weak hydrogen bond to the side chain of Ser267, and its amide group forms another hydrogen bond to the carbonyl group of Ala268 in loop 7. Compared with Ala, Ser is more likely to form turns; hence, together with the L271W substitution, it might destabilize the α -helix O that is present in wt-BdPTE in this region. Finally, the altered conformation of loop 7 is strengthened by several hydrogen bonds that cross-link its backbone, in particular between Ser267 and Asp264, Glu263 and Gly261, and Ser258 and Trp271.

Notably, it seems that the substitutions D233G, H254G, A270S, L271W, I274N, and Y309W lead to the rearrangement of loop 7 only in concert since there are crystal structures of several BdPTE variants that harbor a subset of these mutations and where loop 7 exhibits the canonical conformation (Figure 3C). For example, PTE_27 (PDB ID: 6GBK),⁴⁶ which only carries the H254G mutation, shows overall high similarity to the wt-BdPTE structure, with RMSD = 0.34 Å for the entire subunit (327 $C\alpha$ positions from Ala35 to Thr361). In fact, when superimposing only the $C\alpha$ atoms of loop 7 (Asp253–Ser276), a similarly low RMSD of 0.45 Å is calculated for these 24 $C\alpha$ atoms, which confirms the overall conserved structure with the native enzyme. The BdPTE variant GWT-d3 (PDB

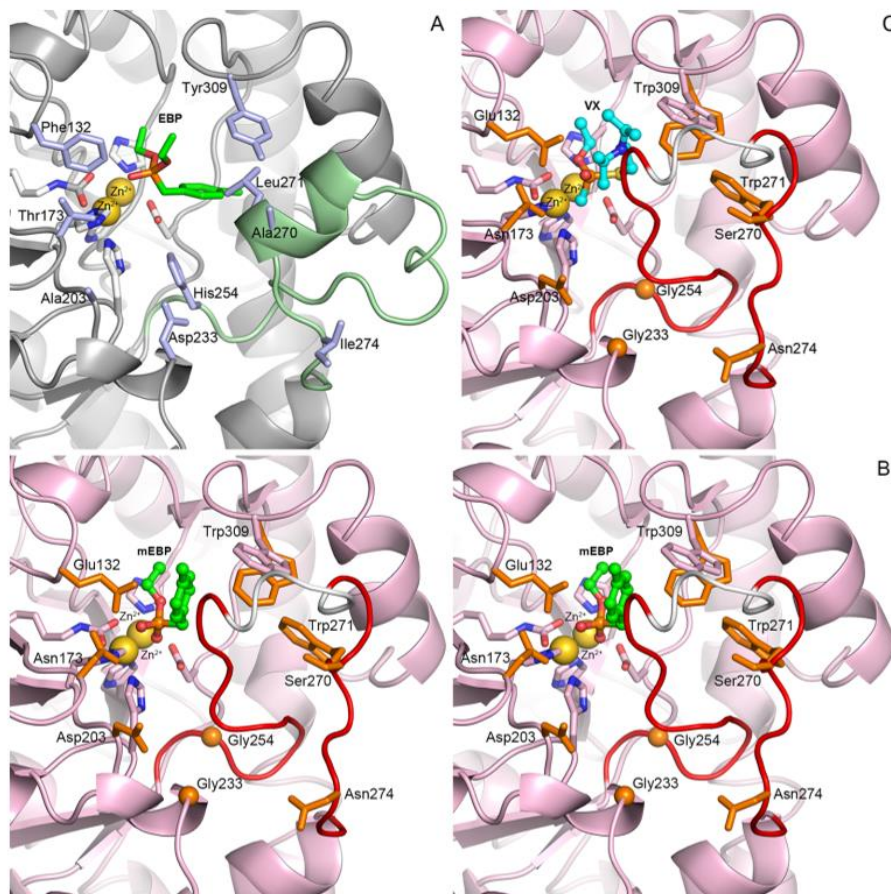


Figure 4. wt-BdPTE and its mutant 10-2-C3(C59V/C227V) with the co-crystallized ligands in their active sites and a docked VX substrate. (A) dEBP (green) bound to the active site of wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM). (B) mEBP (green, ball and sticks) in the active site of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) shown in a stereo representation (coloring as in Figure 3B). Note the different orientation of the methylbenzyl substituent compared to the wt-BdPTE complex. (C) VX (cyan, ball and sticks) modeled with AutoDock Vina into the active site of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V). Note that the *N,N*-dialkylaminoethyl group occupies the position of the methylbenzyl substituent in the crystal structure with the bound mEBP. The following residues are shown as sticks: His residues at positions 55, 57, 201, and 230, Asp301 and the carboxylated Lys169, which coordinate the Zn^{II} ions, residues Ser270, Trp271, Asn274, and Trp309, which are responsible for the rearrangement of loop 7, and those of the anionic cluster, Glu132, Asn173, and Asp203. Gly residues 233 and 254 are depicted as spheres. Trp309 reveals two alternative side-chain conformations (orange and pink, respectively).

ID: 3URA),⁶ which carries the mutations H254G and I274N, aligns even slightly better with the wt-BdPTE structure, with RMSD of 0.39 Å for loop 7 and RMSD = 0.34 Å for the entire subunit.

Interestingly, there is evidence that BdPTE may have evolved from bacterial lactonases with promiscuous PTE activity, so-called PTE-like lactonases (PLLs), which share low but detectable sequence homology and, in particular, a much shorter loop 7 (lacking 14 residues).⁴⁷ Hence, one may speculate that in BdPTE, which is thought to have evolved only recently for the degradation of synthetic insecticides, the long insertion that was acquired by loop 7 has not yet been structurally and functionally optimized in nature, whereas it finally adopted a more appropriate conformation in the course of its stepwise in vitro evolution for the newer class of OP nerve agents.

As the mutations D233G, A270S, L271W, and Y309W were never jointly present in any published crystal structure of a

BdPTE variant, it is not clear which of these may be key to the loop rearrangement. Upon closer inspection, it seems that the amino acid exchange D233G, which creates space for residue Ala259 in loop 7, is a likely candidate. This substitution was for the first time identified in the variant IV-A1 which showed enhanced hydrolytic activity toward substrates carrying an *N,N*-dialkyl-aminoethyl side chain, such as VR.⁹ Of note, the catalytic efficiency for VR did not change much between BdPTE IV-A1 and the further developed variant 10-2-C3(C59V/C227V), with $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ values of 0.53×10^7 and $0.61 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, respectively, even though the latter harbors seven additional functional amino acid exchanges (plus the two substituted Cys residues) and originated from a different branch of in vitro evolution (Scheme 2). The fact that the substrate VR appears to fit well into the active site of IV-A1 provides a hint that the loop rearrangement has already taken place at this generation in the pedigree of BdPTE mutants. So

Table 2. Residues in the Active Sites of Wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM) and BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) that Are Located within Approximately 5 Å of the Inhibitor Di/Mono-ethyl-4-methylbenzylphosphonate^a

residues	wt-BdPTE	BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V)
Zn ^{II} -coordinating residues	H55, H57, H201, H230, D301, and K169	
small binding pocket	G60, I106, W131, L303, F306, and S308	G60, I106, W131, L303, F306, and S308
residues close to the small binding pocket	C59 and S61	V59 and S61
large binding pocket	H254, H257, <u>L271</u> , <u>L272</u> , W302, L303, F306, and M317, +T173, +A203, +D233, and <u>+A270</u>	I260, D301, F306
leaving group binding pocket	W131, F132, <u>L271</u> , F306, S308, and Y309	W131, E132, <u>I260</u> , <u>G261</u> , <u>L262</u> , F306, S308, and W309, +N173

^aTo more precisely assign the subpockets to the different substrate side chains, named according to Chen-Goodspeed et al.,⁵¹ all residues close to the benzyl group of dEBP in the crystal structure of wt-BdPTE were regarded as part of the “large binding pocket”. Residues close to the pro-S ethoxy group belong to the “leaving group pocket”, while the residues around the pro-R ethoxy group form the “small binding pocket”. Whereas residues C59 and S61 are also close to this subpocket, their side chains point away from the active site. VX was docked onto both wt-BdPTE and BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), and the resulting residues surrounding the leaving group (*N,N*-dialkyl-aminoethyl) are also listed (marked with a plus). Residues located within loop 7 are underlined, and those newly considered as relevant are printed bold.

far, however, structural information is missing for members of this branch.

Apart from that, when looking at the crystallographic B-factors, loop 7 seems to be very dynamic in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) (Figure 3A). As the electron density is missing for residues Glu263 to Ser267 at the tip of loop 7, it is clear that this exposed region is more flexible than most of the enzyme core structure. Interestingly, it was found that the region Gly251–Ser276 in the crystal structure of apo-BdPTE, in the absence of metal ions (PDB ID: 1PTA), is partially disordered and can change its conformation significantly compared to the holo-structure with cadmium ions bound to the active site (PDB ID: 1PSC).^{29,48} Moreover, in the wt-BdPTE structure with bound dEBP (PDB ID: 1DPM), the B-factors for residues Gly261, Glu263, and Asp264 are also relatively high. In fact, a normal mode analysis (NMA) of a simplified elastic network model (ENM) of BdPTE revealed a coordinated rearrangement (“breathing” motion) between open and closed conformational sub-states (CSs) involving a considerable movement of loop 7.³⁹

Likewise, based on the crystal structure of the homologous OP-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* (OpdA), it was suggested that mutations in this region may influence the enzymatic activity through dynamic effects.⁴⁹ A molecular dynamics study of the binding mechanism of wt-BdPTE for paraoxon or sarin indicated that a substantial conformational change occurs by the opening of the gateway to the active site (measurement between residues Phe132 and Leu271) to a pocket where the leaving group is expected to be located. This flexible opening is dependent on the substrate substituent that is positioned in the leaving group pocket and accompanied by a crankshaft-like movement of Phe132.⁵⁰ This kind of mechanism would be consistent with our structural findings as the leaving group of the bound substrate analog indeed lies in the predicted pocket and the mutated residue Glu132 adopts a similar conformation as Phe in the wild-type enzyme.

Structural Insights into the Active Site of the BdPTE Variant 10-2-C3(C59V/C227V). The substrate pocket of wt-BdPTE can be divided into four parts, including the active site that harbors the residues which coordinate the two catalytic Zn^{II} ions (Table 2). The substrate analogue dEBP present in the previously described crystal structure of wt-BdPTE (PDB ID: 1DPM) allowed the identification of three distinct subpockets, the small, the large, and the leaving group pocket

(Table 2).⁵¹ These subpockets seem to govern the orientation of the different OP substrates with their varying substituents (Scheme 1) within the active site of the enzyme.⁴³

The same transition state analog dEBP that had been co-crystallized with wt-BdPTE⁴³—and where, compared with the well-known substrate paraoxon, the oxygen of the activated leaving group *p*-nitrophenolate was substituted by a methylene group—was employed here for complex formation with the variant 10-2-C3(C59V/C227V). Unexpectedly, in this crystal structure one of the two non-activated ethoxy groups (pro-S) was hydrolyzed to yield the mono-ethoxy derivative (mEBP), which was clearly defined in the electron density. Notably, mEBP is positioned very close to both catalytic Zn^{II} ions (distances of 3.0 and 3.1 Å to the phosphorus atom; Figure 4B). Hence, it appears that the highly active variant BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) stereospecifically hydrolyzed one of the ethoxy groups of dEBP, whereas autohydrolysis of this artificial substrate in the crystallization buffer at pH 8.3 is very unlikely. The pro-R oxygen points to the α -Zn^{II} ion with a distance of only 2 Å while the pro-S oxygen of the partially hydrolyzed phosphonate points toward the β -Zn^{II} ion with a similar distance of 2 Å. The pro-R ethoxy group is positioned in the small subpocket, in so far resembling the orientation of dEBP in the wt-BdPTE structure (Figure 4A). Furthermore, this is in agreement with the crystal structure of diethyl phosphate bound to wt-BdPTE,⁵² whose superposition reveals one ethyl group in the same orientation as the one of mEBP while the other one points into the direction of the methylbenzyl substituent (not shown).

Nevertheless, the drastic conformational change of loop 7 described above led to significant changes in the mode of ligand/substrate binding (Figures 3B and 4A,B). In the structure of the wt-BdPTE complex, the methylbenzyl group of the substrate analog resides in the large subpocket (Table 2, Figure 4A,B), pointing at His254. However, in the crystal structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), loop 7 occupies this space, in particular with its bulky residues Trp271 and Ile260. As a consequence, the methylbenzyl group of mEBP here lies in the leaving group pocket, pointing toward Leu262. This new finding has implications for bulkier substrates like VX, as their large leaving groups should also not fit into the previously assigned large subpocket of the engineered enzyme anymore. To investigate this hypothesis, S_p-VX was docked into the active site of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) (Figure 4C).

The 10 best docking results were evaluated by measuring the distances of the phosphoryl oxygens from the α - and β -Zn^{II} ions. The maximal accepted distance from one of both Zn^{II} ions was 4.8 Å, whereas other results were rejected. Of the remaining docking models, the substrate position which aligned best with the mEBP position in the crystal structure and which also had a good energy score (−4.6 kcal/mol) is shown in Figure 4C. Instead of the pro-R oxygen of mEBP, the single oxygen of VX points toward the α -Zn ion whereas the ethoxy group lies in the small subpocket. Notably, the *N,N*-dialkylaminoethyl leaving group of VX is now placed in the leaving group pocket, similar to the methylbenzyl group of mEBP. In fact, this makes sense because the methylbenzyl group of this transition state analog corresponds to the nitrophenoxy leaving group of the actual substrate paraoxon. Hence, the present crystal structure not only provides a plausible explanation for the stepwise mechanism of the BdPTE variant 10-2-C3(C59V/C227V) for the hydrolysis of OP substrates but also a rationale for its enhanced catalytic activity toward the nerve agent VX.

In accordance with the extended aliphatic groups in VX, its binding to the substrate pocket is stabilized by several hydrophobic amino acid side chains in loop 7 of the engineered BdPTE. One of the isopropyl groups forms contacts with Leu262, while the other one nestles against Ile260, Phe306, and Trp309. In the hypothetical complex with wt-BdPTE, which was similarly docked as described for the variant above, the *N,N*-dialkylaminoethyl group of VX points into the large pocket in the direction of Asp233, giving rise to an attractive electrostatic interaction with the positively charged ligand group at physiological pH. However, with the altered conformation of loop 7, this pocket is too small in BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) and, as explained above, cannot accommodate the leaving group of VX anymore. Therefore, the mode of binding described for the BdPTE mutants in earlier publications, and serving as a basis for the design of the variant 10-2-C3,¹⁰ is outdated.

When taking a closer look at the mutated positions in the active site of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), the following differences relative to the wild-type enzyme become evident (Figure 4): With the substitution F132E in loop 3, a negatively charged residue appears at the leaving group pocket, which now harbors the *N,N*-dialkylaminoethyl group of VX. Thus, Glu132 leads to a similar Coulomb attraction as Asp233 in the wt-BdPTE (see above), which is mutated to Gly in the 10-2-C3(C59V/C227V) variant. In fact, together with the mutation A203D, Glu132 gives rise to an anionic cluster that favors the binding of the protonated *N,N*-dialkylaminoethyl group in the new position. Furthermore, the Glu side chain can form a hydrogen bond to Asn173 of the large pocket in loop 4, which replaces Thr in wt-BdPTE. The same substitution, T173N, leads to another hydrogen bond between the Asn side chain and the His201 side chain in the β -sheet G which coordinates one of the Zn^{II} ions and, thus, stabilizes the active site.

Of note, residue Glu132 was previously predicted to interact electrostatically with the positively charged *N,N*-dialkylaminoethyl group of the V-agent—even though, as we know now, under invalid structural assumptions—in a model of the mutant A137 (see Scheme 2) with bound VX in the transition state based on the crystal structure of wt-BdPTE.⁸

The Structural Role of Stabilizing Mutations in the BdPTE Variant. In the course of the iterative evolution of this engineered enzyme (Scheme 2), BdPTE 10-2-C3(C59V/

C227V) has incorporated a substantial number of mutations distant from the active site (K77A, A80M, R118E, K185R, A203D, S222D, S238D, I274N, M293V, R319S, G348T, and T352E—as well as the “unselected” substitution P342S⁸), which were announced as stabilizing mutations as they appeared to improve soluble protein expression without impairing the catalytic function.¹⁰ When taking a closer look at these mutations in the present crystal structure compared to the one of wt-BdPTE, the following effects were observed (Figure 1B, SI Figure 3, SI Figure 4).

The mutations K185R and R319S (together with D208G, which is no longer present in the currently investigated BdPTE variant) were introduced at an early stage of enzyme engineering in order to stabilize the metal-free state, which resulted in higher expression yields as a fusion protein with the maltose-binding protein (MBP) in *E. coli*.¹¹ The new Arg side chain at position 185, whose backbone C α is more than 21 Å away from the substrate leaving group (corresponding to the methylbenzyl group of mEBP), forms a salt bridge with Glu219 and a hydrogen bond to Ser218, along with a water bridge to Glu181. This side chain replacement also provokes a small local shift of the backbone of α -helix I by 0.7 Å, leading to a larger movement at the N-terminal end of this helix (at Pro178) by 1.1 Å. The mutated residue Ser at position 319 forms a hydrogen bond with the backbone carbonyl group of Val316, which is associated with a local shift by ≤ 1 Å of α -helix R toward the solvent.

In following rounds of directed evolution (G1–G5, see Scheme 2), which resulted in the variant C23, the mutation D208G was reversed, and three additional stabilizing mutations were introduced: K77A, A80V—later replaced by A80M in the variant 10-2-C3¹⁰—and I274N, together with the “unselected” mutation P342S.⁸ The mutations K77A and A80M lie within the same α -helix D, whose position remained unchanged. For the substitution K77A, no structural rationale or a stabilizing effect is evident, as the negative charge of Glu81 (at a modeled distance of 4.0 Å) would electrostatically favor Lys77. The introduced Ser at position 342 instead of Pro, which is located in a loop far from the active site and, thus, unlikely to have a functional effect,⁸ is involved in a new hydrogen bond to the side chain hydroxyl group of Thr345, which is accompanied by a backbone shift of 1.2 Å of the turn between α -helices S and T.

Interestingly, the two mutations A80V and I274N were independently found in another enzyme engineering study—with the aim to improve hydrolytic activity toward pesticide OPs (not included in Scheme 2)—after random mutagenesis of wt-BdPTE.^{53,54} In this study, it was assumed that Asn274 can form a hydrogen bond with Glu263.⁵⁴ However, this is not seen in the crystal structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), where Asn274 binds a water molecule that further bridges residues Arg275 and Arg280 as well as Ser258 (as described further above). For the mutation A80V, it was speculated in a different study that the new Val side chain can fill a surface cavity.⁴⁴ In the crystal structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V), the Met side chain at this position adopts a similar role as it leans against the hydrophobic cluster comprising Ile58, Val84, Leu87, Leu112, and Val116 and, in this manner, also seems to stabilize the α -helices F and D.

Furthermore, seven stabilizing mutations, R118E, A203D, S222D, S238D, M293V, G348T, and T352E, were introduced into the BdPTE variant C23-Y309W¹⁰ after an analysis with the PROSS algorithm,⁴⁶ which predicts stabilizing mutations

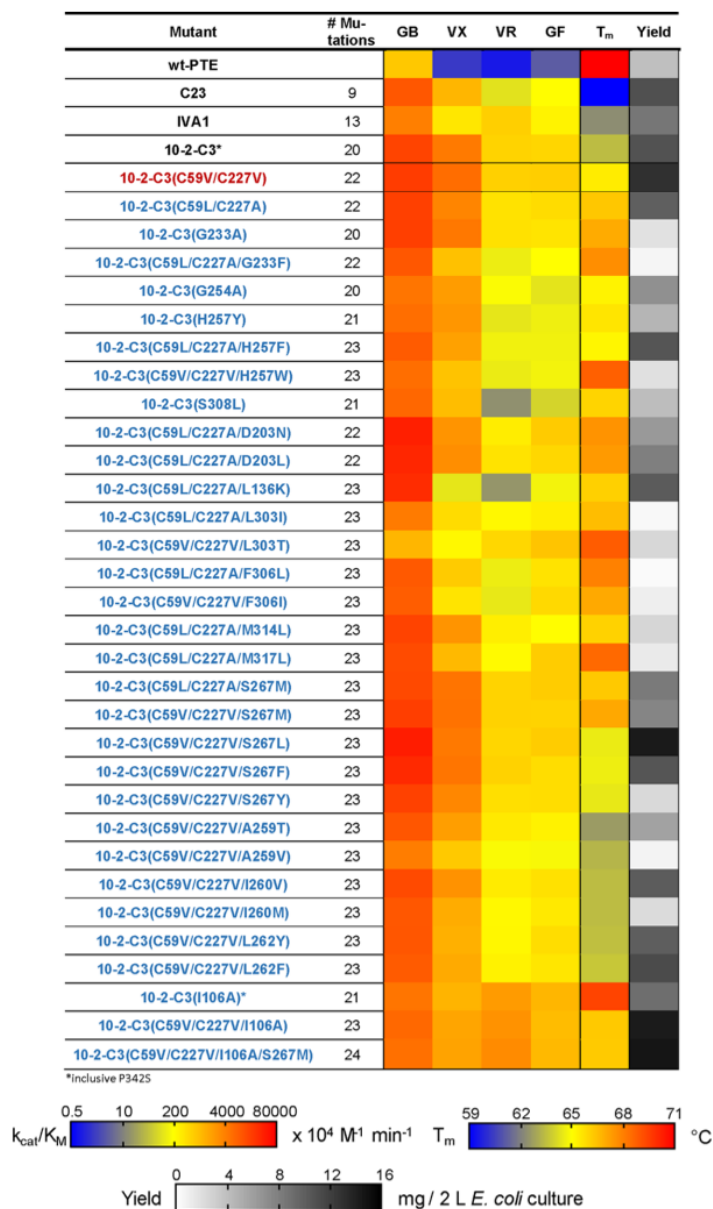


Figure 5. Overview of enzyme properties for the BdPTE mutants from this study: catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) for the nerve agents GB, VX, VR, and GF; protein melting temperature (T_m) measured via CD; and expression yields of the purified proteins from 2 L *E. coli* cultures in LB medium (for data, see SI Table 1).

for increased soluble protein expression without impairing protein function. However, no structural rationale on why these mutations should stabilize the enzyme was presented.

From the crystallographic analysis of BdPTE 10-2-C3-(C59V/C227V), it becomes evident that the substitution R118E leads to a salt bridge with Arg41 (O–N distance: 4.4 Å), which provokes a $C\alpha$ shift by about 0.8 Å for the entire α -helix F as well as the following turn (residues 111–122). The mutation A203D gives rise to a network of hydrogen bonds from one of its carboxylate oxygens to the hydroxyl group of Ser205 and from the other one to the side-chain amide group

of Gln206, while its backbone carbonyl group forms a hydrogen bond with the amide backbone of Gln206. As result, there is a shift by ~ 1 Å of the entire region around loop 5 and α -helices J and K (residues 202–219).

The substitution S222D leads to a new double hydrogen bond between its carboxylate group and the amide backbone as well as the side chain hydroxyl group of Ser224, which is accompanied by a backbone shift by 0.6 Å at position 222. The mutation S238D results in a shift of the corresponding α -helix N by 0.9 Å, possibly due to some electrostatic repulsion by the

Table 3. Catalytic Efficiencies of BdPTE Mutants for the Hydrolysis of Some Relevant Nerve Agents, $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($\times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm \text{SD}$)

BdPTE mutant	VX	VR	GB	GF
10-2-C3 ^a	4.59 \pm 0.08	0.567 \pm 0.008	16.5 \pm 0.3	0.531 \pm 0.021
10-2-C3(C59V/C227V) ^a	6.31 \pm 0.02	0.606 \pm 0.005	20.0 \pm 0.4	0.637 \pm 0.020
10-2-C3(C59L/C227A/S267M)	5.29 \pm 0.02	0.569 \pm 0.008	14.4 \pm 0.7	0.678 \pm 0.031
10-2-C3(C59L/C227A/D203N)	2.50 \pm 0.04	0.311 \pm 0.009	39.5 \pm 1.0	0.679 \pm 0.016
10-2-C3(C59V/C227V/S267L)	4.72 \pm 0.07	0.535 \pm 0.006	41.6 \pm 0.2	0.665 \pm 0.001
10-2-C3(C59V/C227V/S267M)	5.56 \pm 0.16	0.580 \pm 0.010	18.8 \pm 0.1	0.572 \pm 0.004
10-2-C3(I106A/C59V/C227V/S267M)	1.74 \pm 0.02	3.07 \pm 0.02	5.88 \pm 0.02	1.05 \pm 0.02

^aData from ref 13.

adjacent carboxylate side chain of Asp236 (both exposed at the protein surface).

The substitution M293V eliminates an exposed thioether group, which is prone to oxidation.¹³ The β -branched Val side chain makes a van der Waals contact with Thr348, which is accompanied by a ≤ 1.3 Å shift in the backbone of α -helix P and the following turn (residues 290–293). Finally, the G348T mutation leads to a new hydrogen bond to the side chain of Glu352, which itself results from the T352E substitution, and there is a shift by 0.8 Å of α -helix T around position 348. The carboxylate group of Glu352 also forms water-mediated hydrogen bonds to the guanidinium group of Arg356 and to the backbone carbonyl of Glu344.

Taken together, four of these seven mutations introduce new hydrogen bonds (A203D, S222D, G348T, and T352E), one leads to a water network (S238D), and one to a salt bridge (R118E). Moreover, with the mutation M293V, an exposed oxidation sensitive side chain is eliminated, which may prevent chemical damage of the enzyme.

In an attempt to achieve even better resistance against oxidative stress, substitutions of the two potentially reactive unpaired Cys residues at positions 59 and 227 to Val were recently introduced into BdPTE 10-2-C3.¹³ The present crystal structure confirms that both side-chain replacements are fully compatible with the structure of wt-BdPTE, and in each case one of the β -methyl groups points into the same direction as the thiol group of the original residue. In fact, there was no detectable change in backbone conformation around both mutated positions.

Kinetic and Biochemical Characterization of New Mutations Inspired by the Crystal Structure. The rearrangement of loop 7 seen in the crystal structure of BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V) implies a new mode of binding for nerve agent OP substrates, in particular VX (Figure 4). This notion inspired additional mutations to explore the functional relevance of some prominent amino acid residues for the new loop conformation. In this regard, residues A259, I260, and L262 appeared of interest as they are situated much closer to the active site with the new loop conformation and were previously not considered for mutagenesis. Thus, six side-chain substitutions were introduced, A259T/V, I260M/V, and L262F/Y, and the mutated enzymes were tested for catalytic efficiency toward a set of representative nerve agents, VX, VR, sarin (GB), and cyclosarin (GF) (Figure 5, SI Table 1), using an AChE inhibition assay (see the SI methods).¹³

Unexpectedly, all new mutations led to decreased catalytic efficiencies (Figure 5). The substitution A259V had the worst effect with a decrease by 3- to 9-fold, depending on the OP substrate. Likewise, the yield of this mutant upon expression in *E. coli* was only 0.8 mg protein per 2 L culture, compared to 13

mg for BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V). Thus, position 259 seems to be critical for solvation, considering that the less hydrophobic substitution A259T resulted in higher yield (5.9 mg per 2 L culture). Moreover, modeling of the A259V/T mutations with PyMOL indicated small but significant van der Waals clashes with Gly233 and Arg280, which might induce a change in the loop conformation. Likewise, the mutation I260M was deleterious regarding the yield (2.3 mg per 2 L culture). Again, significant van der Waals clashes with residues Ser258, Ser270, Trp271, Phe306, and Trp309 were observed for several of the Met rotamers.

For the other three mutants, I260V and L262F/Y, the recombinant protein yields remained essentially unaffected (around 10 mg per 2 L culture). Introducing the smaller aliphatic Val residue at position 260 did not only retain protein solubility but also had the smallest negative effect on the catalytic efficiency toward all tested nerve agents. In contrast, introducing a large aromatic side chain such as Phe or Tyr at position 262 significantly reduced the catalytic efficiency by factors 1.4 to 4.9. This confirms the importance of Leu at this position, which still originates from wt-BdPTE and points toward the substrate, whereas more bulky side chains would have to point away from the active site in order to maintain the new loop conformation in the variant 10-2-C3(C59V/C227V).

In an accompanying effort, other amino acid exchanges of potential interest were introduced into the preceding variant BdPTE 10-2-C3 (lacking the double Cys substitution) or its mutants with different exchanges of the Cys residues against inert aliphatic side chains (Figure 5). Most of these mutants again showed lower catalytic efficiencies compared to the parental enzyme variant. Those giving rise to the best activities with at least one type of nerve agent substrate are listed in Table 3.

Among these, the mutations S267L and D203N were beneficial with regard to GB hydrolysis and improved the catalytic efficiency each by a factor of around 2. Both substitutions might alter the conformation of loop 7 in a productive manner whereby position 267 lies within the loop segment while Asn203 may stabilize it indirectly via hydrogen bonds with Ser205 and Gln206. The mutation D203N might also favor the emerging negatively charged fluoride leaving group in the transition state in comparison with the likewise negatively charged original Asp side chain.

On the other hand, the mutation S267M was beneficial for VX and VR hydrolysis in the context of the variant 10-2-C3(I106A/C59V/C227V). A small beneficial effect was previously described for the substitution S267M (as sole additional mutation) when comparing the activities against VX of the BdPTE variants 10-2-C3-I106A and 10-1-D11-I106A with $K_{\text{M}}/k_{\text{cat}}$ values of $7 \pm 0.2 \times 10^6$ and $8 \pm 0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$

min^{-1} , respectively.¹⁰ Notably, BdPTE 10-2-C3(I106A/C59V/C227V/S267M) is a candidate with a relatively broad substrate spectrum, as it hydrolyzes all four tested nerve agents with catalytic efficiencies between 1 and $5.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Finally, mutations close to the dimerization interface of the enzyme, such as S308L and L136K, led to decreased hydrolysis rates for all investigated nerve agents, especially VR (Figure 5). Hence, the precise quaternary structure seems to be crucial for the high catalytic efficiency.

To investigate the influence of the new mutations on the enzyme stability, we compared their expression yields in *E. coli* as well as their thermal stabilities in vitro. The parental mutant 10-2-C3 yielded ~11 mg of purified protein from 2 L *E. coli* culture in LB medium, while the less oxidation sensitive version 10-2-C3(C59V/C227V) showed a corresponding figure of 13 mg (Figure 5, SI Table 1). The yields of all other mutants investigated here varied between 0.4 and 14.7 mg, with most of them exhibiting lower yields than BdPTE 10-2-C3(C59V/C227V). This can be explained in the light of the crystal structure, as already explained for some mutations above. For example, positions 303 and 306 are located in loop 8, directly downstream of Asp301, which is one of the Zn^{II} -coordinating residues. Consequently, mutations in this region might affect Zn^{II} binding and, thus, the stability of the holoenzyme. The same is the case for position 233, downstream of His230, which coordinates the other Zn^{II} ion. The best yields, in the range of 14–15 mg, were observed for the mutations S267L, I106A, and I106A/S267M (Figure 5, SI Table 1). This shows that the exchange of Ile106 by Ala does not only enhance VR and GF hydrolysis but also favors protein folding. In this regard, the position 267 is beneficial, too (see above).

On the other hand, when investigating the thermal unfolding via circular dichroism (CD) measurements most of the mutants showed increased melting temperatures, with T_m values from 62.8 to 69.3 °C, compared to 63.6 °C for BdPTE 10-2-C3 (Figure 5, SI Table 1). The variant 10-2-C3(C59L/C227A/L303T) appeared as the most thermostable version, with $T_m = 69.3$ °C. However, this did not correlate with a high expression yield in *E. coli*, as only 2.5 mg of purified protein per 2 L culture was obtained in this case. Likewise, other mutants of BdPTE 10-2-C3 showed high melting temperatures despite poor expression yields, for example those carrying the substitutions G233F/A, H257W, L303T, F306L, and M317L. While a general lack of correlation between expression yield and thermodynamic stability for engineered proteins is well known in the field,⁵⁵ one also has to take into account a potentially limiting effect of Zn^{II} availability during folding of the BdPTE mutants in the cytoplasm of *E. coli*.

Interestingly, the reverse situation, that is, high expression yield combined with lower melting temperature, was observed for the substitutions I260V, L262Y/F, S267L, and H257F (Figure 5). Notably, all of these mutations are located in loop 7 and seem to stabilize the apo-enzyme, keeping in mind that the majority of the enzyme is maintained in its Zn^{II} -free apo-form (due to the limited availability of this metal ion in the bacterial cytoplasm) until the cell is lysed in the presence of a Zn^{II} -supplemented buffer that promotes formation of the holoenzyme.¹¹ Other mutations at these positions in loop 7, like A259V/T, I260M, and S267F/Y, also led to lower melting temperatures (<64.9 °C), which further indicates that the precise sequence and the new conformation of loop 7 is critical for the stability of this engineered enzyme.

CONCLUSIONS

The three-dimensional structure of the BdPTE variant 10-2-C3(C59V/C227V), which carries 22 accumulated mutations per subunit with reference to the natural enzyme, revealed a dramatically changed conformation for loop 7, which covers the active site, if compared not only to the structure of wt-BdPTE⁴³ but also to several other crystallized mutants, in particular C23 (unpublished, PDB ID: 6FU6) and L7ep-3a.⁷ The presence of the co-crystallized, partially hydrolyzed inhibitor mEBP in the active site indicated a novel and more plausible mode of substrate binding in the context of the new conformation of loop 7. It is remarkable that these strong structural deviations in the engineered BdPTE were totally overlooked up to now despite extended computational modeling studies that were performed in the course of the stepwise rational design of this enzyme for faster hydrolysis of neurotoxic OPs.^{9,10} Nevertheless, additional mutations on the basis of the crystal structure could not further improve the catalytic efficiency toward VX, while the importance of residues Ala259, Ile260, and Leu262 for OP substrate binding became apparent. However, we were able to identify some critical amino acid positions for expression yield and folding efficiency or thermal stability (306, 303, 233, 259 and 260, 262, 267, 257). This knowledge may prove useful during future biopharmaceutical development as a catalytic bioscavenger for the treatment of acute intoxications by nerve agents¹⁵ as well as OP pesticides, for example when combined with other promising mutants to build a heterodimeric PTE with a broader substrate profile.⁵⁶

ASSOCIATED CONTENT

Data Availability Statement

The atomic coordinates and structure factors of the refined PTE•mEBP complex have been deposited at the Protein Data Bank (PDB), Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (Rutgers University, New Brunswick, New Jersey), under accession code 7P85.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.biochem.2c00666>.

Detailed method description for the AChE inhibition assay; data for Figure 5; and close-up figures for the electron density at the tip of loop 7 and the structural environment of the stabilizing mutations (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Arne Skerra – Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany;
 orcid.org/0000-0002-5717-498X; Phone: +49 8161 714351; Email: skerra@tum.de; Fax: +49 8161 714352

Authors

Laura Job – Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany
 Anja Köhler – Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany; Bundeswehr Institut für Pharmakologie und Toxikologie, 80937 München, Germany
 Andreas Eichinger – Lehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

Mauricio Testanera – Lehrstuhl für Biologische Chemie,
Technische Universität München, 85354 Freising, Germany;
orcid.org/0000-0002-3879-2272

Benjamin Escher – Lehrstuhl für Biologische Chemie,
Technische Universität München, 85354 Freising, Germany

Franz Worek – Bundeswehr Institut für Pharmakologie und
Toxikologie, 80937 München, Germany

Complete contact information is available at:
<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.biochem.2c00666>

Author Contributions

A.S. and F.W. provided the fundamental idea and direction; L.J., B.E., and M.T. performed protein engineering and stability analyses; A.K. and L.J. performed enzyme activity measurements; A.E. and L.J. analyzed and interpreted the crystal structure; and L.J., A.E., and A.S. wrote the paper. All authors edited and approved the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Bundesamt für Ausrüstung, Informationstechnik und Nutzung der Bundeswehr, Germany, for financial support and the Helmholtz-Zentrum Berlin, Germany, for allocation of synchrotron radiation beamtime and travel support as well as Dr. Thomas Hauß for assistance at BESSY beamline 14.2.

REFERENCES

- (1) Caldwell, S. R.; Raushel, F. M. Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1991**, *31*, 59–73.
- (2) Rastogi, V. K.; DeFrank, J. J.; Cheng, T. C.; Wild, J. R. Enzymatic hydrolysis of Russian-VX by organophosphorus hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *241*, 294–296.
- (3) Bigley, A. N.; Xu, C.; Henderson, T. J.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. Enzymatic neutralization of the chemical warfare agent VX: evolution of phosphotriesterase for phosphorothiolate hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10426–10432.
- (4) Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A. Nerve agent stereoisomers. Analysis, isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 368–374.
- (5) Worek, F.; Thiermann, H.; Wille, T. Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? *Toxicol. Lett.* **2016**, *244*, 143–148.
- (6) Tsai, P.-C.; Fox, N.; Bigley, A. N.; Harvey, S. P.; Barondeau, D. P.; Raushel, F. M. Enzymes for the homeland defense. Optimizing phosphotriesterase for the hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6463–6475.
- (7) Bigley, A. N.; Mabanglo, M. F.; Harvey, S. P.; Raushel, F. M. Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5502–5512.
- (8) Cherny, I.; Greisen, P., Jr.; Ashani, Y.; Khare, S. D.; Oberdorfer, G.; Leader, H.; Baker, D.; Tawfik, D. S. Engineering V-type nerve agents detoxifying enzymes using computationally focused libraries. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2394–2403.
- (9) Goldsmith, M.; Eckstein, S.; Ashani, Y.; Greisen, P., Jr.; Leader, H.; Sussman, J. L.; Aggarwal, N.; Ovchinnikov, S.; Tawfik, D. S.; Baker, D.; Thiermann, H.; Worek, F. Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90*, 2711–2724.
- (10) Goldsmith, M.; Aggarwal, N.; Ashani, Y.; Jubran, H.; Greisen, P., Jr.; Ovchinnikov, S.; Leader, H.; Baker, D.; Sussman, J. L.; Goldenzweig, A.; Fleishman, S. J.; Tawfik, D. S. Overcoming an optimization plateau in the directed evolution of highly efficient nerve agent bioscavengers. *Protein Eng., Des. Sel.* **2017**, *30*, 333–345.
- (11) Roodveldt, C.; Tawfik, D. S. 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.* **2005**, *18*, 51–58.
- (12) Khersonsky, O.; Lipsh, R.; Avizemer, Z.; Ashani, Y.; Goldsmith, M.; Leader, H.; Dym, O.; Rogotner, S.; Trudeau, D. L.; Prilusky, J.; Amengual-Rigo, P.; Guallar, V.; Tawfik, D. S.; Fleishman, S. J. Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires. *Mol. Cell* **2018**, *72*, 178–186.
- (13) Job, L.; Köhler, A.; Escher, B.; Worek, F.; Skerra, A. A catalytic bioscavenger with improved stability and reduced susceptibility to oxidation for treatment of acute poisoning with neurotoxic organophosphorus compounds. *Toxicol. Lett.* **2020**, *321*, 138–145.
- (14) Köhler, A.; Escher, B.; Job, L.; Koller, M.; Thiermann, H.; Skerra, A.; Worek, F. Catalytic activity and stereoselectivity of engineered phosphotriesterases towards structurally different nerve agents in vitro. *Arch. Toxicol.* **2021**, *95*, 2815–2823.
- (15) Stigler, L.; Köhler, A.; Koller, M.; Job, L.; Escher, B.; Potschka, H.; Thiermann, H.; Skerra, A.; Worek, F.; Wille, T. Post-VX exposure treatment of rats with engineered phosphotriesterases. *Arch. Toxicol.* **2022**, *96*, 571–583.
- (16) Schmidt, T. G. M.; Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1528–1535.
- (17) Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- (18) Skerra, A. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **1994**, *151*, 131–135.
- (19) Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3784–3788.
- (20) Fling, S. P.; Gregerson, D. S. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **1986**, *155*, 83–88.
- (21) Worek, F.; Seeger, T.; Goldsmith, M.; Ashani, Y.; Leader, H.; Sussman, J. S.; Tawfik, D.; Thiermann, H.; Wille, T. Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1257–1266.
- (22) Schlehner, S.; Skerra, A. Tuning ligand affinity, specificity, and folding stability of an engineered lipocalin variant – a so-called ‘anticalin’ – using a molecular random approach. *Biophys. Chem.* **2002**, *96*, 213–228.
- (23) Arndt, U. W.; Crowther, R. A.; Mallett, J. F. A computer-linked cathode-ray tube microdensitometer for X-ray crystallography. *J. Sci. Instrum.* **1968**, *1*, 510–516.
- (24) Wilson, A. J. C. Largest likely values for the reliability index. *Acta Crystallogr.* **1950**, *3*, 397–398.
- (25) Brünger, A. T. Free R value: cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol.* **1997**, *277*, 366–396.
- (26) Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- (27) Mueller, U.; Darowski, N.; Fuchs, M. R.; Förster, R.; Hellmig, M.; Paithankar, K. S.; Pühringer, S.; Steffien, M.; Zocher, G.; Weiss, M. S. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Radiat.* **2012**, *19*, 442–449.
- (28) Winn, M. D.; Ballard, C. C.; Cowtan, K. D.; Dodson, E. J.; Emsley, P.; Evans, P. R.; Keegan, R. M.; Krissinel, E. B.; Leslie, A. G. W.; McCoy, A.; McNicholas, S. J.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S.; Potterton, E. A.; Powell, H. R.; Read, R. J.; Vagin, A.; Wilson, K. S. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235–242.

- (29) Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* **1995**, *34*, 7973–7978.
- (30) Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W. G.; Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- (31) Langer, G.; Cohen, S. X.; Lamzin, V. S.; Perrakis, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1171–1179.
- (32) Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 355–367.
- (33) Joosten, R. P.; Long, F.; Murshudov, G. N.; Perrakis, A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCr* **2014**, *1*, 213–220.
- (34) Pontius, J.; Richelle, J.; Wodak, S. J. Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 121–136.
- (35) Colovos, C.; Yeates, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 1511–1519.
- (36) Lüthy, R.; Bowie, J. U.; Eisenberg, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* **1992**, *356*, 83–85.
- (37) Hooft, R. W.; Vriend, G.; Sander, C.; Abola, E. E. Errors in protein structures. *Nature* **1996**, *381*, 272.
- (38) Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21.
- (39) Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577–2637.
- (40) Krissinel, E.; Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 774–797.
- (41) Seeliger, D.; de Groot, B. L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **2010**, *24*, 417–422.
- (42) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohli, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596*, 583–589.
- (43) Vanhooke, J. L.; Benning, M. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. Three-dimensional structure of the zinc-containing phosphotriesterase with the bound substrate analog diethyl 4-methylbenzylphosphonate. *Biochemistry* **1996**, *35*, 6020–6025.
- (44) Jackson, C. J.; Foo, J.-L.; Tokuriki, N.; Afriat, L.; Carr, P. D.; Kim, H.-K.; Schenk, G.; Tawfik, D. S.; Ollis, D. L. Conformational sampling, catalysis, and evolution of the bacterial phosphotriesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 21631–21636.
- (45) Richter, F.; Leaver-Fay, A.; Khare, S. D.; Bjelic, S.; Baker, D. De novo enzyme design using Rosetta3. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e19230.
- (46) Goldenzweig, A.; Goldsmith, M.; Hill, S. E.; Gertman, O.; Laurino, P.; Ashani, Y.; Dym, O.; Unger, T.; Albeck, S.; Prilusky, J.; Lieberman, R. L.; Aharoni, A.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Tawfik, D. S.; Fleishman, S. J. Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability. *Mol. Cell* **2016**, *63*, 337–346.
- (47) Afriat-Jurnou, L.; Jackson, C. J.; Tawfik, D. S. Reconstructing a missing link in the evolution of a recently diverged phosphotriesterase by active-site loop remodeling. *Biochemistry* **2012**, *51*, 6047–6055.
- (48) Benning, M. M.; Kuo, J. M.; Raushel, F. M.; Holden, H. M. Three-dimensional structure of phosphotriesterase. An enzyme capable of detoxifying organophosphate nerve agents. *Biochemistry* **1994**, *33*, 15001–15007.
- (49) Yang, H.; Carr, P. D.; McLoughlin, S. Y.; Liu, J. W.; Horne, I.; Qiu, X.; Jeffries, C. M. J.; Russell, R. J.; Oakeshott, J. G.; Ollis, D. L. Evolution of an organophosphate-degrading enzyme. A comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.* **2003**, *16*, 135–145.
- (50) Koca, J.; Zhan, C. G.; Rittenhouse, R. C.; Ornstein, R. L. Mobility of the active site bound paraoxon and sarin in zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 817–826.
- (51) Chen-Goodspeed, M.; Sogorb, M. A.; Wu, F.; Hong, S. B.; Raushel, F. M. Structural determinants of the substrate and stereochemical specificity of phosphotriesterase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1325–1331.
- (52) Kim, J.; Tsai, P.-C.; Chen, S.-L.; Himo, F.; Almo, S. C.; Raushel, F. M. Structure of diethyl phosphate bound to the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* **2008**, *47*, 9497–9504.
- (53) Cho, C. M.-H.; Mulchandani, A.; Chen, W. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 2026–2030.
- (54) Cho, C. M.-H.; Mulchandani, A.; Chen, W. Functional analysis of organophosphorus hydrolase variants with high degradation activity towards organophosphate pesticides. *Protein Eng., Des. Sel.* **2006**, *19*, 99–105.
- (55) Knappik, A.; Plückthun, A. Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Eng.* **1995**, *8*, 81–89.
- (56) Escher, B.; Köhler, A.; Job, L.; Worek, F.; Skerra, A. Translating the concept of bispecific antibodies to engineering heterodimeric phosphotriesterases with broad organophosphate substrate recognition. *Biochemistry* **2020**, *59*, 4395–4406.

Recommended by ACS

Mutation Effects on Structure and Dynamics: Adaptive Evolution of the SARS-CoV-2 Main Protease

Elizabeth M. Diessner, Carter T. Butts, et al.

JANUARY 19, 2023
BIOCHEMISTRY

READ

Structural Properties of CXCL4L1 and Its Recognition of the CXCR3 N-Terminus

Ya-Hsin Liu, Shih-Che Sue, et al.

JANUARY 10, 2023
BIOCHEMISTRY

READ

Evolving to Evolve, Dan Tawfik's Insights into Protein Engineering

Clayton W. Kosonocky and Andrew D. Ellington

JANUARY 17, 2023
BIOCHEMISTRY

READ

High-Resolution Single-Particle Cryo-EM Hydrated Structure of *Streptococcus pyogenes* Enolase Offers Insights into Its Function as a Plasminogen Receptor

Sheiny Tjia-Fleck, Francis J. Castellino, et al.

JANUARY 26, 2023
BIOCHEMISTRY

READ

Get More Suggestions >

SUPPORTING INFORMATION

Structural and functional analysis of a highly active designed phosphotriesterase for the detoxification of organophosphate nerve agents reveals an unpredicted conformation of the active site loop

Laura Job^a, Anja Köhler^{a,b}, Andreas Eichinger^a, Mauricio Testanera^a, Benjamin Escher^a, Franz Worek^b and Arne Skerra^{a*}

^aLehrstuhl für Biologische Chemie, Technische Universität München, Emil-Erlenmeyer-Forum 5, 85354 Freising, Germany

^bBundeswehr Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Neuherbergstr. 11, 80937 München, Germany

- 2 -

Supporting Methods

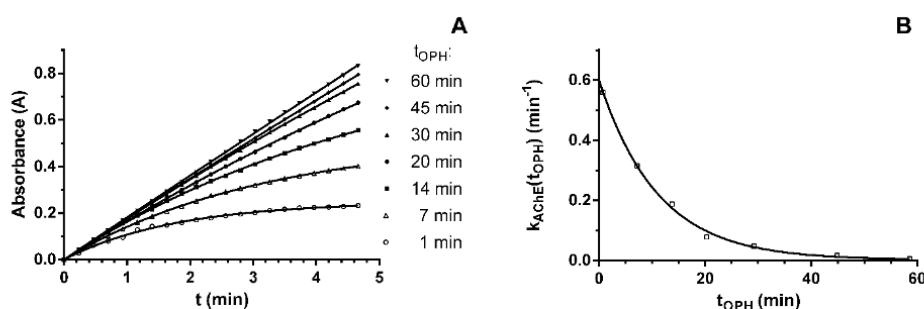
Enzyme Activity Determination

The hydrolytic detoxification of organophosphorus (OP) compounds by BdPTE mutants was quantified by a human acetylcholinesterase (AChE) inhibition assay in duplicates as previously described:¹⁻³ 100 μ L of the appropriately diluted purified recombinant enzyme in TN-buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl) was added to 500 μ L OP solution, resulting in final concentrations of 3.3 μ M VX, 0.8 μ M VR, 0.8 μ M GF and 12.5 μ M GB and incubated at 37 °C. After specific incubation time points (1, 7, 14, 20, 30, 45 and 60 min), 50 μ L incubate was transferred to a polystyrol cuvette (PS macro, VWR, Darmstadt, Germany) prefilled with 3 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.1 mL DTNB (10 mM). Then, 10 μ L AChE and 50 μ L acetylthiocholine (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 using Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) to obtain the pseudo first-order rate constant $k_{AChE}(t_{OPH})$ (SI Figure 1A, Equation 1). The first-order OP degradation constant of the BdPTE variant k_{OPH} was obtained from a plot of $k_{AChE}(t_{OPH})$ versus time, and the corresponding second-order rate constant (SI Figure 1B, Equation 2). The catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) was calculated using Equation 3, wherein $[E]$ is the final concentration of BdPTE in the incubate with OP. Assays and data analysis were performed at the Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology (Munich, Germany).

$$A = A_{max}(1 - e^{-k_{AChE}(t_{OPH}) \cdot t}) \quad (1)$$

$$k_{AChE}(t_{OPH}) = B \cdot e^{-k_{OPH} \cdot t_{OPH}} + C \quad (2)$$

$$\frac{k_{cat}}{K_M} = \frac{k_{OPH}}{[E]} \quad (3)$$



SI Figure 1: Time-dependent detoxification of VR by the BdPTE variant 10-2-C3(C59V/C227V). A) Substrate conversion catalyzed by AChE over time and the effect of its partial inhibition by VR after preceding incubation with the mutant BdPTE for varied periods (1–60 min). B) Plot of the apparent catalytic constant from each curve in (A) versus the period of VR pre-incubation with BdPTE to determine the first-order OP degradation constant, k_{OPH} .

- 3 -

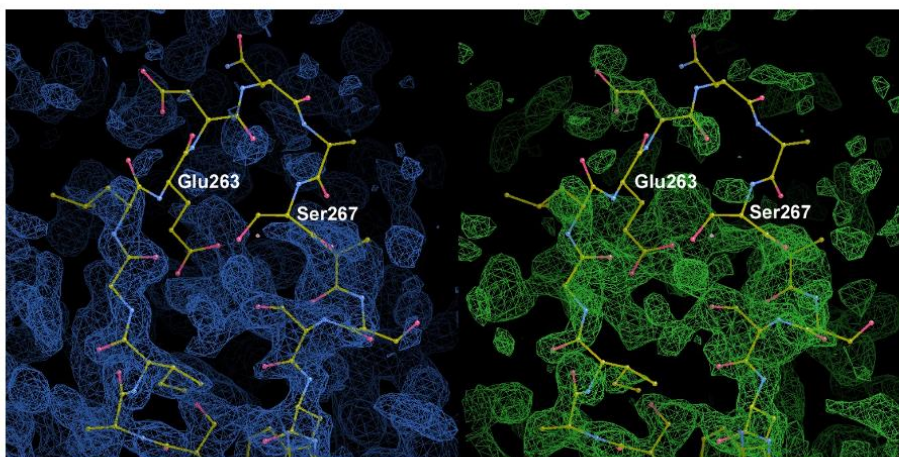
Supporting Tables

SI Table 1: Overview of enzyme properties for the BdPTE mutants from this study: catalytic efficiency ($k_{cat}/K_M \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm \text{SD}$) for the nerve agents VX, VR, GB and GF; protein melting temperature (T_m) measured via CD; expression yields of the purified proteins from 2 L *E. coli* cultures in LB medium.

BdPTE mutant	VX	VR	GB	GF	T_m	Yield
	$k_{cat}/K_M \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \pm \text{SD}$					
wt-PTE	0.0019 ± 0.0001	0.0009 ± 0.0000	0.731 ± 0.007	0.0044 ± 0.0001	71.6 ± 0.3 ^b	4.0
C23 ^a	1.13 ± 0.035	0.103 ± 0.0004	10.6 ± 0.05	0.214 ± 0.005	58.98 ± 0.02	11.0
IVA1	0.355 ± 0.008	0.629 ± 0.010	4.11 ± 0.06	0.270 ± 0.012	62.47 ± 0.02	8.6
10-2-C3 ^b	4.59 ± 0.08	0.567 ± 0.008	16.5 ± 0.3	0.531 ± 0.021	63.6 ± 0.3 ^b	10.9
10-2-C3(C59V/C227V) ^b	6.31 ± 0.02	0.606 ± 0.005	20.0 ± 0.4	0.637 ± 0.020	65.5 ± 0.3 ^b	13.0
10-2-C3(C59L/C227A)	3.56 ± 0.07	0.402 ± 0.005	17.9 ± 0.1	0.456 ± 0.008	66.7 ± 0.2 ^b	10.0
10-2-C3(G233A)	4.78 ± 0.02	0.408 ± 0.021	18.6 ± 1.1	0.380 ± 0.016	67.35 ± 0.09	1.9
10-2-C3(C59L/C227A/G233F)	0.861 ± 0.014	0.133 ± 0.001	10.5 ± 0.03	0.205 ± 0.010	68.08 ± 0.03	0.6
10-2-C3(G254A)	2.06 ± 0.06	0.185 ± 0.001	5.22 ± 0.07	0.107 ± 0.005	65.58 ± 0.05	6.9
10-2-C3(H257Y)	2.38 ± 0.11	0.112 ± 0.010	6.14 ± 0.12	0.139 ± 0.001	65.93 ± 0.07	4.7
10-2-C3(C59L/C227A/H257F)	1.85 ± 0.07	0.145 ± 0.001	9.50 ± 0.21	0.146 ± 0.001	65.51 ± 0.02	10.7
10-2-C3(C59V/C227V/H257W)	0.836 ± 0.006	0.126 ± 0.003	6.14 ± 0.09	0.154 ± 0.002	69.17 ± 0.04	2.0
10-2-C3(S308L)	0.964 ± 0.029	0.0148 ± 0.0004	7.15 ± 0.20	0.074 ± 0.002	66.34 ± 0.05	4.1
10-2-C3(C59L/C227A/D203N)	2.50 ± 0.04	0.311 ± 0.009	39.5 ± 1.0	0.679 ± 0.016	67.94 ± 0.02	6.4
10-2-C3(C59L/C227A/D203L)	2.90 ± 0.06	0.389 ± 0.030	33.5 ± 0.4	0.519 ± 0.010	67.78 ± 0.03	8.1
10-2-C3(C59L/C227A/L136K)	0.113 ± 0.003	0.0169 ± 0.0001	28.7 ± 0.001	0.152 ^c	66.45 ± 0.03	10.3
10-2-C3(C59L/C227A/L303I)	0.462 ± 0.004	0.236 ± 0.001	4.51 ± 0.08	0.301 ± 0.011	66.90 ± 0.04	0.5
10-2-C3(C59V/C227V/L303T)	0.239 ± 0.001	0.518 ± 0.02	1.12 ± 0.01	0.808 ± 0.003	69.27 ± 0.04	2.5
10-2-C3(C59L/C227A/F306L)	0.687 ± 0.007	0.132 ± 0.004	10.1 ± 0.2	0.387 ± 0.013	68.40 ± 0.05	0.4
10-2-C3(C59V/C227V/F306I)	0.383 ± 0.050	0.118 ± 0.007	9.12 ± 0.81	0.500 ± 0.004	67.37 ± 0.04	1.1
10-2-C3(C59L/C227A/M314L)	2.51 ± 0.07	0.299 ± 0.006	16.8 ± 0.2	0.213 ^c	66.41 ± 0.03	2.6
10-2-C3(C59L/C227A/M317L)	1.04 ± 0.01	0.228 ± 0.003	13.9 ± 0.02	0.678 ± 0.014	68.99 ± 0.02	1.3
10-2-C3(C59L/C227A/S267M)	5.29 ± 0.02	0.569 ± 0.008	14.4 ± 0.7	0.678 ± 0.031	66.61 ± 0.02	8.3
10-2-C3(C59V/C227V/S267M)	5.56 ± 0.16	0.580 ± 0.010	18.8 ± 0.1	0.572 ± 0.004	67.42 ± 0.03	7.6
10-2-C3(C59V/C227V/S267L)	4.72 ± 0.07	0.535 ± 0.006	41.6 ± 0.2	0.665 ± 0.001	64.80 ± 0.03	14.4
10-2-C3(C59V/C227V/S267F)	5.14 ± 0.04	0.582 ± 0.006	30.7 ± 0.1	0.451 ± 0.009	64.87 ± 0.03	10.7
10-2-C3(C59V/C227V/S267Y)	3.38 ± 0.05	0.427 ± 0.006	17.7 ± 0.2	0.448 ± 0.006	64.71 ± 0.03	2.4
10-2-C3(C59V/C227V/A259T)	1.96 ± 0.07	0.342 ± 0.003	10.7 ± 0.004	0.273 ± 0.005	62.82 ± 0.04	5.9
10-2-C3(C59V/C227V/A259V)	0.722 ± 0.040	0.181 ± 0.001	4.3 ± 0.1	0.171 ± 0.003	63.45 ± 0.04	0.8
10-2-C3(C59V/C227V/I260V)	2.62 ± 0.05	0.325 ± 0.003	14.3 ± 0.4	0.408 ± 0.006	63.63 ± 0.05	10.2
10-2-C3(C59V/C227V/I260M)	1.42 ± 0.04	0.239 ± 0.006	10.4 ± 0.1	0.343 ± 0.008	63.63 ± 0.04	2.3
10-2-C3(C59V/C227V/L262Y)	1.29 ± 0.06	0.243 ± 0.005	10.7 ± 0.2	0.449 ± 0.002	63.71 ± 0.04	10.1
10-2-C3(C59V/C227V/L262F)	1.49 ± 0.01	0.273 ± 0.030	9.56 ± 0.23	0.364 ± 0.017	63.89 ± 0.04	11.3
10-2-C3(I106A) ^a	1.18 ± 0.02	2.14 ± 0.01	5.20 ± 0.08	1.02 ± 0.15	69.90 ± 0.07	9.1
10-2-C3(C59V/C227V/I106A) ^a	1.68 ± 0.05	2.62 ± 0.01	7.11 ± 0.13	0.972 ± 0.031	66.61 ± 0.03	14.3
10-2-C3(C59V/C227V/I106A/S267M)	1.74 ± 0.02	3.07 ± 0.02	5.88 ± 0.02	1.05 ± 0.02	66.60 ± 0.03	14.7

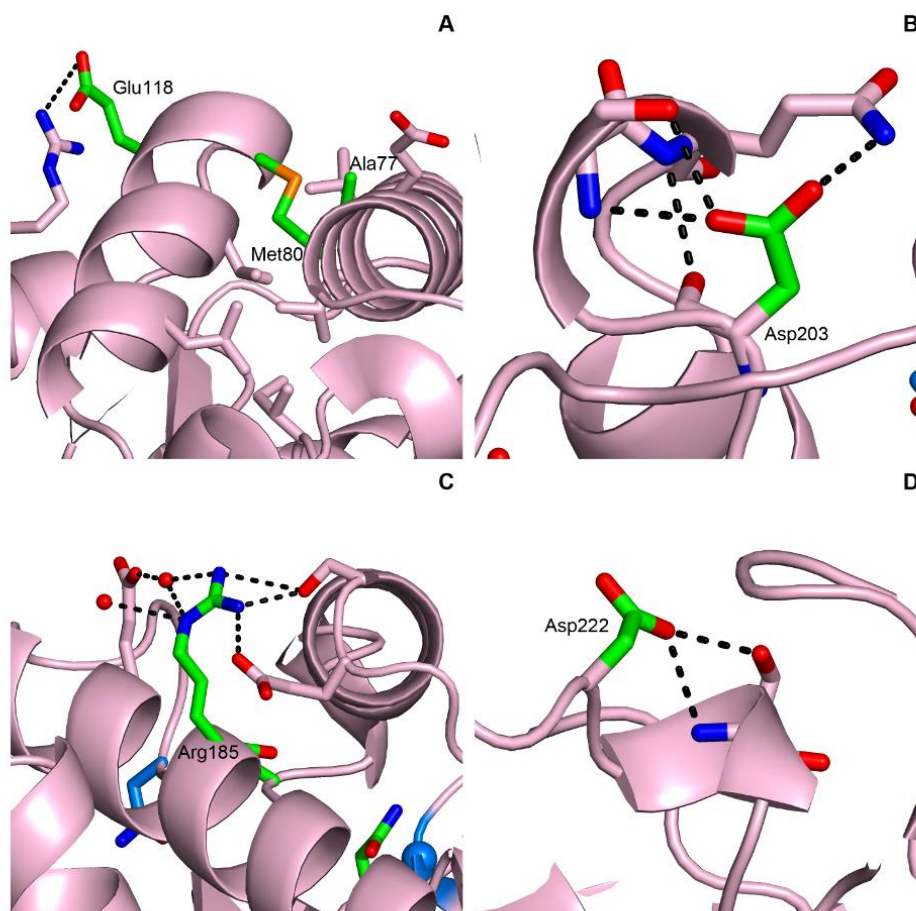
^a Data from³, ^b Data from¹, ^c n=1

Supporting Figures



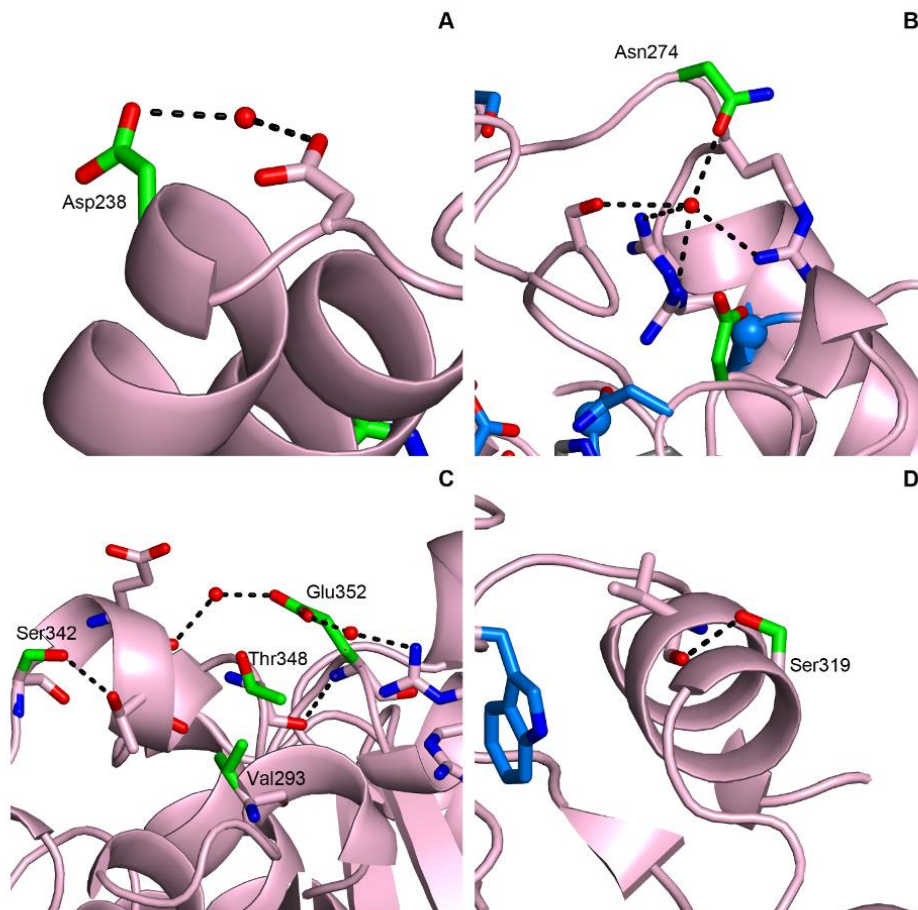
SI Figure 2: Electron density maps around the tip of loop 7. Left: 2F_o-F_c density (blue) contoured at 0.66 σ. Right: F_o-F_c omit density (green) calculated in the absence of the modelled residues 253-276 and contoured at 1.98 σ.

- 5 -



SI Figure 3: Close up view of the stabilizing mutations A) K77A, A80M, R118E; B) A203D; C) K185R; D) S222D.

- 6 -



SI Figure 4: Close up view of the stabilizing mutations A) S238D; B) I274N; C) M293V, P342S, G348T, T352E; D) R319S.

Supporting References

(1) Job, L., Köhler, A., Escher, B., Worek, F., and 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.

(2) Goldsmith, M., Eckstein, S., Ashani, Y., Greisen, P., Jr., Leader, H., Sussman, J. L., Aggarwal, N., Ovchinnikov, S., Tawfik, D. S., Baker, D., Thiermann, H., and Worek, F. (2016) Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro. *Arch. Toxicol.* 90, 2711–2724.

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