

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

TUM SCHOOL OF LIFE SCIENCES

LEHRSTUHL FÜR BIOLOGISCHE CHEMIE

Protein-Engineering katalytischer Bioscavenger zur Detoxifizierung phosphororganischer Verbindungen

Benjamin Escher, M.Sc.

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Wilfried Schwab

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Arne Skerra
2. Prof. Dr. Franz Worek

Die Dissertation wurde am 22.04.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 16.07.2021 angenommen.

Meinem Vater.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arne Skerra für die Möglichkeit, ein so spannendes und herausforderndes Thema im Rahmen einer Doktorarbeit zu bearbeiten. Zudem bedanke ich mich für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine inspirierenden wissenschaftlichen Ideen.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franz Worek für die Unterstützung und produktiven Projekttreffen im Rahmen des Kooperationsprojekts mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr. Im Zuge dessen möchte ich meinen Projektpartnern Laura Job und Anja Köhler für die sowohl exzellente als auch kollegiale Zusammenarbeit und die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Weiterhin gilt größter Dank meiner Laborpartnerin und guten Freundin Carina Sommer für die langjährige und freundschaftliche Zusammenarbeit im gemeinsamen Labor und für die Zeit darüber hinaus.

Herzlicher Dank gilt auch allen meinen langjährigen Mitstreitern im Labor. Sie haben fachlich aber auch außerhalb des Laboralltags entscheidend zur guten Stimmung am Lehrstuhl beigetragen. In diesem Rahmen möchte ich mich besonders bei Christian Deuschle, Fabian Rodewald, Jonetti Schilz, Corinna Brandt, Emanuel Pablo, Laura Job, Elena Ilyukhina für die zahlreichen Tipps und Diskussionen bedanken.

Hervorheben und danken möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biologische Chemie, insbesondere Theresia Wiedemann und Martina Dotzauer für das Bereitstellen exzellenter Verbrauchsmittel und die bestärkenden Gespräche. Außerdem möchte ich mich auch besonders bei Stefan Achatz für die pausenlose Unterstützung bei der massenspektrometrischen Analyse und seinen Sinn für gute Witze bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Ina Theobald, Klaus Wachinger und insbesondere Dr. Martin Schlapschy für die unentwegte Unterstützung im Labor und bereichernden Diskussionen.

Ebenso danke ich allen Ehemaligen des Lehrstuhls für Biologische Chemie für Ihre Kollegialität und Unterstützung, insbesondere Dr. Sven Vopel für die Übernahme der Mentorenfunktion.

Bei Lisa Bock bedanke ich mich für die hervorragende Zusammenarbeit und ihren Beitrag zu meinem Promotionsvorhaben im Rahmen ihres Forschungspraktikums.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Durch ihren Beistand und Vertrauen in meine Fähigkeiten boten sie mir wertvolle Unterstützung und gaben mir Kraft schwierige Phasen zu meistern.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Julia für ihre unglaubliche Geduld, Verständnis und Vertrauen bedanken. Du hast mir gezeigt, was man alles erreichen kann.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

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.

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.

Köhler A., **Escher B.**, Job L., Koller M., Thiermann H., Skerra A., Worek F. (20xx) Catalytic Activity of Optimized Phosphotriesterase Mutants towards Structurally Different Nerve Agents in Vitro. *In Vorbereitung*

Job L., Köhler A., Testanera M., **Escher B.**, Worek F., Skerra A. (20xx) Engineering of a Phosphotriesterase with Enhanced Activity Towards Malaoxon and Higher Stability. *In Vorbereitung*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Organophosphatverbindungen (OPs) als Nervenkampfstoffe und Pestizide	1
1.2	Konventionelle Behandlung von OP-Vergiftungen durch Acetylcholinesterase-Reaktivatoren	3
1.3	Konzepte des <i>Bioscavenging</i> zur Neutralisierung von OPs	5
1.4	Katalytisches <i>Bioscavenging</i> durch bakterielle Enzyme	7
1.4.1	Die Phosphotriesterasen aus <i>Brevundimonas diminuta</i> (BdPTE) und <i>Agrobacterium radiobacter</i> (OpdA)	7
1.4.2	Die Metallo- β -Lactamase Ophc2	10
1.4.3	Die Prolidase OpaA	11
1.4.4	Die Oxidoreduktase CotA	11
1.5	Verbreiterung des Substratprofils von Biokatalysatoren durch Übertragung des Konzepts bispezifischer Antikörper	12
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Bakterienstämme und Plasmide	14
2.1.2	Gensynthesen und Oligodesoxynukleotide	14
2.1.3	Enzyme und sonstige Proteine	18
2.1.4	Chemikalien	19
2.1.5	Standards und Kits	21
2.1.6	Geräte	21
2.1.7	Verbrauchsmaterial	23
2.1.8	Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	25
2.2	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	30
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	31
2.2.3	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	31
2.2.4	Gelelektrophorese und Reinigung von DNA	32
2.2.4.1	Analytische Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.4.2	Präparative Agarose-Gelelektrophorese	32
2.2.4.3	Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese	33
2.2.4.4	Reinigung von Oligodesoxynukleotiden	33
2.2.5	<i>In vitro</i> -Modifizierung von DNA	34
2.2.5.1	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.2.5.2	Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	34
2.2.5.3	Ligierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.5.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen	35
2.2.5.5	Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren	36
2.2.5.6	Konstruktion von PAS-Genkassetten verschiedener Länge	37
2.2.6	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	37

2.3	Gentechnische Methoden	38
2.3.1	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	38
2.3.1.1	Anzucht, Induktion und Ernte von <i>E. coli</i> -Kulturen im Schüttelkolben	38
2.3.1.2	Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter	40
2.4	Proteinchemische Methoden.....	41
2.4.1	Chromatographische Verfahren.....	41
2.4.1.1	Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose.....	41
2.4.1.2	Anionenaustauschchromatographie.....	42
2.4.1.3	Größenausschlusschromatographie	43
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.4.3	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	45
2.4.4	Konzentrierung von Proteinlösungen	45
2.4.5	Verringerung und Kontrolle des Entoxingehaltes	46
2.5	Enzymatische Aktivitätsanalysen.....	46
2.6	Biophysikalische Methoden	47
2.6.1	Massenspektrometrie	47
2.6.2	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	48
2.7	Computerprogramme und Datenbanken.....	49
3	Ergebnisse.....	50
3.1	Evaluierung bakterieller Enzymkandidaten als katalytische Bioscavenger	50
3.1.1	Gentechnische Produktion und Reinigung der Phosphotriesterasen BdPTE und OpdA	50
3.1.2	Gentechnische Produktion und Reinigung der Metallo- β -Lactamase Ophc2	52
3.1.3	Gentechnische Produktion und Reinigung der Oxidoreduktase CotA	52
3.1.4	Gentechnische Produktion und Reinigung der Prolidase OpaA.....	52
3.1.5	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung der Enzymkandidaten	54
3.2	Design und Entwicklung einer heterodimeren <i>single-chain</i> PTE (scPTE) mit verbreitertem Substratspektrum gegenüber Nervenkampfstoffen	56
3.2.1	Konstruktion eines modularen Expressionsvektors für die bakterielle Produktion einer scPTE aus den Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A).....	57
3.2.2	Gentechnische Produktion und Reinigung von scPTE-Varianten mit PAS-Linkern verschiedener Länge	58
3.2.3	Biochemische und biophysikalische Charakterisierung	61
3.3	Stabilisierung der intramolekularen Heterodimerisierung der scPTE(PAS100) durch rationales Protein- <i>Engineering</i>	64
3.3.1	Einführung steuernder Mutationen an der Dimerrenzfläche nach dem Prinzip des <i>Electrostatic Steering</i>	64
3.3.1.1	Einfluss der steuernden Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten	66
3.3.1.2	Einfluss der steuernden Mutationen auf die katalytische Effizienz	69
3.3.2	Kovalente Verknüpfung der PTE-Untereinheiten durch Disulfid- <i>Engineering</i>	70
3.3.2.1	Nachweis der ausgebildeten Disulfidbrücke	71
3.3.2.2	Einfluss der eingeführten Disulfidbrücke auf das Dimerisierungsverhalten und die katalytische Effizienz	72
3.3.3	Untersuchungen zur Thermostabilität der neuen scPTE(PAS100)-Varianten.....	74

3.4	Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit einer scPTE-Variante mit Hilfe der <i>PASylation</i> -Technologie	75
3.4.1	Konstruktion des Expressionsvektors für eine PASylierte Variante aus den PTE-Mutanten C23 und 10-2-C3(I106A) und gentechnische Produktion	75
3.4.2	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung.....	77
3.5	Konstruktion einer heterodimeren bispezifischen PTE mit erweitertem Substratprofil gegenüber Nervenkampfstoffen und Pestiziden	78
3.5.1	<i>Engineering</i> einer hdPTE*(PAS100) Variante mit steuernden Mutationen aus der PTE-Variante 10-2-C3(I106A) und einer verbesserten OpdA-Mutante	79
3.5.2	<i>Engineering</i> einer durch steuernde Mutationen stabilisierten zweikettigen Variante (hdPTE*).....	81
3.5.3	Untersuchungen zur Thermostabilität der heterodimeren PTE-Varianten.....	84
3.5.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität	85
4	Diskussion	89
4.1	Design artifizieller bispezifischer Biokatalysatoren	89
4.2	Stabilisierung der Heterodimerisierung artifizieller bispezifischer Proteine.....	91
4.3	Das Potential hochaktiver Biokatalysatoren hinsichtlich pharmazeutischer Produktion und therapeutischen Einsatzes	94
4.4	Weitere biotechnologische Anwendungsgebiete OP-abbauender Bakterien und Enzyme..	96
5	Zusammenfassung.....	99
6	Abkürzungsverzeichnis	101
7	Literaturverzeichnis.....	104

1 Einleitung

1.1 Organophosphatverbindungen (OPs) als Nervenkampfstoffe und Pestizide

Die Entdeckung der ersten hochtoxischen OPs in den 1930er Jahren durch den deutschen Chemiker Gerhard Schrader ebnete den Weg für deren Weiterentwicklung und die bis zum heutigen Tag anhaltende Nutzung als Nervenkampfstoffe sowie Pestizide (Szinicz, 2005). Obwohl Nervenkampfstoffe als Massenvernichtungswaffen deklariert und durch die internationale Chemiewaffenkonvention strikt reguliert sind, finden sich noch immer große Lagerstätten hochgiftiger Organophosphatverbindungen, und relativ einfache Rezepte für die illegale Synthese sind öffentlich zugänglich (Elsinghorst et al., 2013; Gupta, 2020). OPs stellen also eine ernstzunehmende Gefahr für die Bevölkerung sowohl durch Missbrauch in militärischen Konflikten als auch aufgrund einer möglichen Nutzung durch terroristische Aktivitäten dar (Gupta, 2020). So forderte der Einsatz des Kampfstoffes Sarin während des syrischen Bürgerkriegs mehr als 1.000 Todesopfer (Eisenkraft *et al.*, 2014). Weiterhin werden in Entwicklungsländern aber auch vereinzelt in Industrienationen bestimmte weniger toxische OPs großflächig als Pestizide eingesetzt. Dabei führt die unzureichende Ausbildung der Arbeiter im Umgang mit OPs wie auch die Einnahme mit suizidaler Absicht zu mehr als

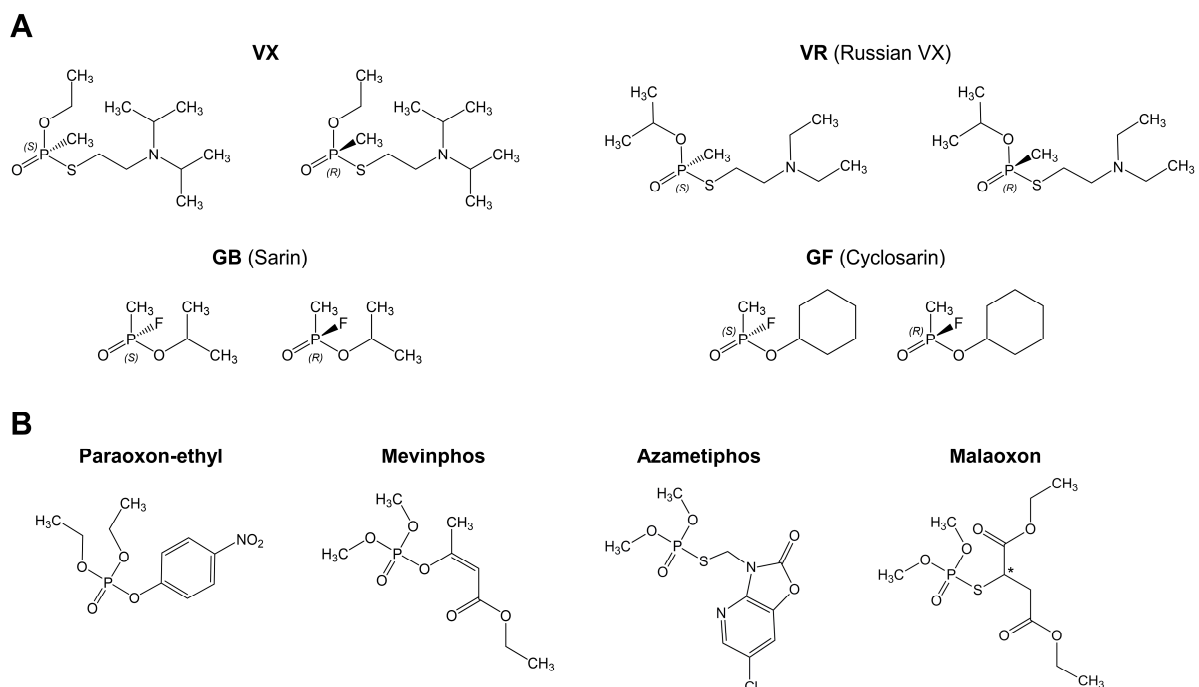


Abbildung 1. Übersicht der chemischen Strukturen relevanter OP-Kampfstoffe und -Pestizide. (A) Chemische Strukturen der OP-Kampfstoffe der V (*venomous*) und der G (*German*) Serie. Dabei zeichnet sich die V-Serie durch eine Thioesterbindung an der Methylphosphonsäure-Gruppe aus, die G-Serie dagegen durch einen Fluorsubstituenten. Beide Gruppen haben ein chirales Phosphoratom, wobei im ersteren Fall das Sp-Isomere das giftigere Enantiomer darstellt. (B) Strukturformeln der bis heute am häufigsten eingesetzten OP-Pestizide. Diese Diethyl- bzw. Dimethylphosphonsäuren enthalten entweder eine Ester- (Paraoxon, Mevinphos) oder eine Thioesterbindung (Azametiphos, Malaoxon).

100.000 Opfern pro Jahr und unzähligen an Langzeitschäden leidenden Personen (Mew *et al.*, 2017).

Den von Schrader entdeckten G (*German*)-typischen Kampfstoffen werden neben Sarin (GB) die Verbindungen Tabun (GA), Soman (GD) und Cyclosarin (GF) zugeordnet. Das erste Mitglied der weiterentwickelten und deutlich giftigeren V (*venomous*)-typischen Kampfstoffe, VX, wurde erstmals in den 1950er Jahren in Großbritannien industriell synthetisiert (Croddy & Wirtz, 2005). In den kommenden Jahrzehnten folgten weitere Verbindungen, wie z.B. das in Russland entwickelte VR (Gupta, 2020). OP-Kampfstoffe sind hauptsächlich schwefel- (V-Serie) oder fluorsubstituierte (G-Serie) Methylphosphonsäuren mit einem zentralen chiralen Phosphor, wobei das S_p-Isomer die toxischere Spezies darstellt (**Abbildung 1**). Die weniger giftigen OP-Pestizide bestehen meist aus einer Diethyl- bzw. Dimethylphosphonsäure mit einer Thioester- oder gewöhnlichen Ester-Abgangsgruppe.

Die G-typischen Kampfstoffen liegen durch ihren hohen Dampfdruck gasförmig vor, sodass diese bei Exposition hauptsächlich über den oberen Atemtrakt oder die Augenschleimhäute aufgenommen werden (Cannard, 2006; Gupta, 2020). V-typische Kampfstoffe werden hingegen als „persistierende Kampfstoffe“ bezeichnet, da diese eine deutlich geringere Volatilität und höhere Stabilität aufweisen (Butrow *et al.*, 2009). Aus diesem Grund erfolgt deren Aufnahme hauptsächlich auf perkutanem Wege, z.B. nach Kontakt mit dem Giftstoff als Aerosol (Craig *et al.*, 1977; Gupta, 2020). Über das Blut werden die OPs nach Resorption zu neuronalen Synapsen bzw. neuromuskulären Endplatten transportiert, wo die im synaptischen Spalt befindliche Acetylcholinesterase (AChE) durch Phosphorylierung des katalytischen Ser200 kovalent inhibiert wird (Sirin *et al.*, 2012). Dabei attackiert dessen funktionelle Hydroxylgruppe das zentrale Phosphoratom des OPs nukleophil, woraufhin die durch die OP-Art bestimmte Abgangsgruppe abgespalten wird (**Abbildung 2**). Aufgrund des damit gehemmten Abbaus des Neurotransmitters Acetylcholin kommt es zu einer kontinuierlichen Stimulierung der muskarinischen bzw. nikotinischen Acetylcholinrezeptoren im synaptischen Spalt, sodass durch die permanente Erregungsweiterleitung eine cholinerge Krise ausgelöst

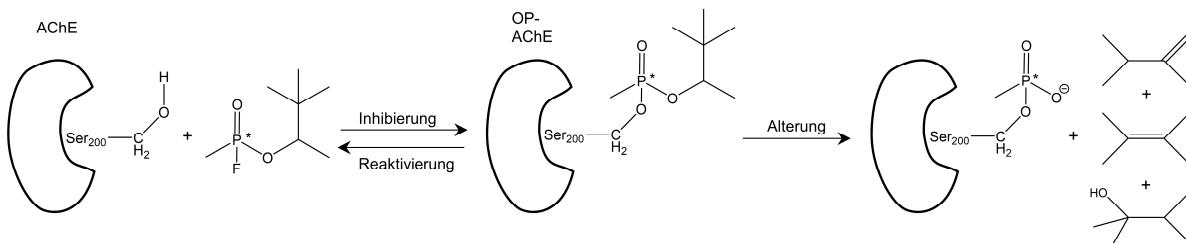


Abbildung 2. Inhibierung der Acetylcholinesterase (AChE) durch den G-typischen Kampfstoff Soman (GD) modifiziert nach Sirin *et al.* (2012). Die funktionelle Gruppe des katalytischen Rests Ser200 greift OPs nukleophil am chiralen Phosphoratom an, woraufhin in diesem Fall ein Fluorid-Ion als Abgangsgruppe fungiert. Das entstehende OP-AChE-Konjugat ist nun kovalent inhibiert und kann im Prinzip durch spontanen Zerfall oder sog. Oxim-Reaktivatoren wieder aktiviert werden. Allerdings kann die OP-AChE durch die spontan ablaufende Dealkylierungsreaktion irreversibel gehemmt werden (Alterung), wobei die Geschwindigkeit dieser Reaktion von der Art der Alkoxygruppe des OPs abhängt.

wird. Je nach Intensität der OP-Exposition führt diese durch Ersticken zum sofortigen Tod oder zu schweren neurologischen Langzeitschäden (Grob, 1956; Gupta, 2020). Die entstandenen OP-AChE-Konjugate können zudem eine Dealkylierungsreaktion unterlaufen, die zu irreversibler Inhibierung in Form einer „gealterten“ AChE führt. Die Geschwindigkeit dieser Dealkylierungsreaktion des OP-AChE-Komplexes wird durch die Art der Alkoxygruppen des gebundenen OP bestimmt (Sirin *et al.*, 2012).

Zur groben Einschätzung der potenziellen Toxizität von OPs kann die *in vitro* mit isolierter humaner AChE bestimmte bimolekulare Inhibierungsrate k_i herangezogen werden. So hemmt z.B. der V-typische Kampfstoff VR AChE-Moleküle mit einem Wert von ca. $4600 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ um den Faktor 12 schneller als das G-typische Sarin, wohingegen Paraoxon-ethyl eine für OP-Pestizide typische eher niedrige Rate von ca. $33 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufweist (Worek *et al.*, 2020). Letztlich hängt die tatsächliche Toxizität *in vivo* aber nicht nur vom reinen Inhibierungspotenzial sondern von mehreren sich beeinflussenden Parametern ab, wie z.B. chemische bzw. biologische Stabilität, Lipophilie, Art bzw. Intensität der Exposition sowie der Geschwindigkeit der AChE-Alterung (Rice, 2016). Gerade die Kombination aus hoher biologischer Stabilität, Lipophilie und potentem Inhibitionseffekt macht die V-typischen Kampfstoffe zu den giftigsten bekannten Verbindungen (Gupta, 2020).

1.2 Konventionelle Behandlung von OP-Vergiftungen durch Acetylcholinesterase-Reaktivatoren

Neben der Entdeckung und Weiterentwicklung der OP-Kampfstoffe begann in den 1950er Jahren auch die Suche nach einem wirksamen Gegengift für Intoxikationen durch OP-Verbindungen. Im Zuge dessen wurden die Oxim-Derivate Pralidoxim (2-PAM) (Childs *et al.*, 1955; Wilson & Ginsburg, 1955) und Obidoxim entdeckt (Eyer & Worek, 2007) (**Abbildung 3**), die bis heute zusammen mit einem muskarinischen Antagonisten, wie z.B. Atropin, und Benzodiazepinen den Kern der Standardtherapie bei OP-Vergiftungen darstellen (Eyer, 2003). In den folgenden Jahren wurde die Zahl der Oxime durch Trimedoxim (TMB-4), Methoxim (MMB-4) und HI-6 zu den sog. „Big Five“ erweitert (Eyer & Worek, 2007).

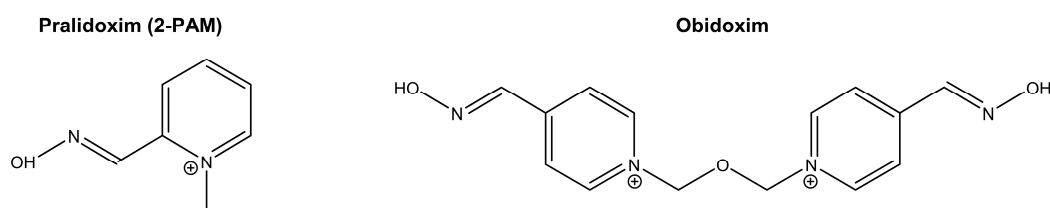


Abbildung 3. Strukturformeln der hauptsächlich zur Therapie von OP-Vergiftungen eingesetzten Acetylcholinesterase-Reaktivatoren Pralidoxim (2-PAM) und Obidoxim. Bei den Verbindungen handelt es sich um Oxim-Derivate, die ein kovalent inhibiertes OP-AChE-Molekül durch Regenerierung des katalytischen Ser200 reaktivieren können. Nach der sog. chemischen Alterung ist die AChE jedoch irreversibel geschädigt und wird durch Oxime nicht mehr reaktiviert.

Oxime agieren im Vergiftungsfall als sog. Reaktivatoren des inhibierten AChE-Konjugats, indem die Hydroxylgruppe des Oxims das Phosphoratom der OP-AChE nukleophil angreift, woraufhin das Enzym mit wiederhergestelltem katalytischen Ser200 aus dem Komplex entlassen wird (Hobbiger, 1963). Die so reaktivierte AChE kann den physiologischen Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin wieder aufnehmen, sodass die pathologische Erregungsweiterleitung und die neuromuskulären Symptome reduziert werden. Atropin sorgt für die Hemmung der muskarinartigen Wirkung der überhöhten Acetylcholin-Konzentration im synaptischen Spalt durch kompetitive Inhibierung der Acetylcholinrezeptoren, womit die überhöhte Signalübertragung eingedämmt wird (Eyer, 2003). Die sofortige Verabreichung von Oximen und Atropin kann bei einer akuten OP-Vergiftung lebensrettend wirken (Thiermann *et al.*, 2016), allerdings offenbart diese Strategie bei genauerer Betrachtung deutliche Schwächen. So ist das Reaktivierungspotenzial der Oxime sowohl durch die Art des eingesetzten OPs als auch durch dessen Alterungskinetik eingeschränkt (Nachon *et al.*, 2013; Worek & Thiermann, 2013). Dementsprechend verlangt z.B. der Kampfstoff Soman mit einer Alterungshalbwertszeit von nur ~ 2 min eine sofortige Behandlung mit dem geeigneten Reaktivator (Worek & Thiermann, 2013). Weitere den reaktivierenden Effekt mindernde Eigenschaften von Oxim-Derivaten sind neben der schlechten Penetration der Blut-Hirn-Schranke ihre limitierte Stabilität *in vivo* (Worek *et al.*, 2020).

Der Nutzen der Oxime bei OP-Vergiftungen, insbesondere durch Pestizide, ist nach wie vor Gegenstand der Diskussion unter Toxikologen (Bajgar *et al.*, 2007; Eddleston *et al.*, 2005). So werden durch die Gabe solcher Reaktivatoren und die Behandlung des Acetylcholinüberschusses mit antinikotinischen, antimuskarinischen sowie antikonvulsiven Substanzen akute und subletale Symptome zwar abgeschwächt, irreversible neurologische Schäden allerdings nicht verhindert (Nachon *et al.*, 2013). Erkenntnisse aus kleineren Studien bzw. Fallberichten zeigten, dass die Behandlung mit Oximen bei schweren Vergiftungen durch OP-Pestizide aufgrund noch nicht verstandener Kausalitäten meist versagt (Eddleston *et al.*, 2002; Peter *et al.*, 2006; Banerjee *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Die Entwicklung dringender benötigter neuartiger Oxime oder alternativer Reaktivatoren mit verbesserten Eigenschaften verläuft schleppend und brachte bisher keinen Kandidaten hervor, der die oben genannten Nachteile umgeht (Worek *et al.*, 2020). Momentan wird zur Abdeckung eines breiteren Spektrums an OP-Verbindungen, und auch um der unterschätzten Gefahr durch OP-Pestizide gerecht zu werden, die Verabreichung einer Mischung aus zwei Oximen mit komplementären Substratprofilen, wie z.B. Pralidoxim und HI-6, in Betracht gezogen (Worek *et al.*, 2016a; Caisberger *et al.*, 2018).

1.3 Konzepte des *Bioscavenging* zur Neutralisierung von OPs

Das neuartige Konzept des *Bioscavenging* zur Behandlung von OP-Vergiftungen hat in letzter Zeit zunehmende Aufmerksamkeit erfahren. Diese Herangehensweise nutzt Proteine bzw. Enzyme, die OP-Verbindungen im Blut inaktivieren, bevor die AChE in den verschiedenen Nervengeweben erreicht und inhibiert wird. Die verschiedenen Klassen an *Bioscavengern* machen OPs auf stöchiometrische, pseudokatalytische oder katalytische Weise unschädlich (**Abbildung 4 A-C**) und zeigten bislang effektive Wirkung bei der Verhinderung von OP-Vergiftungen in Menschen- als auch Tierversuchen (Masson & Rochu, 2009; Nachon *et al.*, 2013). In Folgendem werden die einzelnen Konzepte der unterschiedlichen *Bioscavenging*-Wirkweisen näher vorgestellt.

Stöchiometrische *Bioscavenger* binden OP-Verbindungen irreversibel im aktiven Zentrum in einem Mol-zu-Mol-Verhältnis. Dabei wird das Enzym nach oben dargestelltem Schema rapide inhibiert (s. **Abbildung 2**) und bildet einen stabilen OP-Enzym-Komplex aus, der je nach OP-Art mehr oder weniger schnell eine Alterungsreaktion durchläuft. Bei Behandlungsversuchen im Menschen mit humanem Plasma stellte sich heraus, dass die humane Butyrylcholinesterase (huBChE) OP-Verbindungen im Blut durch stabile Bindung unschädlich machte (Masson & Rochu, 2009; Güven *et al.*, 2004). Dabei liegt die huBChE als tetramere Serinesterase mit einer Konzentration von 50 nM im menschlichen Plasma vor (Lockridge, 1990). Auch in Tierstudien zeigte die huBChE schützende Funktion vor OP-Vergiftung, durch z.B. Sarin, Soman oder VX, bei prophylaktischer Gabe (Saxena *et al.*, 2011a; Saxena *et al.*, 2011b). Aufgrund der stöchiometrischen Komplexbildung müssten für eine protektive Behandlung einer zweifachen LD₅₀-Dosis des Nervenkampfstoffs Soman einer 70 kg schweren Person allerdings 200 mg huBChE injiziert werden (Ashani & Pistinner, 2004). Die pharmazeutische Aufbereitung nativer huBChE ist aber äußerst kostenintensiv, da die aus menschlichem Plasma gewonnenen Ausbeute sehr gering ist (7-9 g pro 100 kg Cohn-Fraktion IV-Paste; > 2000 \$ pro Dosis) (Saxena *et al.*, 2010). Versuche der biotechnologischen Produktion einer rekombinanten huBChE in mehreren Organismen und mit unterschiedlichen Expressionssystemen, v. a. in der Milch transgener Ziegen (Huang *et al.*, 2007), blieben aufgrund schlechter Durchführbarkeit bzw. mangelnder ökonomischer Effizienz erfolglos (Nachon *et al.*, 2013). Die Möglichkeit einer Gentherapie für die transiente Produktion von funktioneller huBChE *in vivo* ist Gegenstand aktueller Forschung und würde die Produktionskosten deutlich senken (Medina-Jaszek *et al.*, 2016), steht aber vor unüberwindbaren regulatorischen Hürden. Auch die lösliche extrazelluläre Domäne der humane AChE (huAChE) wird aktuell als stöchiometrischer *Bioscavenger* zur Behandlung von OP-Vergiftungen untersucht (Masson & Nachon, 2017).

Um die für eine schützende Prophylaxe oder Behandlung benötigte Menge an stöchiometrischem *Bioscavenger* zu reduzieren, zielt das pseudokatalytischen *Bioscavenging* auf die Regenerierung des eingesetzten *Scavengers* ab. Dabei wird der OP-huBChE-Komplex

durch die gleichzeitige Gabe von Oximen reaktiviert (Nachon *et al.*, 2013). Für einen optimalen pseudokatalytischen Effekt sollten sich die Inhibierungs- und die letztlich geschwindigkeitsbestimmende Reaktivierungsrate in derselben Größenordnung befinden (Kovarik *et al.*, 2010), sodass speziell für die huBChE geeignete Reaktivatoren entwickelt werden mussten. Dabei zeigte eine Behandlung mit einer Mischung aus huBChE und entsprechenden nicht auf Pyridinium basierenden Oximen sowohl vor als auch nach Sarin- bzw. Paraoxon-Exposition verbesserte Vitalwerte bei Mäusen (Radić *et al.*, 2013). Allerdings muss beim Einsatz von huAChE oder huBChE zum pseudokatalytischen *Scavenging* die zur irreversiblen Hemmung führende Dealkylierungsreaktion beachtet werden. Durch Protein-*Engineering* wurden daher AChE-Varianten entwickelt, die sowohl eine langsamere Alterung als auch ein für Reaktivatoren besser zugängliches aktives Zentrum aufweisen (Cochran *et al.*, 2011). Die Suche nach verbesserten Reaktivatoren bzw. dealkylierungsresistenten Enzymen sowie die schnelle Ausscheidung der verabreichten Oxime limitieren den Erfolg des pseudokatalytischen *Bioscavenging* bislang deutlich (Masson & Nachon, 2017).

Das katalytische *Bioscavenging* erwies sich demgegenüber als das vielversprechendste Konzept zur Neutralisierung von OP-Verbindungen. Hierbei spalten geeignete Enzyme die P-O- oder P-S-Bindung der OPs und bauen diese so zu weniger toxischen Verbindungen ab (**Abbildung 4 D**) (Wong & Gao, 2007). Auf diese Weise können katalytische *Bioscavenger* ein Vielfaches an OP-Molekülen inaktivieren, was einen deutlich besseren Schutz bei OP-Vergiftungen gegenüber einem stöchiometrischen *Scavenger* bietet (Masson & Nachon, 2017; Worek *et al.*, 2016b). Einen aussichtsreichen Kandidaten für das katalytische *Bioscavenging* stellt die im

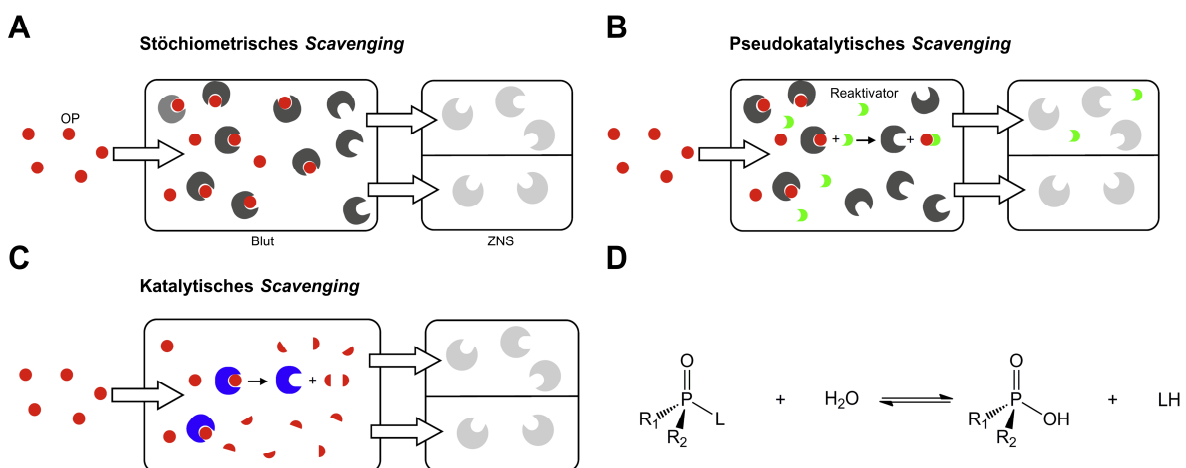


Abbildung 4. Konzepte des *Bioscavenging* zur Neutralisierung von OP-Verbindungen. (A) Beim stöchiometrischen *Scavenging* bindet ein Enzym (z.B. huBChE) irreversibel ein OP-Molekül im Blutstrom, sodass dieses nicht in das Nervensystem gelangen und seinen toxischen Effekt ausüben kann. (B) Beim pseudokatalytischen *Scavenging* wird der stöchiometrisch eingesetzte *Scavenger* zusammen mit einem Reaktivator (z.B. Oxim) appliziert, sodass das Enzym nach Bindung eines OP durch Freisetzung des katalytischen Serins wieder reaktiviert wird. (C) Katalytische *Bioscavenger* ermöglichen dagegen eine effiziente wiederholte hydrolytische OP-Degradierung zu weniger toxischen Verbindungen bei gleichzeitig geringerer Enzymdosis. Schemata modifiziert nach Nachon *et al.* (2013). (D) Reaktionsgleichung zur hydrolytischen Spaltung von OPs durch katalytische *Bioscavenger* (L = Halogen, Alkohol- bzw. Thiolabgangsgruppe).

humanen Plasma vorkommende Paraoxonase PON-1 dar (La Du *et al.*, 1993; Gan *et al.*, 1991). Das natürliche Enzym zeigt promiskuitive Substraterkennung und hydrolysiert verschiedene OPs, was einen guten Ausgangspunkt für Aktivitäts-*Engineering* bietet. Klinisch einsetzbare *Bioscavenger* sollten eine katalytische Effizienz von mindestens $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ aufweisen, um bei noch gut verabreichbaren Enzymdosen einen schützenden Effekt zu ermöglichen (Worek *et al.*, 2016b; Ashani *et al.*, 2016). In der Tat spaltete eine Variante der PON-1 die meisten G-typischen Kampfstoffe mit der geforderten Rate (Goldsmith *et al.*, 2012) und sorgte für effektiven Schutz gegen Cyclosarin in Meerschweinchen (Worek *et al.*, 2014a). Allerdings hydrolysierte keine der entwickelten Varianten die für die V-Kampfstoffe typische S-P-Bindung. Des Weiteren war wie bei der huBCh E die gentechnische Produktion und Lagerung der PON-1 aus Gründen der Stabilität nicht ohne weiteres möglich, sodass schon früh neben diesem menschlichen auch bakterielle Enzyme in den Fokus der Forschung hinsichtlich der Detoxifizierung von OPs gerieten (Masson & Nachon, 2017).

1.4 Katalytisches *Bioscavenging* durch bakterielle Enzyme

Obwohl OPs synthetischen Ursprungs sind, wurden seit den 1970er Jahren viele OP-abbauende Enzyme in bakteriellen Mikroorganismen identifiziert, wobei die physiologische Bedeutung bis heute unklar ist. Vermutlich verschafften Vorläuferenzyme, die unspezifisch OP-Verbindungen umsetzen können, einen selektiven Vorteil, sodass die rapide evolutionäre Anpassung dieser Enzyme begünstigt wurde (Singh & Walker, 2006; Singh, 2009). Singh (2009) erstellte einen Stammbaum potenzieller katalytischer *Bioscavenger* aus Gensequenzen mikrobieller Phosphotriesterasen (PTE; EC 3.1.8) und teilte diese in Abhängigkeit der genetischen Sequenzähnlichkeit in Klassen ein. Für die vorliegende Arbeit wurde ein für jede dieser Klassen repräsentatives Enzym ausgewählt und untersucht. Außerdem wurde ein etwas exotischer Kandidat für katalytisches *Bioscavenging*, die Laccase CotA (EC 1.10.3.2), näher betrachtet, die OPs nicht hydrolytisch sondern oxidativ spaltet (Yang *et al.*, 1990).

1.4.1 Die Phosphotriesterasen aus *Brevundimonas diminuta* (BdPTE) und *Agrobacterium radiobacter* (OpdA)

Bei den Hydrolasen BdPTE aus *B. diminuta* (Uniprot: P0434) (Serdar *et al.*, 1982) und OpdA aus *A. radiobacter* (Uniprot: Q93LD7) (Horne *et al.*, 2002) handelt es sich um sogenannte Aryldialkylphosphatasen (EC 3.1.8.1), die sich in der Amidohydrolase-Proteinsuperfamilie einordnen (Punta *et al.*, 2012). Beide Phosphotriesterasen besitzen in ihren Ursprungsorganismen ein nach der Translokation in den periplasmatischen Raum prozessiertes N-terminales TAT-Signalpeptid. Die Enzyme weisen eine homologe homodimere

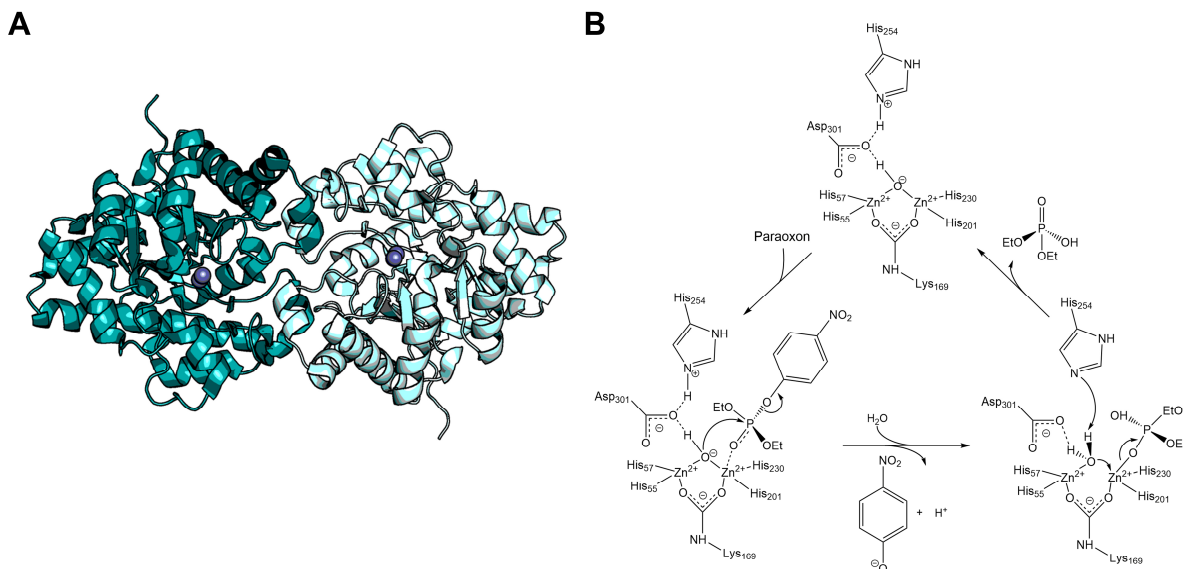


Abbildung 5. Struktur und katalytischer Mechanismus von BdPTE und OpdA. (A) Strukturmodell der homodimeren BdPTE aus *B. diminuta* (PDB: 1HZY) mit zwei für die katalytische Aktivität wichtigen Zn(II)-Ionen im aktiven Zentrum. Aufgrund der hohen Homologie der OpdA und BdPTE sind deren Strukturen nahezu identisch (B) Mechanismus der hydrolytischen Spaltung des OP-Pestizids Paraoxon durch die BdPTE (bzw. OpdA) nach computergestützter Analyse durch Wong & Gao (2007). Eine Besonderheit ist die essentielle posttranslationale Carboxylierung des Lys169 für die Koordination der beiden Zn(II)-Ionen, die wiederum das für die Katalyse wichtige Hydroxid-Ion koordinieren. Dieses spaltet das OP durch nukleophilen Angriff am Phosphoratom nach einem S_N2-Mechanismus in die weniger toxischen Hydrolyseprodukte.

Quartärstruktur mit C₂-Symmetrie auf (**Abbildung 5 A**), wobei die Faltung der Untereinheiten auf einem TIM-Fass basiert (Raushel, 2002; Jackson *et al.*, 2006). Das aktive Zentrum befindet sich am carboxyterminalen Ende des zentralen β -Faltblatt-Kerns und beherbergt ein binukleares Metallzentrum mit zwei durch mehrere His-Reste sowie einen Asp-Rest gebundenen Zn(II)-Ionen. Weiterhin sind die Metallionen über ein Hydroxidion und der für die Aktivität essentiellen Carbamatgruppe des Rests Lys169 koordiniert, die durch posttranslationale Carboxylierung der ϵ -Aminogruppe entsteht. Eine Untereinheit der BdPTE besitzt 336 AS und das Dimer hat eine berechnete Molmasse von ca. 72 kDa. Die homologe OpdA weist ca. 90 % Aminosäuresequenzidentität im Vergleich zur BdPTE und ein zusätzliches 20 AS langes Anhängsel am C-Terminus auf (Raushel, 2002; Yang *et al.*, 2003) (**Abbildung 6**).

Der hydrolytische Mechanismus der Spaltung der P-O- bzw. P-S-Bindung eines OP beginnt mit dem Eintritt des Substrats in das aktive Zentrum, wobei der Phosphoryl-Sauerstoff des OP durch ein Zinkion koordiniert wird. Anschließend greift das von den beiden Zinkionen gebundene Hydroxidion unter Verlust seiner Koordination das Phosphoratom des OP nukleophil an, wobei die Abgangsgruppe (hier Nitrophenol) den Komplex verlässt (S_N2-Mechanismus). Ein neues Wassermolekül koordiniert daraufhin das Zinkion und bildet eine H-Brücke mit Asp301 aus gefolgt von einem Protonentransfer zu His254. Das OP-Spaltungsprodukt verlässt das aktive Zentrum, sodass das Hydroxidion eine Koordinationsverbindung zum zweiten Zink-Ion ausbilden kann (**Abbildung 5 B**) (Wong & Gao, 2007; Ely *et al.*, 2010).


```
          30         40         50         60         70         80         90         100
          *         *         *         *         *         *         *         *
BdPTE      -SIGTGDRINTVRGPITISEAGFTLTTHEHICGSSAGFLRAWPEFFGSRKALAEKAVRGLRRARAAGVRTIVDVSTFDIGR
10-2-C3    -.....A..M.....
10-2-C3(I106A) -.....A..M.....A..
C23        -.....A..V.....
OpdA (LA)  RP.....L.....PV.....H..S...Q.....

          110        120        130        140        150        160        170        180
          *         *         *         *         *         *         *         *
BdPTE      DVSLLAEVSRAADVHIVAATGLWFDPPPLSMRSLRVSVEELTQFFLRREIQYGIEDTGIRAGIIKVATTKGATPFQELVLKAAA
10-2-C3    .....E.....E.....N.....R...
10-2-C3(I106A) .....E.....E.....N.....R...
C23        .....E.....N.....R...
OpdA (LA)  ..R.....M.....H.....

          190        200        210        220        230        240        250        260
          *         *         *         *         *         *         *         *
BdPTE      RASLATGVPVTHTTAASQRDGEQAAIFESEGLSPSRVCIGHSDTDDLSYLTALAARGYLIGLDHIIHSAIGLEDNASA
10-2-C3    .....D.....D.....G...D.....
10-2-C3(I106A) .....D.....D.....G...D.....G.....
C23        .....D.....G.....G.....
OpdA (LA)  .....S.....G.....V...RM.Y...G...

          270        280        290        300        310        320        330        340
          *         *         *         *         *         *         *         *
BdPTE      SALLGIRSWQTRALLIKALIDQGYMKQILVSNDFLFGFSSYVTNIMDVMDRVNPDGMAFIPLRVIPLFLREKGVPOETLAG
10-2-C3    .SW..N.....V.....D.....W.....S.....S.....T
10-2-C3(I106A) .SW..N.....V.....W.....S.....S.....T
C23        ..N.....S.....S.....S.....
OpdA (LA)  L..F.T.....R..KDR...H...LA.....I...V.....P.....

          350        360
          *         *
BdPTE      ITVTNPARFLSPTLRAS-----
10-2-C3    ...E.....
10-2-C3(I106A) ...E.....
C23        .....
OpdA (LA)  V..A.....V..VVTRETSRPAAPIPROQDTER
```

Abbildung 6. Alignment der Aminosäuresequenzen der wtBdPTE, Varianten mit erhöhter Aktivität gegenüber OP-Kampfstoffen und der OpdA(S308L/Y309A); N-terminale TAT-Signalsequenzen wurden entfernt. Konservierte Reste im Vergleich zur obersten Sequenz sind durch Punkte gekennzeichnet. Dieses Alignment wurde mit ANTICALIgN (Jarasch et al., 2016) generiert. Der *Strep*-tag II (WSHPQFEK) (Schmidt & Skerra, 2007) wurde an die N-Termini der jeweiligen Variante angehängt (nicht gezeigt).

Sowohl BdPTE als auch OpdA wurden intensiv durch Protein-Engineering studiert, um mittels gerichteter Evolution höhere katalytische Effizienzen gegenüber den relevanten OPs, vor allem der V-Serie, und mit entsprechender Stereoselektivität zu erreichen (Goldsmith et al., 2012; Bigley et al., 2013; Cherny et al., 2013; Bigley et al., 2015; Goldsmith et al., 2016; Goldsmith et al., 2017). Dabei sind vor allem die daraus resultierenden hochaktiven BdPTE-Mutanten 10-2-C3, die VX mit einer Effizienz von $5,0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ hydrolysiert, als auch die punktmutierte Variante 10-2-C3(I106A) mit zu VR verschobener Substratpräferenz zu nennen (Goldsmith et al., 2017). Beide Varianten wurden aus der Vorläufermutante C23 (Cherny et al., 2013; Goldsmith et al., 2016) erhalten, die ein etwas breiteres Substratprofil mit allgemein weniger hohen Aktivitäten zeigte. Dennoch schützte diese Mutante schon im Tierexperiment erfolgreich vor Vergiftung durch VX (Worek et al., 2014b). Die beschriebenen BdPTE-Varianten zeigten auch gegen fast alle G-Kampfstoffe und Paraoxon eine ähnlich hohe Effizienz, allerdings gegenüber zahlreichen anwendungsrelevanten OP-Pestiziden nur eine geringe hydrolytische Aktivität. Demgegenüber hydrolysierte eine Mutante der OpdA mit den Austausch S308L

und Y309A das häufig eingesetzte Pestizid Malathion mit einer 5000-fach schnelleren Rate als die entwickelten BdPTE-Mutanten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) (Naqvi *et al.*, 2014). Nervenkampfstoffe aber werden von der OpdA und deren Variante nur mit einer Effizienz von deutlich unter $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ abgebaut. Durch das entweder auf OP-Kampfstoffe oder Pestizide spezialisierte Substratprofil der oben beschriebenen Enzyme ist die Suche nach einem Breitband-*Bioscavenger* für den klinischen Einsatz immer noch Gegenstand aktueller Bemühungen.

1.4.2 Die Metallo- β -Lactamase Ophc2

Die Hydrolase Ophc2 (Uniprot: Q5W503) wurde erstmals in Kulturen von *Pseudomonas pseudoalcaligenes* aus mit OP-Insektiziden behandelten Bodenproben als ein in das Periplasma sekretiertes Protein identifiziert und erfuhr bisher wenig Aufmerksamkeit bei der Suche nach katalytischen *Bioscavengern* (Ningfeng *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004). Die Ophc2 gehört wie die BdPTE zur Klasse der Aryldialkylphosphatasen, strukturell allerdings zu der Superfamilie der Metallo- β -Lactamasen (Gotthard *et al.*, 2013). Das Enzym ist ein Homodimer ($M_m = 64 \text{ kDa}$) mit einer für die Familie typischen $\alpha\beta/\beta\alpha$ -Sandwich-Faltung als Tertiärstruktur,

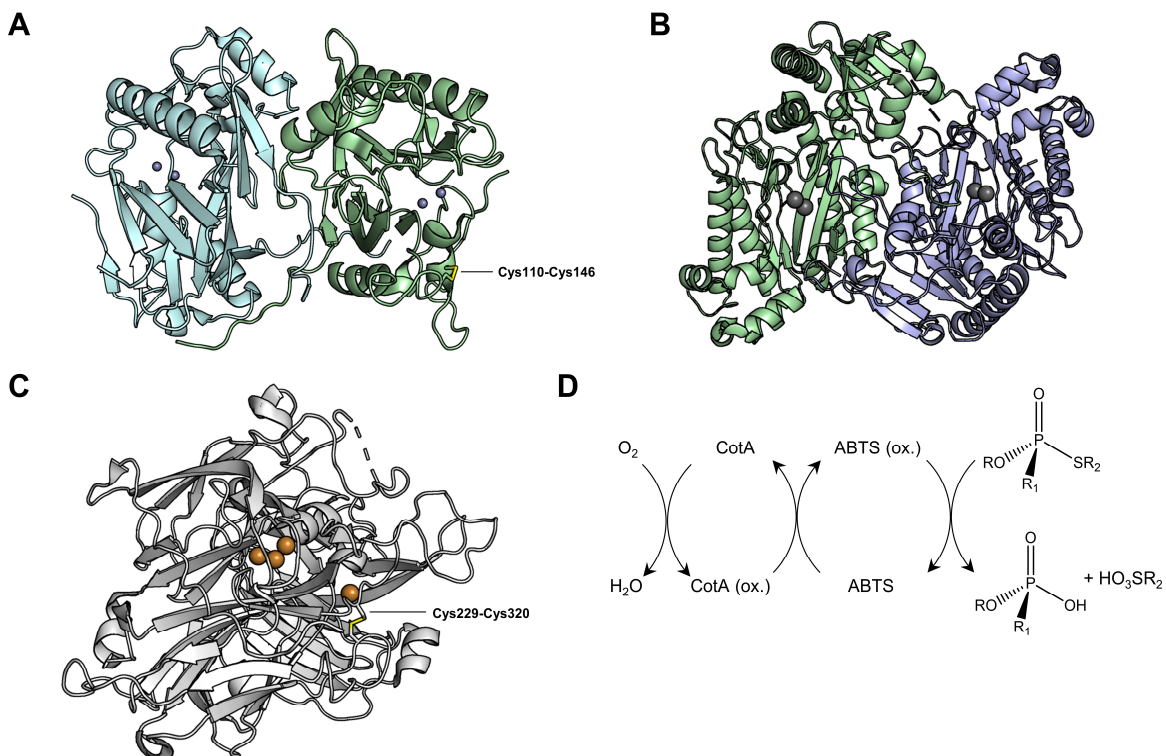


Abbildung 7. Strukturen weiterer Kandidaten für das katalytische *Bioscavenging*. (A) Kristallstruktur der Ophc2 (PDB: 4LE6) aus *P. pseudoalcaligenes*. Das Homodimer weist zwei Zn(II)-Ionen im katalytischen Zentrum und eine Disulfidbrücke zwischen den Cys-Resten 110/146 auf. (B) Kristallstruktur der homodimeren OpaA (PDB: 4ZWP) aus *Alteromonas sp.* mit zwei katalytisch wirkenden Mn(II)-Ionen im aktiven Zentrum. (C) Kristallstruktur der monomeren Laccase CotA (PDB: 1GSK) aus *B. subtilis* mit vier Kupfer-Ionen im aktiven Zentrum und einer Disulfidbrücke zwischen Cys229 und Cys320. Diese inaktiviert OPs nicht durch Hydrolyse, sondern Oxidation mittels Mediators (z.B. ABTS). (D) Zyklus der oxidativen Spaltung eines V-Kampfstoffes. Die CotA oxidiert unter Sauerstoffverbrauch einen Mediator (hier: ABTS). Dieser spaltet das OP wiederum durch Oxidation chemisch und liegt anschließend wieder regeneriert im reduzierten Zustand vor.

wobei sich zwischen den Cysteinresten an Position 110 und 146 eine stabilisierende Disulfidbrücke befindet (**Abbildung 7 A**). Das katalytische Zentrum der Ophc2 ist dem der BdPTE bzw. OpaA trotz unterschiedlicher Tertiärstruktur und Aminosäuresequenz ähnlich. So weist das Enzym in seinem aktiven Zentrum ebenfalls zwei Zink(II)-Ionen auf, die durch mehrere Histidin- und Aspartat-Reste koordiniert werden und das für die Hydrolyse nötige Wassermolekül binden. Es ist davon auszugehen, dass die Ophc2 OP-Verbindungen nach einem mit dem der BdPTE vergleichbaren Mechanismus hydrolysiert (**Abbildung 5 B**). Bisher wurden jedoch noch keine Experimente bezüglich der hydrolytischen Aktivität von Ophc2 gegenüber G- oder V-typischen Kampfstoffen beschrieben.

1.4.3 Die Prolidase OpaA

Zu der Gruppe der Diisopropylfluorophosphatasen (EC 3.1.8.2) gehörende Enzyme wie die Organophosphatanhydrolase OpaA aus *Altermonas sp.* (Uniprot: Q44238) hydrolysieren bevorzugt P-F-, P-CN- oder auch P-O-Bindungen. Deshalb stellt die OpaA einen interessanten Kandidaten für die Detoxifizierung vor allem von G-typischen Kampfstoffen dar (DeFrank & Cheng, 1991). Neben der OP-abbauenden Funktion zeigt die OpaA die Funktion einer Prolidase – eine Xaa-Pro-Dipeptidase (Cheng *et al.*, 1997). So weist das Enzym strukturelle und Sequenzähnlichkeit mit der *E. coli* Amino-peptidase P (EC 3.4.11.9) wie auch mit der menschlichen Prolidase auf (EC 3.4.13.9) (Cheng *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 2010b). Trotzdem ist die Quartärstruktur der OpaA noch nicht vollständig geklärt, wobei Hinweise auf eine Organisation als Homodimer hindeuten (**Abbildung 7 B**) (Vyas *et al.*, 2010b; Vyas *et al.*, 2010a; Daczkowski *et al.*, 2015). Weiterhin hat das Monomer eine Molmasse von 58 kDa mit 517 AS und ist aus einer Amino- und Carboxydomäne mit Pita-Bread-Struktur aufgebaut (Cheng *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 2010b). Dieses Metalloenzym enthält zwei Mn(II)-Ionen im aktiven Zentrum, allerdings wird der katalytische Mechanismus der Hydrolyse immernoch diskutiert.

1.4.4 Die Oxidoreduktase CotA

Die LMCO (*Laccase-like Multicopper Oxidase*) CotA (Uniprot: P07788; EC 1.10.3.2) aus *Bacillus subtilis* (Martins *et al.*, 2002), auch bekannt als *Spore Coat Protein A*, stellt einen vergleichsweise exotischen Kandidaten für einen katalytischen *Bioscavenger* dar, da sich dieses Enzym grundlegend von den Mitgliedern der Phosphotriesterase-Klasse unterscheidet. So wurde gezeigt, dass LCMOs den persistierenden Kampfstoff VX nicht hydrolytisch, sondern oxidativ degradieren (Amitai *et al.*, 1998). Die Oxidoreduktase CotA ist ein Monomer mit einer Molmasse von 65 kDa, weist drei cupredoxinähnliche Domänen auf und beherbergt insgesamt vier für die Katalyse wichtige Kupfer-Ionen (**Abbildung 7 C**) (Enguita *et al.*, 2003). Häufig können Substrate aufgrund ihrer Größe oder durch ihr hohes Redoxpotenzial nicht direkt von

einer LCMO umgesetzt werden, sodass zusätzlich ein sog. chemischer Mediator (z.B. 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure; ABTS) eingesetzt wird (**Abbildung 7 D**). Der durch das Enzym oxidierte Mediator wird durch die ohne katalytische Hilfsmittel stattfindende Oxidation des gewünschten Substrats wieder in die reduzierte Ausgangsform überführt (Kunamneni *et al.*, 2008).

1.5 Verbreiterung des Substratprofils von Biokatalysatoren durch Übertragung des Konzepts bispezifischer Antikörper

Im letzten Jahrzehnt wurden bispezifische Antikörper (bsAks) in der biopharmazeutischen Wirkstoffentwicklung als vielversprechende Werkzeuge für neuartige Behandlungsstrategien etabliert (Labrijn *et al.*, 2019). So vermitteln bsAks beispielsweise im immunonkologischen Bereich die Kontaktbildung zwischen T-Zellen und Krebszellen durch simultane Bindung des CD3-Rezeptors und eines Tumor-Antigens (Strohl & Naso, 2019) (**Abbildung 8**). Weiterhin können durch die Kopplung von zwei unterschiedlichen Paratopen zwei verschiedene krankheitsrelevante Moleküle gleichzeitig neutralisiert werden. Die kurz nach der Erfindung der monoklonalen Antikörper (Kohler & Milstein, 1975) entdeckte inhärente C2-Symmetrie des natürlichweise bivalenten aus zwei Paaren jeweils identischer schwerer und leichter Ketten aufgebauten IgG-Moleküls (Padlan, 1996) konnte für die Generierung von bsAks erfolgreich ausgenutzt werden.

Ähnlich der spezifischen Antigenerkennung monoklonaler Antikörper weisen Biokatalysatoren eine spezifische oder zumindest selektive Substraterkennung auf. Dabei führt die Erhöhung der Enzymaktivität im Verlauf der Proteinevolution oder der gerichteten Evolution *in vitro* meist zu einer Spezialisierung auf eines oder wenige Substrate (Khersonsky & Tawfik, 2010). Dementsprechend stehen für das katalytische *Bioscavenging* nur hochentwickelte Varianten der BdPTE oder OpdA mit einem begrenzten Substratprofil zur Verfügung (Goldsmith *et al.*, 2016; Goldsmith *et al.*, 2017; Ashani *et al.*, 2016).

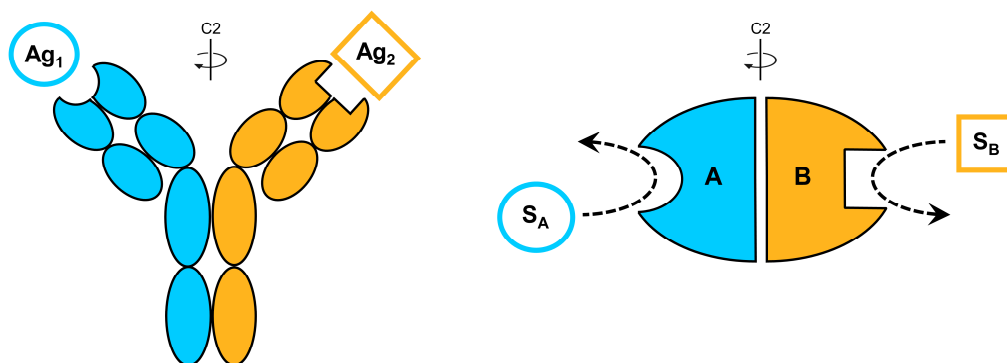


Abbildung 8. Konzeptuelle Analogie zwischen bispezifischen Antikörpern und bispezifischen Enzymen auf der Grundlage einer homodimeren Quartärstruktur, die jeweils zwei unterschiedliche Antigene binden bzw. Substrate umsetzen können. Die artifizielle heterodimere Struktur des bispezifischen Enzyms ermöglicht durch die gebrochene C₂-Symmetrie die Kopplung zweier unterschiedlicher aktiver Zentren hochhomologer Enzymvarianten und damit eine Verbreiterung des Substratprofils.

Gerade aber für den Einsatz in Notsituationen, in denen die Kenntnis über die genaue chemische Identität des eingesetzten OP oft fehlt, stellt dies ein Problem dar. Der Vorschlag, eine Mischung aus mehreren verschiedenen *Bioscavengern* einzusetzen, scheitert an den immensen regulatorischen Anforderungen der biotechnologischen Herstellung, den erforderlichen klinischen Studien sowie dem hohen finanziellen Aufwand für jeden einzelnen der in dieser Mischung enthaltenen biologischen Wirkstoffe.

Eine Übertragung des Protein-*Engineerings* von bsAk auf Biokatalysatoren könnte eine mögliche Lösung für die Verbreiterung des Substratprofils der oben beschriebenen hochentwickelten katalytischen *Bioscavenger* darstellen (**Abbildung 8**). Durch Ausnutzen der homodimeren Quartärstruktur dieser Enzyme kann im Prinzip analog zum bsAk ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten verschiedener Enzymvarianten generiert werden. Der so entstandene „bispezifische“ *Bioscavenger* mit gebrochener C2-Symmetrie sollte durch seine zwei unterschiedlichen aktiven Zentren ein verbreitertes Substratprofil aufweisen, das jeweils die höchsten Aktivitäten beider Enzymvarianten vereint. Im Gegensatz zu einer Mischung aus Enzymen mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften würde ein solcher Breitband-*Bioscavenger* aus einer einzigen wohl definierten biologischen Einheit bestehen, was die regulatorische Zulassung vereinfachen dürfte.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zunächst die als *Bioscavenger* in Frage kommenden Enzyme BdPTE, OpdA, Ophc2, OpaA und CotA in *E. coli* produziert und hinsichtlich ihrer Aktivität und des Substratprofils gegenüber ausgewählten OP-Kampfstoffen und -Pestizide untersucht werden. Anschließend sollten heterodimere *single-chain* PTEs mit verbreitertem Substratprofil generiert werden. Dabei sollte die Heterodimerisierung der beiden verschiedenen Untereinheiten durch rationales Protein-*Engineering* inspiriert durch das Konzept der bsAks stabilisiert werden und die *PASylation*-Technologie zur Vergrößerung des hydrodynamischen Volumens zur Steigerung der Plasmahalbwertszeit angewendet werden. Ziel war schließlich die Entwicklung eines Breitband-*Bioscavengers* mit quasi-nativer Tertiärstruktur und ohne kovalente Verknüpfung der Untereinheiten. Für alle rekombinanten Proteine musste jeweils die heterologe Produktion in *E. coli* und eine Reinigungsstrategie etabliert werden, gefolgt von der biochemischen Charakterisierung.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Plasmide

Escherichia coli-Stämme:

BL21	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsd</i> ΔS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (Studier & Moffatt, 1986)
DH5α	<i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> (Taylor <i>et al.</i> , 1993)
KS272	F ⁻ , Δ <i>lacX74</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>thi</i> , <i>rpsL</i> (<i>StrA</i>), Δ <i>phoA</i> (<i>PvuII</i>) (Strauch & Beckwith, 1988)
Origami B	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>lon</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>lacY1</i> , <i>ahpC</i> , <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> (Kan ^R , <i>tet</i> ^r) (Prinz <i>et al.</i> , 1997)
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 [F ['] : <i>proAB</i> , <i>lacI</i> ^q ΔM15, Tn10(Tet ^R)] (Bullock, 1987)

Bereitgestellte Plasmide:

pASK-IBA4	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA5(+)	IBA GmbH, Göttingen
pXL1-PAS#1.2(200)	XL-Protein GmbH, Freising
pASK-IBA5(+)-10-2-C3	Frau Laura Job, Lehrstuhl für Biologische Chemie, 2018
pASK-IBA5(+)-10-2-C3 (I106A)	Frau Laura Job, Lehrstuhl für Biologische Chemie, 2018
pASK-IBA5(+)-C23	Frau Laura Job, Lehrstuhl für Biologische Chemie, 2018
pTUM4	Herr Dr. Martin Schlapschy, Lehrstuhl für Biologische Chemie (Schlapschy <i>et al.</i> , 2006)

2.1.2 Gensynthesen und Oligodesoxynukleotide

Gensynthesen

Die Gene für die BdPTE (UniProt ID: P0434), CotA (UniProt ID: P07788), OpaA (UniProt ID: Q44238), OpdA (Unitprot ID: Q93LD7) sowie Ophc2 (UniProt ID: Q5W503) wurden optimiert für die heterologe Expression in *E. coli* von der Firma Eurofins Genomics, Ebersberg als doppelsträngige DNA-Fragmente synthetisiert. Genauso wurde eine Gensynthese des Gens für die BdPTE Variante 10-2-C3(I106A) (Gendesign 2; GD2) mit Hilfe des Algorithmus von

GeneArt erstellt und synthetisiert, wobei sich die Codonnutzung soweit von der des Gens für die Variante 10-2-C3 (Gendesign 1, GD1) unterschied, dass eine gezielte Einführung von Punktmutationen mittels der QuikChange-Methode unabhängig voneinander möglich war. Zur Amplifizierung und Klonierung auf den entsprechenden Expressionsplasmiden wurden die Gensequenzen zusätzlich mit den Restriktionsschnittstellen *KasI* und *HindIII* sowie einer D20- bzw. PR1-Bindestelle am 5'- bzw. 3'-Ende versehen. Der Stern im Namen der Primer in der folgenden Liste deutet darauf hin, dass dieser für das GD2 erstellt wurde.

Oligodesoxynukleotide zur DNA-Sequenzierung und Amplifizierung mittels PCR

BE1	5' -TCTAGAGGATCCGGCAGAAGAGCCAGATCTAGCTCTTCTGGCAG CGCTACGCAGTGTCTGGGCTCAG-3'
BE2	5' -TGATTAGGCGCCAGATCTGGATCCATTGGCACCGGTGATCG-3'
BE3	5' -TCTAGAAAGCTTAGGCACGCAGTGTCTGGGC-3'
D20	5' -CCACTCCCTATCAGTGAT-3'
opdA_ <i>AfeI</i> _rev	5' -TCTAGAAGCGCTACGTTTCGGTATCCTGACG-3'
opdA_ <i>BamHI</i> _fwd	5' -AGATCTGGATCCAGACCGATTGGCACCGG-3'
opdA(LA)_ <i>HindIII</i> _rev	5' -TCTAGAAAGCTTAACTTCGGTATCCTGACG-3'
PR1	5' -CGCAGTAGCGGTAAACG-3'
Seq_fwd	5' -TTCAAGAAGCTGGTGCTGC-3'
Seq_GD2.1_rev	5' -AGCAGAGCTACCGCAGAT-3'
Seq_GD2_rev	5' -TGATTCAAAGATGGCAGCT-3'
Seq_rev	5' -GCAGCACCAGTTCTTGAA-3'
tropdA(LA)_ <i>AfeI</i> _rev	5' -TCTAGAAGCGCTAACTGCACGCACGGTC-3'
tropdA(LA)_ <i>HindIII</i> _rev	5' -TCTAGAAAGCTTAACTGCACGCACGGTC-3'

Oligodesoxynukleotide zur Synthese von PAS#1-Genkassetten

PAS#1_fwd	5' -GCCTCTCCAGCTGCACCTGCTCCAGCATCTCCTGCTGCACCAGCTCCG TCTGCTCCTGCT-3'
PAS#2_rev	5' -GGCAGCAGGAGCAGACGGAGCTGGTGCAGCAGGGCTTGCTGGAGCAGG TGCAGCTGGAGA-3'

Oligodesoxynukleotide zur Einführung von Punktmutationen mittels Quik-Change Mutagenese

E71R_fwd	5' -CGTGCATGGCCTCGTTTTTTTTGGTAGCCG-3'
E71R_rev	5' -CGGCTACCAAAAAACGAGGCCATGCACG-3'
E71K_fwd	5' -CGTGCATGGCCTAAATTTTTTTGGTAGCCG-3'
E71K_rev	5' -CGGCTACCAAAAAATTTAGGCCATGCACG-3'
E145N_fwd	5' -CTGCGTAGCGTTGAAAACCTGACCCAGTTTTTTC-3'
E145N_rev	5' -GAAAAAAGCTGGGTCAGGTTTTCAACGCTACGCAG-3'

R152*E_fwd	5'-CACAAATTCCTTTCTTGAAGAGATCCAGTACGGC-3'
R152*E_rev	5'-GCCGTA CTGGATCTCTTCAAGAAAGAATTGTG-3'
R152*D_fwd	5'-CACAAATTCCTTTCTTGATGAGATCCAGTACGGC-3'
R152*D_rev	5'-GCCGTA CTGGATCTCATCAAGAAAGAATTGTG-3'
T311*D_fwd	5'-GGCTTTTCAAGCTGGGTTGATAACATTATGGACGTG-3'
T311*D_rev	5'-CACGTCCATAATGTTATCAACCCAGCTTGAAAAGCC-3'
D133R_fwd	5'-CCGGTCTGTGGGAACGTCCGCCTCTGAGCATG-3'
D133R_rev	5'-CATGCTCAGAGGCGGACGTTCCACAGACCGG-3'
D133K_fwd	5'-CCGGTCTGTGGGAAAAACCGCCTCTGAGCATG-3'
D133K_rev	5'-CATGCTCAGAGGCGGTTTTTCCACAGACCGG-3'
R139*D_fwd	5'-CCTCCGCTGTCAATGGATCTGCGTTCAGTTGAAG-3'
R139*D_rev	5'-CTTCAACTGAACGCAGATCCATTGACAGCGGAGG-3'
R139*E_fwd	5'-CCTCCGCTGTCAATGGA ACTGCGTTCAGTTGAAG-3'
R139*E_rev	5'-CTTCAACTGAACGCAGTTCCATTGACAGCGGAGG-3'
R152E_fwd	5'-GACCCAGTTTTTTTCTGGAAGAAATTCAGTATGG-3'
R152E_rev	5'-CCATACTGAATTTCTTCCAGAAAAAACTGGGTC-3'
R152D_fwd	5'-GACCCAGTTTTTTTCTGGATGAAATTCAGTATGG-3'
R152D_rev	5'-CCATACTGAATTTTCATCCAGAAAAAACTGGGTC-3'
E71*R_fwd	5'-CGTGCCTGGCCACGTTTTTTTCGGTTCACGC-3'
E71*R_rev	5'-GCGTGAACCGAAAAACGTGGCCAGGCACG-3'
T311D_fwd	5'-AGCAGCTGGGTGGATAATATCATGGATGTTATGGATAGCGTTAAT-3'
T311D_rev	5'-GATATTATCCACCCAGCTGCTAAAACCAAACAGCCAATCATTGCT-3'
E145*N_fwd	5'-GTTTCAGTTGAAA ACTTAACACAATTCCTTTCTTCGTGAGATCCAGTACGG-3'
E145*N_rev	5'-GAATTGTGTTAAGTTTTCAACTGAACGCAGGCGCATTGACAGCGG-3'
C59*V_fwd	5'-GAGCATATCGTGGGTAGCTCTGCTGGTTTTTTTACGTGCCTGGC-3'
C59*V_rev	5'-AGAGCTACCCACGATATGCTCATGGGTAAATGTAAAGCCAGCTTCTGAA-3'
C227*V_fwd	5'-GTCACGTGTGGTGATTGGCCATTCAGATGGCACCCGATGATTTAGATTA-3'
C227*V_rev	5'-GGCCAATCACCACACGTGACGGATCTAAACCTTCTGATTCAAAGATGG-3'
S62C_fwd	5'-CATATTGTAGGTAGCTGCGCAGGTTTTTCTGCG-3'
S62C_rev	5'-CGCAGAAAACCTGCGCAGCTACCTACAATATG-3'
S137*C_fwd	5'-GAAGATCCTCCGCTGTGCATGCGCCTGCGTTC-3'
S137*C_rev	5'-GAACGCAGGCGCATGCACAGCGGAGGATCTTC-3'
S137C_fwd	5'-GAAGATCCGCCTCTGTGCATGCGTCTGCGTAGC-3'
S137C_rev	5'-GCTACGCAGACGCATGCACAGAGGCGGATCTTC-3'
S307*C_fwd	5'-GGTTATTTGGCTTTTGTAGCTGGGTTACGAACATTATGG-3'
S307*C_rev	5'-CCATAATGTTTCGTAACCCAGCTACAAAAGCCAAATAACC-3'

L136C_fwd	5'-GAAGATCCGCCTTGCAGCATGCGTCTGCGTAGC-3'
L136C_rev	5'-GCTACGCAGACGCATGCTGCAAGGCGGATCTTC-3'
S308*C_fwd	5'-GGTTATTTGGCTTTTCATGCTGGGTTACGAACATTATGG-3'
S308*C_rev	5'-CCATAATGTTTCGTAACCCAGCATGAAAAGCCAAATAACC-3'
R139E_fwd	5'-GAGCATGGAAGTGCCTAGCGTTGAAGAACTGACCCAGTTTTTTCTGC-3'
R139E_rev	5'-GCTACGCAGTTCATGCTCAGAGGCGGATCTTCCCACAGAC-3'
D133*R_fwd	5'-CTTATGGGAACGTCCTCCGCTGTCAATGCGCCTGCGTTCAGTTG-3'
D133*R_rev	5'-GCGGAGGACGTTCCATAAGCCTGTGGCTGCCACGATATGCAC-3'
S307C_fwd	5'-GATTGGCTGTTTGGTTTTTGCAGCTGGGTGACCAATATC-3'
S307C_rev	5'-GATATTGGTCACCCAGCTGCAAAAACCAAACAGCCAATC-3'
S62*C_fwd	5'-GCATATCGTGGGTAGCTGTGCTGGTTTTTTTACGTG-3'
S62*C_rev	5'-CACGTAAAAAACCAGCACAGCTACCCACGATATGC-3'
S308C_fwd	5'-GGCTGTTTGGTTTTAGCTGCTGGGTGACCAATATCATGG-3'
S308C_rev	5'-CCATGATATTGGTCACCCAGCAGCTAAAACCAAACAGCC-3'
L136*C_fwd	5'-CTTATGGGAAGATCCTCCGCTGCTCAATGCGCCTGCGTTCAG-3'
L136*C_rev	5'-CTGAACGCAGGCGCATTGAGCACGGAGGATCTTCCCATAAG-3'
R152E_fwd	5'-GTTTTTCTGGAAGAAATTCAGTATGGTATTGAAGATACCG-3'
R152E_rev	5'-GAATTTCTTCCAGAAAAAACTGGGTTCAGTTCTTCAACG-3'
R152D_fwd	5'-GTTTTTCTGGACGAAATTCAGTATGGTATTGAAGATACCG-3'
R152D_rev	5'-GAATTTCTTCCAGAAAAAACTGGGTTCAGTTCTTCAACG-3'
E71*K_fwd	5'-CCTGGCCAAAGTTTTTTCGGTTCACGCGCTGCATTAATGGAAAAGG-3'
E71*K_rev	5'-CCGAAAAACTTTGGCCAGGCACGTAAAAAACCAGCAGAGCTACC-3'
R139D_fwd	5'-GAGCATGGATCTGCGTAGCGTTGAAGAACTGACCCAGTTTTTTCTGC-3'
R139D_rev	5'-GCTACGCAGATCCATGCTCAGAGGCGGATCTTCCCACAGAC-3'
D133*K_fwd	5'-CTTATGGGAAAAACCTCCGCTGTCAATGCGCCTGCGTTCAGTTG-3'
D133*K_rev	5'-GCGGAGGTTTTTCCCATAAGCCTGTGGCTGCCACGATATGCAC-3'
opdA_S308L/ Y309A_fwd	5'-CATGATTGGCTGTTTGGTTTTAGCCTCGCTGTGACCAATATTATGGATGT GATG-3'
opdA_S308L/ Y309A_rev	5'-CATCACATCCATAATATTGGTTCACAGCGAGGCTAAAACCAAACAGCCAAT CATG-3'
opdA_E71K_fwd	5'-CTGCGTGCATGGCCTAAATTTTTTGGTAGCCG-3'
opdA_E71K_rev	5'-CGGCTACCAAAAAATTTAGGCCATGCACGCAG-3'
opdA_R152E_fwd	5'-GACCCAGTTTTTTCTGGAAGAAATTCAGCATGG-3'
opdA_R152E_rev	5'-CCATGCTGAATTTCTTCCAGAAAAAACTGGGTC-3'
PTE_A80V_fwd	5'-CGTAAAGCACTGGTAGAAAAAGCAGTGCGTGG-3'
PTE_A80V_rev	5'-CCACGCACTGCTTTTTTCTACCAGTGCTTTTACG-3'
PTE_K185R_fwd	5'-CAAGAAGTGGTTCTGAGAGCAGCAGCACGTG-3'

PTE_K185R_rev 5'-CACGTGCTGCTGCTCTCAGAACCAGTTCTTG-3'

Oligodesoxynukleotide zur Synthese von DNA-Fragmenten

BE_AfeI,His(6x), 5'-GCTTAACGAGGGCAAAAAATGCACCACCATCACCATCACG-3'
BamHI_fwd

BE_AfeI,His(6x), 5'-GATCCGTGATGGTGATGGTGGTGCATTTTTTGGCCCTCGTTAAGC-3'
BamHI_rev

IGRinsert_fwd 5'-GCTTAACGAGGGCAAAAAATGG-3'

IGRinsert_rev 5'-GATCCCATTTTTTGGCCCTCGTTAAGC-3'

Alle Oligodesoxynukleotide wurden von Eurofins Genomics, Ebersberg in RP-HPLC-gereinigter Form bezogen und falls nötig zusätzlich mittels Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt.

2.1.3 Enzyme und sonstige Proteine

β-Amylase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Alkohol-Dehydrogenase (aus Pferdeleber)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Apoferitin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Avidin (aus Eiweiß)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bakterielle alkalische Phosphatase (rekombinant)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Carboanhydrase	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Cytochrom C	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Lysozym (Huhn)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ovalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
<i>Pfu</i> Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase mit dazugehörigem Herstellerpuffer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase mit dazugehörigem Herstellerpuffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Restriktionsendonukleasen mit dazugehörigem Herstellerpuffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M. Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Rinder-Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
T4 DNA-Ligase (1 U/μl) mit dazugehörigem Herstellerpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotid-Kinase mit dazugehörigem Herstellerpuffer	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Thyroglobulin	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen

2.1.4 Chemikalien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem, Darmstadt
2'-Desoxyadenosin 5'-triphosphat (dATP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-Desoxycytidin 5'-triphosphat (dCTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-Desoxyguanosin 5'-triphosphat (dGTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-Desoxythymidin 5'-triphosphat (dTTP)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
2'-(p-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA), 98 %	Alfa Aesar, Heysham, UK
5,5'-(Dithiobis-2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Acetonitril, LC-MS grade (ACN)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Acrylamid-Stammlösung 30 % (w/v) mit 0,8 % (v/v) Bisacrylamid	SERVA, Heidelberg
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	AppliChem, Darmstadt
Agarose für die Gelelektrophorese	Bio&SELL, Feucht
Agarose (low melting point)	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniaklösung, 25 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Carl Roth, Karlsruhe
Anhydrotetracyclin (aTc)	Acros Oranics, Geel, BE
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Blue Dextran	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Coomassie Brilliantblau R-250	AppliChem, Darmstadt
D-Desthiobiotin	IBA, Göttingen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dikaliumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt

Essigsäure, 99,9 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Ethanol, technisch.	CLN Laborgroßhandel, Niederhummel
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin, 99 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Imidazol	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Isopropanol, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol, technisch	CLN Laborgroßhandel, Niederhummel
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Kaliumhydroxid, Plätzchen, p.a.	AppliChem, Darmstadt
Kobalt(II)chlorid, Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfer(II)chlorid, Dihydrat	Merck, Darmstadt
L-Cysteiniumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	J. T. Baker, Darmstadt
Magnesiumsulfat, Heptahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Malaoxon (PESTANAL®), p.a.	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Mangan(II)chlorid, Tetrahydrat	AppliChem, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid, ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure, 85 % w/v	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer-Standardlösungen für pH-Meter	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff N50, CO-frei	Linde, Pullach
Thiamin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem, Darmstadt

2.1.5 Standards und Kits

DNA- und Proteingrößenstandards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Unstained Protein M _w Marker	Thermo Fisher Scientific St. Leon-Rot

Kits zur DNA-Isolierung bzw. Aufbereitung

QIAprep Spin Plasmid Mini Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Quiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen, Hilden

Kit zur DNA-Sequenzierung

Mix2Seq-Sequenzierungskit	Eurofins Genomics, Ebersberg
---------------------------	------------------------------

2.1.6 Geräte

Elektrophorese

Beleuchtungstisch T13	Biometra, Göttingen
HE33 Submarine (DNA-Auftrennung)	Hofer, Holliston, MA, USA
Minigel-Twin (Protein-Auftrennung)	Biometra, Göttingen
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator TI 3 (254 nm)	Biometra, Göttingen

Fermenter

10 L-Fermentersystem	Schütt Labortechnik, Göttingen
O ₂ -Sonde 12/320 A-Typ	Mettler-Toledo, Gießen
pH-Elektrode Typ 465	Ingold Messtechnik, Steinbach
Regeltechnik für pO ₂ und pH	BC Spezialgeräte, Dortmund

Inkubatoren

Friocell	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Incucell	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Innova 43 series	MMM Medcenter Einrichtungen, Planegg
Minitron	Infors, Bottmingen, Schweiz

Multitron	Infors, Bottmingen, Schweiz
<u>Pipetten und Pipettierhilfe</u>	
Gilson P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, WI, USA
Eppendorf Research Plus, 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg
8-fach Mehrkanalpipette Research, 30 – 300 µl	Eppendorf, Hamburg
12-fach Mehrkanalpipette Research Plus, 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy acu	Integra Bioscience, Fernwald
<u>Proteinreinigung</u>	
ÄKTA Pure	GE Healthcare, Freiburg
ÄKTA Purifier	GE Healthcare, Freiburg
Fraktionssammler Frac900	GE Healthcare, Freiburg
Peristaltische Pumpe P-1	GE Healthcare, Freiburg
Signalschreiber Rec 112	GE Healthcare, Freiburg
<u>Spektralphotometer</u>	
CD J810 Spektropolarimeter	Jasco Research, Victoria, BC, Canada
Microplate Reader Synergy 2	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Spektrophotometer Ultraspec 2100 pro	GE Healthcare, Freiburg
Spektrophotometer Ultraspec 3000	GE Healthcare, Freiburg
<u>Waagen</u>	
Feinwaage 125A	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
Laborwaage XB22C	Precisa Gravimetrics, Dietikon Schweiz
Laborwaage PE620	Gebr. Bosch, Jungingen
<u>Wasserfilter- und Destillationsanlagen</u>	
ddH ₂ O Anlage Typ 2304	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Reinstwasser Anlage Synergy 185	Merck, Darmstadt
<u>Zentrifugen/Rotoren</u>	
Eppendorf 5418R	Eppendorf, Hamburg

Sigma 4-16K (11118 und 11156)	Sigma, Osterode
Sorvall RC 12BP+	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Sorvall RC 6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
H-12000 Bioprocessing-Ausschwingrotor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SLA-1500 Super-Lite Aluminium Festwinkelrotor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SLA-3000 Super-Lite Aluminium Festwinkelrotor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SLA 4X1L LEX	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
SS-34 Festwinkelrotor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Sonstige Geräte

Autoklav Varioklav Typ 500	H&P Labortechnik, Oberschleißheim
Endosafe-PTS	Biometra, Göttingen
IKA Combimag-RET	IKA-Werke, Staufen
maXis Q-TOF Massenspektrometer mit ESI- Ionenquelle	Bruker Daltonics, Bremen
Mix 15 eco Multi-Magnetrüherer	2mag, München
Tischhomogenisator PandaPLUS 2000	GEA, Düsseldorf
pH-Meter inolab pH720	WTW, Weilheim
Techne Dri-Block DB-2A	Thermodux, Wertheim
Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler TPersonal	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Wasserbad Haake F6/C25	Thermo Haake, Karlsruhe
Zellhomogenisator <i>French Press</i>	SLM Aminco, Urbana, IL, USA

Weitere zur Grundausstattung eines biotechnologischen Labors gehörende Geräte sind hier nicht explizit genannt.

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Chromatographie-Säulen und Material

Resource Q, 1 bzw. 6 ml	GE Healthcare, Freiburg
<i>Strep</i> -Tactin Superflow	IBA, Göttingen
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Freiburg

Superdex 200 HiLoad 16/60, <i>prep grade</i>	GE Healthcare, Freiburg
Superdex 200 HiLoad 26/60, <i>prep grade</i>	GE Healthcare, Freiburg

Sonstiges Material

Amicon Ultrafiltrationsröhrchen, 4/15 ml (MWCO: 10 kDa, 30 kDa)	Merck, Darmstadt
Atmungsaktive Verschlussfolie für Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Quarz-Küvette Typ 110-QS mit Deckel (Schichtdicke: 0,1 cm)	Hellma, Müllheim
Deep Well Block, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dialysemembran Typ 27 (22 mm, MWCO: 14 kDa)	Precisa Gravimetrics, Dietikon, Schweiz
Einweg-Spritzen (2, 10, 30, 50 ml)	Braun Melsungen, Melsungen
Erlenmeyerkolben (50, 100, 250, 1000, 5000 ml)	Duran Group, Wertheim
Filtropur Spritzenfilter (0,22 bzw. 0,45 µm)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Glaspipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Kulturröhrchen, 13 ml	Sarstedt, Nürnbergrecht
Laborglasflaschen (25, 50, 100, 500, 1000, 2000 ml)	Duran Group, Wertheim
Membranfilter Microsart CN, 0,45 µm	Satorius, Göttingen
Membranfilter NC20, 0,2 µm	GE Healthcare, Freiburg
Mikrotiterplatte 96 Well, Flachboden	Sarstedt, Nürnbergrecht
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, WI, USA
Petrischalen, rund ø 94 mm	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitzen:	
Kristallklar (0,5 bis 10 µl)	Brand, Wertheim
Gelb (10-200 µl)	Sarstedt, Nürnbergrecht
Blau (100-1000 µl)	Gilson International, Limburg-Offheim
Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rosettengefäß, 20 ml	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Unit (MWCO: 10 kDa, Vol.: 10-100 µl)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Snap cap vials, Typ N 18, 5 ml	Macherey-Nagel, Düren
Transferpipetten (1 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnbergrecht

Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix, pH 0-14	Carl Roth, Karlsruhe
UV-VIS QS (1 cm)	Hellma, Müllheim
Verschlussmatte für Deep Well Blocks	Greiner Bio-One, Frickenhausen
VIS Halbküvetten, Plastik	Sarstedt, Nürnbrecht
Vivaspin 500 (MWCO: 10 kDa)	Sartorius, Göttingen
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenbecher/-röhrchen (SLA1500, SS-34, H-12000)	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot

2.1.8 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Proteinen und DNA wurden zur Sterilisation entweder für mind. 20 min bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert und die Chromatographiepuffer zusätzlich für mind. 30 min entgast. Sämtliche Lösungen mit Ausnahme der Kulturmedien, für die entionisiertes Wasser verwendet wurde, wurden mit Reinstwasser (Typ I, 18,2 MΩ·cm) hergestellt. Die verwendeten Kulturplatten wurden bei 4 °C, Lösungen, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte bei Festmedien vor dem Gießen nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C und bei Flüssigmedien erst unmittelbar vor der Verwendung.

Stammlösungen

Für die Herstellung von Selektivmedien bzw. zur Induktion der rekombinanten Genexpression wurden folgende Stammlösungen verwendet. Diese wurden bei -20 °C gelagert und vor Verwendung sterilfiltriert (0,45 µm).

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in 20 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)
Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in DMF (1:10000 zum Medium) oder 5 mg/ml in DMF (1:25000 zum Medium)
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml in 20 % v/v Ethanol (1:1000 zum Medium)

LB-Medium

Bacto Trypton	10 g/l
Bacto Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
Bacto Agar	15 g/l (nur für Kulturplatten)

Mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert

TB-Medium

TB-Puffer-Stammlösung (10x)

KH_2PO_4	5 g/l
K_2HPO_4	5 g/l

TB-Medium

Bacto Trypton	12 g/l
Bacto Hefeextrakt	24 g/l
Glycerin	4 ml/l

Die Zugabe der autoklavierten Pufferstammlösung erfolgte nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums im Verhältnis 1:10.

Lösungen für die Fermentation

Mineralsalzlösung

31 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,51 g/l
19 mM KH_2PO_4	2,58 g/l
25 mM NH_4Cl	1,33 g/l
5 mM $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,47 g/l

Die Mineralsalzlösung stellt sich auf einen pH von 6,9 ein und wurde im Autoklaven sterilisiert.

Glucoselösungen

- 20 % w/v Glucose (separat autoklaviert)
- 50 % w/v Glucose (separat autoklaviert)

 MgSO_4 -Stammlösung

- 1 M MgSO_4 -Lösung (separat autoklaviert)

Thiamin-Stammlösung

- 10 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (sterilfiltriert)

 FeCl_3 -Stammlösung

- 35 g/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (mit Salzsäure bis zur kräftigen Gelbfärbung angesäuert und anschließend sterilfiltriert)

Zn-Acetat-Stammlösung

- 8,0 g/l Zn-Acetat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (sterilfiltriert)

Spurenelement-Stammlösung (sterilfiltriert)

$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	3,0 g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
H_3BO_3	0,6 g/l

CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,5 g/l
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	1,2 g/l
EDTA	4 mM

Weitere Lösungen

12,5 % (v/v) NH₃ und 10 % (w/v) H₃PO₄ zur pH-Regulation

Antifoam A, 30 % wässrige Lösung zur Unterdrückung von Schaumbildung

Puffer für die Agarose-GelelektrophoreseTAE-Puffer

Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

Auftragspuffer für Agarosegele (10x)

Bromphenolblau	1 mg/ml
Glycerin	50 % (v/v)
Xylencyanol	1 mg/ml

Puffer für die CD-Spektroskopie

KH ₂ PO ₄	20 mM
K ₂ SO ₄	50 mM

Mit 5 M KOH auf pH 7,5 eingestellt, sterilfiltriert und entgast.

Puffer für die SDS-PAGESDS-Laufpuffer nach Fling & Gregerson (1986) (1x)

Glycin	190 mM
SDS	1 g/l
Tris	50 mM

pH 8,8 stellt sich ein

Lower-Tris (4x)

SDS	4 g/l
Tris/HCl pH 8,85	3 M

Upper-Tris (4x)

SDS	4 g/l
Tris/HCl pH 6,8	0,5 M

<u>Auftragspuffer (5x)</u>	
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
Glycerin	25 % (v/v)
SDS	7,5 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	12,5 % (v/v) (bei reduzierendem Auftragspuffer)
<u>Färbelösung</u>	
Coomassie Brilliantblau R-250	1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 % (v/v)
<u>Entfärbelösung I</u>	
Essigsäure	10 % (v/v)
Isopropanol	25 (v/v)
<u>Entfärbelösung II</u>	
Essigsäure	10 % (v/v)
<u>Puffer für die Anionenaustauschchromatographie</u>	
<u>Laufpuffer für scPTE-Varianten</u>	
Hepes/NaOH (pH 7,0)	20 mM
NaCl	20 mM
ZnSO ₄	10 μ M
<u>Elutionspuffer für scPTE-Variante</u>	
Hepes/NaOH (pH 7,0)	20 mM
NaCl	500 mM
ZnSO ₄	10 μ M
<u>Laufpuffer für hdPTE-Varianten</u>	
Tris/HCl (pH 8,0)	20 mM
NaCl	20 mM
ZnSO ₄	10 μ M
<u>Elutionspuffer für hdPTE-Varianten</u>	
Tris/HCl (pH 8,0)	20 mM
NaCl	500 mM
ZnSO ₄	10 μ M

Puffer für die Streptavidin-Affinitätschromatographie

SA-Puffer als Laufpuffer

NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
ZnSO ₄	0,1 mM

Elutionspuffer

D-Desthiobiotin	2,5 mM
NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
ZnSO ₄	0,1 mM

Regenerationspuffer

EDTA pH 8,0	1 mM
HABA	5 mM
NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM

SA-Puffer für die Regeneration und Lagerung

EDTA pH 8,0	1 mM
NaCl	150 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaN ₃	0,02 % (v/v)

Puffer für die Größenausschlusschromatographie

SEC-Puffer

NaCl	100 mM
Tris/HCl pH 8,0	50 mM
ZnSO ₄	10 µM

Sonstige Puffer und Lösungen

Benzonase-Puffer

MgCl ₂	5 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM

Lagerungslösung für Chromatographie-Säulen

EDTA pH 8,0	1 mM
NaN ₃	0,02 % (v/v)

Gelöst in ddH₂O und anschließend autoklaviert.

Periplasma-Extraktionspuffer

EDTA pH 8,0	1 mM
Saccharose	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM

TE-Puffer

EDTA pH 8,0	1 mM
Tris/HCl pH 8,0	10 mM

Der 1/10 TE-Puffer wurde durch 10-fache Verdünnung des TE-Puffers mit ddH₂O hergestellt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Etablierte Standardarbeitsvorschriften des Lehrstuhls für Biologische Chemie der TU München wurden an frühere Dissertationen der Arbeitsgruppe angelehnt, aktualisiert und ergänzt (Schlapschy, 2002; Gebauer, 2013; Vopel, 2016; Kirmair, 2017).

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Um Einzelkolonien von *E. coli*-Stämmen zu erhalten, wurde jeweils die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Kulturplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Selektion auf Plasmide erfolgte durch den Zusatz der entsprechenden Antibiotika. Nach der Inkubation wurden die Kulturplatten bei 4 °C aufbewahrt und maximal zwei Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet.

Für stationäre Übernachtskulturen und Expressionskulturen wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetztes autoklaviertes LB- oder TB-Medium verwendet, wobei die Inokulation mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Kulturplatte erfolgte. Verwendete Volumina waren 5 ml im 13 ml Sarstedt-Kulturröhrchen, 50 ml im 100 ml Erlenmeyerkolben sowie 100 ml bzw. 2000 ml im 250 ml bzw. 5000 ml Kolben. Für die Expressionskultur bzw. Plasmidisolierung wurden die Übernachtskulturen bei 30 °C bzw. 37 °C mit 200 rpm inkubiert. Die 2 l-Kulturen wurden jeweils im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Vorkultur angeimpft und, sofern nicht anders angegeben, bei 22 bis 37 °C mit 180 rpm inkubiert.

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Flüssigkultur wurde deren optische Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) in 1 cm Kunststoffküvetten mit Hilfe des Ultrospec 2000-Spektralphotometers gemessen. Falls ein OD-Wert von größer als 1 erreicht wurde, wurde die Zellsuspension geeignet mit Medium verdünnt und erneut vermessen. Alle OD-Messungen wurden jeweils mit dem eingesetzten Nährmedium als Referenz korrigiert.

2.2.2 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

E. coli-Zellen wurden zunächst in einen transformationskompetenten Zustand überführt, da diese natürlicherweise nicht dazu fähig sind, DNA aus dem sie umgebenden Medium aufzunehmen. Dafür wurde die klassische CaCl_2 -Methode eingesetzt, mit der chemisch kompetente *E. coli*-Zellen erzeugt werden können (Cohen *et al.*, 1972).

Für die benötigte stationäre Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium in einem sterilem Sarstedt-Kulturröhrchen ohne Zusatz von Antibiotikum mit einer Einzelkolonie des zu transformierenden *E. coli*-Stammes inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde 50 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 mit dieser stationären Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C mit 180 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{550} = 0,5-0,6$ inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Falcon-Tube überführt und durch Zentrifugation sedimentiert (5000 rpm, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Sediment in 40 ml eiskalter 0,1 M MgCl_2 -Lösung resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Das wiederum erhaltene Zellsediment wurde in 20 ml einer eiskalten 0,05 M CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 2 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 , 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in Aliquots á 50 µl entweder direkt für eine Transformation eingesetzt oder bei -80 °C aufbewahrt. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert.

Für die eigentliche Transformation wurden zu 50 µl Zellsuspension typischerweise 1 µl gereinigte/isolierte Plasmid-DNA, 5 µl Ligierungsansatz oder gereinigter QuikChange-Ansatz bzw. 1 µl TE-Puffer als Kontrolle hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde nach Mischen für 30 min auf Eis inkubiert, danach für 45 s auf 42 °C erwärmt und nach Überführung der Zellsuspension in 1 ml LB-Medium für 45 min bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. Anschließend folgte das Ausplattieren von 100 µl auf eine mit entsprechendem Antibiotikum versetzte LB-Agar-Platte und Inkubation bei 37 °C über Nacht. Falls eine geringe Transformationseffizienz erwartet wurde, wurde der Rest der Zellsuspension abzentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 3 min), der Überstand verworfen und das Sediment in dem übrig gebliebenen LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet und die Prozedur nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Diese beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979). Nachfolgend wird die Plasmid-DNA bei hoher Salzkonzentration an eine Silica-Membran adsorbiert, um anschließend mit Puffern niedriger Salzkonzentration mit 50 µl 1/10 TE-Puffer eluiert werden zu können. Die DNA wurde aus jeweils bei 37 °C und

180 rpm inkubierten stationären Übernachtskulturen von 5 ml LB Medium, wenn nötig mit 1/1000 Volumen an Ampicillin versetzt, isoliert.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur Kontrolle einem Restriktionsverdau mit anschließender analytischer Gelelektrophorese unterzogen.

2.2.4 Gelelektrophorese und Reinigung von DNA

Bei der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle durch Anlegen eines elektrischen Feldes an ein Agarosegel auf Grund ihres negativ geladenen DNA-Rückgrates der Größe nach aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Die einzelnen DNA-Banden werden durch die Gegenwart von z.B. Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung der gewünschten DNA-Fragmente eines Restriktionsansatzes durchgeführt.

2.2.4.1 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Für die analytische Gelelektrophorese wurde eine 1 % (w/v) Suspension aus Agarose und TAE-Puffer hergestellt, nachfolgend bei Siedehitze zur Lösung gebracht und 1/10000 Volumen einer 1 % w/v Ethidiumbromid-Lösung hinzupipettiert. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen und mit einem Geltaschenformer bestückt. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt und die Taschen mit 10 µl einer DNA-Lösung bestehend aus 9 µl der zu analysierenden DNA und 1 µl Auftragspuffer (10x) befüllt. Die Elektrophorese-Dauer betrug ca. 50 min bei einer Spannung von 90 V. Die DNA-Fragmente wurden anschließend aufgrund der Interkalation des Ethidiumbromids mittels Bestrahlung mit UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht.

2.2.4.2 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Bei der präparativen Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1 %-iges Agarosegel mit „*Low Melting Point*“-Agarose wie unter Kapitel 2.2.4.1 beschrieben mit zwei 2 cm breiten Geltaschen hergestellt. Der gesamte Ansatz des Restriktionsverdau mit Enzymen und der zu präparierenden DNA (50 µl) wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen Auftragspuffer (10x) in die Geltaschen gegeben. Die Elektrophorese wurde anschließend für ca. 60 min bei 60 V durchgeführt. Durch Sichtbarmachen unter UV-Licht mit langer Wellenlänge (302 nm) konnten die gewünschten DNA-Banden vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und das entstehende Gelstück in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden.

Zur Extraktion der verdauten DNA-Fragmente aus den ausgeschnittenen Agarosegelstücken wurde das QIAquick *Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll eingesetzt. Dabei wurde die DNA reversibel an eine Silica-Matrix adsorbiert und mit 30 bzw. 50 µl 1/10

TE-Puffer eluiert. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -22 °C gelagert.

2.2.4.3 Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Reinigung von Oligodesoxynukleotiden wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Mittels einer Fertiglösung mit 8,3 M Harnstoff und 25 % w/v Acrylamidbisacrylamid im Mischungsverhältnis 19:1 (Sequagel Concentrate), einer 8,3 M Harnstoff-Fertiglösung (Sequagel Diluent) sowie von 10x TBE-Puffer, wurde eine Mischung von 12 % w/v Acrylamid und 7,5 M Harnstoff in TBE hergestellt. Unter schnellem Rühren wurden 40 µl TEMED und 1 ml 10 % w/v APS zu 100 ml dieser Lösung hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Als Laufpuffer diente TBE.

Die präparative Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese erfolgte vertikal mit 1,5 mm starken Gelen. Zwei Glaspatten (20 x 40 cm) wurden zur Herstellung des Gels mit entsprechenden Kunststoff-Abstandshaltern durch Klammern fixiert und die polymerisierende Gellösung in die Öffnung eingefüllt. Durch Einsetzen eines Geltaschenformers wurden 6 Taschen gebildet. Die Elektrophorese wurde bei einer Leistung von 40 W für ca. 4 h durchgeführt, bis der Bromphenolblaumarker das Gelende erreicht hatte.

2.2.4.4 Reinigung von Oligodesoxynukleotiden

Die von der Firma Eurofins synthetisierten Oligodesoxynukleotide zur Herstellung von unterschiedlich langen PAS-Fragmenten wurden durch Polyacrylamid/Harnstoff-Gelelektrophorese gereinigt. Hierfür wurde 20 µl der Oligodesoxynukleotid-Lösung mit 20 µl Formamid-Auftragspuffer versetzt, auf 80 °C für 5 min erhitzt und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Lösung (à 20 µl) auf jeweils zwei Taschen eines 12 %-igen Polyacrylamid/Harnstoffgels als möglichst schmale Schicht aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Leistung von 40 W betrieben. Nach Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel auf eine UV-durchlässige Klarsichtfolie überführt und die Oligodesoxynukleotid-Banden durch UV-Shadowing bei 254 nm vor einer DC-Fluorescein-Indikatorplatte (Kieselgel 60 F₂₅₄) sichtbar gemacht. Die Bereiche des Gels mit den Hauptproduktbanden wurden möglichst exakt mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur weiteren Zerkleinerung der Gelstücke wurden diese in eine 1 ml-Kunststoffspritze überführt, deren Spitze zuvor mit einer Flamme zugeschmolzen und nach Erkalten mit einer Kanüle durchbohrt worden war. Unter Zugabe von insgesamt 1 ml TE-Puffer wurden die Gelstücke durch die Bohrung gepresst und die auf diese Weise erzeugte Suspension über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Gelmasse wurde mittels einer Spin-X-Filtereinheit in der Tischzentrifuge abgetrennt, das klare Filtrat (ca. 0,9 ml) in ein Eppendorf-Gefäß überführt und drei Mal mit je 1 ml 1-Butanol extrahiert. Dabei wurde die wässrige Phase auf ca. 0,4 ml eingengt. Nach

Zugabe von 40 μl 3 M Natriumacetat pH 4,8, 4 μl 1 M MgCl_2 und 1 ml Ethanol (p.a.) wurde die DNA bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 1 h gefällt. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert (13200 rpm, $4\text{ }^\circ\text{C}$), das Präzipitat mit 0,5 ml 70 % v/v Ethanol gewaschen und im Vakuum für 2 min getrocknet. Das gereinigte Oligodesoxynukleotid wurde abschließend in 50 μl ddH₂O gelöst und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der molaren Konzentration wurde ein kleines Volumen der Oligodesoxynukleotid-Lösung mit TE-Puffer im Verhältnis 1 zu 200 verdünnt und die Absorption bei 260 nm unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des Puffers gemessen. Der Extinktionskoeffizient des Oligodesoxynukleotids wurde dabei aus der Summe der Absorptionsbeiträge der einzelnen Basen abgeschätzt (A: $15,0\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, C: $7,4\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, G: $11,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, T: $8,8\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

2.2.5 *In vitro*-Modifizierung von DNA

2.2.5.1 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen kann DNA an definierten Positionen gespalten werden. Dies wurde sowohl zur Restriktionsanalyse von Plasmiden als auch zur Präparation von größeren Mengen an spezifisch geschnittenen DNA-Fragmenten ausgenutzt. Dabei wurde die jeweilige enzymatische Reaktion mit dem vom Hersteller empfohlenem Puffersystem und unter der empfohlenen Temperatur durchgeführt.

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden 0,5 μg Plasmid-DNA, 5 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 2 μl des empfohlenen 10x Puffers eingesetzt und mit ddH₂O auf ein Endvolumen von 20 μl aufgefüllt.

Bei den präparativen Spaltungen mit einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden 1 bis zu 10 μg Plasmid-DNA, 20 U je Enzym und 5 μl des empfohlenen 10x Puffers verwendet und mit ddH₂O aufgefüllt.

Sowohl Restriktionsanalysen als auch die präparativen Ansätze wurden für 1-1,5 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Letztlich wurden die gespaltenen DNA-Fragmente vor der weiteren Umsetzung durch präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt.

2.2.5.2 Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Bei Restriktionsverdauen entstandene zueinander komplementäre klebrige (*Sticky Ends*) oder glatte Enden (*Blunt Ends*) wurden zur Prävention der Rezirkularisierung des gespaltenen Vektors oder der Bildung von Konkatalameren von DNA-Fragmenten mit Hilfe einer rekombinant hergestellten bakteriellen Alkalischen Phosphatase (AP) dephosphoryliert. Hierfür wurde 1 U AP direkt nach Abschluss der Inkubationszeit in den präparativen

Reaktionsansatz gegeben. Die Reaktion fand für 20 min bei 37 °C statt und wurde durch die Inaktivierung der Phosphatase bei 72 °C für 5 min abgebrochen.

Falls das zu verwendete DNA-Fragment nicht durch präparative Spaltung mit Restriktionsendonukleasen sondern durch PCR gewonnen worden war, wurden die 5'-Enden im Falle der Ligierung mit einem zuvor dephosphorylierten Molekül mit Hilfe einer T4-Polynukleotid-Kinase (PNK) phosphoryliert. Dafür wurde das DNA-Fragment in einem Volumen von 30 µl mit 3 µl 10x T4-PNK-Puffer (Fertiglösung des Herstellers), 3 µl 10 mM ATP sowie 5 U PNK für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde wiederum durch 20-minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die jeweils de- oder phosphorylierten Genfragmente wurden abschließend mittels präparativer Agarose Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.4.2) gereinigt.

2.2.5.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

Zur Konstruktion neuer Plasmide wurden die zuvor mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen und gereinigten DNA-Fragmente mit den jeweiligen komplementären Überhängen mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft.

Die Ligierungsreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit je 50 fmol der zu ligierenden Genfragmente, 1 µl T4 DNA-Ligase (1 Weiss U/µl) und 2 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer durchgeführt und der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden jeweils die geschnittenen Vektoren ohne die entsprechenden Inserts der Ligierungsreaktion unterworfen. 5 µl wurden anschließend für die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet.

2.2.5.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifizierung von Genen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) wurde in dieser Arbeit zur Amplifizierung von Genfragmenten und Einführung oder Änderung von Restriktionsschnittstellen eingesetzt (Saiki *et al.*, 1988). Für die Vervielfältigung wurden Oligodesoxynukleotide (Primer) eingesetzt, die am 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange und zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz enthielten. Von der Matrizen-DNA abweichende Sequenzen wurden mittels Oligodesoxynukleotiden erzeugt, die stromaufwärts der beschriebenen Hybridisierungsregion für mehrere Restriktionsschnittstellen kodierenden Überhang oder an definierten Positionen unterschiedliche Basen aufwiesen (Skerra, 1992). Die Schnittstellen wurden durch mindestens sechs Basen vom Ende des Primers angeordnet, um die Zugänglichkeit nach PCR für Restriktionsnukleasen weiterhin zu gewähren.

Die eingesetzte Q5 *Hot Start High Fidelity* Polymerase zeichnet sich durch äußerst niedrige Fehlerrate, vermittelt durch die 3' zu 5' Exonukleaseaktivität, aus. Des Weiteren wird bei der Q5 Polymerase durch eine Fusion mit Sso7d aus *Sulfolobus solfataricus* die Stabilität des

DNA/Polymerase-Komplexes erhöht und somit eine höhere Prozessivität gewährleistet (Wang *et al.*, 2004). So bindet Sso7d die doppelsträngige DNA unspezifisch und erschwert eine vorzeitige Dissoziation des Fusionsproteins.

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l enthielt 0,2 μ M der beiden Primer, ca. 10 ng Matrizen-DNA, 10 μ l 5x Q5-DNA Polymerase Puffer und 4 μ l dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie 1 U der Q5 *Hot Start High Fidelity* Polymerase. Die Denaturierung fand initial im Thermocycler für 2 min bei 98 °C statt. Die Reaktion erfolgte in insgesamt 30 bis 35 Zyklen mit jeweils drei Schritten: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA für 10 s bei 98 °C; 2. Hybridisierung der Primer an die DNA-Matrize für 30 s mit einer Temperatur angepasst an deren vorhergesagte Doppelstrang-Schmelztemperatur ($T_m + 3$ °C); 3. Elongation der DNA durch die Q5-DNA Polymerase je nach Länge des zu amplifizierenden Abschnitts (10 s/kb) bei 72 °C. Nach Vollendung der Zyklen wurde der Ansatz nochmals bei 72 °C für 5 min inkubiert, um eine finale Vervollständigung der Syntheseprodukte zu erreichen. Es folgte schließlich eine Abkühlung auf 4 °C zur temporären Lagerung.

Um weitere molekularbiologische Modifizierungen wie beispielsweise einen Restriktionsverdau der amplifizierten DNA-Fragmente zu ermöglichen, wurden die im PCR-Ansatz verwendeten Agentien (Polymerase etc.) abgetrennt. Hierfür wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet, das auf der reversiblen Bindung von PCR-Produkten an eine Silica-Membran basiert. Die Prozedur wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die Elution erfolgte mit 50 μ l 1/10 TE-Puffer.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer analytischen Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.4.1) kontrolliert und unter Umständen bis zur weiteren Verwendung bei -22 °C gelagert.

2.2.5.5 Ortsgerichtete Mutagenese nach dem QuikChange-Verfahren

Die zielgerichtete Einführung von Punktmutationen durch Austausch von Basentriplets erfolgte mittels PCR in Anlehnung an das Protokoll des QuikChange *Site Directed Mutagenesis* Kit (Zheng *et al.*, 2004). Dabei wurde das Enzym *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA-Polymerase eingesetzt und das als Matrize dienende Plasmid (10 ng) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in 20 Zyklen amplifiziert (s. Kapitel 2.2.5.4). Dabei entsprach die Schmelztemperatur T_m-5 und die polymerasenspezifische Elongationsgeschwindigkeit 15 s/kb. Der Erfolg der Reaktion wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese überprüft und der Reaktionsansatz nachfolgend mit 30 U des Restriktionsenzym *DpnI* bei 37 °C für eine 1 h inkubiert, wodurch der parentale methylierte DNA-Strang selektiv gespalten wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit dem Qiagen PCR *Purification* Kit nach Herstellerangaben gereinigt und die DNA in 30 μ l 1/10 TE-Puffer eluiert. 5 μ l der DNA-Lösung wurde für die Transformation CaCl_2 -kompetenter *E. coli* XL1 blue Zellen verwendet.

2.2.5.6 Konstruktion von PAS-Genkassetten verschiedener Länge

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Fusion zweier Enzymuntereinheiten ein sog. PAS-Polypeptid bestehend aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser (Schlapschy *et al.*, 2013) eingesetzt. Dazu wurden die Strukturgene der Phosphotriesterasen auf genetischer Ebene mit der PAS-Genkassette ligiert. Eine solche Genkassette besteht im einfachsten Fall aus 60 bp kodierend für 20 Aminosäuren (Sequenz PAS#1) mit 5'-GCC/GGC-Überhängen, was die gerichtete Ligierung und damit Verlängerung der PAS-Grundeinheit ermöglicht. In Abhängigkeit der benötigten Länge des Polypeptids wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt.

Für die Herstellung von PAS-Polypeptiden bis zu einer Länge von 100 Aminosäuren (entsprechend 300 bp) wurden die verwendeten einzelsträngigen Oligodesoxynukleotide PAS#1_fwd und PAS#2_rev mittels Polyacrylamid/Harnstoff Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.4.3) gereinigt. Jeweils 20 µl der Oligodesoxynukleotid-Lösungen (10 µM) wurden mit 1 µl T4 Polynukleotidkinase (5 U, PNK), 10 µl 10x PNK-Puffer sowie 10 µl ATP-Lösung (10 mM) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 100 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Der Ansatz wurde zunächst bei 37 °C für 30 min zwecks 5'-Phosphorylierung durch die PNK inkubiert, anschließend für 10 min auf 95 °C aufgeheizt und langsam mit einer Rate von 0,02 K/s auf RT zur Hybridisierung der Oligodesoxynukleotide abgekühlt. Die so erhaltene PAS(20)-Genkassetten mit 5'-GCC/GGC-Überhängen wurden in einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 100 µl, der 50 µl des Hybridisierungsansatzes, 10 µl T4 Ligasepuffer und 0,5 µl T4 DNA Ligase enthielt, für 25 min auf Eis unter Bildung von Konkatemeren kovalent miteinander verknüpft. In einer anschließenden präparativen Agarose-Gelelektrophorese (s. Kapitel 2.2.4.2) wurden die PAS-Genkassetten passender Größe kodierend für eine PAS(40)- sowie eine PAS(100)-Polypeptidkette isoliert. Die oben genannten Überhänge dieser Genkassetten ermöglichten deren Ligierung mit Vektor-Fragmenten, die zuvor mit der Restriktionsendonuklease *SapI* gespalten worden waren und aus diesem Grund für Ala kodierende 5'-GCC/GGC *Sticky Ends* aufwiesen.

PAS-Genkassetten kodierend für 200 Aminosäuren wurden durch Restriktionsverdau mit *SapI* aus dem Vektor pXL1-PAS#1.2 (s. Kapitel 2.1.1) und präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert. Danach wurde das Rückgrat des Expressionsvektors dephosphoryliert (s. Kapitel 2.2.5.2) und anschließend mit der jeweiligen PAS-Genkassette ligiert (s. Kapitel 2.2.5.3).

2.2.6 Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Zur Kontrolle der korrekten Ligierung bzw. der durch Mutagenese veränderten DNA-Abschnitte wurde eine Sequenzanalyse mit dem Mix2Seq-Kit der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt, die auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.* (1977) basierte. Hierfür wurden 2 µl des entsprechenden Primers (10 µM) und 15 µl der zu

sequenzierenden Plasmid-DNA (50 ng/ μ l) gemischt und an die Firma Eurofins geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den geplanten Plasmiden abgeglichen und auf Korrektheit geprüft.

2.3 Gentechnische Methoden

2.3.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die Strukturgene der zu produzierenden Proteine standen unter Kontrolle des *tetA*-Promotors zum Zweck der rekombinanten Expression in *E. coli*. Für die cytoplasmatische Expression wurden hauptsächlich die *E. coli*-Stämme BL21 und Origami B herangezogen und anschließend ein Gesamtzellaufschluss durchgeführt. Durch das weniger reduzierende Milieu im Cytoplasma des Stammes Origami B können sich dort Disulfidbrücken ausbilden. Für das Enzym OpaA wurde durch ein am N-Terminus des rekombinanten Proteins angeordnetes bakterielles Signalpeptid (OmpA) die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum von *E. coli* bewirkt (Skerra & Plückthun, 1988). Als Expressionsstamm diente in diesem Fall KS272 und der Periplasmaextrakt wurde nach Induktion der Genexpression durch selektive Permeabilisierung der äußeren Membran gewonnen.

2.3.1.1 Anzucht, Induktion und Ernte von *E. coli*-Kulturen im Schüttelkolben

Expression im Cytoplasma von *E. coli*

Zur Produktion rekombinanter Proteine im Cytoplasma wurde *E. coli* BL21, Origami B oder DH5 α mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert und 50 ml LB/Amp-Medium als Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30 bzw. 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 2 l LB/Amp oder TB/Amp supplementiert mit 0,2 mM des entsprechenden Metall-Kofaktors (Zink, Mangan oder Kupfer) im Verhältnis 1:40 in einem 5 l-Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Hauptkulturen mit LB-Medium wurden bei einer Temperatur von 30 °C und 180 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch regelmäßige Probenentnahme zur Messung der optischen Dichte (OD₅₅₀) verfolgt. Die Genexpression wurde bei OD₅₅₀ von ca. 0,6 durch Zugabe von 200 μ l Anhydrotetracyclinlösung (2 mg/ml) induziert (Endkonzentration: 200 μ g/l). Die Induktionsdauer betrug 3 bis 5 h. Die Kulturen mit TB-Medium wurden hingegen bei einer Temperatur von 22 (BL21), (Origami B) und 37 °C (DH5 α) inkubiert und erst bei einer OD₅₅₀ von ca. 1,0 für 15 h induziert. Zur Ernte wurde die Zellsuspension in vorgekühlte 2 l Zentrifugationsbecher überführt und zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C, 35 min). Der Überstand wurde abgekippt und das Zellsediment in 3 ml eiskaltem SA-Puffer (supplementiert mit 0,1 mM des entsprechenden Kofaktors) pro 1 g Nasszellgewicht resuspendiert. Vor der weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension ggf. bei -20 °C gelagert.

Zur Produktion der Oxidoreduktase CotA wurde 2 l TB/Amp-Medium mit einer Vorkultur der mit dem entsprechenden Vektor transformierten BL21-Zellen angeimpft, bei $OD_{550} \approx 0,6$ induziert und gleichzeitig auf 0,25 mM $CuCl_2$ eingestellt. Die CotA wurde dann bei 25 °C für 15 h unter mikroaeroben Bedingungen synthetisiert (kein Schütteln). Dadurch wurde ein höherer Kupfereintrag in das bakterielle Cytoplasma und damit eine Erhöhung der Kupferinkooperation in das aktive Zentrum des Enzyms erreicht (Durao *et al.*, 2008). Die Ernte erfolgte wie oben beschrieben.

Zur Präparation des Gesamtzellextraktes wurden die Zellsuspensionen aufgetaut und mit Hilfe eines French Press-Zellhomogenisators aufgeschlossen (1000 Psi, mind. 3 Passagen). Falls die Zellmasse größer als ca. 10 g war, wurde hierfür ein PandaPLUS 2000 Tisch-Homogenisator der Firma GEA (Düsseldorf, Deutschland) eingesetzt (800 bar, mind. 3 Passagen). In beiden Fällen wurde der Zellextrakt durch Zentrifugation (SS-34, 15000 rpm, 4 °C, 45 min) geklärt und der Überstand für nachfolgende Reinigungsschritte sterilfiltriert (0,45 μ m).

Für die spätere Analyse durch SDS-PAGE wurde eine Gesamtzellprobe in kleinerem Maßstab abgenommen. Hierfür wurden sowohl vor als auch nach der Induktion jeweils 1 ml Zellsuspension aus der Expressionskultur entnommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (13200 rpm, 3 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit Benzonase-Lösung (12,5 U/ml Benzonase in Benzonasepuffer) resuspendiert, zum Zweck der Lyse mit 5x SDS-Auftragspuffer (reduzierend) versetzt und vorsichtig gemischt. Die Volumina wurden so gewählt, dass dies einer Bakteriensuspension mit OD_{550} von ca. 0,8 entsprach. Im Verlauf der einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die freigesetzten Nukleinsäuren durch die Benzonase hydrolysiert. Abschließend wurde die Probe für 5 min auf 95 °C erhitzt und das Lysat bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20 °C gelagert.

Expression im Periplasma von *E. coli*

Für die periplasmatische Produktion wurde *E. coli* KS272 mit dem entsprechenden Expressionsplasmid zusammen mit pTUM4 (Schlapschy *et al.*, 2006) transformiert, 50 ml LB/Amp/Cam-Medium mit einer Einzelkolonie als Vorkultur angeimpft und diese über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 2 l LB/Amp/Cam-Medium mit 0,2 mM $MnCl_2$ versetzt und mit der Vorkultur angeimpft, bei 30 °C geschüttelt und die Genexpression bei einer OD_{550} von 0,5 - 0,6 mit aTc (Endkonzentration: 200 μ g/l) für 3 h induziert. Das durch Zentrifugation erhaltene Zellsediment wurde auf Eis zügig in 20 ml (pro 2 l Zellsuspension) Periplasma-Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, 500 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Sphäroblasten in zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten bis zur Klärung des Überstandes abgetrennt (zwei Durchgänge bei 5100 rpm, 4°C, 15 min). Die periplasmatische Fraktion wurde vorsichtig komplett abgenommen und in SS34-Zentrifugationsröhrchen

überführt. Der letzte Zentrifugationsschritt erfolgte mit höherer Drehzahl (SS34, 15000 rpm, 15 min, 4°C), um letzte Zellbruchstücke abzutrennen. Der so gewonnene lösliche periplasmatische Extrakt wurde für weitere Reinigungsschritte bzw. Analysen verwendet.

2.3.1.2 Anzucht, Induktion und Ernte von Kulturen im Laborfermenter

Bestimmte Anwendungen, insbesondere Experimente mit Versuchstieren, erfordern größere Mengen eines rekombinanten Proteins. Diese wurden gemäß einem von Schiweck & Skerra (1995) etablierten diskontinuierlichem Fermentationsverfahren in *E. coli* produziert.

Hierfür wurden die Bakterienzellen in einem 10 l-Fermentergefäß in einem Mineralsalzmedium kultiviert, dem Ammoniak als Stickstoff- und Glucose als Kohlenstoffquelle zugefüttert wurden. Durch Kontroll- und Regeleinheiten für die Temperatur, den pH-Wert (Ammoniaklösung bzw. Phosphorsäure) und den Sauerstoffpartialdruck wurden homöostatische Bedingungen während des Fermentationsverlaufs gewährleistet. Als Expressionsstamm wurde dabei *E. coli* BL21 verwendet und alle eingesetzten Lösungen sowie das Fermentationsgerät bzw. -zubehör wurden entweder autoklaviert oder sterilfiltriert (0,45 µM).

Als Vorvorkultur wurde 2 ml LB/Amp-Medium mit einer frisch transformierten Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C sowie 180 rpm für 6 bis 8 h geschüttelt. Die Anzucht der Vorkultur erfolgte daraufhin in 360 ml Mineralsalzlösung, zu der 40 ml 20 % (w/v) Glucose, 4 ml 1 M MgSO₄, 400 µl Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml) und 400 µl Thiaminhydrochlorid-Lösung zugegeben wurden. Die Vorkultur wurde im Verhältnis 1:1000 mit der Vorvorkultur angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm für 26 h inkubiert.

Das Kulturgefäß wurde mit 7 l der Mineralsalzlösung befüllt und autoklaviert und danach auf dem Magnetrührer platziert. Nun wurde das Medium auf 25 °C vortemperiert und über einen autoklavierten Trichter 800 ml 20 % (w/v) Glucose, 80 ml 1 M MgSO₄, 8 ml Ampicillin-Stammlösung, 8 ml Thiaminhydrochlorid-Lösung, 4 ml FeCl₃- sowie Zn(OAc)₂-Lösung, 10 ml der Spurenelement-Lösung sowie 200 µl 30 %-ige Antifoam A-Lösung zugeführt. Die Belüftung fand zunächst mit Druckluft statt, wobei dem im noch nicht inokulierten Medium herrschenden Sauerstoffpartialdruck „100 %“ zugeordnet wurde. Während des Fermentationsprozesses wurde der Sauerstoffpartialdruck durch gesteuerte Begasung mit Luft und reinem Sauerstoff auf einen Wert von > 40 % eingestellt. Der pH-Wert wurde durch Titration mit 12,5 % Ammoniak zwischen 6,9 und 7,0 gehalten. Als Rührgeschwindigkeit wurde zunächst 400 rpm eingestellt. Die Mineralsalzlösung wurde daraufhin mit der gesamten Vorkultur angeimpft. Nach 12 h Fermentation befanden sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase, in der zwecks ausreichender Kohlenstoffversorgung 50 %-ige (w/v) Glucose gemäß folgendem Protokoll hinzudosiert wurde:

Ab einer Zelldichte von $OD_{550} = 7,5$ Zugabe mit 14 ml/h

= 12,5 “ 20 ml/h

= 18,5 “ 30 ml/h

= 22,5 “ 40 ml/h

Zudem wurde nach 12 h jeweils halbstündlich die Zelldichte photometrisch bei 550 nm kontrolliert. Hierfür wurden mit einer sterilen Spritze Proben aus dem Kulturgefäß entnommen und die Suspension mit der Mineralsalzlösung im Verhältnis 1:100 verdünnt.

Die Induktion der cytoplasmatischen Genexpression erfolgte bei einer OD_{550} von ca. 40,0 durch Einstellung einer Konzentration von 0,5 mg Anhydrotetracyclin je Liter Kultur. Die Genexpression lief für 3 h ab, bevor die Zellsuspension zügig in 2 l-Zentrifugationsbecher überführt, durch Zentrifugation sedimentiert (Sorvall RC 12BP plus-Zentrifuge, H12000 A-Rotor, 4500 rpm, 30 min, 4 °C) und der Überstand sorgfältig abgenommen wurde.

Die Ernte des Gesamtzellextraktes und Vorbereitung der Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.1 beschrieben.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Chromatographische Verfahren

2.4.1.1 Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose

Die Reinigung rekombinanter Proteine mit Hilfe des *Strep*-tag II Affinitätsanhängsels (Schmidt & Skerra, 2007) erfolgte aus dem bakteriellen Gesamtzellextrakt oder aus der periplasmatischen Zellfraktion mit Hilfe der *Strep*-Tactin-Affinitätschromatographie (SAC) im Einschnitt-Verfahren.

Der wie in Kapitel 2.3.1.1 präparierte Gesamtzellextrakt wurde vor dem Auftragen auf die Säule mit Avidin versetzt, um biotinylierte Wirtsproteine irreversibel zu maskieren und so eine Inaktivierung des Säulenmaterials zu verhindern. Folglich wurde der Extrakt mit einem zweifachen molaren Überschuss an Avidin unter der Annahme, dass eine 1 l *E. coli*-Kultur bei einer OD_{550} von 1,0 ca. 1 nmol Biotin-Carboxyl-Trägerprotein enthält, für 30 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden entstandene Präzipitate durch Zentrifugation und erneute Sterilfiltration (0,45 µM) abgetrennt. Für Gesamtzellextrakte mit einem Volumen bis 20 ml wurde eine *Strep*-Tactin Säule mit 5 ml Bettvolumen und eine Flussrate von 20 ml/h angewendet. Für größere Volumina wurde ein Bettvolumen von ca. 25 ml eingesetzt und eine Flussrate von 40 ml/h. Die zu Äquilibration, Waschen und Elution gebrauchten SA-Puffer

wurden ohne EDTA und mit einem Zusatz von 0,1 mM ZnSO₄ hergestellt. Die Regenerierungs- und Lagerungslösungen wurde der reguläre SA-Puffer mit 1 mM EDTA eingesetzt.

Die eingesetzte *Strep*-Tactin Säule wurde gründlich äquilibriert und der Gesamtzellextrakt aufgetragen. Die Säule wurde dann bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie - anhand der Absorption bei 280 nm - gespült. Die Elution erfolgte mittels einer Lösung von 2,5 mM Desthiobin in SA-Puffer, und die Elutionsfraktion wurde durch SDS-PAGE analysiert. Abschließend wurde die Säule durch Spülen mit 5 mM HABA in SA-Puffer bis zur rötlichen Färbung regeneriert. Die Säulen wurden dann bis zur Entfärbung mit Lagerungspuffer (SA-Puffer, 0,02 % w/v NaN₃) gewaschen und aufbewahrt.

2.4.1.2 Anionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie können Proteine durch Ausnutzen der unterschiedlichen Oberflächenladungen aus einem Proteingemisch getrennt werden. Bei der in dieser Arbeit eingesetzten Anionenaustauschchromatographie wird dies durch die reversible Bindung von negativ geladenen Seitenketten der zu trennenden Biomoleküle an eine mit positiv geladenen quartären Ammoniumgruppen beladene stationäre Phase und nachfolgende graduelle Elution mit einer salzhaltigen mobilen Phase erreicht.

Für diesen Reinigungsschritt nach der SAC wurde die Säule „Resource Q“ der Firma GE Healthcare Life Sciences mit einem Säulenvolumen von 1 oder 6 ml eingesetzt. Vor jedem chromatographischen Lauf wurden alle eingesetzten Puffer und Lösungen sterilfiltriert (0,45 µm) und für mindestens 30 min entgast. Außerdem wurde die Säule mit mindestens 5 Säulenvolumen des Laufpuffers äquilibriert, wobei für die scPTE-Varianten 20 mM Hepes/NaOH, 20 mM NaCl, 10 µM ZnSO₄, pH 7,0 und für hdPTE-Varianten eine mit 20 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 10 µM ZnSO₄, pH 8,0 als Laufpuffer verwendet wurde. Die Proteinproben wurden gründlich gegen 5 l des Laufpuffers über Nacht dialysiert und anschließend zur Entfernung von Partikeln und Aggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Alle beschriebenen Schritte wurden mit einer Flussrate von 3 oder 4 ml/min durchgeführt.

Zur Reinigung der Proteine wurde die Säule je nach Probenvolumen mittels eines 10 oder 50 ml-*Loops* beladen und das Elutionsprofil anhand der Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Dabei betrug das Auftragsvolumen minimal 5 ml und maximal 50 ml. Sobald sich nach Beenden des Auftrags unter Waschen mit Laufpuffer wieder die ursprüngliche Basislinie eingestellt hatte, wurden die gebundenen Proteine in Laufpuffer durch Anlegen eines linearen NaCl-Konzentrationsgradienten getrennt. Dieser wurde so eingestellt, dass innerhalb von 20 (6 ml Säulenvolumen) oder 40 Säulenvolumen (1 ml Säulenvolumen) eine NaCl-Konzentration von 0,25 M (bzw. 0,5 M für die zweikettige hdPTE-Version) in der mobilen Phase erreicht wurde.

Der Proteingehalt und die Reinheit der gesammelten Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE überprüft. Abschließend wurde die verwendete Säule mit 5 Säulenvolumen ddH₂O, 5

Säulenvolumen 0,5 M NaOH sowie 5 Säulenvolumen 2 M NaCl regeneriert und in Lagerungslösung (1 mM EDTA pH 8,0, 0,02 % (v/v) NaN₃) aufbewahrt.

2.4.1.3 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (*Size-Exclusion Chromatography*, SEC) ermöglicht die Trennung von Proteinen anhand ihrer Größe sowie Form und wurde als Methode zur präparativen Feinreinigung als auch zur Analyse des apparenten Molekulargewichts angewendet. Kleinere Moleküle haben in dem porösen Säulenmaterial ein größeres zugängliches Diffusionsvolumen als größere und durch den so auftretenden molekularen Siebeffekt kommt es zur Trennung umgekehrt proportional zum apparenten Molekulargewicht der Proteine. Der eingesetzte SEC-Laufpuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 µM ZnSO₄, pH 8,0) wurde vor Verwendung sterilfiltriert (0,45 µm) und für mindestens 30 min entgast.

Bei präparativen SEC-Läufen zur Feinreinigung nach der Anionenaustauschchromatographie (oder SAC) wurde je nach Probenvolumen entweder die Säule Superdex 200 10/300 GL (Säulenvolumen: 24 ml) oder die Säulen HiLoad Superdex 200 *prep grade* in der Ausführung 16/60 (Säulenvolumen: 120 ml) oder 26/60 (Säulenvolumen: 320 ml) der Firma GE-Healthcare Life Sciences genutzt. Alle Säulen wiesen einen Auflösungsbereich von 10 bis 600 kDa auf. Die zu reinigenden Proben wurden vor dem Auftragen auf 1 bis 3 % des gewählten Säulenbettvolumens eingengt und mittels einer 1 bis 10 ml fassenden Probenschleife appliziert. Anschließend wurde die Proteinprobe mit einer Flussrate von 0,5 (1,0 oder 3,0) ml/min mit einem Säulenvolumen SEC-Laufpuffer aufgetrennt. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden nach dem Lauf durch SDS-PAGE analysiert.

Für die analytischen Chromatographieläufe von zur Homogenität gereinigten Proteinproben wurde die Säule Superdex 200 10/300 GL (Säulenvolumen: 24 ml) verwendet. Alle Läufe wurden bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit einem Auftragsvolumen von 250 µl (500 µl Probenschleife) durchgeführt. Für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts wurde eine Eichgerade mit den Proteinen β-Amylase, ADH, BSA, Carboanhydrase, Cytochrom C und Thyroglobulin erstellt, anhand derer die Molekulargewichte der rekombinanten Proteine aus deren Elutionsvolumen berechnet werden konnten. Das Totvolumen der Säule wurde mit dem Polymer Dextranblau bestimmt.

Zudem wurde das SAC-Eluat, das sowohl intra- als auch intermolekular dimerisierende Spezies der *Single-Chain* Phosphotriesterasevarianten enthielt, mit analytischer SEC hinsichtlich des Oligomerisierungsverhaltens untersucht. Hierfür wurden 500 µl der Probe mit einer 500 µl fassenden Probenschleife auf eine Superdex 200 10/300 GL Säule bei 0,5 ml/min Flussrate aufgetragen und über ein Säulenvolumen aufgetrennt.

Die verwendeten Säulen wurden durch Spülen mit einem Säulenvolumen ddH₂O, einem Säulenvolumen 0,5 M NaOH und einem Säulenvolumen ddH₂O regeneriert und abschließend in 0,02 % w/v NaN₃, 1 mM EDTA gelagert.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine und deren Gemische im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und analysiert werden. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) unter Anwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986) genutzt. Durch Inkubation der zu analysierenden Probe mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und erhalten durch die hydrophobe Anlagerung der SDS-Moleküle eine zu ihrer Größe proportionale negative Gesamtladung. Die zudem durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmte elektrophoretische Mobilität der Proteine verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse. Hier wurden immer 12 %-ige SDS-Polyacrylamidtrenngele und 5 %-ige Sammelgele verwendet.

Zunächst wurde eine Gelkammer aus zwei mit 70 %igem Isopropanol gereinigten und mit einer Kunststoffdichtung abgedichteten Glasplatten und Halteklammern zusammengebaut. In diese Kammer wurde dann ca. 5,5 ml der Trenngelmischung eingefüllt und mit 1 ml ddH₂O überschichtet. Nach etwa vierzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur war das Gel auspolymerisiert und die Wasserschicht wurde durch Abkippen vollständig entfernt. Anschließend wurde die Sammelgelmischung in die Kammer gefüllt und zur Bildung von Geltaschen vorsichtig ein Kamm eingebracht. Nach einer Wartezeit von ca. 20 min konnte der Taschenkamm aus dem polymersierten Sammelgel und die Kunststoffdichtung sowie die Halteklammern entfernt werden. Nun wurde die Gelkammer samt Gel in die vertikale Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt.

Zur Probenvorbereitung wurde jeweils 10 µl der Proteinlösung mit 2,5 µl des 5x Auftragspuffers versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert und die SDS-PAGE unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer bei 120 V für ca. 2 h durchgeführt, bis der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreichte. Anschließend wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer entnommen und für mind. 30 min in Commassie-Brilliantblau-Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden schließlich durch Schwenken für 20 min in Entfärbelösung 1 und danach in Entfärbelösung 2 sichtbar gemacht. Das entfärbte SDS-Gel wurde dann unter weißem Licht durch Fotografieren dokumentiert und bei Bedarf in Aufbewahrungslösung gelagert.

2.4.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationen reiner Proteinlösungen wurden durch die Absorption von Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten bei 280 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (1)$$

Die Absorptionsmessungen wurden mit Hilfe eines Nanodrop Photometers unter Abzug der Eigenabsorption des eingesetzten Puffers durchgeführt. Die benötigten molaren Extinktionskoeffizienten wurden mittels eines Algorithmus, der die Absorptionsbeträge der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und ggf. Cystin für eine vollständig entfaltete Polypeptidkette summiert (Gill & von Hippel, 1989), für jedes Protein mit Hilfe des ProtParam-Tools des ExPASy Bioinformatics Resource Portals (www.expasy.org) ermittelt (Gasteiger *et al.*, 2003).

Tabelle 1: Molare Extinktionskoeffizienten der in der vorliegenden Arbeit in *E. coli* produzierten Proteine bei 280 nm. Durch die Länge des eingesetzten Linkers bzw. Einführung von die Heterodimerisierung stabilisierender Mutationen oder Anwendung der PASylation-Technologie änderten sich Extinktionskoeffizienten der daraus entstehenden Varianten im Vergleich zu den hier aufgeführten Vorläuferproteinen nicht.

Protein	Extinktionskoeffizient ε_{280} [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
BdPTE	34950
OpdA	34950
OpdA(LA)	33460
CotA	93740
Ophc2	44015
OpaA	67270
scPTE(PAS40/100/200)	83420
hdPTE*(PAS100)	72420
hdPTE*	72420
PASylierte scPTE(PAS100)	73910

2.4.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Um die Konzentration einer Proteinlösung zu erhöhen oder einzustellen, wurde die Ausgangslösung mit Hilfe von Konzentratoreinheiten (Amicon, Merck) mit geeigneter Ausschlussgröße (30 kDa) auf ein der gewünschten Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Hierfür wurde die Konzentratormembran zunächst mit 5 ml des verwendeten Puffers gespült und anschließend die Proteinlösung durch Zentrifugation (Sigma 4K10, 3000 rpm,

4 °C) konzentriert. Die zurückbleibende konzentrierte Proteinlösung wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

2.4.5 Verringerung und Kontrolle des Endotoxingehaltes

Da die in dieser Arbeit in *E. coli* produzierten rekombinanten Proteine zukünftig für Tierversuche verwendet werden sollten, musste der Endotoxingehalt in den gereinigten Proteinproben verringert werden, um Fieberreaktionen der Versuchstiere auszuschließen.

Zur Verringerung des Endotoxingehaltes wurden die Säulen Proteus NoEndo HC der Firma Generon verwendet und nach Herstellerprotokoll angewendet. Zur Äquilibration wurde 10 ml sterilfiltrierter SEC Puffer bei 500 g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit bis zu 20 ml der zuvor sterilfiltrierten Proteinprobe durch Zentrifugieren bei 100 bis 200 g für 30 min beladen. Mit dem erhaltenen Eluat wurden weitere zwei Wiederholungen durchgeführt.

Anschließend wurde der Endotoxingehalt in der Probe mit Hilfe des Endosafe-PTS Testsystems der Firma Charles Rivers bestimmt. Der Test wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das Testgerät sowie die gekühlten Testkassetten wurden in einem klimatisierten Raum für 30 min auf RT gebracht. Die mit der Säule behandelten Proben wurden für die Bestimmung im Verhältnis 1:100 mit endotoxinfreiem ddH₂O verdünnt, wobei endotoxinfreie Pipettenspitzen verwendet und anschließend 20 µl der verdünnten Proben blasenfrei in die Kavität der Testkassette aufgetragen wurden.

2.5 Enzymatische Aktivitätsanalysen

Für die Bestimmung der enzymatischen Parameter der hdPTE*(PAS100) sowie der homodimeren OpdA(LA) wurde ein gekoppelter *Assay* mit dem Pestizid Malaoxon und Ellmans-Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) (Ellman *et al.*, 1961) durchgeführt. Dabei reagiert die freiwerdende Thiolgruppe des Hydrolyseprodukts von Malaoxon mit dem Ellmans-Reagenz, sodass die dabei im äquimolaren Verhältnis entstehenden TNB⁻-Ionen die photometrische Verfolgung der Enzymaktivität bei 412 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Synergy 2) erlaubte. Alle Kinetiken wurden in Triplikaten bei 37 °C in einem Volumen von 250 µl in einer Flachboden-Mikrotiterplatte bestimmt. Ein Reaktionsansatz enthielt 10 nM des jeweiligen Enzyms, 0,125 µM DTNB, 0,100 µM ZnSO₄, 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM NaCl. Durch Zugabe von 0,05 bis 8 mM Malaoxon (Stammlsg. gelöst in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 100 mM NaCl) wurden die Reaktionen gestartet. Zur Auswertung wurden die Anfangsgeschwindigkeiten innerhalb des linearen Bereichs der A₄₁₂-Werte mit Hilfe einer Kalibriergeraden, die durch L-Cysteiniumchlorid und DTNB erstellt worden war, bestimmt und gegen die eingesetzte Substratkonzentration

aufgetragen. Die Anpassung der Anfangsgeschwindigkeiten erfolgte mittels der Michaelis/Menten-Gleichung und der Software PRISM 6.01 (GraphPad Software).

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

Die Erstellung der Substrat-*Fingerprints* wurde von Frau Anja Köhler am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchgeführt, da für die Handhabung von OP-Kampfstoffen eine besondere Zertifizierung des Labors erforderlich ist. Die katalytischen Effizienzen der Enzyme wurden dabei mittels eines modifizierten AChE-Inhibitionsassays (Worek *et al.*, 2012) gegenüber einem breit gefächertem Spektrum an OP-Substraten ermittelt.

2.6 Biophysikalische Methoden

2.6.1 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der in *E. coli* produzierten Proteine erfolgte mit Hilfe eines ESI-TOF-Massenspektrometers (*Electrospray Ionisation – Time of Flight*, ESI-TOF) des Typs MaXis der Firma Bruker.

Für die Messungen wurden mindestens 5 μM Protein in einem Volumen von 100 μl gegen 1 l 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,8) unter Verwendung von Mikrodialyseeinheiten (*Slide-A-Lyzer Dialysis Unit*, MWCO 10 kDa, Thermo Fisher Scientific) über Nacht dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Probe in frischen Dialysepuffer überführt und erneut für mindestens 4 h dialysiert. Anschließend wurde die Probe kurz vor der Messung mit 20 % (v/v) Acetonitril versetzt. Die aufgenommenen Massenspektren wurden mit Hilfe der Software Data Analysis 4.0 von Bruker über den gewünschten Massenbereich dekonvuliert und ausgewertet.

Für die Analyse von Disulfidbrücken wurde das rekombinante Protein jeweils im oxidierten als auch im reduzierten Zustand massenspektrometrisch untersucht. Die oxidierte Probe wurde wie oben beschrieben behandelt und vermessen. Zur Reduktion der vorhandenen Disulfidbrücken wurden mindestens 5 μM rekombinantes Protein mit 5 mM DTT für 30 min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Während des ersten Dialyseschrittes wurde der verwendete Dialysepuffer 10 mM Ammoniumacetat mit 5 mM DTT versetzt und auf pH 7,3 eingestellt, da der Bereich für eine optimale reduzierende Wirkung nach Herstellerangaben zwischen pH 7,1 und 8 liegt. Um gleiche Ausgangsbedingungen wie bei den übrigen Messungen zu erreichen, wurde die Probe anschließend für 4 h gegen 1 l 10 mM Ammoniumacetat (pH 6,8) dialysiert und wie oben beschrieben für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Die gemessenen Molmassen wurden verglichen, wobei ein Massenunterschied zwischen reduzierter und oxidierte Form von 2 Da auf die Anwesenheit einer Disulfidbrücke hinwies.

2.6.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie ist eine chiroptische Methode, die in dieser Arbeit zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts und thermischen Stabilität der gereinigten rekombinanten Proteine angewendet wurde. Diese Methode liefert ein Spektrum auf Grundlage der Differenz der Absorptionswerte eines chiralen Chromophors gegenüber rechts- und links-zirkular polarisiertem Licht.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte in einer speziellen Filmküvette aus Quarzglas (Typ: 110-QS) mit einer Schichtdicke von 0,1 cm bei 25 °C. Dafür wurden die zur Homogenität gereinigten Proteinproben zunächst gegen CD-Puffer (20 mM KPi , 50 mM K_2SO_4 , pH 7,5) dialysiert (MWCO 12 bis 16 kDa) und die Spektren zwischen 250 und 190 nm durch Akkumulation von mindestens 8 Einzelspektren ($\text{Response} = 1 \text{ s}$, $\text{Bandwidth} = 1 \text{ nm}$, $\text{Data Pitch} = 0,1 \text{ nm}$, $\text{Scan Speed} = 50 \text{ nm/min}$) generiert. Die gemessenen Werte für die Elliptizität Θ_{obs} wurden auf die molare Elliptizität Θ_M mit Hilfe der Gleichung (3) normalisiert, wobei c die Proteinkonzentration in mol/l und d die Küvettschichtdicke in cm bezeichnet.

$$\Theta_M = \frac{\Theta_{obs}}{c \cdot d} \quad (3)$$

Die thermischen Entfaltungsübergänge der rekombinanten Proteine wurden mittels einer Quarzküvette (Schichtdicke 0,1 cm) bei einer Wellenlänge von 210 nm gemessen, da hier die größte Differenz des CD-Signals zwischen nativem und bei 99 °C vollständig denaturiertem Zustand für alle untersuchten Proteine zu beobachten war. Die Proben wurden wie oben beschrieben vorbereitet und die Messungen mit Schritten von 0,1 °C aufgenommen, wobei die gemessene Elliptizität Θ_{obs} gegen die Temperatur aufgetragen wurde. Die Entfaltungskurven wurden über einen Bereich von 25 bis 99 °C mit einem Temperaturgradienten von 60 K/h aufgezeichnet, wobei die übrigen Einstellungen des CD-Spektropolarimeters denen zur Aufnahme von CD-Spektren entsprachen. Der Auswertung der erhaltenen Rohdaten wurde ein Zweizustandmodell der Proteinfaltung zugrundegelegt (Lumry *et al.*, 1966). Dieses Modell lässt natives und vollständig denaturiertes Protein in signifikanten Mengen vorliegen und vernachlässigt Intermediate. Die Normierung und Kurvenanpassung der thermischen Entfaltungskurven erfolgte mittels *Six-Parameter-Fit* nach Schlehuber & Skerra (2002).

Da die zweikettige hdPTE* eine dreistufige Entfaltungskurve aufwies, wurde die Kurvenanpassung zunächst für den zweiten Übergang durchgeführt. Die daraus erhaltenen Parameter für das mittlere Plateau wurden für Ermittlung der übrigen Parameter des ersten Übergangs fixiert.

2.7 Computerprogramme und Datenbanken

A plasmid Editor 2.0.61 (ApE)	Wayne Davis, Salt Lake City, UT, USA
BioDocAnalyse 2.67.0.6	Biometra, Göttingen
(PSI-)BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)	(Altschul <i>et al.</i> , 1990)
BRENDA (www.brenda-enzymes.org)	(Schomburg <i>et al.</i> , 2017)
Creative Suite 4	Design Standard Adobe Systems, San Jose, CA, USA
ChemDraw Ultra 12.0	PerkinElmer, Rodgau
Data Analysis Software 4.0	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Disulfide by Design 2 (www.cptweb.cpt.wayne.edu/DbD2/index.php)	(Craig & Dombkowski, 2013)
EndNote X8.2	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
ExpASy; ProtParam (http://web.expasy.org/protparam)	(Gasteiger <i>et al.</i> , 2003)
Gen5 1.09.7	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA
GraphPad PRISM 6.01	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
NanoDrop 2000/2000c 1.6.198	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot
Office 365 ProPlus	Microsoft, Redmond, WA, USA
PDBePISA (www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa)	(Krissinel & Henrick, 2007)
Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb)	(Berman <i>et al.</i> , 2000)
PyMol 2.2.2	(DeLano, 2002)
SnapGene 3.3	GSL Biotech LLC, San Diego, CA, USA
Quant	TotalLab, Newcastle upon Tyne, UK
Unicorn 5.20	GE Healthcare, Freiburg
UniProt (www.uniprot.org)	(Apweiler <i>et al.</i> , 2004)

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung bakterieller Enzymkandidaten als katalytische Bioscavenger

Als Grundlage der Evaluierung verschiedener sich für die Detoxifizierung von OPs eignender Enzymkandidaten wurde ein publizierter Stammbaum herangezogen, der die Gensequenzen diverser OP-abbauender Enzyme umfasst und diese nach ihrer Sequenzidentität in Klassen einteilt (Singh, 2009). Repräsentativ für jeweils eine von vier Klassen wurden hier die Phosphotriesterase (BdPTE; Uniprot: P0434) aus *B. diminuta* (Serdar *et al.*, 1982), OpdA (Uniprot: Q93LD7) aus *A. radiobacter* (Horne *et al.*, 2002), Ophc2 (Uniprot: Q5W503) aus *P. pseudoalcaligenes* (Chu *et al.*, 2006) und OpaA (Uniprot: Q44238) aus *Altermonas sp.* (Cheng *et al.*, 1996) ausgewählt. Neben der natürlichen OpdA wurde auch die hinsichtlich der Hydrolyse des Pestizids Malaoxon verbesserte Variante OpdA(S308L/Y309A) in die Auswahl aufgenommen (Naqvi *et al.*, 2014). Darüber hinaus wurde aufgrund eingehender Literaturrecherche die LMCO (*Laccase-like Multicopper Oxidase*) CotA (Uniprot: P07788) aus *B. subtilis* (Amitai *et al.*, 1998) als weiterer Kandidat herangezogen.

Die genannten Enzyme bauen OP-Substrate entweder durch hydrolytische oder oxidative Spaltung ab und repräsentieren damit unterschiedliche Mechanismen. Von Interesse bei der Evaluierung dieser Enzymkandidaten für die biotechnologische und pharmazeutische Anwendung war nicht nur die katalytische Effizienz gegenüber einzelnen OPs, sondern vor allem ein breites Substratprofil. Für die gewählten Enzyme wurden synthetische Gene ohne ihre TAT-Signalpeptide geplant und anschließend in das als Expressionsvektor dienende Plasmid pASK-IBA5(+) (Skerra, 1994) kloniert. Neben der gentechnischen Produktion und Reinigung werden in folgendem Kapitel *Fingerprints* bezüglich der katalytischen Effizienzen der einzelnen rekombinanten Proteine gegenüber einer Auswahl an repräsentativen OPs beschrieben und analysiert.

3.1.1 Gentechnische Produktion und Reinigung der Phosphotriesterasen BdPTE und OpdA

Für die gentechnische Proteinproduktion der verschiedenen Enzymkandidaten wurden die Plasmide pASK-IBA5(+)-bdPTE und -opdA durch Klonierung der einzelnen Strukturgene auf den Expressionsvektor pASK-IBA5(+) konstruiert (Abbildung 9 A). Das Plasmid für die Variante OpdA(LA) wurde durch ortsgerichtete Einführung der Mutationen S308L und Y309A in den Vektor pASK-IBA(5+)-opdA generiert. Bei dem verwendeten Expressionsvektor handelt es sich um ein pUC19-Derivat für die Produktion heterologer Proteine in *E. coli* unter der Kontrolle des tetA Promotor-/Operators (Skerra, 1994). Weiterhin befindet sich an den N-

Termini der Strukturgene zur effizienten Affinitätsreinigung des *Strep*-tag II-Anhängsel (Schmidt & Skerra, 2007).

Die heterologe Produktion der Phosphotriesterasen erfolgte cytoplasmatisch in *E. coli* BL21 bei 30 °C im 2 l-Kulturmaßstab mit LB-Medium, das mit 0,2 mM ZnSO₄ supplementiert worden war. Die Genexpression wurde bei einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,6 mittels aTc (0,2 mg/l Endkonzentration) für 3 bis 5 h induziert. Zum Zeitpunkt der Zellernte betrug die OD₅₅₀ ungefähr 2,1 bis 3,5 und die Zellen wurden mittels Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Darauf folgte die präparative Isolierung der Enzyme aus dem löslichen Gesamtzellextrakt mittels *Strep*-tag II-Affinitätschromatographie (**Abbildung 9 B, D**), wobei der Chromatographiepuffer mit 0,1 mM ZnSO₄ (0,1 mM) versetzt war und kein EDTA enthielt, um die Beladung der aktiven Zentren mit Zinkionen nicht zu beeinträchtigen. Abschließend wurden

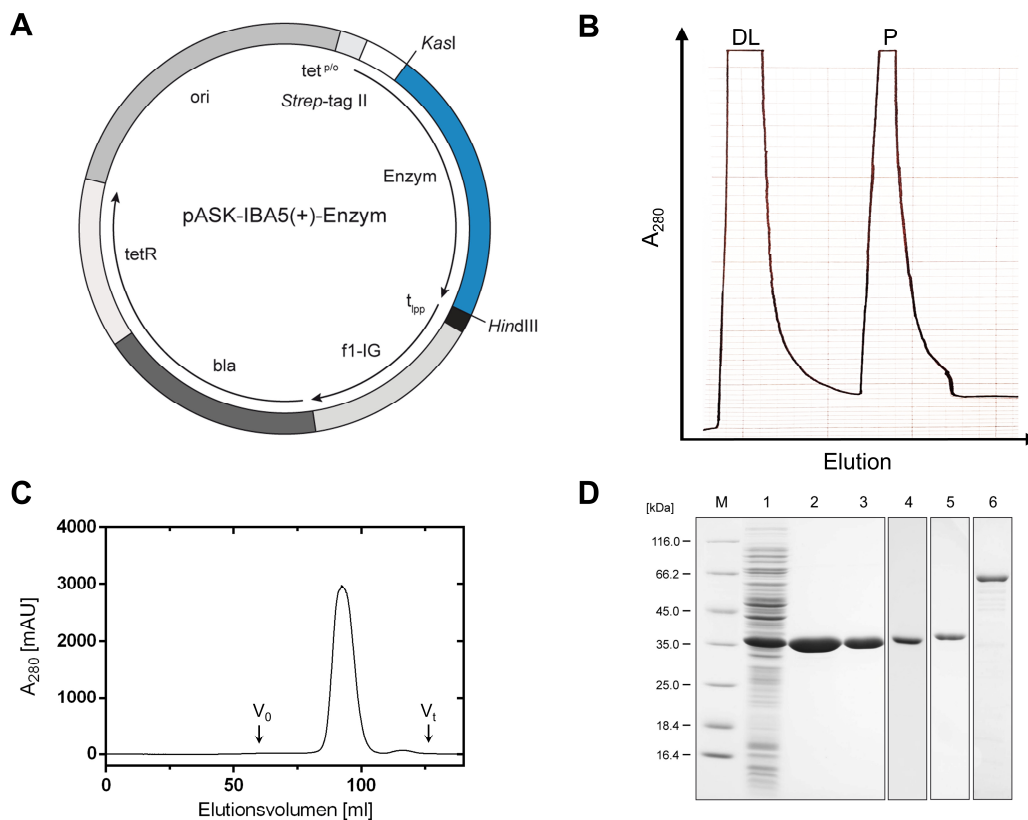


Abbildung 9. Überblick über die gentechnische Herstellung der Hydrolasen BdpTE, OpdA, OpdA(LA), Ophc2 und der Oxidoreduktase CotA. (A) Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors pASK-IBA5(+), der für die unterschiedlichen Enzymkandidaten unter Kontrolle des mit Anhydrotetracyclin regulierbaren tet-Promotor/Operators (tet^{ptc}), gefolgt vom Lipoprotein-Transkriptionsterminator (t_{lpp}), kodiert (Skerra, 1994). Am 5'-Ende ist das jeweilige Strukturgen mit einer für das Affinitätsanhangsel *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) kodierenden Sequenz fusioniert. Die konstitutive Expression des Transkriptionsfusion aus tet-Repressor (tetR) und bla-Gen, ermöglichte die effektive Repression des Promotors wie auch die antibiotische Selektion. Weiterhin trägt das Plasmid den Replikationsursprung der pUC-Familie (ori) und die intergene Region des filamentösen Phagen f1 (f1-IG). (B) Für die Enzymkandidaten beispielhaftes Elutionsprofil der Reinigung der Ophc2 durch Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC): DL, Durchlauf fraktion; P, mit 2,5 mM D-Desthiobiotin eluierte Peak fraktion. (C) Für die Enzymkandidaten beispielhafte präparative Gelfiltration der SAC-Elutionsfraktion der Ophc2 an einer Superdex S200 16/60 Säule. (D) 12 %-ige reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Proteingrößenstandard; Spur 1: bakterieller Gesamtzellextrakt; Spur 2: gereinigte Ophc2 nach SAC; Spur 3-6: abschließend durch SEC gereinigte Fraktion von Ophc2 (Spur 3), BdpTE (Spur 4), OpdA (Spur 5) und CotA (Spur 6).

die rekombinanten Proteine durch Gelfiltration zur Homogenität gereinigt und in Tris/NaCl-Puffer wiederum mit zugesetztem Zink (10 μ M) und Hydrogencarbonat (10 mM) gelagert (**Abbildung 9 C**).

Bei von Frau Laura Job und Frau Anja Köhler durchgeführten Aktivitätsanalysen wurde beobachtet, dass sich durch den Zusatz von Hydrogencarbonat die für Enzymaktivität wichtige post-translationale Carboxylierung der ϵ -Aminogruppe des Lys169 im aktiven Zentrum der BdPTE 10-2-C3 stabilisieren ließ. Die Ausbeuten pro Liter Kultur mit einer auf 1,0 normierten OD₅₅₀ betragen für die BdPTE etwa 1,0 mg und für die OpdA bzw. OpdA(LA) etwa 0,4 mg bzw. 0,9 mg. Die Reinheit wurde durch SDS-PAGE bestimmt und belief sich für die hergestellten rekombinanten Proteine auf 99 % (**Abbildung 9 D**).

3.1.2 Gentechnische Produktion und Reinigung der Metallo- β -Lactamase Ophc2

Die Ophc2 wurde mit Hilfe des Plasmids pASK-IBA5(+)-ophc2 wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben gentechnisch hergestellt und gereinigt (**Abbildung 9**). Da die Ophc2 keine posttranslationale Carboxylierung aufwies, musste dem Lagerungspuffer lediglich Zink (10 μ M) zugesetzt werden. Die Ausbeute pro Liter Kultur mit einer auf 1,0 normierten OD₅₅₀ betrug etwa 7,7 mg. Die Reinheit von 99 % wurde durch SDS-PAGE bestätigt.

3.1.3 Gentechnische Produktion und Reinigung der Oxidoreduktase CotA

Zur gentechnischen Herstellung der Oxidoreduktase CotA wurde der Expressionsvektor pASK-IBA5(+)-cotA mit *E. coli* BL21 als Wirtsorganismus verwendet. Die Induktion der Genexpression erfolgte mittels aTc (0,2 mg/l Endkonzentration) bei einer OD₅₅₀ von \sim 0,6. Gleichzeitig wurde die Kultur mit 0,25 mM CuCl₂ versetzt, gefolgt von der Biosynthese für 15 h bei 25 °C. Dabei wurde die Schüttelfunktion abgeschaltet, um unter mikroaeroben Bedingungen (Sauerstoffkonzentration im Nährmedium deutlich geringer als 20 %) einen höheren Kupfereintrag in das bakterielle Cytoplasma zu erreichen (Durao *et al.*, 2008). Wie Durao *et al.* (2008) zeigten, konnte so ein erhöhter Kupfereinbau in das aktive Zentrum des Enzyms erzielt werden. Nach der Zellernte wurde die Oxidoreduktase durch SAC aus dem löslichen Gesamtzellextrakt isoliert und mittels Gelfiltration bis zu einer Reinheit von 90 bis 95 % gereinigt (**Abbildung 9 D**). Die Ausbeute an rekombinanter CotA pro Liter Kultur mit einer auf 1,0 normierten OD₅₅₀ betrug 0,4 mg.

3.1.4 Gentechnische Produktion und Reinigung der Prolidase OpaA

Für die gentechnische Herstellung der OpaA wurde wiederum der oben beschriebene Expressionsvektor mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel als Rückgrat verwendet, pASK-IBA5(+)-opaA (**Abbildung 9 A**). Die Kultivierung erfolgte unter Schütteln mit *E. coli* BL21 als Wirtsorganismus bei 30 °C im 2 l-Kulturmaßstab in LB-Medium, dem 0,2 mM MnCl₂

zugesetzt worden war. Die Genexpression im bakteriellen Cytoplasma wurde wie oben beschrieben durch aTc (0,2 mg/l Endkonzentration) induziert. Nach Zugabe des Induktors stagnierte die bei 550 nm gemessene optische Dichte und nahm im weiteren Verlauf leicht ab. Das gehemmte Zellwachstums deutete auf einen toxischen Effekt der Hydrolase OpaA hin. Auch eine Variation der Expressionsbedingungen, wie eine deutliche Verringerung der Induktorkonzentration (**Abbildung 10 A**; siehe Wachstumskurven mit BL21), Erniedrigung der Kultivierungstemperatur oder Kultivierung in reichhaltigerem TB-Medium führten nicht zu einer Verbesserung der Zellviabilität oder Ausbeute. Die Anwendung einer periplasmatischen Sekretionsstrategie (Skerra & Plückthun, 1988) durch Einführung eines N-terminalen OmpA-Signalpeptids in das Expressionsplasmid mit dem Stamm *E. coli* KS272 führte ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der Proteinausbeute. Das Polypeptid war auch bei Kotransformation mit dem Plasmid pTUM4, das die Überexpression von Faltungshelfern bewirkt (Schlapschy *et al.*, 2006), nicht isolierbar (**Abbildung 10 B**, vgl. Spur 2 und 3). Beim Einsatz des *E. coli* Stammes DH5 α , der aufgrund seiner Rekombinase- und Endonukleasedefizienz gewöhnlich nur für Klonierungsarbeiten verwendet wird, als Wirtsorganismus für die OpaA-Produktion nach Cheng *et al.* (1999) wurde ein geringerer hemmender Effekt auf das Zellwachstum festgestellt (**Abbildung 10 A**). Um die Verweildauer des rekombinanten Proteins innerhalb der Zelle möglichst gering zu halten, wurde die Genexpression bei 37 °C in TB-Medium mit MnCl₂-Zusatz (0,2 mM) erst bei einer OD₅₅₀ von ~ 3,3 mit aTc (0,04 mg/l Endkonzentration) für nur 2 h induziert. Nach der Zellernte konnte aus dem löslichen Gesamtzellextrakt eine äußerst geringe Menge (0,02 mg OD⁻¹ l⁻¹) an OpaA mittels SA-Affinitätschromatographie isoliert werden (**Abbildung 10 B**, vgl. Spur 4 und 5). Aufgrund der geringen Ausbeute und für erste

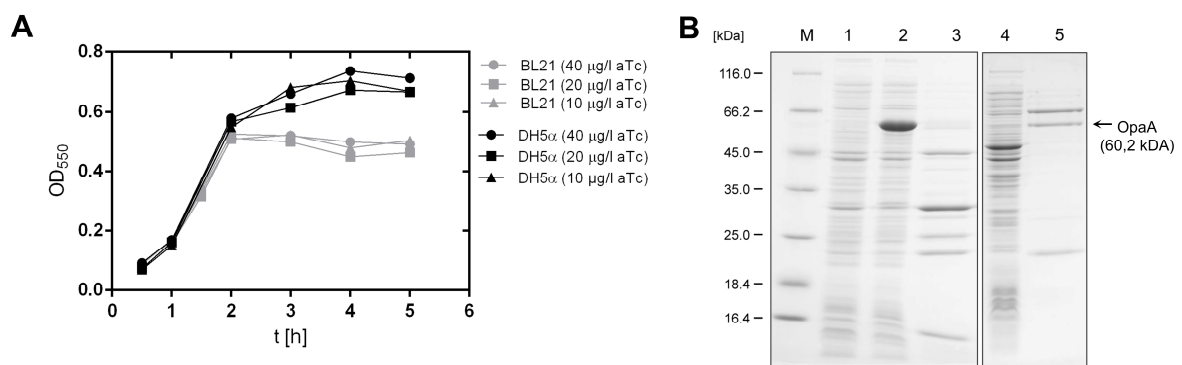


Abbildung 10. Gentechnische Herstellung der Prolidase OpaA. (A) Wachstumskurven der mit dem Expressionsvektor pASK-IBA5(+)-opaA transformierten Wirtsbakterien *E. coli* BL21 und DH5 α . Die Induktion erfolgte jeweils bei einer OD₅₅₀ von ~ 0,5 bis 0,6 mit unterschiedlichen Endkonzentrationen an Anhydrotetracyclin (aTc) (10, 20 und 40 µg/l) für 3 h. Die Kultivierung wurde bei dem Stamm BL21 bei 30 °C und bei DH5 α bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm) durchgeführt. (B) 12 %-ige reduzierende SDS-PAGE der periplasmatischen und cytoplasmatischen Zellfraktionen mit OpaA. Spur M: Proteingrößenstandard; Spur 1: Gesamtzellextrakt einer mit den Plasmiden pASK-IBA4-*opaA* und pTUM4 kotransformierten KS272-Kultur vor Induktion der Fremdgenexpression; Spur 2: Gesamtzellextrakt nach Induktion der Expression von OpaA mittels periplasmatischer Sekretionsstrategie; Spur 3: Extrakt der Periplasmafraktion nach Abtrennen der Sphäroplasten durch Zentrifugation; Spur 4: Gesamtzellextrakt nach Induktion der cytoplasmatischen Expression von OpaA in *E. coli* DH5 α ; Spur 5: Elutionsfraktion der cytoplasmatisch exprimierten OpaA nach Einschnitt-Reinigung des löslichen Gesamtzellextraktes durch SAC (Schmidt & Skerra, 2007).

enzymologische Untersuchungen ausreichenden Reinheit der Proteinpräparation (> 85 %) wurde von weiteren Reinigungsschritten abgesehen.

3.1.5 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung der Enzymkandidaten

Zur Analyse der Quartärstruktur und Reinheit sowie der korrekten Aminosäurezusammensetzung wurden für die Enzymkandidaten BdPTE, OpdA-Varianten, Ophc2 und CotA massenspektrometrische Analysen wie auch Bestimmungen der apparenten Molmasse mittels analytischer Gelfiltration durchgeführt (vgl. **Tabelle 2**), wofür eine Kalibriergerade anhand einer Standardreihe an globulären Proteinen erstellt wurde. Für alle Enzymkandidaten wurde zudem ein *Fingerprint* der katalytischen Effizienzen gegenüber einer Auswahl von gängigen OPs bestimmt.

Für die exakte Bestimmung der Molmassen wurden die rekombinanten Proteine mittels ESI-TOF-Massenspektrometrie unter sauren Bedingungen untersucht. Bei der Verdampfung im Vakuum werden nicht-kovalente Quartärstrukturen in der Regel zerstört, weshalb bei dieser Methode nur die Masse der einfachen Monomere erhalten wird. Durch Vergleich durch den mittels ExPasy (Gasteiger *et al.*, 2003) berechneten molekularen Massen der Enzyme konnte deren Aminosäurezusammensetzung überprüft werden. Die Polypeptide der rekombinanten Enzyme BdPTE, OpdA, OpdA(LA) und Ophc2 zeigten jeweils eine zu vernachlässigende Abweichung von < 1 Da gegenüber ihrer berechneten Molmasse. Dies deutet darauf hin, dass das posttranslational modifizierte Lysin der BdPTE und OpdA bei Denaturierung decarboxyliert. Bei CotA hingegen betrug diese 128,86 Da, was vermutlich auf die stabile Komplexierung von zwei der vier als Cofaktor gebundenen Kupfer(II)-Ionen zurückzuführen ist ($2 \cdot M_w \text{Cu(II)} = 127,10 \text{ Da}$). Bei der analytischen Gelfiltration wurde eine dimere Quartärstruktur für die Enzymkandidaten BdPTE, OpdA und Ophc2 bestätigt. Die bestimmten apparenten Molmassen der Enzyme lagen etwas unterhalb der berechneten Masse eines Dimers,

Tabelle 2. Biophysikalische Parameter der einzelnen Enzymkandidaten. Neben den apparenten Molmassen M_w (app.) mittels analytischer Gelfiltration sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie M_w (obs.) der Enzyme angegeben. Die berechneten Massen M_{kalk} wurden mit ExPASy ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003) ermittelt.

Protein	$M_{\text{kalk, Monomer}}$ [Da]	$M_{\text{kalk, Dimer}}$ [kDa]	M_w (app.) [kDa]	M_w (obs.) [Da]	ΔM_w [Da]
BdPTE	37617,93	75,2	51,9	37617,10	0,83
OpdA	40029,66	80,0	69,5	40028,80	0,86
OpdA(LA)	39963,65	80,0	69,5	39963,00	0,65
Ophc2	33607,09	67,2	56,7	33607,91	0,82
CotA	59692,23	-	50,2	59821,09	128,86

da Proteinfaltung sowie die Assoziation der einzelnen Untereinheiten zu einer kompakteren globulären Form führen. CotA lag wie in der Literatur beschrieben als Monomer vor (Enguita *et al.*, 2003) und zeigte ebenfalls eine etwas kleinere apparente Molmasse als berechnet.

Neben der biophysikalischen Charakterisierung war die Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten gegenüber unterschiedlichen OPs für die Überprüfung der Eignung als *Bioscavenger* von Bedeutung. Aufgrund der strengen gesetzlichen Regulierung des Umgangs mit OPs wurden die *Assays* in einem zertifizierten Labor am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr (München) von Frau Anja Köhler durchgeführt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein Acetylcholinesterase (AChE)-Inhibitionsassay (Worek *et al.*, 2012) verwendet. Dabei wurden das jeweilige OP und das gereinigte rekombinante Enzym unterschiedlich lange inkubiert, sodass eine je nach Geschwindigkeit des Enzyms zunehmende Hydrolyse des OP-Substrats stattfand. Anschließend wurden als AChE-Quelle dienende menschliche Erythrozyten-Geisterzellen – leere Blutzellen – hinzugefügt, wobei die AChE durch das verbliebene OP in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert wurde. Der Anteil an aktiver AChE hydrolysierte das zugegebene Substrat Acetylthiocholin und die freigesetzten Thiolgruppen wurden durch das Ellman's Reagenz in einer chromogenen unkatalysierten Reaktion umgesetzt. Der Konzentrationsanstieg der TNB⁻-Ionen wurde bei 412 nm photometrisch verfolgt, womit die Restaktivität der AChE bestimmt wurde. Damit konnte auf die katalytische Effizienz des OP hydrolysierenden Enzyms geschlossen werden.

Um die Substratpräferenzen der Enzymkandidaten abschätzen zu können, wurden die katalytischen Effizienzen gegenüber den OP-Kampfstoffen VX, CVX und Sarin (GB) sowie dem Pestizid Paraoxon (PXE) bestimmt (**Abbildung 11 A**). Die BdPTE zeigte mit $1,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ die höchste Aktivität gegenüber VX, wohingegen die OpaA CVX am

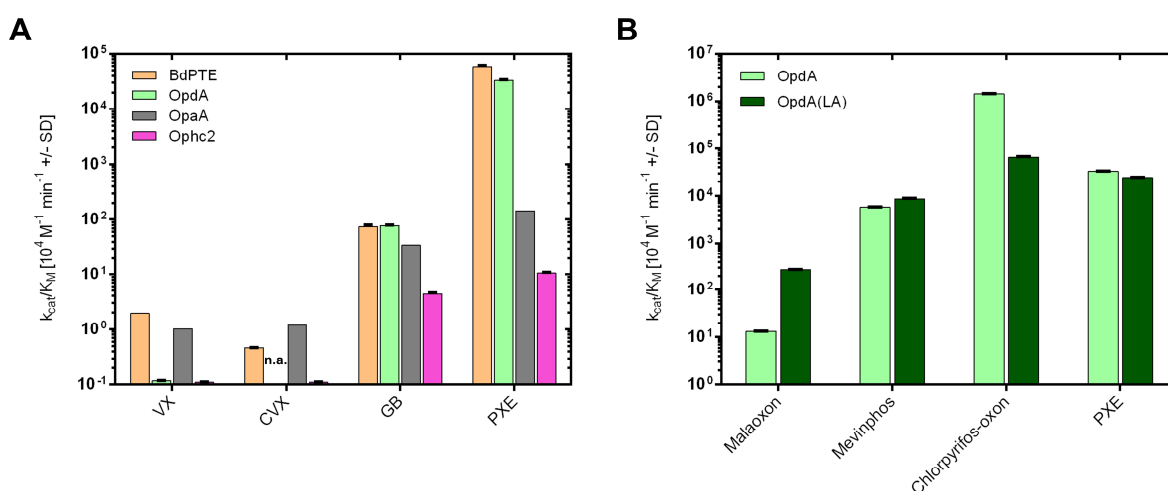


Abbildung 11. Analyse der katalytischen Effizienzen der Enzymkandidaten gegenüber ausgewählten OP-Verbindungen mittels AChE-Inhibitionsassay. Die Experimente wurden von Frau Anja Köhler am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Bundeswehr durchgeführt. Werte sind als Mittelwerte angegeben (N = 2). (A) *Fingerprint* der Hydrolasen BdPTE, OpdA, OpaA und Ophc2 gegenüber den OP-Kampfstoffen VX, CVX, GB und dem Pestizid Paraoxon (PXE). (B) *Fingerprint* der OpdA und ihrer hinsichtlich der Hydrolyse von Malathion verbesserten Mutante OpdA(S308L/Y309A) gegenüber einer Auswahl häufig eingesetzter OP-Pestizide.

effizientesten hydrolysierte ($1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Die V-Kampfstoffe wurden von der OpdA und Ophc2 nur sehr langsam oder überhaupt nicht abgebaut. Sowohl die BdPTE als auch die OpdA zeigten gegenüber GB mit ca. $8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ die höchste Aktivität und bauten PXE sogar mit einer Geschwindigkeit nahe dem Diffusionslimit ab ($> 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Für die CotA konnten mit diesem Assay keine Werte bestimmt werden, da der bei dem Inkubationsschritt des Enzyms mit dem OP zusätzlich hinzugefügte Mediator ABTS vermutlich mit Acetylthiocholin bzw. Ellman's Reagenz in den späteren Arbeitsschritten reagierte und so die Ergebnisse verfälschte.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaft der OpdA, ein breites Spektrum an OP-Insektiziden zu hydrolysieren (Horne *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008), wurde zusätzlich ein *Fingerprint* bezüglich häufig eingesetzter OP-Pestizide wie Malaoxon, Mevinphos und Chlorpyrifos-oxon bestimmt (**Abbildung 11 B**). Tatsächlich zeigte die OpdA hohe katalytische Effizienzen gegenüber Mevinphos und Chlorpyrifos-oxon von $5,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bzw. $14 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die mutierte Version OpdA(LA) (Naqvi *et al.*, 2014) degradierte Chlorpyrifos-oxon zwar etwas langsamer als der Wildtyp aber immer noch mit einer katalytischen Effizienz von mehr als $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Dagegen hydrolysierte die Mutante das Pestizid Malaoxon, das giftigere Zerfallsprodukt des Malathion (Aker *et al.*, 2008), mit $2,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ um den Faktor 20 effizienter.

Aus den erhaltenen *Fingerprints* konnte geschlossen werden, dass die BdPTE ein breites Substratprofil und relativ hohe Hydrolyseaktivität gegenüber OP-Kampfstoffen aufweist, wohingegen die OpdA bzw. deren Variante OpdA(LA) OP-Pestizide besonders effizient abbaut. Die übrigen Enzymkandidaten Ophc2 und OpaA wiesen entweder niedrigere Aktivität oder eine geringe Ausbeute als rekombinante Proteine auf, sodass ein *Engineering* dieser Enzyme hinsichtlich der Verbesserung der Aktivität oder Erweiterung des Substratprofils nicht in Betracht gezogen wurde.

3.2 Design und Entwicklung einer heterodimeren *single-chain* PTE (scPTE) mit verbreitertem Substratspektrum gegenüber Nervenkampfstoffen

In der Regel führt eine Erhöhung der Enzymaktivität im Verlauf der Proteinevolution *in vitro* zu einer Spezialisierung auf bestimmte Substrate (Khersonsky & Tawfik, 2010). Dies gilt auch für die weitgehend optimierten BdPTE-Varianten 10-2-C3 und dessen punktmutierte Version 10-2-C3(I106A) (Goldsmith *et al.*, 2017), die trotz des minimalen Sequenzunterschieds unterschiedliche OP-Kampfstoffe als Substrate präferieren und nur diese mit sehr hoher Geschwindigkeit hydrolysieren. Im Hinblick auf die Detoxifizierung von OP-Kampfstoffen erschien ein erneutes *Engineering* der BdPTE mit Zielsetzung auf erhöhte katalytische Aktivität nicht mehr sinnvoll. Da ein universell einsetzbarer *Bioscavenger* ein breites Spektrum an Organophosphaten abdecken muss, wäre es wünschenswert, die divergierenden

Substratspezifitäten der genannten Mutanten zu vereinen. Angelehnt an das *Engineering* bispezifischer Antikörper wird im folgenden Kapitel das Design und die enzymologische Charakterisierung einer funktionellen heterodimeren PTE mit einem breiten Substratspektrum gegenüber Nervenkampfstoffen beschrieben. Durch Brechen der C2-Symmetrie der homodimeren Quartärstruktur sollte eine einkettige heterodimere *single-chain* PTE (scPTE) aus den beiden BdPTE-Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) konstruiert werden, die zwei unterschiedliche aktive Zentren mit individuellen Substratspezifitäten kombiniert.

3.2.1 Konstruktion eines modularen Expressionsvektors für die bakterielle Produktion einer scPTE aus den Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A)

Ähnlich der klassischen Herangehensweise für die Produktion von bispezifischen Immunglobulinen (Milstein, 2000) ergibt sich bei der Koexpression von zwei verschiedenen Enzymuntereinheiten in einer Wirtszelle das Problem, dass eine Mischung aus zwei unterschiedlichen Homodimeren (A/A und B/B) zusammen mit dem gewünschten Heterodimer (A/B) entsteht. Um dies zu vermeiden, wurde der C-Terminus einer PTE-Variante mittels eines strukturell ungeordneten Pro/Ala/Ser-Polypeptids (PAS) (Schlupschy *et al.*, 2013) genetisch mit dem N-Terminus der anderen Variante verknüpft. Als Kandidaten für die Erzeugung einer scPTE mit verbreitertem Substratspektrum gegenüber Kampfstoffen wurden die BdPTE-Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) ausgewählt (s. **Abbildung 6**). Da sich die Aminosäuresequenz nur in einem einzelnen Rest unterschied, sollten strukturelle Änderungen an der Grenzfläche der Untereinheiten minimal ausfallen und somit eine ungehinderte Heterodimerisierung ermöglichen. Dennoch wiesen beide Varianten komplementäre Substratprofile mit hohen Aktivitäten gegenüber verschiedenen OP-Kampfstoffen auf.

Als Rückgrat für des Expressionsvektor für die scPTE diente erneut das pUC19-Derivat pASK-IBA5(+). Strukturgene für die BdPTE-Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) wurden als doppelsträngige DNA-Fragmente mit für die Expression in *E. coli* optimierten Codons von der Firma Eurofins (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Dabei wurde die Codonnutzung für 10-2-C3(I106A) separat im Kontext des Gens von 10-2-C3 optimiert, um die genetische Sequenzidentität zu minimieren und die ortsgerichtete Mutagenese einzelner Positionen in beiden kodierenden Regionen zu ermöglichen. Zu Beginn wurde mit Hilfe flankierender Primer am C-Terminus des für die Variante 10-2-C3 kodierenden synthetischen Gens durch PCR ein Nukleotidabschnitt eingeführt, der eine *AfeI*-Schnittstelle, zwei durch sechs Nukleotide getrennte invertierte *SapI*-Erkennungsstellen und eine *BamHI*-Schnittstelle umfasste. Das resultierende PCR-Produkt wurde anschließend durch eine N-terminale *KasI*- und die eingeführte *BamHI*-Schnittstelle in pASK-IBA5(+) eingefügt. Anschließend wurde eine *BamHI*-Schnittstelle durch PCR am 5'-Ende des synthetischen Gens der Variante 10-2-C3(I106A) eingeführt und das DNA-Fragment mittels *BamHI* und *HindIII* in das zuvor

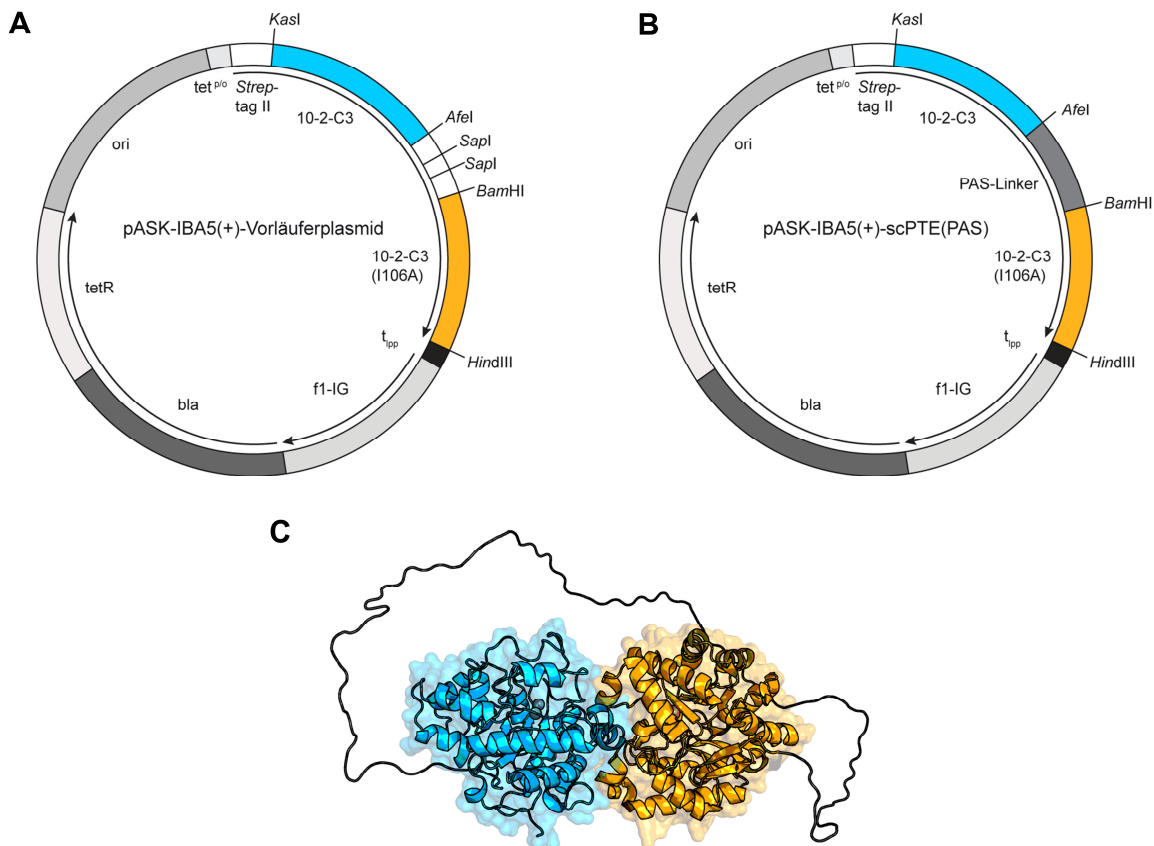


Abbildung 12. Vorläuferplasmid und Expressionsvektor für die scPTE bestehend aus den BdPTE-Untereinheiten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A). (A) Das auf pASK-IBA5(+) basierende Vorläuferplasmid kodiert für die beiden Strukturgene von *Strep*-10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) separiert durch eine intergenische Region. Das Design erlaubte einen modularen Austausch der Strukturgene wie auch der intergenischen Region zwischen der *AfeI* und *BamHI* Schnittstelle. Außerdem gestattete eine abgestimmte Codonverwendung der beiden Strukturgene die ortsgerichtete Mutagenese einzelner Positionen. (B) Expressionsplasmid für eine scPTE mit verbreitertem Substratspektrum gegenüber OP-Kampfstoffen, bei der die intergenische Region des Vorläuferplasmids durch einen PAS-Linker mit variiert Länge ausgetauscht wurde. Das am N-Terminus befindliche *Strep*-tag II (Schmidt & Skerra, 2007) ermöglichte die effiziente Isolierung des rekombinanten Proteins aus dem löslichen Gesamtzellextrakt mittels Affinitätschromatographie. (C) Computergestützte Modellierung der Struktur der scPTE ausgehend von dem Koordinatensatz für die BdPTE (PDB ID: 1HZY).

hergestellte Plasmid inseriert (**Abbildung 12 A**). Schließlich konnten PAS-Genkassetten beliebiger Länge mittels der beiden *SapI*-Restriktionsschnittstellen eingebracht werden, wobei deren Erkennungssequenzen des Typs IIa während dieses Klonierungsschrittes eliminiert wurden (**Abbildung 12 B**). Auf diese Weise wurden Expressionsplasmide für die Varianten scPTE(PAS40), scPTE(PAS100) und scPTE(PAS200) hergestellt. Die so konstruierten scPTE-Expressionsvektoren weisen einen modularen Aufbau auf, sodass Strukturgene und Linker beliebig durch Restriktionsverdau und Ligierung ausgetauscht werden konnten.

3.2.2 Gentechnische Produktion und Reinigung von scPTE-Varianten mit PAS-Linkern verschiedener Länge

Da es sich bei der scPTE um ein neuartiges Enzymformat handelte, lagen noch keine Erfahrungen hinsichtlich der biotechnologischen Herstellung vor. So diente die Variante scPTE(PAS100) als „Erlkönig“ für die Expression und Reinigung. Dafür wurde *E. coli* BL21

mit dem Plasmid pASK-IBA5(+)-scPTE(PAS100) transformiert und die Zellen im 2 l-Maßstab in TB-Medium, supplementiert mit 0,2 mM ZnSO₄ als Kofaktor, bei 22 °C bis zu einer OD₅₅₀ von ca. 2,0 kultiviert. Anschließend wurde die cytoplasmatische Biosynthese der scPTE durch Zugabe von aTc (0,2 mg/L Endkonzentration) induziert, wobei die Bakterien nach 15 h bei einer OD₅₅₀ von ca. 4,0 bis 4,5 geerntet wurden. Es folgte die Isolierung der scPTE(PAS100) gewonnenen löslichen Gesamtzellextrakt mittels Affinitätschromatographie an Streptavidin-Sepharose. Die anschließende Analyse der SAC-Elutionsfraktion durch reduzierende SDS-PAGE zeigte eine distinkte Bande für das scPTE(PAS100)-Polypeptid (**Abbildung 13 B**, s. Spur 2). Die nachfolgende Gelfiltration offenbarte allerdings neben der gewünschten intramolekular assoziierten scPTE (M_w (app.) = 99,0 kDa) oligomere Nebenprodukte (M_w (app.) = 218,8 kDa) (**Abbildung 13 C**, s. scPTE(PAS100)). Eine Erklärung für den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus lieferte der Vergleich mit der Bildung von sog. *Diabodies* bei der biotechnologischen Herstellung von scFv-Fragmenten (Holliger *et al.*, 1993). Die Oligomere der scPTE entstanden offenbar durch intermolekulare Assoziation von zwei

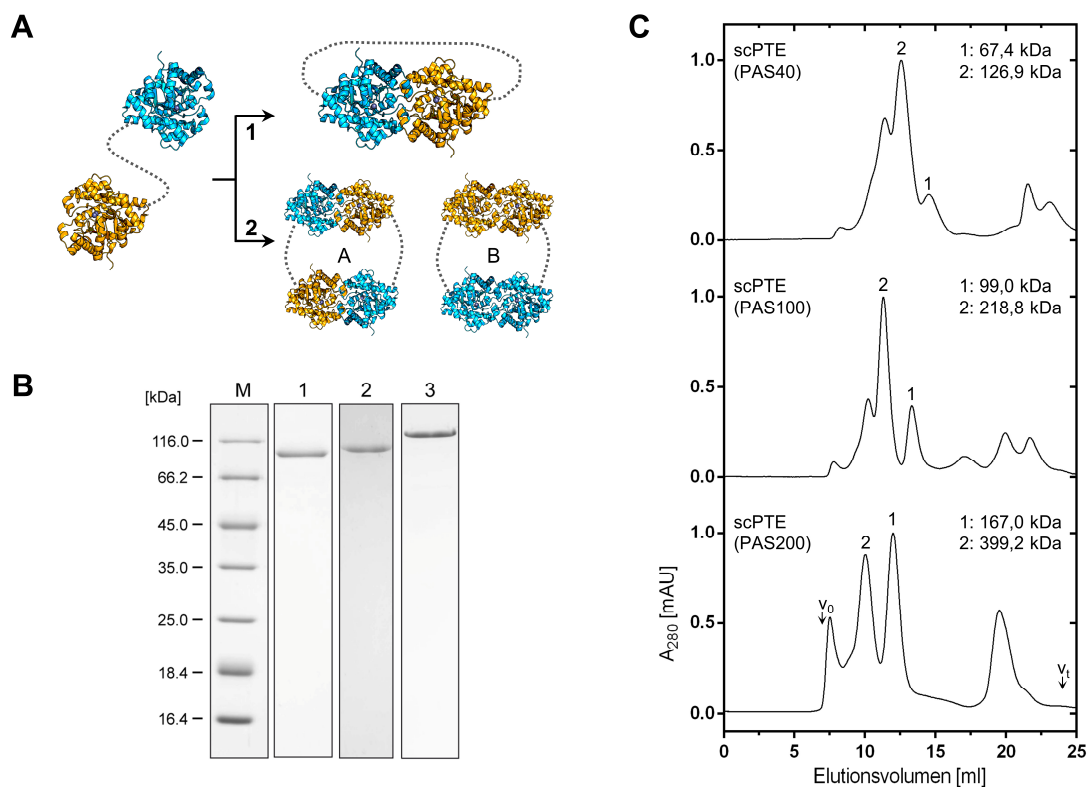


Abbildung 13. Untersuchung des Oligomerisierungsverhaltens der mittels Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC) im Einzschritt-Verfahren gereinigten scPTE-Varianten mit unterschiedlich langen PAS-Linkern. (A) Schematische Darstellung der Assoziationsmöglichkeiten des scPTE-Polypeptids. 1: Intramolekulare Assoziation; 2: Intermolekulare (a) Hetero- bzw. (b) Homodimerisierung (B) 12 %-ige reduzierende SDS-PAGE von SAC gereinigten scPTE-Varianten mit unterschiedlicher Linkerlänge. Spur M: Proteingrößenstandard (kDa); Spur 1: SAC-Elutionsfraktionen der scPTE(PAS40); Spur 2: scPTE(PAS100); Spur 3: scPTE(PAS200). (C) Analytische Gelfiltration der mittels SAC aus dem löslichen Gesamtzellextrakt von *E. coli* isolierten scPTE-Spezies mit ihren jeweiligen apparenten Molekulargewichten. Neben der gewünschten intramolekularen Variante (1) zeigen die Elutionsprofile zudem intermolekulare Dimere (2). Dabei ist das Verhältnis zwischen beiden Spezies abhängig von der verwendeten Länge des PAS-Linkers. Die Signale im späten Chromatographieverlauf (ab ~ 20 ml) sind auf niedermolekulare Verunreinigungen zurückzuführen.

scPTE-Molekülen, wobei die Untereinheiten entweder homo- oder heterodimerisieren konnten (**Abbildung 13 A**).

Die Bildung von *Diabodies* aus scFV-Fragmenten wird durch einen kürzeren die V_H - und V_L -Domäne verbindenden Linker begünstigt (vgl. **Abbildung 35**) (Kortt *et al.*, 1997). Aus diesem Grund wurde die Länge des hier eingesetzten PAS-Polypeptids variiert, um ein besseres Verständnis des Oligomerisierungsmechanismus von scPTE-Molekülen zu erlangen. Neben der schon vorhandenen scPTE(PAS100) wurden die Varianten scPTE(PAS40) und scPTE(PAS200) wie oben beschrieben produziert. Nach der Isolierung aus dem löslichen Gesamtzellextrakt mittels SAC erfolgte eine analytische Gelfiltration, um das Verhältnis zwischen inter- und intramolekularen Spezies zu ermitteln (**Abbildung 13 C**). Dabei wurde eine S200 10/300 GL Säule mit Lagerungspuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 μ M ZnSO₄) äquilibriert und von jeder Variante jeweils 250 μ l mit einer Konzentration von 0,25 mg/ml aufgetragen. Es zeigte sich, dass der Anteil an gewünschter intramolekular assoziierter scPTE mit zunehmender Linkerlänge anstieg. So wies scPTE(PAS200) ca. 50 %, scPTE(PAS100) 33 % und scPTE(PAS40) nur 15 % an intramolekularem Heterodimer auf. *Molecular Modelling*-Experimente verdeutlichten, dass der kurze PAS(40)-Spacer bei der intramolekularen Heterodimerisierung einen gespannten Zustand zwischen dem C- und N-Terminus der beiden Untereinheiten hervorrief.

Trotz der aus sterischer Sicht ausreichenden Linker-Länge bei den PAS(100)- und PAS(200)-Varianten stellten intermolekulare Oligomere – auch Oligomere aus mehr als zwei scPTE-Molekülen – für eine proteinchemische Charakterisierung störende Verunreinigungen dar. Um die gewünschten intramolekularen Heterodimere zu isolieren, wurde mit den durch SAC gereinigten Varianten eine Anionenaustauschchromatographie (AEX) mit Hilfe einer Resource

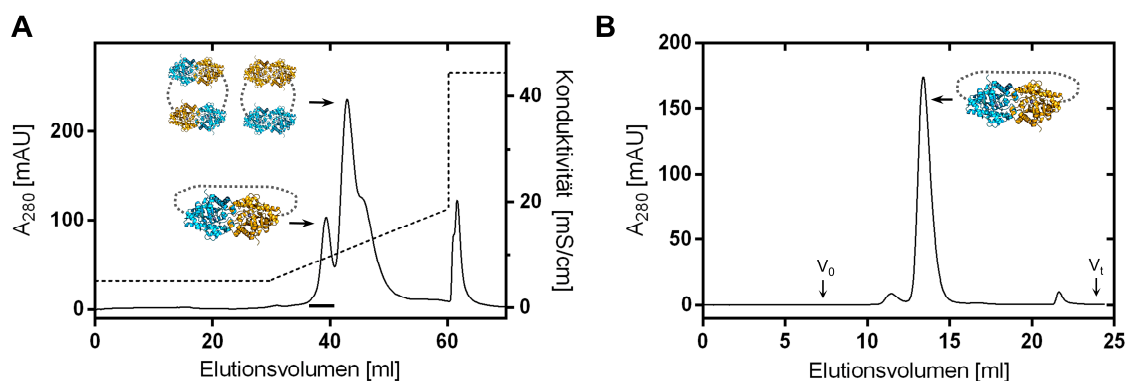


Abbildung 14. Beispielhafte Reinigung der scPTE(PAS100) nach Streptavidin-Affinitätschromatographie (SAC). (A) Anionenaustauschchromatographie (AEX) der SAC-Elutionsfraktion der scPTE(PAS100) an einer Resource Q-Säule (Volumen 6 ml). Durch Anlegen eines flachen NaCl-Gradienten (in 40 bzw. 20 Säulenvolumen von 20 mM auf 250 mM NaCl) konnten intramolekulare von intermolekularen Spezies getrennt werden. Die gesammelten Fraktionen des gewünschten intramolekularen Heterodimers sind mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. (B) Präparative Größenausschlusschromatographie (SEC) der vereinigten AEX-Fractionen an einer S200 10/300-Säule. Dieser Schritt führte nach der AEX zur vollständigen Abtrennung der intermolekular assoziierten scPTE-Polypeptidketten. Die ausschließlich das intramolekulare Heterodimer beinhaltenden Fraktionen wurden vereinigt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Q-Säule durchgeführt (**Abbildung 14 A**). Aufgrund ihres niedrigen isoelektrischen Punktes ($pI \sim 5,3$) adsorbierten die scPTE-Varianten bei dem verwendeten Laufpuffer (20 mM Hepes/NaOH, 20 NaCl, 10 μ M ZnSO₄, pH 7,0) quantitativ an den Anionentauscher und wurden durch lineare Erhöhung der NaCl-Konzentration eluiert. Allerdings musste zur Separierung der einzelnen Spezies ein genügend flacher Gradient (250 mM NaCl in 20 Säulenvolumen) gewählt werden, da sich die elektrostatischen Wechselwirkungen der intramolekularen und intermolekularen Versionen mit der Matrix nur leicht unterschieden. Das intramolekulare Heterodimer eluierte bei einer NaCl-Konzentration von ca. 110 mM und die intermolekularen Versionen bei ca. 155 mM. Zur Feinreinigung wurden die vereinigten AEX-Elutionsfraktionen einer präparativen Gelfiltration (Säule: S200 10/300 GL) unterzogen (**Abbildung 14 B**). Auf diese Weise konnten die drei scPTE-Varianten bis zu einer Reinheit von ca. 99 % isoliert werden. Die Ausbeuten pro 2 l *E. coli*-Kultur waren mit 0,07 mg für die PAS(40)-Variante und 0,2 mg für die PAS(100)-Variante eher gering. Trotz des höheren Anteils an intramolekularem Heterodimer der PAS(200)-Variante lag dessen Ausbeute im gleichen Bereich nur bei 0,1 mg.

3.2.3 Biochemische und biophysikalische Charakterisierung

Die einkettigen heterodimeren PTEs wurden einer ausführlichen biophysikalischen und biochemischen Charakterisierung unterzogen. Um den Einfluss der ungeordneten PAS-Linker verschiedener Länge auf das hydrodynamische Volumen der scPTE-Varianten zu untersuchen, wurde die analytische Gelfiltration zur Bestimmung der apparenten Molekulargewichte durchgeführt (**Abbildung 15 A**). Die Variante scPTE(PAS40) zeigte eine apparente Größe von 67 kDa, was für intramolekular assoziierte Untereinheiten mit einem kurzen Linker zu erwarten war ($M_{\text{kalk}} = 77,3$ kDa). Eine größere Linkerlänge wie bei scPTE(PAS100) bzw. scPTE(PAS200) führte zu einem steigendem Vergrößerungseffekt mit einem apparenten Molekulargewicht von 99 kDa ($M_{\text{kalk}} = 82,2$ kDa) bzw. 167 kDa ($M_{\text{kalk}} = 90,5$ kDa). Dieser Effekt spiegelte das aufgrund der ungeordneten Struktur eines PAS-Polypeptids vergrößerte hydrodynamische Volumen des Fusionsproteins wider (Schlupschy *et al.*, 2013). Die Zusammensetzung der zur Homogenität gereinigten scPTE-Varianten scPTE(PAS100) und scPTE(PAS200) wurde durch Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung bestätigt (**Abbildung 15 C und D**).

Die Analyse des Fern-UV Spektrums (190 bis 250 nm) mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie erlaubte Rückschlüsse auf eine native Faltung und die Sekundärstrukturanteile der scPTE. Dabei zeigte das intramolekulare Heterodimer eine nahezu identische Ausstattung an Sekundärstruktur wie die beiden als Ausgangspunkt dienenden homodimeren bdPTE-Mutanten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) (**Abbildung 15 B**). Das Maximum bei 192 nm und die Minima bei 207 und 222 nm deuteten auf eine durch α -Helices geprägte Sekundärstruktur hin (Holzwarth & Doty, 1965), wobei ein durch β -Faltblattstrukturen verursachtes Signal leicht überlagert erschien (Maximum: 195 nm, leicht negativ 215-220 nm (Lottspeich & Zorbas,

1998)). Dies deckte sich mit den in der Literatur beschriebenen Sekundärstrukturanteilen der nativen BdPTE (PDB: 1HZY) mit 50 % α -Helix, 14 % β -Faltblatt und 36 % Zufallsknäuel (Benning *et al.*, 2001). Die Analyse des Fern-UV-Spektrums der scPTE(PAS100) deutete also darauf hin, dass die beiden BdPTE-Untereinheiten im Verbund eines intramolekularen Heterodimers eine native Struktur ausbildeten.

Neben der biophysikalischen Charakterisierung ist vor allem die Bestimmung der enzymatischen Aktivität gegenüber einer Auswahl an OP-Nervenkampfstoffen (VX, VR, GB und GF) wichtig, um ein verbreitertes Substratprofil der scPTE-Varianten nachzuweisen. Dafür

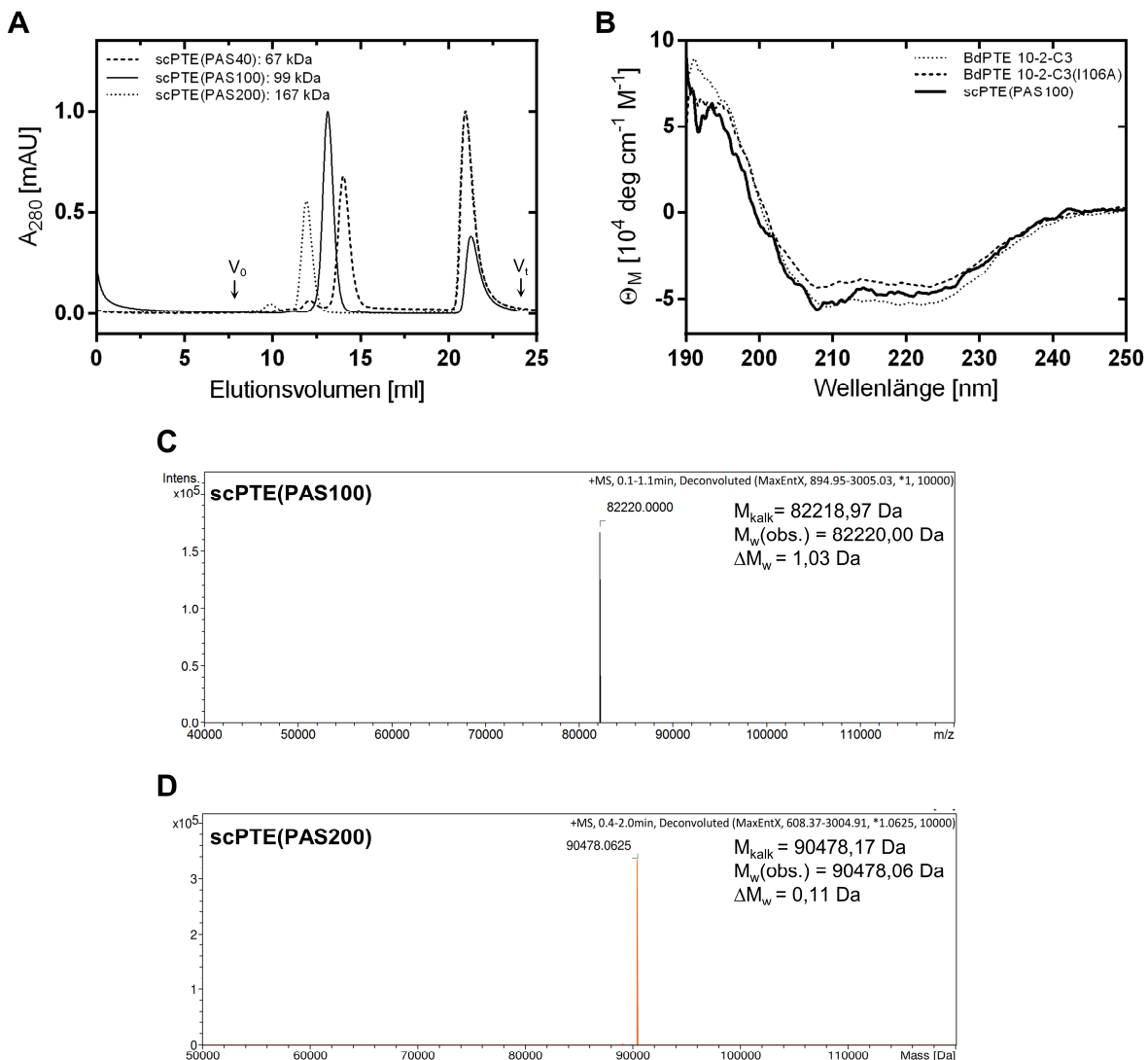


Abbildung 15. Biophysikalische Charakterisierung der scPTE. (A) Analytische Gelfiltration in Lagerungspuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 μ M ZnSO₄, pH 8,0) der einzelnen gereinigten scPTE-Varianten mit PAS(40)-, PAS(100)- oder PAS(200)-Linker. Eine größere Linkerlänge führte zu einem steigenden apparenten Molekulargewicht verglichen mit der jeweiligen berechneten molekularen Masse. (B) CD-Spektrum der gereinigten scPTE(PAS100) im Vergleich mit den homodimeren BdPTE-Mutanten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A). Die CD-Spektren wurden bei 25 °C in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen und auf die molare Elliptizität (Θ_M) normiert. Die Proteinlösungen lagen in Messpuffer (50 mM K₂SO₄, 20 mM KP₁ pH 7,5) vor. Das Maximum bei 192 nm bzw. die Minima bei 207 und 222 nm weisen bei allen drei Proteinen auf einen hohen Gehalt an α -Helices hin (Holzwarth & Doty, 1965), bei insgesamt sehr ähnlichen Kuvvenverläufen. ESI-Massenspektren der gereinigten Enzyme (C) scPTE(PAS100) und (D) scPTE(200).

wurden die katalytischen Effizienzen der einzelnen scPTE-Varianten von Frau Anja Köhler mittels AChE-Inhibitionsassays (Worek *et al.*, 2012) bestimmt und den zugrundeliegenden BdPTE-Mutanten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) verglichen (Abbildung 16, s. Tabelle 6). Wie aus der Literatur bekannt (Goldsmith *et al.*, 2017) werden die Kampfstoffe VX und GF von der BdPTE 10-2-C3, die OP-Verbindungen VR und GF hingegen von der BdPTE 10-2-C3(I106A) als Substrate bevorzugt. Der nun erhaltene *Fingerprint* für die verschiedenen Konstrukte offenbarte, dass alle heterodimeren scPTE-Varianten unabhängig von der Länge des PAS-Linkers die vier OP-Kampfstoffe mit der jeweils höheren katalytischen Effizienz des parentalen homodimeren Enzyms spalteten. So hydrolysierte beispielsweise scPTE(PAS100) das Substrat VX mit einer katalytischen Effizienz von $6,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ vergleichbar der BdPTE 10-2-C3 ($4,6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$), wohingegen BdPTE 10-2-C3(I106A) eine um ca. den Faktor 5 niedrigere Aktivität zeigte ($1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). VR wurde dagegen durch scPTE(PAS100) vier mal schneller ($2,3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) als durch die BdPTE 10-2-C3 abgebaut, wobei die homodimere Variante 10-2-C3(I106A) eine ähnlich effiziente Hydrolyse aufwies ($2,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Diese Resultate bestätigen die erfolgreiche Konstruktion eines funktionellen intramolekularen PTE-Heterodimers. Durch Kombination der zwei unterschiedliche Substratpräferenzen aufweisenden aktiven Zentren von homodimeren BdPTE-Varianten konnte ein *Bioscavenger* mit verbreitertem Substratspektrum gegenüber OP-Nervenkampfstoffen erzeugt werden. Dabei stellte sich heraus, dass ein PAS-Polypeptid mit einer Länge von mindestens 100 Aminosäuren als Linker von Vorteil war, um eine effiziente intramolekulare Heterodimerisierung zu ermöglichen.

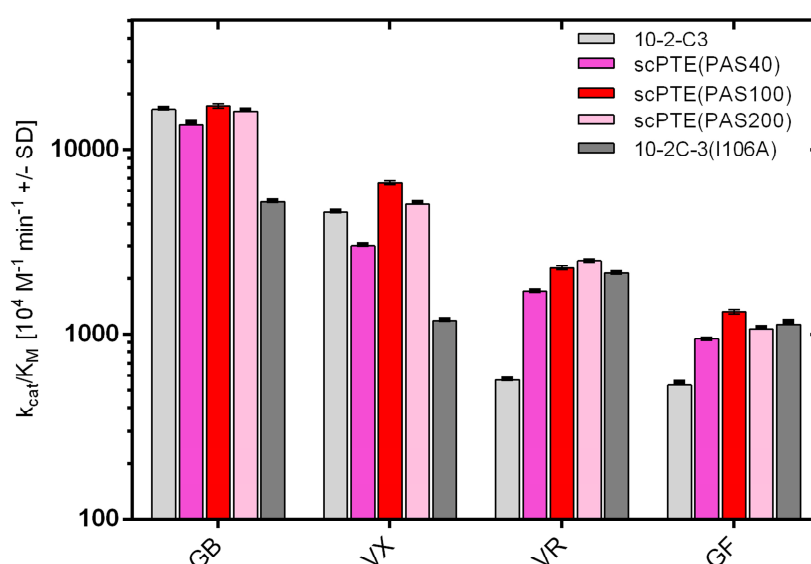


Abbildung 16. *Fingerprint* der katalytischen Effizienzen verschiedener scPTE-Versionen gegenüber einer Auswahl an repräsentativen OP-Kampfstoffen. Gemessen wurden die Aktivitäten der heterodimeren scPTE-Varianten mit unterschiedlich langen PAS-Linkern im Vergleich mit den homodimeren BdPTE 10-2-C3 (GB, VX) und 10-2-C3(I106A) (VR, GF), was zu einem verbreitertem Substratspektrum mit den jeweils höheren katalytischen Effizienzen hinsichtlich der OP-Nervenkampfstoffe führt. Die Bestimmung erfolgte durch Frau Anja Köhler mittels eines AChE-Inhibitionsassays (Worek *et al.*, 2012). Werte sind als Mittelwerte angegeben (N = 2 für Homodimere, N = 4 für scPTE-Varianten).

3.3 Stabilisierung der intramolekularen Heterodimerisierung der scPTE(PAS100) durch rationales Protein-Engineering

Die Tendenz der scPTE intermolekulare Oligomere zu bilden, stellte einen die Ausbeute an intramolekularem Heterodimer beeinträchtigenden Nachteil dar, der die biotechnologische Produktion für eine klinische Anwendung erschweren würde. Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel verschiedene Konzepte beschrieben, um die intramolekulare Heterodimerisierung der scPTE durch rationales Protein-Engineering zu stabilisieren und somit die Ausbeute der gewünschten Spezies zu erhöhen.

3.3.1 Einführung steuernder Mutationen an der Dimerengrenzfläche nach dem Prinzip des *Electrostatic Steering*

Die Stabilisierung der Heterodimerisierung durch Einführung steuernder Mutationen nach dem Prinzip des *Electrostatic Steering* wurde durch das Engineering bispezifischer Antikörper inspiriert, bei dem dieses Konzept erfolgreich zur verbesserten Heterodimerisierung der schweren Ketten zweier verschiedener Immunglobuline verfolgt wurde (Gunasekaran *et al.*, 2010).

Ähnlich der homodimeren, aus zwei identischen C_H2-C_H3-Abschnitten der schweren Kette bestehenden IgG-Fc-Region kommt in der homodimeren Quartärstruktur der BdPTE aufgrund der vorliegenden C₂-Symmetrie jede Wechselwirkung an der Dimerengrenzfläche zwischen den beiden Untereinheiten zweimal vor. Von daher ist jede Salzbrücke zwischen einem Paar Aminosäuren mit funktionellen Gruppen komplementärer Ladung in zwei Kopien mit umgekehrter Orientierung vorhanden (**Abbildung 17 A**). Im vorliegenden Fall einer heterodimeren PTE mit verschiedenen aktiven Zentren und zwei separat kodierten Regionen für die jeweilige Untereinheit liegt eine gebrochene C₂-Symmetrie vor, sodass die Orientierung einer Salzbrücke ohne gleichzeitige Veränderung der anderen geändert werden kann. Diese

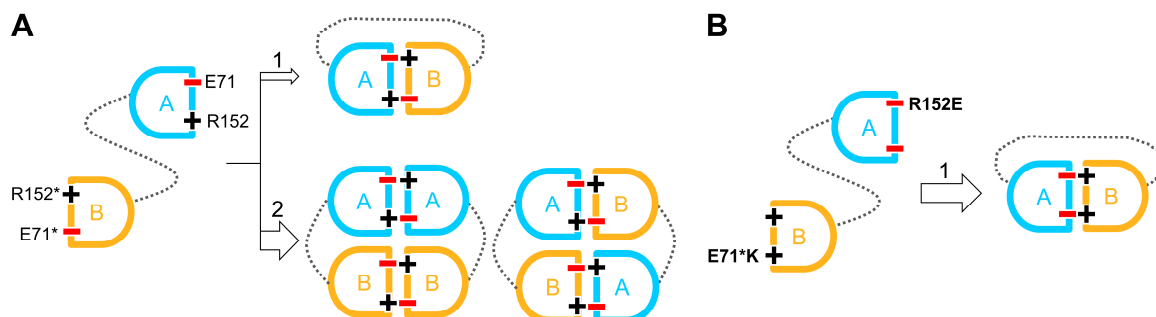


Abbildung 17. Schematische Darstellung einer scPTE bestehend aus den bdPTE-Untereinheiten A und B sowie eines sich an der Dimerengrenzfläche befindlichen Salzbrückenpaares. (A) Schematische Darstellung der durch die C₂-Symmetrie bedingten doppelt und mit umgekehrter Polarität auftretenden Salzbrücke bei intramolekularer (1) bzw. intermolekularer (2) Assoziation der scPTE-Polypeptidkette. (B) Erwartete Stabilisierung aufgrund des *Electrostatic Steering*-Effekts durch eingeführte steuernde Mutationen: E71*K/R152E. Durch die Umkehr der Polarität einer Kopie der Salzbrücke wird die intramolekulare Heterodimerisierung durch Ausbildung von zwei Salzbrücken nach wie vor stabilisiert, aber die intermolekulare Homodimerisierung durch elektrostatische Abstoßung der gleich geladenen Seitenketten unterdrückt.

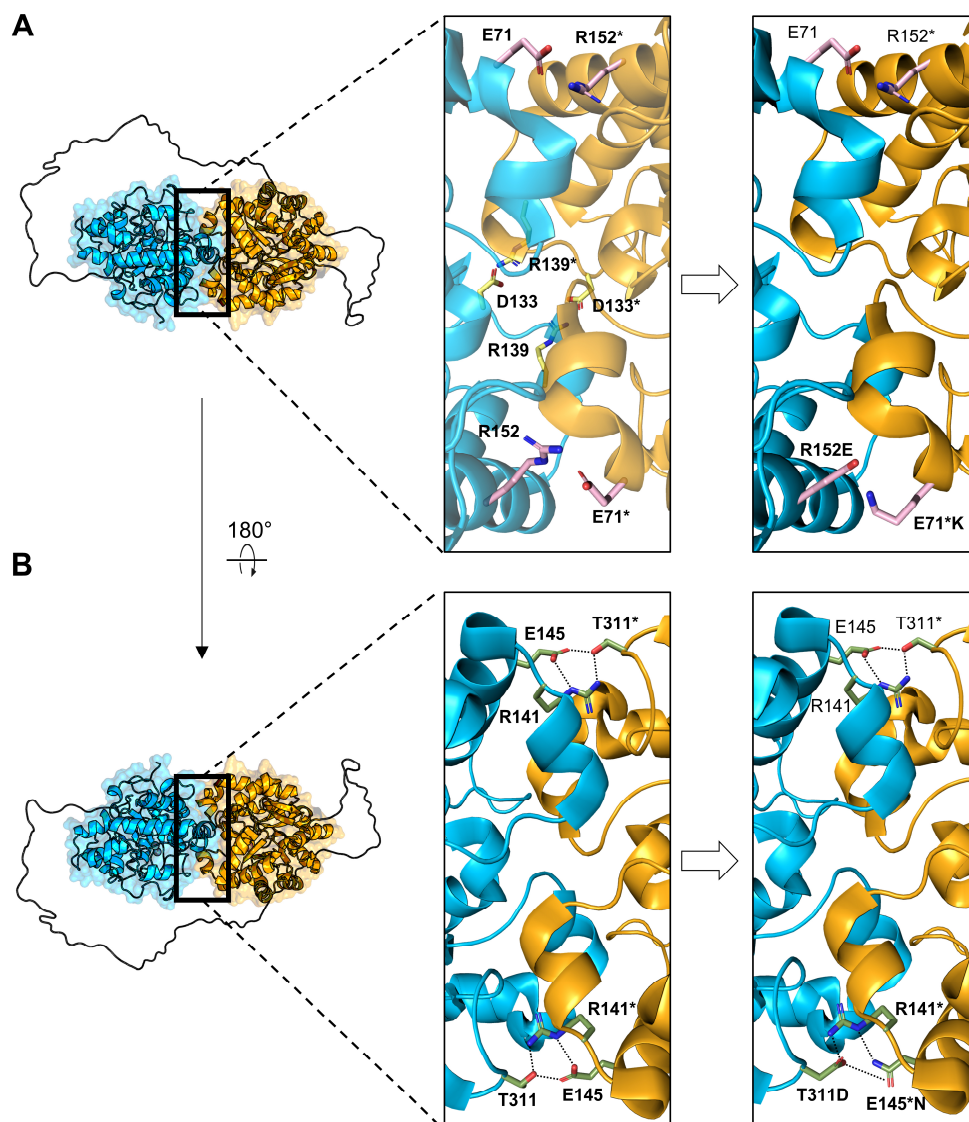


Abbildung 18. Darstellung der PTE-Dimergrenzfläche (PDB: 1HZY) und computergestützte Modellierung der eingeführten steuernden Mutationen mit dem geplanten *Electrostatic Steering*-Effekt. (A) Nahaufnahme der sich zwischen den beiden Untereinheiten befindlichen exponierten (E71–R152) und der begrabenen (D133–R139) Salzbrückenpaare und beispielhafte Mutation der unteren Kopie der exponierten Salzbrücke E71*K und R152E zur Favorisierung der intramolekularen Heterodimerisierung, wobei der Stern auf eine Aminosäure in der zweiten Untereinheit hinweist. (B) Nahaufnahme des sich zwischen den beiden Untereinheiten befindlichen H-Brückennetzwerks (gestrichelte Linien) bestehend aus den Resten R141, E145 und T311. Auch dieses Interaktionsnetzwerk kommt bedingt durch die C2-Symmetrie doppelt mit umgekehrter Orientierung in der Grenzfläche der Quartärstruktur vor. Die beispielhafte Modellierung der Mutationen T311D und E145*N der unteren Kopie des Netzwerks verdeutlicht den zu erwartenden die Heterodimerisierung favorisierenden Effekt.

Eigenschaft des scPTE-Konstrukts erlaubte folglich die Einführung steuernder Mutationen. Damit ergab sich die Möglichkeit, die intramolekulare Heterodimerisierung durch Umkehr der Polarität einer Kopie eines nativen Salzbrückenpaares zu stabilisieren (**Abbildung 17 B**). Durch den resultierenden *Electrostatic Steering*-Effekt kann im Prinzip die Homodimerisierung der Untereinheiten unterdrückt werden, da die eingeführten Mutationen zu einer elektrostatischen Abstoßung bei Assoziation identischer Untereinheiten führen sollten.

Um für die Einführung von steuernden Mutationen geeignete Salzbrücken zu identifizieren, wurde die auch in den hier verwendeten Mutanten konservierte Dimer Grenzfläche der natürlichen homodimeren BdPTE (PDB: 1HZY) mit Hilfe des PDBePISA-Servers (Krissinel & Henrick, 2007) analysiert (**Abbildung 18**). Dabei wurde das teilweise exponierte Salzbrückenpaar der Seitenketten Glu71 und Arg152 identifiziert. Weiterhin befand sich noch ein geeignetes Salzbrückenpaar aus Asp133 und Arg139 tiefer begraben an der Grenzfläche in räumlicher Nähe zu den aktiven Zentren. Um nun die Polarität einer Kopie der exponierten Salzbrücke umzukehren, wurde das Glu71 gegen Arg sowie Lys in dem *upstream* liegenden PTE-Strukturgen und Arg152* (der Stern zeigt die Position im Strukturgen der *downstream* liegenden Untereinheit des scPTE-Gens an) gegen Glu sowie Asp in der anderen kodierenden Region ausgetauscht (**Abbildung 18 A**). Aufgrund des oben erläuterten doppelten Vorkommens der Salzbrücke konnten die genannten Aminosäureaustausche auch mit der anderen Kopie durchgeführt werden (Aminosäurepaar an den Positionen 152/71*). Daraus ergaben sich insgesamt acht verschiedene scPTE-Varianten mit einer exponierten Salzbrücke mit umgekehrter Polarität. In der gleichen Weise wurde mit der begrabenen Salzbrücke (Aminosäurepaar 133/139* bzw. 133*/139) verfahren, sodass wiederum acht Varianten mit steuernden Mutationen resultierten.

Bei der Analyse der Dimer Grenzfläche fiel zudem ein beide Untereinheiten überspannendes H-Brückennetzwerk ins Auge, das aus den Aminosäureresten Arg141, Glu145 und Thr311* bzw. Arg141*, Glu145* und Thr311 gebildet wurde (**Abbildung 18 B**). Durch Einführung der Mutationen E145N und T311*D bzw. E145*N und T311D sollte das Netzwerk bei Heterodimerisierung im Prinzip erhalten bleiben, wohingegen die Homodimerisierung durch Verlust einer H-Brücke bzw. elektrostatischer Abstoßung destabilisiert werden sollte.

3.3.1.1 Einfluss der steuernden Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten

Zur Untersuchung des Einflusses der mittels Punktmutagenese eingeführten steuernden Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten wurden die entsprechenden neuen scPTE(PAS100)-Varianten wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben cytoplasmatisch in *E. coli* BL21 exprimiert und durch SAC aus dem löslichen Gesamtzellextrakt isoliert. Da sowohl das intramolekulare Heterodimer als auch die intermolekularen Spezies mindestens ein N-terminales *Strep*-tag II-Affinitätsanhängsel aufwiesen, wurde die SAC-Elutionsfraktion zur Analyse der Verteilung der verschiedenen Spezies einer analytischen Gelfiltration unterzogen.

Interessanterweise führte die Umkehrung der Polarität sowohl im Fall der exponierten Salzbrücke- als auch der begrabenen Salzbrücken zu einer signifikanten Reduzierung der Oligomerbildung für die jeweilige scPTE-Variante (**Abbildung 19** und **Abbildung 20**). Vor allem die Kombination der Mutationen R152E und E71*K, genannt scPTE*(PAS100), zeigte kaum Verunreinigungen durch Oligomere und das Signal des gewünschten intramolekularen

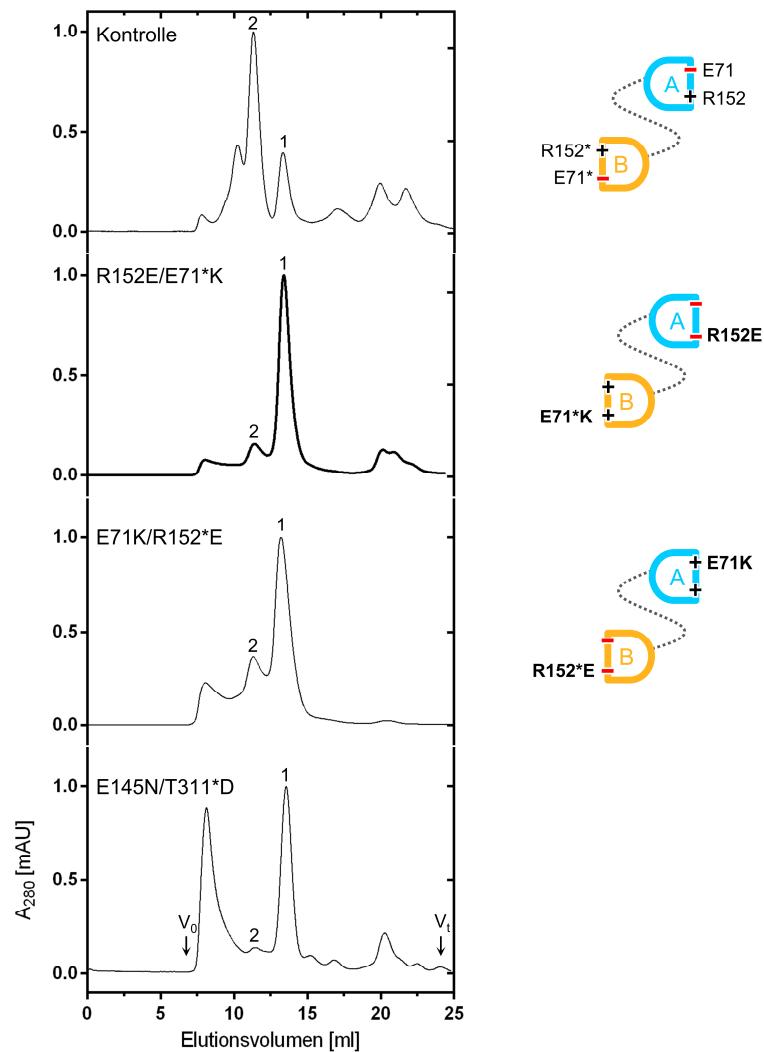


Abbildung 19. Untersuchungen zum Einfluss der eingeführten steuernden Mutationen auf das Dimerisierungsverhalten der scPTE(PAS100). Gezeigt sind ausgewählte Elutionsprofile von analytischen Gelfiltrationen der SAC-Eluatfraktionen der einzelnen mit steuernden Mutationen versehenen scPTE-Varianten, wobei zum Vergleich die ursprüngliche scPTE(PAS100) eingesetzt wurde. Alle gesteuerten Varianten wiesen eine Unterdrückung der intermolekularen Assoziation (2) auf und das gewünschte intramolekulare Heterodimer (1) stellte die dominante Spezies dar. Auch welche Kopie des symmetrieverwandten Salzbrückenpaares (vgl. E71K/R152*E oder R152E/E71*K) verändert wurde, nahm Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten (schematische Darstellung der jeweiligen zugehörigen scPTE-Polypeptidketten rechts neben den Elutionsprofilen: A, 10-2-C3; B, 10-2-C3(I106A)). Dies war nicht der Fall für die Mutation des H-Brückennetzwerkes (E145N/T311D), bei dem beide Anordnungen nahezu identische Elutionsprofile aufwiesen.

Heterodimers dominierte in dem nahezu monodispersen Elutionsprofil. Auch eine Erhöhung der Proteinkonzentration, was normalerweise eine vermehrte Bildung von intermolekularen Spezies begünstigt, um den Faktor 20 auf $\sim 100 \mu\text{M}$ führte nicht zu einer Verschiebung dieses Musters (**Abbildung 20 B**). Dies war nicht ohne weiteres zu erwarten, da die Umkehr der Polarität einer Kopie des jeweiligen symmetrieverwandten Salzbrückenpaares die Bildung einer intermolekularen Spezies mit heteroassoziierten Untereinheiten nicht vollständig verhindern konnte (vgl. **Abbildung 17**). Dies wird bei Betrachtung des Elutionsprofils der Variante mit der alternativen Anordnung der steuernden Mutationen (E71K/R152*E) deutlich, bei dem ein ausgeprägteres Signal der intermolekularen Spezies detektiert werden konnte. Dies könnte

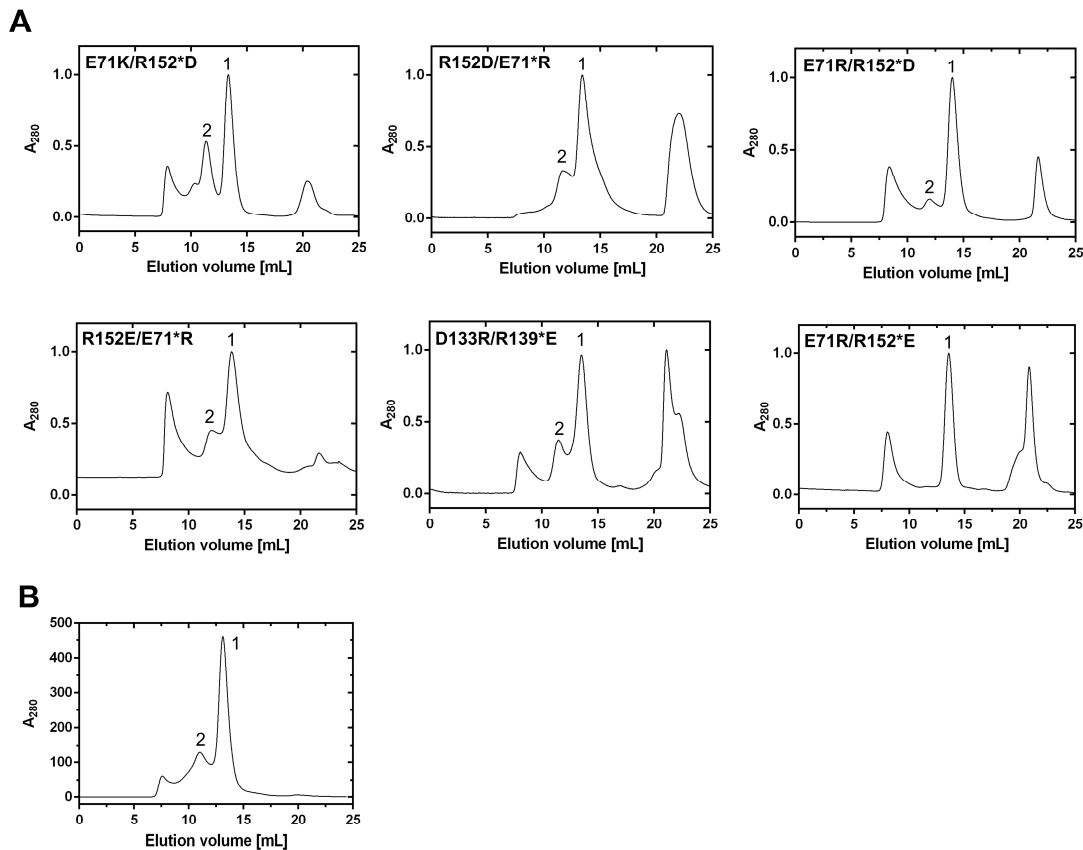


Abbildung 20. Oligomerisierungsanalysen der scPTE-Mutanten (1: intramolekulares Heterodimer; 2: intermolekulare Spezies). (A) Oligomerisierungsanalyse der durch SAC gereinigten scPTE(PAS100)-Varianten mit verschiedenen Mutationen mit *Electrostatic-Steering*-Effekt. (B) Oligomerisierungsprofil einer 20-fach konzentrierten SAC-gereinigten Probe ($\sim 100 \mu\text{M}$) von scPTE*(PAS100) zur Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentration auf die Oligomerisierung.

durch die partiell gebrochene C2-Symmetrie in einer heterodimeren scPTE erklärt werden. Durch unterschiedliche Mutationen, die das aktive Zentrum der jeweiligen Untereinheit umgeben, und der vektoriellen Anordnung dieser innerhalb einer einzelnen Polypeptidkette könnten die Energetik der Homo-/Heterodimerisierung oder die Kinetik dieser Wechselwirkungen während der Proteinfaltung in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Durch die Einführung der steuernden Mutationen E71K/R142*E,D oder R152E,D/E71*K wurde die Ausbeute der jeweiligen gereinigten heterodimeren scPTE-Variante im Vergleich zur scPTE ohne diese Mutationen um den Faktor 5 bis 10 erhöht. So konnte aus 2 l Kultur 1,9 mg scPTE*(PAS100) isoliert werden. Die anderen Varianten zeigten zwar ebenfalls eine verbesserte Ausbeute, allerdings nur um einen Faktor von bis zu 2.

Auch der Eingriff in das H-Brückennetzwerk führte zu einer effizienten Stabilisierung der intramolekularen Heterodimerisierung (**Abbildung 19**). Beide Varianten, bei denen die eine (E145N/T311*D) oder die andere Kopie (T311D/E145*N) mutiert worden waren, zeigten zwar einen hohen Peak für Mikroaggregate, aber nahezu keine intermolekularen Oligomere. Die Ausbeute an gereinigtem intramolekularem Heterodimer beider scPTE-Mutanten war im Vergleich zur ursprünglichen scPTE(PAS100) um etwa den Faktor 5 erhöht.

3.3.1.2 Einfluss der steuernden Mutationen auf die katalytische Effizienz

Neben der Stabilisierung des intramolekularen Heterodimers und der damit einhergehenden Steigerung der Ausbeute bei der biotechnologischen Produktion war der Einfluss der steuernden Mutationen auf die sehr hohen katalytischen Effizienzen der jeweiligen BdPTE-Untereinheiten von Interesse. Hierfür wurden die durch SAC aus dem Gesamtzellextrakt isolierten rekombinanten Proteine mit AEX und SEC zur Homogenität gereinigt. Anschließend wurde von Frau Anja Köhler ein *Fingerprint* der katalytischen Effizienzen gegenüber der gängigen OP-Kampfstoffe VX, VR, GB und GF mittels AChE-Inhibitionsassays bestimmt (s. Kapitel 3.1.5 bzw. 3.2.3). Die einzelnen scPTE-Varianten wurden anschließend mit der Ausgangsversion scPTE(PAS100) verglichen (**Abbildung 21**).

Die Aktivitätsanalyse offenbarte, dass die Positionierung der eingeführten Ladung die katalytische Aktivität der beiden Untereinheiten in unterschiedlichem Maße beeinflusste. So zeigte die Einführung von negativen Seitenketten (R152E oder D) in die 10-2-C3-Untereinheit und die von positiven Seitenketten (E71*K oder R) in 10-2-C3(I106A) eine durchweg höhere Aktivität als die alternativen Anordnungen (z.B. E71K/R152*E). Dagegen führte eine Veränderung der nahe der aktiven Zentren liegenden begrabenen Salzbrücke meist zu einer deutlich verringerten katalytischen Effizienz. Nur Versionen mit der Substitution R139*E zeigten bei den scPTE-Varianten mit veränderter exponierter Salzbrücke Erhalt der Aktivität. Als aktivste Varianten mit Salzbrücken umgekehrter Polarität zeigten sich scPTE*(PAS100) (s. **Tabelle 6**) und die Version mit derselben Orientierung, aber den Austausch R152D und E71*K. Diese wiesen eine innerhalb des Faktors 2 liegende katalytische Effizienz gegenüber allen getesteten OP-Kampfstoffe verglichen mit dem originalen scPTE(PAS100) auf. Auch die Variante mit dem veränderten H-Brückennetzwerk (T311D/E145*N) hydrolysierte die

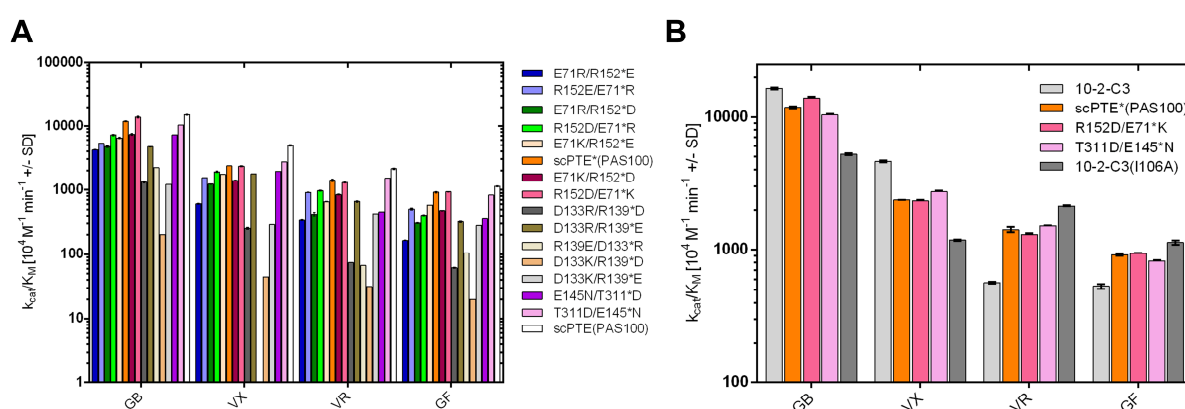


Abbildung 21. Analyse des Substratspektrums von verschiedenen scPTE(PAS100)-Varianten mit steuernden Mutationen hinsichtlich repräsentativer Kampfstoffe mittels AChE-Inhibitionsassay. (A) Hydrolytische Aktivität aller generierter Varianten mit steuernden Mutationen. Die Varianten sind jeweils gemäß der Kombination an Mutationen spezifiziert, wobei scPTE*(PAS100) für die Substitutionen R152E/E71*K steht (N = 2). (B) Vergleich der katalytischen Effizienzen der besten gesteuerten Varianten mit denen der homodimeren BdPTE 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) (N = 3). Die scPTE-Varianten vereinigten auch mit den eingeführten Mutationen für eine effizientere intramolekulare Heterodimerisierung die jeweils höchsten Aktivitäten der homodimeren BdPTE-Mutanten gegenüber den einzelnen OP-Kampfstoffen.

Kampfstoffe ähnlich effizient wie die scPTE*(PAS100), wohingegen die umgekehrte Version nur mittelmäßige katalytische Werte zeigte.

Das durch Kombination von zwei verschiedenen aktiven Zentren erzeugte verbreiterte Substratspektrum gegenüber OP-Kampfstoffen blieb bei den drei oben beschriebenen scPTE-Mutanten erhalten. Außerdem zeigten diese Varianten verglichen mit der originalen scPTE(PAS100) eine deutlich verbesserte Ausbeute und auch Reinheit nach Einzelschritt-Isolierung durch SAC, was neben einer hohen katalytischen Aktivität ein wichtiges prozesstechnisches Kriterium im Hinblick auf die biotechnologische Produktion und die klinische Anwendung eines *Bioscavengers* darstellt.

3.3.2 Kovalente Verknüpfung der PTE-Untereinheiten durch Disulfid-Engineering

In der Natur sind viele Proteine durch sog. interchenare Disulfidbrücken kovalent vernetzt, wie z.B. die Ketten eines Antikörpers oder die des Insulins. Inspiriert durch die Protein-Engineering Studien dsFv-Fragments (Brinkmann *et al.*, 1993) sollte die intramolekulare Heterodimerisierung der scPTE durch die Einführung einer artifiziellen Disulfidbrücke an der Grenzfläche der beiden BdPTE-Untereinheiten stabilisiert werden. Da die BdPTE-Mutanten keine native Disulfidbrücke aufwiesen, mussten für die Einführung der benötigten Cystein-Reste geeignete Positionen an der Dimerengrenzfläche identifiziert werden. Dafür wurde eine hochaufgelöste BdPTE-Kristallstruktur (PDB: 1HZY) mittels des *Disulfide by Design 2*-Algorithmus (s. Kapitel 2.7) analysiert. Dieser ermittelt Aminosäurepaare in geeignetem Abstand (C_{β}/C_{β} -Distanz $\leq 5,5 \text{ \AA}$), bei denen die Einführung von Cysteinresten wahrscheinlich zur Ausbildung einer Disulfidbrücke führt. Geeignete Disulfidbrücken sollten zudem eine niedrige Bindungsenergie und die dafür gewählten Seitenkettenposition einen hohen B-Faktor aufweisen. Als vielversprechende Positionen für die Einführung von Cysteinresten zur Ausbildung von Disulfidbrücken wurden die Restepaare S62/S137*, Leu136/S308*, S137/S307* und deren symmetrieverwandte Versionen S137/S62*, S308/L136* und S307/S137* identifiziert (**Abbildung 22**). Wie bei der Einführung von Mutationen für den

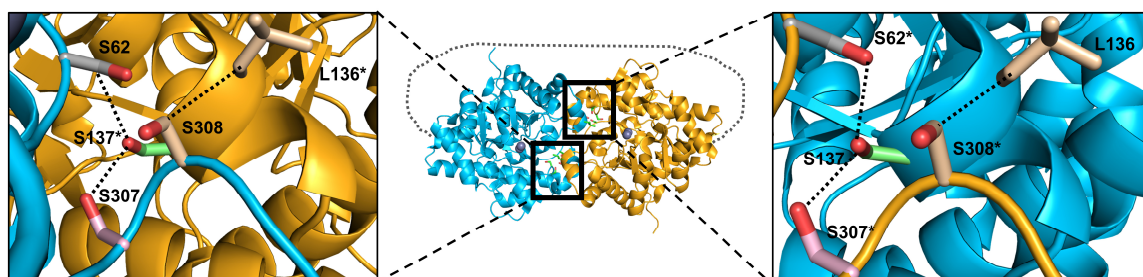


Abbildung 22. Computergestützte Einführung einer kovalenten Verknüpfung der PTE-Untereinheiten mittels Disulfid-Engineering. Die durch die gestrichelte Linie gekennzeichneten und von dem Algorithmus *Disulfide by Design 2* vorhergesagten Aminosäurepaare sollten bei Mutation zu Cystein eine Disulfidbrücke ausbilden. Daraus ergaben sich die Varianten scPTEcc(PAS100) (S62/S137*C), (S307C/S137*C) und (S308C/L136*C) sowie die umgekehrten Anordnungen mit den Austauschen S137C/S62*C, S137C/S308*C und L136C/S308*C. Als Grundlage für die Untersuchungen wurde die Kristallstruktur der natürlichen BdPTE herangezogen (PDB: 1HZY).

Electrostatic Steering-Effekt wurden durch die gebrochene C2-Symmetrie die Cysteinreste individuell an den entsprechenden Positionen der jeweiligen Untereinheiten eingeführt, sodass sich nur bei Heterodimerisierung eine Disulfidbrücke ausbilden konnte.

Als Grundlage für die Einführung von Disulfidbrücken diente der Vektor pASK-IBA5(+)-scPTEcc(PAS100), der für eine cysteinfreie Version der scPTE(PAS100) kodiert. Bei dieser waren die begrabenen nativen Cysteinreste 59 und 227 in beiden BdPTE-Untereinheiten mittels ortsgerichteter Mutagenese durch Valinreste ausgetauscht, um unerwünschte Wechselwirkungen mit den später an der Grenzfläche eingeführten Cysteinen auszuschließen. Bei diesen Austausch wurde die Aminosäure Valin gewählt, da diese Substitution keine Auswirkungen auf die Aktivität der homodimeren BdPTE 10-2-C3 hatte (Job *et al.*, 2020). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt sechs Varianten durch Einführung von Cysteinresten an den durch den Algorithmus identifizierten Aminosäurepaaren generiert.

Für die scPTEcc(PAS100) wurde *E. coli* BL21, für die Disulfid-Varianten der *E. coli*-Stamm Origami B als Wirtsorganismen zur rekombinanten Expression herangezogen, da dieser durch sein weniger reduzierendes Milieu im Cytoplasma die Ausbildung von Disulfidbrücken erlaubte. Die Expression und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 erläutert mittels SAC, AEX und abschließender SEC. Die Ausgangsmutante scPTEcc(PAS100) und die Mutanten S62C/S137*C, S137C/S62*C, S137C/S307*C und L136C/S308*C wurden von Frau Lisa Bock im Zuge eines Forschungspraktikums produziert und analysiert.

3.3.2.1 Nachweis der ausgebildeten Disulfidbrücke

Nach rekombinanter Expression wurden die jeweiligen Disulfid-Varianten zur Homogenität gereinigt und anschließend durch SDS-PAGE analysiert (**Abbildung 23 A**) (Lisa Bock, Forschungspraktikum). Unter reduzierenden Bedingungen zeigte sich eine einzige scharfe Bande beim erwarteten Molekulargewicht (ca. 82,2 kDa). Beim Auftragen derselben Proteinprobe unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte die angefärbte Bande unerwarteterweise ein höheres apparentes Molekulargewicht als die der reduzierten Form. Die durch Quernetzung ausgelöste verminderte Zugänglichkeit des scPTE-Polypeptids könnte im Vergleich zur reduzierten Variante eine verminderte Bindung von SDS zur Folge haben, sodass die geringere negative Ladungszahl zu einer langsameren Wanderungsgeschwindigkeit der Polypeptidkette führt. Weiterhin zeigte die durch Anionenaustauschchromatographie abgetrennte intermolekular assoziierte Spezies, die als Nebenprodukt auftrat, unter nicht reduzierenden Bedingungen ein noch deutlich größeres apparentes Molekulargewicht als das intramolekulare Heterodimer. Daraus ließ sich ableiten, dass sich auch bei der intramolekularen Heterodimerisierung eine Disulfidbrücke aus den eingeführten Cysteinen gebildet hatte.

Um eine genauere Aussage über die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke treffen zu können, wurde die Molmasse einer reduzierten wie auch einer unbehandelten Proteinprobe von scPTE(PAS100)(S137C/S62*C) mittels ESI-TOF Massenspektrometrie bestimmt (**Abbildung 23 B**) (Lisa Bock, Forschungspraktikum). Die Reduktion der Disulfidbrücke erfolgte durch Inkubation mit 5 mM DTT. Für die Analyse wurden beide Ansätze gegen 10 mM NH₄Ac mit bzw. ohne DTT-Zusatz dialysiert. Die reduzierte Polypeptidkette zeigte eine um ca. 1,98 Da höhere Molmasse (82236,0 Da) als die unbehandelte Probe (82234,02 Da). Dieser Unterschied ließ sich durch die Hydrierung (2 H-Atome = 2 Da) bei Reduktion einer Disulfidbrücke erklären.

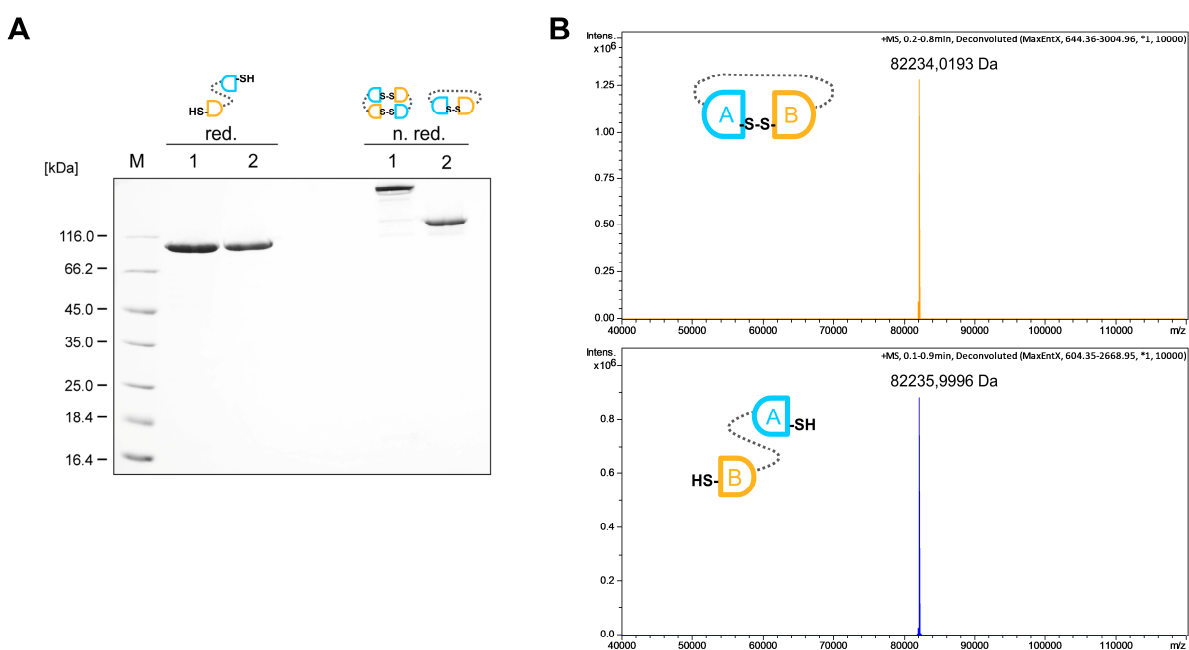


Abbildung 23. Nachweis der intramolekularen Disulfidbrücke in der Variante scPTE(PAS100)(S137C/S62*C). (A) 12 %-ige SDS-PAGE-Analyse des mittels Anionenaustauschchromatographie isolierten intermolekularen Dimers (1) und des zur Homogenität gereinigten intramolekularen Heterodimers (2). Die Proben wurden sowohl unter reduzierenden (red.: Auftragspuffer mit β -Mercaptoethanol) als auch unter nicht reduzierenden (n. red.: Auftragspuffer ohne β -Mercaptoethanol) Bedingungen aufgetragen. Nach Reduktion waren intermolekular und intramolekular assoziierte Spezies nicht zu unterscheiden ($M_{\text{kalk}} = 82,2$ kDa). Nur unter nicht reduzierenden Bedingungen blieben die Disulfidbrücken intakt, sodass sich die beiden Spezies hinsichtlich des Migrationsverhaltens sowohl untereinander als auch von den reduzierten Formen unterschieden. (B) Massenspektrometrische Analyse des intramolekularen Heterodimers unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Die mittels 5 mM DTT reduzierte Probe zeigte eine um ca. 1,98 Da größere Molmasse (82236,0 Da) als die unbehandelte Probe (82234,02 Da).

3.3.2.2 Einfluss der eingeführten Disulfidbrücke auf das Dimerisierungsverhalten und die katalytische Effizienz

Wie auch die einzelnen aus der Stabilisierung der Heterodimerisierung mittels *Electrostatic Steering* hervorgegangenen Varianten, wurden die generierten Disulfid-Varianten hinsichtlich ihres Dimerisierungsverhaltens mittels analytischer Gelfiltration aus der SAC-Elutionsfraktion untersucht. Dabei zeigte die als Kontrolle eingesetzte cysteinfreie Variante scPTEcc(PAS100)

ohne jegliche steuernde Mutation ein ähnliches Elutionsprofil wie ihr Gegenstück scPTE(PAS100), welches noch die nativen Cysteinreste trug und bei dem oligomere Spezies im Vergleich zum intramolekularen Heterodimer dominierten ($\sim 33\%$ an intramolekularem Heterodimer; siehe **Abbildung 24 A**, oben). Alle durch Disulfidbrücke quervernetzten scPTE-Varianten wiesen ebenfalls einen hohen Anteil von ca. $\sim 50\%$ an intermolekularen Spezies auf (vgl. **Abbildung 24 A**, unten). Die Ausbeuten der durch eine Disulfidbrücke stabilisierten intramolekularen Heterodimere waren im Vergleich zu der cysteinfreien scPTE um den Faktor 3,5 bis 6,5 größer. So zeigte die Variante mit den Austauschen S307C/S137**C* die höchste Ausbeute von ca. 1,3 mg pro 2 l *E. coli* Kultur.

Für die gereinigten Varianten wurde von Frau Anja Köhler ein *Fingerprint* bzgl. der katalytischen Effizienz gegenüber den OP-Kampfstoffen VX, VR, GB und GF mit Hilfe des AChE-Inhibitionsassays ermittelt (**Abbildung 24 B**). Erwartungsgemäß hatte die Eliminierung der begrabenen Cysteinreste des wildtypischen Enzyms in scPTEcc(PAS100) keinerlei Einfluss auf die hydrolytische Aktivität. Anschließend wurden die katalytischen Effizienzen der Disulfid-Mutanten mit denen der cysteinfreien Ausgangsversion verglichen, um etwaige Auswirkungen der eingebrachten Disulfidbrücke zu untersuchen. So wiesen die einzelnen Disulfid-Varianten zwar für einzelne Kampfstoffe ähnlich hohe hydrolytische Aktivitäten auf, allerdings zeigte jede Version bei mindestens einem der Kampfstoffe eine um den Faktor 4 bis 5 schlechtere Aktivität. Während sich beispielsweise die Austausche S308C/L136**C* kaum auf die Rate gegenüber VR und GF auswirkten, wurde VX nur mit einer Effizienz von $1,2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (vgl. $4,9 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) hydrolysiert. Folglich zeigte keine der Disulfid-Varianten ein

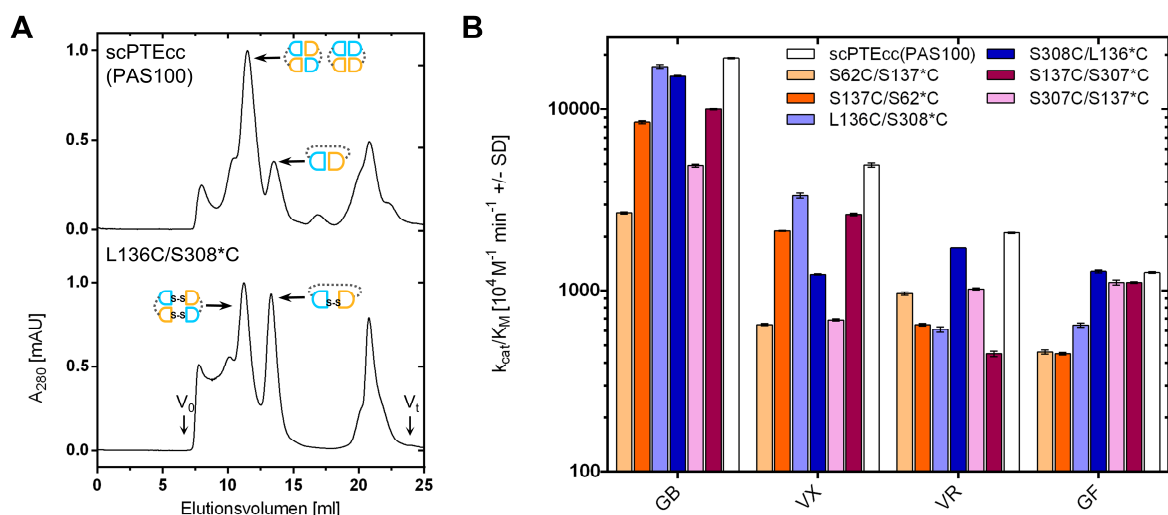


Abbildung 24. Untersuchungen zum Einfluss der eingebrachten Disulfidbrücke auf das Dimerisierungsverhalten sowie die katalytische Effizienz gegenüber ausgewählten OP-Kampfstoffen. (A) Analytische Gelfiltrationen der SAC-Elutionsfraktionen der cysteinfreien scPTEcc(PAS100) und der repräsentativen scPTE-Disulfidvariante mit den Mutationen L136C/S308**C*. Die Nebenprodukte durch intermolekulare Assoziation von zwei scPTE-Molekülen konnte durch das Einführen der Disulfidbrücke an der Dimerengrenzfläche verringert, aber nicht gänzlich unterdrückt werden. (B) Analyse der katalytischen Effizienzen der einzelnen scPTE-Disulfidvarianten sowie der cysteinfreien Version hinsichtlich repräsentativer OP-Nervenkampfstoffe, GB, GF, VR und VX. Die Werte wurden im AChE-Inhibitionsassay bestimmt und sind als Mittelwerte angegeben ($N = 2$).

effektiv verbreitertes Substratprofil gegenüber den ausgewählten Nervenkampfstoffen, da die individuellen Aktivitäten der einzelnen parentalen BdPTE-Untereinheiten nicht vollständig erhalten blieben bzw. vereinigt wurden. Die Position der Mutationen in räumlicher Nähe zu den jeweiligen aktiven Zentren und damit einhergehende minimale strukturelle Änderungen könnten dabei die Verringerung der Aktivität gegenüber einzelnen OP-Substraten erklären.

3.3.3 Untersuchungen zur Thermostabilität der neuen scPTE(PAS100)-Varianten

Zur Analyse der Stabilität wurden für das Ausgangsprotein scPTE(PAS100) und die stabilisierten Varianten scPTE*(PAS100) und scPTE(PAS100)(S307C/S137*C) thermische Entfaltungsstudien mittels CD-Spektroskopie durchgeführt. Außerdem wurden die Thermostabilitäten der homodimeren BdPTE-Mutanten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) untersucht, von denen die heterodimere scPTE jeweils eine Untereinheit aufwies. Die gereinigten Proteine wurden für die Untersuchung gründlich gegen CD-Puffer (20 mM KP_i , 50 mM K_2SO_4 , pH 7,5) dialysiert und das CD-Spektrum von 25 bis 99 °C mit einem Temperaturgradienten von 60K/h und bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgenommen (**Abbildung 25**).

Die Messung des durch thermische Entfaltung bedingten Verlusts an Sekundärstruktur ergab für die homodimere BdPTE-Mutante 10-2-C3 einen T_m -Wert von 65,3 °C, wobei die Punktmutation I106A überraschenderweise zu einem höheren Wert von 69,2 °C bei gleichzeitig höherer Kooperativität führte. Ähnliche Schmelztemperaturen wie diese stabilere homodimere BdPTE-Mutante wiesen auch die heterodimere Ursprungsversion scPTE(PAS100) mit 69,9 °C

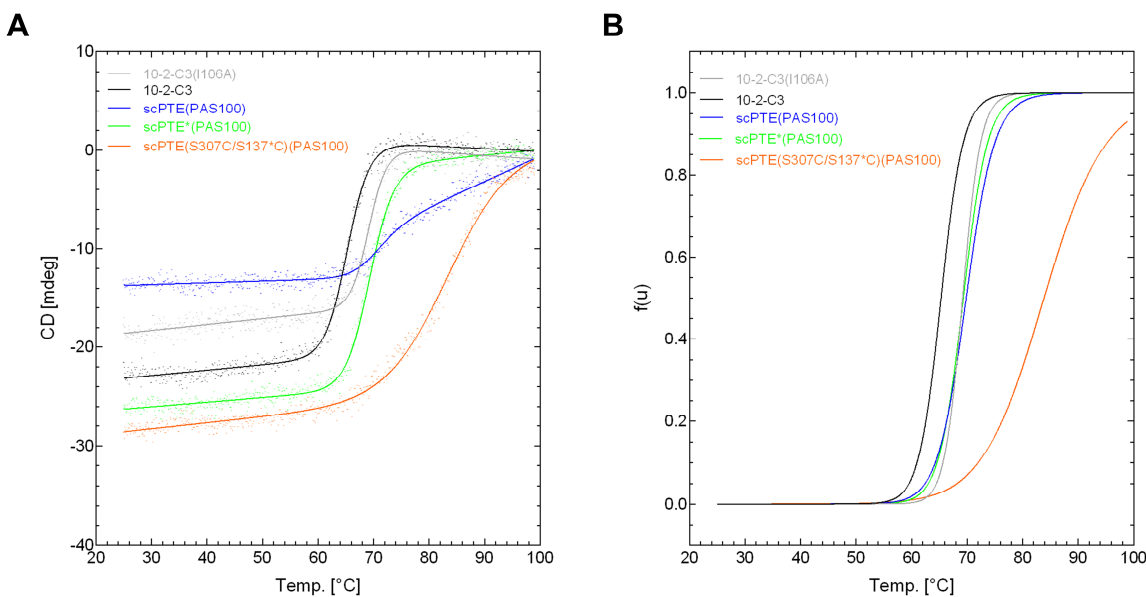


Abbildung 25. Entfaltungsstudien der scPTE(PAS100)-Varianten sowie ihrer homodimeren BdPTE-Gegenstücke. (A) Rohdaten der thermisch induzierten Denaturierung der Mutanten 10-2-C3, 10-2-C3(I106A), scPTE(PAS100), scPTE*(PAS100) und der Disulfid-Variante S307C/S137*C bei 210 nm und einer Heizrate von 60 K/h. Die Spektren wurden von 25 bis 99 °C aufgenommen und die gemessenen Rohdaten anschließend durch nicht-lineare Regression (*Six Parameter Fit*) numerisch angepasst. (B) Normierte Entfaltungskurven der einzelnen Varianten.

und die elektrostatisch gesteuerte Variante scPTE*(PAS100) mit 69,3 °C auf. Die höchste thermische Stabilität zeigte offenbar aufgrund der eingeführten Disulfidbrücke die Variante scPTE(PAS100)(S307C/S137*C) mit $T_m = 83,8$ °C, wenn auch bei deutlich verminderter Kooperativität (s. **Tabelle 3**). Da alle eingesetzten rekombinanten Proteine während der Erhitzung Aggregate bildeten, konnte allerdings keine Renaturierungskurve aufgezeichnet werden.

Tabelle 3. Durch thermische Entfaltungsstudien bestimmte Parameter der Faltungsstabilität für die homodimeren BdPTE-Mutanten und scPTE-Varianten. Die elektrostatisch gesteuerte Variante scPTE*(PAS100) trägt die Mutationen R152E/E71*K.

	BdPTE 10-2-C3	BdPTE 10-2-C3(I106A)	scPTE (PAS100)	scPTE* (PAS100)	scPTE(PAS100) (S307C,S137*C)
T_m [°C]	65,3	69,2	69,8	69,3	83,8
ΔH_m [kJ/mol]	477,9	600,1	381,1	447,1	190,5
$\Delta G^{25^\circ C}$ [kJ/mol]	56,9	77,4	49,8	57,8	31,4

3.4 Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit einer scPTE-Variante mit Hilfe der *PASylation*-Technologie

Eine gemeinsame Problematik vieler biopharmazeutisch eingesetzter rekombinanter Proteine liegt in ihrer kurzen Plasma-Halbwertszeit, die nur ein paar Stunden nach intravenöser Injektion beträgt. Als Grund hierfür ist vor allem die rasche renale Filtration der rekombinanten Proteine zu nennen. Um dem entgegenzuwirken, kann durch genetische Fusion mit einem Polypeptid bestehend aus den kleinen Aminosäuren Pro, Ala und Ser (PAS) (Schlupschy *et al.*, 2013), welches im gelösten Zustand eine ungeordnete Struktur annimmt (Breibeck & Skerra, 2018), das hydrodynamische Volumen und somit das apparente Molekulargewicht eines therapeutischen Proteins vergrößert werden, was die Nierenfiltration verlangsamt. Neben dem Einsatz eines PAS-Linkers wurde daher am C-Terminus einer scPTE-Variante mit elektrostatisch steuernden Mutationen ein PAS(200)-Anhängsel angebracht. Als Untereinheiten wurden die BdPTE-Mutanten C23 (Goldsmith *et al.*, 2016) und wiederum 10-2-C3(I106A) gewählt, und das Konstrukt wurde im Laborfermenter produziert. Die BdPTE-Mutante C23 stellte eine Vorläufermutante der 10-2-C3-Versionen dar und zeichnete sich durch ein etwas breiteres Substratprofil mit allerdings geringerer katalytischer Effizienz aus.

3.4.1 Konstruktion des Expressionsvektors für eine PASylierte Variante aus den PTE-Mutanten C23 und 10-2-C3(I106A) und gentechnische Produktion

Zur Konstruktion des Expressionsvektors für eine PASylierte scPTE-Variante aus den Untereinheiten der BdPTE-Mutanten C23 und 10-2-C3(I106A) (Sequenz s. **Abbildung 6**) wurde das für die scPTE(PAS100) kodierende Konstrukt (**Abbildung 12**) als Grundlage herangezogen, wobei das Plasmid pASK-IBA5(+)-C23 wurde von Frau Laura Job bereitgestellt wurde. Dieses diente als Matrize, um eine *AfeI*-Schnittstelle am C-Terminus des C23-

Strukturgenen mittels PCR und entsprechenden Primern einzubringen. Das PCR-Produkt wurde durch Restriktionsverdau mit *KasI* und *AfeI* und anschließender Ligierung in das Expressionsplasmid für scPTE(PAS100) inseriert, wobei die kodierende Region für 10-2-C3 ausgetauscht wurde. Weiterhin wurden am C-Terminus des *downstream* liegenden Gens von 10-2-C3(I106A) durch PCR zwei durch sechs Nukleotide getrennte invertierte *SapI*-Erkennungsstellen und abschließend eine *HindIII*-Schnittstelle mit Stoppcodon eingeführt. Diese modifizierte kodierende Region für 10-2-C3(I106A) wurde mittels der Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *HindIII* im Austausch gegen die vorherige Version in den Expressionsvektor eingebracht. Eine Genkassette kodierend für ein PAS(200)-Polypeptid wurde mittels der am C-Terminus eingeführten *SapI*-Schnittstellen inseriert, wobei deren Erkennungssequenzen eliminiert wurden (**Abbildung 26 A**). Abschließend wurden durch ortsgerichtete Mutagenese die die Heterodimerisierung am effizientesten stabilisierenden Mutationen R152E/E71*K in die jeweiligen Strukturgene eingebracht, wobei der Stern eine Position in der kodierenden Region für 10-2-C3(I106A) markiert.

Für die gentechnische Herstellung der PASylierten Variante wurde der *E. coli*-Stamm BL21 mit dem Expressionsplasmid transformiert. Wie die anderen hergestellten Plasmide trug das rekombinante Protein das *Strep*-tag II am N-Terminus, und die Expression lag unter Kontrolle des tetA-Promotor-/Operatorsystems. Die Produktion erfolgte im 8 l-Fermentationgefäß bei 25 °C, wobei die cytoplasmatische Biosynthese der PASylierten scPTE-Variante mit einer aTc-Konzentration von 500 µg/l bei einer OD₅₅₀ von ca. 20 induziert wurde. Die Ernte durch Zentrifugation erfolgte nach 2,5 h, nachdem eine OD₅₅₀ von ca. 40 erreicht worden war. Nach

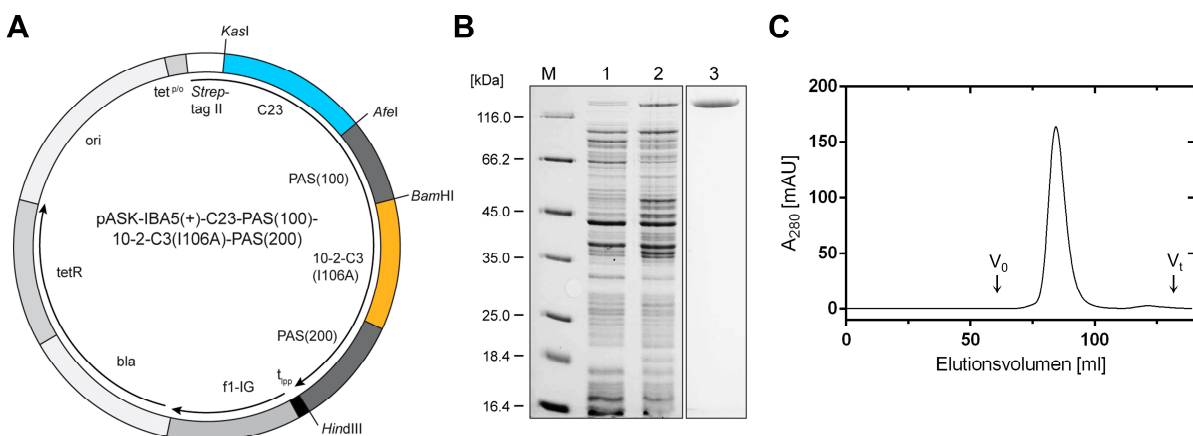


Abbildung 26. Expressionsvektor und biotechnologische Herstellung der PASylierten scPTE-Variante, scPTE(PAS100)-PAS(200), mit den BdPTE-Untereinheiten C23 und 10-2-C3(I106A). (A) Schematische Darstellung des auf dem Vektor pASK-IBA5(+) basierenden Expressionsplasmids für die PASylierte scPTE-Variante aus den BdPTE-Mutanten C23 und 10-2-C3(I106A), die die elektrostatisch steuernden Mutationen R152E bzw. E71*K trugen. Das PAS(200)-Anhängsel wurde zur Vergrößerung des apparenten Molekulargewichts nahtlos am C-Terminus der 10-2-C3-Untereinheit angebracht. (B) 12 %-ige reduzierende SDS-PAGE zur Analyse der Proteinproduktion und Reinigung. Spur M: Proteingrößenstandard (kDa); Spur 1: Löslicher Gesamtzellextrakt vor Induktion; Spur 2: Löslicher Gesamtzellextrakt nach Induktion; Spur 3: Gereinigte PASylierte scPTE nach SAC, AEX und SEC. (C) Präparative Gelfiltration der AEX-gereinigten PASylierten scPTE-Variante an einer S200 16/60-Säule.

Zellaufschluss und Isolierung des löslichen Zellextraktes wurde das rekombinante Protein durch SAC gereinigt, wobei der Durchlauf mehrmals aufgetragen wurde, um Verluste durch Überladung zu verhindern. Intermolekular assoziierte scPTE-Spezies wurden wie schon oben beschrieben mittels AEX abgetrennt und das PASylierte intramolekulare Heterodimer abschließend durch SEC feingereinigt. Auf diese Weise konnten mit einem Fermentationsvorgang mehr als 10 mg Protein mit einer Reinheit von 99 % isoliert werden (**Abbildung 26 B und C**).

3.4.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung

Die Vergrößerung des apparenten Molekulargewichts der PASylierten scPTE-Variante wurde mittels analytischer Gelfiltration nachgewiesen (**Abbildung 27 A**). Dafür wurde eine S200 10/300 Säule zunächst mit einer Standardreihe an globulären Proteinen kalibriert. Bei der anschließenden Analyse zeigte das rekombinante Protein ein vergrößertes apparentes Molekulargewicht von 254 kDa verglichen mit seiner kalkulierten Masse von 98,5 kDa. Durch Vergleich mit dem apparenten Gewicht der scPTE*(PAS100) ohne PAS(200)-Anhängsel (99,1 kDa) wurde eine durch das ungeordnete PAS(200)-Polypeptid vermittelte Volumenvergrößerung um den Faktor 2,5 festgestellt. Dieses Ergebnis stand im Einklang mit dem bereits beschriebenen Effekt der *PASylation* (Schlapschy *et al.*, 2013). Dementsprechend sollte die PASylierte scPTE-Variante eine durch Verzögerung der renalen Filtration verbesserte Plasma-Halbwertszeit im Tierversuch aufweisen.

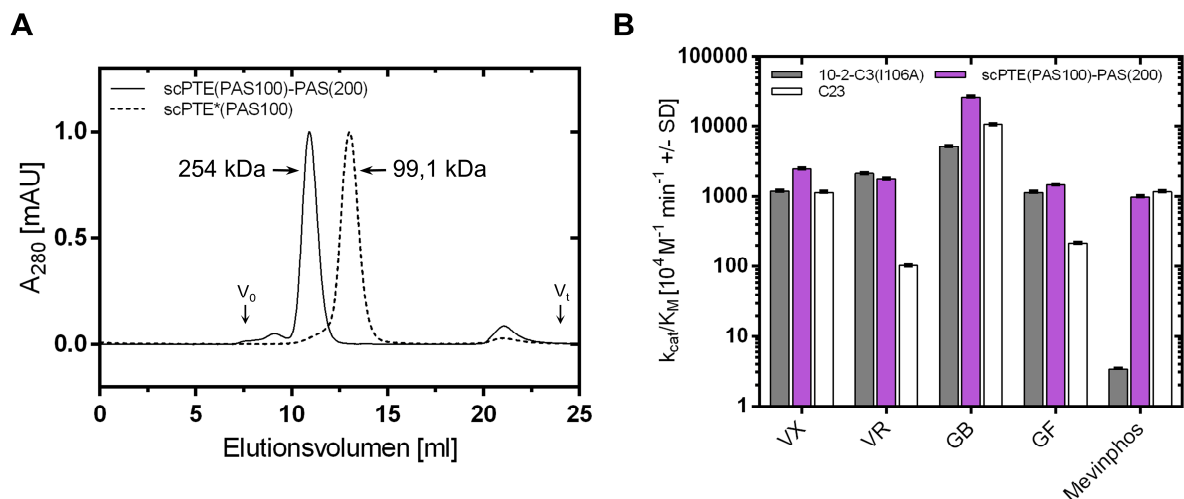


Abbildung 27. Biophysikalische und enzymologische Charakterisierung der scPTE(PAS100)-PAS(200) aus den BdPTE-Untereinheiten C23(R152E) und 10-2-C3(E71K/I106A). (A) Analyse des Einflusses des PAS(200)-Anhängsels auf das apparente Molekulargewicht einer scPTE-Variante mittels analytischer Gelfiltration. Beide Varianten wurden vor dem Auftragen zur Homogenität gereinigt, sodass nur das jeweilige intramolekulare Heterodimer vorlag. (B) Bestimmung der katalytischen Effizienzen der PASylierten scPTE wie auch der homodimeren BdPTE-Mutanten C23 und 10-2-C3(I106A) gegenüber repräsentativen OP-Kampfstoffen und dem OP-Pestizid Mevinphos durch AChE-Inhibitionsassay. Die scPTE-Variante zeigt ein durch Kombination der aktiven Zentren verbreitertes Substratspektrum mit jeweils der höchsten Aktivität der jeweiligen BdPTE-Untereinheit. Werte sind als Mittelwerte angegeben (N = 4 für die scPTE-Variante, N = 2 für homodimere Varianten).

Weiterhin wurde die hydrolytische Aktivität der Variante gegenüber den OP-Kampfstoffen VX, VR, GB und GF sowie dem OP-Pestizid mittels AChE-Inhibitionsassays durch Frau Anja Köhler bestimmt (**Abbildung 27 B**). Wie zu Beginn beschrieben, weist die homodimere BdPTE-Vorläufermutante C23 ein etwas breiteres Substratprofil auf, was sich im Vergleich zur Nachfolgemutante 10-2-C3(I106A) vor allem in einer hohen katalytischen Effizienz gegenüber dem Pestizid Mevinphos niederschlug. Die Aktivitätsanalyse bestätigte wiederum, dass die Substratpräferenzen beider BdPTE-Homodimere in der heterodimeren PASylierten scPTE-Variante vereinigt wurden. So zeigte diese gegenüber Mevinphos eine katalytische Effizienz von $9,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und war damit um ca. den Faktor 290 aktiver als die homodimere Enzymmutante 10-2-C3(I106A) ($3,4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Analog hydrolysierte das intramolekulare Heterodimer den Kampfstoff VR ca. 18-mal effizienter ($1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) als die homodimere C23-Mutante ($1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Weiterhin zeigten die eingeführten steuernden Mutationen (R152E/E71*K) offenbar keinen negativen Effekt auf die Aktivität der scPTE-Variante.

Die *PASylation*-Technologie wurde also erfolgreich auf eine heterodimere scPTE-Variante aus C23 und 10-2-C3(I106A) angewendet, die sich zudem im Fermenter in einem für Tierexperimente ausreichenden Maßstab herstellen ließ. Dabei konnte das scPTE-Format auf eine weitere Kombination aus BdPTE-Mutanten appliziert werden.

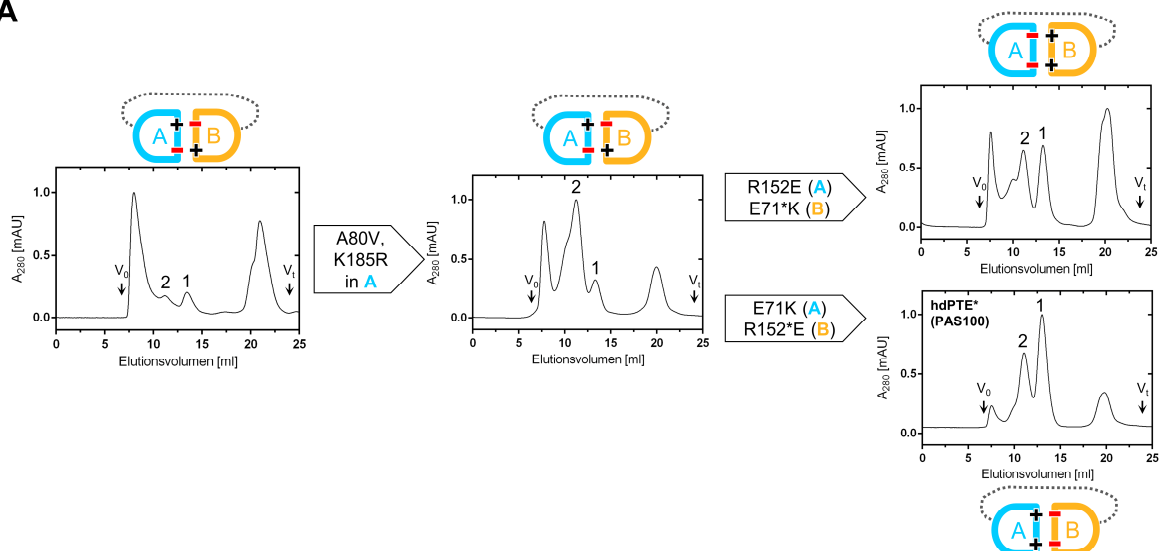
3.5 Konstruktion einer heterodimeren bispezifischen PTE mit erweitertem Substratprofil gegenüber Nervenkampfstoffen und Pestiziden

Die erzielten Resultate bezüglich der Generierung von heterodimeren scPTE-Varianten mit verbreitertem Substratspektrum ermutigten zur Herstellung einer heterodimeren PTE mit einem Substratprofil, das nicht nur OP-Kampfstoffe, sondern auch eine Reihe von OP-Pestiziden umfasste. Im folgenden Kapitel wird das Design eines chimären Breitband-*Bioscavengers* detailliert beschrieben, der sich aus den Untereinheiten der BdPTE-Mutante 10-2-C3(I106A) sowie einer optimierten OpdA aus *A. radiobacter* zusammensetzt. Dabei sollten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der einzelnen Substratprofile und Stabilisierung eines PTE-Heterodimers angewendet werden, um nicht nur eine einkettige (hdPTE*(PAS100)), sondern auch eine zweikettige Version (hdPTE*) dieses *Scavengers* zu konstruieren. Diese Varianten wurden anschließend hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum an verschiedenen als Nervenkampfstoffe oder Pestizide bekannten Organophosphatverbindungen charakterisiert. Außerdem erfolgte eine biophysikalische Analyse der Varianten.

3.5.1 Engineering einer hdPTE*(PAS100) Variante mit steuernden Mutationen aus der PTE-Variante 10-2-C3(I106A) und einer verbesserten OpdA-Mutante

Die Grundlage eines breiten Substratprofils gegenüber OP-Kampfstoffen wie auch -Pestiziden bildete die Vereinigung geeigneter PTE-Untereinheiten mit entsprechenden orthogonalen Präferenzen im scPTE-Format. So wurde für eine hohe katalytische Effizienz gegenüber Nervenkampfstoffen wiederum die BdPTE-Variante 10-2-C3(I106A) eingesetzt. Die Pestizidhydrolyse betreffend erwiesen sich dagegen in Kapitel 3.1 das Enzym OpdA, eine PTE aus *A. radiobacter*, und vor allem dessen hinsichtlich Malathion verbesserte Mutante OpdA(S308L, Y309A) (Naqvi *et al.*, 2014) als besonders effizient. Diese OpdA-Mutante zeigte verbesserte Hydrolyseaktivität gegenüber Malaoxon und Azametiphos, wobei auch Paraoxon und Chlorpyrifos mit einer katalytischen Effizienz $> 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ umgesetzt wurden. Gerade Malaoxon und Azametiphos stellten für alle BdPTE-Mutanten schlechte Substrate dar, sodass die Substratprofile der OpdA(LA) und der BdPTE 10-2-C3(I106A) nahezu komplementär

A



B

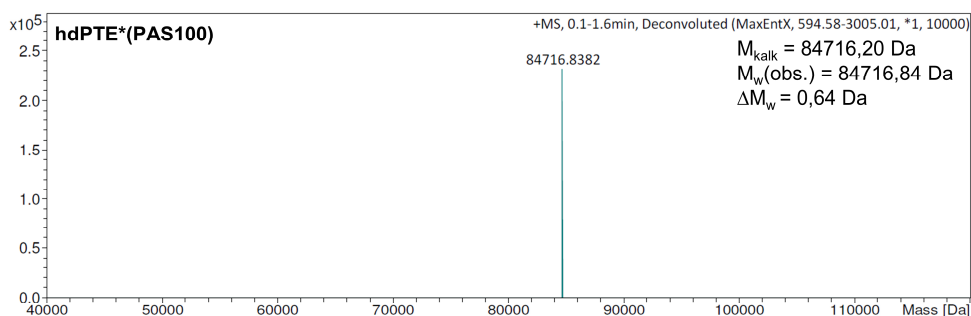


Abbildung 28. Schrittweises Engineering des durch elektrostatisch steuernde Mutationen stabilisierten Breitband-Bioscavengers hdPTE*(PAS100). (A) Evolution des rekombinanten Fusionsproteins bestehend aus den Untereinheiten der OpdA(LA) (Mutante A in hellblau) und der BdPTE 10-2-C3(I106A) (Mutante B, orange) verbunden durch ein PAS(100)-Polypeptid. Die Auswirkungen der schrittweise eingeführten steuernden Mutationen wurden anhand von analytischer Gelfiltration der einzelnen SAC-gereinigten hdPTE(PAS100)-Varianten überprüft. Dabei sind das gewünschte intramolekulare Heterodimer mit der Nummer 1 und die intermolekularen Spezies mit der Nummer 2 gekennzeichnet. (B) Massenspektrometrische Analyse der mittels AEX und SEC zur Homogenität gereinigten scPTE-Variante hdPTE*(PAS100).

zueinander waren. Andererseits wiesen die PTEs verschiedenen bakteriellen Ursprungs eine hochhomologe Tertiärstruktur auf, wobei sich die Aminosäuresequenz der OpdA in 33 Positionen von dem BdPTE-Wildtyp und sogar um 50 Positionen von der BdPTE-Mutante 10-2-C3(I106A) unterschied (vgl. **Abbildung 6**). Dabei wies die OpdA jedoch ein zusätzliches C-terminales Anhängsel mit einer Länge von 20 Aminosäuren auf.

Für die Konstruktion eines entsprechenden Expressionsplasmids wurde das für die scPTE(PAS100) kodierende Plasmid (s. **Abbildung 12 B**) als Grundlage herangezogen. Die kodierende Region für die BdPTE 10-2-C3 wurde durch diejenige für die verbesserte OpdA(LA) mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen *KasI* und *AfeI* ausgetauscht. Mit dem so erzeugten Expressionsplasmid wurde das Protein in BL21 produziert. Der lösliche Zellrohextrakt wurde auf eine *Strep*-Tactin-Säule aufgetragen und das rekombinante Protein in der SAC-Elutionsfraktion mittels analytischer Gelfiltration hinsichtlich des Oligomerisierungsverhaltens untersucht. Die Analyse zeigte hauptsächlich Mikroaggregate und kaum inter- oder intramolekulare Spezies (**Abbildung 28 A**). Aus diesem Grund wurden die bei erweiterter Literaturrecherche ermittelten Mutationen A80V und K185R in die kodierende Region für die OpdA(LA) eingeführt. Diese Aminosäureaustausche sollten die OpdA durch Eliminierung einer hydrophoben Kavität (McLoughlin *et al.*, 2005) und Ausbildung dreier neuer H-Brücken (Yang *et al.*, 2003) stabilisieren (**Abbildung 29**).

Die Oligomerisierungsanalyse dieser scPTE-Version ergab zwar immer noch Mikroaggregate, vor allem aber intermolekulare Spezies und zumindest einen kleinen Anteil an intramolekularem Heterodimer (**Abbildung 28 A**). Folglich wurden in das so stabilisierte chimäre Enzym die zuvor gefundenen steuernden Mutationen eingebracht. Dazu wurden die beiden Aminosäureaustausche R152E in OpdA(LA/A80V/K185R) (OpdA(LAVR)) und E71*K in BdPTE 10-2-C3(I106A) eingeführt. Die erhaltene Variante zeigte zwar einen höheren Anteil an intramolekularem Heterodimer, allerdings lag immer noch ein signifikanter

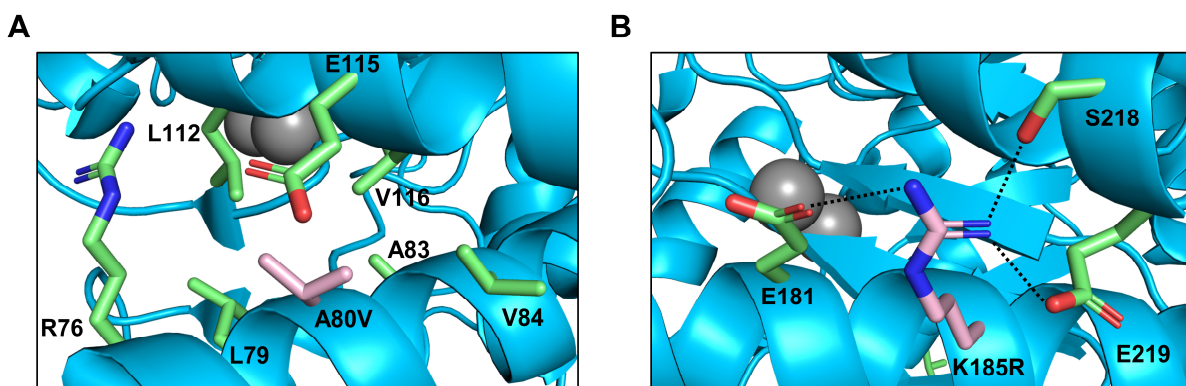


Abbildung 29. Computergestützte Analyse der in die OpdA(LA) eingeführten stabilisierenden Mutationen A80V (Yang *et al.*, 2003) und K185R (McLoughlin *et al.*, 2005) anhand der Kristallstruktur einer verwandten OpdA-Mutante (PDB: 3A3X). (A) Die Mutation A80V eliminierte eine von den Resten R76, L79, A83, V84, L112, E115 und V116 gebildete hydrophobe Oberflächenkavität des rekombinanten Proteins. (B) Die stabilisierende Mutation K185R führte zur Ausbildung dreier neuer Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) mit den Aminosäureseitenketten E181, S218 und E219.

Anteil an intermolekularen Spezies vor. Aufgrund der zuvor gewonnenen Erkenntnisse über die Effekte unterschiedlicher Anordnung der elektrostatisch steuernden Mutationen im Kontext der beiden verschiedenen aktiven Zentren wurde eine Version mit umgekehrter Symmetrie konstruiert, in der die Substitution E71K in die OpdA(LAVR)- und R152*E in die BdPTE 10-2-C3(I106A)-Untereinheit eingeführt wurden (vgl. **Abbildung 18 A**). Die nun erhaltene Variante hdPTE*(PAS100) zeigte einen deutlich erhöhten Anteil an intramolekularem Heterodimer, wobei eine Ausbeute von 2,9 mg pro 2 l Kultur erreicht wurde. Das rekombinante Protein wurde mittels AEX und SEC zur Homogenität gereinigt und die korrekte Zusammensetzung massenspektrometrisch bestätigt (**Abbildung 28 B**).

3.5.2 Engineering einer durch steuernde Mutationen stabilisierten zweikettigen Variante (hdPTE*)

Inspiziert durch die erfolgreiche Produktion einer scPTE aus zwei Untereinheiten verschiedener bakterieller Herkunft, wurde die Konstruktion einer heterodimeren PTE mit einer quasi-nativen Tertiärstruktur, d.h. ohne kovalente Verbindung der beiden Untereinheiten durch einen PAS-Linker, in Angriff genommen. Hierfür wurde der für den PAS(100)-Linker kodierende Bereich des im vorherigen Kapitel 3.5.1 beschriebenen Expressionsplasmids für hdPTE*(PAS100) gegen eine intergenische Region, die neben Start- und Stoppcodon eine Shine-Dalgarno-Sequenz nach Skerra (1994) enthielt, ausgetauscht (**Abbildung 30**). Das so erhaltene bicistronische Konstrukt ermöglichte eine simultane Expression der beiden Untereinheiten OpdA(LAVR/E71K) und 10-2-C3(I106A/R152E) im Cytoplasma von *E. coli*. Das resultierende mit elektrostatisch steuernden Mutationen versehene PTE-Heterodimer wird in folgendem als hdPTE* bezeichnet. Analog wurde ein biscistronisches Expressionsplasmid kodierend für eine hdPTE-Variante ohne steuernde Mutationen (hdPTE) hergestellt.

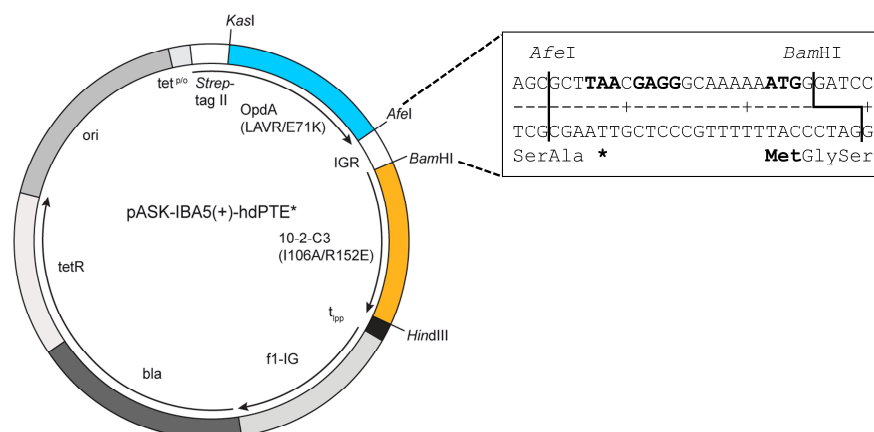


Abbildung 30. Bicistronisches Expressionsplasmid für die simultane Biosynthese der beiden Polypeptidketten der hdPTE* im Cytoplasma von *E. coli*. Das Plasmid kodiert für die Untereinheiten OpdA(LAVR/E71K) mit N-terminalem Strep-tag II und BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E). Die Untereinheiten tragen das beschriebene elektrostatisch steuernde Mutationspaar E71K/R152*E. Der PAS-Linker des hdPTE(PAS100)-Plasmids ist hier durch eine intergenische Region (IGR) ausgetauscht, die neben einem Stopp- und Startcodon eine Shine-Dalgarno Sequenz beinhaltet (fett markiert).

Beide zweikettige Varianten wurden im Cytoplasma von *E. coli* BL21 exprimiert, wobei es zu einer Bildung von homo- und heterodimeren Spezies kommen konnte, ähnlich der Koexpression zweier verschiedener schwerer Ketten bei der Produktion von bispezifischen Antikörpern (s. Einleitung). Die Mischung rekombinanter Proteinspezies wurde anschließend mittels SAC aus dem löslichen Zellextrakt isoliert und mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX) und SDS-PAGE analysiert (**Abbildung 31**). Die sich deutlich unterscheidenden isoelektrischen Punkte der beiden Untereinheiten ($\sim 9,2$ für OpdA(LAVR/E71K) und $\sim 5,1$ für BdPTE 10-2-C3(I106A)) erlaubte in dem gewählten Puffersystem bei pH 8,0 die vollständige Trennung der verschiedenen Homodimere von dem gesuchten Heterodimer in einem NaCl-Konzentrationsgradienten (**Abbildung 31 A**, s. hdPTE* Lauf 1).

Dabei zeigte die SAC-Elutionsfraktion im Fall der gesteuerten Mutante hdPTE* einen hohen Anteil der homodimeren OpdA(LAVR/E71K) im Durchlauf während der AEX (**Abbildung 31 B**, s. Spur P2). Die Analyse durch SDS-PAGE des löslichen Gesamtzellextraktes zeigte, dass dies auf einen Überschuss dieser Untereinheit aufgrund der verstärkten Translations des ersten Cistrons zurückzuführen sein könnte (**Abbildung 31 B**, s. Spur 1 bzw. 2). Nach Anlegen des NaCl-Konzentrationsgradienten eluierte das gewünschte Heterodimer hdPTE* bei ca. 110 mM NaCl, wobei kein weiteres Signal für die homodimere BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E)

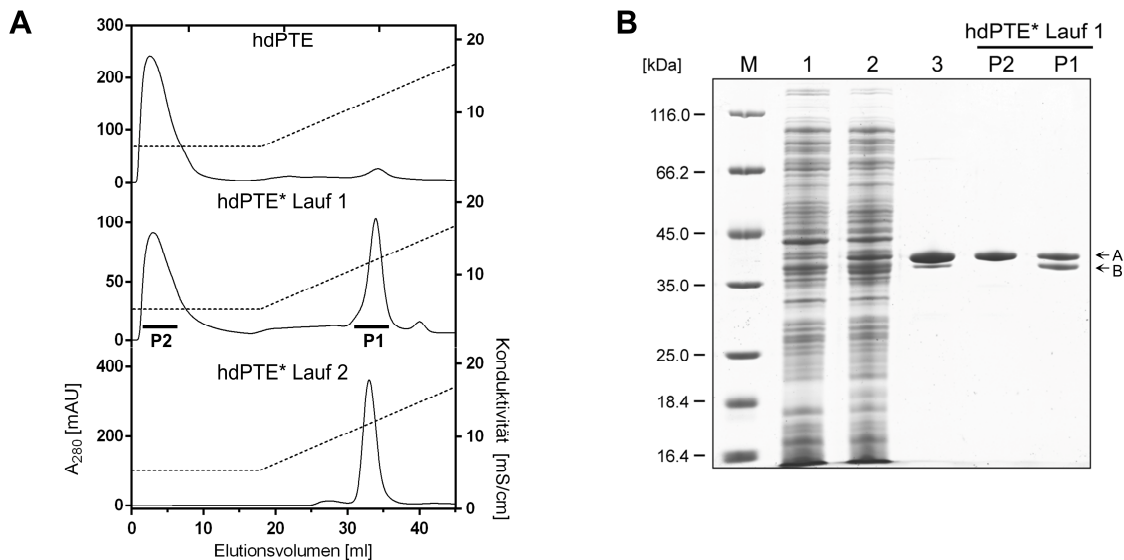


Abbildung 31. Analyse der heterodimeren hdPTE* bestehend aus den Untereinheiten BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E) und OpdA(LAVR/E71K) ohne kovalente Verknüpfung. (A) Elutionsprofile der Anionenaustauschchromatographie (AEX) der durch SAC gereinigten Proteine ohne (hdPTE) und mit elektrostatisch steuernden Mutationen (hdPTE*). Durch die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte der einzelnen Untereinheiten konnten homodimere (P2) von heterodimeren Spezies (P1) getrennt werden (hdPTE* Lauf 1). Rechromatographie der heterodimeren Fraktion P1 deutete auf stabile Assoziation der Untereinheiten (hdPTE* Lauf 2). (B) 12 %-ige reduzierende SDS-PAGE. Spur M: Proteingrößenstandard (kDa); Spur 1: Löslicher Gesamtzellextrakt vor Induktion; Spur 2: Löslicher Gesamtzellextrakt nach Induktion der Genexpression, in dem eine deutliche Bande für die OpdA(LAVR/E71K) (Untereinheit A) aber eine nur schwache Bande für die BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E) (Untereinheit B) zu erkennen sind; Spur 3: SAC-Elutionsfraktion; Spur P2: AEX-Durchlauf aus dem hdPTE* Lauf 1 zeigt nur eine Bande für die Untereinheit A; Spur P1: Die AEX-Elutionsfraktion zeigt Banden im stöchiometrischen Verhältnis für die Untereinheiten A und B der heterodimeren hdPTE*.

nachweisbar war, im Einklang mit einer schwächeren Expression des zweiten Cistrons. Allerdings trug dieses Homodimer auch kein *Strep*-tag II, sodass diese Spezies – falls überhaupt vorhanden – vermutlich schon bei der SAC depletiert wurde. Weiterhin zeigte ein Rechromatographie-Experiment mit der das bispezifische Enzym enthaltenden AEX-Elutionsfraktion unter gleichen Bedingungen (**Abbildung 31 A**, s. hdPTE* Lauf 2) keine Reäquilibration der Untereinheiten.

In ähnlicher Weise wurde eine durch SAC gereinigte Mischung aus den Untereinheiten ohne die steuernden Mutationen (hdPTE) analysiert (**Abbildung 31 A**, s. hdPTE). Das dabei beobachtete äußerst geringe Signal für die heterodimere Spezies bestätigte den stabilisierenden Effekt der eingeführten steuernden Mutationen. Als Ergebnis eines präparativen Expressionsexperiments konnte so mittels SAC, AEX und SEC 4,1 mg der heterodimeren hdPTE* aus 2 l *E. coli*-Kultur isoliert werden.

Die massenspektrometrische Analyse der gereinigten hdPTE* zeigte Signale mit identischer Intensität für beide Polypeptidketten bei jeweils korrekter Molmasse (**Abbildung 32 A**). Das durch Gelfiltration bestimmte apparente Molekulargewicht von 65,2 kDa lag etwas unterhalb der Summe der Masse der beiden Polypeptidketten ($M_{\text{kalk}} = 76,4 \text{ kDa}$) (**Abbildung 32 B**). Das aufgenommene CD-Spektrum von 190 bis 250 nm ergab eine ähnliche Zusammensetzung an Sekundärstrukturelementen wie die der jeweiligen homodimeren Gegenstücke OpdA(LAVR) und BdPTE 10-2-C3(I106A). Dabei waren die CD-Profile durch einen hohen Anteil an α -Helix

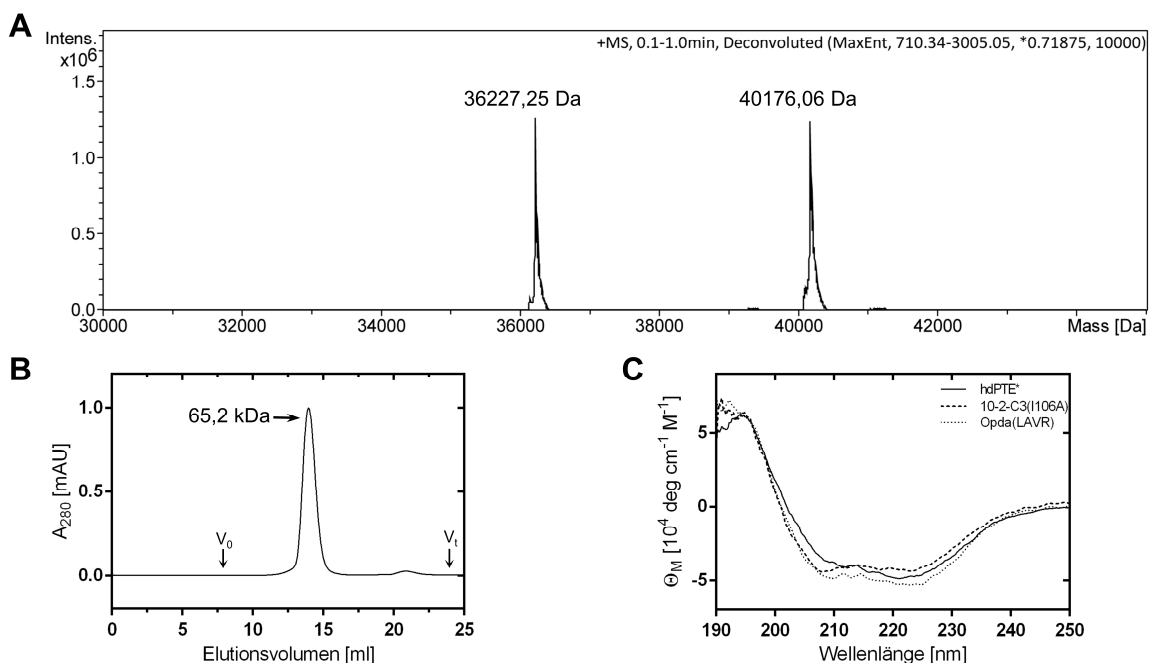


Abbildung 32. Biophysikalische Untersuchung der gereinigten heterodimeren hdPTE*. (A) Massenspektrometrische Analyse zeigte die Masse der beiden Polypeptidketten der jeweiligen Untereinheiten BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E) ($M_{\text{kalk}} = 36227,01 \text{ Da}$; $\Delta M_w = 0,24 \text{ Da}$) und OpdA(LAVR/E71K) ($M_{\text{kalk}} = 40176,93 \text{ Da}$; $\Delta M_w = 0,87 \text{ Da}$). (B) Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der hdPTE* mittels analytischer Gelfiltration, wodurch die dimere Quartärstruktur bestätigt werden konnte. (C) Sekundärstrukturanalyse der hdPTE* und der jeweiligen homodimeren Ausgangsenzyme BdPTE 10-2-C3(I106A) und Opda(LAVR)

geprägt (**Abbildung 32 C**, vgl. **Abbildung 15** und Kapitel 3.2.3). Die biophysikalische Untersuchung ließ neben der oben beschriebenen AEX-Analyse darauf schließen, dass die hdPTE* eine quasi-native heterodimere Quartärstruktur aufwies.

3.5.3 Untersuchungen zur Thermostabilität der heterodimeren PTE-Varianten

Die Thermostabilität der kovalent verbundenen hdPTE*(PAS100) bzw. der zweikettigen Variante hdPTE* wurde mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde die Änderung des CD-Signals aufgrund des thermisch induzierten Verlusts an Sekundärstruktur bei einer konstanten Wellenlänge von 210 nm verfolgt und mittels *Six Parameter Fit* die Schmelztemperatur bestimmt. Zur Vorbereitung wurden alle Proben gründlich gegen CD-Puffer (20 mM KP_i , 50 mM K_2SO_4 , pH 7,5) dialysiert und die Schmelzkurve von 25°C bis 99 °C aufgenommen (**Abbildung 33**).

Die homodimeren Varianten OpdA(LAVR) bzw. BdPTE 10-2-C3(I106A) zeigten Schmelztemperaturen von 86,4 bzw. 69,2 °C (s. **Abbildung 25** bzw. **Tabelle 3**). Die entsprechende heterodimere scPTE-Variante mit steuernden Mutationen hdPTE*(PAS100) lag mit einer T_m von 72°C näher an der der BdPTE-Mutante. Die Untersuchung der Thermostabilität der zweikettigen hdPTE* offenbarte dagegen eine Schmelzkurve mit zwei Übergängen. Da die beiden Untereinheiten im heterodimeren Komplex nur durch nicht kovalente Wechselwirkungen verbunden waren, kam es offenbar zur Dissoziation und Denaturierung der Untereinheiten bei der jeweiligen Schmelztemperatur. Derlei Phänomene

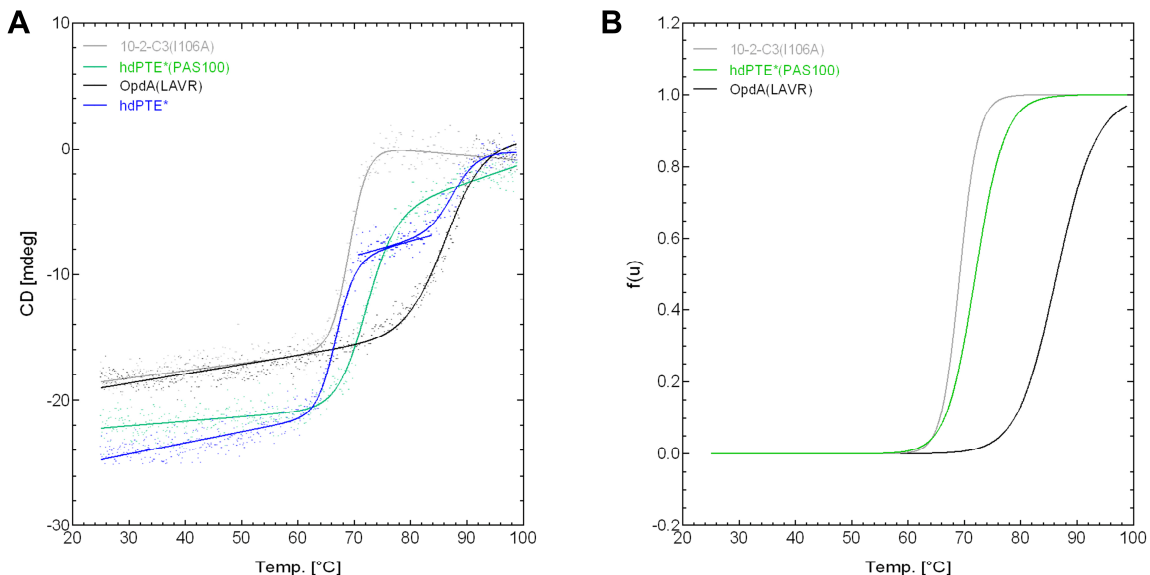


Abbildung 33. Thermische Stabilität der kovalent verbundenen hdPTE*(PAS100) sowie der zweikettigen Variante hdPTE* bestehend aus den Untereinheiten OpdA(LAVR/E71k) und BdPTE 10-2-C3(I106A/R152E). (A) Rohdaten der thermisch induzierten Denaturierung der homodimeren OpdA(LAVR) und BdPTE 10-2-C3(I106A) im Vergleich mit der hdPTE*(PAS100) und hdPTE* bei 210 nm. Das Spektrum wurde von 25 bis 99 °C bei einer Heizrate von 60K/h aufgenommen und die gemessenen Rohdaten mittels nicht linearer Regression angepasst (*Six Parameter Fit*). Dabei wurden die beiden Übergänge im Fall der hdPTE* einzeln angepasst und ließen sich so der entsprechenden Untereinheit zuordnen. (B) Normierte Entfaltungskurven der Varianten mit nur einem Übergang.

sind aus der Literatur bekannt, z.B. bei Antikörperfragmenten (Wörn & Plückthun, 1999). Dabei entfaltete sich die BdPTE-Untereinheit 10-2-C3(I106A/R152E) bei 66,8 °C und damit bei einer um ca. 2,4 °C niedrigeren Temperatur als die Version ohne elektrostatisch steuernde Mutation. Die Untereinheit OpdA(LAVR/E71K) denaturierte hingegen erst bei einer vergleichbaren Temperatur wie ihr parentales Gegenstück OpdA(LAVR). Alle Varianten zeigten bei der Erhöhung der Temperatur Aggregation, sodass die Aufnahme einer Renaturierungskurve nicht möglich war.

Tabelle 4. Durch thermische Entfaltung bestimmte biophysikalische Parameter bezüglich der Stabilität der homodimeren rekombinanten Proteine OpdA(LAVR) bzw. BdPTE 10-2-C3(I106A) (Daten aus Tabelle 3) sowie der heterodimeren hdPTE*(PAS100) und der jeweiligen Untereinheiten der hdPTE*. Die mit dem Stern gekennzeichneten Varianten tragen die elektrostatisch steuernden Mutationen E71K in der OpdA- und R152E in der BdPTE-Untereinheit.

	OpdA (LAVR)	BdPTE 10-2-C3(I106A)	hdPTE* (PAS100)	hdPTE* Übergang I	hdPTE* Übergang II
T_m [°C]	86,4	69,2	72,0	66,8	86,4
ΔH_m [kJ/mol]	307,7	600,1	388,2	565,2	497,5
$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ [kJ/mol]	52,5	77,4	52,8	-	-

3.5.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der hdPTE*(PAS100) und der hdPTE* wurde wiederum ein *Fingerprint* mittels AChE-Inhibitionsassay von Frau Anja Köhler am Institut für Pharmakologie und Toxikologie aufgenommen. Um ein umfassendes Bild über die Substratprofile zu erhalten, wurden die katalytischen Effizienzen gegenüber einer breit gefächerten Auswahl an OP-Kampfstoffen sowie OP-Pestiziden untersucht. Dies umfasste die von der homodimeren BdPTE 10-2-C3(I106A) präferierten Substrate VX, VR, GF und GB und die von der homodimeren OpdA(LA) bevorzugten OP-Pestizide Azametiphos, Malaoxon, Mevinphos und Paraoxon-ethyl (**Abbildung 34 A und Tabelle 6**).

Dieser *Fingerprint* illustrierte den bispezifischen Charakter der chimären Enzymversionen hdPTE*(PAS100) und hdPTE*, wobei jeweils die höchsten Aktivitäten der jeweiligen parentalen homodimeren Ausgangsenzyme bzgl. der jeweiligen Substrate nachgewiesen wurden. So hydrolysierte beispielsweise die einkettige heterodimere Variante hdPTE*(PAS100) den Nervenkampfstoff VR um den Faktor 3300 effizienter als die homodimere OpdA(LA) und das Pestizid Malaoxon um den Faktor 1200 schneller als die homodimere BdPTE 10-2-C3(I106A). Die zweikettige hdPTE* zeigte ähnliche hohe katalytische Effizienzen gegenüber allen OP-Substraten.

Zudem wurden die enzymkinetischen Parameter der einkettigen Version hdPTE*(PAS100) und der homodimeren OpdA(LAVR) verglichen (**Abbildung 34 B, Tabelle 5**). Hierfür wurde eine Enzymkinetik mit dem Substrat Malaoxon aufgenommen, indem der Anstieg des eine

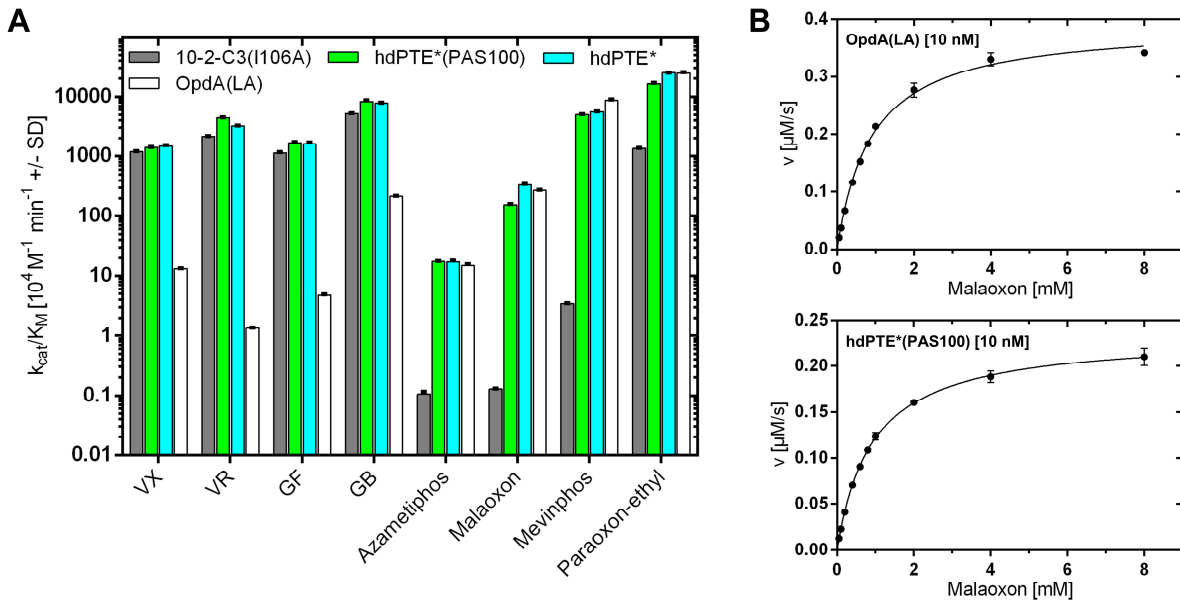


Abbildung 34. Analyse des Substratprofils und einzelner enzymkinetischer Parameter der heterodimeren PTE-Varianten. (A) *Fingerprint* der katalytischen Effizienzen der heterodimeren Varianten hdPTE*(PAS100) und hdPTE* sowie der homodimeren Ausgangsmutanten OpdA(LA) und 10-2-C3(I106A) gegenüber einer repräsentativen Auswahl an OP-Kampfstoffen und -Pestiziden. Die Bestimmung erfolgte mittels AChE-Inhibitionsassay. Die bispezifischen Heterodimere mit elektrostatisch steuernden Mutationen (*) kombinieren jeweils die besten hydrolytischen Aktivitäten der einzelnen Homodimere zu einem besonders breiten Substratspektrum. Werte sind als Mittelwerte angegeben (N = 4 für heterodimere Varianten, N = 2 für homodimere Ausgangsenzyme). (B) Bestimmung der enzymkinetischen Parameter von hdPTE*(PAS100) und der homodimeren OpdA(LA) gegenüber dem Pestizid Malaoxon, dessen Hydrolyseprodukt eine aromatische Thiolgruppe aufweist, die den direkten photometrischen Nachweis und damit eine enzymatische Analyse nach Michaelis/Menten gestattet. So wurden die Anfangsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration in 50 Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,1 μM ZnSO₄, pH 8,0 anhand der Konzentrationszunahme an TNB-Ionen bei 412 nm photometrisch im Dreifachansatz bestimmt und mit Hilfe der Michaelis/Menten-Gleichung angepasst. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen sind angegeben.

aromatische Thiolgruppe enthaltenden Hydrolyseprodukts nach Umsatz mit Ellmans Reagenz bei 412 nm absorptionsspektrometrisch verfolgt wurde. Beide Enzyme zeigten eine klassische Michealis-Menten Kinetik, wobei das Homodimer und das Heterodimer vergleichbare K_M -Werte aufwiesen (0,902 mM bzw. 0,919 mM). Dagegen zeigte die hdPTE*(PAS100) einen etwas geringeren k_{cat} -Wert von 23,4 s^{-1} im Vergleich zu 39,3 s^{-1} . Dies steht im Einklang mit dem Umstand, dass die OpdA(LAVR) zwei hochaktive Zentren für dieses Substrat aufweist. Die gemessenen katalytischen Effizienzen $1,53 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für das Heterodimer und $2,62 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für das homodimere Enzym waren untereinander wie auch mit den im *Fingerprint* durch AChE-Inhibition bestimmten vergleichbar.

Die durchgeführten Untersuchungen deuteten auf ein beispiellos breites Substratprofil hin, dass durch Kombination zweier unterschiedlicher aktiver Zentren erreicht wurde. Das so konstruierte Enzym zeigt damit Potential als chimärer *Bioscavenger* zur effizienten Detoxifizierung verschiedenster OP-Verbindungen. Dabei stellt vor allem die zweikettige hdPTE* durch ihre quasi-native Quartärstruktur ein echtes bispezifisches Pendant zu den zuvor generierten hochspezialisierten homodimeren PTE-Varianten dar.

Tabelle 5. Kinetische Parameter der homodimeren OpdA(LA) und der bispezifischen hdPTE*(PAS100) für das Substrat Malaoxon. Die katalytische Aktivität wurde anhand der Konzentrationszunahme von TNB⁻ bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Temperatur von 37 °C photometrisch bei 412 nm bestimmt.

Protein	K_M [mM]	k_{cat} [s⁻¹]	k_{cat}/K_M [M⁻¹ min⁻¹]
OpdA(LA)	0,902	39,3	2,62 · 10 ⁶
hdPTE*(PAS100)	0,919	23,4	1,53 · 10 ⁶

Tabelle 6. Katalytische Effizienzen ($k_{cat}/K_M \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) der homodimeren BdpTE- und OpdA-Mutanten im Vergleich mit den wichtigsten scPTE- und hdPTE*-Versionen gegenüber OP-Nervenkampfstoffen sowie OP-Pestiziden.

	GB	VX	VR	GF	Azametiphos	Malaoxon	Mevinphos	Paraoxon-ethyl
hdPTE*	77.7 ± 2.2	14.7 ± 0.4	31.8 ± 1.0	15.9 ± 0.8	0.2 ± 0.009	3.3 ± 0.1	55.5 ± 1.6	246 ± 3.0
hdPTE* (PAS100)	82.8 ± 3.6	13.9 ± 0.2	44.3 ± 0.9	16.7 ± 0.5	0.2 ± 0.003	1.5 ± 0.04	49.6 ± 0.9	162 ± 4.4
OpdA(LA)	2.14 ± 0.04	0.13 ± 0.002	0.02 ± 0.003	0.05 ± 0.002	0.15 ± 0.008	2.7 ± 0.03	86.6 ± 2.7	244 ± 6.6
scPTE* (PAS100)	119 ± 2.0	23.7 ± 0.1	14.1 ± 0.7	9.2 ± 0.2	-	-	-	-
scPTE (PAS100)	172 ± 5.0	66.2 ± 1.7	22.8 ± 0.6	13.2 ± 0.4	-	-	-	-
10-2-C3 (I106A)	52.0 ± 0.8	11.8 ± 0.2	21.4 ± 0.1	11.3 ± 0.4	0.001 ± 0.0	0.001 ± 0.0	0.03 ± 0.005	13.3 ± 0.4
10-2-C3	165 ± 3.0	45.9 ± 0.8	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2	-	0.003 ± 0.0	0.036 ± 0.004	-

4 Diskussion

4.1 Design artifizierlicher bispezifischer Biokatalysatoren

Die in dieser Arbeit entwickelte Strategie wurde durch das *Engineering* bispezifischer Antikörper (Labriijn *et al.*, 2019) inspiriert. Dabei wurde ein *Proof-of-Concept* der Konstruktion bispezifischer Biokatalysatoren durch stabile Heterodimerisierung mit verbreitertem Substratspektrum durch Brechen der homodimeren C₂-Symmetrie erzielt. Als Modellenzyme dienten die homologen homodimeren Phosphotriesterasen BdPTE und OpdA, um deren Potential, verschiedene OP-Nervenkampfstoffe bzw. OP-Pestizide abzubauen, für die Generierung eines Breitband-*Bioscavengers* auszunutzen (Raushel, 2002; Yang *et al.*, 2003; Horne *et al.*, 2002).

Beim ersten Design der heterodimeren scPTE wurde der jeweilige C- und N-Terminus der beiden Enzymuntereinheiten der BdPTE-Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) mit einem Linker bestehend aus den Aminosäuren Pro, Ala und Ser (PAS) verbunden (Schlapschy *et al.*, 2013). Die kovalente Verknüpfung der Untereinheiten erlaubte die Unterscheidung der gewünschten intramolekularen Heterodimere von intermolekularen Spezies also Nebenprodukte anhand der apparenten Molmassen. Dabei hatte der PAS-Linker aufgrund seiner inerten Natur keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität und Faltung der scPTE-Varianten (Lerchner *et al.*, 2016). Das Oligomerisierungsverhalten einer scPTE-Variante war jedoch von der Länge des die beiden Untereinheiten verknüpfenden PAS-Polypeptids abhängig. So wurde festgestellt, dass ein kurzer PAS(40)-Linker die intermolekulare Assoziation begünstigte, wohingegen eine Verlängerung des verknüpfenden Polypeptids die Bildung des intramolekularen Heterodimers begünstigte (vgl. scPTE(PAS100) bzw. scPTE(PAS200)).

Der bei *single-chain* Fv Antikörperfragmenten (scFv) gewöhnlicherweise verwendete (Gly₄Ser)_n-Linker kann das Oligomerisierungsverhalten in ähnlicher Weise beeinflussen (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988). Bei scFv handelt es sich um das Fv-Fragment eines Antikörpers, dessen variable Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L) mittels eines Polypeptid-Linkers verbunden sind (**Abbildung 35**). Die Erkenntnis, dass sich das Oligomerisierungsgleichgewicht durch Änderung der Linkerlänge steuern ließ, ermöglichte die Generierung von bivalenten oder bispezifischen *Diabodies* durch Assoziation von zwei scFv-Polypeptiden, gegebenenfalls mit V_H- bzw. V_L-Domänen unterschiedlicher Herkunft (Holliger *et al.*, 1993). Genauere Untersuchungen bezüglich des Oligomerisierungsverhaltens von scFvs offenbarten, dass eine Linkerlänge von weniger als 12 bis 15 Aminosäuren hauptsächlich zu intermolekularen Dimeren führt. Eine weitere Verkürzung auf weniger als vier Aminosäuren resultierte aufgrund der auftretenden starken sterischen Spannungen in Oligomeren höherer Ordnung (Tria- oder Tetra**odies**); (Kortt *et al.*, 1997; Atwell *et al.*, 1999). Neben der Länge des verknüpfenden Polypeptids beeinflussen noch andere Faktoren wie Ionenstärke, pH-Wert

und auch die Aminosäuresequenz das Oligomerisierungsverhalten von Fv-Fragmenten (Arndt *et al.*, 1998). Weiterhin kann die Bildung intermolekularer Dimere aus scFv mit langen Linkern durch Bindung von zwei Antigenen stabilisiert werden (Arndt *et al.*, 1998).

Die in dieser Arbeit dargelegte Strategie zur Generierung bispezifischer Biokatalysatoren mit verbreitertem Substratspektrum wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Zwar wurde zuvor eine heterodimere Endoribonuklease (Conrad *et al.*, 2002) oder eine nicht symmetrische Restriktionsendonuklease (Wende *et al.*, 1996) konstruiert, allerdings dienten diese künstlichen Heterodimere nur zur Untersuchung eines etwaigen Wirkungszusammenhangs der beiden katalytischen Zentren. Dabei wurden eine normale und eine katalytisch inaktive Untereinheit koexprimiert und die jeweiligen Heterodimere aufwendig mittels zweier unterschiedlicher Affinitätschromatographien gereinigt. Bei dieser Vorgehensweise wurden also keine heterodimeren Enzyme mit zusätzlicher Substratspezifität erzeugt.

Die zweikettige Variante hdPTE* wie auch die kovalent verknüpfte *single-chain* Variante hdPTE*(PAS100) stellen hochaktive bispezifische *Bioscavenger* bestehend aus Untereinheiten von BdPTE- und OpdA-Mutanten dar. Dabei weist das zweikettige chimäre Enzym eine den parental homodimeren Proteinen sehr ähnliche Quartärstruktur auf und kombiniert zwei unterschiedliche aktive Zentren. Die bispezifischen *Bioscavenger* zeigen ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebenes breites Substratspektrum, sodass sowohl OP-Nervenkampfstoffe als auch OP-Pestizide mit hoher katalytischer Effizienz hydrolysiert werden. Entgegen der Spekulation von Despotovic *et al.* (2019) weisen PTE-Heterodimere keine verschlechterte hydrolytische Aktivität auf, sondern die beiden voneinander unabhängigen aktiven Zentren sind voll funktionsfähig.

Die beiden für diesen chimären *Scavenger* verwendeten enzymatischen Untereinheiten entspringen Organismen aus derselben bakteriellen Klasse der *Alphaproteobacteria*, gehören aber zwei unterschiedlichen phylogenetischen Ordnungen an, den *Caulobacterales* (B.

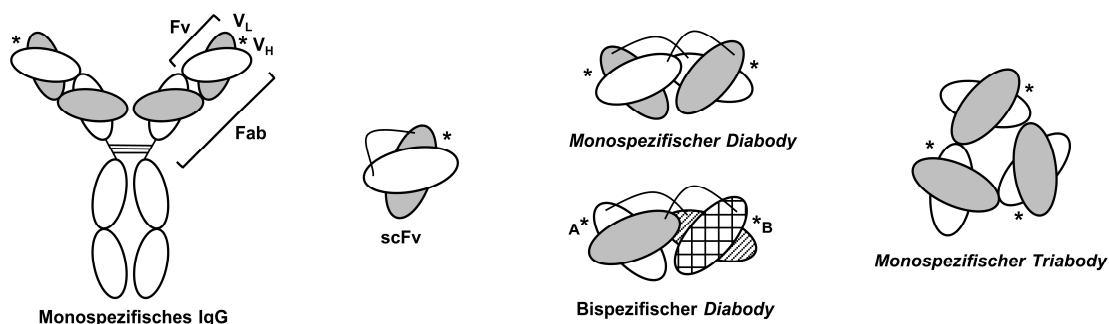


Abbildung 35. Schematische Darstellung eines gewöhnlichen monospezifischen IgG-Moleküls und von verschiedenen scFv-Formaten, wobei die Antigenbindestellen jeweils mit einem Stern markiert sind. Ein scFv besteht aus der V_H - und V_L -Domäne (weiß/grau), die über einen $(G_4S)_n$ -Linker kovalent verbunden sind. Über die Länge des Linkers kann bis zu einem gewissen Grad gesteuert werden, ob sich entweder *Diabodies* oder höhere Oligomere, wie *Triabodies*, durch intermolekulare Assoziation mehrerer scFv-Moleküle bilden. Aufgrund der Bivalenz von *Diabodies* kann auch eine bispezifische Form erzeugt werden. Dabei dimerisiert eine Polypeptidkette, die $V_H(A)$ (weiß) und $V_H(B)$ (gestreift) beinhaltet, mit einer Kette bestehend aus $V_L(A)$ (grau) und $V_L(B)$ (gemustert), wobei A und B von unterschiedlichen Antikörpern stammen.

diminuta) (Segers *et al.*, 1994) bzw. den *Rhizobiales* (*A. radiobacter*) (Slater *et al.*, 2009). Trotz der Unterschiede in der Aminosäuresequenz und Substraterkennung weisen BdPTE und OpdA bei Strukturüberlagerung (PDB: 1HZY und 2DJD) eine RMSD der C α -Atome von nur 0,83 Å und somit eine homologe Tertiärstruktur auf. So scheint für die Konstruktion bispezifischer Biokatalysatoren vor allem eine homologe Struktur relevant zu sein. Man darf also erwarten, dass diese Strategie auch auf PTEs aus anderen Ursprungsorganismen oder sogar auf Enzyme unterschiedlicher Klassen angewendet werden kann.

4.2 Stabilisierung der Heterodimerisierung artifizieller bispezifischer Proteine

Bei der Herstellung bispezifischer Antikörper stellte sich heraus, dass eine einfache Koexpression der verschiedenen Genpaare von leichter und schwerer Kette zu einer komplexen Mischung von Spezies mit unterschiedlicher Zusammensetzung der jeweiligen Ketten im zellulären Cytoplasma führte (Kohler & Milstein, 1975; Suurs *et al.*, 2019). So entstehen bei der sog. Quadroma-Technologie, bei der zwei unterschiedliche Hybridomzellen fusioniert werden, 10 unterschiedliche Kombinationen an Kettenkonfigurationen, von denen eine dem gewünschten bispezifischen Antikörper entspricht. Folglich sind die durch aufwendige Reinigung erreichten Ausbeuten an gewünschtem Heterodimer meist gering (Carter, 2001). Aus diesem Grund wurden mehrere Strategien des Protein-*Engineerings* entwickelt, um die gezielte Heteroassoziation der beiden schweren Ketten zu forcieren (Labrijn *et al.*, 2019). Dabei sind vor allem die für diese Arbeit relevanten Strategien *Knob-into-Hole* (Ridgway *et al.*, 1996) und *Electrostatic Steering* (Gunasekaran *et al.*, 2010) herauszustellen.

Die Entwicklung der *Knob-into-Hole*-Strategie wurde ursprünglich durch die von Crick vorgeschlagene Packung der Aminosäureseitenketten zwischen zwei α -Helices (Crick, 1952; Crick, 1953) inspiriert (Brinkmann & Kontermann, 2017). So übertrugen Ridgway *et al.* (1996) dieses Konzept auf Antikörper, um eine die Heterodimerisierung favorisierende CH₃-Grenzfläche zu erzeugen. Dabei wurden kleinere Seitenketten in der einen CH₃-Domäne gegen größere als *Knob* ausgetauscht, während in der anderen Domäne durch Austausch großer gegen kleine Seitenketten ein künstliches *Hole* geschaffen wurde. Als Modellsystem wurden das CD4-IgG-Immunchäsins und ein humanisierter anti-CD3-Antikörper gewählt, wobei die Mutagenese an der Dimerengrenzfläche der beiden aneinandergelagerten antiparallelen β -Faltblätter der CH₃-Domänen durchgeführt wurde. Dabei ermöglichten die reziproken Substitutionen Y407T (*Hole*-Mutante) und T366Y (*Knob*-Variante) unabhängig von ihrer Platzierung auf dem Antikörper oder dem Chäsins bei Koexpression beider Polypeptide eine Ausbeute von ca. 92 % an gewünschtem Heterodimer. Die *Knob-into-Hole*-Strategie löste also das Problem der Heteroassoziation der schweren Ketten durch steuernde Seitenkettenpackung besonders effizient. Deshalb wird dieses Konzept bis heute bei der industriellen Herstellung

von bispezifischen Antikörpern gegen mannigfaltige Zielstrukturen angewandt (Chen *et al.*, 2014; Brinkmann & Kontermann, 2017). Zur Stabilisierung der Heterodimerisierung von bispezifischen PTE-Varianten bot sich diese Methodik allerdings nicht an, da sich der begrabene Teil der PTE-Dimer Grenzfläche nah am aktiven Zentrum befindet, was einen ungünstigen Einfluss auf die enzymatische Aktivität erwarten ließ.

Die Strategie des sog. *Electrostatic Steering*, die erstmals zum Design von heterodimeren *Coiled-Coils* verwendet wurde (O'Shea *et al.*, 1993), beruht auf der Einführung gegenteilig geladener Reste an der Dimer Grenzfläche entweder durch Erzeugung zusätzlicher Salzbrücken oder durch Umkehr der Polarität existierender Salzbrücken. Auch zur Stabilisierung der Heteroassoziation schwerer Ketten in bispezifischen Antikörpern wurde die *Electrostatic-Steering*-Strategie untersucht (Gunasekaran *et al.*, 2010). Um die relativen Ausbeuten der Fc-Hetero- bzw. Homodimere beurteilen zu können, wurden für die Experimente ein Fc-Fragment und eine scFv-Fc-Fusion koexprimiert. Die entstandenen Proteinspezies konnten anschließend mittels nicht reduzierender SDS-PAGE aufgrund der signifikanten Größenunterschiede identifiziert werden. Durch Einführung der Mutationen K409D und D399*K wurde die Polarität einer Kopie des symmetrischen Salzbrückenpaares innerhalb der CH3/CH3-Grenzfläche umgekehrt. Aufgrund der daraus resultierenden elektrostatischen Abstoßung bei Homodimerisierung wurde die Heteroassoziation der Fc-Regionen begünstigt. Dabei wurde bei der besten erhaltenen Variante, bei der die Polarität von Kopien zweier Salzbrücken umgekehrt wurde (K409D,D399K / D399*K,E356*K), die Homoassoziation nahezu vollständig unterdrückt.

Ähnlich dem Problem bei der Konstruktion von bispezifischen Antikörpern, wiesen alle in dieser Arbeit dargestellten scPTE-Varianten unabhängig der Linkerlänge einen hohen unerwünschten Anteil an intermolekular assoziierten Spezies auf. Da die PTE an der Dimer Grenzfläche zwei Salzbrücken aufweist (Benning *et al.*, 2001), stellte die Herangehensweise des *Electrostatic Steering* zur Stabilisierung der intramolekularen Heterodimerisierung der scPTE die Strategie der Wahl dar. So erwies sich vor allem die Umkehrung einer Kopie des exponierten Salzbrückenpaares als besonders erfolgreich. Die Kombination R152E/E71K begünstigte die intramolekulare Interaktion bzw. Heterodimerisierung, ohne negativen Einfluss auf die katalytische Effizienz zu haben. Erwartungsgemäß erwiesen sich die steuernden Mutationen vor allem für die Bildung des zweikettigen bispezifischen Enzyms (z. B. hdPTE*) als essentiell. Die Ergebnisse zeigen, dass die beim Antikörper-Engineering bewährte Methodik zur Stabilisierung der Heterodimerisierung auch auf oligomere Biokatalysatoren angewendet werden kann.

Im Fall von bispezifischen *Diabodies* werden zwei Polypeptide, die jeweils entweder beide V_H-Domänen oder beide V_L-Domänen enthalten, koexprimiert. Dies kann zu nicht funktionellen intramolekular assoziierten Spezies führen (Brinkmann & Kontermann, 2017). Ein

Lösungsansatz besteht in der Einführung einer interchenaren Disulfidbrücke zwischen einem der V_H - V_L -Paare, um die korrekte intermolekulare Anordnung zu stabilisieren (FitzGerald *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997). Die geeigneten Positionen in konservierten Regionen der V_H/V_L -Grenzfläche zur Einführung einer solchen Disulfidbrücke wurden in früheren Arbeiten bestimmt (Brinkmann *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1996). Demnach gestatten vor allem die Positionen 44 der V_H - und 100 der V_L -Domäne oder die Positionen 105 in V_H und 43 in V_L eine Mutation zu Cysteinresten (Nummerierung nach Kabat *et al.* (1991)). Aufgrund der Pseudo-C2-Symmetrie des V_H/V_L -Heterodimers gibt es an der Grenzfläche keine perfekt symmetrisch angeordneten Positionspaare (Brinkmann *et al.*, 1993). Die so stabilisierten bispezifischen *Diabodies*, Fv-Fragmente oder scFv-Fragmente zeigten sowohl höhere Stabilität als auch verbesserte Ausbeute des jeweiligen gewünschten Produkts (Michaelson *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 1997; Brinkmann *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1996). Die gleiche Strategie wurde hier auf die scPTE(PAS100)-Variante übertragen, wobei die Positionspaare für den Cysteinaustausch durch den *Disulfide by Design 2*-Algorithmus (Craig & Dombkowski, 2013) vorhergesagt wurden und aufgrund der C2-Symmetrie der PTE-Mutanten immer doppelt auftraten. Die so gewonnenen Disulfid-scPTE-Varianten (s. Kapitel 3.3.2.2 und 3.3.3) wiesen zwar kein verbreitertes Substratspektrum auf, allerdings eine erhöhte thermische Stabilität.

Bei der Untersuchung mittels CD-Spektroskopie zeigten die scPTE-Varianten eine Schmelzkurve mit einem einstufigen Übergang ohne Intermediat. In der Arbeit von Wörn & Plückthun (1999) wurden scFvs mittels chemischer Denaturierung auf ihre Stabilität hin untersucht und daraufhin in vier verschiedene Klassen eingeordnet, wobei die scFvs der Klasse II einen den scPTE-Varianten ähnliches Verhalten zeigten. Bei diesen bewegt sich die intrinsische Stabilität der einen Domäne im gleichen Rahmen wie die Summe der intrinsischen und extrinsischen Stabilität, welche durch die Wechselwirkungen an der V_H/V_L -Grenzfläche bestimmt wird, der anderen Domäne. Das bedeutet, dass die Ausbildung einer Grenzfläche die Gesamtstabilität der intrinsisch instabileren Domäne auf fast das gleiche Niveau wie die der stabileren scFv-Domäne anhebt. Im Einklang damit zeigten auch die Varianten scPTE(PAS100) und scPTE*(PAS100) eine dem stabileren parentalen Enzym 10-2-C3(I106A) ähnliche T_m von ca. 69 °C. Im Vergleich dazu wies die isolierte instabilere Untereinheit 10-2-C3 eine Schmelztemperatur von nur 65,3 °C auf.

Bei scFv-Fragmente, die aus Untereinheiten von sich stark unterscheidender Stabilität bestehen, würden zwei Übergänge in der Entfaltungskurve erwartet werden (Wörn & Plückthun, 1999). Entgegen dem zeigte die Variante hdPTE*(PAS100), die aus 10-2-C3(106A) und einer deutlich stabileren OpdA-Variante besteht, nur einen einstufigen Übergang ohne Intermediat, welches eine intakte und eine entfaltete Domäne aufweist. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Wechselwirkungen an der Dimergrenzfläche bei der hdPTE-Variante einen wichtigen Beitrag zur Gesamtstabilität leisten oder die kovalente Verknüpfung der beiden Domänen die Bildung

eines Intermediates verhindert. Dagegen zeigte die zweikettige Variante hdPTE* im Einklang mit der oben beschriebenen Erwartung zwei Übergänge

Diese Arbeit beweist, dass die künstliche Erzeugung heterodimerer Biokatalysatoren durch rationales Protein-*Engineering* elegant gesteuert werden kann. So sorgten die eingeführten Mutationen bei erfolgreichem *Design* für eine effiziente Erhöhung der Ausbeute ohne Beeinflussung der enzymatischen Aktivität des bispezifischen Biokatalysators.

4.3 Das Potential hochaktiver Biokatalysatoren hinsichtlich pharmazeutischer Produktion und therapeutischen Einsatzes

Enzyme werden aufgrund ihrer Fähigkeit, Substrate mit hoher Spezifität und katalytischer Effizienz in das gewünschte Produkt umzuwandeln, nicht nur zur industriellen Herstellung von Feinchemikalien sondern auch als biologische Wirkstoffe verwendet. Dabei werden Enzyme hauptsächlich in der Ersatztherapie bei seltenen durch verschiedene Enzymdefekte ausgelösten lysosomalen Speicherkrankheiten, zur Behandlung von Krebserkrankungen oder Zystischer Fibrose sowie zur Auflösung von Blutgerinnseln eingesetzt (Yari *et al.*, 2017). Das Enzym L-Asparaginase, das die Hydrolyse von L-Asparagin zu Aspartat und Ammoniak katalysiert, zählt bei der Behandlung akuter lymphatischer Leukämie zur Standardtherapie. Dabei baut es das im Blut zirkulierende L-Asparagin ab, das die entarteten Zellen für die Aufrechterhaltung ihrer Proteinbiosynthese bei schneller Zellteilung benötigen (Pieters *et al.*, 2008; Baldo, 2015). Weiterhin wird rekombinant hergestellter *Tissue Plasminogen Activators* als Serinprotease zur Fibrinolyse von Blutgerinnseln eingesetzt, wobei die Aktivierung von Plasminogen zu Fibrin abbauendem Plasmin katalysiert wird (Ny *et al.*, 1984; Collen & Lijnen, 2009; Baldo, 2015). Diese Beispiele unterstreichen, dass rekombinante Enzyme in der modernen medizinischen Versorgung angekommen sind und erfolgreich in Standardtherapien eingesetzt werden.

Neben ihrem Einsatz bei Erkrankungen können Enzyme als Antidot bei Vergiftungen verwendet werden. So wurden in der Vergangenheit große Bemühungen zur Entwicklung eines *Bioscavengers* für die effiziente stöchiometrische oder katalytische Inaktivierung von OP-Nervenkampfstoffen wie auch OP-Pestiziden unternommen. Im Jahr 2009 führte die Firma Baxter *Healthcare* eine erfolgreiche Phase I-Studie zur Verträglichkeit, Sicherheit und Pharmakokinetik (NCT: 00333528) mit dem löslichen stöchiometrischen *Scavenger* huBChE durch. Weiterhin sind hochaktive Mutanten der bakteriellen BdPTE als katalytische *Bioscavenger* in den Fokus der Forschung gerückt (Goldsmith *et al.*, 2017; Goldsmith *et al.*, 2016; Khersonsky *et al.*, 2018; Bigley *et al.*, 2015; Bigley *et al.*, 2013). Um jedoch deren Spezialisierung auf wenige OPs entgegenzuwirken, wurde deshalb der Einsatz von Mischungen aus verschiedenen PTE-Varianten vorgeschlagen (Despotovic *et al.*, 2019). Dabei wurden die zuvor entwickelten homodimeren BdPTE-Varianten IVA1 (Goldsmith *et al.*, 2017), 10-2-C3 (Goldsmith *et al.*, 2017) und R2#16 (Khersonsky *et al.*, 2018) separat produziert, gereinigt und

anschließend in einem bestimmten Verhältnis vermischt, um die effiziente Hydrolyse der unterschiedlichen Nervenkampfstoffe RVX, GA, GB, GF, VX und GD zu gewährleisten.

Für eine regulatorische Zulassung einer solchen Enzymmischung müssten die einzelnen Protein-Komponenten jedoch separat gemäß GMP-Richtlinien hergestellt und in klinischen Studien validiert werden, weshalb eine solche Herangehensweise vermutlich äußerst kostenintensiv ist (Lagasse *et al.*, 2017). Dies ist besonders bei Enzymen wie z. B. der BdPTE und OpdA mit ihren unterschiedlichen Substratspezifitäten der Fall, denn aufgrund der signifikanten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen zeigen diese Enzyme verschiedene physikochemische Eigenschaften, die jeweils einen eigens entwickelten Herstellungsprozess mitsamt bioanalytischer Charakterisierung erfordern. Aus diesen Gründen stellt die in dieser Arbeit gezeigte Strategie zur Generierung stabilisierter bispezifischer Enzyme eine elegante Lösung für die Breitband-Detoxifizierung von OP-Verbindungen durch einen wohldefinierten Proteinwirkstoff dar.

Neben einem breiten Substratprofil ist für den Einsatz von bakteriellen Enzymen als katalytische *Bioscavenger* wichtig, dass diese möglichst lange im Blutkreislauf zirkulieren und trotz ihrer heterologen Natur auch nach mehrfacher Gabe keine Immunantwort auslösen. Novikov *et al.* (2010) modifizierten die BdPTE mit Polyethylenglykol (PEG) verschiedener Länge mittels der freien Lysin-Seitenketten an der Proteinoberfläche (Abuchowski *et al.*, 1977). Die PEGylierten Enzyme zeigten in Experimenten mit Meerschweinchen eine durch die vergrößerten hydrodynamischen Volumina verzögerte renale Filtration mit einer Verweildauer von 50 h (vgl. unmodifizierte PTE: 1 h) und nahezu keine Immunreaktion (Novikov *et al.*, 2010). Dennoch bringt dieser Ansatz essentielle Nachteile mit sich: Die PEGylierungsreaktion läuft nicht ortsspezifisch ab, sodass am Ende eine aufwendig zu analysierende polydisperse Proteinpräparation vorliegt (Dozier & Distefano, 2015). Obwohl PEG-Polymere als GRAS (*generally recognized as safe*)-Substanzen gelten (Strohl, 2015), führt eine fortgesetzte Exposition aufgrund der enzymatisch nicht abbaubaren Etherbindung zu einer Anhäufung von PEG-Polymeren im Gewebe und letztlich zur Vakuolisierung (Bendele *et al.*, 1998). Weiterhin gibt es bereits Hinweise auf eine Bildung von Anti-PEG-Antikörpern bei mit PEGylierten Proteinen behandelten Patienten (Garay *et al.*, 2012). Eine weitere Strategie, die Plasma-Halbwertszeit und Immuntoleranz von PTEs zu verbessern, stellt die sog. Verkapselung des Enzyms in einem *Nanocarrier*, wie z.B. einem zwitterionischen Polymer, dar (Zhang *et al.*, 2019). Ein solcher *Nanoscavenger* zeigte in der Ratte anhaltende Schutzwirkung vor dem Nervenkampfstoff Sarin mit einer verbesserten Pharmakokinetik bei vernachlässigbarer Aktivierung des Immunsystems. Allerdings ist die komplette Versiegelung solcher *Nanocontainer* aufwendig, damit kein Austritt von Enzymmolekülen stattfindet (Gupta, 2020).

In dieser Arbeit wurde die *PASylation*-Technologie (Schlapschy *et al.*, 2013) als biologische Alternative zur PEGylierung sowohl für die Vergrößerung des hydrodynamischen Radius als

auch die genetische Verknüpfung von zwei Enzymuntereinheiten erfolgreich eingesetzt. Die genetische Fusion eines PAS(200)-Anhängsels mit dem C-Terminus einer scPTE führte zusammen mit dem PAS(100)-Linker zu einer Vergrößerung der apparenten Molmasse um den Faktor 2,5. Die so erreichte apparente Masse von 254 kDa liegt weit über der in der Literatur angegebenen Ausschlussgröße von 60 – 70 kDa bei der glomerulären Filtration (Knauf *et al.*, 1988), wobei die *PASylation* keine der oben genannten Nachteile der PEGylierung aufweist (Schlapschy *et al.*, 2013). Weiterhin kann ein solcher PASylierter *Scavenger* verglichen mit dem *Nanoscavenger* aufgrund der genetischen Fusion biotechnologisch hergestellt werden. Die durchgeführten Experimente zeigen neben dem modularen Charakter des scPTE-Formats, dass durch Fermentation scPTEs mit verlängerter Halbwertszeit in einem für Tierversuche ausreichender Quantität hergestellt werden können.

4.4 Weitere biotechnologische Anwendungsgebiete OP-abbauender Bakterien und Enzyme

Die weitverbreitete landwirtschaftliche Nutzung von OP-Pestiziden führt durch die damit verbundene Belastung des Bodens und Grundwassers zu erheblichen Umweltschäden (Mulla *et al.*, 2020). So stieg allein in Indien die Insektizidnutzung in den Jahren 2008 bis 2010 von 3.000 auf ca. 21.000 Tonnen (Mew *et al.*, 2017). Zudem stellen Altlager von militärisch nutzbaren OP-Kampfstoffen nicht nur eine Gefahr für die Öffentlichkeit durch Missbrauch (Elsinghorst *et al.*, 2013) sondern auch eine große ökologische Herausforderung dar. So gilt der Kampfstoff VX als in der Umgebung persistierend, sodass dieser nach Einsatz großflächige Gebiete gänzlich unzugänglich macht (*Terrain Denial Military Compound*) (Gupta, 2020).

Die Dekontamination großer Flächen erfolgt normalerweise durch den Einsatz von Natriumhypochlorit oder Natronlauge, sodass die OP-Verbindungen durch Oxidation oder alkalische Hydrolyse neutralisiert werden (Jacquet *et al.*, 2016). Größere OP-Vorratslager werden durch einen zweistufigen Verbrennungsvorgang bei Temperaturen von über 1000 °C zerstört. Die dabei entstehenden sauren Abgase müssen zudem mit Natriumhydroxid und Wasser neutralisiert werden, um eine unschädliche Abluft garantieren zu können (Pearson & Magee, 2002). Diese Methoden sind jedoch aufgrund der harschen Bedingungen für die Dekontamination von Personen, sensitiven Materialien oder landwirtschaftlichen Nutzflächen ungeeignet. Demgegenüber stellt die biologische Sanierung (Bioremediation), die zur Entgiftung von Ökosystemen den Einsatz von Mikroorganismen oder Enzymen nutzt, eine umweltfreundliche und mitunter kostengünstige Möglichkeit des OP-Abbaus dar (Smith & Smith, 2009). Von Mulbry *et al.* (1998) wurde zum ersten Mal die erfolgreiche Entgiftung von mit OPs kontaminiertem Abfall in industriellem Maßstab durch ein nicht näher beschriebenes symbiotisch lebendes Konsortium von OP abbauenden Mikroorganismen mit Hilfe eines Filter-Bioreaktors beschrieben. Dabei wurde 15.000 Liter Coumaphos, ein OP-Insektizid zur

Bekämpfung von Rinderzecken, effizient abgebaut. Allerdings ist die Nutzung von lebenden bakteriellen Konsortien zur Bioremediation mit praktischen Herausforderungen verbunden. Die Induktion und Regulierung der katabolischen Mechanismen sind unter natürlichen Bedingungen nicht ausreichend untersucht (Singh, 2009). Weiterhin ist noch wenig über die Interaktionen innerhalb solcher bakterieller Konsortien bekannt. Auch die benötigte Zusammensetzung des Nährmediums, die Verfügbarkeit von Starterkulturen oder der Sauerstoffverbrauch sind schwer fassbare Faktoren (Jeffrey *et al.*, 1998).

Mit der Verbesserung der biotechnologischen Produktion von Proteinen hat die Nutzung von rekombinant hergestellten Enzymen als „grüne Lösung“ in der Bioremediation deutlich zugenommen (Singh, 2009). Das von den australischen Behörden CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization*) und der Firma Ocira entwickelte und kommerziell vermarktete Produkt *Landguard*TM enthält je nach Ausführung die OpdA als Wildtypenzym oder Form der Mutante A900, die mit verbesserter Aktivität gegenüber dem Pestizid Chlorpyrifos-methyl aufweist (Scott *et al.*, 2011; Sutherland *et al.*, 2004) und die rational geplanten Aminosäuresubstitutionen Ala52Val, Ser64Ala, Lys157Arg, Asp204Glu und Asn237Asp trägt. *Landguard*TM reduziert den OP-Gehalt von landwirtschaftlichem oder industriellem Abwasser signifikant, was den Nutzen von rekombinant hergestellten Enzymen zur großflächigen Dekontamination von belasteten Quellen veranschaulicht (Thakur *et al.*, 2019). Weitergehend versuchte die mit CSIRO assoziierte Forschungsgruppe um Gao *et al.* (2014) den ökologischen Einsatz der OpdA durch Immobilisierung auf Polyester-Textilien zu verbessern. Durch Aktivierung des Polyesters mit Ethylendiamin wurde das Enzym seine exponierten Lysinseitenketten unter Verwendung des *Crosslinkers* Glutaraldehyd kovalent gebunden. Das immobilisierte Enzym zeigte auch bei geringer Konzentration von OP-Pestiziden gute Aktivität in ungepufferten Lösungen sowie Wiederverwendbarkeit in kontinuierlichen oder *Batch*-Verfahren. Die erleichterte Rückgewinnung des heterogenen Biokatalysators senkt zudem anfallende Kosten (Gao *et al.*, 2014). Einen weiteren Lösungsansatz zur biologischen Sanierung stellt die Phytodegradierung von OP-Verbindungen dar. Dazu wurden transgene Tabakpflanzen hergestellt, die die bakterielle Phosphotriesterase Ophc2 exprimieren und sekretieren, woraufhin diese das ausgebrachte Pestizid Methylparathion nahezu vollständig abbauten (Wang *et al.*, 2008). Diese kostengünstige und effektive Herangehensweise ist jedoch durch die strengen regulatorischen Richtlinien der meisten Staaten bezüglich der Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt stark beschränkt und stellt deshalb keine allgemein praktikable Option zur Bioremediation dar (Singh, 2009).

Abgesehen von der pharmazeutischen Anwendung von *Bioscavengern* wurden zum Schutz von Soldaten bei militärischen Operationen Methoden zur Dekontaminierung der Haut entwickelt (Gordon *et al.*, 2006; Gupta, 2020). Dazu wurde ein Polyurethanschwamm aus hydrophilen Urethanpräpolymeren hergestellt und verschiedene OP abbauende oder bindende Enzyme, wie

die BChE oder PTE und deren Varianten, kovalent in der netzartigen Struktur unter Nutzung von Hydroxyl- oder Aminogruppen der Aminosäureseitenketten immobilisiert. Zusätzlich enthielt der Schwamm reaktivierende Substanzen wie Oxime. Aufgrund des hydrophilen Charakters konnte der mit Enzymen ausgestattete Schwamm keine Organophosphate aufnehmen, sodass das Additiv Tetraethylenglycoldimethylether benötigt wurde. Weiterhin macht die rapide Penetration der Haut durch OP-Kampfstoffe eine Behandlung mit einem dekontaminierenden Schwamm bei starker Exposition gegenüber V-Kampfstoffen eher unpraktikabel (Gupta, 2020).

PTEs wurden auch zur Entwicklung von Biosensoren für den Nachweis von OP-Kontaminationen verwendet, wobei hauptsächlich zwei Detektionsmethoden zur Verfolgung der Entstehung von Hydrolyseprodukten zum Einsatz kamen. Einerseits wurde mittels Potentiometrie die lokale pH-Veränderung gemessen und andererseits wurde die Entstehung von elektrolytischen Reaktionsprodukten amperometrisch bestimmt (Singh, 2009). Beide Methoden wurden innerhalb eines Sensors kombiniert, sodass durch Potentiometrie das gesamte Spektrum an OPs nachgewiesen werden konnte und die amperometrische Messung eine grobe Klassifizierung des jeweiligen OPs ermöglichte (Wang *et al.*, 2002). Bei moderneren Biosensoren wird das Enzym durch unspezifische Bindung auf Carbon-Nanotubes immobilisiert, sodass die Hydrolyse von OPs eine elektronisch detektierbare Änderung der Leitfähigkeit des Nanotubes auslöst (Liu *et al.*, 2007).

Die in dieser Arbeit hergestellten bispezifischen Enzyme erscheinen für andere biotechnologische Anwendungen neben der pharmazeutischen Applikation geeignet. So sind gerade im Bereich der Bioremediation mit freien Enzymen (wie *Landguard*TM) oder auch bei der Biosensorenteknik einfach herzustellende und auch gut definierte Proteine nötig, die durch Erkennung eines breiten Spektrums an OPs vielseitig einsetzbar sind. Da auch die Proteinstabilität in solchen Anwendungen eine Rolle spielt, weniger als eine hohe katalytische Effizienz, erscheinen diesbezüglich auch die disulfidverbrückten thermostabilen scPTEs von Interesse.

Durch Übertragung des Konzeptes bispezifischer Antikörper auf Biokatalysatoren wurden bispezifische Enzyme durch Ausnutzen der homodimeren Quartärstruktur von bakteriellen Phosphotriesterasen (PTE) generiert. Verschiedene PTE-Untereinheiten aus *B. Diminuta* sowie *A. radiobacter* wurden erfolgreich kombiniert und deren Heterodimerisierung durch gezieltes Protein-Engineering stabilisiert. Der resultierende Bioscavenger aus PTEs verschiedenen bakteriellen Ursprungs wies ein stark verbreitetes Substratprofil gegenüber OP-Kampfstoffen oder/und -Pestiziden auf.

5 Zusammenfassung

Organophosphatverbindungen (OPs) stellen eine große toxikologische Gefahr aufgrund terroristisch motivierten Missbrauchs und durch den immernoch weit verbreiteten Gebrauch von OP-Pestiziden in der Landwirtschaft dar. OPs entfalten durch die effiziente Inhibierung der für eine physiologische Nervensignalübertragung wichtigen Acetylcholinesterase ihr äußerst tödliches Potential und fordern jährlich mehr als 100.000 Todesopfer. Da die aktuelle Standardtherapie mit niedermolekularen Oximen deutliche Einschränkungen aufweist, erfahren hocheffiziente OP abbauende Enzyme als katalytische *Bioscavenger* große Aufmerksamkeit.

Zur Identifizierung eines geeigneten *Bioscavengers* wurden die Phosphotriesterase aus *B. diminuta* (BdPTE), OpdA aus *A. radiobacter*, Ophc2 aus *P. pseudoalcaligenes*, OpaA aus *Altermonas sp.* und CotA aus *B. subtilis* bezüglich der Umsetzung verschiedener OPs verglichen. Dabei zeigte die BdPTE solide Aktivität gegenüber den OP-Kampfstoffen VX, CVX und GB, wohingegen eine mutierte OpdA mit den Austauschungen S308L und Y309A, OpdA(LA), OP-Pestizide wie Malaoxon und Mevinphos bevorzugte. Neben den genannten Enzymen wiesen auch die literaturbekannten und weitgehend gegenüber OP-Kampfstoffen optimierten Varianten der BdPTE 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) eine beschränkte Substratspezifität auf und präferierten trotz minimaler Sequenzunterschiede unterschiedliche OPs. So wäre für eine Behandlung von OP-Vergiftungen der Einsatz einer Enzymmischung nötig, was die biopharmazeutische Herstellung deutlich komplizierter gestalten würde.

Angelehnt an das Konzept des *Engineerings* bispezifischer Antikörper wurden *Bioscavengers* mit breitem Substratprofil gegenüber Nervenkampfstoffen konstruiert. Durch Ausnutzen der homodimeren Quartärstruktur bakterieller PTEs wurden heterodimere *Single-Chain* PTEs (scPTEs) aus den BdPTE-Varianten 10-2-C3 und 10-2-C3(I106A) erzeugt. Dafür wurden die C- und N-Termini der Untereinheiten durch unterschiedlich lange und flexible PAS-Linker kovalent verbunden (40, 100 und 200 Aminosäuren). Durch die Kombination der zwei unterschiedlichen aktiven Zentren wurden die besten Aktivitäten der parentalen BdPTE-Varianten vereinigt. Die bispezifischen Enzyme bauten die OP-Kampfstoffe VX, VR, GB und GF mit einer katalytischen Effizienz von mindestens $1,5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ab. Zwar hatte die Länge des Linkers keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, aber wie bei scFv-Fragmenten auf das Oligomerisierungsverhalten der scPTE-Varianten. Der relative Anteil an gewünschtem intramolekularem Heterodimer nahm im Vergleich zu den intermolekularen Spezies bei Verlängerung des Linkers zu, sodass dieser bei der scPTE(PAS40) 15 %, der scPTE(PAS100) 33 % und der Variante mit PAS200-Linker 50 % ausmachte.

Zur Stabilisierung der Heterodimerisierung der scPTE(PAS100) wurden Mutationen nach dem Prinzip des *Electrostatic Steering* eingeführt. Dabei wurde die Polarität einer Kopie eines aufgrund der C2-Symmetrie vorliegenden Salzbrückenpaares, E71-R152* und R152-E71*, an der Dimer Grenzfläche umgekehrt, um eine Homodimerisierung durch elektrostatische

Abstoßung zu unterdrücken. Die Position des Rests auf der 10-2-C3(I106A)-Untereinheit ist durch einen Stern markiert. Bei Untersuchung verschiedener Kombinationen aus E71R, K und R152E, D zur Umkehrung der Polarität führten die Austausche R152E/E71*K der als scPTE*(PAS100) benannten Variante fast ausschließlich zur Bildung des gewünschten intramolekularen Heterodimers. Dadurch konnte die Proteinausbeute bei der Produktion in einer 2 l Kultur um den Faktor 10 auf 1,9 mg gesteigert werden. Gleichzeitig wurde die Aktivität gegenüber den Kampfstoffen VX, VR, GB und GF höchstens um den Faktor 2 im Vergleich zur ursprünglichen scPTE(PAS100) vermindert. Dagegen beeinträchtigte die Einführung einer intramolekularen Disulfidbrücke zur Stabilisierung der Heterodimerisierung an der Dimergrenzfläche der scPTE(PAS100) die enzymatische Aktivität derart, dass eine Kombination der Substratpräferenzen nicht gewährleistet war. Allerdings erhöhte diese erwartungsgemäß die thermische Stabilität von 69,8 °C auf 83,8 °C.

Mittels *PASylation*-Technologie wurde die potentielle Plasma-Halbwertszeit einer aus den BdPTE-Untereinheiten C23 und 10-2-C3(I106A) bestehenden, ebenfalls durch die Mutationen R152E/E71*K stabilisierten scPTE(PAS100)-Variante verlängert. So wurde das hydrodynamische Volumen durch C-terminale Fusion eines PAS(200)-Anhängsels um den Faktor 2,5 vergrößert, wobei die katalytische Aktivität nicht beeinträchtigt wurde. Zudem wurde die PASylierte Variante erfolgreich in einem für Tierversuche relevanten Maßstab fermentiert.

Angetrieben durch die gewonnenen Erkenntnisse wurde ein chimärer Breitband-*Bioscavenger* für den Abbau von OP-Kampfstoffen und Pestiziden bestehend aus PTEs unterschiedlichen bakteriellen Ursprungs erstellt. Als parentale Enzyme wurden die homologen Untereinheiten der BdPTE 10-2-C3(I106A) und OpdA(LA) eingesetzt. Erst die Positionierung der steuernden Mutationen R152*E auf 10-2-C3(I106A) und E71K auf OpdA(LA) sowie die Einführung der in der Literatur beschriebenen stabilisierenden Mutationen A80V und K185R in die OpdA(LA)-Untereinheit führten zu einer stabilen Bildung des Heterodimers. Sowohl die erhaltene einkettige hdPTE*(PAS100) als auch die zweikettige Variante hdPTE* mit quasi-nativer Quartärstruktur kombinierten die komplementären Substratprofile ihrer parentalen Enzyme und bauten ein beispiellos breites Spektrum an Kampfstoffen und Pestiziden ab. So wurde der Kampfstoff VR 3300-mal und das Pestizid Malaoxon 1200-mal schneller durch das bispezifische Enzym als durch das jeweilige langsamere homodimere Parentalenzym abgebaut.

Das in dieser Arbeit dargestellte *Engineering* bispezifischer Enzyme bietet eine elegante Lösung und vor allem rentable Herangehensweise für die Breitband-Detoxifizierung von OPs durch eine wohldefinierte biokatalytische Einheit. Weiterhin könnte die entwickelte Strategie zur Kombinierung zweier aktiver Zentren mit unterschiedlichen Substratpräferenzen auf Oligomere mit anderen katalytischen Eigenschaften anwendbar sein.

6 Abkürzungsverzeichnis

Θ_M	Molare Elliptizität
Θ_{obs}	Gemessene Elliptizität
AChE	Acetylcholinesterase
ADH	Alkoholdehydrogenase
AEX	Anionenaustauschchromatographie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
aTc	Anhydrotetracyclin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BChE	Butyrylcholinesterase
BdPTE	Phosphotriesterase aus <i>Brevundimonas diminuta</i>
bla	Gen der β -Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin
bsAk	Bispezifischer Antikörper
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CotA	Laccase aus <i>Bacillus subtilis</i>
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin 5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin 5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
fl-IG	Intergenische Region des Bakteriophagen fl
Fc	<i>Fragment Crystallizable Region</i>
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
hdPTE	Heterodimere Phosphotriesterase bestehend aus den Untereinheiten von BdPTE und OpdA
hu	Präfix für human
kb	Kilobasen
k_{cat}	Wechselzahl

kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis/Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani
M_{kalk}	Kalkulierte molare Masse
M_w	Molare Masse
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (Ausschlussgrenze)
OD_x	Optische Dichte bei Wellenlänge x
OP	Organophosphat
OpaA	Organophosphatanhydrolase aus <i>Alteromonas sp.</i>
OpdA	Phosphotriesterase aus <i>Agrobacterium radiobacter</i>
Ophc2	Aryldiäkylphosphatase aus <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Polypeptid aus repetitiven Abfolgen der Aminosäuren Prolin, Alanin und Serin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PTE	Phosphotriesterase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAC	Streptavidinaffinitätschromatographie
scFv	<i>Single-chain</i> Fv-Antikörperfragmente
scPTE	<i>Single-chain</i> Phosphotriesterase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
<i>Strep</i> -tag	Streptavidinaffinitätsanhängsel
TB	<i>Terrific Broth</i>
$tet^{p/o}$	Tetracyclin Promotor/Operator
tetR	Tetracyclin-Repressor
t_{pp}	Lipoprotein-Transkriptionsterminator
v/v	Volumenprozent
V_0	Durchbruchvolumen einer SEC-Säule
V_L	Variable Domäne der leichten Kette
V_H	Variable Domäne der schweren Kette

V_t	Bettvolumen einer SEC-Säule
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient

7 Literaturverzeichnis

- Abuchowski, A., McCoy, J.R., Palczuk, N.C., van Es, T. & Davis, F.F. (1977) Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* 252, 3582-3586.
- Aker, W.G., Hu, X., Wang, P. & Hwang, H.M. (2008) Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus*. *Environ. Toxicol.* 23, 548-554.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D. & Hadar, Y. (1998) Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *F. E. B. S. Lett.* 438, 195-200.
- 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-D119.
- Arndt, K.M., Müller, K.M. & Plückthun, A. (1998) Factors Influencing the Dimer to Monomer Transition of an Antibody Single-Chain Fv Fragment. *Biochemistry* 37, 12918-12926.
- 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. & Pistinner, S. (2004) Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. *Toxicol. Sci.* 77, 358-367.
- Atwell, J.L., Breheney, K.A., Lawrence, L.J., McCoy, A.J., Kortt, A.A. & Hudson, P.J. (1999) scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between VH and VL domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng.* 12, 597-604.
- Bajgar, J., Fusek, J., Kuca, K., Bartosova, L. & Jun, D. (2007) Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini-Rev. Med. Chem.* 7, 461-466.
- Baldo, B.A. (2015) Enzymes Approved for Human Therapy: Indications, Mechanisms and Adverse Effects. *BioDrugs* 29, 31-55.
- Banerjee, I., Tripathi, S.K. & Roy, A.S. (2014) Efficacy of pralidoxime in organophosphorus poisoning: revisiting the controversy in Indian setting. *J. Postgrad. Med.* 60, 27-30.
- Bendele, A., Seely, J., Richey, C., Sennello, G. & Shopp, G. (1998) Short Communication: Renal Tubular Vacuolation in Animals Treated with Polyethylene-Glycol-Conjugated Proteins. *Toxicol. Sci.* 42, 152-157.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, 423-426.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Breibeck, J. & Skerra, A. (2018) The polypeptide biophysics of proline/alanine-rich sequences (PAS): Recombinant biopolymers with PEG-like properties. *Biopolymers* 109.
- Brinkmann, U. & Kontermann, R.E. (2017) The making of bispecific antibodies. *MAbs* 9, 182-212.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S.H., Lee, B. & Pastan, I. (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 7538-7542.
- Bullock, W.O.e.a. (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5, 376-379.
- Butrow, A.B., Buchanan, J.H. & Tevault, D.E. (2009) Vapor Pressure of Organophosphorus Nerve Agent Simulant Compounds. *J. Chem. Eng. Data* 54, 1876-1883.
- Caisberger, F., Pejchal, J., Misik, J., Kassa, J., Valis, M. & Kuca, K. (2018) The benefit of combinations of oximes for the ability of antidotal treatment to counteract sarin-induced brain damage in rats. *B.M.C. Pharmacol. Toxicol.* 19, 35.
- Cannard, K. (2006) The acute treatment of nerve agent exposure. *J. Neurol. Sci.* 249, 86-94.
- Carter, P. (2001) Bispecific human IgG by design. *J. Immunol. Methods* 248, 7-15.
- Chen, C., Zhang, Y., Zhang, Y., Li, J., Tsao, S.W. & Zhang, M.Y. (2014) Superior antitumor activity of a novel bispecific antibody cotargeting human epidermal growth factor receptor 2 and type I insulin-like growth factor receptor. *Mol. Cancer Ther.* 13, 90-100.

- Cheng, T., Liu, L., Wang, B., Wu, J., DeFrank, J.J., Anderson, D.M., Rastogi, V.K. & Hamilton, A.B. (1997) Nucleotide sequence of a gene encoding an organophosphorus nerve agent degrading enzyme from *Alteromonas haloplanktis*. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 18, 49-55.
- Cheng, T.C., DeFrank, J.J. & Rastogi, V.K. (1999) *Alteromonas* prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem-Biol. Interact.* 119-120, 455-462.
- Cheng, T.C., Harvey, S.P. & Chen, G.L. (1996) Cloning and expression of a gene encoding a bacterial enzyme for decontamination of organophosphorus nerve agents and nucleotide sequence of the enzyme. *Appl. Environ. Microb.* 62, 1636-1641.
- 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. *A.C.S. Chem. Biol.* 8, 2394-2403.
- Childs, A.F., Davies, D.R., Green, A.L. & Rutland, J.P. (1955) The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *Brit. J. Pharm. Chemoth.* 10, 462-465.
- Chu, X.Y., Wu, N.F., Deng, M.J., Tian, J., Yao, B. & Fan, Y.L. (2006) Expression of organophosphorus hydrolase OPHC2 in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expres. Purif.* 49, 9-14.
- Cochran, R., Kalisiak, J., Kucukkilinc, T., Radic, Z., Garcia, E., Zhang, L., Ho, K.Y., Amitai, G., Kovarik, Z., Fokin, V.V., Sharpless, K.B. & Taylor, P. (2011) Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging. *J. Biol. Chem.* 286, 29718-29724.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. & Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2110-2114.
- Collen, D. & Lijnen, H.R. (2009) The Tissue-Type Plasminogen Activator Story. *Arterioscl. Throm. Vas.* 29, 1151-1155.
- Conrad, C., Schmitt, J.G., Evguenieva-Hackenberg, E. & Klug, G. (2002) One functional subunit is sufficient for catalytic activity and substrate specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease III artificial heterodimers. *F. E. B. S. Lett.* 518, 93-96.
- Craig, D.B. & Dombkowski, A.A. (2013) Disulfide by Design 2.0: a web-based tool for disulfide engineering in proteins. *B.M.C. Bioinformatics* 14, 346.
- Craig, F.N., Cummings, E.G. & Sim, V.M. (1977) Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX. *J. Invest. Dermatol.* 68, 357-361.
- Crick, F.H.C. (1952) Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* 170, 882-883.
- Crick, F.H.C. (1953) The packing of α -helices: simple coiled-coils. *Acta Crystallogr.* 6, 689-697.

- Croddy, E. & Wirtz, J.J. (2005) *Weapons of mass destruction : an encyclopedia of worldwide policy, technology, and history*, Santa Barbara, Calif., ABC-CLIO.
- Daczkowski, C.M., Pegan, S.D. & Harvey, S.P. (2015) Engineering the Organophosphorus Acid Anhydrolase Enzyme for Increased Catalytic Efficiency and Broadened Stereospecificity on Russian VX. *Biochemistry* 54, 6423-6433.
- DeFrank, J.J. & Cheng, T.C. (1991) Purification and properties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacterial isolate. *J. Bacteriol.* 173, 1938-1943.
- DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. Delano Scientific. Palo Alto, CA, USA.
- Despotovic, 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.* 32, 169-174.
- Dozier, J.K. & Distefano, M.D. (2015) Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 25831-25864.
- Durao, P., Chen, Z., Fernandes, A.T., Hildebrandt, P., Murgida, D.H., Todorovic, S., Pereira, M.M., Melo, E.P. & Martins, L.O. (2008) Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13, 183-193.
- Eddleston, M., Eyer, P., Worek, F., Mohamed, F., Senarathna, L., von Meyer, L., Juszczak, E., Hittarage, A., Azhar, S., Dissanayake, W., Sheriff, M.H.R., Szinicz, L., Dawson, A.H. & Buckley, N.A. (2005) Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *The Lancet* 366, 1452-1459.
- Eddleston, M., Szinicz, L., Eyer, P. & Buckley, N. (2002) Oximes in acute organophosphorus pesticide poisoning: a systematic review of clinical trials. *Qjm-Mon. J. Assoc. Phys.* 95, 275-283.
- Eisenkraft, A., Gilburd, D., Kassirer, M. & Kreiss, Y. (2014) What can we learn on medical preparedness from the use of chemical agents against civilians in syria? *Am. J. Emerg. Med.* 32, 186.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Jr. & Feather-Stone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Elsinghorst, P.W., Worek, F., Thiermann, H. & Wille, T. (2013) Drug development for the management of organophosphorus poisoning. *Expert Opin. Drug Dis.* 8, 1467-1477.
- Ely, F., Hadler, K.S., Gahan, L.R., Guddat, L.W., Ollis, D.L. & Schenk, G. (2010) The organophosphate-degrading enzyme from *Agrobacterium radiobacter* displays mechanistic flexibility for catalysis. *Biochem. J.* 432, 565-573.
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O. & Carrondo, M.A. (2003) Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* 278, 19416-19425.

- Eyer, P. (2003) The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 22, 165-190.
- Eyer, P.A. & Worek, F. (2007) Oximes. *Chemical Warfare Agents*, 305-329.
- FitzGerald, K., Holliger, P. & Winter, G. (1997) Improved tumour targeting by disulphide-stabilised diabodies expressed in *Pichia Pastoris*. *Protein Eng.* 10, 1221-1225.
- 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.
- Gan, K.N., Smolen, A., Eckerson, H.W. & La Du, B.N. (1991) Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab. Dispos.* 19, 100-106.
- Gao, Y., Truong, Y.B., Cacioli, P., Butler, P. & Kyrtziz, I.L. (2014) Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles. *Enzyme Microbial. Technology* 54, 38-44.
- Garay, R.P., El-Gewely, R., Armstrong, J.K., Garratty, G. & Richette, P. (2012) Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin. Drug Del.* 9, 1319-1323.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31, 3784-3788.
- Gill, S.C. & von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- Goldsmith, M., Aggarwal, N., Ashani, Y., Jubran, H., Greisen, P.J., 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.
- Gordon, R.K., Owens, R.R., Askins, L.Y., Baker, K., Ratcliffe, R., Doctor, B., Clarkson, E.D., Schulz, S., Railer, R., Sigler, M., Thomas, E., Ault, K. & Mitcheltree, L.W. (2006) Formulation of polyurethane sponges for chemical, biological and radiological decontamination and detoxification. *The Proceedings of the Medical Defence Bioscience Review Therapeutics*, 43-44.

- Gotthard, G., Hiblot, J., Gonzalez, D., Elias, M. & Chabriere, E. (2013) Structural and enzymatic characterization of the phosphotriesterase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *P. L. o. S. One* 8, e77995.
- Grob, D. (1956) Manifestations and treatment of nerve gas poisoning in man. *U. S. Armed Forces Med. J.* 7, 781-789.
- Gunasekaran, K., Pentony, M., Shen, M., Garrett, L., Forte, C., Woodward, A., Ng, S.B., Born, T., Retter, M., Manchulenko, K., Sweet, H., Foltz, I.N., Wittekind, M. & Yan, W. (2010) Enhancing antibody fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent igg. *J. Biol. Chem.* 285, 19637-19646.
- Gupta, R.C. (2020) *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*, Waltham, Elsevier.
- Güven, M., Sungur, M., Eser, B., Sari, I. & Altuntaş, F. (2004) The effects of fresh frozen plasma on cholinesterase levels and outcomes in patients with organophosphate poisoning. *J. Toxicol. Clin.* 42, 617-623.
- Hobbiger, F. (1963) Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase. IN KOELLE, G. B. (Ed.) *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G. (1993) "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6444-6448.
- Holzwarth, G. & Doty, P. (1965) The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 218-228.
- Horne, I., Sutherland, T.D., Harcourt, R.L., Russell, R.J. & Oakeshott, J.G. (2002) Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an agrobacterium isolate. *Appl. Environ. Microb.* 68, 3371-3376.
- Huang, Y.-J., Huang, Y., Baldassarre, H., Wang, B., Lazaris, A., Leduc, M., Bilodeau, A.S., Bellemare, A., Côté, M., Herskovits, P., Touati, M., Turcotte, C., Valeanu, L., Lemée, N., Wilgus, H., Bégin, I., Bhatia, B., Rao, K., Neveu, N., Brochu, E., Pierson, J., Hockley, D.K., Cerasoli, D.M., Lenz, D.E., Karatzas, C.N. & Langermann, S. (2007) Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 13603.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotný, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Bruccoleri, R.E., Haber, E., Crea, R. & et al. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5879-5883.
- Jackson, C.J., Carr, P.D., Kim, H.K., Liu, J.W., Herral, P., Mitic, N., Schenk, G., Smith, C.A. & Ollis, D.L. (2006) Anomalous scattering analysis of *Agrobacterium radiobacter* phosphotriesterase: the prominent role of iron in the heterobinuclear active site. *Biochem. J.* 397, 501-508.

- Jacquet, P., Daude, D., Bzdrenga, J., Masson, P., Elias, M. & Chabriere, E. (2016) Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: special focus on hyperstable enzymes. *Environ. Sci. Pollut. R.* 23, 8200-8218.
- 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.
- Jeffrey, S.K., Cathleen, J.H., Walter, W.M., Elmer, H.A. & Daniel, R.S. (1998) Biotechnology for the Elimination of Agrochemical Wastes. *Hortscience* 33, 626-631.
- Job, L., Kohler, 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.
- Kabat, E.A., National Institutes of, H. & Columbia, U. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, Bethesda, MD, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health.
- 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.e175.
- Khersonsky, O. & Tawfik, D.S. (2010) Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 471-505.
- Knauf, M.J., Bell, D.P., Hirtzer, P., Luo, Z.P., Young, J.D. & Katre, N.V. (1988) Relationship of effective molecular size to systemic clearance in rats of recombinant interleukin-2 chemically modified with water-soluble polymers. *J Biol Chem* 263, 15064-15070.
- Kohler, G. & Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Kortt, A.A., Lah, M., Oddie, G.W., Gruen, C.L., Burns, J.E., Pearce, L.A., Atwell, J.L., McCoy, A.J., Howlett, G.J., Metzger, D.W., Webster, R.G. & Hudson, P.J. (1997) Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng. Des. Sel.* 10, 423-433.
- Kovarik, Z., Katalinić, M., Šinko, G., Binder, J., Holas, O., Jung, Y.-S., Musilova, L., Jun, D. & Kuča, K. (2010) Pseudo-catalytic scavenging: Searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem-Biol. Interact.* 187, 167-171.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774-797.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A. & Alcalde, M. (2008) Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 10-24.

- La Du, B.N., Adkins, S., Kuo, C.-L. & Lipsig, D. (1993) Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem-Biol. Interact.* 87, 25-34.
- Labrijn, A.F., Janmaat, M.L., Reichert, J.M. & Parren, P. (2019) Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 585-608.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagasse, H.A., Alexaki, A., Simhadri, V.L., Katagiri, N.H., Jankowski, W., Sauna, Z.E. & Kimchi-Sarfaty, C. (2017) Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Res* 6, 113.
- Lerchner, A., Daake, M., Jarasch, A. & Skerra, A. (2016) Fusion of an alcohol dehydrogenase with an aminotransferase using a PAS linker to improve coupled enzymatic alcohol-to-amine conversion. *Protein Eng. Des. Sel.* 29, 557-562.
- Lin, C.C., Hung, D.Z., Chen, H.Y. & Hsu, K.H. (2016) The effectiveness of patient-tailored treatment for acute organophosphate poisoning. *Biomed J.* 39, 391-399.
- Liu, N., Cai, X., Lei, Y., Zhang, Q., Chan, M., Li, C., Chen, W. & Mulchandani, A. (2007) Single-Walled Carbon Nanotube Based Real-Time Organophosphate Detector. *Electroanal.* 19, 616-619.
- Lockridge, O. (1990) Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol. Therapeut.* 47, 35-60.
- Lottspeich, F. & Zorbas, H. (1998) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Lumry, R., Biltonen, R. & Brandts, J.F. (1966) Validity of the "two-state" hypothesis for conformational transitions of proteins. *Biopolymers* 4, 917-944.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H. & Henriques, A.O. (2002) Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat. *J. Biol. Chem.* 277, 18849-18859.
- Masson, P. & Nachon, F. (2017) Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning. *J. Neurochem.* 142 Suppl 2, 26-40.
- Masson, P. & Rochu, D. (2009) Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae*.
- McLoughlin, S.Y., Jackson, C., Liu, J.W. & Ollis, D. (2005) Increased expression of a bacterial phosphotriesterase in escherichia coli through directed evolution. *Protein Expr. Purif.* 41, 433-440.
- Medina-Jaszek, A., Ahokhai, O., Taheri, M., Arif, M., Tretiakova, A. & Wilson, J. (2016) 60. Engineering AAV Vector for the Delivery of Human BuChE to Protect Against Exposure to Organophosphates. *Mol. Ther.* 24, S26.

- Mew, E.J., Padmanathan, P., Konradsen, F., Eddleston, M., Chang, S.S., Phillips, M.R. & Gunnell, D. (2017) The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15: Systematic review. *J. Affect. Disord.* 219, 93-104.
- Michaelson, J.S., Demarest, S.J., Miller, B., Amatucci, A., Snyder, W.B., Wu, X., Huang, F., Phan, S., Gao, S., Doern, A., Farrington, G.K., Lugovskoy, A., Joseph, I., Bailly, V., Wang, X., Garber, E., Browning, J. & Glaser, S.M. (2009) Anti-tumor activity of stability-engineered IgG-like bispecific antibodies targeting TRAIL-R2 and LTbetaR. *MAbs* 1, 128-141.
- Milstein, C. (2000) With the benefit of hindsight. *Immunol. Today* 21, 359-364.
- Mulbry, W., Ahrens, E. & Karns, J. (1998) Use of a field-scale biofilter for the degradation of the organophosphate insecticide coumaphos in cattle dip wastes. *Pesticide Science* 52, 268-274.
- Mulla, S.I., Ameen, F., Talwar, M.P., Eqani, S.A.M.A.S., Bharagava, R.N., Saxena, G., Tallur, P.N. & Ninnekar, H.Z. (2020) Organophosphate Pesticides: Impact on Environment, Toxicity, and Their Degradation. IN SAXENA, G. & BHARAGAVA, R. N. (Eds.) *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety: Volume I: Industrial Waste and Its Management*. Singapore, Springer Singapore.
- 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.
- Naqvi, T., Warden, A.C., French, N., Sugrue, E., Carr, P.D., Jackson, C.J. & Scott, C. (2014) A 5000-fold increase in the specificity of a bacterial phosphotriesterase for malathion through combinatorial active site mutagenesis. *P. L. o. S. One* 9, e94177.
- Ningfeng, W., Minjie, D., Guoyi, L., Xiaoyu, C., Bin, Y. & Yunliu, F. (2004) Cloning and expression of ophc2, a new organophosphorus hydrolase gene. *Chinese Sci. Bull.* 49, 1245-1249.
- 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.
- Ny, T., Elgh, F. & Lund, B. (1984) The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5355-5359.
- O'Shea, E.K., Lumb, K.J. & Kim, P.S. (1993) Peptide 'velcro': design of a heterodimeric coiled coil. *Curr. Biol.* 3, 658-667.
- Padlan, E.A. (1996) X-ray crystallography of antibodies. *Adv. Protein Chem.* 49, 57-133.
- Pearson, G.S. & Magee, R.S. (2002) Critical evaluation of proven chemical weapon destruction technologies (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 74, 187-316.
- Peter, J.V., Moran, J.L. & Graham, P. (2006) Oxime therapy and outcomes in human organophosphate poisoning: an evaluation using meta-analytic techniques. *Crit. Care Med.* 34, 502-510.

- Pieters, R., Appel, I., Kuehnel, H.J., Tetzlaff-Fohr, I., Pichlmeier, U., van der Vaart, I., Visser, E. & Stigter, R. (2008) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy, and safety of a new recombinant asparaginase preparation in children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia: a randomized phase 2 clinical trial. *Blood* 112, 4832-4838.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. & Beckwith, J. (1997) The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 272, 15661-15667.
- Punta, M., Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A. & Finn, R.D. (2012) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 40, D290-301.
- Radić, Z., Dale, T., Kovarik, Z., Berend, S., Garcia, E., Zhang, L., Amitai, G., Green, C., Radić, B., Duggan, Brendan M., Ajami, D., Rebek, J., Jr. & Taylor, P. (2013) Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochem. J.* 450, 231-242.
- Rauschel, F.M. (2002) Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 288-295.
- Reiter, Y., Brinkmann, U., Lee, B. & Pastan, I. (1996) Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments. *Nat. Biotechnol.* 14, 1239-1245.
- Rice, H. (2016) Toxicology of organophosphorus nerve agents.
- Ridgway, J.B., Presta, L.G. & Carter, P. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* 9, 617-621.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-5467.
- Saxena, A., Sun, W., Dabisch, P.A., Hulet, S.W., Hastings, N.B., Jakubowski, E.M., Mioduszewski, R.J. & Doctor, B.P. (2011a) Pretreatment with human serum butyrylcholinesterase alone prevents cardiac abnormalities, seizures, and death in Göttingen minipigs exposed to sarin vapor. *Biochem. Pharmacol.* 82, 1984-1993.
- Saxena, A., Sun, W., Fedorko, J.M., Koplovitz, I. & Doctor, B.P. (2011b) Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX. *Biochem. Pharmacol.* 81, 164-169.

- Saxena, A., Tipparaju, P., Luo, C. & Doctor, B.P. (2010) Pilot-scale production of human serum butyrylcholinesterase suitable for use as a bioscavenger against nerve agent toxicity. *Process Biochem.* 45, 1313-1318.
- Schiweck, W. & Skerra, A. (1995) Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* 23, 561-565.
- 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.
- Schlapschy, M., Grimm, S. & Skerra, A. (2006) A system for concomitant overexpression of four periplasmic folding catalysts to improve secretory protein production in *Escherichia coli*. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 385-390.
- 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.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (2007) The strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528-1535.
- Schomburg, I., Jeske, L., Ulbrich, M., Placzek, S., Chang, A. & Schomburg, D. (2017) The BRENDA enzyme information system-From a database to an expert system. *J. Biotechnol.* 261, 194-206.
- Scott, C., Begley, C., Taylor, M.J., Pandey, G., Momirovski, V., French, N., Brearley, C., Kotsonis, S.E., Selleck, M.J., Carino, F.A., Bajet, C.M., Clarke, C., Oakeshott, J.G. & Russell, R.J. (2011) Free-Enzyme Bioremediation of Pesticides. *Pesticide Mitigation Strategies for Surface Water Quality*. American Chemical Society.
- Scott, C., Pandey, G., Hartley, C.J., Jackson, C.J., Cheesman, M.J., Taylor, M.C., Pandey, R., Khurana, J.L., Teese, M., Coppin, C.W., Weir, K.M., Jain, R.K., Lal, R., Russell, R.J. & Oakeshott, J.G. (2008) The enzymatic basis for pesticide bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48, 65-79.
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. & De Vos, P. (1994) Classification of *Pseudomonas diminuta* leifson and hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* busing, doll, and freytag 1953 in *brevundimonas* gen. nov. as *brevundimonas diminuta* comb. nov. and *brevundimonas vesicularis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 499-510.
- 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.
- Singh, B.K. (2009) Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 156-164.
- Singh, B.K. & Walker, A. (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *F. E. M. S. Microbiol. Rev.* 30, 428-471.

- Sirin, G.S., Zhou, Y., Lior-Hoffmann, L., Wang, S. & Zhang, Y. (2012) Aging mechanism of soman inhibited acetylcholinesterase. *J. Phys. Chem. B.* 116, 12199-12207.
- Skerra, A. (1992) Phosphorothioate primers improve the amplification of DNA sequences by DNA polymerases with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 20, 3551-3554.
- 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. & Plückthun, A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli. *Science* 240, 1038-1041.
- Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., Otten, L., Suen, G., Welch, R., Almeida, N.F., Arnold, F., Burton, O.T., Du, Z., Ewing, A., Godsy, E., Heisel, S., Houmiel, K.L., Jhaveri, J., Lu, J., Miller, N.M., Norton, S., Chen, Q., Phoolcharoen, W., Ohlin, V., Ondrusek, D., Pride, N., Stricklin, S.L., Sun, J., Wheeler, C., Wilson, L., Zhu, H. & Wood, D.W. (2009) Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.* 191, 2501-2511.
- Smith, T.M. & Smith, R.L. (2009) *Ökologie*, München, Pearson Studium.
- Strauch, K.L. & Beckwith, J. (1988) An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 1576-1580.
- Strohl, W.R. (2015) Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 29, 215-239.
- Strohl, W.R. & Naso, M. (2019) Bispecific T-Cell Redirection versus Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cells as Approaches to Kill Cancer Cells. *Antibodies (Basel, Switzerland)* 8, 41.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Sutherland, T.D., Horne, I., Weir, K.M., Coppin, C.W., Williams, M.R., Selleck, M., Russell, R.J. & Oakeshott, J.G. (2004) Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clin. Exp. Pharmacol. P.* 31, 817-821.
- Suurs, F.V., Lub-de Hooge, M.N., de Vries, E.G.E. & de Groot, D.J.A. (2019) A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacol. Therapeut.* 201, 103-119.
- Szinicz, L. (2005) History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* 214, 167-181.
- Taylor, R.G., Walker, D.C. & McInnes, R.R. (1993) E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 21, 1677-1678.

- Thakur, M., Medintz, I.L. & Walper, S.A. (2019) Enzymatic Bioremediation of Organophosphate Compounds-Progress and Remaining Challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*.
- Thiermann, H., Aurbek, N. & Worek, F. (2016) Treatment of Nerve Agent Poisoning. *Chemical Warfare Toxicology: Volume 2: Management of Poisoning*. The Royal Society of Chemistry.
- Vyas, N.K., Nickitenko, A., Rastogi, V.K., Shah, S.S. & Quioco, F.A. (2010a) Correction to Structural Insights into the Dual Activities of the Nerve Agent Degrading Organophosphate Anhydrolase/Prolidase. *Biochemistry* 49, 2305-2305.
- Vyas, N.K., Nickitenko, A., Rastogi, V.K., Shah, S.S. & Quioco, F.A. (2010b) Structural insights into the dual activities of the nerve agent degrading organophosphate anhydrolase/prolidase. *Biochemistry* 49, 547-559.
- Wang, J., Krause, R., Block, K., Musameh, M., Mulchandani, A., Mulchandani, P., Chen, W. & Schöning, M. (2002) Dual amperometric-potentiometric biosensor detection system for monitoring organophosphorus neurotoxins. *Anal. Chim. Acta* 469, 197-203.
- Wang, X., Wu, N., Guo, J., Chu, X., Tian, J., Yao, B. & Fan, Y. (2008) Phytodegradation of organophosphorus compounds by transgenic plants expressing a bacterial organophosphorus hydrolase. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 365, 453-458.
- Wang, Y., Prosen, D.E., Mei, L., Sullivan, J.C., Finney, M. & Vander Horn, P.B. (2004) A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Res.* 32, 1197-1207.
- Wende, W., Stahl, F. & Pingoud, A. (1996) The production and characterization of artificial heterodimers of the restriction endonuclease *ecorV*. *Biol. Chem.* 377, 625-632.
- Wilson, I.B. & Ginsburg, B. (1955) A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta* 18, 168-170.
- 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., Eyer, P. & Thiermann, H. (2012) Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Test. Anal.* 4, 282-291.
- Worek, F., Koller, M., Thiermann, H. & Wille, T. (2016a) Reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase by obidoxime, HI-6 and obidoxime+HI-6: Kinetic in vitro study with simulated nerve agent toxicokinetics and oxime pharmacokinetics. *Toxicology* 350-352, 25-30.
- 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. (2013) The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacol. Therapeut.* 139, 249-259.
- Worek, F., Thiermann, H. & Wille, T. (2016b) 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.
- Wörn, A. & Plückthun, A. (1999) Different Equilibrium Stability Behavior of ScFv Fragments: Identification, Classification, and Improvement by Protein Engineering. *Biochemistry* 38, 8739-8750.
- Wu, N., Deng, M., Shi, X., Liang, G., Yao, B. & Fan, Y. (2004) Isolation, purification and characterization of a new organophosphorus hydrolase OPHC2. *Chinese Sci. Bull.* 49, 268-272.
- Yang, H., Carr, P.D., McLoughlin, S.Y., Liu, J.W., Horne, I., Qiu, X., Jeffries, C.M., Russell, R.J., Oakeshott, J.G. & Ollis, D.L. (2003) Evolution of an organophosphate-degrading enzyme: a comparison of natural and directed evolution. *Protein Eng.* 16, 135-145.
- Yang, Y.C., Szafraniec, L.L., Beaudry, W.T. & Rohrbaugh, D.K. (1990) Oxidative detoxification of phosphonothiolates. *J. Am. Chem. Soc.* 112, 6621-6627.
- Yari, M., Ghoshoon, M., Vakili, B. & Younes, G. (2017) Therapeutic Enzymes: Applications and Approaches to Pharmacological Improvement. *Curr Pharm. Biotechnol.* 18.
- 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.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.L. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115.
- Zhu, Z., Presta, L.G., Zapata, G. & Carter, P. (1997) Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci.* 6, 781-788.