



Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen

Pascal Schneider



Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich Forschungszentrum Jülich GmbH Institut für Bio- und Geowissenschaften IBOC – Bioorganische Chemie

Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen

Pascal Schneider

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich Band 45

ISBN 978-3-95806-690-8

Herausgegeben von Jörg Pietruszka



Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pascal Schneider

aus Lenzkirch

Düsseldorf, November 2022

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek. Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet über http://dnb.d-nb.de abrufbar.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Jörg Pietruszka
Korreferent:	Prof. Dr. Holger Gohlke
Tag der mdl. Prüfung:	30.11.2022
Herausgeber:	Prof. Jörg Pietruszka
Umschlaggestaltung:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Druck:	Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH
Copyright:	Forschungszentrum Jülich 2023

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich, Band 45

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2022)

ISBN 978-3-95806-690-8

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilendieses Werkesistauchim Einzelfall nur inden Grenzender gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils gültigen Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht oder auf Konferenzen vorgetragen.

Publikationen während der Doktorarbeit

<u>P. Schneider</u>, B. Henssen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. P. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 23412-23418; "Biocatalytic C3 – Indole Methylation – A Useful Tool for the Natural-Product-Inspired Stereoselective Synthesis of Pyrroloindoles".

L. Winand, <u>P. Schneider</u>, S. Kruth, N.-J. Greven, W. Hiller, M. Kaiser, J. Pietruszka, M. Nett, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 6563-6567; "Mutasynthesis of Physostigmines in *Myxococcus xanthus*".

B. David, <u>P. Schneider</u>, P. Schaefer, J. Pietruszka, H. Gohlke, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, 36, 491-496; "Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: virtual screening and *in vitro* characterization".

D. A. Amariei, N. Pozhydaieva, B. David, <u>P. Schneider</u>, T. Classen, H. Gohlke, O. H. Weiergraber, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 14130-14139; "Enzymatic C3-Methylation of Indoles Using Methyltransferase PsmD – Crystal Structure, Catalytic Mechanism, and Preparative Applications".

Konferenzbeiträge

CLIB Internationale Konferenz (Hybridkonferenz) (2/2022). M. Haase, M. Schatton, B. Chapple, D. Amariei, <u>P. Schneider</u>, J. Pietruszka; "Methylation (im)-possible – a useful tool for tailoring drug products". (Pitch & Q&A, online-Teilnahme)

Biotrans, Graz (online Konferenz) (06/2021). <u>P. Schneider</u>, J. Pietruszka; "Biocatalytic C3indole methylation – A useful tool for natural product synthesis". (Vortrag)

Moderator CKB Symposium (03/2021); AP3 Gesundheit (online Konferenz)

CKB-Symposium 2019 (10/2019); <u>P. Schneider</u>, J. Pietruszka; "Novel tools for physostigmine synthesis". (Vortrag)

Abschlussarbeiten

Die vorliegende Arbeit enthält Ergebnisse aus den entsprechend aufgelisteten Abschlussarbeiten, welche vom Autor betreut und an den entsprechenden Stellen in der vorliegenden Dissertation namentlich gekennzeichnet wurden. Die jeweiligen Abschlussarbeiten wurden unter Anleitung des Autors durchgeführt und sind im Text kenntlich gemacht. Zusätzlich wurden vom Autor bereitgestellte Substrate und Enzyme hervorgehoben und der experimentelle Eigenanteil kenntlich gemacht. Die intellektuelle Planung und Vorbereitung der Abschlussarbeiten, sowie die Einarbeitung und Betreuung vor Ort wurden vom Autor durchgeführt.

M.Sc. Benjamin Chapple (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit), **2021**; "Enzymatic alkyl-derivatization of a physostigmine precursor using two different SAM-supply systems"

M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Masterarbeit), **2020**; "C-methyltransferases as a powerful tool for organic synthesis – characterisation, optimisation and application for the stereoselective formation of indole alkaloids"

B.Sc. Philipp Schäfer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Bachelorarbeit), **2020**; "Discovery and Synthesis of novel cholinesterase inhibitors based on physostigmine"

INHALTSVERZEICHNIS

Vor	wort	IX
1.	Abkürzungsverzeichnis	X
2.	Kurzfassung	1
3.	Abstract	1
4.	Einleitung	2
4	.1 Einführung in die Thematik	2
	4.1.1 Biokatalyse – mehr als ein grünes Versprechen	2
	4.1.2 Biokatalyse – das Schweizer Taschenmesser der Wirkstoffsynthese	3
4	.2 Ziel der Arbeit	7
5.	Kenntnisstand	10
5	.1 Die Rolle von Naturstoffen in der Pharmazie	10
	5.1.1 Entwicklung von (neuen) Wirkstoffen	11
	5.1.2 Methyl – Die Allzweckwaffe des Medizinalchemikers?	14
	5.1.3 Der "magic methyl effect"	15
5	.2 Bedeutung von Physostigmin	18
	5.2.1 Physostigmin und Physostigmin-Derivate	19
	5.2.2 Totalsynthese von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten	20
	5.2.3 Biologischer Zugang zu Physostigmin	24
5	.3 Methyltransferasen	27
	5.3.1 SAM Abhängige Methyltransferasen – Klassen und Einteilung	27
	5.3.2 Methylierung von Naturstoffen und anderen small molecules	29
	5.3.2.1 O-Methyltransferasen	29
	5.3.2.2 <i>N</i> -Methyltransferasen	32
	5.3.2.3 C-Methyltransferasen	35
	5.3.2.3.1 C-3 Indol-Methyltransferasen	35
	5.3.2.3.2 Biochemische Friedel-Crafts Alkylierung	37
	5.3.2.3.3 Biochemische Isoprenyl-Methylierung	38
5	.4 Cosubstrat SAM – vom Flaschenhals zur neuen Hoffnung?	40
	5.4.1 Systeme zur (Re-)Generierung von SAM	41
	5.4.2 Lineare SAM-Versorgungssysteme	42
	5.4.3 SAM-Recycling	44
6.	Eigene Ergebnisse	50
6	0.0 Schöne neue Welt der Methyltransferasen	50
6	6.1 C-3 Indol-Methyltransferase SgPsmD	50
	6.1.1 Expression und Reinigung von SgPsmD	50
	6.1.2 Synthese des natürlichen SgPsmD Substrats	56
	6.1.3 Reproduktion der Aktivität von SgPsmD und initiale Charakterisierung	56

6.1.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von PsmD	59
6.1.5 Substratspektrum von SgPsmD	63
6.1.6 Nachweis der Enantioselektivität der enzymatischen SgPsmD-Reaktion	66
	68
6.1.7. Zusammenfassung des Kapitels	69
6.2 C-3 Indol-Methyltransferase SaPsmD	70
6.2.1 Identifizierung neuer Methyltransferasen durch Sequenzhomologie	71
6.2.2 Expression und Reinigung von SaPsmD	72
6.2.3 Charakterisierung von SaPsmD	73
6.2.4 Vergleich der kinetischen Parameter von SaPsmD und SgPsmD	75
6.2.5 Substratabhängige Aktivität von SaPsmD	77
6.2.6. Zusammenfassung des Kapitels	79
6.3 SAM-Recycling – Neue Methoden ermöglichen präparative biokatalytische Methylierung	
6.3.1 Expression und Reinigung der Halogenid-Methyltransferase <i>Ct</i> HMT	80
6.3.2 Implementierung des enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems	81
6.3.3 Optimierung des SAM Recycling durch statistische Versuchsplanung	84
6.3.4. Zusammenfassung des Kapitels	
6.4 Nutzung von Methyltransferasen zur präparativen Synthese und Evaluierung Bioaktivität	g der 89
6.4.1 Anwendung von SgPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese	
6.4.2 Anwendung von SaPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese	91
6.4.3 Testung biologischer Aktivität produzierter Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol	e94
6.4.4. Bestimmung von molekularen Zielstrukturen von Hexahydropyrrolo[2,3- und in-silico Evaluierung	b]indolen 97
6.4.5 Bestimmung der ADME Parameter produzierter Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole.106
6.4.6 Zusammenfassung des Kapitels	- 108
6.5 <i>N</i> -Methyltransferase SgPsmC	
6.5.1 Expression und Reinigung von SgPsmC	110
6.5.2 Synthese der racemischen Referenz zur Bestimmung der Selektivität de Reaktion	er SgPsmC 112
6.5.3 Präparative Anwendung von SgPsmC	113
6.5.4 SgPsmC – Eine Möglichkeit zur universellen N-Methylierung?	115
6.5.5 Bestimmung des Indolin-Substratspektrums	120
6.5.6 Kinetische Racematspaltung durch SgPsmC als Schlüsselschritt der Tor von enantiomerenreinen Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen	talsynthese 121
6.5.7 Zusammenfassung des Kapitels	125
7. Zusammenfassung und Ausblick	126
7.1 C-3 Indol-Methyltransferasen in der Biokatalyse	126

7.1.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte	128
7.1.2 Mutagenese der PsmD-Enzyme	128
7.1.3 Diketopiperazine – Biokatalytischer Zugang durch C-3 Indol-Methyltransfe	erasen 130
7.2 Mutasynthese und Ganzzellbiokatalyse – Das native SAM-Recycling	
7.2.1 Generierung von Physostigmin Derivaten durch Mutasynthese in Myxococ	cus
xhantus	131
7.3 SgPsmB – Biokatalytische Deacetylierung als fehlendes Puzzelstück?	134
7.3.1 Produktion und Reinigung von SgPsmB	134
7.3.2 SgPsmB – Der Flaschenhals der Physostigmin-Biosynthese?	135
7.4 Enzymgekoppeltes SAM-Recycling für den Einsatz zur präparativen Biokataly	se137
7.4.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte	137
7.4.2 Vor- und Nachteile des enzymgekoppelten SAM-Recyclings	137
7.5 Späte Modifizierung von <i>N</i> -Heterozyklen – Anwendung einer <i>N</i> -MT zur kinetis Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i>]indolen	chen 140
7.5.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte	141
7.5.2 Anwendung zur kinetischen Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>k</i>	b]indolen
7.5.3 Gezielte Modifizierung von <i>N</i> -Heterozyklen	
7.6 Erweiterung und Testung der Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Bibliothek	144
7.6.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte	146
7.6.2 QSAR-Modell zur Optimierung von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-b]ind	ol146
7.6.3 Entdeckung neuer Acetylcholinesterase Inhibitoren zur Bekämpfung von A	Alzheimer
3. Experimenteller Teil	
8.1 Allgemeines	
8.1.1 Geräte und Software	
8.1.2 Verbrauchsmaterialien	
8.1.3 Chemikalien	
8.1.4 Enzyme	
8.1.5 Plasmide und Oligonukleotide	
8.1.6 Mikroorganismen	
8.2 Molekularbiologische Methoden	
8.2.1 Design von Primern	
8.2.2 PCR Methoden	
8.2.2.1 Kolonie-PCR	
8.2.2.2 Test-PCR	
8.2.2.3 Overlap Extension PCR	
9.2.2 loolation van Plaamid DNA	157

8.2.4 Restriktionsverdau und Ligation	157
8.2.5 Agarosegelelektrophorese	158
8.2.5.1 Gelelution aus dem Agarose-Gel	159
8.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	159
8.2.7 DNA-Sequenzierung	159
8.3 Mikrobiologische Zellkultur	160
8.3.1 Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen	160
8.3.2 Komplexmedien	160
8.3.3 Stammlösungen zur Kultivierung von Mikroorganismen	160
8.3.4 Allgemeine Bedingungen zur Kultivierung von Mikroorganismen	160
8.3.5 Generelles zur heterologen Expression von Zielenzymen in E. coli	161
8.3.5.1 Heterologe Expression der C-Methyltransferase SgPsmD	161
8.3.5.2 Heterologe Expression der <i>N</i> -Methyltransferase SgPsmC	161
8.3.5.3 Heterologe Expression der Halogenid-Methyltransferase CtHMT	162
8.3.5.4 Heterologe Expression der C-Methyltransferase SaPsmD	162
8.3.5.5 Heterologe Expression der Methioninadenosyltransferase TkMAT	162
8.3.5.6 Heterologe Expression der Amid-Hydrolase SgPsmB	163
8.3.6 Herstellung von Glycerinkulturen zur Lagerung Mikroorganismen	163
8.3.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	163
8.3.8 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen	164
8.4 Proteinbiochemische Methoden	165
8.4.1 Zellaufschluss	165
8.4.2 SDS Page	165
8.4.3 Proteinreinigung mit Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)	166
8.4.4 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	167
8.5 Durchführung der verschiedenen Biokatalyse Ansätze und Assays	168
8.5.1 Genereller Ablauf des PsmD in vitro assay	168
8.5.2 Implementierung des CtHMT-SAM-Recycling im SgPsmD gekoppelten Ansatz	z.169
8.5.3 Optimierung der <i>Ct</i> HMT gekoppelten <i>Sg</i> PsmD-Reaktion	169
8.5.4 Genereller Ablauf des PsmC in vitro Assays	170
8.5.5 Kinetische Racematspaltung mit SgPsmC	171
8.5.6 Bestimmung der Aktivität von <i>Ct</i> HMT Lysat	172
8.5.7 Mtase [™] -Glo Assay: Kalibrierung mit SAH	172
8.5.8 Mtase [™] -Glo Assay: Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration	173
8.5.9 Mtase [™] -Glo Assay: Bestimmung der kinetischen Parameter	173
8.5.10 Mtase [™] -Glo Assay: Bestimmung der spezifischen Aktivität von MTs	174
8.5.11 Ellmanns Assay zur Bestimmung der IC $_{50}$ -Werte von AChE und BChE Inhibi	toren
	176

8.5.12 Durchführung der in silico Experimente	177
8.6 Synthesevorschriften	179
8.6.1 Allgemeine chemische Methoden	179
8.6.1.1 Lösungsmittel	179
8.6.1.2 Allgemeine Durchführung von Reaktionen	179
8.6.1.3 Allgemeine Durchführung von Reaktionskontrollen	179
8.6.1.4 Säulenchromatographie	179
8.6.1.5 GC (Gaschromatographie)-MS Messungen	179
8.6.1.6 HR (Hochauflösende)-MS Messungen	180
8.6.1.7 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) und Quantitative NMR-Spektro	oskopie 180
8.6.1.8 Infrarotspektroskopie (IR)	
8.6.1.9 LC (Liquid Chromatography)-MS Analyse	
8.6.1.10 RP-LC (Liquid Chromatography) Analyse	
8.6.1.11 Chirale Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	
8.6.1.12 Bestimmung der optischen Rotation	
8.6.1.13 Ermittlung von <i>ee</i> -Werten	
8.6.1.14 Ermittlung der Selektivität (S)	
8.6.2 Generelle Methoden zur Synthese der Indol-Bibliothek	
8.6.2.1 Synthese der Serotonin-Derivate	
8.6.2.1.1 Generelle Vorschrift zur Synthese von <i>N</i> -alkyl Serotonin-Varianten	
8.6.2.2 Synthese der verschiedenen carbamoylierten <i>N</i> -Acetylserotonin Derivat	e191
8.6.2.2.1 Generelle Synthesevorschrift zur Herstellung der <i>N</i> -Acetylserotonin D	erivate 191
8.6.2.3 Synthese von 5-halogenierten N-Acetyltryptamin-Derivaten	
8.6.2.3.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 5-halogenierten <i>N</i> -Acetyltrypt Derivaten	amin- 199
8.6.2.4 Synthese von racemischen Standards für die Enantiomerenanalytik von verschiedenen Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i>]indolinen über eine dearomatisierende Zyklisierung	201
8.6.2.4.1 Dearomatisierende Zyklisierung	201
8.6.2.4.2 Methoxy Entschützung, N-Benzyl Schützung und Carbamoylierung	205
8.6.2.4.3 N-Benzyl Entschützung	207
8.7 Präparative Biokatalyse	209
8.7.1 Herstellung von Physostigmin Analoga mit SgPsmD und CtHMT	209
8.7.2 Herstellung von Physostigmin Analoga mit SaPsmD und CtHMT	211
9. Literaturverzeichnis	216
10. Anhang	232
10.1 Rohdaten der Optimierung des SAM Recyclings durch statistische Versuchs	planung
	232 VII

	10.2	2 Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	234
	10.3	3 Konzentrations-Wirkungs-Diagramme zur Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	240
	10.4	4 NMR-Spektren	242
	10.5	5 LC-MS Daten	302
	10.6	6 Kalibriergeraden	307
	10.7	7 Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit	.309
11	•	Formelregister	311
12	•	Danksagung	313
13		Erklärung	315

VORWORT

"It always seems impossible until it's done"

(Nelson Mandela, † 5.12.2013)

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

+I-Effekt	Positiver induktiver Effekt	MAT	Methionin-Adenosvltransferase
-I-Effekt	Negativer induktiver Effekt	MS	Massenspektrometrie
Abs	Absorption	MSD	mass selective detector
ADH	Alkoholdehydrogenase	MTBE	Methyl- <i>tert</i> -hutylether
	Adenosindinhosnhat	MT	Methyltransferase
Amn	Ampicillin	nh	nicht bestimmt
	Adenosinmononhosnhat		Nicotinamidadenindinukleotid
	Ammoniumporovodiculfat		Nicotinamidadenindinukleotid
AF 3 Är			Netional Conter for Pietochnology Information
AQ.	Molares Aquivalent		National Center for Biotechnology Information
AIF Dia Tria	Rie(2 budrowystbyl)amine		
DIS-THS	DIS(2-flydroxyethyl)arfillio-	INIVIE	nuclear magnetic resonance
	ins(nydroxymeinyi)meinan		
bia DLAOT	Gen fur β-Lactamase		/v-metnyitransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	NRPS	nichtribosomale Peptidsynthese
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
CDS	coding sequence	O-MT	O-Methyltransferase
CFE	cell free extract	Ori	origin of replication
CFU	colony forming units	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CoA	Coenzym A	PCR	polymerase chain reaction
COSY	correlation spectroscopy	PDB	protein data bank
DAD	Diodenarraydetektor	PE	Petrolether
DC	Dünnschichtchromatographie	PEG	Polyethylenglycol
DEPT	distortionless enhancement by	Pi	Anorganisches Phosphat
	polarization transfer		5
dest.	destilliert	PKS	Polyketidsynthasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	PIP	Pyridoxalphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid	npm	parts per million
COMT	Catechol O-Methyltransferase	rcf	relative centrifugal force
	1 4-Dithio-D-threitol	rnm	revolutions per minute
EC	enzyme class	DT	Paumtomporatur
	Childrendiamintatragastat		
EDIA	etitylenulariinteti aacetat	SVM	S Adopov/mothionin
EIC		SAIVI	S-Adenosylhemosystein
EO	Electrospray		S-Adenosymomocystem
ESI	Elektronensprayionisation	SAR	Structure-activity-relationship
ELUAC		505	
TW	forward (Primer)		
GC	Gaschromatographie	laq	Thermus aquaticus Polymerase
HMBC	heteronuclear multiple bond	ТВ	terrific broth
	correlation		
HMT	Halomethyltransferase	TEA	Triethylamin
HPLC	high performance liquid	TEMED	<i>N</i> , <i>N</i> , <i>N</i> ', <i>N</i> '-Tetramethylethylendiamin
	chromatography		
HRMS	high-resolution mass spectrometry	Term	Terminator
HSQC	heteronuclear single quantum	THF	Tetrahydrofuran
	coherence		
IC	inhibitory concentration	t _R	Retentionszeit
IMAC	Immobilized metal ion affinity	Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1.3-diol
-	chromatography		5 5 51 1 7-
IPTG	Isopropyl-B-D-thiogalactopyranosid	T7P	T-7 Promotor
IR	Infrarotspektroskopie	T7T	T-7 Terminator
Kan	Kanamycin		
kh	Kilobase		
kDa	Kilodalton		
KDa KD	Kaliumphasphatnuffar		
LD	iysogeny broth		
	liquid chromatography		
LV	Leervektor	1	

2. KURZFASSUNG

Im Fokus dieser Arbeit steht die Etablierung von *C*- und *N*-Methyltransferasen zur biokatalytischen und stereoselektiven Bereitstellung bioaktiver Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Alkaloide, die sich von dem Naturstoff Physostigmin ableiten. Zentrale Aspekte der Untersuchung sind dabei die Charakterisierung von geeigneten Enzymen, ihre präparative Nutzung unter Verwendung eines Cosubstrat-Regenerationssystems und die Untersuchung der Bioaktivität der hergestellten Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole.

Das Schlüsselenzym PsmD in der Biosynthese von Physostigmin in Streptomyces ariseofuscus katalysiert eine stereoselektive C-3 Indol-Methylierung. Dabei bildet sich durch sich anschließende intramolekulare Cyclisierung das charakteristische eine Hexahvdropyrrolo[2.3-b]indol-Grundgerüst aus. Obwohl dieser Schritt innerhalb der Biosynthese bereits aufgezeigt werden konnte, gab es bisher keine weiteren Versuche, diese Enzyme umfangreicher zu charakterisieren und für den Einsatz in der Biokatalyse zu nutzen. Im Zuge dieser Arbeit wurde SgPsmD isoliert, gereinigt und biochemisch charakterisiert. Durch Implementierung eines enzymgekoppelten SAM-Regenerationssystems (S-Adenosylmethionin) gelang es unterschiedlich substituierte Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole im präparativen Maßstab biokatalytisch herzustellen. Dieser Prozess wurde in der Folge durch den Einsatz und die Charakterisierung eines PsmD Homolog aus Streptomyces albulus optimiert.

Um die Pyrroloindolin-Alkaloid-Bibliothek weiter zu diversifizieren, wurde die *N*-Methyltransferase (*N*-MT) PsmC, welche ebenfalls an der Physostigmin-Biosynthese beteiligt ist, biochemisch charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz dieser *N*-Methyltransferase eine kinetische Racematspaltung von synthetisch zugänglichen, racemischen Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen mit hoher Selektivität möglich ist. Darüber hinaus konnte das Potential zur gezielten, späten Modifizierung (*engl. late-stage modification*) von pharmazeutisch relevanten *N*-Heterozyklen aufgezeigt werden.

Die bis dato chemisch nicht zugänglichen, biokatalytisch hergestellten Physostigmin-Derivate wurden hinsichtlich ihrer Bioaktivität gegenüber den medizinisch relevanten molekularen Zielstrukturen AChE (Acetylcholinesterase) und BChE (Butyrylcholinesterase) untersucht. Dabei wurde eine Inhibition dieser Enzyme im nanomolaren Bereich nachgewiesen und eine für bisher charakterisierte Physostigmin-Derivate unübliche Selektivität gegenüber einer der beiden Zielstrukturen wurde beobachtet. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die bioaktiven Naturstoffe in Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) hinsichtlich ihres weiteren therapeutischen Potentials evaluiert. Anhand von *in silico* Untersuchungen konnten neue, potenzielle molekulare Zielstrukturen identifiziert werden.

Durch abschließende *in silico* Bestimmung der pharmakokinetischen Eigenschaften der hergestellten Physostigmin-Derivate konnte die Wirkstofftauglichkeit dieser Naturstoffe untersucht werden. Eine weitere Diversifizierung des Pyrroloindolin-Grundgerüsts scheint dabei notwendig zu sein, um aus den Naturstoffen Wirkstoffe zu generieren. Der Einsatz von Methyltransferasen und deren Optimierung scheint ein geeigneter Schritt auf diesem Weg zu sein.

3. ABSTRACT

The focus of this work is to establish *C*- and *N*-methyltransferases for the biocatalytic and stereoselective production of bioactive hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol alkaloids derived from the natural product physostigmine. Central aspects of the study are the characterization of suitable enzymes, their preparative use applying a cofactor regeneration system, and investigation of the bioactivity of the hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indoles produced.

The key enzyme PsmD in the biosynthesis of physostigmine in *Streptomyces griseofuscus* catalyses a stereoselective *C*-3 indole methylation, thereby forming the characteristic pyrroloindoline backbone through a consecutive intramolecular cyclization. Although this step had already been elucidated within the biosynthesis, there have been no further attempts to characterize this enzyme and investigate its use in biocatalysis. In the course of this work, *Sg*PsmD was isolated, purified and biochemically characterized. By implementing an enzyme-coupled SAM regeneration system, it was possible to biocatalytically produce various substituted hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indoles on a preparative scale. This process was subsequently optimised by the use and characterisation of a PsmD homolog from *Streptomyces albulus*.

To further diversify the pyrroloindoline alkaloid library, the *N*-methyltransferase PsmC, also known to be involved in the physostigmine biosynthesis, was biochemically characterised. It was shown that the use of this *N*-MT enables kinetic resolution of synthetically accessible racemic hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indoles with high selectivity. Furthermore, the enzyme's potential use for targeted, late-stage modification of pharmaceutically relevant *N*-heterocycles was demonstrated.

The biocatalytically prepared physostigmine-derivatives, which were not chemically accessible before, were investigated regarding their bioactivity towards the medicinally relevant drug targets AChE and BChE. Inhibition of these enzymes in the nanomolar range was demonstrated, and a selectivity to one of the two target structures, which is unusual for physostigmine-derivatives, was observed. Based on these results, the bioactive natural products were evaluated in collaboration with Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Juelich) with respect to their further therapeutic potential, and new potential targets were identified by *in silico* investigations.

Initial *in silico* evaluation of the pharmacokinetic properties of the prepared physostigminederivatives revealed the drugability of these natural products. However, further optimisation and *in vitro* validation is necessary to generate drugs from the obtained natural products. The use and optimisation of methyltransferases seems to be a suitable step on this path.

4. EINLEITUNG

4.1 Einführung in die Thematik

4.1.1 Biokatalyse – mehr als ein grünes Versprechen

Neben den immer lauter werdenden Rufen nach nachhaltigen und umweltfreundlichen Prozessen, sind es vor allem die Herausforderungen der stereoselektiven Synthese von chiralen Bausteinen und Wirkstoffen, die einen organischen Chemiker heutzutage vor große Aufgaben stellen. Dabei sollen moderne Syntheserouten folgende Kriterien erfüllen: Kosteneffizienz, Atomökonomie, Robustheit, Reproduzierbarkeit und Skalierbarkeit.^[1] Um diese Ziele zu erreichen, werden Katalysatoren benötigt. Neben der Organo- und Metallkatalyse hat sich gerade die Biokatalyse hier als nützlich erwiesen und findet immer größere Bedeutung in der chemischen Industrie.^[2] Die Gründe dafür findet man vor allem in der rasanten Entwicklung der letzten 20 Jahre.^[3] Neben der Entdeckung und Erforschung neuer Enzyme und Enzymreaktionen, war die Entwicklung der gerichteten Evolution ein wesentliche Triebkraft und wurde 2018 mit dem Nobelpreis für Prof. Dr. Frances Arnold gewürdigt.^[4-7] Mit Hilfe der gerichteten Evolution konnten bekannte Enzyme für neue Reaktionen zugänglich gemacht werden, die Enzymstabilität verbessert oder ihre Aktivität erhöht werden.^[6, 8-10] Zusätzlich wurden immer neue Wege gefunden, die teilweise extrem teuren, aber notwendigen Cosubstrate von Enzymen wie NADPH, ATP oder SAM in situ zu recyceln, um damit deren Verbrauch von stöchiometrischen hin zu katalytischen Mengen zu senken und die Kosten pro Reaktion deutlich zu verringern.^[11, 12] In der Summe führte dies zu einem Anstieg des Bedarfs an biokatalytischen Transformationen und somit den Einzug von Enzymen in die chemische und pharmazeutische Industrie.^[13] Zusätzlich gilt die Biokatalyse als Zukunftstechnologie und soll dabei helfen, Bedrohungen wie Klimaerwärmung und Umweltverschmutzung durch vermeidbare Ressourcenverschwendung zu bekämpfen. Zur Umsetzung dieser Ziele schließen sich immer mehr Forscher*innen zusammen, um gemeinsam Projekte und Ideen zu verwirklichen, verschiedene Bereiche zu vernetzen und Technologien erfolgreich zu verknüpfen. Innerhalb des Kompetenzzentrums Biotechnologie (CKB) wurde unter dieser Prämisse eine solche Initiative für standortübergreifende Forschung gegründet. Ein zusätzlicher Aspekt, der hier im Arbeitspaket (AP) III adressiert wird, sind die zukünftigen Herausforderungen des demografischen Wandels durch Volkskrankheiten und die Ausbreitung von multiresistenten Mikroorganismen. Zusammengefasst wird dieses Themengebiet unter dem Begriff "Gesundheit". Hier, wie auch in den anderen genannten Bereichen, sollen Biotransformationen als elementarer Teil einer nachhaltigen Biotechnologie etabliert werden. Die vorliegende Arbeit ist Teil des AP III des Kompetenzzentrums Biotechnologie (CKB) und trägt durch die Etablierung biokatalytischer Methylierung aktiv zu einer nachhaltigen Zukunft bei.

4.1.2 Biokatalyse – das Schweizer Taschenmesser der Wirkstoffsynthese

Die Biokatalyse als Teil der chemischen und pharmazeutischen Industrie ist eine der Zukunftstechnologien auf dem Weg hin zu einer nachhaltigen Wirtschaft. Bereits heute werden verschiedene Enzyme industriell genutzt, um Wirkstoffe, aber auch Industriechemikalien herzustellen. Darüber hinaus findet man diverse Enzyme in Lebens- und Verbrauchsmitteln.^[14]

Einsatzbereich	Verwendete Enzyme	Anwendung
Pharmazeutische Industrie	Transaminase, Lipase,	Herstellung von Intermediaten
	Monoaminoxidase, Penicillin	in der Wirkstoffsynthese
	Acylase	
Lebensmittel	Trypsin, Amylase, Glukose	Herstellung von Glukose aus
	Isomerase, Papain, Pectinase	Stärke, Anpassung des
		Produktgeschmacks
Waschmittel	Protease, Lipase, Amylase,	Abbau von Fetten und Ölen,
	Cellulase	Erhalt der Farbintensität oder
		Entfärbung
Biokraftstoffe	Lipase, Cellulase, Xylanase	Abbau von Lignocellulose zur

Tabelle 1. Verschiedene Einsatzgebiete und Anwendung von Enzymen in der Industrie. Adaptiert und verändert nach Chapman *et al.*^[14]

Besonders im Bereich der Wirkstoffsynthese hat der Einsatz von Enzymen zugenommen. Gründe dafür sind eine höhere Selektivität (Stereo- und Chemoselektivität) enzymatischer Umsetzungen gegenüber chemischen Prozessen, die Umsetzung in Wasser und wässrigen Medien statt organischer Lösungsmittel und die Durchführung bei vergleichsweise niedrigen Temperaturen. Diese Faktoren erfüllen bereits einige der zwölf "Grundprinzipien" nachhaltiger Chemie, jedoch bedarf es einer stetigen Weiterentwicklung um sensible Ressourcen wie Wasser einzusparen.^[15-19] Um den Einsatzbereich und die Effektivität von Enzymen weiter zu erhöhen, gilt es akute Probleme in der Anwendbarkeit und Handhabung zu lösen. So sind beispielsweise mangelnde Enzymstabilität oder geringe Umsatzraten limitierende Faktoren. Wie in **Tabelle 2** dargestellt, gibt es für viele der aktuellen Fragestellungen bereits Lösungen. Weiterhin werden Enzyme Tag für Tag optimiert und an die industriellen Bedürfnisse angepasst. Besonders spannend sind dabei aktuelle Anwendungsbeispiele. Dazu muss zunächst die Art der Bereitstellung des Biokatalysators berücksichtigt werden. Hier sollte generell zwischen isoliertem Enzym und Ganzzellkatalyse unterschieden werden.^[20, 21]

Herstellung von Bioethanol

4. Einleitung

Problemstellung	Lösung
"Die Herstellung von Enzymen ist teuer und	Optimierung der rekombinanten Expression
nicht alle sind zuganglich"	in einem geeigneten Organismus
	Bereitstellung von Enzymen durch
	spezialisierte Firmen und Start-ups
	Immobilisierung des Enzyms zur
	Wiederverwendung und Kostenreduktion
"Enzyme sind nicht stabil"	enzyme engineering durch rationales
	Design oder gerichtete Evolution zur
	Verbesserung der Stabilität
"Enzyme sind von teuren Cosubstraten	Effektive Recyclingsysteme sind für viele
abhangig"	Cosubstraten etabliert und konnten im
	industriellen Maßstab bereits genutzt
	werden
"Prozessentwicklung und downstream	Biotechnologische Lösungen über
Prozesse sind schwierig"	Fermentation, statistische Versuchsplanung
	und Automation

Tabelle 2. Übersicht aktueller Fragestellungen und Lösungen der Anwendung von Enzymen. Adaptiert von Wu *et al.*^[3]

Neuerdings hat sich für den Einsatz von isolierten Enzymen neben dem klassischen Eintopf-Ansatz (engl. batch), der Einsatz von Enzymen in der kontinuierlichen die Durchflusschemie (enal. flow) als besonders nützlich erwiesen.^[22] Für Ganzzell(bio)katalyse kann insbesondere zwischen der Biotransformation, die den Umsatz von nicht natürlichen Substraten zu einem gewünschten Produkt beschreibt, und der Mutasynthese unterschieden werden. Bei der Mutasynthese werden Biosynthesewege gezielt manipuliert und durch Ausschalten (engl. knock-out) oder Deletion einzelner Genabschnitte modifiziert und können so anschließend für die homologe oder heterologe Produktion von Stoffwechselprodukten genutzt werden.^[23-28] Dies wird durch Zufüttern geeigneter Vorläufermoleküle ermöglicht natürlichen und bietet einen Zugang zu nicht Stoffwechselprodukten. Möglichkeiten Die verschiedenen zur Bereitstellung von Biokatalysatoren sind in Abbildung 1 zusammengefasst. In welcher Form die Biokatalysatoren angewendet werden, hängt von der geplanten Synthese ab und muss im Zweifel für jeden Prozess einzeln evaluiert werden. Grundsätzlich besteht innerhalb der Industrie ein großes Interesse an enzymatischen Prozessen und durch enge Zusammenarbeit mit Forschergruppen gelingt es mehr und mehr biokatalytische Prozesse zu etablieren. Partiell

4

4. Einleitung

werden diese bereits industriell angewandt, zum Teil bereiten akademische Arbeiten durch z.B. die Herstellung von chiralen Bausteinen eine solche Entwicklung gerade vor.^[29, 30]



Abbildung 1. Zusammenfassung der grundsätzlichen biokatalytischen Prozesse die in der pharmazeutischen Industrie Anwendung finden.

Ein aktuelles Beispiel aus dem Jahr 2019 ist in **Abbildung 2** dargestellt und zeigt die wichtigsten Schritte eines von Merck & Co. etablierten, chemoenzymatischen Prozesses zur Synthese des HIV-Wirkstoffs Islatravir.^[30, 31] Über insgesamt fünf Schritte unter Verwendung von neun Enzymen konnte die enantioselektive Synthese durchgeführt werden. Während der Prozessoptimierung wurden fünf dieser neun Enzyme mutiert, um einerseits die Umsätze der einzelnen Reaktionen zu erhöhen und andererseits die Selektivität des Gesamtprozesses zu verbessern. Die dargestellte Syntheseroute zeigt eindrucksvoll, wozu die Nutzung von Biokatalysatoren, gerade im Bereich der Wirkstoffsynthese nützlich ist. Gleichzeitig wird beim Blick auf diese Arbeit allerdings auch deutlich, dass ein enormer Aufwand betrieben werden muss, um einen solchen Prozess zu etablieren. So bleibt auch hier anzumerken, dass die Nutzung von Enzymen in der chemischen Industrie punktuell einen Vorteil bieten kann, allerdings keinesfalls muss. Ein Abwägen von Kosten und Nutzen, sowie Ressourcennutzung ist in jedem Fall ratsam und sollte vor dem Propagandieren einer industriellen Revolution beachtet werden.



Abbildung 2. Ausschnitt aus der chemoenzymatische Synthese des HIV-Wirkstoffs Islatravir von Merck & Co.^[30] **DERA**: Deoxyribosephosphate-Aldolase; **PPM**: Phosphopentamutase; **PNP**: Purinnukleosid-Phosphorylase.

Darüber hinaus gibt es vor allem im Bereich der späten und gezielten Funktionalisierung von Natur- und Wirkstoffen einen Bedarf für den Einsatz von regio-, chemo- und stereoselektiven Biokatalysatoren.^[32, 33] Insbesondere das späte, selektive einfügen einer Methylgruppe kann mitunter eine große Herausforderung sein und bietet sich als Ziel zur Implementierung geeigneter Biokatalysatoren an.^[31, 34] Deshalb gilt es für die Zukunft, neue Biokatalysatoren für bisher nicht mögliche Transformationen zugänglich zu machen, dabei gleichzeitig die vorhandenen Biokatalysatoren gut zu nutzen und durch rationales Design oder gerichtete Evolution an die Aufgabenstellung anzupassen. So könnte die Biokatalyse zukünftig für einen breiten Anwendungsbereich nutzbar gemacht werden und Ihren Beitrag zu einer nachhaltigen Industrie leisten.

4.2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung von Methyltransferasen als Werkzeug zur selektiven Synthese verschiedener Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierter Naturstoffe. Dafür werden chemische und biologische Methoden kombiniert, um einen ökonomisch sinnvollen Zugang zu diesen Naturstoffen zu ermöglichen. Ergänzt wird die Arbeit durch eine pharmazeutische Betrachtung und die erhaltenen Verbindungen sollen hinsichtlich ihrer Bioaktivität und Eignung als Wirkstoff untersucht werden.

Für die Biosynthese von Physostigmin (1) in *Streptomyces griseofuscus* ist bekannt, dass die Methyltransferase *Sg*PsmD das Schlüsselenzym darstellt und durch stereoselektive Methylierung am *C*-3 Indol einerseits das Stereozentrum einbringt und andererseits die Bildung des Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Grundgerüsts (2) katalysiert. Dieses Enzym soll zunächst biochemisch charakterisiert werden und basierend darauf sollen weitere *C*-3 Indol-Methyltransferasen zur Enzym-Bibliothek hinzugefügt werden. Diese sollen schließlich zur präparativen, stereoselektiven Synthese bioaktiver Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole (2) genutzt werden (Abbildung 3, Route A).

A. Stereoselektive C-3 Indol Methylierung



Max. Ausbeute 50 %

Abbildung 3. Übersicht der Zielsetzung dieser Arbeit. **A.** Nutzung der C-3 Indol-Methyltransferase SgPsmD aus der der Biosynthese von Physostigmin in Streptomyces griseofuscus zur stereoselektiven Synthese von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen. **B.** Kinetische Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol unter Nutzung der N-Methyltransferase SgPsmC aus der der Biosynthese von Physostigmin in Streptomyces griseofuscus.

Zur Erweiterung der möglichen Substanz-Bibliothek soll zusätzlich die *N*-Methyltransferase PsmC, welche aus demselben Biosynthese-Gencluster stammt, charakterisiert und hinsichtlich einer möglichen Nutzung zur kinetischen Racematspaltung von chemisch zugänglichen Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen untersucht werden (**Abbildung 3**, **Route B**). Durch den Einsatz von **Route A** und **Route B** soll eine Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierte, über Biokatalyse zugängliche, Naturstoff-Bibliothek aufgebaut werden.

4. Einleitung

Da für Verbindungen dieser Alkaloid-Familie, speziell Physostigmin (1), eine Bioaktivität gegenüber den pharmazeutisch relevanten Zielenzymen Acetylcholinesterase (AChE) und Butyrylcholinesterase (BChE) bekannt ist, soll die hier hergestellte Substanz-Bibliothek zunächst in diesem Kontext auf ihre Bioaktivität hin untersucht werden. Darüber hinaus sollen in Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) weitere molekulare Zielstrukturen identifiziert und die Wirkstofftauglichkeit dieser Verbindungen sowie deren pharmakokinetisch relevante Parameter mit Hilfe von *in silico* Methoden evaluiert werden.

5. KENNTNISSTAND

5.1 Die Rolle von Naturstoffen in der Pharmazie

Seit Beginn der Menschheitsgeschichte spielt die Verwendung von Naturstoffen eine elementrare Rolle und trägt maßgeblich zu unserer Entwicklung bei.[35] Dabei stammt das Wissen über die Nutzbarkeit und richtige Verwendung von Pflanzen meist aus Regionen mit einer hohen Biodiversität wie Südamerika, China oder Afrika, eine Wiege für (Hoch)-Kulturen.^[36] Was mit der Verwendung von Kokablättern begann und mit der Entdeckung von Penicillin durch Fleming seinen Lauf nahm, zieht sich bis heute in die moderne Medizin und begründet die gezielte Verwendung von Naturstoffen zur Behandlung von Krankheiten, Symptomen oder als Rauschmittel.^[37-39] So stellten und stellen Naturstoffe noch heute eine wichtige Quelle zur Entwicklung neuer Wirkstoffe dar.^[40] Von marinen Organismen über die Entschlüsselung und Entdeckung von bisher unbekannten Sekundärmetaboliten aus Bakterien bietet die Natur eine unerschöpfliche Quelle an Möglichkeiten.^[41-44] Gerade deshalb verwundert es nicht, dass ein Großteil der in den letzten vier Jahrzehnten zugelassenen Medikamente ihren Ursprung in Naturstoffen haben oder von Naturstoffen inspiriert wurden.^[40] Trotz der Beliebtheit von Naturstoffen als Medikamente, oder zumindest als Leitstruktur für diese, ist es selten möglich. Naturstoffe direkt als Medikament einzusetzen.^[45-47] Deutlich öfter müssen entsprechende Substanzen mit Hinblick auf ihre Pharmakokinetik und Pharmakodynamik weiter optimiert werden. [33, 48, 49] Insofern wurden die Bemühungen zur Identifizierung und Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten intensiviert und erweitert, ohne das die Bedeutung von Naturstoffen dabei abgenommen hat.^[50]



Abbildung 4. Anteil der Naturstoffe an der Gesamtzahl der zugelassenen Wirkstoffe von 1981 bis 2019.^[40] Adaptiert und verändert nach Newman *et al.*^[40]

5.1.1 Entwicklung von (neuen) Wirkstoffen

Während Naturstoffe ein Eckpfeiler bei der Entdeckung und Entwicklung neuer bioaktiver Verbindungen und Grundgerüste sind, gibt es darüber hinaus weitere Möglichkeiten, um neue Wirkstoffe zu entdecken. Mittlerweile besitzt iedes Pharmaunternehmen eine Substanz-Bibliothek, die meist mehrere Millionen niedermolekulare Substanzen umfasst.^[51, 52] Ergänzt wird dies durch kommerzielle Anbieter wie MolPort, die laut eigenen Angaben ein Netzwerk von 75 Anbietern und Herstellern von chemischen Verbindungen haben und insgesamt rund 8 Millionen Substanzen in ihrer Bibliothek vereinen. Gerade für akademische Screening Zwecke ist dies gut geeignet und wird in in silico basierten Entwicklungsprozessen häufig als essenzieller Filterschritt genutzt.^[53, 54] Wie schnell damit auf aktuelle Herausforderungen eingegangen werden kann, zeigen verschiedene Publikationen mit Blick auf die Bekämpfung des Coronavirus bzw. einer COVID-Erkrankung. Vor allem für akademische Gruppen wäre ein Screening mit vorgeschalteter Synthesearbeit innerhalb von einem Jahr kaum möglich. Durch Nutzung der verfügbaren Bibliotheken konnten allerdings erste Arbeiten hinsichtlich der Inhibition verschiedener elementarer Strukturen des Virus publiziert werden.^[53, 55-57] Diese Arbeiten haben gemeinsam, dass in silico Methoden verwendet wurden, um eine Vorhersage über die Aktivität der zu testenden Substanzen gegen eine bestimmte Zielverbindung treffen zu können. Basis für die rasante Entwicklung ist die steigende Anzahl von charakterisierten Zielstrukturen durch Proteinstrukturbestimmung über NMR oder Kristallstrukturen. Das ermöglicht deutlich genauere Aussagen mittels docking-Experimenten. Durch dezentrale, zur Verfügung gestellte Rechenleistung können molecular dynamics implementiert werden, wodurch die reale Flexibilität von Proteinen, insbesondere bei der Interaktion von Protein und Ligand, mehr Berücksichtigung findet.^[58-61] Die zu verarbeitende Datenmenge steigt dadurch deutlich an, wodurch mehr und mehr künstliche Intelligenz und machine learning Prozesse eingesetzt werden können und müssen.^[62, 63]

Neben den *in silico* basierten hochdurchsatzfähigen Ansätzen, haben sich in der pharmazeutischen Industrie weitere Hochdurchsatz-Screenings durchgesetzt. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen dem sogenannten phänotypischen Screening (engl. *phenotypic drug discovery*) und der nach Zielstruktur gerichteten Wirkstoffsuche (engl. *target-based drug discovery*). Diese Ansätze umfassen Hochdurchsatz-Screening-Methoden auf molekularer Ebene, bei denen der Einfluss von Natur- und Wirkstoffen auf ganze Zellen, respektive auf einzelne molekulare Zielstrukturen untersucht wird.^[64-68] Beim *target-based drug discovery* ist der Startpunkt eine klar definierte Zielstruktur, für welche gezeigt werden konnte, dass diese eine elementare Rolle bei der Entwicklung einer Krankheit spielt. Die Komplexität der Erkrankung wird auf ein bestimmtes Enzym, einen Rezeptor oder eine Protein-Protein Interaktion herunter gebrochen und die Modulation dieser Zielstruktur wird untersucht. Während auf den ersten Blick deutlich wird, worauf die Limitationen dieses Ansatzes fußen,

muss berücksichtigt werden, wieviel Wissen und Entwicklung zuvor in die Identifizierung einer geeigneten Zielstruktur geflossen ist. Dennoch bleibt ein offensichtlicher Kritikpunkt, dass die Gesamtkomplexität einer Krankheit nur selten über einzelne Zielstrukturen definiert werden kann. Über die letzten Jahrzehnte hinweg war target-based drug discovery eine treibende Kraft für Innovation und die Anzahl an verfügbaren, hochdurchsatzfähigen Assays ist enorm gestiegen. Von einfachen Enzymassays wie Kinase- oder Hydrolase-Screenings, über G-Protein gekoppelte Rezeptor Assays, bis hin zum Monitoring von Protein-Protein Interaktionen gibt es eine Vielzahl an etablierten und verfügbaren Methoden, die sich auch im akademischen Kontext eignen.^[68-71] Vorteilhaft ist dies vor allem für Gruppen aus der bioorganischen Chemie. da eine Zellkultur dafür oft nicht nötig ist und die meisten dieser (Bio-)Assays im 96-384 well plate Format durchführbar sind. Zu großen Teilen sind diese sogar kommerziell als Kit erhältlich und können ohne große Vorkenntnisse direkt genutzt werden.^[72, 73] Im pharmazeutischen Kontext muss allerdings beachtet werden, dass der Fokus auf eine bestimmte molekulare Zielstruktur, sowie die Durchführung der Assays in vitro, abseits von lebenden Zellen, oft dazu führt, dass eine Übertragung der identifizierten potenziellen Wirkstoffe (engl. hits) zu Wirkstoffkandidaten (engl. leads) oft schwierig ist, da unerwünschte Nebenwirkungen oder generelle Zytotoxizität an dieser Stelle keine Beachtung finden.^[74-77]

So begann sich der Fokus mehr auf die Phänotyp-basierten Assays zu verschieben. Entgegen den zuvor angesprochenen Nachteilen der target based drug discovery, wird die Komplexität einer Krankheit bei den phänotypischen Assays deutlich mehr berücksichtigt. Allein in die Entwicklung von Modellzelllinien werden oft mehrere Jahre investiert, um die Zusammenhänge eines Krankheit-assoziierten Phänotyps in einer untersuchbaren Zelle darzustellen. ^[64, 78] Eine Kenntnis über die mechanistischen Grundlagen der Krankheit ist außerhalb des Modells nicht notwendig und durch Fokussierung auf klinisch relevante Phänotypen können aktuell relevante Fragestellung direkt und zielgerichtet adressiert werden. Phänotypisches Screening hat den Vorteil, dass ein bias über die Wahl der Zielstruktur entfällt. Über die Beobachtung der Veränderung von morphologischen Eigenschaften, den vorhandenen Metaboliten und Markern, Veränderungen im Proteom oder Genom und dem Vergleich mit unbehandelten und gesunden Zellen, können substanzspezifische Veränderungen detektiert werden. Führen diese zu einer "Normalisierung" des Krankheit-assoziierten Phänotyps, kann zunächst von einem hit ausgegangen werden.^[79-81] Über die erhaltenen Daten kann zudem ein substanzspezifisches Profil erstellt werden. Eine direkte Folge daraus kann ein repurposing, also die Verwendung eines bekannten Wirkstoffes für die Behandlung einer neuen oder anderen Indikation sein, ein Trend, der sich mehr und mehr in der pharmazeutischen Industrie findet.^[82, 83]

Einen *hit* zu identifizieren bedeutet allerdings nicht, dass damit die Entwicklung eines Wirkstoffs abgeschlossen ist. Die Anpassung, Optimierung und Validierung eines *hits* hin zum

12

lead und später zum fertigen Wirkstoff dauert oft mehrere Jahre und stellt Medizinalchemiker vor große Herausforderungen (**Abbildung 5**).^[84, 85] Im Fokus steht dabei die Frage der Wirkstofftauglichkeit einer Verbindung und umfasst verschiedene Parameter, die häufig unter dem Begriff ADME zusammen gefasst werden.



Abbildung 5. Übersicht der erforderlichen Schritte der Wirkstoffentwicklung. Der gesamte Prozess nimmt im Schnitt 10–15 Jahre in Anspruch und kostet durchschnittlich eine bis fünf Milliarden Euro bis zur endgültigen Zulassung. Während verschiedene Hochdurchsatz-Screening Methoden, sowie vorhandene Substanz-Bibliotheken den Prozess der *hit* Identifizierung deutlich beschleunigt haben, ist die Wirkstoffoptimierung weiterhin ein Engpass in der Entwicklung. Darüber hinaus sind vor allem die klinischen Studien sowie der finale Zulassungsprozess langwierig und kostenintensiv.^[86-90]

ADME fasst dabei die wichtigsten Bereiche der Pharmakokinetik zusammen und befasst sich mit der Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion eines Wirkstoffs oder Wirkstoffkandidaten.^[91, 92] Die gezielte Optimierung dieser Eigenschaften ist das endgültige Ziel der medizinalen Chemie und unterscheidet eine bioaktive Verbindung von einem (potentiell) marktreifen Wirkstoff. Wichtige Molekülparameter bei dieser Betrachtung wurden bereits von Lipinski et al. zusammengefasst und beschreiben vereinfacht, welche Moleküleigenschaften statistisch gesehen die Wahrscheinlichkeit zur Eignung als Wirkstoff erhöhen (Tabelle 3). Dazu zählen neben dem Oktanol-Wasser-Verteilungkoeffizienten (clogP), die Gesamtatomzahl, das Molekulargewicht, die Anzahl der Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen die Anzahl der Akzeptoren und von Wasserstoffbrückenbindungen. Auch wenn die Nichterfüllung dieser Parameter schlussendlich kein Ausschlusskriterium sein muss, bieten die in Tabelle 3 dargestellten Parameter eine gute Richtlinie für Eigenschaften potenter Wirkstoffe.^[93, 94]

5. Kenntnisstand

Tabelle 3. Von Lipinski *et al.* aufgestellte Parameter zu Beschreibung von vorteilhaften Moleküleigenschaften von Wirkstoffkandidaten. **clogP**: Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient; **MW**: Molekulargewicht (engl. *molecular weight*); **HBD**: Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (engl. *hydrogen bond donor*); **HBA**: Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (engl. *hydrogen bond acceptor*).

Eigenschaft ^[a]	Bereich ^[a]	Bereich ^[b]	
clogP	<5	-0.4–+5.6	
MW (Da)	<500 Da	160–480 Da	
HBD	<5		
HBA	<10		
Gesamtatomzahl		20–70	

^[a] Lipinski *rule of five*^[93]

^[b] Parameter zur Beurteilung der *druglikeness*^[95, 96]

Von besonderer Bedeutung ist die Frage nach der Metabolisierung eines Wirkstoffes durch menschlichen Metabolismus kann dabei in den Körper. Der Primärund Sekundärmetabolismus unterschieden werden und nimmt maßgeblichen Einfluss auf die Dosierung, Art der Applikation und nicht zuletzt auf die Einhaltung der Dosierung (engl compliance) der Patienten.^[97, 98] Durch verschiedene Stoffwechselprozesse kann es beispielsweise zu einer Giftung des eingesetzten Medikaments kommen. Dieser Prozess beschreibt die Biotransformation eines Wirkstoffs durch körpereigene Enzyme hin zu einem Metaboliten, welcher toxische Eigenschaften besitzt.^[48, 99] Diese Prozesse zu verstehen und bei der Wirkstoffentwicklung zu berücksichtigen ist das Aufgabengebiet der sogenannten pharmazeutischen Chemie bzw. der Medizinalchemie. Ziel ist die gezielte Anpassung und Weiterentwicklung eines Wirkstoffkandidaten hin zu einem sicheren Arzneistoff.^[100]

5.1.2 Methyl – Die Allzweckwaffe des Medizinalchemikers?

Eine besondere Rolle in der medizinal-chemischen Optimierung von Leitstrukturen nehmen Methylgruppen ein.^[101, 102] Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der Klasse der niedermolekularen Wirkstoffe. Bereits 2016 enthielten bis zu 77 % dieser Wirkstoffe eine oder mehrere Methylgruppen, viele davon kohlenstoffgebunden.^[103] Dazu zählen einige bekannte Wirkstoffe wie Imatinib (6), Aprepitant (7) oder Esomeprazol (8) (Abbildung 6), welche allein Umsätze im Milliardenbereich generieren und über Jahre hinweg zu den meist genutzten Arzneimitteln gehören.^[102] Dabei hat das gezielte Implementieren von Methylgruppen ein klares Ziel und wird häufig verwendet um Moleküleigenschaften zu optimieren. Dazu gehört beispielweise die Löslichkeit. Durch Einbringen einer Methylgruppe wird eine graduierte Erhöhung der Lipophilie ermöglicht.^[104] Dies hat neben der Bioverfügbarkeit auch direkten Einfluss auf die Verteilung des Wirkstoffs im Körper.^[105] Darüber hinaus kann die Art und Weise

5. Kenntnisstand

der Biotransformation des Wirkstoffs durch gezielte Methylierung verändert werden. Das unter **Abbildung 6** abgebildete Antiemetikum Aprepitant enthalt in α-Position zum Sauerstoff eine Methylgruppe, was eine deutliche Steigerung der *in vivo* Halbwertszeit des Wirkstoffes zur Folge hat.^[106] *Vice versa* können neben der sterischen Abschirmung von metabolischen *hotspots* auch metabolische *softspots* durch Methylierung von Schwefel, Stickstoffen oder Sauerstoffen eingefügt werden. Diese können vor allem durch CYP (Cytochrom P-450) Enzyme leicht oxidiert und die Methylgruppe so entfernt werden, was eine Glucuronidierung ermöglicht und eine Exkretion des Wirkstoffs über den Harn erleichtert.^[48]



Abbildung 6. Beispiele bekannter und erhältlicher methylierter Arzneistoffe.

Die bisher beschriebenen Effekte fallen vor allem unter den Begriff der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Darüber hinaus gibt es Effekte basierend auf einer oder mehrerer Methylgruppen, die über das bisher beschriebene hinausgehen. Diese Effekte sind deutlich individueller zu betrachten und beziehen sich meist auf die Steigerung der Wirksamkeit des Wirkstoffes.^[107] Zusammengefasst werden diese Effekte unter dem sogenannten "*magic methyl effect*".^[102]

5.1.3 Der "magic methyl effect"

Bei der statistischen Auswertung von mehr als 2100 verschiedenen, methylierten Substanzen wurde deutlich, dass die Implementierung einer Methylgruppe genauso häufig zu einer verbesserten Affinität zur Zielstruktur führt, wie dies nicht der Fall ist.^[108] Trotzdem gibt es Beispiele, für die gezeigt werden konnte, dass es durch Implementierung einer Methylgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Potenz eines Wirkstoffs im Bereich von mehr als zwei Größenordnungen kommen kann.^[102] Ein solcher Anstieg lässt sich allerdings nicht mit der *desolvation* erklären, was typischerweise zu einem Anstieg der Wirksamkeit um das drei- bis

15

zehn-fache führt.^[109] Desolvation beschreibt einen der Prozesse, bei dem Wassermoleküle. die einen Liganden umgeben, verdrängt werden, um die Wechselwirkung des Liganden mit seinem Ziel zu ermöglichen.[110, 111] Es ist bekannt, dass dies direkt mit der Anzahl an Methylgruppen eines Liganden korreliert und die benötigte Energie zum Entfernen von Wassermolekülen bei steigender Anzahl von Methylgruppen sinkt.^[102] Steigerungen der Wirksamkeit, die den Einfluss des Effekts der desolvation übersteigen, werden gemeinhin unter dem "magic methyl effect" zusammengefasst.^[109] Da der "magic methyl effect" den Effekt der desolvation übersteigen kann, muss im Zweifel für jedes Beispiel evaluiert werden, woher der jeweilige Anstieg in der Wirksamkeit stammt. Zusätzlich spielt die Position, an welcher die Methylgruppe eingebracht wurde, sowie die Frage, ob die Methylgruppe ein Stereozentrum bildet, eine wichtige Rolle.^[106] Ein gutes Beispiel hierfür ist die Optimierung eines mGluR5 (metabotroper Glutamatrezeptor 5) Antagonisten von GSK (GlaxoSmithKline, London, UK).[112] Die molekulare Zielstruktur mGluR5 ist von großem Interesse und wird mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht.^[113] GSK gelang es, durch medizinal-chemische Optimierung einer Leitstruktur einen potenten mGluR5 Antagonisten zu identifizieren.^[112] Erreicht wurde dies durch sukzessive Testung wandernder Methylgruppen entlang des Strukturgerüsts von 9 (Tabelle 4). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es einige generelle Grundprinzipien gibt, welche den Anstieg der Wirksamkeit in Abhängigkeit der Position und Rolle der Methylgruppe beschreiben. Dabei ist vor allem der Einfluss der Methylgruppe auf die Konformation des Wirkstoffes wichtig. Wichtige Positionen für Methvlaruppen sind:

- 1. Methylgruppen als Substituenten an Aromaten in ortho Position^[114]
- 2. Methylgruppen an substituierten (Hetero-) Zyklen^[115]
- 3. Methylgruppen zwischen zwei frei drehbaren Bindungen^[116]

So bleibt festzuhalten, dass ein *"magic methyl effect"* existiert und ein durchaus nützliches Phänomen für die Optimierung von Wirkstoffen darstellt. Allerdings muss zwischen den verschiedenen Einzeleffekten der Methylgruppe klar unterschieden werden. Während manche Parameter vorherzusagen und zu berechnen sind, überraschen andere deutlich und sind nicht notwendigerweise auf andere Strukturen übertragbar. So bleibt der Einfluss der Methylgruppe am Ende ein, zumindest teilweise, magisches Phänomen.

	R ¹	R ²	R ³	R ²	mGlu5R
				Konfiguration	IС ₅₀ [nм]
	Н	Н	Н	—	>1000
R ³ _Ph	Н	Me	Н	rac	>1000
0~0	Me	Н	Н	—	>1000
$N = N^{-R^2}$	Ме	Me	Ме	rac	>1000
	Me	Ме	Н	S	>1000
ŭ	Ме	Ме	Н	R	40

 Tabelle 4. Entwicklung eines mGlu5R Antagonisten (GSK) durch sukzessive Testung diverser

 Methylierungsmuster basierend auf der Leitstruktur 9.^[113]

5.2 Bedeutung von Physostigmin

Ein weiterer bekannter Vertreter der methylierten Natur- und Wirkstoffe ist das Physostigmin (1) und seine Derivate. Physostigmin selbst ist ein Indolalkaloid, welches aus der Kalabarbohne (Physostigma venosum) neben anderen Indolalkaloiden isoliert werden konnte.[117] Bereits seit Ende des 19. Jahrhunderts ist dieser Naturstoff bekannt und wurde seitdem für verschiedene Indikationen genutzt.^[118] Heute wird Physostigmin aufgrund seiner schlechten pharmakokinetischen Eigenschaften vor allem lokal zur Behandlung des Glaukoms und zur Vorbeugung von Organophosphat-Exposition unter dem Namen Anticholium eingesetzt.^{[119,} 120] Grundlage für die Nutzung von Physostigmin ist seine parasympathomimetische Wirkung durch Inhibierung der Acetylcholinesterase (AChE).^[121] Dieses Enzym baut den Botenstoff Acetylcholin (10) in Cholin (11) und Essigsäure ab, was zu einer Abnahme der lokalen Konzentration von Acetylcholin (10) im synaptischen Spalt führt. Ist krankheitsbedingt aber ein Mangel des Botenstoffs vorhanden, oder soll der Parasympathikus angeregt werden, bietet sich die Acetylcholinesterase als molekulare Zielstruktur zur Behandlung an.^[122] Zusätzlich wurde Physostigmin zur symptomatischen Behandlung von Alzheimer untersucht, wurde aber aufgrund von nachteiligen pharmakokinetischen Eigenschaften nie von der zuständigen Zulassungsbehörde (FDA, Food and Drug Administration) für diese Indikation freigegeben.^[123] Betrachtet man den Mechanismus der Inhibition der AChE durch Physostigmin (1) (Abbildung 7) fällt auf, dass dieser ähnlich zur natürlichen Ester-Hydrolyse des Acetylcholins verläuft. Der Unterschied besteht hier vor allem in der Hydrolyse der Carbamat-Seitengruppe des Physostigmins (1) und der daraus resultierenden Carbamoylierung des katalytisch aktiven Serins. Während die Regeneration des acetylierten Serinrestes der AChE unter normalen Bedingungen rasch durch Wasser geschieht, ergibt sich aus der Carbamoylierung des Serin eine pseudo-irreversible Inhibition des Enzyms durch Physostigmin (1). Das Serin steht nicht zur Hydrolyse des Acetylcholins (10) zur Verfügung. Dieses sammelt sich im synaptischen Spalt und kann seine parasympathische Wirkung weiter entfalten.^[124] Bei der vorbeugenden Behandlung bei Organophosphat-Exposition wird erneut der pseudo-irreversible Mechanismus genutzt, um die AChE vor einer irreversiblen Inhibition durch Reaktion mit Organophosphaten zu schützen. Organophosphate wurden unter anderem als Düngemittel verwendet und sind mittlerweile in den meisten Ländern der Welt verboten. Darüber hinaus sind einige Vertreter dieser Klasse vor allem als chemische Kampfstoffe bekannt. Insbesondere Sarin erlangte dabei zweifelhafte Berühmtheit und wurde vermehrt während des ersten Weltkrieges eingesetzt und führte direkt oder durch Spätfolgen zum Tod vieler Soldaten. Heute ist der Einsatz von sogenannten ABC-Waffen, zu denen chemische Kampfstoffe sowie biologische Kampfstoffe zählen, durch die Chemiewaffenkonventionen grundsätzlich verboten.^[125-127] Eine Möglichkeit, die systemischen

5. Kenntnisstand

Nebenwirkungen von Physostigmin (**1**) zu umgehen, war die transdermale Anwendung.^[128] Auch die Anwendung in Form von Mikropartikeln wurde untersucht.^[129]



Abbildung 7. A. Abbau von Acetylcholin durch die katalytische Triade der Acetylcholinesterase und angedeutet die Regeneration des katalytisch aktiven Serins durch Wasser. **B.** Reaktion der Acetylcholinesterase mit Physostigmin (1) und angedeutet die Regeneration der Acetylcholinesterase durch Wasser. Der Vorgang ist aufgrund seiner langsamen Geschwindigkeit pseudo-irreversibel. Adaptiert und verändert nach Lao *et al.*^[123]

5.2.1 Physostigmin und Physostigmin-Derivate

Neben synthetischen Physostigmin-Derivaten konnten aus der Kalabarbohne weitere Indolalkaloide isoliert werden, die alle einen ähnlichen Aufbau aufweisen.^[130] Für die synthetischen Derivate konnte grundsätzlich ein Trend hin zu sterisch anspruchsvolleren Carbamaten beobachtet werden, mit dem Ziel, den unspezifischen Abbau des Physostigmins durch körpereigene Esterasen zu verhindern oder zu verlangsamen und so die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Wirkstoffe gegenüber Physostigmin (1) zu verbessern.^[131, 132] Zusätzlich wurden basierend auf dem Physostigmin
Pharmakophor Wirkstoffe entwickelt, welche besser zur lokalen Anwendung geeignet sind, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Somit können sie keine Nebenwirkungen im zentralen Nervensystem hervorrufen und weisen damit weniger drastische Nebenwirkungen auf.^[133]



Abbildung 8. Übersicht verschiedener Physostigmin-Derivate und Analoga. Strukturelle Ähnlichkeiten wurden hervorgehoben (blau) und das stereogene Zentrum mit der Methylgruppe markiert (roter Kreis).
A. Indolalkaloide die aus der Kalabarbohne (*Physostigma venosum*) isoliert werden konnten. B. Ausgewählte Beispiele für synthetische Physostigmin-Derivate. C. Physostigmin Analoga, welche zur lokalen Anwendung optimiert wurden.

Wie in **Abbildung 8** gezeigt, weisen vor allem die isolierten Indolalkaloide, sowie die synthetischen Derivate eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zueinander auf. Das blau markierte Pyrroloindolin-Grundgerüst findet sich in allen relevanten Verbindungen dieser Klasse. Zusätzlich ist die rot markierte Methylgruppe von enormer Bedeutung und nimmt sowohl in der synthetischen Herstellung als auch in der Biosynthese dieser Verbindungen eine wichtige Rolle ein. Auffällig dabei ist die Stereoinformation, welche mit dieser Methylgruppe in das Molekül implementiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass das (+)-Physostigmin Enantiomer (3a*R*,8a*S*) eine um das 1000-fach geringere Bioaktivität im Vergleich zu (-)-Physostigmin (3a*S*,8a*R*) aufweist, was hervorhebt, wie wichtig es ist, diese Methylgruppe in der richtigen Orientierung während der Synthese zu implementieren.^[130] Um dieses Ziel zu erreichen, gibt es heute mehr als 70 verschiedene Totalsynthesen von Physostigmin (1), ca. die Hälfte davon führt zu einer enantiomerenreinen Verbindung. Dennoch bleibt vor allem die Implementierung eine chemische Herausforderung und es werden immer neue Methoden entwickelt.^[134]

5.2.2 Totalsynthese von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten

Percy Julian and Josef Pikel gelang es 1935 die erste Totalsynthese von Physostigmin (1) durchzuführen.^[135] Über fünf Schritte konnte Physostigmin (1) in enantiomerenreiner Form erhalten werden. Die Trennung der Enantiomere erfolgte über die Bildung diastereomerer

Salze und Trennung durch fraktionierte Kristallisation unter Nutzung der Auxiliare *D*-Camphersulfonsäure und D-Weinsäure.



Abbildung 9. Erste Totalsynthese von Physostigmin (1) nach Percy *et al.* 1935. Ausgehend von Oxindol **20a** wurde das Amin **21** durch Umsetzung mit 1,2-Dibromethan und Methylamin erhalten. Die Racematspaltung durch Kristallisation wurde mit D-Camphersulfonsäure und D-Weinsäure durchgeführt, um das (*S*)-Amin **22** zu erhalten. Mit Natrium und Ethanol wurde das Amin reduziert und (3aS,8aR)-Eserthol **23** erhalten. Das Phenol wurde mit AlCl₃ entschützt, was (3aS,8aR)-Eserolin (**12**) ergab.^[135] Die Carbamoylierung von (3aS,8aR)-Eserolin (**12**) in (3aS,8aR)-Physostigmin [oder (-)-Physostigmin] (**1**) unter Verwendung von Methylisocyanat wurde bereits von Polonovski und Nitzberg beschrieben.^[136]

Seitdem hat sich in der organischen Chemie einiges verändert, allerdings bleibt der Aufbau des Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Grundgerüsts der wichtigste Schritt in der Synthese. Zu den Herausforderungen gehören das quartäre stereogene Zentrum und der Aufbau des Pyrroloindol-Ringsystem.^[137, 138]

Unterschieden werden muss zwischen den klassischen Synthesewegen, deren Startpunkte häufig Indole oder Oxindole sind, und den neuen Synthesewegen, die sich vor allem durch die Nutzung von Metallkatalyse auszeichnen. Zu den klassischen Wegen zählen unter anderem der "biomimetische" Ansatz, der "Indol"-Ansatz sowie der "Oxindol"-Ansatz.^[139] Ausgewählte Stellvertreter der klassischen Ansätze sind in **Abbildung 10** dargestellt.



Abbildung 10. Ausgewählte Literaturbeispiele für die "klassische" Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen. Abgebildet sind die wichtigsten Schritte zur Bildung des Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Grundgerüsts. **A.** "Biomimetischer" Ansatz nach Yi *et al.*, der Aufbau des Grundgerüsts erfolgt direkt durch dearomative Zyklisierung. Bedingungen: **24a**, a). *t*-BuOK; b). E₃tB; c). Mel, THF, RT–40 °C, 24 h.^[140] **B.** "Indol" Ansatz nach Lucarini *et al.*; der Aufbau des Grundgerüsts erfolgt direkt durch eine [2+3]-Cycloaddition. Es wurde eine Diastereoselektivität mit einem *exo/endo* Verhältnis von 9:1 beobachtet. Bedingungen: **24a**, **25**, ZrCl₄, DCM, RT, 24 h.^[141] **C.** "Oxindol" Ansatz nach Barbas III. *et al.*, der Aufbau des Grundgerüsts erfolgt im Anschluss an die enantioselektive Nitro-Michael Addition, welche durch einen Organokatalysator (Thioharnstoff-Katalysator) ermöglicht wird. Bedingungen: **20b**, Nitroethylen, Thioharnstoff-Katalysator (10%), THF, -10 °C, 24 h.^[142]

Neue Syntheserouten bieten dagegen andere Ansätze und legen den Fokus deutlich mehr auf die Synthese enantiomerenreiner Verbindungen. Um neben den "klassischen" Synthesen auch neue Routen abzubilden, wurden in **Abbildung 11** aktuelle Beispiele zusammengefasst, die nicht vor 2019 publiziert wurden. So gibt es heute eine Vielzahl von möglichen Syntheserouten sowohl für den selektiven, als auch nicht selektiven Zugang zu Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen.^[143] Trotzdem besteht weiterhin Bedarf an neuen Technologien, da die hier vorgestellten Synthesen weder günstig, noch ausreichend nachhaltig für die Zukunft der Chemie sind. So bleibt die Frage nach der perfekten Lösung weiterhin offen, was Raum für den Einsatz alternativer Möglichkeiten bietet.^[34]



Abbildung 11. Aktuelle Beispiele metallkatalysierter Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Synthesen, welche zur Herstellung von Esermethol (30) genutzt wurden. A. Reduktive Arylalkenylierung unter Verwendung eines Nickelkatalysators. Bedingungen: 28a, Ni(COD)₂ (10 mol%), L15 (20 mol%), Zn, DMA, RT.^[144]
B. Enantioselektive Domino-Heck-Reaktion unter Verwendung eines Palladiumkatalysators. Bedinungen: 28b, MeOH, BnOH, CO/Ar = 1:6 (1 Atm.), Pd(TFA)₂ (6 mol%), Xida-Phos (15 mol%), CSF, Mesitylen, 45 °C, 48 h.^[145]
C. Nickel-katalysierte Carbamoyl-Iodierung. Bedingungen: 31, Mn, Nil₂ (15 mol%), (S)-*t*BuPHOX (15 mol%), KI, Toluol, 85 °C, 24 h.^[146]

5.2.3 Biologischer Zugang zu Physostigmin

Neben der chemischen Synthese gibt es auch andere Wege, Zugang zu Physostigmin (1) zu erhalten. Eine Methode, die dafür lange Zeit genutzt wurde, ist die Extraktion von getrockneten Pflanzenteilen der Kalabarbohne.^[147, 148] Allerdings ist für die Extraktion und anschließende Reinigung selbst kleiner Mengen der Zielverbindung getrocknetes Pflanzenmaterial im Kilogrammmaßstab notwendig. Dazu kommen noch weitere Wasch- sowie Trennschritte und säulenchromatographische Reinigungen unter Einsatz von bis zu 100 L Lösungsmittel.^[149] Aus aktueller Sicht erscheint eine klassische Extraktion weder als ökonomisch noch ökologisch sinnvolle Alternative.^[150] Industriell gab es bereits seit den frühen 1990er Jahren die Möglichkeit, Physostigmin (1) über Fermentation mit *Streptomyces griseofuscus* NRRL 5234 herzustellen.^[151] Dabei gelang es Zhang *et al.* durch gezielte Optimierung des Fermentationsmediums einen Produkttiter von bis zu 880 mg/L Kultur zu erreichen.^[152] Es blieb jedoch lange ungeklärt, wie der hier genutzt Stamm *Streptomyces griseofuscus* NRRL 5234 Physostigmin (1) biosynthetisch produziert.

Erst 2014, also knapp 20 Jahre später, konnten Liu *et al.* das für die Biosynthese verantwortliche Gencluster identifizieren und den dazugehörigen Biosyntheseweg entschlüsseln.^[34] Es konnte gezeigt werden, dass insgesamt sieben Enzyme an der Biosynthese von Physostigmin (1), ausgehend von 5-Hydroxytryptophan (33), beteiligt sind. Das Gencluster hat eine Größe von 8.5 kb und codiert für fünf Transferasen, eine putative Hydrolase und eine Decarboxylase. Die einzelnen Zwischenprodukte der Biosynthese konnten durch systematischen *knock-out* einzelner Gene erhalten und nachgewiesen werden. So konnte das gesamte Biosynthese-Gencluster entschlüsselt werden (

Abbildung 12).

Die Pyridoxal-5'-phosphat(PLP)-abhängige Decarboxylase PsmH decarboxyliert 5-Hydroxytryptophan (33), wodurch Serotonin (34) entsteht, das anschließend durch die N-Acetyltransferase PsmF zu N-Acetylserotonin (3a) acetyliert wird. 3a wird dann durch die O-Carbamoyltransferase PsmE zu Verbindung 35 carbamoyliert. Durch die N-Methyltransferase PsmA wird 35 durch N-Methylierung zu 3b. Die C-Methyltransferase PsmD methyliert das Molekül **3b** am C-3 des Indols, was zum nukleophilen Angriff des Amids auf das Iminium-Ion führt, sodass 2a gebildet wird. 2a wird dann durch die N-Methyltransferase PsmC zu der Verbindung 4a N-methyliert. 4a wird anschließend durch das Esterase/Lipase-Homolog PsmB zu 36 deacetyliert. Eine weitere Methylierung durch PsmC führt zu (-)-Physostigmin (1).



Abbildung 12. Übersicht der Physostigmin-Biosynthese in Streptomyces griseofuscus NRRL 5324. Adaptiert und verändert nach Liu *et al.*^[34]

Auffällig für dieses Gencluster ist, dass von insgesamt sieben Enzymen, drei zur Klasse der SAM (S-Adenosylmethionin)-abhängigen Methyltransferasen gehören. Während PsmA und PsmC N-Methyltransferasen sind, ist PsmD eine C-Methyltransferase. Für dieses Enzym konnte gezeigt werden, dass es den wichtigsten Schritt der Biosynthese von Physostigmin (1) katalysiert. An dieser Stelle der Biosynthese wird das stereogene Zentrum an der C-3 Position des Indols aufgebaut und gleichzeitig das Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Grundgerüst gebildet (Abbildung 13). Im direkten Vergleich der PsmD-Reaktion mit den chemischen Syntheserouten, welche den Zugang zu dem Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Grundgerüst ermöglichen, fällt auf, wie groß das Potential dieser biochemischen Reaktion ist. Die Natur dieser Biotransformation (Abbildung **13**) eindrucksvoll, zeiat mit wie mehrere Syntheseschritte durch ein einzelnes Enzym ersetzt werden könnten. Methyltransferasen, insbesondere SAM-abhängige, bieten nicht nur hier, sondern generell neue Möglichkeiten in

der organischen Synthese und zur gezielten späten Modifizierung von Natur- und Wirkstoffen, welche bisher weder chemisch noch biokatalytisch zugänglich waren.^[153]



Abbildung 13. Vorhergesagter Ablauf der PsmD-Reaktion. Nach erfolgter *C*-3 Indol-Methylierung läuft die Bildung von **2a** durch eine intramolekulare Reaktion spontan ab. Adaptiert und verändert nach Liu *et al.*^[34]

5.3 Methyltransferasen

Methyltransferasen (MTs, EC 2.1.1.-) sind Enzyme, die in allen Bereichen des Lebens zu finden sind. Sie stellen ein wichtiges biologisches Werkzeug zur Regulation einer Vielzahl verschiedener Prozesse dar. Insbesondere SAM-abhängige Methyltransferasen, die *S*-Adenosylmethionin (**SAM**, **37**) als Methyl-Donor verwenden, sind die primäre Quelle für die biologische Methylierung. Bei dem Methyltransfer wird SAM stöchiometrisch verbraucht und dabei *S*-Adenosylhomocystein (**SAH**, **38**; **Abbildung 14**) gebildet. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen und die Vielzahl an katalysierten Reaktionen bilden die SAM-abhängigen Methyltransferasen eine sehr heterogene und diverse Klasse von Enzymen, welche nichtsdestotrotz hochkonservierte Elemente besitzen.^[154, 155]



Abbildung 14. Die meisten Methyltransferasen verwenden S-Adenosylmethionin (**SAM**, **37**) als Cosubstrat, welches in den Zellen als primärer Methyl-Donor fungiert. Die elektrophile Methylgruppe am Sulfoniumzentrum wird auf ein geeignetes Nukleophil übertragen (in den meisten Fällen in einer S_N2-ähnlichen Reaktion), die von einer Methyltransferase katalysiert wird. Dabei entsteht das methylierte Substrat und S-Adenosylhomocystein (**SAH**, **38**).^[32]

5.3.1 SAM Abhängige Methyltransferasen – Klassen und Einteilung

Auffällig ist dabei die strukturelle Vielfalt der Substrate, welche methyliert werden können. Von den Bausteinen des Lebens wie DNA und RNA, über Makromoleküle wie Histone und anderen Proteine hin zu pharmazeutisch relevanten Natur- und Wirkstoffen lassen sich beteiligte MTs finden.^[155, 156] SAM-abhängige MTs werden im Allgemeinen nach den SAM-Bindemotiven in fünf Klassen eingeteilt. Die meisten der vorkommenden SAM-abhängigen MTs fallen unter die Klasse 1. Enzyme dieser Klasse werden zusätzlich nach ihren Zielsubstraten gruppiert. Man unterscheidet zwischen DNA-MTs (DMTs), Protein-MTs (PMTs) und MTs, die niedermolekulare Verbindungen oder Naturstoffe (NPMTs) methylieren, wobei letztere sowohl am Primär- als auch am Sekundärstoffwechsel beteiligt sind. Zwei weitere Klassifizierungen sind üblich: Eine auf der Grundlage des Methyl-Akzeptor-Atoms (meist O, gefolgt von N und C, in selteneren Fällen S, oder sogar Halogenide und Metalle) und die zweite auf der Grundlage der Strukturfaltung.^[32, 157] Wie zuvor beschrieben, sind MTs an der Regulation der Translation durch Methylierung der RNA entscheidend beteiligt.^[158, 159] So wurde in einigen Fällen gezeigt, dass das Fehlen bestimmter Methylierungsmuster der DNA zu einer

fehlerhaften Genexpression führt und damit einhergehend die Entstehung von Krebs fördert.^[160] Aktuelle Forschung im Zeichen der Corona-Pandemie zeigten darüber hinaus auch die Entwicklung von Inhibitoren gegen die Guanin *N*-7 Methyltransferase (nsp14) als Ziel für die Entwicklung antiviraler Wirkstoffe, um die Corona-Erkrankung zu behandeln.^[161] Auch wenn die Enzyme dieser Klasse insgesamt eine geringe Primärstrukturähnlichkeit aufweisen, welche bei nur 10 % liegen kann, und darüber hinaus sehr unterschiedliche Aufgaben übernehmen, teilen diese jedoch einige sehr distinkte Strukturmotive, welche sich zu großen Teilen in allen Enzymen dieser Klasse wiederfinden lassen.^[32]

Eines dieser Strukturmotive ist das "Rossmann-like superfold" in welchem sieben β-Stränge mit α -Helices abwechselnd aufeinander folgen.^[162] Das zentrale β -Faltblatt wird durch diese sieben einzelnen Stränge gebildet, welche durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind.^[154] Elementare Aufgabe dieser Kernstruktur ist die Bindung des Cosubstrats SAM. Es werden insgesamt drei Motive (I-III) unterschieden.^[157] Dabei wird SAM über das komplexe Zusammenspiel von Van-der-Waals Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen entlang der Motive I-III gebunden. Die Bindung des SAM erfolgt einerseits über Wechselwirkung des Motiv I mit dem Carboxyterminus von SAM, andererseits über die Wechselwirkung eines aciden, hoch konservierten Bereichs des Motivs II mit dem Ribose-Gerüst von SAM. Die glycinreiche GxGxG Sequenz ist besonders charakteristisch für SAMabhängige MTs und findet sich in allen MTs der Klasse I wieder. Zusätzlich interagiert ein flexibler Teil des C-Terminus von Motiv II (β-2) mit dem Adenosyl-Rest von SAM, während gleichzeitig sowohl das Amin als auch das Sulfoniumion mit flexiblen Teilen C-terminal zu β-4 wechselwirken.^[154, 163, 164] Die verschiedenen Motive sind durch längere Sequenzabschnitte voneinander getrennt, jedoch ist ihre Reihenfolge innerhalb der Polypeptidkette immer ähnlich.[164] Die konservierten Seguenzbereiche sind im nachfolgenden in den Motiven I-III in blau hervorgehoben.[158]

Motiv I:

V/I/L) (L/V) D/E (V/I) G (G/C) G (T/P) G.

Motiv II:

(P/G) (Q/T) (F/Y/A) D A (I/V/Y) (F/I) (C/V/L).

Motiv III:

L L (R/K) P G G (R/I/L) (L/I) (L/F/I/V) (I/L).

Die eigentliche Methylierungsreaktion verläuft nach einem S_n 2-Mechanismus. Dementsprechend stellt die Natur verschiedene Nukleophile zur Verfügung (C, O, N, S), welche die elektrophile Methylgruppe des SAM angreifen.^[165] Der Angriff des Nukleophils erfolgt von der Rückseite der sp³-hybridisierten Methylgruppe des SAM und es kommt zu der Ausbildung eines trigonalbipyramidalen Übergangszustandes.^[165, 166]

5.3.2 Methylierung von Naturstoffen und anderen small molecules

Natural product Methyltransferasen (NPMTs) kommen ubiquitär in der Natur vor. Sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien konnten diverse Biomoleküle nachgewiesen werden, welche eine spezifische Methylierung aufweisen.^[167, 168] Die meisten dieser Stoffe weisen eine Methylierung am Sauerstoff- oder Stickstoffatom auf. Zusätzlich konnten einige Beispiele für Regio- und stereoselektive *C*-Methylierung nachgewiesen werden.^[169-172]

5.3.2.1 O-Methyltransferasen

Brenzcatechin (*engl. catechol*) O-Methyltransferasen (COMT) sind die bekanntesten Vertreter der NPMTs und sind im menschlichen Körper an der Metabolisierung von Katecholaminen beteiligt. Die humanen COMTs sind damit eine pharmazeutisch relevante molekulare Zielstruktur und Gegenstand aktueller Forschung im Bereich der Parkinson-Therapie (**Abbildung 15**).^[173] Zusätzlich geraten COMT-Polymorphismen, also das Auftreten von Genvarianten, mehr und mehr in den Fokus und werden mit einer Reihe von psychischen Zuständen wie Angststörungen und Schizophrenie, aber auch speziell Essstörungen und Übergewicht in Verbindung gebracht.^[174]

Die COMT-Reaktion erfolgt regioselektiv, was die COMT für die Nutzung in der organischen Synthese interessant macht.^[175-177] Im Zuge dessen wurden COMTs beispielsweise zur Produktion von Vanillin (39) eingesetzt oder zur Dekoration von Tetrahvdroisochinolin (engl. tetrahydroisoquinoline (THIQ, 40))-basierter Naturstoffe verwendet.^[178, 179] Von Turner und Mitarbeitern konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Einsatz einer O-Ligninabbau gewonnene Ferulasäure Methyltransferase aus (41) zur 3.4-Dimethmoxyzimtsäure (42) umgesetzt werden konnte. Durch Kopplung dieser Reaktion mit einer Ammoniaklvase konnte ein Vorläufer von Levodopa (43) mit Titern von bis zu 600 mg/L durch Ganzzellbiokatalyse produziert werden.^[24]



Abbildung 15. Abbau des Botenstoffes Levodopa (**43**) zu 3-O-Methyldopa (**44**) durch die O-Methyltransferase (*Hs*COMT) aus *Homo sapiens*. Ein therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Parkinson und psychischen Erkrankungen ist die Inhibition der COMT und damit verbunden ein Anstieg des freien Levodopa. Eine Auswahl zur Behandlung verwendeter COMT Inhibitoren (Verbindung **45**–**47**) ist ebenfalls abgebildet.^[173]



Abbildung 16. Aktuelle Literaturbeispiele der Verwendung von O-Methyltransferasen zur biokatalytischen Bereitstellung von pharmazeutisch oder industriell relevanten Verbindungen. *Ec* = *Escherichia coli; Rn* = *Rattus norvegicus; Ej* = *Eriobotrya japonica.*^[178-180]

Die Nutzung und Anwendbarkeit der O-Methyltransferasen, sowohl in Ganzzellbiokatalyse-Reaktionen als auch durch Einsatz von isoliertem Enzym, zeigt deutlich das Potential der Anwendung dieser Biokatalysatoren in verschiedenen Bereichen (**Abbildung 16**). Ob die gezeigten Reaktionen – chemisch gesehen – wirklich die Lösung eines existenten Problems darstellen, bleibt abzuwarten und zeigt mehr einen Schritt Richtung nachhaltiger Industrie als in Richtung industrieller Revolution.^[181] Mangelnde Regioselektivität

sowie schlechte Umsatzraten limitieren häufig den Gebrauch von nativen Enzymen und ziehen einen aufwendigen Prozess der Optimierung durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign nach sich. Dies wurde jedoch für die COMT bereits erfolgreich durchgeführt und angewandt.^[182]



Abbildung 17. Sowohl Rebeccamycin (**50**) als auch Rapamycin (**51**) weisen *O*-Methyltransferasen als elementaren Teil ihrer Biosynthese auf. Während bei der Biosynthese von Rebeccamycin (**50**) eine MT (RebM) vorkommt, sind es bei Rapamycin (**51**) insgesamt drei MTs (RapM, RapI und RapQ) die im Laufe der Biosynthese die verschiedenen Methylierungsschritte katalysieren.^[183]

Darüber hinaus sollten O-Methyltransferasen erwähnt werden, welche bisher weniger für die industrielle Anwendung angedacht sind, aber einen großen Mehrwert in Bezug auf ihre Selektivität und adressierten Zielverbindungen mit sich bringen. Ein gutes Beispiel dafür ist die Zucker O-Methyltransferase RebM, welche in der Lage ist, selektiv die 4'-Hydroxy Gruppe von Rebeccamycin (50) (Abbildung 17) in Anwesenheit anderer, freier Alkohole zu methylieren.^[183] RebM ist Teil des Biosynthese-Genclusters von Rebeccamycin (50), eines Naturstoffs der antitumor Eigenschaften besitzt. Ein weiteres Beispiel ist RapM, eine von drei O-Methyltransferase aus der Biosynthese von Rapamycin (51). Rapamycin (51) ist ein häufig bekanntes Immunsuppressivum und wird zur Therapie nach erfolgter Organtransplantation verwendet. Neben RapM katalysieren RapI und RapQ jeweils ebenso die selektive O-Methylierung einer sekundären Alkoholgruppe in der komplexen Struktur von Rapamvcin (51).[184]

Sowohl für Rebeccamycin (**50**) als auch Rapamycin (**51**) sind mittlerweile Totalsynthesen bekannt und durchgeführt worden.^[185, 186] Für beide Synthesen ist eine divergierende Schutzgruppenstrategie notwendig. Die Anwendung von RebM und RapM zur gezielten Modifizierung des zuvor synthetisch hergestellten Grundgerüstes könnte eines der zukünftigen Anwendungsgebiete dieser Enzyme darstellen. Darüber hinaus ist es durchaus von Interesse, die außerordentliche Chemo- und Regioselektivität dieser Enzyme weiter zu evaluieren und gegebenenfalls auch auf andere Strukturmotive zu erweitern.^[167]

5.3.2.2 N-Methyltransferasen

Für die Anwendung von *N*-Methyltransferasen bietet sich insbesondere die Betrachtung der vorhandenen und notwendigen *N*-Methylierung von *N*-Heterozyklen sowie primäre Amine an. Beides sind Strukturmotive, die einerseits oft in Natur- und Wirkstoffen vorkommen und gleichzeitig problematisch in Bezug auf chemo- und regioselektive Methylierung sein können.^[187, 188] Dies gilt vor allem für Verbindungen mit *N*-Heterozyklus, beispielsweise Pyrazol (**53**), bei welchem die Tautomerisierung zu Heteroatomen mit vergleichbarer Reaktivität führt.^[189] Unter den Wirkstoffen, die einen *N*-Heterozyklus enthalten, sind es vor allem 5- und 6-gliedrige Ringsysteme, die mit über 70% den größten Teil dieser Klasse ausmachen.^[190] Betrachtet man zusätzlich die enorme Anzahl an Wirkstoffen, die nicht nur einen, sondern mehrere Heterozyklen oder auch freie Heteroatome aufweisen, wird deutlich, wie wichtig vor allem regio- und chemoselektive Reaktionen sind (**Abbildung 18**).^[187]

Doch fehlt es an Werkzeugen, um diese Reaktionen biokatalytisch durchführen zu können. Bengel *et al.* konnten anhand einer Nicotinamid *N*-Methyltransferase aufzeigen, wie die Bereitstellung eines solchen Werkzeuges aussehen und funktionieren kann, um die aufgeworfene Fragestellung zukünftig biokatalytisch beantworten zu können.^[169]

Natürlicherweise katalysieren Nicotinamid *N*-Methyltransferase (NMT) die Umsetzung von Nicotinamid (NAM) (**59**) zu Methyl-Nicotinamid (MNAM) (**60**). Dabei findet eine regioselektive *N*-Methylierung des Pyridin-Stickstoffs statt. Neben der Funktion von NAM als Vitamin B-3, spielt es auch bei diversen metabolischen Prozessen eine Rolle.^[191]

Für die NMT konnte initial gezeigt werden, dass eine *N*-Methylierung von Pyrazol (**53**) grundsätzlich möglich ist, wenn auch mit geringer Regioselektivität. Um das zu verbessern, wurde basierend auf der Kristallstruktur des Enzyms mit der sogenannten *FuncLib* Methode eine Bibliothek an NMT-Varianten erstellt, welche anschließend auf ihre Regioselektivität hin gegenüber verschiedenen Pyrazolen getestet wurde. Schließlich konnte für verschiedene Enzymvarianten verschiedene Selektivitäten gegenüber einer Pyrazol-Bibliothek gezeigt werden (**Abbildung 19**).^[169, 192]



Abbildung 18. Beispiele der in Wirkstoff vorkommenden 5- und 6- gliedrigen Heterozyklen und auf dem freien Markt erhältlichen Arzneistoffe die diese Heterozyklen als relevantes Strukturmotiv beinhalten. Zusätzlich wurden kritische Methylgruppen, deren selektive Einführung mit klassischen, chemischen Alkylierungsmethoden nicht trivial ist und ein Potential zur Implementierung von *N*-Methyltransferasen in der Synthesesequenz vorhanden wäre, hervorgehoben.^[169, 192]

Der damit erfolgte Transfer von natürlicher Reaktion hin zu artifiziellen, hoch selektiven Reaktivitäten ist ein Paradebeispiel für die Bereitstellung von innovativen Biokatalysatoren, die in der Folge zur Anwendung für die späte Modifizierung von Natur- und Wirkstoffen oder als Ergänzung in der Totalsynthese geeignet sind. Gerade für die Anwendung von *N*-Methyltransferasen ist eine Entwicklung in diese Richtung zu erwarten und weitere, ähnlich aufgebaute Publikationen werden in den nächsten Jahren folgen.^[193] In diesem Sinne wurden bereits weitere Arbeiten veröffentlicht, welche die Nutzung von *N*-Methyltransferasen zur regioselektiven Diversifizierung von Pyrazolen und eine selektive Mono-Methylierung von Anthranilsäure (**62**) zeigten.^[194, 195] Zusammengenommen sind das Startpunkte für eine spannende Entwicklung hin zu neuen, vielseitigen Biokatalysatoren.



Abbildung 19. Übersicht der Arbeit von Bengel *et al.* Beschrieben wurde ausgehend von einer Nicotinamid *N*-Methyltransferase (NMT) der Weg hin zu einer regioselektiven Pyrazol *N*-Methyltransferase mit deutlich gesteigerter Aktivität. Neben dem Methylpyrazol (**53a**) konnte eine Verbesserung der beiden getesteten Parameter für weitere Pyrazol Substrate **53b** und **53c** gezeigt werden. Adaptiert und verändert nach Bengel *et al.*^[169]

5.3.2.3 C-Methyltransferasen

5.3.2.3.1 C-3 Indol-Methyltransferasen

Der Aufbau einer C-C Bindung ist chemisch anspruchsvoll, insbesondere wenn diese an einer zuvor nicht aktivierten C-H Bindung stattfinden soll.^[167] Zunehmend sind es die SAM-abhängigen *C*-Methyltransferasen, die das Interesse für diese Art von Reaktion wecken und das bekannte chemische Portfolio um eine selektive Methode erweitern. Es konnte in einigen Fällen gezeigt werden, dass diese Biokatalysatoren großes Potential zur Anwendung in der organischen Synthese, aber auch in der späten Modifizierung von Natur- und Wirkstoffen besitzen.^[193, 196] In diesem Abschnitt soll der Fokus auf *C*-Methyltransferasen liegen, die entweder einen entscheidenden Schritt in der Biosynthese eines Naturstoffs katalysieren, oder deren Produkte besondere pharmazeutische Relevanz besitzen.

Im letzten Jahrzehnt konnte für einige Pyrroloindolin-basierte Naturstoffe gezeigt werden, dass *C*-3 Methyltransferasen nicht nur an der Biosynthese dieser Naturstoffe beteiligt sind, sondern die Reaktion des kernstrukturbildenden Schrittes katalysieren. Interessanterweise laufen diese Methyltransferase-Reaktionen mit einer hohen Stereoselektivität ab und die richtige Orientierung der Methylgruppe an der 3*a*-Position des Pyrroloindolins spielt eine wichtige Rolle für die Bioaktivität dieser Verbindungen.^[196-202]



(-)-Physostigmin (1)

(-)-Lansai B (63)

(+)-Nocardioazine A (64)

Abbildung 20. Beispiele für Naturstoffe mit Pyrroloindolin-Grundgerüst (blau) und Methylgruppe in 3*a*-Position. Für alle drei Naturstoffe konnte eine Bioaktivität gezeigt werden und es wurde gezeigt, dass *C*-3 Indol-Methyltransferasen an deren Biosynthese beteiligt sind.^[34, 201]

Zu diesen Naturstoffen gehören neben Physostigmin (1) die Diketopiperazine (DKP) (-)-Lansai B (63) und (+)-Nocardioazine A (64) Während Physostigmin (1) ein bekannter Acetylcholinesterase-Inhibitor ist und medizinisch bereits verwendet wird, gibt es für die Diketopiperazine bisher noch wenige biologische Daten. In ersten Studien konnte allerdings unterschiedliche Bioaktivitäten aufgezeigt werden. So wurde neben einem antitumor Effekt auch gezeigt, dass DKPs eine immunsuppressive Wirkung haben.^[199] Je nach Methylierungsmuster der Tryptophanreste gibt es monozyklische, einfach *C*-methylierte und doppelt *C*-methylierte DKPs. Diese entstehen durch die Methylierung von entweder einer oder zwei *C*-3-Indolpositionen, die dann die Zyklisierung zwischen dem C2-Atom des Indols und dem DKP-Stickstoff zu einem fünfgliedrigen Heterozyklus durchlaufen. Lansai B (63), Nocardioazin A (64) sind Vertreter der doppelt *C*-3 methylierten Indolalkaloide und leiten sich

von Cyclo-Tryptophan-Tryptophan-DKP ab.^[203, 204] Das steigende Interesse und die zunehmende Aufklärung von Biosynthesewegen führt dazu, dass mittlerweile einige *C*-3 Indol-Methyltransferasen bekannt geworden sind und teilweise auch charakterisiert wurden. Eine Auswahl an annotierten Genen, welche für *C*-3 Indol-Methyltransferasen codieren, ist in **Tabelle 5** zusammengefasst.

Tabelle 5. Übersicht der bekannten C-3 Indol-Methyltransferasen basierend auf ihrem jeweiligen Gen, dem Ursprungsorganimus und der zughörigen GenBank IDs.

Gen	Organismus	ID	Literatur
psmD_Sg	Streptomyces griseofuscus NRRL 5324	KF201694.1	[34, 205]
psmD_Sa	Streptomyces albulus	CP026094.1	[196]
stspM1_Ss	Streptomyces sp. HPH0547	MK573553.1	[198]
nozB	Nocardiopsis chromatogenes YIM 90109	WP_026123683	[204]

Trotz der strukturellen Vielfalt der Pyrroloindolin-basierten Naturstoffe, sind heute immer noch wenige *C*-3 Methyltransferasen identifiziert und charakterisiert worden. Insofern besteht noch viel Potential in der weiteren Forschung auf diesem Gebiet. Die katalysierte *C*-3 Indol-Methylierung unter der beobachteten Stereo- und Regioselektivität bleibt chemisch schwer zu überbieten und öffnet eine Nische für den Einsatz dieser Biokatalysatoren in der organischen Synthese.

5.3.2.3.2 Biochemische Friedel-Crafts Alkylierung

Die Friedel-Crafts-Alkylierung ist eine klassische organische Reaktion zur Alkylierung von vor allem aromatischen Systemen. Insbesondere für die großtechnische Anwendung ist diese Reaktion jedoch ökologisch aufgrund der erheblichen Menge von anorganischen Salzabfällen sowie der benötigten Energiemenge sehr bedenklich. Zudem ist eine regioselektive Mono-Alkylierung chemisch schwer zu erreichen. Daher wäre eine umweltfreundliche und selektive Alternative wünschenswert.^[206-208] Im Zuge dieser Entwicklung gelang es Biokatalysatoren zu identifizieren, welche in der Lage sind, regioselektiv aromatische Systeme zu monoalkylieren. Dies konnte anhand der Biosynthese von Novobiocine (**65**) gezeigt werden (**Abbildung 21**).^[209] Neben SsNovO konnte bereits eine weitere Coumarin *C*-Methyltransferase (*Sr*CouO) identifiziert und charakterisiert werden.^[168] Ein Mechanismus für die biokatalytische Alkylierung wurde bereits postuliert (**Abbildung 22**).



Abbildung 21. Ausschnitt der Novobiocin (**65**) Biosynthese. Die Coumarin *C*-Methyltransferase *Ss*NovO katalysiert die regioselektive Coumarin-Methylierung von **66** zu **67.** Adaptiert und verändert nach Pacholec *et al.*^[209]



Abbildung 22. Mechanismus der Coumarin-*C*-Methylierung durch *Sr*CouO. Nach Aktivierung des Coumarin-Grundgerüsts durch das katalytisch aktive His-120 kommt es zu einem nukleophilen Angriff des *C*-8 an SAM unter Bildung eines Intermediates, das deprotonierte Coumarin wird zusätzlich durch ionische Wechselwirkung über Arg121 stabilisiert. Die anschließende Tautomerisierung führt zur Rearomatisierung und Bildung von **69**. Adaptiert und verändert nach Gruber *et al.*^[168]

Für SrCuoO und *Ss*NovO konnte anhand eines Sequenzalignments von Gruber *et al.* gezeigt werden, dass die Aminosäuren His120 und Arg121 hoch konserviert sind und sich in beiden Sequenzen finden.^[168] Es ist davon auszugehen, dass der Mechanismus für beide Enzyme ähnlich ist (**Abbildung 22**). Die Suche nach homologen Enzymen hat bereits begonnen und es konnten einige strukturell ähnliche Enzyme identifiziert werden, die zukünftig dabei helfen können, die aufgezeigten Limitationen zu eliminieren und biokatalytische Friedel-Crafts-Alkylierung für eine größere Bandbreite von Substraten möglich zu machen.^[207]

5.3.2.3.3 Biochemische Isoprenyl-Methylierung

Teleocidin B (**70**) ist ein Indolalkaloid, das aus einer Indollactam und einer Monoterpen-Einheit besteht. Es wurde erstmals aus *Streptomyces mediocidicus* isoliert und ist eine Mischung von vier Stereoisomeren (Teleocidine (**70**) B1–B4). Es konnte gezeigt werden, dass Teleocidin B (**70**) ein Modulator der Proteinkinase C ist, was es zu einem potenziell wertvollen Molekül in der pharmazeutischen Entwicklung macht.^[210] Das Enzym TleD katalysiert dabei einen wichtigen Schritt in der Biosynthese (**Abbildung 23**). Dabei wird Teleocidin A (**71**) zu Teleocidin B (**70**) durch Methylierung an der Isopren Seitenkette (*C*-25) umgesetzt. Die Reaktion wird durch eine 1,2-Hydrid-Umlagerung, gefolgt von einem intramolekularen Ringschluss, vervollständigt.^[211]



Teleocidin A (71)

Teleocidin B1–B4 (70)

Abbildung 23. SmTleD katalysierte Isoprenyl-Methylierung innerhalb der Bisoynthese von Teleocidine B (70).^[211]

Ähnliche Reaktionen konnten innerhalb der Ergosterol-Biosynthese in Pilzen und Pflanzen beobachtet werden.^[212] Die Sterol-C24-Methyltransferase spielt eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Entwicklung. Sie wurde bisher allerdings vor allem als Kandidat zur Wirkstoffentwicklung und weniger zur Anwendung in der Biokatalyse betrachtet.^[213]

5.4 Cosubstrat SAM – vom Flaschenhals zur neuen Hoffnung?

Ungefähr 50 % aller bekannten Enzyme sind abhängig von einem oder mehreren Cofaktoren. Sie können nach ihrer chemischen Struktur (anorganisch vs. organisch), der Art der Verbindung mit dem Enzym (Cosubstrat vs. Coenzym) und ihrem allgemeinen Reaktionsmechanismus (selbstregenerierend vs. gruppenübertragende Cosubstraten) eingeteilt und klassifiziert werden.^[214, 215] Die häufigsten Cosubstrate, die in stöchiometrischen Mengen zur Verfügung gestellt werden müssen und für die Regenerationssysteme entwickelt wurden oder werden, sind zusammen mit ihrem Preis (in € pro mmol) in **Tabelle 6** zusammengefasst.

Tabelle 6. Übersicht der wichtigsten Cosubstrate, die für präparativen Biokatalyse relevant sind oder schon flächendeckend genutzt werden. Adaptiert und verändert nach Andexer *et al.* Die Preise wurden im März 2020 erhoben und stellen die von *Merck* (Darmstadt, Deutschland) gelisteten Preise dar.^[12]

Cosubstrat	Preis (€/mmol)
SAM (xC ₇ H ₈ O ₃ S, 500MG) (37)	1000
NAD(H) (Na ₂ xH ₂ O, 5G) (72)	127
NADP(H) (Na ₄ xH ₂ O, 5G) (73)	1808
ATP (Na ₂ xH ₂ O, 25G) (74)	13
Acetyl-CoA (xNa ⁺ yH ₂ O, 100MG) (75)	12791

Um Enzyme, die von den genannten Cosubstraten abhängig sind, für die präparative Synthese nutzbar zu machen, braucht es effektive Cosubstrat-Recyclingsysteme, um den Bedarf an Cosubstrat von stöchiometrischen auf katalytische Mengen zu senken. Dabei muss ein Recyclingsystem im Allgemeinen einige wichtige Punkte erfüllen, um für die präparative Biokatalyse einsetzbar zu sein. Die Regenerationsreaktion des Cosubstrats muss hochspezifisch sein und darf die Hauptreaktion nicht beeinträchtigen oder zu Nebenreaktionen führen. Durch die Einführung zusätzlicher Schritte in eine biokatalytische Reaktion entstehen zusätzlichen Kosten für die Produktion und den Gesamtprozess. Deshalb ist es vorteilhaft, wenige Enzyme zur Regeneration zu nutzen, statt ausladender bioinspirierter Regenerationszyklen. Die Kompatibilität aller Komponenten muss bei den verwendeten Reaktionsbedingungen gewährleistet sein und die nötige Optimierung eines Cosubstrat-Regenerationssystems zusätzlich zur Entwicklung eines neuen, biokatalytischen Prozesses kann in manchen Fällen eine große Herausforderung sein.^[216-218] Neben der Optimierung der regenerierenden Enzyme an sich (bspw. durch gerichtete Evolution), ist es vor allem die Prozessentwicklung, die im Fokus steht.^[219] So besteht ein gesteigertes Interesse daran, Enzymreaktionen nicht im batch, sondern im kontinuierlichen Flusssystem (engl. flow) durchzuführen. Hierfür konnte gezeigt werden, dass aufgrund der besser steuerbaren

Parameter der Enzymreaktion, Ausbeuten gesteigert werden und Prozesse insgesamt nachhaltiger und kosteneffizienter gestaltet werden konnten.^[220, 221] Insbesondere für NAD(H) (72) und NADP(H) (73) gibt es aktuelle Beispiele, die eine erfolgreiche Anwendung von Enzym-gekoppelten Regenerationsprozessen im *flow* zeigen.^[222, 223]

Für andere Cosubstrate, insbesondere SAM (37), gab es im letzten Jahrzehnt allerdings wenige Neuerungen und der präparative Einsatz von SAM-Recyclingsystemen war nahezu ausgeschlossen. Hauptgrund dafür waren die bisher notwendiaen Multienzym-Regenerationssysteme, die zur Verfügung standen, aber in ihrer Anwendung durch die enorme Komplexität eingeschränkt waren.^[224] Dies änderte sich als es Seebeck und Liao gelang, das erste, direkte SAM-Recyclingsystem erfolgreich zu etablieren.^[225] In Folge dessen entflammte geradezu ein "hype" auf diesem Forschungsgebiet und der Bedarf an SAM-Recyclingsystemen zur breiten Anwendung in der Biokatalyse steigt seitdem stetig an. In dem folgenden Abschnitt soll ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zur (Re-)Generierung von SAM (37) gegeben werden.

5.4.1 Systeme zur (Re-)Generierung von SAM

In den letzten Jahren stieg der Bedarf an zuverlässigen Methoden zur Erleichterung der *in situ* Generierung von SAM (**37**) und deren Einsatz zur biokatalytischen Methylierung. Dieser Trend führte zu der Entwicklung verschiedener (chemo-) enzymatischer Lösungen. Die Methoden unterscheiden sich nicht nur in ihrem grundlegenden Aufbau (lineare Versorgungsketten oder Kaskaden gegenüber echten Recycling-Ansätzen), sondern auch hinsichtlich der Anzahl der zugänglichen SAM-Derivaten (uSAM). Die Notwendigkeit der chemischen Synthese von Vorläufern, die Art und Verfügbarkeit des Opfersubstrats und die Gesamtzahl der Regenerationszyklen (*engl. total turnover number*, TTN) fließen in die Gesamtbetrachtung der Systeme mit ein und entscheiden darüber, welches System für eine bestimmte MT-Reaktion am besten geeignet ist. Wie generell für enzymbasierte Regenerationssysteme ist die Kompatibilität von Enzymen und Reaktionsbedingungen absolut entscheidend für eine erfolgreiche Implementierung und Durchführung.^[225-227]

Dabei lösen die enzymbasierten Ansätze nahezu alle Probleme, mit denen eine rein chemische Methodik zu kämpfen hat. Da für den eigentlichen SAM-Erzeugungsschritt Enzyme verwendet werden, verläuft die SAM-Synthese diastereoselektiv: Das biologisch inaktive und oft hemmende (R,S)-SAM-Diastereomer wird nicht gebildet und eine Reinigung ist nicht erforderlich. Die inhärente und problematische Instabilität von SAM wird durch die *in situ* Versorgung mit dem Cosubstrat umgangen, wodurch seine Expositionszeit begrenzt, und sein Abbau verringert wird.^[181, 228, 229]

5.4.2 Lineare SAM-Versorgungssysteme

Es gibt verschiedene Enzyme, die sich zum Einsatz in linearen SAM-Versorgungssystemen eigenen. Am weitesten verbreitet ist der Einsatz der Methionin-Adenosyltransferasen (MAT, EC 2.5.1.6), welche bereits mehrfach erfolgreich zu diesem Zweck eingesetzt wurden (**Abbildung 24**).^[230-232] Für die biochemische Bereitstellung von SAM (**37**) benötigt die MAT stöchiometrische Mengen ATP (**74**) und L-Methionin (**76**). Häufig wird der enzymatische Ansatz mit einer SAH (**38**) Hydrolase (SAHH) gekoppelt, um eine inhibitorische Wirkung des akkumulierten SAH (**38**) zu vermeiden.



L-Methionin (76)

SAM (37)

Abbildung 24. (Chemo-) enzymatische Herstellung von SAM (37) unter Nutzung der Methionin-Adenosyltransferase. $^{\left[230-232\right]}$

Eine Vielzahl an verschiedenen MATs wurde mittlerweile getestet, charakterisiert und im Hinblick auf ihre Promiskuität gegenüber L-Methionin Analoga hin untersucht. Die untersuchten MATs unterscheiden sich je nach Ursprung (prokaryotisch oder eukaryotisch) deutlich in ihrer Enzymaktivität und vor allem in ihrer optimalen Reaktionstemperatur. So wurden einige MATs aus thermophilen Bakterien isoliert, die ihre höchste Enzymaktivität jenseits von 80 °C erreichen. Für eine humane MAT (*Hs*MAT2) hingegen konnte gezeigt werden, dass eine große Bandbreite an L-Methionin Analoga als Substrat akzeptiert wurden. Die optimalen Reaktionsbedingungen lagen bei 37 °C.^[231]

Anstelle der MAT kann zur Nutzung eines linearen SAM Versorgungssystems auch die Chlorinase SalL aus dem marinen Bakterium *Salinispora tropica* genutzt werden. Über SalL kann SAM (**37**) durch die enzymkatalysierte Reaktion aus 5'-Chloro-5'-deoxyadenosin (CI-DA, **77a**) und L-Methionin (**76**) sowie L-Methionin Analoga **76a** hergestellt werden. Dieses System konnte im späteren Verlauf durch die Fluorinase (FDAS) aus *Streptomyces cattleya* unter Nutzung 5'-Fluoro-5'-deoxyadenosin (F-DA, **77b**) erweitert werden. Eine weitere Verbesserung des Systems gelang durch Nutzung von neuartigen ATP Analoga, was zu verbesserter Bildung von SAM Analoga und damit einhergehend eine Vergrößerung der zugänglichen Substrat-Bibliothek führte (**Abbildung 25**).^[233, 234]



Abbildung 25. (Chemo-) enzymatische Herstellung von SAM (37) und SAM Analoga 37a unter Nutzung von Dehalogenasen. A. SalL (*Salinispora tropica*) und FDAS (*Streptomyces cattleya*) generieren SAM (37) und SAM Analoga 37a aus 5'-halogenierten 5'-Deoxyadenosin Verbindungen und L-Methionin (76) sowie L-Methinon Analoga 76a. B. Zugang zu SAM Analoga 37a unter Nutzung von SalL (*Salinispora tropica*) aus CI-DA Analoga 77c und L-Methionin Analoga 76a.^[230-232]

Während die Nutzung von stöchiometrischen Mengen ATP (**74**) im Hinblick auf die Gesamtkosten zumindest diskutierbar und tolerierbar ist, wird eine präparative Nutzung der Halogenasen aufgrund des kommerziell nicht möglichen Zugangs zu CI-DA (**77a**) und F-DA (**77b**) sowie dem CI-DA Analoga **77c** vorerst scheitern. Einige chemische Syntheseschritte sind hier notwendig um diese Verbindungen zu erhalten, allerdings schwanken die Ausbeuten innerhalb der Synthese und die Isolation über säulenchromatographische Methoden ist notwendig, um sowohl die Methionin-Analoga als auch die Nukleosid-Analoga in reiner Form zu erhalten.^[231, 234] Dem gegenüber steht allerdings der Blumenstrauß an SAM Analoga **37a** der bisher schon zugänglich gemacht wurde. Durch zusätzliche Implementierung von SAH Hydrolasen erweitert sich die Enzymkaskade und es muss zumindest diskutiert werden, ob das im Sinne eines effizienten Systems ist und ein aus ökonomischer sowie ökologischer Sicht sinnvolles System ergibt. Aufgrund mangelnder Alternativen galten die linearen SAM Versorgungssysteme lange Zeit als beste Alternative zur Nutzung von stöchiometrischen Mengen SAM (**41**). Allerdings änderte sich das mit der Implementierung eines direkten, enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems.

5.4.3 SAM-Recycling

2019 wurde ein direktes SAM-Recyclingsystem von Seebeck et al. unter Verwendung eines einzigen Enzyms entwickelt. Eine Halogenid-Methyltransferase (HMT) aus Chloracidobacterium thermophilum (CtHMT) methyliert SAH (38) unter Verbrauch von kostengünstigem, kommerziell erhältlichem Methyliodid zu SAM (37). Das System zeigte eine hohe TTN von ~500 und wurde durch den Einsatz eines Nukleosidase-defizienten E. coli Amnt Stamms optimiert. Ein anhaltendes Problem war der Abbau des katalytischen SAH (38) durch SAH-Hydrolasen, wodurch die TTN limitiert wurde. Durch Implementierung des Nukleosidase-defizienten Stammes konnte dies gelöst werden. Dieses System ist leicht zu handhaben und es wurde gezeigt, dass es robuste und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Da nur katalvtische Mengen an SAH benötigt werden, handelt es sich um das erste SAM-Recyclingsystem.[225]



Abbildung 26. SAM-Recycling durch ein einziges Enzym unter Verwendung einer Halogenid-Methyltransferase (HMT) aus *Chloracidobacterium thermophilum* (*Ct*HMT), die SAH (**38**) durch Verbrauch von Methyliodid zu SAM (**37**) methyliert, welches dann für die eigentliche MT Reaktion zur Verfügung steht. Adaptiert und verändert nach Schneider *et al.*^[205]

Diese Entwicklung führte zu einem förmlichen Goldrausch auf diesem Gebiet und in der Folge wurden diverse Versuche unternommen, dieses System weiterzuentwickeln oder es für die Anwendung in der präparativen Biokatalyse zu nutzen. Seit 2019 wurde die Arbeit von Liao und Seebeck bereits 44-mal zitiert (Stand 22.01.22) und unterschiedlichste Anwendungen von Forscher*innen rund um die Welt beschrieben. Neben der Anwendung des Systems zur präparativen Bereitstellung von Natur- und Wirkstoffkandidaten, wurden auch Beispiele zur Anwendung in der Synthese von chiralen Synthesebausteinen und Isotopenmarkierung gezeigt. Aktuelle Literaturbeispiele für die Verwendung des enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems sind in **Tabelle 7** zusammengefasst. Die Zusammenstellung zeigt, wie divers und heterogen die getesteten und genutzten Enzyme sind und wie breit gleichzeitig das mögliche Anwendungsgebiet für diese Art von direktem, Enzym gekoppelten SAM-Recycling

ist. Allerdings konnte im Verlauf eine Limitierung aufgezeigt werden, die im Anschluss direkt

von mehreren Arbeitsgruppen adressiert wurde.

Tabelle 7. Zusammenfassung der Beispiele für die Nutzung des SAM-Recyclingsystems und deren Anwendung. **EgtD**: Ergotamin N-Methyltransferase aus *Mycobacterium smegmatis*; **IMT**: Inositol O-Methyltransferase aus *Mesembryanthemum crystallinum*; **PMT**: Putreszin *N*-Methyltransferase aus *Anisodus tanguticus*; **Nov**: Novobiocin O-Methyltransferase aus *Streptomyces niveus*; **SgvM**: C-Methyltransferase aus *Streptomyces griseoviridis*; **PsmD**: C-3 Indol-Methyltransferase aus *Streptomyces griseofuscus*; **NMT**: Nicotinamid *N*-Methyltransferase aus *Homo sapiens*; **OMT**: Isoeugenol O-Methyltransferase aus *Clarkia breweri*; **COMT**: Catechol O-Methyltransferase aus *Homo sapiens*.

Zielsetzung	Gekoppelte MT	Jahr	Quelle
Etablierung eines SAM -	EgtD; IMT; PMT; SgvM; NovO	2019	[225]
Recyclingsystems			
Synthese chiraler	SgvM	2020	[235]
<i>L</i> - und D-β-Methyl-α-aminosäuren			
Regioselektive Pyrazol N-Methylierung	NMT	2020	[169]
Regioselektive Catechol O-	OMT; COMT	2021	[179]
Methylierung			
Fluor-Methylierung als	EgtD; IMT; PMT; SgvM; NovO	2021	[238]
Synthesewerkzeug			
Präparative biokatalytische Herstellung	PsmD	2021	[205]
von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i>]indolen			

So konnte für die ursprünglich genutzt *Ct*HMT gezeigt werden, dass abgesehen von Methyliodid einerseits nur wenige andere Alkyl-Halogenide akzeptiert werden, und andererseits die Enzymaktivität sowohl generell als auch im speziellen für andere Alkyl-Halogenide gering ist. Dies führt zu Problemen für die weitere Anwendung dieses Systems im Hinblick auf die potenziell mögliche Produkt-Diversifizierung, gerade im Vergleich zu den bekannten linearen Versorgungssystemen, die eine große Auswahl an SAM-Analoga bereitstellen können.^[193, 240, 241]

Um diesen Flaschenhals zu umgehen, wurden verschiedene Ansätze parallel verfolgt. Zum einen wurde die bestehende Liste an charakterisierten HMT Enzymen durch eine Homologiebasierte Suche erweitert. Zum anderen wurden Enzym-Optimierungsansätze verfolgt, um bekannte HMTs zur Herstellung von SAM Analoga (**37a**) nutzbar zu machen (**Abbildung 27**).^[169, 195, 237] Zusätzlich besteht die Möglichkeit zur Optimierung eines Enzymes, als auch die Identifizierung neuer Enzyme als bekanntes und etabliertes Werkzeug zur Verfügung. ^[242, 243] als Den Anfang machte dabei die Arbeitsgruppe um Bornscheuer. Hier gelang es basierend auf einer Halogenid-Methyltransferase aus Aradiopsis thaliana, für welche es zu diesem Zeitpunkt bereits eine Kristallstruktur gab, HMT-Varianten durch gerichtete Evolution zu optimierten Varianten zum erzeugen. Für diese konnten einen ein breites Alkylhalogenid-Substratspektrum im Vergleich zu CtHMT gezeigt werden und gleichzeitig eine höhere Enzymaktivität erreicht werden. Die Durchführung dieser Experimente im präparativen Maßstab ermöglichte die Isolation von drei verschiedenen SAM-Analoga und durch Kopplung dieser Reaktion mit einer MT konnte eine erste Alkyl-Diversifizierung an niedermolekularen Verbindungen unter Verwendung des HMT-Recvclingsvstems durchgeführt werden.^[237] Basierend auf der Arbeit von Hauer entwickelte das Team von Hammer mit Hilfe von phylogenetischer Homologiemodellen und Analyse der Enzymklasse der Thiopurin-Methyltransferasen ein Sequenz-Netzwerk (engl. sequence similarity network (SSN). Damit konnte die bereits bestehende Liste an HMT Enzymen auf insgesamt elf ausgeweitet werden. Durch systematische Untersuchung dieser Enzyme mit einer Alkylhalogenid-Bibliothek konnte für jedes der getesteten Enzyme ein Halogenierungsprofil erstellt werden.^[195] Dies erleichtert den Zugang anderer Forscher*innen zu den HMT Systemen und es kann für jeden Zweck ein passendes Enzym basierend auf dem erhaltenen Profil ausgesucht werden. Es ist davon auszugehen, dass in den folgenden Jahren diese HMT-Bibliothek erweitert wird und gleichzeitig eine Verbesserung dieser Enzyme zum Einsatz in der industriellen Biokatalyse vorgenommen wird. Insofern bilden die hier gezeigten Arbeiten zwar den aktuellen Wissenstand ab, darüber hinaus herrscht allerdings weiterhin viel Bewegung und der "Goldrausch" wird, zumindest vorerst, weitergehen.

Wie zuvor angedeutet, gibt es auch die Möglichkeit den natürlichen SAM-Regenerationszyklus zu nutzen. Von dem Team um Andexer *et al.* konnte gezeigt werden, dass ein geschlossener SAM Kreislauf über 6 Enzyme erreicht werden kann (**Abbildung 28**).^[12] Dieses System wurde erfolgreich im biochemischen Maßstab etabliert, offenbarte allerdings Probleme was die Anzahl der möglichen Regenerationszyklen, die maximal erreicht werden kann, angeht. Dies konnte auf die mangelnde Stabilität von SAM und SAH zurückgeführt werden. Bei der *in vitro* Rekonstitution eines solch komplexen Systems ist der nicht Enzym-katalysierte Abbau von SAM eine stark limitierende Komponente. Deshalb wurden im Verlauf der Entwicklung zunehmend SAM-Isostere für die Verwendung des Regenerationszyklus implementiert (**Abbildung 29**).^[194] Damit konnte zwar erfolgreich ein nicht-enzymatischer Abbau von SAM verhindert werden, allerdings sanken durch Einsatz der Isostere die Umsätze der gekoppelten Reaktion um ca. 50%, da nicht alle Enzyme des Regenerationssystems die Nukleosid-Isostere gleich gut akzeptieren (**Abbildung 29**).

A. Enzym Optimierung durch gerichtete Evolution nach Bornscheuer et al.



B. Phylogenetischer (SSN) Ansatz nach Hammer et al.



Abbildung 27. Zusammenfassung der Weiterentwicklung des SAM-Recyclingsystems zur Herstellung von SAM Analoga **37a. A.** Ansatz nach Bornscheuer *et al.* Basierend auf der Halogenid-Methyltransferase aus *Aradiopsis thaliana* wurden Enzymvarianten durch gerichtete Evolution erzeugt, welche Alkylhalogenide akzeptieren und SAM Analoga erzeugten.^[237] **B.** Ansatz nach Hammer *et al.* Basierend auf bekannten HMTs wurde ein SSN (*sequence similarity network*) erstellt und neue HMTs konnten identifiziert und getestet werden. Eine HMT-Bibliothek aus 11 Enzymen wurde auf ihre Promiskuität gegenüber verschiedenen Alkylhalogenide (19 Substrate) hin untersucht.^[195]



Abbildung 28. Mehrstufiges, zyclisches SAM Regenerationssystem. **Ado**: Adenosin, **AMP/ADP/ATP**: Adenosin Mono-, Di-, Triphosphate, **polyP**: Anorganisches Polyphosphat, Adenosinkinase, **PPK2-I**: Polyphosphatekinase II, **PPK2-I**: Polyphosphatkinase I, **MAT**: Methionine-Adenosyltransferase, **MT**: Methyltransferase, **SAHH**: S-Adenosylhomocystein-Hydrolase. L-Met: L-Methionin. Adaptiert verändert und nach Andexer *et al*.^[12]



Abbildung 29. Nicht enzymatischen Depurinierung von SAM (37). Um einen Abbau von SAM (37) zu verhindern wurden SAM Isostere in den Regenerationszyklus implementiert und getestet. Es zeigte sich allerdings, dass über die sechs Enzyme hinweg SAM Isostere nicht gleich gut von allen Enzymen akzeptiert werden. So konnte zwar ein Abbau von SAM verhindert werden, gleichzeitig sanken allerdings die Umsätze in der gekoppelten Reaktion.^[194]

So bleibt zumindest die *in vitro* Rekonstitution des natürlichen SAM Zyklus schwierig. Die offensichtliche Alternative dazu ist die Nutzung der Ganzzellbiokatalyse. Dabei greift man auf die natürlichen SAM Reserven des Wirtsorganismus zurück und durch Einbringen einer oder mehrere Methyltransferasen in einen geeigneten Expressionsstamm (Plasmid-basiert oder durch Genomintegration) kann Biokatalyse durchgeführt werden. Für einen stetigen Nachschub an SAM muss dafür ein lebendes System verwendet werden, was bedeutet, dass das Zielsubstrat über die Zellmembran des genutzten Organismus transportiert werden muss,

um die gewünschte Reaktion zu durchlaufen. Aktuell gibt es wenige Beispiele der Nutzung von in vivo Biokatalyse zur Anwendung von Methyltransferasen. Allerdings konnten die Gruppe um Turner et al. zeigen, dass eine praktische Anwendung durchaus möglich ist.^[24] Durch gezielte Manipulation des SAM-Regenerationszyklus, durch Plasmid-basiertes Einbringen von nicht nur der Methyltransferase, sondern auch von Enzymen, welche an der Regulation der SAM Produktion in vivo beteiligt sind, konnten die Umsätze für die O-Methylierung von Ferulasäure von anfänglich knapp 20 % auf 100 % gesteigert werden. Die drei zusätzliche Enzyme sind notwendig, nehmen jedoch keinen Einfluss auf die eigentliche MT Reaktion haben, sondern fördern ledialich die Bereitstellung von SAM. Ähnliches wurde bereits 2016 für die de novo Biosynthese von Vanillin gezeigt.^[244] Insofern kann es hilfreich sein, für die in vivo Biokatalyse direkt auf bakterielle Expressionsstämme zurückzugreifen, welche bereits biotechnologisch für die Produktion von SAM optimiert wurden.^[245] Frei nach "dosis venenum facit" muss bei einem Eingriff in die Regulation des SAM Zyklus allerdings beachtet werden, dass eine Erhöhung der SAM-Konzentration in vivo zu einer gesteigerten DNA-Methylierungsrate führen kann, was zum vermehrten Auftreten von Mutationen im Genom des Expressionsstamms führt. Es wurde beschrieben, dass insbesondere das Zellwachstum davon negativ beeinflusst wird und damit eine Abnahme der Biomasse einhergeht.^[246] Insofern kann die Wahl des richtigen Produktionssystems eine wichtige Rolle spielen. Es wurde unter anderem gezeigt, dass auch verschiedene Hefestämme zur biotechnologischen Anwendung von MTs durchaus geeignet sein können und auch hier eine Regulation des SAM-Zyklus möglich ist.^[247, 248]

Es bleibt abschließend festzuhalten, dass der Einsatz von Methyltransferasen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie durch massive Fortschritte im Bereich der SAM-Regeneration über die letzten 5 Jahre hinweg möglich geworden ist. Stand heute fehlen noch die Anwendungsbeispiele im Gramm und Kilogramm Maßstab. Bei der Geschwindigkeit der aktuellen Entwicklung kann es aber nur eine Frage der Zeit sein, bis dieser Meilenstein erreicht wird und Methyltransferasen als omnipräsentes Werkzeug in der Biokatalyse genutzt werden können.^[249, 250]

6. EIGENE ERGEBNISSE

6.0 Schöne neue Welt der Methyltransferasen

Während andere Biokatalysatoren schon seit Jahrzehnten fester Bestandteil der organischen Synthese sind, wurden Methyltransferasen nur allmählich untersucht und werden erst seit wenigen Jahren für diesen Zweck aktiv genutzt. Dieser aktuelle Vorstoß in den Bereich der Methyltransferasen hängt einerseits maßgeblich mit der unaufhörlichen Suche der chemischen Industrie nach nachhaltigen Synthesemethoden zusammen und andererseits damit, dass Methyltransferasen an sich und ihre Rolle in der Natur stetig weiter erforscht und entschlüsselt wurden. Dabei kristallisierte sich zunehmend heraus, dass neben der enorm wichtigen Rolle dieser Enzyme sowohl bei der Regulation der Genexpression als auch der Regulation der Translation in Eukaryoten und Prokaryoten, diese Enzyme auch einen wertvollen Beitrag in der organischen Synthese leisten können.^[155, 156] Zum einen durch Implementierung dieser Biokatalysatoren in Totalsynthesen, welche dadurch kürzer und effizienter werden sollen. Zum anderen zur gezielten späten Modifizierung von Vorläufer Molekülen bei der Herstellung von Wirkstoffen. Im Folgenden Abschnitt wird auf die während dieser Arbeit erfolgte Identifizierung und Implementierung von Methyltransferasen für diesen Zweck eingegangen.

6.1 C-3 Indol-Methyltransferase SgPsmD

6.1.1 Expression und Reinigung von SgPsmD

Nachdem die Gensequenz der Ziel-Methyltransferase SgPsmD aus Streptomyces griseofuscus bereits 2014 von Liu et al. publiziert wurde, konnte für diese Arbeit via kommerzieller Gensynthese ein passendes Plasmid erstellt werden. An dieser Stelle wurde von einer Codonharmonisierung abgesehen. Die Gensequenz wurde als pUC57-*psmC_Sg-psmD_Sg* Plasmid bestellt. Die Gensequenz beinhaltete ursprünglich einen *tac*-Promotor (pTAC), da dieser für die Expression in *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli* geeignet ist. Im Vergleich zum T7-Promotor ist der pTAC allerdings ein schwacher Promotor und für eine Expression mit anschließender Reinigung des produzierten Enzyms nicht optimal geeignet und wurde im Folgenden ausgetauscht. Um *psmD_Sg* erfolgreich exprimieren zu können, musste zunächst eine Einzelvariante von *psmD_Sg* erzeugt werden und anschließend in ein für die Genexpression geeignetes Plasmid eingebracht werden. Hierfür wurden die vorhandenen Schnittstellen für *psmD_Sg* (Xhol) und *psmC_Sg* (NdeI) genutzt und sowohl pUC57-*psmC_Sg-psmD_Sg* als auch der der Zielvektor mit Hilfe der angezeigten Restriktionsenzyme verdaut (**Abbildung 30**). Nachdem das pUC57-*psmC_Sg-psmD_Sg* Plasmid mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut wurde, konnten die einzelnen

Fragmente (ca. 1000 kb) *via* 1 %igem Agarosegel von dem restlichen Vektor getrennt werden (**Abbildung 31**). Anschließend wurde das Fragment aus dem Gel eluiert und mit dem zuvor verdauten pET21a(+)–Vektor unter Zugabe einer T4 Ligase über Nacht ligiert.



Religation von Vektor und Insert

Abbildung 30. Übersicht der verwendeten Klonierungsstrategie zur Herstellung der Einzelvarianten pET21a(+)-*psmD_Sg* und pET21a(+)-*psmC_Sg* aus dem Ursprungsplamid. Es wurde eine Restriktion gefolgt von einer Ligation durchgeführt. **HIS**: *6x His-Tag*, **Term**: T7-Terminatorsequenz, **pTAC**: *tac*-Promotor.



Abbildung 31. Ergebnisse der Klonierung von pET21a(+)-*psmD_Sg.* **A**. 1 % Agarosegel des Restriktionsverdaus von pUC57-*psmC_Sg-psmD_Sg* (ca. 6000 kb) mit Ndel oder Xhol zur Gewinnung und Reinigung des gewünschten Inserts (ca. 1000 kb). M = 1 kb DNA *Ladder (Thermo Fisher Scientific,* Waltham, MA, USA). **B**. Analyse der Kolonie-PCR nach der Transformation von *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsmix von pET21a(+)-Vektor [geschnitten] und *psmD_Sg*-Insert [geschnitten und gereinigt] mit den Primerpaar T7P und T7T. Dargestellt sind die untersuchten Klone 1–8 bzw. deren Amplifikationsprodukte (Zielprodukt ca. 1000 kb).

Nach erfolgter Ligation wurde der Ligationsmix direkt für die Transformation von *E. coli* DH5 α genutzt. Die erhaltenen Kolonien wurden anschließend mittels Kolonie-PCR analysiert. Hierfür wurden Primer genutzt welche spezifisch an der T7-Promotorsequenz des pET21a(+) oder an

der T7-Terminatorsequenz von pET21a(+) binden. Im Weiteren wurden ausschließlich Kolonien genutzt, für welche mittels Agarosegelelektrophorese eine Bande mit der erwarteten Fragmentgröße (ca. 1000 kb) nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 31**).

Mit Hilfe der Kolonie-PCR konnten zwei von acht getesteten Kolonien positiv evaluiert und identifiziert werden (Nr. 4 und 7, **Abbildung 31**). Basierend auf der Analyse enthielten Klon 4 und Klon 7 das Plasmid mit dem Insert der richtigen Größe (ca. 1000 kb). Für die weiteren Kolonien konnten Produkte mit einer Größe von ca. 2000 kb beobachtet werden, welche auf einen unvollständigen Verdau des ursprünglichen Plasmids zurückzuführen sind. Die beiden positiven Klone wurden kultiviert und anschließend das Plasmid isoliert. Nach erfolgter Sequenzierung konnte das gewünschte Plasmid pET21a (+)-*psmD_Sg* für die anschließende Expression genutzt werden.

Die Expression des Zielgens erfolgte durch Transformation von E. coli BL21 Gold (DE3) mit dem Plasmid pET21a (+)-psmD Sg. Nach dem Ausplattieren auf LB-Agar unter Ampicillin Selektion konnten einzelne Kolonien erhalten und anschließend kultiviert werden. Aus einer Übernachtkultur, welche zunächst durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und mit frischem TB Medium, Ampicillin und 1 % (w/v) Glukose gewaschen wurde, konnte die Hauptkultur inokuliert und bei einer OD₆₀₀~0.5 die Expression durch Zugabe von IPTG (0.5 mM finale Konzentration) induziert werden. Nach 16 h bei 30 °C und 180 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und via SDS-PAGE analysiert. E. coli BL21 Gold (DE3) wurde bereits erfolgreich von Liu et al. zur Expression des Zielgens eingesetzt und ist eine Weiterentwicklung des E. coli BL21(DE3).^[34] E. coli BL21 Gold (DE3) ist für höhere Proteinausbeuten bekannt, da durch den endA und Hte Genotyp zusätzlich die Transformationseffizienz erhöht wird.^[34, 251] Basierend auf der Proteinsequenz waren durch theoretische Berechnung Größe und molarer Extinktionskoeffizient des Zielproteins bekannt. Diese wurden im Folgenden genutzt, um die Enzymkonzentration zu bestimmen, oder eine Verifizierung der Proteingröße von ~30.5 kDa via SDS-PAGE durchzuführen. Alle relevanten Parameter, die zur Überprüfung von SgPsmD verwendet wurden sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Zusätzlich wurde bei der initialen Analyse des Expressionsverhaltens darauf geachtet, dass das Protein nicht nur produziert wird, sondern auch in löslicher Form vorhanden ist. Dafür wurde das Zelllysat nach dem Aufschluss für einige Minuten zentrifugiert und so die Pelletfraktion von dem zellfreien Extrakt (CFE, engl. cell free extract) getrennt. Lösliche Proteine sollten sich überwiegend im zellfreien Extrakt befinden. Große Mengen des Proteins in der Pelletfraktion hingegen weisen auf einen unvollständigen Zellaufschluss oder unlösliches Protein hin.

Tabelle 8. Übersicht über relevante Parameter von *Sg*PsmD. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient wurden durch theoretische Berechnungen basierend auf der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) erhoben.^a

Parameter					We	ərt	
GenBank ID)				AF	IL44	345.1
Molekularge	ewic	ht			30	.5 k[Da
Extinktionsk	coeff	izient	t (280) nm)	49	640	L/mol∙cm
	М	LV	1	2	3	М	kDa
			1		1		
							150
							100
					4		60
				:			40
				-	-		30
						-	20
							10

Abbildung 32. *SDS-PAGE* Analyse der Expression von *psmD_Sg* in *E. coli* BL21 Gold (DE3) [*Sg*PsmD = 30.5 kDa] M = Marker (Roti®-Mark 10–150), LV = Lysat *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+); 1 = Lysat *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sg*; 2 = Pellet *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sg*; 3 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sg*.

Mittels *SDS-PAGE* Analyse konnte eine Expression von *psmD_Sg* nachgewiesen werden und die beobachtete Größe des produzierten Proteins von ~30 kDa stimmt mit der Vorhersage überein. Zusätzlich befand sich ein großer Teil des Zielproteins *Sg*PsmD in der CFE-Fraktion (**3, Abbildung 32**), weshalb die CFE direkt für *in vitro* Tests verwendet werden konnte. Zusätzlich wurde im Folgenden eine weitere Reinigung des Proteins durchgeführt.

Diese Reinigung wurde über *IMAC* [Nickel-Ionen immobilisiert auf Nitrilotriessigsäure (NTA)] durchgeführt. Hierfür wurde vorab ein *6x His-Tag* am *C–Terminus* der nativen Gensequenz von *psmD_Sg* implementiert, welcher in Leserichtung Teil des pET21a Vektors ist. Das Ergebnis der Reinigung wurde anschließend mittel *SDS-Page* analysiert (**Abbildung 33**), das gereinigte Protein konzentriert und nachfolgend von überschüssigem Imidazol aus dem Elutionspuffer durch Umpuffem befreit.



Abbildung 33. *SDS-PAGE* Analyse der Nickel-NTA Reinigung von *Sg*PsmD (~30 kDa, schwarze Markierung) in *E. coli* BL21 Gold (DE3) [*Sg*PsmD = 30.5 kDa] M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sg*; 2 = Pellet *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sg*; 3 = Durchlauffraktion (FT, *engl. flow through*), 4 = Waschfraktion 1, 5 = Waschfraktion 2, 6 = Waschfraktion 3, 7 = Elutionsfraktion 1, 8 = Elutionsfraktion 2, 9 = Elutionsfraktion 3, 10 = Reinigung der Säule (*engl. purge*).

Es wurden die Elutionsfraktionen (**7–9, Abbildung 33**) in Spinfiltern (10 kDa *cutoff, 4500 rpm*) konzentriert und dabei ein Pufferaustausch durch mehrmaliges Auffüllen mit KP₁-Puffer pH 7.5 durchgeführt. Insgesamt konnten aus 5 g Zellpellet 30 mg Protein isoliert werden (entspricht 10 mg/mL finaler Konzentration, die Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten bestimmt). Das gereinigte Enzym wurde im Anschluss direkt für Biotransformationen genutzt. Die *SDS-PAGE* Analyse zeigte unter den verwendeten Bedingungen deutliche Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen (**7–9, Abbildung 33**) von *Sg*PsmD. In der Folge wurde die im Waschschritt verwendete Imidazol Konzentration von 50 mM auf 100 mM erhöht, was zu einer deutlich höheren Reinheit des Proteins in den Elutionsfraktionen führte (**6–8, Abbildung 34**). Trotz einer deutlichen Überladung des Gels mit Protein, sind nur wenige Verunreinigungen auf der *SDS-PAGE* zu erkennen. Das hier gereinigte *Sg*PsmD (**8, Abbildung 34**) wurde zur Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt, da für die Evaluierung der spezifischen Aktivität eines Enzyms eine hohe Reinheit notwendig ist, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.



Abbildung 34. SDS-PAGE Analyse der Nickel-NTA Reinigung mit 100 mM Imidazol im Waschpuffer von SgPsmD (~30 kDa, schwarze Markierung) in E. coli BL21 Gold (DE3) [SgPsmD = 30.5 kDa] M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = CFE E. coli BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-psmD_Sg; 2 = Pellet E. coli BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-psmD_Sg; 3 = Durchlauffraktion (FT, *engl.* flow through), 4 = Waschfraktion 1, 5 = Waschfraktion 2, 6 = Elutionsfraktion 1, 7 = Elutionsfraktion 2, 8 = Elutionsfraktion 3, 9 = Reinigung der Säule (engl. *purge*).
6.1.2 Synthese des natürlichen SgPsmD Substrats

Nachdem SgPsmD erfolgreich produziert und gereinigt worden war, sollte das natürliche Substrat von SgPsmD synthetisiert werden um anschließend eine Charakterisierung des Enzyms durchführen zu können. Dazu wurde eine Syntheseroute gewählt, welche ausgehend vom günstigen und kommerziell erhältlichen (5-Benzyloxyindol-3-yl)acetonitril (**78a**) startete. Über insgesamt drei Schritte konnte das Produkt **4a** mit einer Gesamtausbeute von 72 % dargestellt werden. Ausgehend von **78a** wurde das Nitril unter milden Bedingungen reduziert und durch Zugabe des entsprechenden Anhydrids das Amid **79a** erzeugt. Ohne weitere Reinigung wurde die Benzylschutzgruppe unter reduktiven Bedingungen entfernt und so Verbindung **3a** erzeugt und isoliert. Durch anschließende Carbamoylierung konnte das finale Produkt **4a** mit einer Gesamtausbeute von 72 % über drei Schritte erhalten werden (**Abbildung 35**).





6.1.3 Reproduktion der Aktivität von SgPsmD und initiale Charakterisierung

Wie von Liu *et al.* beschrieben ist *Sg*PsmD maßgeblich an der Biosynthese von Physostigmin in *Streptomyces griseofuscus* beteiligt und katalysiert die stereoselektive *C*-3 Methylierung am Indol-Grundgerüst.^[197] Dies wurde dabei auch *in vitro* gezeigt und das Produkt der *Sg*PsmD-Reaktion konnte über LC-MS nachgewiesen werden. Nachdem in dieser Arbeit das passende Substrat synthetisiert wurde und *Sg*PsmD erfolgreich produziert und isoliert werden konnte, sollte im nächsten Schritt die beschriebene Reaktion reproduziert werden. Anschließend sollte eine umfassende Charakterisierung von *Sg*PsmD erfolgen. Hierzu wurde ein *in vitro* Assay mit gereinigtem *Sg*PsmD durchgeführt und *via* LC-MS analysiert. Für das initiale Screening wurden kleine Volumina von bis zu 1 mL verwendet um den Verbrauch an Substrat, Enzym, aber auch dem Cosubstrat SAM, so gering wie möglich zu halten. Da zu diesem Zeitpunkt keine geeigneten Produkt Referenzen vorhanden waren, wurden erhaltenen



Abbildung 36. In vitro SgPsmD Assay zur Validierung der natürlichen Aktivität. Es wurde der relative Umsatz von Substrat **4a** zu Produkt **2a** bestimmt. SgPsmD wurde als gereinigtes Enzym eingesetzt. Die Umsetzung wurde bei 250 nm verfolgt und die Signale über *m*/z-Verhältnis zugewiesen. [Assaybedingungen: 15 μ M SgPsmD, 1 mM Substrat **(4a)**, 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 1 % (*v*/*v*) DMSO, 35 °C, 16 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. LC-MS (*reversed phase* Atlantis T3 Säule (1 mm × 3 mm, 3 μ m), 0.00 min: Wasser/Methanol (90:10); 4.00 min: Wasser/Methanol (40:60); 6.00 min: Methanol, 10 μ L, 0.6 mL/min, 30 °C).

Signale über UV-Vis bei 250 nm detektiert und anschließend über das m/z Verhältnis zugeordnet. So konnte gezeigt werden, dass einerseits das zugegebene Substrat 4a verbraucht wird und gleichzeitig ein neues Produkt entsteht, welches vom m/z Verhältnis zu dem vorhergesagten Produkt 2a passen würde (Abbildung 36). Dieser Versuchsaufbau wurde anschließend genutzt, um sowohl das Temperatur- als auch das pH-Optimum von SgPsmD zu bestimmen, welches zuvor nie experimentell überprüft worden war. Zur Evaluierung wurde hierfür der relative Umsatz [%] basierend auf den Peakflächen (AUC, engl. area under the curve) der zugeordneten Signale von Substrat 4a und Produkt 2a bei 250 nm bestimmt [%, (AUC 2a/(AUC 2a+AUC 4a)x100 %)]. Für die Testung des optimalen Temperaturfensters von SqPsmD wurde ein Bereich von 25-40 °C in 5 °C Inkrementen getestet und analysiert. Die Evaluierung des optimalen pH-Bereichs wurde in KPi-Puffer von 6.0 bis 8.0 in 0.5er Schritten durchgeführt. Für die Durchführung des Assays wurden SAM und Substrat 4a zu KPi-Puffer pH 7.5 gegeben und die Reaktion durch Zugabe von SgPsmD gestartet. Nach 4 h wurde die Reaktion durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) gestoppt. Nach anschließender Extraktion konnten die Proben für die LC-MS Analyse vorbereitet werden.

57

Ergebnisse (Abbildung 37) Mit Hilfe der konnte aezeiat werden. dass das Temperaturoptimum von SqPsmD bei 35 °C liegt. Somit wurden alle weiteren Experimente bei dieser Temperatur durchgeführt. In Bezug auf den pH-Wert konnte ein vernachlässigbarer Unterschied zwischen den getesteten Werten festgestellt werden. Alle Tests wurden in einem Puffersystem durchgeführt, wodurch für KPi-Puffer nur der hier dargestellte Bereich realisiert werden konnte, da außerhalb dieser Grenzen KP_i seine Pufferkapazität verliert. Zusätzlich sei dabei noch angemerkt, dass bei einer weiteren Verschiebung des Puffers in das basische Milieu eine Hydrolyse der Carbamat-Seitengruppe auftritt, was zu einer Freisetzung des Phenols führen würde. Unter den aetesteten Bedingungen konnte keine Entstehung des freien Phenols über LC-MS nachgewiesen werden und KP_i-Puffer konnte für die weitere Evaluierung genutzt werden. Beim direkten Vergleich der beiden durchgeführten Experimente zur Bestimmung der optimalen Bedingungen fällt auf, dass die relativen Umsätze [%] deutlichen Schwankungen unterliegen. Dies liegt vor allem an der Varianz der Enzymaktivität, welche sich von Charge zu Charge unterscheiden kann. Zusätzlich müssen Lagerbedingungen und Herstellungsdatum berücksichtigt werden. In diesem Fall wurde für die Experimente die aleiche Enzymkonzentration verwendet, eine Überprüfung der spezifischen Aktivität war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich und wurde zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit später als Normwert hinzugefügt.



Abbildung 37. Ergebnisse der Evaluierung von Temperatur- und pH-Einfluss auf die *in vitro* Reaktion von *Sg*PsmD. [Assaybedingungen Temperaturoptimum: 15 μM *Sg*PsmD, 1 mM Substrat **4a**, 2 mM SAM, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5), 1 % (*v*/*v*) DMSO, 25–40 °C, 4 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. [Assaybedingungen pH-Optimum: 15 μM *Sg*PsmD, 1 mM Substrat **4a**, 2 mM SAM, KP_i-Puffer (100 mM, pH 6.0–8.0), 1 % (*v*/*v*) DMSO, 35 °C, 4 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

6.1.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von PsmD

Um die Aktivität von SgPsmD reproduzierbar und mit möglichst geringem Hintergrund bestimmen zu können, wurde für gereinigtes Enzym statt der bereits beschrieben LC-MS Methodik ein indirektes Assav genutzt. Ein verfügbares, kommerziell erhältliches Kit MtaseTM-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) wurde hierfür eingesetzt und war sowohl für die Durchführung im 96- als auch 384-well plate Format geeignet. Grundlage dieses Assays ist der Verbrauch von SAM unter Freisetzung von SAH. SAH wird in der Folge durch Zugabe von kommerziellen Lösungen zu einem Lumineszenz Signal umgewandelt und kann detektiert werden (Schema 6, Material und Methoden). Ein hierfür notwendiger Schritt ist die Kalibrierung des zu benutzenden Platereader mit Hilfe einer SAH Kalibriergerade (Abbildung A). Basierend auf dieser Kalibriergerade kann anschließend über lineare Regression die eigentliche SAH Konzentration bestimmt werden, welche direkt mit dem Substratverbrauch bzw. der Produktbildung der zu untersuchenden Reaktion korreliert. Neben der Kalibriergeraden wurde zusätzlich für jedes zu testende Enzym ein passender Messbereich bestimmt. Einerseits ist dafür die passende Enzymkonzentration notwendig, andererseits sollte das zu messende Zeitintervall bestimmt werden, um innerhalb der Nachweisgrenzen zu agieren. Hierfür wurde das natürliche Substrat 4a von SgPsmD verwendet.

Im Gegensatz zu den in KP_i-Puffer durchgeführten Experimenten wird vom Hersteller des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) der sogenannte Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA) genutzt. Um zu gewährleisten, dass die mit dem Assay bestimmten Aktivität vergleichbar mit dem KP_i gemessenen Umsätzen ist, wurden beide Puffer mit derselben Methode verglichen. Dabei konnte mit Hilfe der LC-MS Methodik gezeigt werden, dass es keinen Unterschied zwischen den beiden Systemen unter den getesteten Bedingungen gibt und die Ergebnisse aus dem Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) übertragbar sind (**Abbildung 38**).



Abbildung 38. Vergleich der relativen Umsätze [%] bei Verwendung der beiden Puffersysteme. KP_I-Puffer oder Mtase-Puffer. [Assaybedingungen: 15 μM *Sg*PsmD, 1 mM Substrat **4a**, 2 mM SAM, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5) oder Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 4 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Für die weitere Evaluierung wurde zunächst die passende Enzymmenge pro Assay ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Menge von mehr als 2 µg Enzym pro Reaktion zu einer Sättigung der Lumineszenz im gemessenen Bereich führt. Deshalb wurden anschließend alle Reaktionen dieser Art mit 1 µg *Sg*PsmD durchgeführt. Für diese Enzymmenge konnte zusätzlich gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von 25 min die Lumineszenz linear ansteigt (**Abbildung 39**).



Abbildung 39. A. Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration zur Durchführung des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) mit *Sg*PsmD. **B.** Zunahme der Signalintensität über die Zeit der *Sg*PsmD-Reaktion während des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA). [Assaybedingungen **A.** 50 µM Substrat **4a**, 50 µM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 0.75–10 µg PsmD, 35 °C, 10 min, 20 µL Assayvolumen]. [Assaybedingungen **B.** 50 µM Substrat **4a**, 50 µM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 µg *Sg*PsmD, 35 °C, 2.5–25 min, 20 µL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Für eine möglichst hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit wurde für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Reaktionszeitraum auf die ersten 10 Minuten beschränkt. Somit konnte die initiale Reaktionsgeschwindigkeit abgebildet werden. Zusätzlich wurde für jedes Assay eine Negativkontrolle ohne Substrat und eine Hintergrundkontrolle ohne Enzym durchgeführt.

Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen konnte mit der Bestimmung der kinetischen Parameter von *Sg*PsmD begonnen werden. Hierfür wurde für verschiedene Konzentrationen (0–100 µM) die jeweilige Umsatzrate über drei Zeitpunkte (5, 7.5 und 10 min) bestimmt und gegen die getestete Substratkonzentration aufgetragen. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0.5 % TFA gestoppt. Für die substrataufgelöste Kinetik wurde zunächst für alle Reaktionen dieselbe SAM-Konzentration (60 µM) verwendet. Da davon auszugehen ist, dass die SAM-Konzentration selbst einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit hat, wurde dies zusätzlich in einer SAM aufgelösten Kinetik bestimmt. Für beide Kinetiken wurde jeweils 1 µg Enzym pro Reaktion verwendet. Die kinetischen Parameter wurden anschließend mathematisch durch Anwendung eines *least-square*-fit und der Michaelis-Menten-Gleichung (**8.5.10**) bestimmt (**Abbildung 40**).



Abbildung 40. Bestimmung der kinetischen Parameter von *Sg*PsmD in Abhängigkeit des natürlichen Substrates **4a** [**A**.] und **SAM** [**B**.]. [Assaybedingungen **A**. 0–100 μM Substrat **4a**, 60 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μg *Sg*PsmD, 35 °C, 5–10 min, 20 μL Assayvolumen]. [Assaybedingungen **B**. 50 μM Substrat **4a**, 0–200 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μg *Sg*PsmD, 35 °C, 5–10 min, 20 μL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

Parameter	Substrat-abhängige Kinetik	SAM-abhängige Kinetik
KM	11.3 ± 1.1 μΜ	6.6 ± 0.6 µM
V _{max}	0.83 ± 0.05 μM	0.56 ± 0.02 μM/min
k _{cat}	0.009 s ⁻¹	_

 Tabelle 9. Zusammenfassung der erhobenen kinetischen Parameter.

Es konnte beobachtet werden, dass *Sg*PsmD einen niedrigeren KM-Wert für SAM aufweist. Dies ist typisch für diese Enzymklasse und deutet auf eine kooperative Bindung von SAM und Substrat hin.^[32, 252] Die Bindung des Substrats findet demnach nach erfolgter Bindung von SAM im aktiven Zentrum statt. Gleichzeitig bedeutet dies für die kommenden Ansätze, das bereits geringe SAM-Konzentrationen zu einer Sättigung des Enzyms führen und ist eine wichtige Erkenntnis für den Einsatz von beispielweise SAM-Recyclingsystemen. Die ermittelte spezifische Aktivität für *Sg*PsmD lag bei 18.3 ± 0.4 µmol/min·g.

6.1.5 Substratspektrum von SgPsmD

Für eine weitere Evaluierung von SgPsmD, vor allem im Hinblick auf die Anwendbarkeit, sollte das Substratspektrum von SgPsmD untersucht werden. Bis dato waren keine Forschungsergebnisse zur Promiskuität von SgPsmD bekannt. Es wurde eine systematische Untersuchung durchgeführt bei der beide relevanten Seitengruppen alternierend sterisch anspruchsvoller gestaltet wurden. Zusätzlich sollte getestet werden, ob die Änderung und Einführung von anderen 5'-substituenten am Indol möglich ist. Für die Synthese der genannten Verbindungen wurde das Reaktionsschema, welches für die Synthese des natürlichen Substrats verwendet wurde (**Abbildung 41**) adaptiert und angepasst. Auf diesem Weg konnten die Indol-Derivate (**4a-k**) generiert werden.



Abbildung 41. Reaktionsschema welches für die Synthese der verschiedenen Substrate verwendet wurde.

Tabelle 10. Übersicht über die in dieser Arbeit synthetisierten Indole die für das Substratspektrum genutzt wurden. Die Ausbeute ist als Gesamtausbeute über drei Schritte angegeben.

	Indol (4)	R ¹	R ²	R³	Ausbeute [%]
	а	Me	Н	Me	31
	b	Et	Н	Me	77
D ²	С	<i>n</i> Pr	Н	Me	20
	d	<i>i</i> Pr	Н	Me	56
$\mathbb{R}^{3}^{N} \rightarrow \mathbb{O}$	е	<i>t</i> Bu	Н	Me	44
	f	Ph	Н	Me	13
- V N H	g	Me	Me	Me	84
	h	Me	Н	Et	52
	i	Me	Н	<i>n</i> Pr	51
	j	Me	Н	<i>t</i> Bu	39
	k	Me	Н	Ph	65

Ergänzt wurden die in **Tabelle 10** aufgeführten Indole durch verschiedene kommerzielle Substanzen und das 5'-H Indol **3g**, welche durch den ersten Schritt der oben in **Abbildung 41** Synthese mit einer Ausbeute von 90 % direkt zugänglich gemacht werden konnte. Alle Reaktionen wurden mit dem Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) durchgeführt. Nach 10 Minuten bei 35 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0.5 % TFA gestoppt und anschließend im Hinblick auf die relative Aktivität von *Sg*PsmD gegenüber dem getesteten Substrat analysiert. Alle Werte wurden auf das natürliche Substrat **4a** (100 % Kontrolle) normiert und sind als relative Werte angegeben. Zur Verifizierung des indirekten Assays wurden alle relativen Umsätze über LC-MS wie unter **6.1.3** bestimmt und verglichen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 42** zusammengefasst.

Im Vergleich zu dem natürlichen Substrat **4a** wird deutlich, dass eine Vergrößerung des sterischen Anspruches sowohl auf der Carbamoyl-Seite des Moleküls als auch auf der Amid-Seite zu einer Verringerung der Aktivität von *Sg*PsmD führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität direkt mit der Größe der eingebrachten Reste negativ korreliert. Zusätzlich ist der Effekt auf der Carbamoyl-Seite stärker ausgeprägt, was zu einer Reduktion der Enzymaktivität für die Substrate **4j** und **4k** bis hin zu einem Verlust der *Sg*PsmD Aktivität führt. Speziell für diese beiden Proben konnte *via* LC-MS kein Umsatz detektiert werden. Es wurde deutlich, dass der Carbamoyl–Rest eine essenzielle Rolle für die Aktivität des Enzyms spielt. Während für Melatonin **79b** und **3g** noch geringe Aktivität beobachtet werden konnte, wurde für 2-(1*H*-Indol-3-yl)ethan-1-amin (**80**) und *N*-Acetyl-L-tryptophan-methylester **81** keine Aktivität und kein Umsatz detektiert. Anhand der Experimente konnte das Substratspektrum für *Sg*PsmD erfolgreich evaluiert werden. Es konnte deutlich das Potential, aber auch die Limitierung dieses Enzyms im Hinblick auf den Einsatz zur präparativen chemischen Synthese aufgezeigt werden.

Allerdings muss angemerkt werden, dass im Assay in diesem Format nur gereinigtes Enzym benutzt werden kann. Beim Versuch das Assay mit Lysaten zu verwenden, wurde deutlich, dass das Hintergrundsignal zu hoch und damit keine Messung möglich ist. Diese Einschränkung ist besonders im Hinblick auf die Etablierung eines möglichen Mutagenese Screening Ansatzes ein Nachteil und limitiert das Hochdurchsatz-Potential des Mtase[™]-Glo Assays (*Promega*, Fitchberg, USA) erheblich.



Abbildung 42. Übersicht der Ergebnisse der Substratspektrum-Analyse. Dargestellt sind die vorhergesagten Produkte der *Sg*PsmD-Reaktion. Die Produktbildung wurde *via* LC-MS anhand des *m/z* Verhältnis nachgewiesen. [Assaybedingungen: 50 μM Substrat 50 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μg PsmD, 35 °C, 10 min, 20 μL Assayvolumen]. [Umsatzbedingungen: 1 mM Substrat, 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 6.0–8.0), 1 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 4 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet.

6.1.6 Nachweis der Enantioselektivität der enzymatischen SgPsmD-Reaktion

Durch die Analyse des Genclusters aus Streptomyces griseofuscus von Liu et al. konnte gezeigt werden, dass Physostigmin stereoselektiv in der Biosynthese gebildet wird.^[34] Es wurde gezeigt, dass SgPsmD maßgeblich dafür verantwortlich ist und die Methylgruppe vermutlich stereoselektiv implementiert. Gezeigt wurde dies jedoch bisher nur anhand des entstandenen Physostigmins. Für die von SgPsmD katalysierte Reaktion wurde die Stereoselektivität der enzymatischen Methylierung nicht explizit nachgewiesen. Gleichzeitig war unklar, ob die Selektivität - sofern vorhanden - auch auf andere Indol-Substrate übertragbar ist. Um dies zu überprüfen, wurden die drei racemische Referenzverbindungen rac-2a, rac-2e und rac-2m wie in Abbildung 43 dargestellt synthetisiert und mit Hilfe von HPLC an chiraler stationärer Phase analysiert. Anschließend wurden die Produkte rac-2a. rac-2e und rac-2m mit den Produkten der biokatalytischen Umsetzung durch SgPsmD verglichen.

Für die racemische Synthese der Standards wurde der sogenannte biomimetische Ansatz verfolgt, in dem analog zu der Biosynthese die Methylgruppe - in diesem Fall unselektiv eingebracht und gleichzeitig das Hexahydropyrolloindolin-Grundgerüst aufgebaut wird. Im Folgenden wurde die Synthese der Zielverbindungen durch eine divergierende Schutzgruppenstrategie und Carbamoylierung über insgesamt sechs Schritte mit einer Gesamtausbeute von 5-19 % realisiert (Abbildung 43).



Abbildung 43. Reaktionsschema der Synthese racemischer Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol Referenzverbindungen rac-2a, rac-2e und rac-2m.

Grund für die divergierende Schutzgruppenstrategie dieser Synthese war die mangelnde Selektivität der Carbamoylierung am Phenol in Anwesenheit des ungeschützten heterocyclischen Stickstoffatoms (*N*-8). Erst durch eine *N*-Benzyl Schützung wurde eine selektive Carbamoylierung des Phenols möglich.

Die abschließende Entschützung konnte unter milden, reduktiven Bedingungen durchgeführt werden. Die Ausbeuten dieser Reaktion schwanken allerdings beträchtlich und es wurde die Bildung mehrere Nebenprodukte beobachtet, welche nicht einzeln isoliert werden konnten. Insgesamt konnte die Synthese der racemischen Referenzverbindungen durch diese nicht optimierte Synthesesequenz realisiert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Syntheseroute für die Herstellung diverser Referenzprodukte genutzt werden könnte. Ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufermolekül (*rac* 2I, Abbildung 43) können über wenige Schritte diverse Carbamat-Seitenketten eingefügt werden und so potenziell die Selektivität der enzymatischen Reaktion für weitere Substrate und entsprechende Produkte nachgewiesen werden könnte.

Die in **Abbildung 43** hergestellten Verbindungen wurden anschließend *via* HPLC-UV an chiraler stationärer Phase analysiert und mit den entsprechenden biokatalytischen Umsetzungen aus **Abbildung 42** verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur eines der beiden möglichen Enantiomere des Produktes gebildet wird (**Abbildung 44**). Diese Beobachtung deckt sich mit der von Liu *et al.* postulierten Theorie.^[34] Auch für die Verbindungen **2e** und **2m** wurde dies überprüft und es konnte auch hier gezeigt werden, dass jeweils nur eines der beiden möglichen Enantiomere gebildet wird. Damit konnte an dieser Stelle erfolgreich belegt werden, dass es sich um eine stereoselektive Methylierung handelt, unabhängig von dem für die enzymatische Reaktion verwendeten Substrat. Gleichzeitig war der Enantiomerenüberschuss für alle getesteten Verbindungen > 99 %, was die (Stereo)-Selektivität dieser enzymatischen Reaktion verdeutlicht.

Die Konfiguration für **2a**, **2e** und **2m** wurde anschließend anhand der optischen Rotation (siehe Anhang, S. 211) bestimmt und mit der optischen Rotation von Physostigmin (1) und Phenserin (**15**) verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Vorzeichen der jeweiligen Verbindungen übereinstimmen (-). Somit konnte von derselben Konfiguration ausgegangen werden.

Für die beiden Substanzen ist bekannt, dass nur eines der beiden Enantiomere eine bioaktive Wirkung erzielt.^[253, 254] Für die Implementierung der Methylgruppe war es daher essenziell, dass diese in der "richtigen" Orientierung aufgebaut wird. Die aus der Biokatalyse stammenden Verbindungen wurden zu einem späteren Zeitpunkt präparativ hergestellt und die entsprechenden Drehwerte dieser Verbindungen mittels Polarimeter untersucht und verglichen.



Abbildung 44. HPLC-UV Analyse an chiraler stationärer Phase der Umsetzung der Substrate **4a**, **4e** und **3g** mit *Sg*PsmD zu den Produkten **2a**, **2e** und **2m** (grau) und Vergleich mit chemisch hergestellten, racemischen Standards (schwarz) zur Bestimmung der Enantioselektivität der *Sg*PsmD-Reaktion. Für die Reaktion wurde gereinigtes *Sg*PsmD eingesetzt. [Assaybedingungen: 15 μM *Sg*PsmD, 1 mM Substrat (**4a**, **4e**, **3g**), 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 1 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 16 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol (Gemisch wurde an die gemessene Verbindung angepasst).

6.1.7. Zusammenfassung des Kapitels

- Die C-3 Indol-Methyltransferase SgPsmD konnte erfolgreich produziert und gereinigt werden
- Mittels LC-MS Analyse wurde die natürliche Reaktion von SgPsmD bestätigt und konnte erfolgreich reproduziert werden
- Die optimalen Reaktionsbedingungen f
 ür die Reaktion dieses Enzyms wurden bestimmt (35 °C, pH 7.5 (KP_i 100 mM))
- Eine Bestimmung der kinetischen Parameter der Methyltransferase SgPsmD wurde durchgeführt (k_{cat} = 0.009 s⁻¹)
- Möglichkeiten und Limitierungen dieser enzymatischen Methylierung konnten basierend auf dem Substratspektrum von SgPsmD aufgezeigt werden
- Es konnte nachgewiesen werden, dass die von SgPsmD katalysierte Reaktion stereoselektiv verläuft (ee > 99 %)

6.2 C-3 Indol-Methyltransferase SaPsmD

Nachdem erste Schritte zur Anwendung und Evaluierung von *C*-3 Indol-Methyltransferasen erfolgt waren und das Potential dieser enzymatischen Reaktion deutlich gemacht werden konnte, wurde die Suche nach neuen, bisher unbekannten Methyltransferasen intensiviert. Dazu wurde nach weiteren, verwandten und bisher nicht charakterisierten Methyltransferasen gesucht. Ziel war es Enzyme mit einer hohen Ähnlichkeit zu dem erfolgreich charakterisierten Enzym *Sg*PsmD zu finden. Dies wurde basierend auf der Aminosäuresequenz von *Sg*PsmD durchgeführt. Dabei konnten einige *Sg*PsmD Homologe identifizierte werden, welche für eine anschließende Charakterisierung in Betracht gezogen wurden.

Die Enzyme sollten möglichst dieselbe Reaktion katalysieren, dabei aber ein breiteres Substratspektrum akzeptieren oder eine höhere Temperatur- als auch Reaktionsstabilität aufweisen und somit besser für den geplanten Einsatz zur präparativen Biokatalyse geeignet sein. Entsprechend beschreibt der folgende Abschnitt die systematische Suche nach geeigneten Enzymen und die biochemische Evaluierung von einem der identifizierten Kandidaten *Sa*PsmD.

Der folgende Abschnitt enthält Ergebnisse der Masterarbeit von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), welche basierend auf den Ideen des Autors und dessen Vorbereitung, sowohl experimentell als auch inhaltlich, ermöglicht wurde. Dies bildet das Fundament der in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse. Die entsprechenden experimentellen Anteile von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurden im Folgenden kenntlich gemacht und hervorgehoben. Gleiches gilt für den geleisteten Beitrag des Autors an den aufgezeigten Ergebnissen der von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführten Experimente und gemeinsam erhaltenen Ergebnissen.

6.2.1 Identifizierung neuer Methyltransferasen durch Sequenzhomologie

Basierend auf der Aminosäuresequenz von *Sg*PsmD wurde eine *Basic Alignment Search Tool* (BLASTp)-Analyse durchgeführt.^[255] Da zu diesem Zeitpunkt keine Kristallstruktur von *Sg*PsmD verfügbar war, wurde die Analyse nur basierend auf der Aminosäuresequenz ohne Berücksichtigung von strukturellen Daten durchgeführt und analysiert. Zur Evaluierung der Ergebnisse wurde die absolute Sequenzübereinstimmung sowie die Ähnlichkeitswertung verwendet.

 Tabelle 11. Ausschnitt aus dem Ergebnis der Sequenzähnlichkeitssuche für SgPsmD mittels (BLASTp)-Analyse.^[255]

Organismus	Enzym ID	Übereinstimmung
Streptomyces albulus	A0A059VYP3	89.9 %
Streptomyces sp. MZ03-48	A0A553ZQX1	80.1 %
Streptacidiphilus bronchialis	A0A345T4J6	55.1 %

Die Ähnlichkeitssuche zeigte, dass es wenige ähnliche Methyltransferasen gibt, welche bisher identifiziert und näher untersucht wurden. Alle in **Tabelle 11** dargestellten Enzyme stammen aus Genomanalysen und basieren auf theoretisch vorhergesagten Sequenzen. Basierend auf der vorhergegangenen Analyse wurde entschieden, die putative Methyltransferase aus *Streptomyces albulus* zu untersuchen und zu charakterisieren.

Auffällig war, dass neben *Streptomyces griseofuscus* auch *Streptomyces albulus* und *Streptacidiphilus bronchialis* mehrere relevante Gene aus dem Physostigmin-Biosynthese-Gencluster von *Streptomyces griseofuscus* enthalten. In der Literatur wurden diese Stämme allerdings nie als Physostigmin-Produzenten aufgeführt. Das Auftreten von mehreren Enzymen aus dem entsprechenden Biosynthese-Gencluster legt allerdings nahe, dass diese Stämme entweder dazu in der Lage waren Physostigmin herzustellen oder es unter bestimmten Bedingungen immer noch sind. Eine zukünftige, systematische Untersuchung der aufgezeigten Stämme erscheint deshalb durchaus sinnvoll und könnte weiter zu als Grundlage zur gezielten Identifikation von geeigneten Methyltransferasen dienen.

6.2.2 Expression und Reinigung von SaPsmD

Für die Expression wurde die synthetische Gensequenz von *psmD_Sa* in einem pET28a(+) Vektor von einem kommerziellen Hersteller (GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA)) bezogen. Zu Gunsten der Vergleichbarkeit wurde anschließend eine Klonierung durchgeführt und die Gensequenz von *psmD_Sa* durch Restriktion und Ligation in einen pET21a(+) Vektor eingebracht, welcher anschließend für die Expression in *E. coli* BL21 Gold (DE3) genutzt werden konnte. Für die Reinigung des Proteins wurde ein *6x His-Tag* in *frame* an den *C*-Terminus der Gensequenz angefügt.

Tabelle 12. Übersicht über relevante Parameter von *Sa*PsmD. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient wurden durch theoretische Berechnungen basierend auf der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) erhoben.^a

Parameter	Wert
UniProt ID	A0A059VYP3
Molekulargewicht	30.6 kDa
Extinktionskoeffizient (280 nm)	49640 L/mol·cm

Die Expression des Zielgens erfolgte durch Transformation von *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem Plasmid pET21a(+)-*psmD_Sa*. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte analog zu den für *Sg*PsmD genutzten Bedingungen (**8.3.5.1**). Es konnte eine Expression von *psmD_Sa* nachgewiesen werden und die beobachtete Größe des produzierten Proteins von ~30 kDa stimmt mit der Vorhersage überein (**Abbildung 45**).



Abbildung 45. *SDS-PAGE* Analyse der Nickel-NTA Reinigung von *SapsmD* in *E. coli* BL21 Gold (DE3) Gold [*Sa*PsmD = 30.6 kDa], M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sa*; 2 = Pellet Fraktion *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmD_Sa*; 3 = Durchlauffraktion (FT, *engl. flow through*), 4 = Waschfraktion, 5 = Elutionsfraktion 1, 6 = Elutionsfraktion 2. Das Experiment wurde von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva im Rahmen ihrer Masterarbeit (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) unter den zuvor vom Autor optimierten Bedingungen durchgeführt.^[256] Zusätzlich befindet sich ein großer Teil von *Sa*PsmD in der CFE Fraktion. Somit konnte das CFE direkt für *in vitro* Tests verwendet werden und zusätzlich eine weitere Reinigung des Proteins durchgeführt werden. Die Reinigung des Proteins wurde über IMAC (Nickel-NTA) durchgeführt und anschließend mittels *SDS-PAGE* analysiert. Die Ergebnisse der Expression und Reinigung sind in **Abbildung 45** zusammengefasst.

6.2.3 Charakterisierung von SaPsmD

Für eine erste Untersuchung von *Sa*PsmD in Hinblick auf dessen Aktivität wurde basierend auf den zuvor hergestellten Standards ein HPLC-basiertes *in vitro* Assay durchgeführt. Initial wurde hierfür CFE von *E. coli* BL21 Gold (DE3) pET21a(+)-*psmD_Sa* genutzt. Durch anschließende Extraktion des Substrats und Produkts mit organischem Lösungsmittel (EtOAc) wurden die Proben mittels HPLC an chiraler stationärer Phase analysiert und der Umsatz der Reaktion analysiert (**Abbildung 46**).



Abbildung 46. HPLC-Analyse des *in vitro* Assay der SaPsmD-Reaktion von Substrat **4a** zu Produkt **2a** (dunkel). SaPsmD wurde als CFE eingesetzt. Die Umsetzung wurde bei 205 nm verfolgt und mit der vorhandenen Referenz *rac-2a* (hell) verglichen. [Assaybedingungen: 20 % SaPsmD-CFE, 1 mM Substrat **4a**, 2 mM SAM, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5), 1 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 16 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 80:20). Die Enantioselektivität dieser Reaktion wurde bereits zuvor beschrieben.^[256]

Es konnte gezeigt werden, dass SaPsmD die getestete Reaktion katalysiert und somit in aktiver Form im CFE vorliegt. Bei der Analyse mit den zuvor hergestellten racemischen Referenzen konnte zudem festgestellt werden, dass diese Reaktion stereoselektiv verläuft (**Abbildung 46**). Basierend auf den generierten Ergebnissen wurde die Charakterisierung von SaPsmD weitergeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen für SaPsmD zu bestimmen und mit den Ergebnissen für SgPsmD vergleichen zu können. Zunächst wurden die Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen (25–45 °C) durchgeführt, mittels HPLC-UV analysiert und der relative Umsatz von Substrat **4a** zu Produkt **2a** bestimmt.

Beim Vergleich der beiden Enzyme wird deutlich, dass SaPsmD in einem sehr ähnlichen Bereich wie SgPsmD optimal arbeitet und die bestimmte optimale Temperatur für SaPsmD bei 35 °C liegt. Bei weiterer Erhöhung der Temperatur bis 45 °C verliert SaPsmD jedoch nicht weiter an Aktivität. Dies könnte auf eine größere Stabilität des Enzyms hindeuten, welche im Folgenden genauer untersucht werden sollte (**Abbildung 47**).



Abbildung 47. Vergleich des Temperaturoptimums von *Sa*PsmD (grau, Kreis) und *Sg*PsmD (schwarz, Quadrat). [Assaybedingungen: 20 µM PsmD-Enzym, 1 mM Substrat **4a**, 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 1 % (*v/v*) DMSO, 25–45 °C, 4 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Das Experiment wurde von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. Das genutzte *Sg*PsmD als auch das genutzte Substrat für diese Reaktion wurden vom Autor für dieses Experiment im Rahmen der Masterarbeit zur Verfügung gestellt.^[256]

Ein besonders wichtiger Punkt dabei ist die Enzymstabilität über die Dauer der Reaktionszeit. Im Idealfall überdauert der Biokatalysator die Reaktionsdauer, ohne dabei an Aktivität einzubüßen. Dies ist insbesondere für schlecht produzierbare Enzyme oder solche, die ungünstige kinetische Parameter wie einen geringen k_{cat}-Wert aufweisen, essentiell.^[257] Um die zeitabhängige Stabilität der beiden PsmD-Enzyme zu bestimmen, wurde die verbleibende Enzymaktivität für die natürliche Reaktion von Substrat **4a** zu Produkt **2a** über 24 h bestimmt. Dafür wurde das Enzym bei 35 °C in Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), inkubiert und Proben zwischen 0–24 h aus dieser Lösung entnommen und mit Hilfe des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) die vorhandene Enzymaktivität bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das *Sg*PsmD-Homolog *Sa*PsmD eine deutlich verlängerte Lebensdauer aufweist (**Abbildung 48**) und über den getesteten Zeitraum von 24 h keine Enzymaktivität einbüßt. Dem gegenüber hat *Sg*PsmD nach 24 h eine kaum mehr nachzuweisende Enzymaktivität. Bereits nach 6 h beginnt die Aktivität abzunehmen. Das Ergebnis deutet erneut darauf hin, dass *Sa*PsmD eine verbesserte Stabilität gegenüber *Sg*PsmD aufweist, was dieses Enzym zu einem besser geeigneten Biokatalysator in diesem Kontext machen würde. Um diese Annahme final zu beweisen, wurden anschließend die kinetischen Parameter von *Sa*PsmD bestimmt und mit *Sg*PsmD verglichen.



Abbildung 48. Verbleibende Enzymaktivität der PsmD-Enzyme für verschiedene Inkubationszeitpunkte (0, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h und 24 h) zur Bestimmung der Stabilität der beiden Enzyme unter Reaktionsbedingungen. [Assaybedingungen: 50 μ M Substrat (**4a**), 50 μ M SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μ g PsmD, 35 °C,10 min, 20 μ L Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. Das Experiment wurde von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Das genutzte *Sg*PsmD als auch das genutzte Substrat für diese Reaktion wurden vom Autor für dieses Experiment im Rahmen der Masterarbeit zur Verfügung gestellt.^[256]

6.2.4 Vergleich der kinetischen Parameter von SaPsmD und SgPsmD

Um die kinetischen Parameter von *Sg*PsmD und *Sa*PsmD zu vergleichen, wurden diese für *Sa*PsmD, wie unter **6.1.4** beschrieben mit Hilfe des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) erhoben, evaluiert und mit den zuvor generierten Daten für *Sg*PsmD verglichen. Hierfür wurde die Reaktionsrate für die natürliche PsmD-Reaktion von Substrat **4a** zu Produkt **2a** für verschiedene Substratkonzentrationen gemessen. Die kinetischen Parameter wurden anschließend mathematisch durch Anwendung eines *least-square*-fit und der Michaelis-Menten-Gleichung (**8.5.10**) bestimmt (**Abbildung 49**).

Beide Enzyme weisen eine nahezu identische Michaelis-Menten Konstante (K_M) auf, welche die Affinität zum Substrat beschreibt. Bei der maximalen Umsatzrate (V_{max}) hingegen gibt es einen deutlichen Unterschied. *Sg*PsmD weist ein nahezu doppelte so große maximale Umsatzrate im Vergleich zu *Sa*PsmD auf (**Tabelle 13**). Entsprechend liegt der k_{cat} für *Sg*PsmD im Vergleich zu *Sa*PsmD höher. Obwohl *Sg*PsmD somit als besserer Biokatalysator gilt, sind die Unterschiede der beiden Methyltransferasen gering und generell liegt der k_{cat} deutlich unter dem, was von einem effizienten Biokatalysator ($k_{cat} \sim 10 \text{ s}^{-1}$) allgemein erwartet wird.^[258]



Abbildung 49. Änderung der Umsatzrate über die Substratkonzentration zur Bestimmung der kinetischen Parameter von SaPsmD in Abhängigkeit des Substrats **4a**. [Assaybedingungen: 0–60 μM Substrat **4a**, 60 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μg PsmD, 35 °C, 5–10 min, 20 μL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. Das Experiment wurde von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Das genutzte Substrat für diese Reaktion wurde vom Autor für dieses Experiment im Rahmen der Masterarbeit zur Verfügung gestellt.^[256]

Parameter	SgPsmD	SaPsmD
K _M	11.3 ± 1.1 μм	10.5 ± 0.6 µм
V _{max}	0.83 ± 0.05 µм/min	0.48 ± 0.02 µм/min
k _{cat}	0.009 s ⁻¹	0.003 s ⁻¹

|--|

Erweitert man die Betrachtung allerdings auf andere, bekannte *C*-Methyltransferasen, fällt auf, dass sich die beobachteten Werte mit Daten aus der Literatur decken und *C*-Methyltransferasen generell einen geringen k_{cat} -Wertaufweisen (**Tabelle 14**). Insofern sind die hier bestimmten Werte für die beiden PsmD-Enzyme durchaus im Einklang mit der Literatur und es muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei *C*-Methyltransferasen als ganze Gruppe wohl um wenig effiziente Biokatalysatoren im industriellen Sinne handelt. Trotzdem bestechen besonders die *C*-3 Indol-Methyltransferasen mit ihrer Stereoselektivität, welche nach *Sg*PsmD auch für *Sa*PsmD nachgewiesen werden konnte.

Enzym	k _{cat}	Quelle
SgPsmD	0.009 s ⁻¹	Diese Arbeit
SaPsmD	0.003 s ⁻¹	[256]
SsStspM1	0.016 s ⁻¹	[198]
SrCouO	0.008 s ⁻¹	[168]
SsNovO	0.004 s ⁻¹	[171]

Tabelle 14. Übersicht der k_{cat} -Werte verschiedener C-Methyltransferasen aus dieser Arbeit und derLiteratur.

6.2.5 Substratabhängige Aktivität von SaPsmD

Für eine weitere Evaluierung von SaPsmD, vor allem im Hinblick auf die weitere Anwendbarkeit im Vergleich zu SgPsmD, sollte das Substratspektrum untersucht werden. Es wurde eine systematische Untersuchung durchgeführt in der, analog zu dem Vorgehen für SgPsmD (6.1.5), beide relevanten Seitengruppen abwechselnd sterisch anspruchsvoller gestaltet wurden. Zusätzlich sollte getestet werden, ob die Einführung von anderen 5'-Substituenten am Indol möglich ist und ob SaPsmD hier einen Unterschied zu den für SqPsmD erhaltenen Daten aufweist (6.1.5). Insgesamt wurden dafür 13 der bisher untersuchten Substrate erneut mit SaPsmD getestet, die relative Enzymaktivität ermittelt und mit der für SgPsmD bestimmten relativen Aktivität verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich für SaPsmD generell der gleiche Trend ergibt (Abbildung 50). Je sterisch anspruchsvoller die Carbamoyl-Seitengruppe bzw. die Amid-Seitengruppe aufgebaut ist, desto geringer ist die relative Enzymaktivität. Im direkten Vergleich von SaPsmD zu SgPsmD fällt jedoch auf, dass der Aktivitätsverlust für SaPsmD im Allgemeinen deutlich geringer ausfällt. Besonders deutlich ist dieser Trend bei der Carbamoyl-Seitenkette. Hier konnte eine Enzymaktivität selbst für das Phenylcarbamat detektiert werden. Für die Verbindungen ohne 5'-Carbamoyl ergibt sich ein ähnliches Bild. Während SgPsmD für die anspruchsvollen Substrate 3g, 79b und 81 kaum oder gar keine Enzymaktivität (0–11 %) aufweist, konnten für SaPsmD moderate bis geringe Enzymaktivitäten (4-26 %) detektiert werden. Somit ist SaPsmD vor allem im Hinblick auf die Nutzung von anspruchsvollen Substraten von Vorteil und konnte das C-3 Indol-Methyltransferase Portfolio dieser Arbeit erfolgreich, um ein zusätzliches biokatalytisch nutzbares Enzym erweitern.



Abbildung 50. Vergleich der Ergebnisse der Substratspektrum-Analyse von SaPsmD und SgPsmD. Dargestellt sind die vorhegesagten und detektierten Produkte der PsmD-Reaktion. [Assaybedingungen: 50 μM Substrat 50 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 1 μg PsmD, 35 °C,10 min, 20 μL Assayvolumen]. Für jede Untersuchung wurden drei unabhängige Proben gemessen und die Mittelwerte inklusive Standardabweichung abgebildet. Die Bestimmung der relativen Aktivitäten für SaPsmD wurde von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Die genutzte Substrat für die Evaluierung von SaPsmD wurde vom Autor für dieses Experiment im Rahmen der Masterarbeit zur Verfügung gestellt.^[256] Die für SgPsmD dargestellten Ergebnisse entsprechen den unter **6.1.5** aufgezeigten Aktivitäten und dienen dem direkten Vergleich der beiden Enzyme.

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, dass obwohl die beiden hier untersuchten Enzyme eine Sequenzhomologie von etwa 90 % aufweisen, sie sich sowohl in den kinetischen Parametern als auch in der Stabilität unterscheiden. Zusätzlich wurde deutlich, dass *Sa*PsmD eine breitere Substratakzeptanz besitzt. Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass *Sa*PsmD basierend auf den bestimmten Eigenschaften besser für die präparative Biokatalyse geeignet ist.

Um generell präparative, biokatalytische Methylierung zu ermöglichen, wurde versucht, den stöchiometrischen Bedarf für SAM durch Implementierung eines SAM-Recyclingsystem zu umgehen und so den Einsatz von SAM abhängigen Methyltransferasen als Biokatalysatoren der Zukunft unter ökonomischen Gesichtspunkten zugänglich zu machen.

6.2.6. Zusammenfassung des Kapitels

- Die C-3 Indol-Methyltransferase SaPsmD konnte erfolgreich produziert und gereinigt werden
- Mittels HPLC-UV Analyse wurde die vorhergesagte Reaktion von 4a zu 2a von SaPsmD bestätigt und es konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion stereoselektiv verläuft
- Die optimalen Reaktionsbedingungen f
 ür die Reaktion dieses Enzyms wurden bestimmt und mit SgPsmD verglichen [35 °C, pH 7.5 in KP_i (100 mM)]
- Eine Bestimmung der kinetischen Parameter wurde durchgeführt und konnte im Vergleich mit SgPsmD und anderen C-Methyltransferasen eingeordnet werden
- Vor- und Nachteile des Einsatzes von SaPsmD im Vergleich zu SgPsmD konnten im Hinblick auf Substratakzeptanz, Reaktionsbedingungen und Enzymstabilität nachgewiesen werden

6.3 SAM-Recycling – Neue Methoden ermöglichen präparative biokatalytische Methylierung

Die größte Limitierung für die Anwendung von SAM-abhängigen Methyltransferasen war bisher der stöchiometrische Einsatz des Cosubstrats. SAM gehört zu den teuersten, verfügbaren Cosubstraten und bis 2019 war keine direkte Recyclingmethode bekannt. Mit der Forschung von Liao *et al.* änderte sich dies und in der Folge intensivierte sich die Forschung auf diesem Gebiet.^[225] Die Aussicht auf ein enzymgekoppeltes, direktes SAM-Recycling System steigerte die Anwendbarkeit von SAM-abhängigen Methyltransferasen vor allem in Bezug auf den Einsatz in der präparativen Biokatalyse. Der Schlüssel zu dieser neuen Technologie war die Verwendung einer Halogenid-Methyltransferase, welche in der Lage ist, eine Methylgruppe von Methyliodid auf SAH zu übertragen und so SAM zu generieren.^[225, 238]

Für diese Arbeit wurde das von Liao *et al.* implementierte System adaptiert und optimiert.^[225] Grundlage dafür war die Weitergabe des entsprechenden Plasmids pET28a(+)-*hmt_Ct* sowie eines Nukleosidase-defizienten *E. coli* BL21 Δ*mnt* (DE3) Stammes. Liao *et al.* hatten in ihrer Arbeit gezeigt, dass selbst geringe Verunreinigungen mit Nukleosidasen die Recyclingkapazität durch den Abbau von SAH limitieren können. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse für die Implementierung und Optimierung des enzymgekoppelten, direkten SAM-Recycling zusammengefasst.

6.3.1 Expression und Reinigung der Halogenid-Methyltransferase CtHMT

Für die Produktion und Reinigung der Halogenid-Methyltransferase aus Chloroacidobacterium thermophilum wurde der nukleosidasedefiziente E. coli BL21 Δmnt (DE3) Stamm mit dem pET28a(+)-hmt Ct Plasmid transformiert und durch Ausplattieren auf LB-Agar unter Kanamycin-Selektion konnten einzelne Kolonien angezogen und anschließend kultiviert werden. Aus einer Übernachtkultur wurde die Hauptkultur angeimpft und bei einer OD₆₀₀ ~0.5 die Genexpression durch Zugabe von IPTG (0.2 mM finale Konzentration) induziert. Nach 16 h bei 25 °C und 180 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und via SDS-PAGE analysiert. Für die anschließende Reinigung mittels IMAC (Nickel-NTA) enthielt die Gensequenz in Leserichtung einen 6x His-Tag am N-Terminus. Die Expression und Reinigung erfolgten nach den von Liao et al. publizierten Bedingungen (8.3.5.3).^[225] Die Analyse via SDS-PAGE zeigt eine erfolgreiche Produktion und Reinigung von CtHMT unter den gewählten Bedingungen und die Größe der detektierten Bande von ~20 kDa stimmt mit der Vorhersage überein (Abbildung 51). Die Elutionsfraktionen 5 und 6 wurden vereint und konzentriert. Für CtHMT ist eine Doppelbande zu sehen, was allerdings nicht auf eine Verunreinigung hindeutet, sondern ein Zeichen dafür ist, dass der SDS Probenpuffer in zu geringer Konzentration verwendet oder ohne ausreichend Reduktionmittel angesetzt wurde

und das Protein somit nicht vollständig reduziert vorliegt. Dabei kann häufig eine charakteristische Doppelbande beobachtet werden.



Abbildung 51. SDS-PAGE Analyse der Nickel-NTA Reinigung von *Ct*HMT in Δ mnt *E. coli* BL21(DE3) [*Ct*HMT = 24.6 kDa], M = Marker (Roti®-Mark 10–150), 1 = CFE Δ mnt *E. coli* BL21(DE3) pET28a(+)-*hmt_Ct*; 2 = Pellet Fraktion Δ mnt *E. coli* BL21(DE3)_pET28a(+)-*hmt_C*; 3 = Durchlauffraktion n (FT, *engl. flow through*), 4 = Waschfraktion, 5 = Elutions-fraktion 1, 6 = Elutionsfraktion 2, 7 = Elutionsfraktion 3, 8 = Reinigung der Säule (*engl. purge*).

In der Folge konnte das erfolgreich gereinigte *Ct*HMT Enzym als solches für die Testung und Implementierung des SAM-Recyclings eingesetzt werden. Insgesamt konnten 20 mg Enzym (Konzentration wurde *via* Nanodrop unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten bestimmt) aus 2 Liter Kultur und 5 g Zellpellet gewonnen werden. Generell bleibt festzuhalten, dass die erzielten Proteinausbeuten unter Verwendung des Δ mnt *E. coli* BL21 Δ mnt (DE3) gering ausfielen und *Sg*PsmD in diesem Stamm nicht exprimierbar war, was eine Produktion und Nutzung von *Sg*PsmD Lysat verhinderte. So wurde eine erste Evaluierung des SAM-Recyclings im gekoppelten Ansatz mit gereinigten Enzymen durchgeführt. In einem ersten Experiment sollte so gezeigt werden, dass es möglich ist, stöchiometrische Mengen SAM durch katalytische Mengen SAH mit Hilfe dieses Systems zu ersetzen.

6.3.2 Implementierung des enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems

Für eine initiale Untersuchung wurde die natürliche PsmD-Reaktion von **4a** zu **2a** unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt und mittels LC-MS analysiert. Alle Reaktionen wurden nach 16 h durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) gestoppt, extrahiert und *via* LC-MS in Bezug auf den relativen Umsatz von Substrat **4a** zu Produkt **2a** ausgewertet. Ziel dieser Untersuchung war es zum einen zu zeigen, dass diese Reaktion unter der Nutzung von katalytischen Mengen SAH zur gewünschten Reaktion führt und zum anderen einen Einblick in die zu optimierenden Parameter dieser Reaktion zu erhalten (**Abbildung 52**).



Abbildung 52. Reaktionsschema für die Untersuchung der gekoppelten *Ct*HMT-*Sg*PsmD-Reaktion zur Implementierung und Validierung des SAM-Recyclingsystems anhand der natürlichen *Sg*PsmD-Reaktion. Adaptiert und verändert nach Schneider *et al.*^[205]

Dafür wurden die Enzyme (10 oder 50 µM *Sg*PsmD, 10 oder 50 µM *Ct*HMT) wechselseitig in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, die SAH Menge (10 µM oder 50 µM) und die Temperatur (30 oder 35 °C) variiert. Zusätzlich wurde in einer weiteren Untersuchung getestet, ob die Substratbeladung und die Laufzeit der Reaktion erhöht werden können und zu einer Steigerung der Umsätze führen. All diese Parameter tragen zu einem optimalen Umsatz des gekoppelten Systems bei und müssen aufeinander abgestimmt werden. Für die initiale Testung wurden alle Experimente in Duplikaten durchgeführt und sind entsprechend als Mittelwert aus zwei unabhängigen Reaktionen dargestellt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 53** zusammengefasst.

Es konnte gezeigt werden, dass die von *Seebeck* und *Liao* publizierte SAH Konzentration (50 μ M) mehr als ausreichend für eine vollständige Umsetzung des Substrats **4a** in dem hier getesteten gekoppelten Ansatz ist. Bereits 10 μ M SAH genügen, um einen vollständigen Umsatz zu erzielen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass vor allem die Enzymmenge den Umsatz limitiert. Dabei war besonders auffällig, dass weniger die *Ct*HMT- und mehr die *Sg*PsmD-Konzentration Einfluss auf die Reaktion nimmt. Dies deutet darauf hin, dass bereits bei geringen *Ct*HMT Konzentrationen ausreichend SAM gebildet wird und somit das eigentliche SAM-Recyclingsystem nicht limitierend für die Umsätze in der hier getesteten Reaktion ist.



Abbildung 53. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung der gekoppelten *Ct*HMT-*Sg*PsmD-Enzymreaktion zur Implementierung des SAM-Recyclingsystems. Es wurden verschiedenen Enzymkonzentrationen (1 – 4) kombiniert und unter 30 bzw. 35 °C und bei 10 bzw. 50 µM SAH getestet. 1 = 50 µM *Ct*HMT und 50 µM *Sg*PsmD, 2 = 10 µM *Ct*HMT und 10 µM *Sg*PsmD, 3 = 50 µM *Ct*HMT und 10 µM *Sg*PsmD; 4 = 10 µM *Ct*HMT und 50 µM *Sg*PsmD. [Assaybedingungen: 10–50 µM *Sg*PsmD, 10– 50 µM *Ct*HMT, 2 mM Substrat **4a**, 5 mM Methyliodid, 10–50 µM SAH, KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO, 30–35 °C, 16 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Die Experimente wurden als unabhängige Duplikate durchgeführt und sind als Mittelwert dargestellt.

Für die untersuchten Temperaturen konnte nur ein geringer Unterschied festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass der Unterschied in dem getesteten Temperaturbereich zu vernachlässigen ist. Temperaturen größer als 40 °C sind für dieses System nicht geeignet, da davon auszugehen ist, dass ein Großteil des in Lösung befindlichen Methyliodids in die Gasphase übergehen würde (Siedepunkt Methyliodid = 42 °C). Dies würde zu nicht reproduzierbaren Schwankungen der Methyliodidkonzentration führen. Es bleibt festzuhalten, dass ein vollständiger Umsatz des Substrats 4a beobachtet werden konnte. Die Substratkonzentration für dieses Experiment lag bei 2 mM und sollte im folgenden Experiment weiter erhöht werden, um zu bestimmen, ob eine Erhöhung der Substratkonzentration bei gleichbleibender Enzym- und SAH-Konzentration möglich ist. Damit sollte überprüft werden, ob die Gesamteffektivität des Systems weiter zu erhöhen ist. Zu diesem Zweck wurde die besten, zuvor getesteten Reaktionsbedingungen (Abbildung 53) übernommen und die Experimente wiederholt, während die Substratkonzentration von 2 mM bis 6 mM erhöht wurde. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich bei einer Erhöhung der Substratkonzentration eine längere Reaktionszeit positiv auf die relativen Umsätze auswirkt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 zusammengefasst.



Abbildung 54. Ergebnis der Untersuchung der Erhöhung der Substratkonzentration auf das gekoppelte SAM-Recyclingsystem. Es wurden verschiedene Substratkonzentrationen getestet und für 16 h und 40 h inkubiert. [Assaybedingungen: 50 μM *Sg*PsmD, 10 μM *Ct*HMT, 2-6 mM Substrat **4a**, 8–20 mM Methyliodid, 10 μM SAH, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO, 30 °C, 16–24 h, 800 *rpm*, 1 mL Assayvolumen]. Die Experimente wurden als unabhängige Duplikate durchgeführt und sind als Mittelwert dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei gleichbleibender SAH- und Enzymkonzentration der Umsatz bei gleichzeitiger Erhöhung der Substratkonzentration abnimmt. Für eine Substratkonzentration von 6 mM Substrat konnten über 70 % relativer Umsatz beobachtet werden. Gleichzeitig wurde festgestellt, dass bereits eine Erhöhung der Substratkonzentration auf 3 mM zu einer Verminderung des relativen Umsatzes im Vergleich zu 2 mM Substratkonzentration führt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Umsätze nach 40 h höher waren als nach 16 h. Dies legt nahe, dass die Reaktionszeit verlängert werden sollte, um einen optimalen Umsatz zu erzielen. Es bleibt festzuhalten, dass ein einfaches Screening wie hier dargestellt nur geringe Erfolgsaussichten für eine komplexe, Multi-Parameter-Reaktion wie diese aufweist. Trotz der erfolgreichen Implementierung des SAM-Recyclingsystems in diesem Experiment, wurde deshalb eine statistische Versuchsplanung durchgeführt um alle relevanten Parameter bestimmen und optimieren zu können.

6.3.3 Optimierung des SAM Recycling durch statistische Versuchsplanung

Bei dieser Art des enzymgekoppelten Recyclings ist es besonders wichtig die Bedingungen auf die beiden verwendeten Enzyme abzustimmen. Dies unterscheidet beispielsweise das enzymgekoppelte vom substratgekoppelten Recycling. Neben der Temperatur und dem pH-Wert, nehmen sowohl die beiden Substratkonzentrationen, die SAH-Konzentration und die Enzymkonzentrationen Einfluss auf die Reaktion. Zusätzlich können Proteasen, die meist eine prosthetische Gruppe in Form eines zweiwertigen Kations aufweisen, einen negativen Einfluss durch Abbau der für die Reaktion notwendigen Enzyme nehmen. Entsprechend wurden folgende Parameter basierend auf den zuvor erhaltenen Ergebnissen für die statistische Versuchsplanung (*engl. design of exeperiment*, DoE) ausgewählt und anschließend in Duplikaten randomisiert getestet:

- Temperatur (25 °C und 35 °C)
- pH (7.5 und 8 in KP_i)
- EDTA (0 und 1 mM)
- SAH-Konzentration (20 und 50 μM)
- Methyliodidkonzentration (1 und 5 mM)

Die fünf genannten Parameter wurden systematisch in einem *factorial design* untersucht. Es sollte festgestellt werden, welche dieser Parameter generell einen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion nehmen und welche ggf. für ein weiteres Screening außer Acht gelassen werden können. Da aus den vorherigen Experimenten bekannt war, dass die *Ct*HMT und *Sg*PsmD-Konzentration einen deutlichen Einfluss auf die Reaktion haben, sollten diese Parameter in einer zweiten Runde mit den relevanten, hier bestimmten Parametern getestet werden. Die Substratkonzentration für jedes Experiment lag bei 2 mM. Eine weitere Adaption an die eigentliche Fragestellung war die Verwendung von *Ct*HMT-CFE anstelle von gereinigtem Enzym, was für die präparative Anwendung Vorteile in der Handhabung bedeutet. Um reproduzierbare Ergebnisse erhalten zu können wurde deshalb für die verwendete *Ct*HMT-CFE Charge die volumetrische Aktivität bestimmt (**8.5.6**). Die Auswertung der einzelnen Reaktionen erfolgte über HPLC-UV und es weiteren Substrat **4a**, Produkt **2a** und der verwendete interne Standard 3-Methylindol (**83**) mit derselben Methode kalibriert (**Abbildung A**).

Für das erste DoE wurden insgesamt 32 Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 55** zusammengefasst und geben wieder, ob ein Zusammenhang zwischen Umsatz und dem getesteten Parameter besteht. Dafür wurden jeweils die rel. Umsätze [%] des zu testenden Parameters unter gleichbleibenden Bedingungen ermittelt. Je steiler eine Gerade ansteigt, desto größer ist der Unterschied und desto größer ist der Einfluss des Parameters auf die Gesamtreaktion. Basierend auf den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass von den fünf untersuchten Parametern zwei (Temperatur und Methyliodidkonzentration) Einfluss auf die Reaktion nehmen. Für zwei der getesteten Parameter (pH, EDTA) konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Für die SAH-Konzentration konnte bei höheren Konzentrationen ein geringfügig erhöhter Umsatz beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den unter **6.3.2** erhobenen Daten überein und es konnte erfolgreich eine statische Versuchsplanung durchgeführt werden.



Abbildung 55. Übersicht über den Einfluss der einzelnen Parameter auf den relativen Umsatz [%]. Zum direkten Vergleich wurden jeweils die Ergebnisse aus den Experimenten unter den günstigsten Bedingungen mit dem größten rel. Umsatz [%] verglichen. Alle Experimente wurden als Duplikate durchgeführt. Für den gesamten Datensatz der Analyse siehe Anhang (**Tabelle A1**).

Im nächsten Schritt sollten alle bekannten und relevanten Parameter in einem weiteren, ähnlich aufgebauten Experiment untersucht werden. Ziel war es die Reaktion vor allem im Hinblick auf den Enzymeinsatz so ökonomisch wie möglich bei maximalem Umsatz zu gestalten. Für die zweite statistische Versuchsplanung wurden deshalb die Enzymkonzentrationen von CtHMT, in Form der zugegebenen CFE Menge, und die verwendete SqPsmD Menge evaluiert. Die Temperatur wurde für alle Experimente auf 35 °C festgelegt und gleichzeitig die Substratkonzentration auf 2 mM fixiert. Zusätzlich wurden verschiedene Methyliodidkonzentrationen untersucht. Für das zweite DoE wurden insgesamt 33 Experimente durchgeführt und der wechselseitige Einfluss der Enzym- und Methyliodid-Menge bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 56 als 3D-surface-plot zusammengefasst.



Abbildung 56. Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung dargestellt als *3D-surface-plot*. Aufgetragen ist die *Sg*PsmD Menge [μ L] gegen die genutzt Methyliodidkonzentration [mM] bei optimierter *Ct*HMT-CFE Menge (250 μ L; 25 % des Gesamtvolumens) gegen den relativen Umsatz [%]. Die Oberfläche stellt einen Querschnitt des 3D *plots* dar und die dunklen Bereiche liegen oberhalb der Ebene. Alle Experimente wurden als Duplikate durchgeführt. Für den gesamten Datensatz der Analyse siehe Anhang (**Tabelle A2**). Die Analyse der Rohdaten und die Erstellung des *3D-surface-plot*. wurden von Dr. Thomas Classen (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) mit Hilfe der Software *DesignExpert 11* durchgeführt

Bei Betrachtung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass für einen optimalen relativen Umsatz [%], weder die Enzymkonzentration noch die Methyliodidkonzentration maximal sein müssen. Für die Methyliodidkonzentration ist eine detaillierte Betrachtung der Rohdaten notwendig, hier zeigte sich, dass für eine Methyliodidkonzentration von 13 mM der reproduzierbar höchste Umsatz möglich war (**Tabelle A2**), während sich eine weitere Erhöhung negativ auswirkte. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 15** zusammengefasst und beziehen sich auf die im Kontext günstigsten Bedingungen. Demnach sind die Bedingungen dargestellt, bei denen ein größtmöglicher Umsatz, bei gleichzeitig minimaler Enzymbeladung erreicht wurde. Eine weitere Erhöhung der Enzymmenge führt zwar weiterhin zu einer Erhöhung der Umsätze, allerdings sind die Unterschiede gering und rechtfertigen damit nicht den übermäßigen Einsatz von Enzym. Insofern geben die optimalen Parameter die ökonomisch sinnvollste Lösung des *3D-surface-plot* wieder.

Parameter	Wert
SgPsmD-Konzentration	6.7 µм (0.8 U/µg)
CtHMT-CFE Menge	262 μL (0.09 U/mL)
Methyliodidkonzentration	13 mm (aus 1.3 mm Stocklösung in DMSO)
Substratkonzentration	2 mM (aus 200 mM Stocklösung in DMSO)
SAH-Konzentration	20 µм (aus 2 mм Stocklösung in DMSO)
EDTA-Konzentration	1 mM
Temperatur	35 °C
pH	7.5 in KP _i -Puffer (100 mм)

Tabelle 15. Zusammenfassung der optimalen Parameter für das enzymgekoppelte
SAM-Recyclingsystem (Reaktionsansatzgröße = 1 mL)

Die statistische Versuchsplanung sinnvoll hat aezeiat. dass es ist. eine Multi-Parameter-Reaktion, wie enzymgekoppelte Recyclingsysteme, systematisch zu optimieren. In den hier gezeigten Ergebnissen konnte die Ökonomie der Reaktion über den geringeren Verbrauch des Katalysators optimiert werden. Gleichzeitig konnte hinsichtlich der Ökologie der Reaktion optimiert werden, indem der Verbrauch und Bedarf von Methyliodid für diese Reaktion im Vergleich zu Liao et al. gesenkt werden konnte. Im nächsten Abschnitt wurden die hier bestimmten Bedingungen auf die präparative Herstellung von verschiedenen Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen übertragen und angewendet.

6.3.4. Zusammenfassung des Kapitels

- Die Halogenid-Methyltransferase CtHMT konnte erfolgreich produziert und gereinigt werden
- Es konnte erfolgreich ein enzymgekoppeltes, direktes SAM-Recyclingsystem basierend auf einer Halogenid-Methyltransferase etabliert werden
- Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden durch statistische Versuchsplanung bestimmt und sowohl der Verbrauch von SAH als auch die Enzymbeladung konnten optimiert und gesenkt werden. Vollständige Umsätze für die getestete Reaktion wurden unter Nutzung des SAM-Recyclingsystems erzielt

6.4 Nutzung von Methyltransferasen zur präparativen Synthese und Evaluierung der Bioaktivität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das SAM-Recyclingsystem in Verbindung mit der Anwendung von *C*-3 Indol-Methyltransferasen im kleinen Maßstab (1 mL) möglich ist, wurden die optimierten Bedingungen skaliert und für die präparative Anwendung genutzt. Reaktionen vom analytischen Maßstab (1 mL) auf präparative Größe (> 100 mL) zu skalieren, kann einen Flaschenhals in der Entwicklung solcher Systeme darstellen. Geeignete Reaktionsgefäße in dieser Größe sind meist aus Glas und unterscheiden sich in ihrer Beschaffenheit deutlich von den Bedingungen in einem Plastik-Mikroreaktionsgefäß. Neben Erlenmeyerkolben, werden häufig Rundkolben oder auch Schottflaschen genutzt. Für diesen Fall sollte das Reaktionsgefäß verschließbar sein, um einen Austritt von Methyliodid aus der Lösung zu verhindern. In vorherigen Arbeiten konnte von Klein *et al.* gezeigt werden, dass sich besonders Schottflaschen für den Einsatz in der präparativen Biokatalyse eigenen und wurden für diese Arbeit entsprechend genutzt.^[259] Eine weitere Optimierung wurde nicht durchgeführt und die Bedingungen wie in **Tabelle 15** beschrieben angewendet und skaliert, um die angestrebte Umsatzmenge von 50 mg zu erreichen.

6.4.1 Anwendung von SgPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese

Für die unter Abschnitt 6.3.3 optimierte Reaktion wurde zunächst getestet, ob sich die evaluierten Parameter auf ein größeres System in einer Schottflasche übertragen lassen. Es sollten 50 mg (0.18 mmol) Substrat **4a** umgesetzt werden. Das dafür benötigte Volumen betrug 90 mL. Entsprechend wurden die Experimente in einer 250 mL Schottflasche durchgeführt. KPi-Puffer pH 7.5 wurde vorgelegt und die benötigte Menge CtHMT-CFE zugegeben. Anschließend wurden SAH, Methyliodid und 4a als DMSO-Stock zur Lösung hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe von gereinigtem SgPsmD gestartet und bei 35°C und 300 rpm für 24 h Stunden in einem geschlossenen Inkubator geschüttelt. Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse sind in Abbildung 57 zusammengefasst. Es konnte gezeigt werden, dass die präparative Umsetzung von Substrat 4a zu Produkt 2a mit SaPsmD unter Verwendung eines enzymgekoppelten Recyclingsystems durchgeführt werden kann. Unter den gewählten Bedingungen konnte ein vollständiger Umsatz erzielt werden (bestimmt über HPLC-UV). Nach Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt 2a mit einer Ausbeute von 84 % isoliert werden. Des Weiteren erfolgt diese Umsetzung unter Recyclingbedingungen stereoselektiv und das Produkt 2a konnte mit einem Enantiomerenüberschuss (ee, engl. enantiomeric excess) von > 99 % (nachgewiesen über HPLC-UV Messung an chiraler stationärer Phase) hergestellt werden.



Abbildung 57. Reaktionsschema für die präparative, biokatalytische Umsetzung von Substrat **4a** zu Produkt **2a**. Die Reaktion wurde in einer 250 mL Schottflasche durchgeführt. [Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat **4a**, 13 mM Methyliodid, 20 μM SAH 6.7 μM *Sg*PsmD (16 U/g), 25 mL *Ct*HMT (0.09 U/mL), KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (v/v) DMSO, 35 °C, 24 h, 300 *rpm*, 90 mL Reaktionsvolumen]. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Irene Küberl (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erstellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Basierend auf den gezeigten Ergebnissen sollten in der Folge weitere Verbindungen präparativ hergestellt werden. Dazu wurden Substrat **4e** und **3g** unter denselben Bedingungen wie unter **6.4.1** umgesetzt und analysiert. Verbindung **4e** wurde ausgewählt, da gezeigt werden sollte, dass auch sterisch anspruchsvolle Verbindungen biokatalytisch zugänglich sind. Das 5'-H Indol **3g** zählt zu den besonders anspruchsvollen Substraten mit niedriger *Sg*PsmD Aktivität von unter 10 % (**Abbildung 42**). Es sollte gezeigt werden, dass auch diese Substrate präparativ hergestellt und isoliert werden können. Die Ergebnisse für die präparative Umsetzungen sind in **Tabelle 16** zusammengefasst.

Tabelle 16. Übersicht über die Ergebnisse der präparativen Herstellung verschiedener Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole mittels Biokatalyse. [Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat, 13 mM Methyliodid, 20 μM SAH 6.7 μM SgPsmD (16 U/g), 25 mL CtHMT (0.09 U/mL), KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO, 30 °C, 24 h, 300 *rpm*, 100 mL Reaktionsvolumen]. **ee:** Enantiomerenüberschuss (*engl. enantiomeric excess*)

Substrat	Produkt	Relativer Umsatz [%]	Ausbeute [%]	ee [%]
4a	2a	100	84	> 99
4e	2e	32	25	> 99
3g	2m	19	13	> 99

Die biokatalytische, präparative Herstellung verschiedener Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole konnte unter den getesteten Bedingungen erfolgreich durchgeführt werden und die Verbindungen **2a**, **2e** und **2m** erfolgreich isoliert werden.

Entsprechend der verringerten Aktivitäten der anspruchsvollen Substrate 4e und 3g gegenüber dem natürlichen Substrat 4a, wurden für diese geringere Umsätze beobachtet und es konnte weniger Produkt isoliert werden. Dennoch sind die Ergebnisse als Erfolg zu verbuchen, da eine präparative, biokatalytische Synthese generell möglich ist und sich die Verbindungen isolieren ließen. Zudem wurden auch hier die Bildung der Produkte mit einem Enantiomerenüberschuss von > 99 % gebildet. Da die hier genutzten Bedingungen für die natürliche Reaktion optimiert wurden, war ein geringerer Umsatz für die anspruchsvollen Substrate 4e und 3g somit zu erwarten. Obwohl SgPsmD im Vergleich zu SaPsmD das Enzym mit den besseren Enzymkennzahlen (k_{cat} und v_{max}) ist (**Tabelle 13**), bleibt die Enzymstabilität ein limitierender Faktor. Wie bereits zuvor unter 6.3.2 gezeigt, konnte auch durch Verlängerung der Reaktionszeit kein wesentlich größerer Umsatz erzielt werden. Infolgedessen wurde für die weitere präparative Herstellung von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen SaPsmD genutzt.

6.4.2 Anwendung von SaPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese

Die Nutzung von SaPsmD in der präparativen Biokatalyse hätte im Grunde genommen zwei große Vorteile. Es konnte zunächst unter 6.2.3 gezeigt werden, dass SaPsmD im Gegensatz zu SgPsmD über 24 h hinweg in aktiver Form vorliegt und so die Reaktion über einen längeren Zeitraum hinweg katalysieren kann, was den Nachteil der geringeren katalytischen Effizienz ausgleicht. Darüber hinaus konnte von D. Amariei gezeigt werden, dass eine Expression von psmD Sa in E. coli BL21 Amnt (DE3) möglich ist und damit eine direkte Nutzung von CFE anstelle von gereinigtem Enzym möglich erscheint.^[296] Damit wird der Aufwand durch nicht notwendige Proteinreinigung gesenkt und die Handhabung des Systems insgesamt vereinfacht. Auf Zugabe von zusätzlichem SAH konnte bei diesem Versuchsaufbau verzichtet werden. Es genügt das im CFE natürlich enthaltene SAH aus dem E. coli-eigenen pool wie von D. Amariei durch systematische Optimierung des Systems durch statistische Versuchsplanung gezeigt werden konnte. Für die Durchführung wurden prinzipiell die von D. Amariei beschriebenen Konditionen benutzt. Für jeden Ansatz wurde frisches CtHMT-CFE sowie SaPsmD-CFE durch Ultraschallaufschluss des Zellpellets in KPipH 7.5 (100 mM, enthält 1 mM EDTA) und anschließende Zentrifugation vorbereitet.^[296] Zu der Lösung aus CFE wurde dann das entsprechende Substrat (1 mM finale Konzentration) und Methyliodid (10 mM finale Konzentration) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 24-48 h, je nach Reaktionsverlauf, welcher anhand regelmäßiger DC Kontrolle verfolgt wurde, durch Zugabe von EtOAc gestoppt. Nach anschließender Extraktion und Reinigung mittels Säulenchromatographie konnten insgesamt acht Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen (2b, 2d, 2c, 2s, 2e, 2r, 2g und 2h) erfolgreich isoliert werden. Die Ergebnisse der präparativen Biokatalyse mittels SaPsmD sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Ausbeute für die hier gezeigte präparative Biokatalyse schwankte von 10 % bis zu 79 %, was einerseits mit der substratabhängigen SaPsmD-Enzymaktivität zu
erklären ist und andererseits mit der Extraktion und Reinigung des Biokatalyse-Ansatzes zusammenhängt.

Tabelle 17. Übersicht der Ergebnisse der präparativen Herstellung von verschiedenen Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen mit SaPsmD unter Anwendung des SAM-Recyclingsystems. [Reaktionsbedingungen: 1 mM Substrat **4**, 10 mM Methyliodid, 20 % CFE SaPsmD (0.1 U/mL), 14 % *Ct*HMT (0.09 U/mL), KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5, 1 mM EDTA), 2 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 24 h, 300 *rpm*, 100 mL Reaktionsvolumen].

Me 🦳

$\mathbf{R}^{2} \qquad \qquad$							
Verbindung	R ¹	R ²	Ausbeute				
2b	° v	H O J	44 mg (66 %)				
2d	° v	[−] N [−] O ₃ s	35 mg (50 %)*				
2c	No.	[−] N [−] O ₃ ³ ⁵	55 mg (78 %)				
2r	° ° °	H O J	15 mg (20 %)*				
2e	No.	H O J	17 mg (32 %)*				
2s	^b vvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvvv	−N −O 355 O	45 mg (70 %)*				
2g	No. No.		46 mg (72 %)				
2h	0 	∼ ^H N O _{js} s	52 mg (79 %)				

*Diese Verbindungen enthielten nach säulenchromatographischer Reinigung noch deutliche Kontaminationen. Die Ausbeute könnte deshalb abweichen und es wurde keine qNMR Analyse vorgenommen.

6.4 Nutzung von Methyltransferasen zur präparativen Synthese und Evaluierung der Bioaktivität

Es konnte aezeiat werden. dass präparative Biokatalyse unter Nutzuna der C-3 Indol-Methyltransferase generell möglich ist. In dieser Arbeit wurde erfolgreich eine Hexahvdropyrrolo[2,3-b]indol-Bibliothek erstellt, von der die meisten Verbindungen zuvor nicht synthetisch zugänglich waren oder sind. Somit stellt die Biokatalyse für diese Art von Verbindungen eine wertvolle Methodik zur Herstellung dar. Für die meisten der dargestellten Verbindungen konnten gute Ausbeuten von über 60 % erzielt werden. Allerdings wurde derselbe Trend, welcher zuvor schon bei der Nutzung von SgPsmD beobachtet werden konnte, wahrgenommen. Je geringer die Aktivität von PsmD für das jeweilige Substrat ist, desto geringer fallen die Ausbeuten aus. Für den Einsatz von SaPsmD konnte allerdings gezeigt werden, dass dieser Trend weniger stark ausgeprägt ist und Verbindungen mit einer relativen Aktivität von 20-30 % (Abbildung 50) konnten präparativ mit guten Ausbeuten zugänglich gemacht werden.

Generell sind die Ausbeuten geringer als 80 % und eine Erklärung dafür wurde von D. Amariei aufgezeigt.^[296] Ein Grund ist das Auftreten eines N-methylierten Nebenproduktes 5 durch überschüssiaes Methyliodid in der Reaktionslösung und dadurch verursachte Hintergrundmethylierung des freien, verbleibenden Stickstoffs. Dieses Nebenprodukt wird in der Regel bei ieder Reaktion gleichmäßig mit bis zu 15 % gebildet und limitiert dadurch die maximale mögliche Ausbeute. Auch unter den hier verwendeten Bedingungen konnte die Bildung des Nebenproduktes mittels Dünnschichtchromatographie beobachtet werden. Dabei ist das Nebenprodukt sehr gut zu erkennen, da es im Vergleich zum Hauptprodukt einen höheren Rf-Wert aufweist und beim Anfärben mit MolyDip einen charakteristischen gelb-roten Spot bildet, während das Hauptprodukt meist blau-violett erscheint. Ein Versuch, die Nebenprodukte zu isolieren und zu guantifizieren wurde unternommen, konnte aber aufgrund der teilweise sehr kleinen Menge unter den genutzten säulenchromatographischen Bedingungen nicht realisiert werden. Für die isolierten und sauberen Verbindungen wurde mittels gNMR die Reinheit bestimmt (8.6.1.7). Anschließend wurden diese auf Ihre biologische Aktivität hin untersucht.

Eine bekannte molekulare Zielstruktur für Verbindungen mit einem Hexahvdropyrrolo[2.3-b]indol-Strukturmotiv sind die Acetvlcholinesterase sowie Butyrylcholinesterase. Diese beiden Enzyme werden von Physostigmin (1) inhibiert und sollten zunächst untersucht werden. Zusätzlich sollten neue molekulare Zielstrukturen identifiziert werden, die wirkstoffähnlichen Eigenschaften der biokatalytisch hergestellten Verbindungen analysiert und die ADME Parameter in silico bestimmt werden.

93

6.4.3 Testung biologischer Aktivität produzierter Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole

Acetyl- bzw. Butyrylcholin sind wichtige Transmitter, die an vielen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt sind. Der Abbau dieser Botenstoffe erfolgt durch die Acetylcholinesterase (AChE) und die Butvrvlcholinesterase (BChE). Insbesondere bei degenerativen Nervenkrankheiten wie Alzheimer kann ein ausgeprägter Mangel dieser Botenstoffe zu Symptomen wie Ruhelosigkeit oder dem für Alzheimer typischen Tremor führen. Zur Behandlung dieser Symptome werden sogenannte Cholinesterase-Inhibitoren eingesetzt, welche durch Inhibition der entsprechenden Esterasen den Abbau des Botenstoffs verhindern und so die Symptome verbessern sollen. Obwohl dies nicht direkt zur Heilung der entsprechenden Krankheit beiträgt, helfen diese Inhibitoren das Leid der Patienten zu verringern.^[260, 261] Ein bekannter Wirkstoff aus der Klasse der Cholinesterase-Inhibitoren ist Physostigmin (1). Aufgrund seiner hohen Potenz wird und wurde dieser Naturstoff zur Inhibition dieser Enzyme eingesetzt. Allerdings ist die Anwendbarkeit von Physostiamin aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften begrenzt.^[117] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Physostigmin und den in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen wurde mit Hilfe des sogenannten Ellmann-Assay überprüft, ob die unter 6.4.2 hergestellten Verbindungen eine inhibitorische Aktivität gegenüber der AChE und BChE aufweisen.



Abbildung 58. Schematische Darstellung des AChE- bzw. BChE-Assay nach Ellmann *et al.*^[262] Als Substrate dienen Acetylthiocholiniodid und Butyrylthiocholiniodid, welche durch die Esterase-Aktivität in freie Thiole gespalten werden und mit dem Ellmanns Reagenz (DNTB) reagieren können. So entsteht eine gelbe Färbung der Lösung, welche bei 410 nm detektiert werden kann. [Assaybedingungen: 162 μL (1.5 mM DNTB Lösung in 100 mM KP_i pH 8), 8 μL Inhibitor, 50 μL of AChE Lösung (0.5 U/mL in 100 mM KP_i pH 8, Aktivität laut Hersteller) oder BChE Lösung (5.0 U/mL in 100 mM KP_i pH 8, Aktivität laut Hersteller), 30 μL Acetylthiocholiniodid oder Butyrylcholiniodid Lösung (15 mM in 100 mM KP_i pH 8)]

Zur Durchführung und Bestimmung der inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) wurde eine Verdünnungsreihe (zwölf Verdünnungsschritte jeweils, 1:4) der zu testenden Substanz hergestellt (31 mM–8 nM). Für jede Konzentration wurde die verbleibende Enzymumsatzrate

bestimmt, durch Vergleich mit einer Negativkontrolle die relative Enzymaktivität bestimmt und gegen die getestete Konzentration aufgetragen. Über eine Substanz-Wirkungskurve (*engl. dose-response curve*) konnte über einen nichtlinearen *fit* die inhibitorische Konzentration bestimmt werden (**Abbildung A 7** und **Abbildung A 8**). Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde das Assay zusätzlich mit bekannten AChE und BChE Inhibitoren durchgeführt und für diese Substanzen ebenfalls die inhibitorische Konzentration bestimmt. Für alle in **Tabelle 18** aufgelisteten Substanzen wurde vor der Messung eine quantitative NMR-Analyse zur Bestimmung der Reinheit durchgeführt. Kommerzielle Substanzen wurden überprüft, falls keine Reinheit vom Hersteller angegeben wurde oder die angegebene Reinheit unter 98 % lag. Die Ergebnisse der Messungen sind in **Tabelle 18** zusammengefasst.

Tabelle 18. Ergebnisse der Bestimmung der inhibitorische Konzentration (IC₅₀) für die AChE und BChE. Es wurden sowohl Kommerzielle als auch Substanzen, die innerhalb dieser Arbeit synthetisiert wurden, getestet. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt und die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Verbindung	Reinheit	AChE IC₅₀ [µM]	BChE IC₅₀ [µM]	BChE/AChE
Rivastigmin (18)	> 95 %	36.1± 2.7	1.0 ± 0.06	0.03
Physostigmin (1)	> 95 %*	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.92
Eserolin (12)	> 95 %	8.3 ± 0.4	> 1000	n.b.
Esermethol (30)	> 95 %*	>1 000	9.3 ± 0.4	n.b.
2a	> 90 %*	0.09 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.10
2b	> 95 %*	0.15 ± 0.01	0.01 ± 0.002	0.07
2c	> 95 %*	0.19 ± 0.02	0.02 ± 0.002	0.10
2g	> 95 %*	0.18 ± 0.03	0.05 ± 0.006	0.28
2h	> 95 %*	0.40 ± 0.06	0.02 ± 0.001	0.05

* Reinheit wurde mittels qNMR bestimmt.

Wahrend alle getesteten Verbindungen, welche eine 5'-Carbamoyl-Seitenkette aufweisen, eine inhibitorische Aktivität gegenüber den getesteten Esterasen aufweisen, trifft das auf Eserolin und Esermethol nicht zu. Dies kann über die Struktur-Wirkbeziehung (*engl structure activity relation, SAR*) von Physostigmin begründet werden. Verantwortlich für die Inhibition ist die Carbamoylierung der Esterase durch Hydrolyse von Physostigmin. Dabei wird der Carbamyl-Rest auf das Enzym übertragen. Während die Spaltung des Physostigmins schnell abläuft, braucht die Regeneration des Enzyms deutlich länger. In dieser Zeit steht das aktive Serin der Esterase allerdings nicht zur Hydrolyse des Transmitters zur Verfügung. Man spricht dabei von einer pseudo-irreversiblen Inhibition.

Für die in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen **2a**, **2b**, **2c**, **2g** und **2h** konnte erfolgreich ein IC₅₀-Wert bestimmt werden. Im Vergleich zu dem bekannten Inhibitor Physostigmin fällt auf, dass alle Verbindungen ohne *N*-Methylgruppe eine erhöhte Selektivität gegenüber der BChE aufweisen. Gleichzeitig zeigen sich diese Verbindungen gegenüber der AChE ähnlich potent wie Physostigmin. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die über präparative Biokatalyse hergestellten Verbindungen nicht nur bioaktiv sind, sondern im Vergleich zu Physostigmin eine erhöhte Selektivität gegenüber der BChE aufweisen. Diese Verbindungen waren zuvor chemisch nicht zugänglich und wurden in dieser Arbeit das erste Mal hergestellt und beschrieben.

Basierend auf der hier bestimmten Bioaktivität stellte sich die Frage, ob diese Verbindungen auch eine Bioaktivität gegenüber anderen molekularen Zielstrukturen aufweisen und gegebenenfalls eine breitere Anwendbarkeit aufweisen, als bisher angenommen wurde. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst eine Literatur basierte Suche nach bekannten Zielstrukturen für Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole durchgeführt.

6.4.4. Bestimmung von molekularen Zielstrukturen von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen und in-silico Evaluierung

Um molekulare Zielstrukturen außerhalb der AChE und BChE zu identifizieren, wurden bekannte Physostigmin Stoffwechselprodukte oder Analoga ohne Carbamoyl-Seitengruppe untersucht. Speziell für Eserolin (12) sind biologische Daten verfügbar, während weder für Esermethol (30) noch Rubreserin (85) Daten zur biologischen Aktivität in der PubChem Datenbank^a hinterlegt sind. Basierend darauf wurden die für Eserolin (12) belegten molekularen Zielstrukturen und Organismen zusammengefasst (Tabelle 19) und als Basis für eine weitere Evaluierung genutzt. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) erstellt.

Tabelle 19.	. Zusammenfas	sung der	auf PubChem ^a	vorhandenen	Daten zur	Bioaktivität	von l	Eserolin
(12). M-1: N	/luskarinischer /	Acetylcholi	nrezeptor-1; M·	-2: Muskarinis	cher Acetyl	cholinrezept	or-2.ª	

IC₅₀ [nM]	Zielstruktur	Organismus	Тур
200	CYP 450 2D6	Homo sapiens	Protein
300	Mu Opioid Rezeptor	Rattus norvegicus	Protein
3981	Plasmodium falciparum	Plasmodium falciparum	Organismus
3981	Demethylase 4A	Homo sapiens	Protein
4456	Aldolase	Giardia intestinalis	Protein
5323	Protein Kinase PLK-I	Homo sapiens	Protein
6310	Putative Demethylase 4A	Homo sapiens	Protein
37000	M-1 Rezeptor	Mus musculus	Protein
160000	M-2 Rezeptor	Rattus norvegicus	Protein

Im Anschluss wurden basierend auf den in **Tabelle 19** zusammengefassten Daten eine Bibliothek von molekularen Zielstrukturen als Grundlage für eine *in silico docking* Untersuchung verwendet. Für die ausgewählten Zielstrukturen mussten zwei Kriterien erfüllt werden: Zum einen muss für reproduzierbare *docking* Resultate eine Kristallstruktur des entsprechenden Proteins in der Protein Datenbank (PDB, *engl. protein data base*) hinterlegt sein. Zum anderen sollten nur Zielstrukturen berücksichtigt werden, welche mit schweren und für die Menschheit bedrohlichen Krankheiten assoziiert werden können oder sich im Bereich der Pestizidentwicklung oder Bekämpfung von parasitären Erkrankungen als nützliche Zielstruktur erwiesen haben. Insgesamt wurden 16 (**Tabelle 20**). unterschiedliche molekulare Zielstrukturen mit zwei unabhängigen *docking* Methoden überprüft. Die Ergebnisse der *in silico* Untersuchung wurden in **Abbildung 59** zusammengefasst. Basierend auf den Ergebnissen des ersten Screenings, wurden weitere Versuche unternommen, um die Wechselwirkung mit entsprechenden Zielstrukturen besser zu verstehen. Dazu wurden die Enzyme AChE, BChE und der 5HT_{2c}-Rezeptor im Anschluss genauer untersucht um ein besseres Verständnis für die Interaktion des Liganden und dem Enzym/Rezeptor zu bekommen.

Tabelle 20. Übersicht der für das *in silico docking* verwendeten molekularen Zielstrukturen. Alle Zielstrukturen stammen aus *Homo sapiens* und stellen relevante Zielstrukturen für die Behandlung von Krankheiten dar. Ausnahmen sind farblich gekennzeichnet. **AS**: Zielstruktur zur Entwicklung neuer Pestizide, die für das *docking* genutzte 3D-Proteinstruktur stammt aus einem Homologiemodell. **Gf16bAld:** Essenzielles Protein aus dem Parasiten *Giardia lambia/intestinalis*. **ADCS:** Ubiquitäres Protein in Pflanzen und Bakterien als Startpunkt zur Entwicklung neuer Pestizide und Antibiotika. Diese Daten wurden von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

ID	Abkürzung	Zielstruktur	Uniprot ID	PDB ID
1	α2a-adrenoR	Adenosin Rezeptor A2a	P29274	6kuy
2	α4β2-nAChR	α4β2-Nikotinacetylcholin- <i>Rezeptor</i>	P07550	5afh
3	5HT _{2c}	5-Hydroxytryptamin Rezeptor 2C	P28335	6bqg
4	AChE	Acetylcholinesterase	P22303	6069
5	BChE	Butyrlcholinesterase	P06276	6r6v
6	AS	A. thaliana Anthranilsäure Synthase	P32069	Modell
7	LD4A	Lysine-Demethylase 4A	O75164	6g5x
8	$\alpha7_nAChR$	α7-Nikotinacetylcholin-Rezeptor	P36544	5afh
9	Gf16bAld	G.lambliaFructose-1,6-biphosphatealdolase	O97447	3ohi
10	m1_mAChR	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor-1	P11229	5cxv
11	STKinase	Serin/Threonin-Kinase	Q13188	2owb
12	AldRed	Aldose Reductase	P15121	2ikg
13	α2c-adrenoR	a2c-Adrenorezeptor	P18825	6kuw
14	ADCS	E. coli Aminodeoxychorismatsynthase	P05041	1k0e
15	GLP1R	Glucagon-like Peptid 1 Rezeptor	P43220	3iol
16	mu-opioidR	Mu Opioidrezeptor	P35372	5c1m



Molekulare Zielstruktur

Abbildung 59. Ergebnisse der *in silico docking* Experimente zur Untersuchung verschiedener molekularer Zielstrukturen. Auf der y-Achse wurden die untersuchten Verbindungen aufgetragen, auf der x-Achse finden sich die getesteten Zielstrukturen (**Tabelle 20**). Es wurden zwei unabhängige *docking* Experimente durchgeführt (**A**. u. **B**.) und der clogP-normalisierte *docking score* (angegeben als relativer *docking score*) ermittelt. Der relative *docking score* ergibt sich durch Subtraktion eines Schwellenwertes (-0.8) vom eigentlichen clogP-normalisierte *docking score*. Je kleiner der erreichte Wert, desto besser die vorhergesagte Bindungsaffinität. Liegt der relative Wert unter 0 (orange-gelb) kann eine weitere Evaluierung in Betracht gezogen werden. **A:** Glide Software (Version 90156) unter Nutzung der SP *scoring function* **B:** AutoDock (Version 3.0.5) unter Nutzung der DrugScore 2018 sc*oring function*. Diese Daten wurden von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Visualisierung und Aufarbeitung wurden vom Autor durchgeführt.^[263-267]

Für die Evaluierung der *docking* Ergebnisse wurde ein relativer *docking score* eingefügt. Der relative *docking score* beschreibt, wie gut oder schlecht eine getestete Substanz abschnitt. Je gelblicher und heller der Farbton, desto besser das Ergebnis. Berechnet wird der relative *docking score* durch Subtraktion eines Schwellenwertes (-0.8) vom eigentlichen *docking score*. Der *docking score* an sich beschreibt die energetische Betrachtung der Liganden-Protein

Interaktion und damit die freie Bindungsenergie (Δ G). Je kleiner die nötige Energie ist, desto wahrscheinlicher ist eine Ligand-Protein Interaktion. Zudem fällt auf, dass sich die Ergebnisse der beiden *docking* Experimente deutlich voneinander unterscheiden. Dies hängt maßgeblich von der verwendeten Software, sowie dem genutzten Algorithmus ab, welcher für die *in silico* Evaluierung genutzt wird (**A**: Glide Software (Version 90156) unter Nutzung der SP *scoring function* **B**: AutoDock (Version 3.0.5) unter Nutzung der DrugScore 2018 *scoring function*).^[263-265] Im Falle der Ergebnisse, welche mit Hilfe von Glide SP erhalten wurde, wurden die Unterschiede im clogP der entsprechenden Verbindung und deren Auswirkung auf die relative Bindungsaffinität zu dem Rezeptor berücksichtigt und entsprechend normalisiert.

Generell werden vier Methoden zur Evaluierung der Interaktion zwischen Protein und Ligand unterschieden (Stand 2018). 1. Abgeleitet von physikalischen Prinzipien basierend auf Anziehung- und Abstoßungskräften. 2. Empirische Ansätze (darunter fällt die genutzte Methode A). 3. Wissens- bzw. Datenbasierte Ansätze, welche experimentelle Datensätze verwenden (darunter fällt die genutzte Methode B). 4. Maschine learning basierte Ansätze die mehrere der unter 1-3 genannten Aspekte berücksichtigen können.^[266] Dies macht den direkten Vergleich zweier docking Experimente schwierig, welche mit unterschiedlichen Methoden erhoben wurden. Allgemein sollte ein hit im Optimalfall in beiden unabhängigen docking Experimenten als solcher erscheinen. So kann es durchaus sinnvoll sein unterschiedliche Methoden zur Evaluierung zu nutzen und die erhaltenen Ergebnisse abzugleichen, ohne die absoluten Werte direkt miteinander zu vergleichen. Beim ersten docking Experiment (Abbildung 59, A.) sticht vor allem die Verbindung 2c heraus und zeigt gegenüber verschiedenen Zielstrukturen eine Interaktion. Darunter fallen die AChE (4), der Adenosin Rezeptor A2a (1) und der muskarinische Acetylcholinrezeptor-1 (10), die allesamt eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen im Nervensystem übernehmen. Für das zweite docking Experiment (Abbildung 59, B.) sind die Ergebnisse deutlich heterogener und insbesondere Verbindung 2m und 2g zeigen einige Interaktionen. Auffällig sind dabei Interaktionen mit der STKinase (11) und dem 5HT_{2C} Rezeptor (3). Die hier erhaltenen Ergebnisse sollten als Ausgangpunkt für weiterführende Untersuchungen dienen. Von einer Überinterpretation sollte allerdings abgesehen werden, da bisher zu den hier untersuchten molekularen Zielstrukturen kaum experimentelle Daten im Hinblick auf die hier untersuchten Verbindungen zur Verfügung stehen und damit eine finale Aussage kaum zu treffen ist. Auffällig ist jedoch, dass die AChE in beiden docking Experimenten als molekulare Zielstruktur identifiziert werden konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten in der Folge weitere in silico Untersuchungen durchgeführt werden, um die erhaltenen Aussagen zu präzisieren und somit zumindest für einzelne Zielstrukturen eine genauere Aussage treffen zu können. Dazu wurden basierend auf den Ergebnissen Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand modellieren und untersucht. In dem hierfür angeschlossenen docking Experiment wurden nur Verbindungen berücksichtigt, welche bereits präparativ hergestellt werden konnten und für die bereits ein valider IC₅₀-Wert bestimmt wurde. Damit sollte ein erster Ansatzpunkt gefunden werden, um zu verstehen, wieso die hier hergestellten Verbindungen eine verbesserte inhibitorische Wirkung gegenüber der BChE im Vergleich zur AChE aufweisen (**Abbildung 60**). Zusätzlich wurde der 5HT_{2c} Rezeptor in die Untersuchung inkludiert, da dieser bei der vorhergegangenen Untersuchung (**Abbildung 59**) als Zielstruktur-Kandidaten identifiziert werden konnte und als sehr gut untersuchter Rezeptor gilt.



Abbildung 60. Ergebnisse des *docking* Experiments für die Enyzme AChE und BChE, sowie den Rezeptor 5HT_{2c}. Abgebildet ist der *docking score* [kcal/mol]. Je kleiner die benötigte Energiemenge [kcal] pro Moleküleinheit [mol] ist, desto höher ist die vorhergesagte Affinität zum molekularen Zielstruktur und damit die Wahrscheinlichkeit eines Bindungsereignisses. Zur Bestimmung wurde Glide Software (Version 90156) unter Nutzung der SP *scoring function* unter Berücksichtigung eines *biase* (AChE und BChE) genutzt. Diese Daten wurden von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) erhoben und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Visualisierung und Aufbereitung wurden vom Autor durchgeführt.

Für das *docking* Experiment wurde ein sogenanntes *biased* Protokoll verwendet, bei dem eine Beschränkung der Entfernung der Carbamat-Seitenkette zum katalytisch aktiven *oxyanion hole* der AChE eingeführt wurde.^[268] Dabei sollte die Carbamat-Seitenkette dazu gezwungen werden, in räumlicher Nähe zum *oxyanion hole* der AChE binden, um entsprechend des bekannten katalytischen Mechanismus reagieren zu können. Die Einführung eines *bias* kann dabei hilfreich sein die erhaltenen *docking* Ergebnisse besser einzuordnen.^[269] Prinzipiell könnten die getesteten Verbindungen **2a**, **2b**, **2c**, **2g**, **2h** und Physostigmin an einer anderen Stelle des Proteins einen absolut gesehen, besseren Wert ergeben. Allerdings wäre so eine Inhibition nach dem bekannten Mechanismus nicht möglich. In diesem Sinne wurde der *bias* hier als interner Filter verwendet und dient der Einordnung der Ergebnisse für eine realitätsnahe Evaluierung.

Die docking Ergebnisse zeigen im Wesentlichen denselben Trend, welche auch für die in vitro Experimente beobachtet werden konnte. Die Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole 2a-2c und 2g-2h zeigen im direkten Vergleich zu Physostigmin eine erhöhte Affinität zu der BChE. Für den 5HT_{2c} Rezeptor konnte eine positive Tendenz hin zu den langkettigen Alkyl-Derivaten beobachtet werden. Um dies allerdings zu bestätigen, müssten mehr Verbindungen in silico getestet werden und zusätzlich in vitro Experimente zur Validierung durchgeführt werden. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen bietet sich eine experimentelle Überprüfung des 5HT_{2c} Rezeptors als molekulare Zielstruktur an. Auffällig war insgesamt, dass insbesondere bei Esermethol sowie Eserolin für alle getesteten Zielstrukturen die besten docking Ergebnisse beobachtet werden konnten. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass beide Verbindungen eine schwache inhibitorische Wirkung auf AChE bzw. BChE haben (Tabelle 18). Diese Wirkung ist im direkten Vergleich mit Verbindungen, welche eine Carbamat-Seitengruppe enthalten, gering und lässt auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus schließen. Dennoch weisen beide erstaunlich gute in silico Affinitäten auf, was erneut verdeutlich, dass sowohl mechanistisches Verständnis, sowie valide in vitro Daten nötig sind, um eine detaillierte und differenzierte Betrachtung zu ermöglichen. Eine reine Evaluierung basierend auf den erhaltenen in silico Resultaten ist nicht ratsam und kann zu Überinterpretation der erhaltenen Daten führen.

Insgesamt konnte somit deutlich aufgezeigt werden, wie wichtig es sein wird eine heterogene Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Bibliothek als Basis für weitere Screening Experimente zu nutzen. Esermethol- und Eserolin-Derivate biokatalytisch besser zugänglich zu machen sollte demnach zusätzlich priorisiert und in der Zukunft untersucht werden, um weitere *in vitro* Daten für ähnliche Verbindungen generieren zu können. Außerdem erscheint ein Blick hin zu neuen molekularen Zielstrukturen möglich. Allerdings sind weitreichende *in vitro* Untersuchungen notwendig, um die *in silico* erhaltenen Daten, speziell gegenüber dem 5HT_{2c} Rezeptors als molekulare Zielstruktur, experimentell zu validieren. An dieser Stelle soll auch erwähnt werden,

dass beispielsweise die Testung von Kinase-Bibliotheken mit Hilfe von kommerziell verfügbaren Kits im 96–384 *well plate* Format unter geringem Aufwand möglich ist. Kinasen sind aufgrund des Verbrauchs von ATP besonders leicht zu untersuchen und stellen in der Krebstherapie ein relevantes Target dar. So ergeben sich an dieser Stelle einige Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen.

Generell sollte man die *in silico* generierten *docking* Ergebnisse mit einer gewissen Zurückhaltung betrachten. Für die meisten Verbindungen ist es möglich eine Position innerhalb der molekularen Zielstruktur in einer energetisch günstigen Konformation zu modellieren. Für eine genaue Vorhersage braucht es meist eine größere Datenmenge, die für neue Strukturen nicht in diesem Umfang verfügbar ist. Konventionelle *docking* Ansätze bilden zumeist nur einen Ausschnitt der komplexen und flexiblen Realität dessen ab, was bei der Protein-Liganden Interaktion passiert.^[270] So werden *docking* Experimente zunehmend durch *induced fit docking* Protokolle oder *molecular dynamics* Simulationen ergänzt, erweitert und verdrängt. Hier werden Änderungen in der Proteinkonformation bei Auftreten einer Interaktion berücksichtigt und vorhergesagt. Allerdings erfordert dies meist eine große Rechenleistung und viel Zeit und wurde deshalb bei der Erhebung dieser Daten nicht berücksichtigt.

Zur vereinfachten Darstellung und zur Verbesserung des Verständnisses wurden die Ergebnisse des docking Experiments visualisiert und die entsprechenden Protein-Liganden Interaktionspunkte hervorgehoben. Dies wurde beispielhaft für die Verbindung 2a (Abbildung 61) und Esermethol (30, Abbildung 62) visualisiert und alle relevanten Aminosäuren wurden farblich hervorgehoben. Dabei konnten für beide Verbindungen ähnliche Wechselwirkungen über aromatische Aminosäuren (T oder π Stacking über His) oder unpolare AS (Ala, Gly) identifiziert werden. Für Esermethol (30) können unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.4) ionische Wechselwirkungen über das N-1 Stickstoffatom modelliert werden. Ausgeprägt sind diese vor allem bei der Interaktion mit AChE und dem 5HT_{2C} Rezeptor, was einen großen Beitrag zu dem in diesen beiden Fällen deutlich besseren Dockingscore leistet. Ähnliche Interaktionen konnten auch für die anderen Beispiele gezeigt und identifiziert werden. Für den Mechanismus der Inhibition der Esterasen sind diese Interaktionen allerdings irrelevant, weshalb Verbindungen mit Carbamoyl-Seitengruppe eine deutlich stärker ausgeprägte Inhibition zeigen, als es das Modell vermuten lässt. Für den 5HT_{2C} Rezeptor gilt das so allerdings nicht und eine Evaluierung in vitro erscheint basierend auf den in dieser Arbeit erhaltenen Daten sinnvoll.



Abbildung 61. Durch *molecular modelling* konnten verschiedene distinkte Interaktionspunkte zwischen den Aminosäuren (AS) der molekularen Zielstruktur und dem Liganden (2a) identifiziert werden und sind hier in 2D abgebildet. Die identifizierten Aminosäuren wurden in drei Gruppen anhand ihrer Position eingeteilt (Rückgrat, Seitenkette oder beides). Die Art der Interaktion wurde zusätzlich bestimmt und zugeordnet und spiegeln die am häufigsten auftretenden Wechselwirkungen (Ww) wider. Dazu zählen vor allem polare Interaktionspunkte wurden durch farbliche Markierung deutlich gemacht. Zusätzlich sind. Die einzelnen Interaktionspunkte wurden durch farbliche Markierung deutlich gemacht. Zusätzlich sind alle AS dargestellt, die in räumlicher Nähe zum Substrat lokalisiert sind. Die *molecular modelling* Experimente, sowie die gezeigte Abbildung wurden von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.



Abbildung 62. Durch *molecular modelling* konnten verschiedene distinkte Interaktionspunkte zwischen den Aminosäuren (AS) der molekularen Zielstruktur und dem Liganden (Esermethol (30)) identifiziert werden und sind hier in 2D abgebildet. Die identifizierten Aminosäuren wurden in drei Gruppen anhand ihrer Position eingeteilt (Rückgrat, Seitenkette oder beides). Die Art der Interaktion wurde zusätzlich bestimmt und zugeordnet und spiegeln die am häufigsten auftretenden Wechselwirkungen (Ww) wider. Dazu zählen vor allem polare Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Ww. sowie ionische Ww. Die einzelnen Interaktionspunkte wurden durch farbliche Markierung deutlich gemacht. Zusätzlich sind alle AS dargestellt, die in räumlicher Nähe zum Substrat lokalisiert sind. Die *molecular modelling* Experimente, sowie die gezeigte Abbildung wurden von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Es konnte basierend auf *in silico* Screening Ergebnissen in Kombination mit zuvor bestimmten, experimentellen Daten gezeigt werden, dass es basierend auf dem Pyrroloindolin-Grundgerüst möglich ist neue Wirkstoffe, in diesem Fall sogar biokatalytisch, herzustellen. Diese potenziellen Wirkstoffe könnten verschiedene molekulare Zielstrukturen adressieren und sollten zukünftig dahingehend weiter untersucht werden.

Auf dem Weg hin zu einem einsetzbaren Wirkstoff ist die Betrachtung der Nutzbarkeit von Verbindungen als Wirkstoff ein elementarer Bestandteil bei der Entwicklung eines *hits* hin zu einem *lead*. In der Folge wurde eine erste Charakterisierung der hier hergestellten, sowie kommerzieller Verbindungen in Hinblick auf die pharmakokinetischen Eigenschaften vorgenommen.

6.4.5 Bestimmung der ADME Parameter produzierter Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole

Nachdem zuvor potentiell neue molekulare Zielstrukturen identifiziert werden konnte, sollten die hergestellten Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole in diesem Abschnitt hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Wirkstoff (*engl. drugability*) und ihrer Wirkstoffähnlichkeit (*engl. druglikeness*) untersucht werden.

Dabei ist es bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe heute üblich kritische Parameter zunächst *in silico* zu bestimmen und anschließend *in vitro* zu überprüfen. Im Zuge dieser Entwicklung wurden für diese Arbeit zunächst die relevanten Parameter zur Bestimmung der Wirkstoffähnlichkeit anhand der von *Lipinski* und *Veber* aufgestellten Richtlinien zusammengetragen und mit ähnlichen Wirkstoffen verglichen (**Tabelle 21**).^[93, 96]

Tabelle 21. Parameter für *druglikeness* der hier untersuchten Verbindungen. Die Werte wurden *in silico* unter Verwendung von QikProp (Version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012) bestimmt. **clogP**: Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient; **HBA**: Wasserstoffbrücken Akzeptoren (*engl. hydrogen bond acceptor*); **HBD**: Wasserstoffbrücken Donor (*engl. hydrogen bond donor*); **PSA**: Polare Oberfläche (*engl. polar surface area*); **RB**: Rotierende Bindungen; **MW**: Molekulargewicht (*engl. molecular weight*).

Verbindung	clogP	HBA	HBD	PSA	RotB	MW [g/mol]
Rivastigmin (18)	2.3	3	0	32.78	6	250.3
Physostigmin (1)	1.9	4	1	44.81	3	275.5
Eserolin (12)	2.0	2	1	26.71	0	218.3
Esermethol (30)	2.4	2	0	15.71	1	232.3
2a	1.4	5	2	70.67	4	289.3
2b	1.7	5	2	34.14	5	303.4
2c	2.2	5	2	34.14	6	317.4
2g	1.6	5	1	34.14	4	303.4
2h	1.8	5	2	34.14	5	303.4
2m	2.0	3	1	32.34	1	216.3

Bei der Betrachtung der Wirkstoffähnlichkeit konnten keine auffälligen negativen Punkte oder grobe Verletzungen der relevanten Parameter zur Beurteilung der Wirkstoffähnlichkeit gefunden werden. Sowohl die zugelassenen Wirkstoffe Physostigmin und Rivastigmin, als auch die in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen (**2a–2c** und **2g–2h**) weisen vergleichbare Werte auf und erfüllen damit die *rule of five*.^[93, 96]

Anschließend wurden die pharmakokinetischen Parameter untersucht. Diese wurden zunächst *in silico* unter Verwendung von QikProp (Version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012) bestimmt und sind in **Tabelle 22** zusammengefasst.

Tabelle 22. Ergebnisse der Bestimmung der ADME-Parameter. Die Werte wurden *in silico* unter Verwendung von QikProp (Version 3.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012) bestimmt. **Star:** Anzahl der Eigenschaften oder Deskriptorwerte die außerhalb des 95 %igem-Bereich ähnlicher Werte für bekannte Wirkstoffe fallen. **CNS**: Vorausgesagte Aktivität im zentralen Nervensystem (*engl. central nervous system* (CNS)) auf einer Skala von -2 (inaktiv) bis+2 (aktiv). **QPCaco**: Vorhergesagte Caco-2 Zellpermeabilität zur Bestimmung der Darm-Blut-Schranke Permeabilität für passiven Transport [< 25 (schlecht); > 500 (gut)]. **QPMDCK**: Vorhergesagte MDCK Zellpermeabilität zur Bestimmung der Blut-Hirn-Schranke Permeabilität für passiven Transport [< 25 (schlecht); > 500 (gut)]. **QPIogBB**: Vorhergesagter Blut-Hirn Verteilungskoeffizient für oral verabreichte Wirkstoffe. *HsOralAb*: Vorhergesagte relative Aufnahme eines Wirkstoffs in *Homo sapiens* [< 20 % (schlecht); > 80 % (gut)].

Verbindung	Star	CNS	QPCaco	QPMDCK	QPlogBB	HsOralAb.
			[nm/sec]	[nm/sec]		[%]
Physostigmin (1)	0	2	135.1	69.6	0.68	73
Rivastigmin (18)	0	1	1135.9	628.1	0.39	96
Eseroline (12)	0	2	164.1	85.9	0.82	74
Esermethol (30)	2	2	541.9	312.3	1.25	87
2a	1	1	103.4	96.4	-0.12	68
2b	0	1	69.2	74.7	-0.42	68
2c	0	1	154.8	120.8	-0.22	76
2g	1	1	172.8	166.7	0.05	75
2h	1	1	131.9	125.5	-0.11	73
2m	1	2	417.9	436.8	0.56	82
Sollwert	0–5	-2-+2	>500	>500	-3–1.2	>80

Mit den in **Tabelle 22** dargestellten Werten konnte gezeigt werden, dass es generell kaum bzw. wenige Verstöße gegen die Star-Regeln gibt. Diese geben stellvertretend die druglikeness wieder, basierend auf den Eigenschaften oder Deskriptor Werten die außerhalb des 95% igem-Bereich ähnlicher Werte für bekannte Wirkstoffe fallen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden. dass alle hier untersuchten Verbindungen einen positiven CNS-Wert (engl. central nervous system) aufweisen und somit eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Effekt im zentralen Nervensystem haben. Für die Zellpermeabilität konnte aufgezeigt werden, dass grundsätzlich ein passiver Transport möglich erscheint. Allerdings sind die Transportraten insbesondere für die in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen 2a-c und 2g, h sowohl für die modellierte Darm-Blut-Schranke als auch die Blut-Hirn-Schranke am

unteren Ende des zulässigen Bereichs. Die orale Verfügbarkeit der getesteten Verbindungen ist moderat bis gut und könnte eine perorale Applikationsmöglichkeit indizieren.

Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass sich die in dieser Arbeit hergestellten und untersuchten Verbindungen generell als Leitstruktur für die Entwicklung von Wirkstoffen eigenen. Eine weitere Optimierung der Leistruktur sollte vorgenommen werden, um die pharmakokinetischen Eigenschaften zu verbessern. Dies könnte beispielsweise durch eine gezielte *lead*-Optimierung erfolgen und sollte in Betracht gezogen werden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine *in vitro* Validierung der zuvor *in silico* bestimmten ADME-Parameter durchgeführt. Dazu wurden Proben im Rahmen einer Kooperation zur Untersuchung zur Verfügung gestellt. Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit war die experimentelle Untersuchung nicht abgeschlossen und die Daten sind entsprechend nicht in die Arbeit inkludiert.

6.4.6 Zusammenfassung des Kapitels

- Insgesamt konnten 11 verschiedene Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole biokatalytisch unter Verwendung der C-3 Indol-Methyltransferasen SgPsmD und SaPsmD unter Nutzung eines SAM-Recyclingsystem ökonomisch sinnvoll und stereoselektiv hergestellt werden
- Eine inhibitorische Wirkung auf die molekularen Zielstrukturen AChE und BChE konnte gezeigt und eine einzigartige BChE-Selektivität beobachtet werden
- Neue molekulare Zielstrukturen konnten durch *in silico* Untersuchung als potenzielle Wirkstoff *targets* f
 ür die in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen identifiziert werden
- Eine vergleichende *docking* Untersuchung von drei molekularen Zielstrukturen und verschiedenen Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen wurde durchgeführt und mechanistisch aufgearbeitet
- Die drug like properties der hier hergestellten Verbindungen wurde nach Lipinksi et al. evaluiert und bestätigt
- Die ADME Parameter der hergestellten Verbindungen wurden durch *in silico* Modellierung überprüft und relevante Parameter konnten bestimmt und durch Vergleich mit ähnlichen Wirkstoffen eingeordnet werden

6.5 N-Methyltransferase SgPsmC

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass über die Nutzung von *C*-3 Indol-Methyltransferasen die Herstellung von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen möglich ist. Allerdings, wurde deutlich, dass die Nutzung dieser Biokatalysatoren einige Einschränkungen in Bezug auf das akzeptierte Substratspektrum oder die generell geringe Enzymaktivität mit sich bringt. Aus der Analyse des von Liu *et al.* publizierten Genclusters aus *Streptomyces griseofuscus* ging hervor, dass die *N*-Methyltransferase *Sg*PsmC zwei Reaktionen innerhalb der Biosynthese von Physostigmin katalysiert.^[34]



Abbildung 63. SgPsmC katalysierte Reaktionen innerhalb der Biosynthese von Physostigmin (1).[34] Bei Betrachtung der in Abbildung 63 dargestellten natürlichen Reaktionen von SgPsmC fällt auf, dass sich die beiden methylierten Stickstoffatome in ihrer chemischen Reaktivität unterscheiden. Für die erste Reaktion ist die Methylierung eines Indolin-Stickstoffatom beobachtet worden, während im späteren Verlauf der Biosynthese eine Methylierung am N-1 Atom (2° Amin) katalysiert wird. Des Weiteren fällt auf, dass SgPsmC innerhalb der Biosynthese von Physostigmin nur eines der beiden möglichen Enantiomere umsetzen muss. Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob SgPsmC auch in der Lage ist, zwischen den beiden möglichen Enantiomeren zu unterscheiden. Aufgrund der Besonderheiten von SgPsmC sollte das Enzym im Folgenden charakterisiert werden und anschließend hinsichtlich seines Potentials zur Anwendung in der Synthese von neuartigen Hexahydropyrrolo[2,3b]indolen, welche mit Hilfe der PsmD-Enzyme nicht zugänglich waren, evaluiert werden. Dieser Abschnitt enthält Ergebnisse aus der Bachelorarbeit von B.Sc. Philipp Schäfer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).^[271] Die relevanten Enzymparameter, die vor der Charakterisierung von SgPsmC durch theoretische Berechnung zugänglich waren, sind in Tabelle 23 zusammengefasst und wurden genutzt, um Größe und Proteinkonzentration von SgPsmC zu bestimmen.

Tabelle 23. Übersicht über relevante Parameter von *Sg*PsmC. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient wurden durch theoretische Berechnungen basierend auf der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) erhoben.^a

Parameter	Wert
UniProt ID	W8Q892
Molekulargewicht	29.1 kDa
Extinktionskoeffizient (280 nm)	48025L/mol·cm

6.5.1 Expression und Reinigung von SgPsmC

Das pET21a(+)-*psmC_Sg* Plasmid wurde wie unter **6.1.1** beschrieben durch einen Restriktionsverdau unter Verwendung des Restriktionsenzyms Xhol und anschließende Religation des ebenfalls mit Xhol geschnittenen pET21a(+) Vektors hergestellt. Anschließend wurde *E. coli* DH5 α mit dem pET21a(+)-*psmC_Sg* Plasmid transformiert und unter Ampicillin Selektion kultiviert. Die gebildeten Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR untersucht.



Abbildung 64. 1 % Agarosegel zur Analyse der Kolonie-PCR mittels *Overlap Extension* PCR des Gens $psmC_Sg$ (1200 bp) der erhaltenen *E. coli* DH5 α_p ET21a(+)- $psmC_Sg$ Kolonien. M = 1 kb DNA *Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA). Dargestellt sind die Amplifikationsprodukte der getesteten Klone I–VIII unter Nutzung des Primerpaars T7P und T7T.

Die Kolonie-PCR wurde hier zur Überprüfung durchgeführt, da durch Verunreinigungen von nicht geschnittenem Vektor auch fehlerhafte Plasmide vorhanden sein können. Es konnte gezeigt werden, dass nur zwei von acht (I und II) getesteten Kolonien das passende Insert enthielten. Diese beiden Kolonien wurden anschließend über Nacht in Flüssigmedium kultiviert und das Plasmid isoliert. Durch Sequenzierung konnte erfolgreich gezeigt werden, dass es sich um das gewünschte Plasmid pET21a(+)-*psmC_Sg* handelte. Für die Expression des

Zielgens wurde *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem pET21a(+)-*psmC_Sg* Plasmid transformiert. Die Expression wurde bei Standardbedingungen (**8.3.5.2**) durchgeführt und *via SDS-Page* analysiert.



Abbildung 65. *SDS-PAGE* Analyse der Expression von *psmC_Sg* in *E. coli* BL21 Gold (DE3) [*Sg*PsmC = 29.1 kDa], M = Marker (Roti®-Mark 10–150), LV = Roh Lysat *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+); 1 = Roh Lysat *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmC_Sg*; 2 = Pelletfraktion *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmC_Sg*; 3 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmC_Sg*.

Eine Produktion des Zielenzyms *Sg*PsmC, welches zum Großteil in der CFE Fraktion vorkam, konnte gezeigt werden (**Abbildung 65**). Daraufhin wurde eine IMAC (Nickel-NTA) Reinigung des Proteins über den in Leserichtung liegenden *6x His-Tag* am *C-Terminus* durchgeführt, um das gereinigte Protein zu erhalten und anschließend für den Einsatz in der Biokatalyse als solches nutzen zu können. Es wurden insgesamt 5 g Zellpellet aufgeschlossen und für die Reinigung verwendet.



Abbildung 66. *SDS-PAGE* Analyse der Nickel-NTA Reinigung von *psmC* in *E. coli* BL21 Gold (DE3) [*Sg*PsmD = 29.1 kDa], M = Marker (Roti®-Mark 10–200), 1 = final gereinigte SgPsmC nach aufkonzentrieren (2 µL wurden auf das Gel geladen); 3 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmC_Sg*; 4 = Pelletfraktion *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET21a(+)-*psmC_Sg*; 5 = Durchlauffraktion (FT, *engl. flow through*), 6 = Waschfraktion 1, 7 = Waschfraktion, 8 = Elutionsfraktion 1, 9 = Elutionsfraktion 2, 10 = Elutionsfraktion 3, 11 = Elutionsfraktion 4, 12 = Reinigung der Säule (*engl. purge*).

Die Elutionsfraktionen 9–11 wurden gesammelt und aufkonzentriert. Insgesamt konnten 40 mg (Bestimmung der Konzentration wurde *via* Nanodrop basieren auf dem Extinktionskoeffizienten durchgeführt) des *Sg*PsmC-Enzyms isoliert und anschließend für die Testung genutzt werden.

6.5.2 Synthese der racemischen Referenz zur Bestimmung der Selektivität der SgPsmC Reaktion

Generell lag die Vermutung nahe, dass das Produkt **5a** der *Sg*PsmC-Reaktion stereoselektiv gebildet wird. Grundlage für die Annahme ist die Tatsache, dass der Aufbau des Stereozentrums innerhalb der Physostigmin-Biosynthese von *Sg*PsmD katalysiert wird und *Sg*PsmC somit das eine, vorhandene Stereoisomer methyliert. Um das zu beweisen, wurde in dieser Arbeit der racemische Standard der *Sg*PsmC-Reaktion chemisch über fünf Schritte synthetisiert und das Ergebnis anschließend mit dem Produkt der Biokatalyse verglichen. Die Implementierung der Methylgruppe an der C-3 Position des Indols erfolgte analog zu der unter **Abbildung 43** bereits etablierten biomimetischen Methylierung. Durch anschließende Methylierung des freien Indolin-Stickstoffatoms konnte die *N*-8 Methylgruppe eingebracht werden. Der Vorteil der frühzeitigen *N*-Methylierung ist eine steigende Stabilität der Verbindungen vor allem gegenüber reduktiven Bedingungen. So konnte die *O*-Benzyl-Entschützung unter Rückflussbedingungen problemlos durchgeführt werden. Nach finaler Carbamoylierung konnte das gewünschte Produkt mit einer Gesamtausbeute von 18 % über fünf Schritte erfolgreich isoliert werden. Die einzelnen Schritte der Synthese sind in **Abbildung 67** zusammengefasst.



Abbildung 67. Schema der Synthese von *rac-5a* als racemische Referenz der natürlichen *Sg*PsmC-Reaktion zur Evaluierung der Stereoselektivität der enzymatischen Reaktion.

6.5.3 Präparative Anwendung von SgPsmC

Nach erfolgter Produktion und Reinigung von *Sg*PsmC sowie der Synthese der racemischen Referenzverbindung sollte die Verbindung **5a** unter Einsatz der beiden natürlichen Enzyme *Sg*PsmD und *Sg*PsmC *via* präparativer Biokatalyse, wie in **Abbildung 68** dargestellt, hergestellt werden.



Abbildung 68. Reaktionsschema und Ergebniss für die präparative biokatalytische Umsetzung unter Nutzung von SgPsmD und SgPsmC zur Herstellung von Verbindung **5a**. [Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat **4a**, 10 mM Methyliodid, 6.7 μM SgPsmD (0.8 U/g), 10 μM SgPsmc (32 U/g), 14 % *Ct*HMT (0.09 U/mL), 20 μM SAH, KP_FPuffer (100 mM, pH 7.5, 1 mM EDTA), 2 % (v/v) DMSO, 35 °C, 24 h, 300 *rpm*, 100 mL Reaktionsvolumen]. Dieses Experiment wurde in Zusammenarbeit mit P. Schäfer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.^[271]

Dafür wurden 3 g *Ct*HMT Zellpellet in KP_i-Puffer pH 7.5 resuspendiert und aufgeschlossen. Die *Ct*HMT-CFE Lösung wurde mit KP_i-Puffer pH 7.5 auf das angestrebte Volumen eingestellt und nacheinander Methyliodid Lösung, Substrat Lösung und SAH Lösung zugegeben. Durch Zugabe von gereinigtem *Sg*PsmD sowie *Sg*PsmC wurde die Reaktion gestartet. Nach 24 h bei 35 °C und 300 *rpm* wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethylacetat gestoppt. Nach erfolgter Extraktion mit organischem Lösungsmittel konnte das Produkt säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Ausbeute von 33 % isoliert werden. Ein Grund für die geringe Ausbeute liegt in der unvollständig abgelaufenen Reaktion. Als Nebenprodukt konnte die Verbindung **2a** mit 34 % isoliert werden. Eine Optimierung der Reaktion unter Nutzung der beiden Methyltransferasen scheint notwendig zu sein, um die Ausbeute zu erhöhen. Zusätzlich sollte eine weitere Charakterisierung von *Sg*PsmC erfolgen, um weitere Rückschlüsse auf die optimalen Reaktionsbedingungen ziehen zu können. Es bleibt festzuhalten, dass eine Nutzung zur präparativen Herstellung von *N*-Methyl-Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen unter den hier getesteten Bedingungen generell möglich ist.

Die isolierte Verbindung **5a** wurde anschließend mit dem zuvor synthetisierten racemischen Standard **rac-5a** *via* HPLC-UV an chiraler stationärer Phase analysiert (**Abbildung 69**). Es konnte gezeigt werden, dass nur eines der beiden möglichen Enantiomere der Verbindung **5a** biokatalytisch gebildet wird und die Herstellung damit stereoselektiv erfolgt. Ob *Sg*PsmC zwischen den beiden Stereoisomeren diskriminieren kann blieb vorerst offen und musste im weiteren Verlauf der Charakterisierung mit einer geeigneten racemischen Vorläuferverbindung überprüft werden.



Abbildung 69. HPLC-UV Analyse an chiraler stationärer Phase der Umsetzung des Substrats **4a** mit SgPsmD und SgPsmC zu Produkt **5a** (in schwarz) und der Vergleich mit racemischem Standard **rac-5a** (in grau) zur Bestimmung der Enantioselektivität der Reaktion bei 205 nm. Für die Reaktion wurde gereinigtes SgPsmD und SgPsmC eingesetzt. [Reaktionsbedingungen: 2 mM Substrat **4a**, 10 mM Methyliodid, 6.7 μ M SgPsmD (0.8 U/g), 10 μ M SgPsmc (32 U/g), 14 % CtHMT (0.09 U/mL), 20 μ M SAH, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5, 1 mM EDTA), 2 % (v/v) DMSO, 35 °C,24 h, 300 rpm, 100 mL Reaktionsvolumen]. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μ L, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 80:20). Die Enantioselektivität dieser Reaktion konnte bereits innerhalb der Bachelorarbeit von P. Schäfer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) gezeigt werden und wurde gemeinsam mit dem Autor durchgeführt.^[271]

6.5.4 SgPsmC – Eine Möglichkeit zur universellen N-Methylierung?

Eine zentrale Frage für die weitere Nutzbarkeit und Evaluierung von *Sg*PsmC war, ob es mit dieser *N*-Methyltransferase möglich ist, auch andere Strukturmotive zu methylieren oder ob eine ähnliche Substratimitierung vorliegt, wie es für die PsmD-Enzyme beobachtet werden konnte. Zur Beantwortung dieser Frage, wurden zunächst Indolin (**88a**) und Anilin (**89**) als mögliche Substrate für *Sg*PsmC getestet. Indolin wurde zum einen aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol ausgewählt und es sollte gezeigt werden, ob dieses vereinfachte Strukturmotiv von *Sg*PsmC umgesetzt werden kann. Dies wäre besonders im Hinblick auf den Einsatz zur gezielten späten Modifizierung von Natur- und Wirkstoffen interessant, da diese häufig *N*-Heterozyklen wie Indoline, Isochinoline oder Pyrrole beinhalten. Diese Gruppen spät in der Synthese zu modifizieren kann mit den bekannten chemischen Möglichkeiten problematisch sein. Es wird dahingehend nach innovativen, neuen Lösungen gesucht diese Reaktionen selektiv durchzuführen, in diesem Fall biokatalytisch. Für Aniline sollte gezeigt werden, dass falls diese von SgPsmC akzeptiert werden, es nur zu einer einfachen Methylierung kommt.

Um dies zu untersuchen, wurden sowohl das Indolin (88a) als auch Anilin (89) in 500 µL Ansätzen getestet. Zu einer Lösung aus gereinigtem *Sg*PsmC in KP_i-Puffer pH 7.5 (100 mM) wurden SAM (2mM) und Anilin (89) oder Indolin (88a) (je 500 µM) gegeben und für 16 h bei 35 °C und 800 *rpm* inkubiert. Durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) wurde die Reaktion gestoppt, extrahiert und *via* GC-MS hinsichtlich der Produktbildung analysiert. In diesem ersten Experiment sollte lediglich gezeigt werden, ob eines der beiden hier getesteten Substrate umgesetzt wird und sich das zu erwartende Produkt mittels GC-MS detektieren lässt. Für Indolin (88a) als Substrat für die *Sg*PsmC-Reaktion konnte gezeigt werden, dass ein Umsatz stattfindet und das entsprechende *N*-methylierte Produkt *via* GC-MS konnte erfolgreich detektiert werden (Abbildung 70). Für Anilin dagegen, konnte weder mittels der GC-MS noch mittels DC Analyse ein Umsatz festgestellt werden.



Abbildung 70. GC-MS Chromatogramm der Umsetzung von Indolin (**88a**) zum *N*-Methylindolin (**90a**) mit *Sg*PsmC. [Reaktionsbedingungen: 2.0 mM Substrat (**88a**), 1 mM SAM. 10 μ M *Sg*PsmC (32 U/g), KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5, 1 mM EDTA), 2 % (*v*/v) DMSO, 35 °C, 24 h, 300 *rpm*, 1 mL Reaktionsvolumen]. GC-MS (Optima 5MS Säule (30 m × 0.25 mm, 0.25 μ M), 1 min, 60 °C; 60–185 °C (15 °C/min); 185–280 °C (120 °C/min); 5 min, 280 °C, 1 μ L; MS(ESI, 70 eV).

Basierend auf den Ergebnissen, wurde die weitere Evaluierung von SgPsmC mit Indolin als Testsubstrat fortgeführt. Dies hat den Vorteil, dass das hier verwendete Substrat und entsprechend auch das Produkt kommerziell günstig zu erhalten sind. Zusätzlich sind die Analyse und Evaluierung der SgPsmC-Reaktion *via* GC-MS schnell und sensitiv möglich.

In der Folge wurde die Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums für *Sg*PsmC auf diese Art durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktion wurde diese durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) gestoppt und anschließend extrahiert. Das Extraktionsmittel (EtOAc) war in diesem Fall mit einem internen Standard versetzt. Über den internen Standard sollten Schwankungen in der Extraktionseffizient berücksichtigt und ausgeglichen werden. Nach der Extraktion wurde das Lösungsmittel durch Zugabe von MgSO₄ getrocknet, eingedampft und anschließend mit Chloroform auf die Zielkonzentration von 500 µM eingestellt. Die Analyse erfolgte *via* GC-MS und der relative Umsatz von Substrat **88a** zu Produkt **90a** wurde wie zuvor unter **6.1.3** beschrieben bestimmt. Für eine erhöhte Genauigkeit wurde zusätzlich eine Kalibrierung der GC-MS mit dem Substrat und dem internen Standard durchgeführt. Der Ablauf ist schematisch in **Abbildung 71** dargestellt und zur Evaluierung wurde das Produkt/Substrat Verhältnis anhand der erhaltenen Peakflächen bestimmt und als relative Umsatz angegeben.



Abbildung 71. Reaktionsschema zur Evaluierung des Temperatur- und pH-Optimums von SgPsmC. Assaybedingungen: 0.5 mM Substrat **88a**, 21.7 μM, SgPsmC (32 U/g), 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 6–8.5), 2 % (*v/v*) DMSO, 25–55 °C, 16 h, 800 *rpm*, 0.5 mL Reaktionsvolumen].

Für die Untersuchung der optimalen Reaktionsparameter für *Sg*PsmC (**Abbildung 712**) konnte gezeigt werden, dass die optimale Temperatur zwischen 35–40 °C liegt. Generell wurde für den Temperaturbereich von 25–40 °C ein geringer Unterschied im relativen Umsatz festgestellt, während für 45–55 °C ein deutlicher Abfall zu beobachten war.

Für die Untersuchung des optimalen pH (in KP_I-Puffer) konnte gezeigt werden, dass insgesamt nur geringe Unterschiede festzustellen sind, mit einer Ausnahme bei pH 6. Der Trend zeigt, dass ein pH-Wert zwischen 7–8 für eine optimale Umsetzung genutzt werden sollte. Basierend auf den hier erhaltenen Ergebnissen wurden alle weiteren Experimente bei 35 oder 40 °C und bei einem pH von 7.5 oder 8 in KP_I-Puffer oder Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA) durchgeführt.

Nachdem die optimalen Reaktionsbedingungen für *Sg*PsmC bekannt waren, sollten die kinetischen Parameter dieses Enzyms bestimmt werden. Die kinetischen Parameter wurden sowohl für das natürliche *Sg*PsmC Substrat **2a** als auch Indolin (**88a**) bestimmt und verglichen. Die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde wie bereits unter **6.1.4** beschrieben durchgeführt. Die benötigte Enzymmenge pro Assay wurde vorab für beide Substrate einzelnen bestimmt (**Abbildung 73**).



Abbildung 72. Ergebnisse der Testung der optimalen Reaktionsbedingungen für SgPsmC. Temperatur- (**A**.) und pH- (**B**.) Optimum wurden bestimmt und jeweils gegen den relativen Umsatz [%] aufgetragen. [Assaybedingungen **A**.: 0.5 mM Substrat **88a**, 21.7 μ M SgPsmC (32 U/g), 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (v/v) DMSO, 25-55 °C, 16 h, 800 rpm, 0.5 mL Reaktionsvolumen]. Assaybedingungen **B**.: 0.5 mM Substrat **88a**, 21.7 μ M SgPsmC (32 U/g), 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 6.0–8.0), 2 % (v/v) DMSO, 40 °C, 16 h, 800 rpm, 0.5 mL Reaktionsvolumen]. Das Produkt/Substrat Verhältnis wurde anhand der erhaltenen Peakflächen bestimmt und ist als relativer Umsatz angegeben Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unterschiedlichen Messungen mit Standardabweichung angegeben.



Abbildung 73. Ergebnisse der Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration für das Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) mit *Sg*PsmC und Indolin (88a) (A.) oder 2a (B.) als Substrat. [Assaybedingungen A.: 50 µM Substrat 88a, 50 µM SAM, 0.1–6 µg *Sg*PsmC, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 40 °C,10 min, 20 µL Assayvolumen]. [Assaybedingungen B.: 50 µM Substrat 2a, 50 µM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 0.1–2 µg *Sg*PsmC, 40 °C, 10 min, 20 µL Assayvolumen]. Die Experimente wurden als Duplikat durchgeführt und sind als Mittelwert aus zwei Experimenten angegeben.

Dabei konnte gezeigt werden, dass zwischen den beiden hier genutzten Substraten deutliche Unterschiede zu erkennen sind. Für das Indolin (**88a**) ist eine Enzymmenge von 2 µg optimal, während für das natürliche Substrat **2a** bereits 0.1 µg ausreichend sind. Die hier bestimmten Enzymmengen wurden anschließend für die Bestimmung der kinetischen Parameter benutzt.



Abbildung 74. Bestimmung der SgPsmC Kinetik für das natürliche Substrat 2a (A.) und Indolin 88a (B.). Die Umsatzrate ist jeweils gegen die getestete Substratkonzentration aufgetragen. Assaybedingungen A.: 1-200 μM Substrat 2a, 50 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl. 3 mM MaCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 ma/mL BSA), 0.01 µg SaPsmC, 40 °C, 5–10 min, 20 µL Assayvolumen]. [Assaybedingungen B.: 1-200 µM Substrat 88a, 50 µM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 2 μg SgPsmC, 40 °C, 5-10 min. 20 uL Assavvolumen]. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung angegeben und in Tabelle 24 zusammengefasst.

Parameter	Substrat 2a	Substrat 88a
V _{max}	0.42 ± 0.02 μM/min	0.23 ± 0.01 μм/min
Км	3.75 ± 0.60 µM	18.0 ± 2.8 µM
k _{cat}	0.41 s ⁻¹	0.002 s ⁻¹

Wie sich bereits bei der Bestimmung der passenden Enzymmenge (Abbildung 73) angedeutet hatte, unterscheiden sich die Umsatzraten für die beiden hier genutzten Substrate deutlich. Es konnte für das natürliche Substrat **2a** ein K_{M} 3.75 ± 0.60 µM bestimmt werden, der damit ~3-mal niedriger als der K_M für 88a ausfällt und somit auf eine deutlich erhöhte Bindungsaffinität zu Gunsten des natürlichen Substrats hindeutet. Das bestimmte v_{max} für das natürliche Substrat 2a beträgt 0.42 ± 0.02 µM/min und ist damit circa doppelt so hoch wie der bestimmte Wert für 88a. Wenn man für die Berechnung des k_{cat} die genutzte Enzymmenge mit einbezieht, ergibt sich für das natürliche Substrat eine ~200-mal höhere katalytische Effizienz im Vergleich zum Indolin. Es bleibt festzuhalten, dass trotz der geringeren katalytischen Effizienz eine Umsetzung von Indolin mit SgPsmC möglich ist. Im Hinblick auf eine weitere Untersuchung auf die Aktivität von SgPsmC, vor allem in Bezug auf den Einfluss von Substituenten in 5'-Position des Indolins, ist die Nutzung einer Indolin-Bibliothek von Vorteil, da eine große Bandbreite an diversen Substraten kommerziell verfügbar ist.

6.5.5 Bestimmung des Indolin-Substratspektrums

Eine der Kernfragen, die es zu beantworten galt, war inwieweit die Veränderung der Elektronendichte des aromatischen Systems und damit einhergehend die Aktivierung oder Desaktivierung des Indolin Stickstoff-Atoms, eine Rolle für die *Sg*PsmC Aktivität spielt, wie es analog z.B. für den pK_S-Wert von Phenolen beschrieben wurde.^[272] Im Gegensatz zu den Phenolen führt eine Erhöhung der Elektronendichte des Aromaten allerdings zu einem niedrigeren pK_B und damit zu einer Erhöhung der Basizität und chemischen Reaktivität gegenüber Elektrophilen. *Vice versa* kann dieser Effekt für eine Verringerung der Elektronendichte des Aromaten auf ihre relative Aktivität hin untersucht. Für die Bestimmung der relativen Aktivität wurde das Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) verwendet und für jedes Substrat die Aktivität bestimmt und auf Indolin normiert (**88a**, 100 % Kontrolle). Die Ergebnisse sind in **Abbildung 75** zusammengefasst.

Für 13 von den 14 hier getesteten Indolinen konnte generell *Sg*PsmC Aktivität bestimmt werden. Einige weisen eine deutlich erhöhte *Sg*PsmC Aktivität von bis zu 269 % im Vergleich zu dem unsubstituierten Indolin (**88a**) auf. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Aktivierung oder Desaktivierung des Aromaten konnte generell nicht festgestellt werden. Es ließ sich jedoch vermuten, dass besonders polare Seitengruppen (**88b**, **88c**, **88i**, **88h**, **88l**) einen negativen Einfluss auf die *Sg*PsmC Aktivität haben. Für die Substrate (**88b**, **88c**, **88i**, **88h**, **88l**) lag die höchste gemessene relative Aktivität bei 35 ± 4 % (Verbindung **88l**) Für besonders stark elektronenziehende Gruppen (**88g**, **88m**) konnte im direkten Vergleich zu sterisch ähnlich anspruchsvollen Gruppen wie Verbindung **88f** eine niedrigere *Sg*PsmC Aktivität nachgewiesen werden. Für **88g** lag diese bei 151 ± 18 % während für Verbindung **88f** eine relative Aktivität von 229 ± 15 % detektiert werden konnte. Generell kann festgehalten werden, dass *Sg*PsmC eine Vielzahl von verschiedenen 5'-substituierten Indolinen als Substrat akzeptiert und die Umsetzung katalysiert, was für eine breite, biokatalytische Anwendbarkeit von *Sg*PsmC spricht.



Abbildung 75. Ergebnisse zur Untersuchung von 5'-substituierten Indolinen auf die relative *Sg*PsmC Aktivität. Die Produkte **88a–88o** sind entsprechend ihres aktivierenden oder desaktivierenden Potentials aufsteigend geordnet.^[273-275] [Assaybedingungen: 50 μM Substrat **88a–88o**, 50 μM SAM, Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), 2 μg/μL *Sg*PsmC, 40 °C, 10 min, 20 μL Assayvolumen]. Die Ergebnisse sind als Mittelwert von drei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung angegeben.

6.5.6 Kinetische Racematspaltung durch SgPsmC als Schlüsselschritt der

Totalsynthese von enantiomerenreinen Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen

Um im Folgenden untersuchen zu können, ob SgPsmC zwischen zwei Enantiomeren einer Verbindung diskriminieren kann und somit zu einer kinetischen Racematspaltung angewendet werden könnte. wurden aufarund der deutlich höheren Aktivität die Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole statt der Indoline verwendet. Es ist davon auszugehen, dass unter Verwendung substituierter, racemischer Indoline die SgPsmC Aktivität weiter sinkt und somit ein Nachweis problematisch sein könnte. Für die kinetische Racematspaltung wurde eine Verbindung getestet, die einerseits über wenige Syntheseschritte mit guten Ausbeuten verfügbar war und andererseits nach erfolgter Racematspaltung möglichst einfach diversifizierbar im Hinblick auf die Herstellung bioaktiver Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole sein sollte. Die geplante Syntheseroute für den biokatalytischen Zugang zu Physostigmin und Physostigmin-Derivaten ist in Abbilduna 76 dargestellt. Die Herstellung von Ausgangsverbindung 79d erfolgte wie bereits unter 6.1.3 beschrieben über Reduktion der Nitril-Seitengruppe, gefolgt von einer in situ Carbamoylierung unter Verwendung von Chlorameisensäuremethylester. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 83 % isoliert werden. Die anschließende racemische, biomimetische Methylierung erfolgte ebenfalls unter bereits bekannten Bedingungen (6.1.6) und das racemische Hexahvdropyrrolo[2.3-b]indol rac-86b konnte mit einer Ausbeute von 65 % nach säulenchromatographischer Reinigung isoliert werden. Nebenprodukt dieser Reaktion war die racemische Verbindung rac-87b. Die Verbindungen rac-86b und rac-87b wurden als Substrat bzw. Standard für die Analyse mittels HPLC-UV an chiraler stationärer Phase verwendet und mit dem Ergebnis der biokatalytischen Umsetzung der Verbindung rac-86b unter Nutzung von SgPsmC verglichen. Für die biokatalytische N-Methylierung wurde gereinigtes SgPsmC und SAM in KPipH 7.5 (100 mM) genutzt. Über einen Zeitraum von 24 h wurden mehrmals Proben entnommen und durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) gestoppt. Nach erfolgter Extraktion wurden die Proben via HPLC-UV an chiraler stationärer Phase analysiert und mit einer Negativkontrolle, welche kein SgPsmC beinhaltete, verglichen.



Abbildung 76. Übersicht und Ergebnisse der geplanten Anwendung der *N*-Methyltransferase SgPsmC als Schlüsselschritt in der Synthese von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen und Synthese chemischer Referenzen zur Bestimmung der Selektivität. Bei der Herstellung von **rac-86b** entsteht **rac-87b** (Ausbeute 10 %) als Nebenprodukt und konnte isoliert werden.

Im Vergleich mit den chemisch hergestellten Referenzverbindungen (Abbildung 77) konnte gezeigt werden, dass von den beiden möglichen Produkt Enantiomeren (E1_P und E2_P) nur eines gebildet wird (Abbildung 78). Gleichzeitig wurde über einen Zeitraum von 24 h beobachtet, dass das racemische Substratgemisch aus E1s und E2s kontinuierlich umgesetzt wird und eines der beiden Enantiomere (E2s) in der Reaktionslösung verbleibt. Der Enantiomerenüberschuss (ee, engl. enantiomeric excess, Gleichung siehe 8.6.1.13) für E2s nach 24 h Reaktionszeit beträgt 91 %. Für das Produkt konnte nur eines der beiden möglichen Enantiomere detektiert werden ($E2_P$), der *ee* liegt damit bei > 99 %. Für die Gesamtreaktion wurde eine Selektivität (S) von > 100 festgestellt (Gleichung siehe 8.6.1.14). Damit ist eine kinetische Racematspaltung unter diesen Bedingungen möglich und SgPsmC weist eine hohe Selektivität auf (Abbildung 78). Im nächsten Schritt sollte anstelle von stöchiometrischen Mengen SAM für diese Reaktion das SAM-Recyclingsystem für die SgPsmC-Reaktion implementiert werden, um so eine präparative Umsetzung zu ermöglichen. Dazu wurden die unter 6.3.3 optimierten Bedingungen genutzt und auf SgPsmC übertragen. Neben dem SAM-Recycling unter Nutzung der CtHMT und Methyliodid wurde eine Positivkontrolle durch Zugabe von SAM mitgeführt und für beide Versuche eine Negativkontrolle ohne Zugabe von SgPsmC durchgeführt. Nach 24 h wurden alle Proben durch Zugabe von organischem Lösungsmittel (EtOAc) gestoppt, extrahiert und via HPLC an chiraler stationärer Phase. analysiert. Die Analyse zeigt deutlich, dass ein Einsatz des SAM-Recyclings unter Nutzung von Methyliodid für die kinetische Racematspaltung unter diesen Bedingungen nicht möglich ist. Im Vergleich zu der positiven Kontrolle, bei welcher die Reaktion mit stöchiometrischen Mengen SAM durchgeführt wurde, sinkt der ee des Produktes deutlich. Ursache dafür ist die Hintergrundreaktion, bei der das Substrat von Methyliodid aus der Lösung direkt N-methyliert wird. Gut erkennbar ist dies an der CtHMT Kontrolle ohne Zugabe von SqPsmC. Die Hintergrundreaktion ist deutlich zu erkennen und es bildet sich das Produkt als racemisches Gemisch (3, Abbildung 79). Das deckt sich mit den Beobachtungen von D. Amariei und stellt ein Problem in der Anwendung des CtHMT basierten SAM-Recyclingsystems dar.^[296] Unter den hier getesteten Bedingungen ist eine präparative Anwendung ohne Verlust von Selektivität nicht möglich. Um das Problem der Hintergrundmethylierung durch einen Überschuss an Methyliodid zu umgehen und trotzdem eine kostengünstige Alternative zur stöchiometrischen Nutzung von SAM zu haben, könnte ein neues, sogenanntes SAM-Versorgungssystem, welches von der Gruppe um J. Andexer bereits 2017 beschrieben wurde, implementiert und als Alternative auf die Nutzung zur präparativen Biokatalyse hin evaluiert werden.^[172] Die Nutzung eines geeigneten SAM-Regenerationssystems zur erfolgreichen Skalierung der hier gezeigten Experimente erscheint notwendig, um die benötigte Selektivität aufrecht zu erhalten und so eine präparative Anwendung zu ermöglichen. In Zukunft sollte die Wahl des passenden SAM-Systems deutlich stärker bei der Entwicklung berücksichtigt und optimiert werden.



Abbildung 77. Analyse der racemischen Standards *rac*-87b und *rac*-86b *via* HPLC an chiraler stationärer Phase. Retentionszeiten: E1_P: 21.4 min, E2_P: 25.8 min, E1_S: 44.9 min, E2_S: 55.6 min. Die Verbindungen wurden wie in **Abbildung 76** dargestellt synthetisiert. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10). Retentionszeiten: E1_P: 21.4 min, E2_P: 25.8 min, E1_S: 44.9 min, E2_S: 55.6 min.



Abbildung 78. Zeitlicher Verlauf der biokatalytischen Umsetzung von Substrat *rac*-86b unter Nutzung von *Sg*PsmC und Analyse *via* HPLC an chiraler stationärer Phase. Die Nummerierung der Z-Achse gibt den Zeitpunkt nach Probeentnahme wieder. [Assaybedingungen: 0.5 mM Substrat (*rac*-86b), 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g), 2 mM SAM, KPi-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (v/v) DMSO, 40 °C, 16 h, 800 *rpm*, 0.5 mL Reaktionsvolumen]. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10). Retentionszeiten: E1_P: 21.4 min, E2_P: 25.8 min, E1_S: 44.9 min, E2_S: 55.6 min.



Abbildung 79. Ausschnitt aus der Analyse der Reaktion von SgPsmC und dem *Ct*HMT-SAM-Recyclingsystem zur kinetischen Racematspaltung der Verbindung *rac-86b* und. Die Analyse wurde *via* HPLC an chiraler stationärer Phase durchgeführt. Die SAM Kontrolle (1), sowie die Mehtyliodid Kontrolle (3) wurden ohne Zugabe von *Sg*PsmC durchgeführt. [Assaybedingungen 1: 0.5 mM Substrat *rac-86b*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g), KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 2: 0.5 mM Substrat *rac-86b*, 0.5 mM SAM, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g), KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 3: 0.5 mM Substrat *rac-86*, 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 4: 0.5 mM Substrat *rac-86*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g); 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 4: 0.5 mM Substrat *rac-86*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g); 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 4: 0.5 mM Substrat *rac-86*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g); 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 4: 0.5 mL substrat *rac-86*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g); 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO. 4: 0.5 mL substrat *rac-86*, 21.7 μM *Sg*PsmC (32 U/g); 14 % *Ct*HMT-CFE, 5 mM Methyliodid, KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5), 2 % (*v/v*) DMSO 40 °C, 16 h, 800 *rpm*, 0.5 mL Reaktionsvolumen]. [Assaybedingungen, 40 °C, 16 h, 800 *rpm*, 0.5 mL Reaktionsvolumen]. HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10). Retentionszeiten: E1_P: 21.4 min, E2_P: 25.8 min.

6.5.7 Zusammenfassung des Kapitels

- Die *N*-Methyltransferase *Sg*PsmC konnte erfolgreich produziert und gereinigt werden
- Das Temperatur- und pH-Optimum (35–40 °C, KP_i pH 7.5 (100 mM)) konnten f
 ür SgPsmC bestimmt werden
- Die kinetischen Parameter von SgPsmC konnten sowohl f
 ür das nat
 ürliche Substrat 2a als auch f
 ür ein artifizielles Substrat 88a bestimmt und verglichen werden
- Es konnte kein inhärenter Einfluss der Elektronendichte des Aromaten in Abhängigkeit verschiedener 5'-Substituenten auf die SgPsmC Aktivität beobachtet werden
- Eine kinetische Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen unter Nutzung von SgPsmC ist mit einer guten Selektivität (> 100) möglich
- Der Einsatz des direkten, enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems als SAM-Quelle f
 ür die kinetische Racematspaltung mit SgPsmC ist aufgrund von Hintergrundmethylierung nicht durchf
 ührbar

7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

7.1 C-3 Indol-Methyltransferasen in der Biokatalyse

Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Expression von psmD Sg und damit Produktion einer C-3 Indol-Methyltransferase aus dem Biosynthese-Gencluster des bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-b]indols Physostigmin (1). Der aus der Biosynthese bekannte Schlüsselschritt sollte für die chemoselektive, biokatalytische Svnthese von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Alkaloiden nutzbar gemacht werden. Zu Beginn der Evaluierung des Zielenzyms SgPsmD wurde die natürliche, aus der Physostigmin-Biosynthese bekannte Reaktion reproduziert. Hierzu wurde zunächst eine dreistufige Syntheseseguenz etabliert, um das Substrat 4a zu erhalten. Durch anschließende detaillierte, biochemische Evaluierung von SqPsmD konnten sowohl das Temperatur- und pH-Optimum für SqPsmD als auch die kinetischen Parameter bestimmt werden. Die Analyse des Substratspektrums von SgPsmD zeigte, welches Potential dieses Enzym für die Anwendung in der organischen Chemie bietet, offenbarte allerdings auch Restriktionen in der Anwendbarkeit. Vor allem im Hinblick auf sterisch anspruchsvolle Substrate zeigte das Enzym zunehmend sinkende Aktivität. Ähnliches wurde für Substrate ohne Carbamat-Seitengruppe beobachtet, sodass von einer limitierten Anwendbarkeit für den Einsatz in der Biokatalyse ausgegangen werden musste.

Ergänzt wurde die Betrachtung durch die Analyse der (Stereo-) Selektivität der SqPsmD-Reaktion. Durch Synthese geeigneter, racemischer Referenzen und Analyse via HPLC an chiraler stationärer Phase, konnte für insgesamt drei Produkte der Biokatalyse (2a, 2e, 2m) gezeigt werden, dass die Reaktion enantioselektiv abläuft. Dabei konnte beobachtet werden, dass weder der sterische Anspruch der Amid-Seitengruppe (Substrat 4e) noch das Fehlen der Carbamat-Seitengruppe (Substrat **3q**) einen Einfluss auf die Selektivität nehmen. Dies ist im Hinblick auf die Anwendung in der präparativen Biokatalyse ein großer Vorteil, da die bekannten chemischen Methoden die Selektivität dieser Reaktion nicht erreichen. Im Folgenden wurde das Enzymportfolio durch Sequenzhomologie-basierte Suche erweitert. Es konnten weitere, putative C-3 Indol-Methyltransferasen identifiziert und eine davon (SaPsmD aus Streptomyces albulus) hinsichtlich ihrer Charakteristika untersucht werden. Im Fokus stand dabei die Evaluierung von SaPsmD im direkten Vergleich mit SgPsmD hinsichtlich der Anwendbarkeit zur präparativen Biokatalyse. Zunächst konnte gezeigt werden, dass SaPsmD tatsächlich die natürliche SgPsmD-Reaktion katalysiert und dass auch diese Reaktion enantioselektiv verläuft. Durch Analyse des Temperaturoptimums konnten erste Unterschiede zwischen SaPsmD und SgPsmD festgestellt werden. Diese Beobachtung setzte sich bei der Analyse der Stabilität unter Reaktionsbedingungen (35 °C, KPi pH 7.5, 100 mM) über insgesamt 24 h fort. Im direkten Vergleich weist SaPsmD eine höhere Stabilität auf, gleichzeitig sind die bestimmten kinetischen Parameter ungünstiger.

A. PsmD Reaktion



B. Ausschnitt des Substratspektrums



C. Vergleich der biochemischen Parametern der genutzten C-3 Indol-Methyltransferasen

Parameter	SgPsmD	SaPsmD
k _{cat} [s ⁻¹]	0.009	0.003
т [°С]	35	30–45
Stab. [h]	< 6	> 24

Abbildung 80. Zusammenfassung für die Ergebnisse der Untersuchung von verschiedenen C-3 Indol-Methyltransferasen (PsmD) aus *Streptomyces griseofuscus (Sg)* und *Streptomyces albulus (Sa).* **A.** Natürliche PsmD-Reaktion unter Verbrauch des Cosubstrats SAM. **B.** Ausschnitt aus dem Substratsprektrum von PsmD. **C.** Vergleich der biochemischen Parameter von *Sg* und *Sa*PsmD. [Stab. = Stabilität].
7.1.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte

Basierend auf den zuvor zusammengefassten und in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zuneuenC-3 Indol-MethyltransferasefürdieSynthesevonHexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Alkaloiden ergeben sich diverse Anknüpfungspunkte für künftigeArbeiten, welche teilweise bereits begonnen wurden.

7.1.2 Mutagenese der PsmD-Enzyme

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die PsmD-Enzyme ein breites Spektrum von Derivaten des natürlichen Substrates **4a** akzeptieren. Um jedoch die Umwandlung von schlecht umsetzbaren Substraten zu verbessern, wurde innerhalb der Masterarbeit von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ein erster Versuch zur Optimierung von *Sa*PsmD durch gerichtete Evolution unternommen.^[256] Die initialen Ergebnisse dieser Arbeit werden im folgenden Umrissen und sollten als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen.

Zunächst wurden die Zusammensetzung und der Aufbau des aktiven Zentrums von SaPsmD anhand eines Homologie-Strukturmodell analysiert. Alle Reste, die sich in einem Abstand von weniger als 4 Å von dem platzierten Substrat 4a befanden, wurden für die Mutagenese in Betracht gezogen. Die weitere Auswahl der Aminosäuren basierte auf der Interaktion bestimmter Reste für die Substratbindung, der optimalen Orientierung innerhalb des aktiven Zentrums und der Substratfixierung durch verschiedene molekulare Kräfte (vor allem Wechselwirkung über kurze Abstände (engl. short range forces) wie Wasserstoffbrückenbindungen). So konnte die Auswahl auf vier potenziell wichtige Aminosäuren eingeschränkt werden. In dem Homologie-Strukturmodell mit Substrat lagen diese Reste in der Nähe der polaren Seitengruppen des Substrats und tragen somit mutmaßlich über polare Wechselwirkungen zur Stabilisierung bei.^[256]

Da die allgemeine Wirkung der einzelnen Reste auf die Substratakzeptanz untersucht werden sollte, wurde eine Sättigungsmutagenese an ausgewählten Positionen durchgeführt, also die Substitution jedes ausgewählten Restes gegen die anderen 19 kanonischen natürlichen Aminosäuren.^[276] So konnten insgesamt 189 Mutanten erzeugt werden, welche hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht wurden.^[256] Im Vergleich zum Wildtyp konnte allerdings keine wesentliche Änderung hinsichtlich der Promiskuität festgestellt werden. Zusätzlich konnte für einige Enzymvarianten gezeigt werden, dass sich die Enzymaktivität verringerte oder nicht mehr detektiert werden konnte.^[256] An diesem Punkte wurde von einer Sequenzierung und detaillierten Charakterisierung der inaktiven Enzymvarianten abgesehen, trotz der Notwendigkeit einer detaillierten Betrachtung des Reaktionsmechanismus. Diese Untersuchung wurde zu einem späteren Zeitpunkt weitergeführt.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Ein wichtiger Schritt zur Vorhersage von geeigneten Mutanten war die Generierung einer Kristallstruktur von einem der beiden vorhandenen PsmD-Enzymen. Dies gelang zum Ende der Masterthesis von M.Sc. Nadiia Pozhydaieva (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und sollte in der Folge als Startpunkt für die weitere Optimierung der PsmD-Enzyme durch M.Sc. Diana Amariei (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) innerhalb ihrer Promotion dienen.^[256, 296] Die an der Enzymreaktion beteiligten Aminosäuren zu identifizieren und damit den Reaktionsmechanismus aufzuklären bleibt ein elementarer Baustein auf dem Weg zu einem tieferen Verständnis für die biokatalytische C-3 Indol-Methylierung. Um zukünftig die in dieser Arbeit aufgezeigten Limitationen dieser Enzyme 711 überwinden. muss notwendigerweise eine Enzymoptimierung durchgeführt werden. Neben der Erweiterung des Substratspektrums dieser Enzyme sollte auch die Optimierung hinsichtlich der Temperatur, Zeit und Lösungsmittelstabilität erfolgen, um die hier initial gezeigten Ergebnisse in der Zukunft für eine erfolgreiche Implementierung zur industriellen Anwendung nutzbar zu machen.



Abbildung 81. Ausschnitt aus dem Homologiemodell von SaPsmD welches als Grundlage für die Mutagense verwendet wurde. Hervorgehoben sind die relevanten Aminosäuren und das Cosubstrat SAH. Das Homologiemodell wurde von Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) bereitgestellt.

7.1.3 Diketopiperazine – Biokatalytischer Zugang durch C-3 Indol-Methyltransferasen

Diketopiperazin (DKP)-haltige Cyclopeptide sind eine weitere Klasse von Naturstoffen aus der Familie der Indolalkaloide. DKPs weisen eine große strukturelle Vielfalt auf und besitzen darüber hinaus wertvolle, biologische Aktivitäten.^[199] Je nach Methylierungsmuster der Tryptophanreste in cWW-DKPs, sind monozyklische, einfach methylierte und doppelt methylierte Formen möglich. Die beiden letzteren Formen entstehen durch die Methylierung von entweder einer oder zwei C3-Indolpositionen. Analog zu der für die PsmD-Enzyme beobachteten Reaktion, soll auch hier die C-3 Methylierung stereoselektiv bzw. diastereoselektiv erfolgen und über Zyklisierung hin zu dem Pyrroloindolin-Grundgerüst führen.[198] Basierend auf der Biosynthese der bekannten DKPs Lansai B 63 und Nocardioazin A 64 wurden die Gensequenzen für StspM1 (aus Streptomyces sp. HPH0547) und C3-M (aus Nocardiopsis sp. CMB-M0232) in einem pET28a Vektor kommerziell hergestellt. Innerhalb der Masterarbeit M.Sc. Nadiia Pozhvdaieva von (Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) sollte eine Charakterisierung und Evaluierung der beiden Enzyme vorgenommen werden. Die beiden Gene konnten erfolgreiche exprimiert werden und das W-W Dipeptid mit einer Ausbeute von 92 % über drei Schritte hergestellt werden.^[256] Die fehlenden Schritte hin zur Charakterisierung und Evaluierung von SsStspM1 und NsC3-M werden seit 2021 durch M.Sc. Mona Haase (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen ihrer Doktorarbeit untersucht und weiter voran gedacht. Basierend auf den von M.Sc. Mona Haase erhaltenen Ergebnissen konnte somit die Aktivität von SsStspM1 gegenüber verschiedenen Dipeptiden gezeigt werden. Über die Synthese von Referenzverbindungen wurde darüber hinaus bestätigt, dass die Reaktion diastereoselektiv verläuft und Zugang zu diversen DKPs bietet, welche in Zukunft hinsichtlich ihrer Bioaktivität untersucht werden sollen (M. Haase, unveröffentlichte Ergebnisse, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).



Abbildung 82. Reaktionsschema für die initiale Analyse der beiden C-3 Indol-Methyltransferasen StspM1 (aus *Streptomyces sp. HPH0547*) und C3-M (aus *Nocardiopsis sp. CMB-M0232*).^[199, 201]

7.2 Mutasynthese und Ganzzellbiokatalyse – Das native SAM-Recycling

Eine Möglichkeit den Einsatz eines SAM-Recyclingsystems zu umgehen, ist die Nutzung von Ganzzellbiokatalvse oder Mutasynthese und damit die Nutzung des nativen SAM-Vorrats. Basierend auf dem Physostigmin Biosynthese-Gencluster wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Lea Winand (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, AG Nett, TU Dortmund) ein Versuch zur heterologen Produktion von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten in xhantus unternommen. Mvxococcus xhantus ist ein räuberisches Mvxococcus Bodenbakterium und besitzt für die Mutasynthese förderliche Eigenschaften. Als räuberisches Bakterium nimmt M. xhantus vermehrt Nährstoffe aus seiner Umgebung auf, was für eine erleichterte Aufnahme von u.a. Mutasynthons (kleine, chemische Vorläuferverbindungen, die in Folge der Biosynthese durch den manipulierten Wirt einem Zielprodukt umgesetzt werden sollen) spricht. Zusätzlich sind in den letzten Jahren zunehmend neue, genetische Werkzeuge zur gezielten Modifizierung von *M. xhantus* entwickelt worden.^[277, 278] So konnten bereits einige Arbeiten mit M. xhantus als Chassi für die Mutasynthese zur heterologen Produktion komplexer Naturstoffe veröffentlicht werden, nicht zuletzt vor allem durch die Forschung der Gruppe um Prof. Markus Nett (Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen, TU Dortmund).[279-^{281]} Insbesondere für die heterologe Produktion von Naturstoffen, in deren Biosynthese SAMabhängige Methyltransferasen beteiligt sind, scheint *M. xhantus* aufgrund seines natürlichen SAM-pools gut geeignet zu sein.[282]

Im Folgenden sind die Ergebnisse der gemeinsamen Untersuchung zur heterologen Produktion von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten zusammengefasst. Durch Synthese von für die Mutasynthese geeigneten Vorläuferverbindungen und anschließende Testung der erhaltenen Verbindungen im Hinblick auf ihre Bioaktivität konnte die bekannte Pyrroloindolin-Bibliothek erfolgreich erweitert werden. Die gemeinschaftlichen Ergebnisse konnten bereits 2021 von Winand *et al.* publiziert werden.^[283]

7.2.1 Generierung von Physostigmin Derivaten durch Mutasynthese in Myxococcus xhantus

Ziel dieser Veröffentlichung war es, einen direkten und ressourceneffizienten Zugang zu Physostigmin und Physostigmin-Derivaten zu generieren. Dazu wurde ein Teil des nativen Physostigmin Biosynthese-Genclusters, mit Hilfe eines für *M. xhantus* geeigneten Plasmid-basierten Vektorsystems, in den Produzenten eingebracht. Durch Fütterung geeigneter, synthetisch zugänglicher Vorläufermoleküle gelang es nicht nur Physostigmin mit einem Titer von bis zu 72 mg/L, sondern auch verschiedene Physostigmin-Derivate **1a–1d** zugänglich zu machen.



Abbildung 83. Übersicht des genutzten Chassis zur Produktion von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten **1a–1d** in *M. xhantus*. Adaptiert und verändert nach Winand *et al*.^[283]

Dabei konnte beobachtet werden, dass analog zu den Ergebnissen der Biokatalyse, die produzierten Titer vor allem von der Substratakzeptanz der einzelnen Enzyme abhängt. Der native SAM-*pool* von *M. xhantus* scheint dagegen keine Limitierung darzustellen. Gleiches gilt für die Aufnahme der verschiedenen Vorläufermoleküle durch *M. xhantus*. Allerdings konnte auch eine Akkumulation von Intermediaten beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war nicht bekannt, welches Enzym der Flaschenhals der Mutasynthese sein könnte. Eine weitere Optimierung des Vektors steigerte die Physostigmin-Produktion und deutet darauf hin, dass eine weitere Optimierung des Produktionschassis durchaus sinnvoll und notwendig sein könnte, um die Produktionstiter weiter zu maximieren.

Die erhaltenen und *via* präparativer HPLC isolierten Verbindungen wurden anschließend im Hinblick auf ihre Bioaktivität innerhalb dieser Arbeit durch den Autor untersucht. Neben der Testung auf AChE und BChE Aktivität wurde zusätzlich die Zytotoxizität gegenüber *Plasmodium falciparum* untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung der Bioaktivität sind in **Tabelle 25** zusammengefasst.

Tabelle 25. Ergebnisse der biologischen Untersuchung verschiedener, durch Mutasynthese zugängliche Physostigmin-Derivate in Bezug auf das inhibitorische Potenzial gegenüber AChE/BChE und dem zytotoxischen Potential gegenüber *P. falciparum*.^[283] Die Untersuchung der inhibitorischen Potentials gegenüber der AChE und BChE wurde vom Autor durchgeführt.

Verbindung	R ¹	AChE IC₅₀ [nM]	BChE IC₅₀ [nM]	Zytotoxizität IC₅₀ [mM]	Titer [mg/L]
Rivastigmin		36059.2	1031.0	n.d. ^b	
Physostigmin	-N O J	127.9	122.5	173.4	72.0
1a	~ ^H ^Y ^O ^y	1559.2	158.1	163.5	9.5
1b	F	> 10 ¹⁰	34435.0	> 300	2.0
1c	CI	> 10 ¹⁰	> 10 ⁵	> 300	4.9
1d	Br	> 10 ¹⁰	> 10 ⁵	> 300	5.6
Podophyllotoxin		n.b.	n.b.	0.01	

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Produktion von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten durch heterologe Produktion in *M. xhantus* möglich ist. Physostigmin konnte mit guten Titern und Ausbeuten erhalten werden und eine Diversifizierung dieses Ansatzes unter Verwendung verschiedener Mutasynthons ist möglich und liefert die neuartigen Physostigmin-Derivate **1a–1d**, welche bisher weder synthetisch noch biokatalytisch zugänglich waren. Somit stellt der Einsatz der Mutasynthese in diesem Kontext eine sinnvolle Ergänzung und Erweiterung der bis dato gezeigten Möglichkeiten zur Herstellung von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Alkaloiden dar und erweitert die verfügbare Substanzbibliothek.

7.3 SgPsmB – Biokatalytische Deacetylierung als fehlendes Puzzelstück?

Wie bereits zuvor angemerkt fiel bei der Durchführung und Analyse der Mutasynthese auf, dass eine Akkumulation von Zwischenprodukten stattfindet. Entgegen der Erwartung das SAM der Flaschenhals der *in vivo* Produktion ist, war es vor allem das Intermediat **5**, also das Produkt vor der Amid-Hydrolyse, welches übermäßig detektiert werden konnte. Es ist bekannt, dass *Sg*PsmB die Hydrolyse katalysiert, allerdings wurde dieses Enzym bisher nie charakterisiert. Betrachtet man zudem die Ergebnisse aus dieser Arbeit in Bezug auf die PsmD-Enzyme, überrascht diese Erkenntnis. Es wäre zu vermuten gewesen, dass basierend auf der niedrigen PsmD-Enzymaktivität der hier untersuchten 5'-halogenierten Indole **3j–31** generell keine Akkumulation von Zwischenprodukten stattfindet, sondern die Biosynthese an sich nicht stattfindet und damit vor allem das Mutasynthon im Medium zurückbleibt. Da für *Sg*PsmC bereits gezeigt werden konnte, dass 5'-halogenierte Verbindungen als Substrat akzeptiert werden, rückte *Sg*PsmB als möglicher Flaschenhals der Mutasynthese in den Fokus. Um das zu untersuchen, wurde die *psmB_Sg* Gensequenz von Dr. Lea Winand in einem pET28a(+) Vektor als pET28a(+)-*psmB_Sg* zur Verfügung gestellt und sollte innerhalb dieser Arbeit hinsichtlich seiner Aktivität untersucht werden.

7.3.1 Produktion und Reinigung von SgPsmB

Zunächst wurde dafür *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem entsprechenden pET28a(+)-*psmB_Sg* Plasmid transformiert. Durch Expression unter Standardbedingungen (**8.3.5.6**) konnte *psmB_Sg* erfolgreich exprimiert und das Protein anschließend *via* Nickel-NTA gereinigt werden.



Abbildung 84. *SDS-PAGE* Analyse der Nickel-NTA Reinigung von *Sg*PsmB in *E. coli* BL21 Gold (DE3) [*Sg*PsmB = 32.6 kDa], M = Marker (Roti®-Mark), 1 = CFE *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET28a(+)*psmB_Sg*; 2 = Pelletfraktion *E. coli* BL21 Gold (DE3)_pET28a(+)-*psmB_Sg*; 3 = Durchlauffraktion (FT, *engl. flow through*), 4 = Waschfraktion 1, 5 = Waschfraktion 2, 6 = Waschfraktion 3, 7 = Elutionsfraktion 1, 8 = Elutionsfraktion 2, 9 = Elutionsfraktion 3, 10 = Elutionsfraktion 4, 11 = Reinigung der Säule (*engl. purge*).

Die Fraktionen 8–10 wurden konzentriert und anschließend für die Biokatalyse verwendet. **Abbildung 84** zeigt deutliche Verunreinigungen in den Elutionsfraktionen. Eine weitere Optimierung der Reinigung wurde zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht vorgenommen, sollte aber zur Bestimmung von unter anderem kinetischen Parametern in Betracht gezogen werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

7.3.2 SgPsmB – Der Flaschenhals der Physostigmin-Biosynthese?

Von Liu *et al.* konnte bereits 2014 gezeigt werden, dass *Sg*PsmB die unter **Abbildung 85** gezeigte Reaktion katalysiert. Unter Nutzung von gereinigtem *Sg*PsmB wurde diese Reaktion *in vitro* unter den von Liu *et al.* publizierten Bedingungen rekonstruiert. Es konnte *via* DC-Analyse die Entstehung eines neuen Produktes beobachtet werden. Unter den hier getesteten Bedingungen lief die Reaktion allerdings sehr langsam ab und das Produkt konnte lediglich nach 24 h Reaktionszeit in geringen Mengen *via* DC-Kontrolle detektiert werden.



Abbildung 85. Reaktionsschema *Sg*PsmB-Reaktion. Die Reaktion wurde analog zu den von Liu *et al.* publizierten Bedingungen durchgeführt.^[34] Eine Kontrolle ohne Enzym wurde parallel durchgeführt und die Zugabe (+) Coenzym A wurde untersucht. [Reaktionsbedingungen: 1 mM Substrat **5a**, 15 μM *Sg*PsmB, 100 μM COA; TRIS-Puffer (100 mM, pH 8), 1 % (*v/v*) DMSO, 35 °C, 24 h, 300 rpm, 1 mL Reaktionsvolumen].

Darüber hinaus wurden *Sg*PsmB innerhalb einer institutsinternen Kooperation weitergeben und sollten hinsichtlich des Einsatzgebietes als Hydrolase weiter untersucht werden (M.Sc. Cindy Zimmermann, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Im weiteren Verlauf wurde zur Überprüfung der Hydrolase-Aktivität das Paranitrophenol-Assay eingesetzt. Dieses Assay wird verwendet, um die (unspezifische) Hydrolase-Aktivität zu bestimmten.^[284, 285] Zur Überprüfung der Funktionalität des isolierten *Sg*PsmB-Enzyms wurden drei verschiedene Ester (unterscheiden sich in der Länge der Alkylkette, siehe **Abbildung 86**) getestet. Dabei konnte einerseits festgestellt werden, dass *Sg*PsmB generell in der Lage ist, Paranitrophenolester zu hydrolysieren und des Weiteren, dass kurzkettige Ester schneller als langkettige Ester hydrolysiert werden. Somit konnte *Sg*PsmB als aktives Enzym eingesetzt werden und eine Hydrolase-Aktivität wurde bestätigt.

7. Zusammenfassung und Ausblick



Abbildung 86. Aufbau des Paranitrophenol Assays zur Überprüfung der Hydrolase-Aktivität von *Sg*PsmB. Gemessen wurde der Verbrauch des Paranitrophenolesters und die enzymkatalysierte Freisetzung des Paranitrophenolats, welches eine charakteristische gelbe Färbung der Lösung verursacht, welche bei 410 nm detektiert werden kann. [Assaybedinungen: 100 μM Substrat **91a–c**, 5 μg *Sg*PsmB, TRIS-Puffer (100 mM, pH 8), 1 % (*v/v*) DMSO, 25 °C, 10 min, 0.2 mL Reaktionsvolumen].^[284, 285]

Es bleibt festzuhalten, dass sich eine weiterführende und detailliertere Untersuchung von *Sg*PsmB im Hinblick auf seine Rolle in der Biosynthese lohnt. Ein Einsatz von homologen PsmB-Enzymen in der Mutasynthese zur Optimierung der Produktion von Physostigmin wäre hier ein möglicher Ansatz und sollte zukünftig untersucht werden. Entsprechend der zuvor durchgeführten Sequenzanalysen für *Sg*PsmD und *Sg*PsmC fällt auch hier auf, dass sowohl ein PsmB-Homolog aus *Streptomyces albulus* als auch *Streptacidiphilus bronchialis* identifiziert werden konnte. Alternativ dazu wäre eine Enzymoptimierung durch gerichtete Evolution ebenfalls ein Ansatzpunkt. Generell eigenen sich Amid-Hydrolasen für verschiedene Anwendungen. Der Einsatz von Amid-Schutzgruppen ist in der Chemie ist eine selten genutzte Möglichkeit, wird aber u.a. bei der chemischen Synthese von Zuckern verwendet. Eine Evaluierung der Einsatzmöglichkeiten von *Sg*PsmB in Bezug auf die selektive Entschützung in der Totalsynthese könnte durchaus Potential zur Anwendung bieten.^[286, 287]

Enzym	omprotib	opereinsummung
PsmB,	W8Q973	
Hydrolase		
Hydrolase	A0A059VUJ6	87.4 %
Hydrolase	A0A553ZQW8	80.9 %
Hydrolase	A0A345T4J3	58.6 %
	PsmB, Hydrolase Hydrolase Hydrolase Hydrolase	PsmB, W8Q973 Hydrolase A0A059VUJ6 Hydrolase A0A553ZQW8 Hydrolase A0A345T4J3

Tabelle 26. Ergebnisse der BLASTp-Analyse der SgPsmB Aminosäuresequenz.^[255]

7.4 Enzymgekoppeltes SAM-Recycling für den Einsatz zur präparativen Biokatalyse

Im Verlaufe dieser Arbeit konnte basierend auf einer Halogenid-Methyltransferase ein enzymaekoppeltes Recyclingsystem basierend auf der Arbeit von Liao et al. implementiert werden.^[34] Basis für die Nutzung ist die Produktion des Zielenzyms in einem Nukleosidase defizienten Stamm und einen unspezifischen Abbau des katalvtischen SAH zu verhindern. So konnte gezeigt werden, dass bereits eine Katalysatorbeladung von 1 mol% ausreichend ist um eine präparative, biokatalvtische Methylierung durchzuführen. Damit konnten das bisher größte Hindernis, welches die Anwendung von SAM-abhängigen Methyltransferasen einschränkte, beseitigt werden, sodass ein stöchiometrischer Bedarf an SAM nicht mehr besteht. Durch anschließende gezielte Optimierung der Reaktionsparameter mit statistischer Versuchsplanung, konnten die optimalen Parameter für die Durchführung des enzymgekoppelten SAM-Recyclingsystems unter Berücksichtigung der eigentlichen, PsmD-katalysierten Methylierung bestimmt werden. In einem ersten Versuchsaufbau konnten zwei kritische Parameter (Temperatur und Methyliodidkonzentration) identifiziert werden. Andere Faktoren wie der pH-Wert, die Zugabe von EDTA oder die genutzte SAH-Menge zeigten keinen bzw. nur geringen Einfluss auf die Reaktion. Durch eine weitere Optimierung konnten die genutzten Enzymmengen aufeinander abgestimmt und eine optimale Methyliodidkonzentration ermittelt werden. Auffällig war dabei, dass eine Erhöhung der Methyliodidkonzentration nicht grenzenlos möglich ist und die Gesamtreaktion negativ beeinflusst. Grund dafür sind Hintergrundreaktionen, welche einerseits durch unspezifische Methylierung des Substrats bzw. Produkts und andererseits durch Methylierung des Enzyms zu einer Limitation des Umsatzes führen können. Eine Optimierung der Reaktionsparameter für die Nutzung von enzymgekoppelten Recyclingsystemen ist notwendig und muss für jeden neuen Prozess zunächst durchgeführt werden. Dabei ist statistische Versuchsplanung ein hilfreiches Werkzeug und ermöglicht die systematische Testung einer Multi-Parameter-Reaktion mit einer vertretbaren Menge an durchzuführenden Experimenten.

7.4.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte

Basierend auf den zuvor zusammengefassten und in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zuneuenSAM-RecyclingMethodenfürdieSynthesevonHexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Alkaloiden ergeben sich diverse Anknüpfungspunkte für künftigeArbeiten, welche teilweise bereits begonnen wurden.

7.4.2 Vor- und Nachteile des enzymgekoppelten SAM-Recyclings

Wie später im Rahmen der Arbeit gezeigt wurde, eignet sich das HMT-basierte System zur präparativen Synthese. Dabei liegen die Vorteile des Systems vor allem bei seiner Schlichtheit.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Es ist das bisher einzige direkte SAM-Recyclingsystem und kommt dabei mit nur einem zusätzlichen Enzym aus. Das genutzte Opfersubstrat Methyliodid ist kommerziell erhältlich und günstig. Die Recyclingreaktionen lassen sich bei Umgebungstemperatur durchführen und die Nutzung von CFE ist möglich. Diese Punkte sorgen dafür, dass das System für viele Gruppen in der akademischen Forschung interessant wird und bereits geworden ist. Was zu Beginn dieser Arbeit ein Nachteil des Systems war, hat sich im letzten Jahr zu einem Vorteil entwickelt. Eine Alkyl-Randomisierung, welche basierend auf *Ct*HMT zuvor nicht möglich war, ist aktuell keine Herausforderung mehr. Mittlerweile wurden sowohl HMT-Varianten als auch Homologe von verschiedenen Forschergruppen analysiert und zugänglich gemacht.^[169, 195, 237] Im selben Atemzug konnte auch ein weiterer Nachteil bereits ausgeglichen werden und die homologen Enzyme, als auch die Enzymvarianten, weisen alle samt eine höhere katalytische Effizienz auf als die in dieser Arbeit genutzte Halogenid-Methyltransferase *Ct*HMT.

Demgegenüber stehen offensichtliche Bedenken, ob die Nutzung von Methyliodid als Opfersubstrat in der Biokatalyse zu einer ökonomisch und ökologisch sinnvollen Lösung beiträgt. Hier kann demnach einer der großen Vorteile biokatalytischer Reaktionen, nämlich die Nutzung ungiftiger und umweltverträglicher Substanzen nicht voll ausgespielt werden. So lohnt sich trotz der vorhandenen Vorteile des SAM-Recyclings ein Blick auch auf andere Versorgungssysteme und eine gesamtheitliche Betrachtung scheint notwendig um die Dimension und das Potential dieser Anwendungen zu begreifen.^[12, 193, 288] Eine detaillierte Betrachtung der aktuell verfügbaren Systeme wurde bereits unter **5.4** vorgenommen und ist in **Abbildung 87** schematisch zusammengefasst.

Zusätzlich sollte ein Biokatalysator, auch in Verbindung mit einem enzymgekoppelten Recyclingsystem, selektiv sein. Unter Nutzung des direkten, enzymgekoppelten SAM-Recyclings konnten allerdings vor allem bei hoher Methyliodid konzentration Hintergrundreaktionen beobachtet werden. Besonders deutlich war dies bei der Verwendung von SqPsmC zur kinetischen Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol rac-86b zu beobachten. Hier konnte unter Verwendung des HMT-Systems keine ausreichende Selektivität erzielt werden und bei Betrachtung einer Kontrollreaktion wurde deutlich, in welchem Ausmaß die Hintergrundreaktion stattfindet (Abbildung 79). Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, bietet das MAT basierten SAM-Versorgungssystems. Wie in Abbildung 87 dargestellt, ist hierfür die Nutzung von (über-)stöchiometrischen Mengen ATP notwendig, was wiederum aus ökonomischer Sicht unerwünscht ist. So bleibt die Verwendung des passenden SAM-Recycling- oder Versorgungsystems eine Einzelfallentscheidung und die Reaktionsparameter müssen für jede Reaktion neu bestimmt werden, um einen effizienten Prozess zu ermöglichen.

7. Zusammenfassung und Ausblick



Abbildung 87. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Cosubstrat-Regenerierungs- und Erzeugungsansätze (grau hinterlegt) gemeinsam mit anderen, aktuell verfügbaren Systemen. HMT: Halogenid-Methyltransferase; MAT: Methionin-Adenosyltransferase; SalL und FDA: Halogenasen; X-Da: Halogeniertes Desoxyadenin.^[12]

Eine Lösung für die angesprochenen Probleme könnte die Anwendung im *flow* sein. So lassen sich Reaktionsparameter besser aufeinander abstimmen und die Durchführung der Experimente in geschlossenen Systemen senkt die Gesundheitsgefährdung. Arbeiten in diese Richtung wurden bereits von M.Sc. Benjamin Chapple (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) aufgenommen und basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen sollen in den kommenden Jahren weitere Prozesse etabliert werden um eine nachhaltige, biokatalytische Methylierung ressourceneffizient nutzbar zu machen.

7.5 Späte Modifizierung von *N*-Heterozyklen – Anwendung einer *N*-MT zur kinetischen Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen

Um die vorhandene und durch die *C*-3 Indol-Methyltransferase PsmD zugängliche Bibliothek an bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen erweitern zu können, wurde die *N*-Methyltransferase *Sg*PsmC, welche ebenfalls aus dem Physostigmin-Biosynthese-Gencluster stammt, zunächst produziert und gereinigt. Anschließend wurde eine biochemische Charakterisierung durchgeführt. Dabei wurde das Substratportfolio durch Testung von Anilin und Indolin als mögliche Substrate erweitert. Während für Anilin keine Enzymaktivität festgestellt werden konnte, war eine *N*-Methylierung des Indolins möglich. Bei der systematischen Testung des Substratspektrums von *Sg*PsmC anhand einer Indolin-Bibliothek, konnte kein inhärenter Effekt von 5'-Substituenten festgestellt werden. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl unterschiedlicher 5'-substituierter Indoline **88a–880** von *Sg*PsmC akzeptiert und umgesetzt werden.

Darüber hinaus werden auch Chinolin- **92** und THIQ-Derivate **93**, sowie racemische Indoline von *Sg*PsmC als Substrat mit mäßiger bis guter Aktivität akzeptiert. Basierend darauf entstand der Plan einer fünfstufigen Totalsynthese von Physostigmin, welche als Schlüsselschritt eine enzymbasierte, kinetische Racematspaltung durch *Sg*PsmD enthielt. Es konnte gezeigt werden, dass *Sg*PsmC die kinetische Racematspaltung eines geeigneten, chemisch zugänglichen Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indols *rac-86b* mit hoher Selektivität (> 100) katalysiert (**Abbildung 78**). Während die Reaktion unter Zugabe von stöchiometrischen Mengen SAM mit hoher Selektivität ablief, konnte unter Verwendung des enzymgekoppelten *Ct*HMT-SAM-Recyclingsystems ein Einbruch der Selektivität durch Hintergrundmethylierung beobachtet werden. So könnte für die weitere Anwendung das *Tk*MAT-basierte SAM-Versorgungssystem genutzt werden. Eine weitere Optimierung des Systems ist notwendig und wird aktuell von M.Sc. Benjamin Chapple (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) im Rahmen seiner Doktorarbeit untersucht, um eine präparative Nutzung und damit die erste biokatalytische Totalsynthese von Physostigmin zu ermöglichen.





Abbildung 88. Übersicht der Ergebnisse und Anwendungsfelder der *N*-Methyltransferase *Sg*PsmC. **A.** Chemo-enzymatische Totalsynthese von Physostigmin durch Implementierung einer kinetischen Racematspaltung durch *Sg*PsmC unter Nutzung eines SAM-Versorgungssystems. **B.** Erweiterung des Substratspektrums von *Sg*PsmC auf relevante Strukturmotive in Wirk- und Naturstoffen zur möglichen Anwendung für späte, chemische Funktionalisierung.

7.5.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte

Basierend auf den zuvor zusammengefassten und in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zur Implementierung einer kinetischen Racematspaltung für die Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Alkaloiden ergeben sich diverse Anknüpfungspunkte für künftige Arbeiten, welche teilweise bereits begonnen wurden.

7.5.2 Anwendung zur kinetischen Racematspaltung von

Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolen

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen für *Sg*PsmC wird die Arbeit an diesem Projekt von M.Sc. Benjamin Chapple (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) fortgesetzt. Ziel ist es dabei die erkannten Limitationen zu überwinden und die kinetische Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol zur enzymatischen Synthese von Physostigmin und Physostigmin-Derivaten nutzbar zu machen.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit *Sg*PsmC-Homologe einzusetzen. Wie für die PsmD-Enzyme bereits gezeigt werden konnte, können selbst geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz einen großen Einfluss auf die Enzymstabilität haben. Die Ergebnisse der BLASTp-Analyse deuten darauf hin, dass sowohl *Streptomyces albulus*, als auch *Streptomyces sp. MZ03-46* und *Streptoacidophilus bronchialis* große Teile des Physostigmin-Biosynthese-Genclusters enthalten (**Tabelle 26** und **Tabelle 27**). Des Weiteren fällt auf, dass die verschiedenen *N*-MTs und *C*-MTs eine Sequenzähnlichkeit von 40–50% aufweisen. In

Experimenten konnte für SgPsmC eine C-MT-Aktivität gezeigt werden, allerdings läuft die Reaktion nur sehr langsam ab und eine weitere Untersuchung wurde basierend auf dieser Beobachtung nie durchgeführt. Vermutlich wäre es möglich durch Enzymoptimierung aus der *N*-MT eine duale MT zu generieren, welche sowohl *N*- als auch *C*-Methylierung mit hoher Enzymaktivität katalysieren kann und somit ein ambivalenter, stereoselektiver Biokatalysator erzeugt werden könnte.

Eine weiterführende Optimierung von *Sg*PsmC durch rationales Proteindesign ist eine Möglichkeit und es konnten bereits für diverse Beispiele eine deutliche Verbesserung der Enzymstabilität oder Lösungsmitteltoleranz durch Anwendung von verschiedenen verfügbaren bioinformatischen Methoden erreicht werden.^[289-293]

Organismus	Enzym	Uniprot ID	Übereinstimmung
Streptomyces griseofuscus	PsmC,	W8Q892	
	Methyltransferase		
Streptomycs albulus	Methyltransferase	A0A059VYN1	91.6 %
Streptomyces sp. MZ03-48	Methyltransferase	A0A553ZQW8	80.4 %
Nocardiopsis sp. HDS5	Methyltransferase	n.v.	69.4 %
Streptacidiphilus bronchialis	Methyltransferase	A0A345T4J3	57.9 %

Tabelle 27. Ergebnisse der BLASTp-Analyse der SgPsmC Aminosäuresequenz.^[255]

7.5.3 Gezielte Modifizierung von N-Heterozyklen

Das Potenzial der späten Funktionalisierung (*engl. late-stage modification, LSF*) bei der Einführung kleiner, chemischer Gruppen am Ende einer chemischen Synthese oder bei der Diversifizierung biologisch aktiver Heterozyklen von Natur- und Wirkstoffen hat LSF zu einem unverzichtbaren, chemischen Werkzeug in der organischen Synthese gemacht. So steigt der Bedarf an chemo-, stereo- und regioselektiven Reaktionen in diesem Bereich weiter an.^[294, 295] Es wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz von Biokatalysatoren auf diesem Gebiet enorme Vorteile bietet. Allerdings sind gerade für *N*-Heterozyklen bisher noch wenige, anwendbare Biokatalysatoren verfügbar.^[296]

Neben SgPsmC wurden in den letzten Jahren immer wieder Enzyme untersucht, welche sich für den Einsatz zur selektiven, späten Modifizierung von *N*-Heterozyklen eigenen.^[169, 297] Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits die Wildtyp Enzyme häufig eine außerordentliche Selektivität besitzen, wie es für SgPsmC der Fall war, oder eine gezielte Optimierung auf dem Weg zu Selektivität notwendig sein kann, wie Hauer *et al.* zeigten.^[169] Es würde sich eine weitere Betrachtung und Optimierung von SgPsmC hinsichtlich seiner breiten Anwendbarkeit

lohnen, um unter anderem die Enzymaktivität gegenüber THIQs zu verbessern und das Substratspektrum generell zu erweitern. So könnte zukünftig in einem ersten Schritt eine Enzym-Bibliothek aus den zuvor beschriebenen Enzymen, sowie neuen Biokatalysatoren systematisch gegen eine Bibliothek an relevanten *N*-Heterozyklen getestet werden. In einem zweiten Schritt könnten *hits* durch gerichtete Evolution oder rationales Proteindesign weiter optimiert werden, um industriell einsetzbare Biokatalysatoren zu erzeugen. Die aktuell verfügbaren *N*-MTs bieten einen guten Startpunkt für diese Entwicklung und das Interesse von Seiten der Industrie steigt zunehmend an.

7.6 Erweiterung und Testung der Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Bibliothek

Nachdem in dieser Arbeit zunächst C-3 Indol-Methvltransferasen zur stereoselektiven. biokatalytischen Synthese von Hexahydropyrrolo[2.3-b]indolen biochemisch charakterisiert und implementiert wurden. konnte anschließend ein enzymgekoppeltes SAM-Recyclingsystem etabliert werden. Durch gezielte Optimierung der Reaktionsparameter konnte die SgPsmD-HMT Reaktion unter Verbrauch von katalytischen Mengen SAH durchaeführt werden. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass diese Reaktionsbedingungen robust und skalierbar sind, sodass sie zur ersten präparativen, biokatalytischen Synthese von drei Physostiamin-Derivaten 2a. 2e und 2m eingesetzt werden konnten. Im Folgenden gelangen eine Optimierung und Vereinfachung dieses Versuchsaufbaus durch Einsatz eines homologen Enzyms (SaPsmD). Die Vorteile dabei waren zum einen, dass SaPsmD nicht gereinigt werden muss, sondern direkt als CFE eingesetzt werden kann. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass SaPsmD über einen längeren Zeitraum aktiv ist, während für SqPsmD die Enzymaktivität bereits nach 5 h nachlässt. Durch die Nutzung von SaPsmD im präparativen Maßstab gelang es, insgesamt 10 weitere Physostigmin-Derivate zugänglich machen und eine zu so Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-Bibliothek zu generieren (Abbildung 89).

Da Physostigmin ein bekannter AChE- und BChE-Inhibitor ist und basierend drauf als parasympathomimetischer Wirkstoff eingesetzt wird, wurde die Wirkung der hier synthetisierten Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Bibliothek auf AChE und BChE untersucht und ein IC₅₀-Wert bestimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass die hier hergestellten Verbindungen potente Wirkstoffe mit IC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich sind. Darüber hinaus konnte für die hier hergestellte Substanzklasse eine einzigartige Selektivität zugunsten der BChE beobachtet werden, ähnlich wie es für den zugelassenen Wirkstoff Rivastigmin der Fall ist.^[298-300] Durch abschließende Untersuchung der *druglikeness* und verschiedenen pharmakokinetischen Parametern, durch *in silico* Experimente, konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Verbindungen sich zumindest als Leitstrukturen für die Etablierung neuer Wirkstoffe eigenen können.



Abbildung 89. Übersicht der präparativen, biokatalytischen Synthese bioaktiver Hexahydropyrrolo[2,3b]indole und ihre Testung gegen die molekularen Zielstrukturen AChE und BChE unter Nutzung der Ellmanns Methode. Die Abbildung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Irene Küberl (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) erstellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

7.6.1 Perspektiven und Anknüpfungspunkte

Basierend auf den zuvor zusammengefassten und in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zur Implementierung einer präparativen, biokatalytischen Synthese von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen und deren biologische Testung ergeben sich diverse Anknüpfungspunkte für künftige Arbeiten, welche teilweise bereits begonnen wurden.

7.6.2 QSAR-Modell zur Optimierung von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol

Innerhalb dieser Arbeit konnten bereits verschiedene, neue biokatalytische Ansätze zur Synthese von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen gezeigt werden. Als Kritikpunkt könnte angebracht werden, dass die erzeugte Bibliothek an Verbindungen insgesamt zu homogen ist und abgesehen von kleineren Modifikationen keine großen, strukturellen Unterschiede abbildet. Demgegenüber steht allerdings die Beobachtung, dass bereits kleine strukturelle Unterschiede, wie es zwischen Verbindung **2a** und Physostigmin der Fall ist, einen Einfluss auf Selektivität gegenüber molekularen Zielstrukturen haben. Deshalb sollte die Weiterführung, Erweiterung und Optimierung der bestehenden Verbindungs-Bibliothek unter rationalen Gesichtspunkten ablaufen und fortgeführt werden.

In Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) wurde deshalb an einem QSAR (*engl. quantitative strucutre-activity-relation*) Modell gearbeitet. Das Ziel war es dabei die die experimentell erhaltenen Daten gemeinsam mit Literaturdaten zu nutzen, um anschließend einen *machine learning*-basierten Algorithmus zur iterativen Strukturoptimierung zu implementieren. Ziel war es dabei einen Prozess hin zu optimierten, aktiveren Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indolen zu etablieren. Grundlage ist eine auf *molecular docking* gestützte Vorhersage von IC₅₀-Werten der zu testenden Substanzen, welche anschließend mit den durch biokatalytische Synthese zugänglichen Verbindungen durch *in vitro* Studien verifiziert bzw. konkretisiert werden. In einer ersten Studie soll das Prinzip auf die bekannten, molekularen Zielstrukturen AChE und BChE angewendet werden, für welche bereits neuartige, bioaktive Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole getestet werden konnten und deren Bioaktivität quantifiziert werden konnte.

Basierend auf den hier etablierten Prozessen, soll zum einen die vorhandene Bibliothek an Verbindungen stetig und unter rationalen Gesichtspunkten erweitert werden, da die Datenmenge eine entscheidende Rolle für die Qualität des Modells spielt. Zum anderen wurde bereits unter **6.4.4** gezeigt, dass auch andere molekulare Zielstrukturen zur biologischen Testung der hier hergestellten Verbindungs-Bibliothek in Frage kommen. Ein erfolgreich implementierter Prozess könnte insofern auf beliebig viele weitere Zielstrukturen erweitert und getestet werden und somit die beschleunigte Entwicklung von neuen, aktiveren Verbindungen katalysieren.

7.6.3 Entdeckung neuer Acetylcholinesterase Inhibitoren zur Bekämpfung von Alzheimer

Aufgrund des schlechten Wirkprofils ist Physostigmin nicht zur Behandlung von Alzheimer zugelassen, obwohl die AChE als molekulare Zielstruktur bei der symptomatischen Behandlung von Alzheimer adressiert wird. Zur Behandlung werden andere Wirkstoffe, wie Donepezil, Galanthamin und Tacrine verwendet.^[301, 302]



Abbildung 90. Übersicht der zur Alzheimer Behandlung zugelassenen Arzneimittel.

Im Zuge des demografischen Wandels und der steigenden Anzahl von an Alzheimer erkrankten Menschen, wächst allerdings der Bedarf an neuen, potenten Wirkstoffen mit verbesserten, pharmakokinetischen Eigenschaften.^[303] Eine Möglichkeit zur Entdeckung neuer Wirkstoffe ist das Pharmakophor-basierte, virtuelle Screening.^[304] Als Teil dieser Doktorarbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) im Rahmen der Bachelorarbeit von B.Sc. Philipp Schäfer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) ein solches Screening durchgeführt.^[271] In der vorliegenden Studie wurden drei auf docking basierende, virtuelle Screening-Ansätze verwendet und sowohl die ZINC15- als auch die MolPort-Datenbanken nach verfügbaren Analoga von Physostigmin (1) und Donepezil (94), zwei hochwirksamen AChE-Inhibitoren, zu durchsuchen. Dabei konnten insgesamt über 50 neue, potenzielle AChE-Inhibitoren in silico identifiziert werden und ein sogenannter Docking Score ermittelt werden.^[271] Dieser gibt die berechnete Bindungsenergie an. Je niedriger der Wert, desto höher ist die Warscheinlichkeit einer Bindung des Liganden an den Rezeptor. Diese wurden anschließend experimentell auf ihre inhibitorische Wirkung hin untersucht wurden. Für 11 dieser Verbindungen gelang es einen IC₅₀-Wert zu bestimmen. Die Werte lagen zwischen 14 bis 985 µM und es konnten neuartige Gerüststrukturen identifiziert werden, die für die Entwicklung neuer Klassen von AChE-Inhibitoren verbessert und zukünftig verwendet werden könnten. Für die drei potentesten, neuen Verbindungen konnte zusätzlich der Mechanismus der Inhibition gezeigt werden. Besonders auffällig war bei dieser Studie das Rivastigmin-Derivat S-I 26, welches eine deutlich erhöhte Potenz im Vergleich mit Rivastigmin selbst aufweisen konnte (14 ± 1 µM für S-I 26 und 71 ± 3 µM für Rivastigmin). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die hier erhaltenen Ergebnisse sind Teil einer 2021 veröffentlichten Publikation (David et al.).[268]

Tabelle 28. Zusammenfassung der Ergebnisse der Publikation von David et al. Für das Docking wurde
die Software Glide SP verwendet und ein sogenannter Docking Score ermittelt. Dieser gibt die
berechnete Bindungsenergie an. Je niedriger der Wert, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer
Bindung des Liganden an den Rezeptor. Der IC50-Wert wurde als Mittelwert einer Mehrfachbestimmung
(n = 6) angegeben. ^[268]

Verbindung	ІС₅₀ [µм]	Docking Score [kcal/mol]	Inhibition
S-I 16	220 ± 10	-8.02	
S-I 18	634 ± 67	-9.68	
S-I 26	14 ± 1	-9.20	gemischt
S-II 2	481 ± 36	-10.15	
S-II 6	331 ± 8	-10.03	
S-II 13	393 ± 27	-10.29	
S-II 14	985 ± 309	-10.64	
S-II 16	417 ± 33	-10.74	
S-II 18	175 ± 16 -10.99		gemischt
S-III 6	120 ± 3	-15.10	gemischt
S-III 12	393 ± 27	-13.48	
Physostigmine (1)	0.18 ± 0.01	-7.68	
Donepezil (94)	0.027 ± 0.002	-10,46	
Rivastigmine (30)	71 ± 3	-7.68	



Abbildung 91. Strukturen der in dieser Untersuchung identifizierten AChE-Inhibitoren.

.

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Allgemeines

8.1.1 Geräte und Software

In **Tabelle 29** sind regelmäßig genutzte Geräte aufgelistet. Genutzte Software ist in **Tabelle 30** aufgelistet.

Tabelle 29. Ül	bersicht über i	n dieser	Arbeit	verwendete	Geräte.
----------------	-----------------	----------	--------	------------	---------

Gerät	Beschreibung	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	300 V Netzgerät	VWR International GmbH,
		Darmstadt, Deutschland
	Agarosegelkammern	peqLab Biotechnologie
		GmbH, Erlangen,
		Deutschland
Chromatographiesystem	Agilent1100	Agilent Technologies,
(HPLC)		Santa Clara, USA
	Dionex UltiMate 3000	Thermo Fisher Scientific,
		Waltham, MA, USA
Fotoapparat	Canon EOS 1000D, digitale	Canon Deutschland GmbH,
	Spiegeireilexkamera mil EF-5	Kreleid, Deutschland
	Canon EOS 6D Mark II. digitalo	Capan Dautschland CmbH
	Spiegelreflexkamera mit Canon	Krefeld Deutschland
	FF 24 - 105 mm f/41 IS USM	Kieleid, Deutschland
	Objektiv	
Gelelektrophorese für	Gelelektrophoresesystem für	<i>Invitrogen</i> GmbH.
SDS-PAGE	Invitrogen precast SDS-PAGE-	Darmstadt, Deutschland
	gels (XCell ureLock™ Mini-	
	Cell Èlectrophoresis System)	
	Bio-Rad Mini-Protean® Tetra	Bio-Rad Laboratories
	System	GmbH, München,
		Deutschland
Heizschrank	Jouan Innovens 234 EU1	Thermo Fisher Scientific,
		Waltham, MA, USA

Gerät	Beschreibung	Hersteller
NMR	600 MHz NMR	Bruker Billerica USA
Magnetrührer mit	Heidolph MR 3001 K kombiniert	Heidolph Instruments
Heiznlatte	mit EKT HeiCon	GmbH & Co. KG
	Kontaktthermometer	Schwabach Deutschland
PCR Cycler	VIII/P Donnio	VIVIP International CmbH
r Cit-Cyclei	ν νης σορρίο	Dermetedt Deutschland
	Piamatra TProfossional Pasia	Anglutik long AC long
	Credient	Analytik Jena AG, Jena,
nH Matar	Giduleill Mikroprozosor pH Motor 764	Knick Elektronische
pn-meter		Mooggoröte
		Cmbl & Co. KC. Barlin
		Gillon & CO. KG, Dellill,
n II. Elektrede		
pH-Elektrode	NORDANTEC pH-Elektrode	NORDANTEC GmbH,
Dis stans stan		Bremernaven, Deutschland
Photometer	NanoDrop 2000c,	I nermo Fisner Scientific,
	Kleinvolumenphotometer	Waltham, MA, USA
	Tecan Infinite® M1000 PRO,	Tecan Group AG,
_ ,	Miktrotiterplatten	Männedorf, Schweiz
Pipetten	Eppendorf Research, 0.1–2.5 µL	Eppendorf AG, Hamburg,
	Francisco de eff. De secondo de 40 mil	Deutschland
	Eppendorf Research, 1–10 µL	Eppendorr AG, Hamburg,
	Francisco Programska 40, 400 st	Deutschland
	Eppendorr Research, 10–100 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Eppendorf Research 100-	Eppendorf AG Hamburg
	1 000 µl	Deutschland
	Gilson Pipetman, 0.5–5 ml	Gilson, Middleton, WI, USA
Pumpen	Vaccubrand RZ 6	Vaccubrand
	Drehschieberpumpe	GmbH & Co KG Wertheim
	Breneenheberpampe	Deutschland
	DIVAC 1.2L Membranpumpe	Levbold GmbH, Köln,
		Deutschland
Rotationsverdampfer	Büchi Rotavapor® R-210	Büchi Labortechnik GmbH
Retationeverdampier	Rotationsverdampfer mit <i>Büchi</i>	Essen Deutschland
	B-491 Heizbad und Büchi V-700	
	Membrannumpe	
Schüttler und	BioCote Stuart rotator SB2	BioCote Ltd
Inkubatoren	Rotorschüttler in 37°C	Wolverbampton LIK
Induatoren	Konstantraum für Kulturröhreben	Wolvemanpton, or
	Edmund Bübler TiMix Schüttler	Edmund Bühler CmbH
	mit Inkubationabauba für	Hashingan Doutashland
	Realitionenlatten	Hechingen, Deutschland
	Finandarf MixMata DCB 11	Ennandorf AC Hamburg
	Eppendon Miximale PCB-11,	Eppendon AG, Hamburg,
		Deutschland
	Reaktionsplatten	
	Eppendon I nermomixer	Eppendont AG, Hamburg,
	compact, beneizter	Deutschland
	Schüttelblock für 1.5–2 mL	
	Reaktionsgetälse	
	Heidolph Unimax 1010,	Heidolph Instruments,
	Plattformschüttler für	GmbH & Co. KG,
	Flüssigkulturen; mit <i>Heidolph</i>	Schwabach, Deutschland
	Inkubator 1000,	
	Inkubationshaube	

	Samaray DK 10011	Dendelin electronia
Ultraschalidad	Sonorex RK 100H	Bandelin electronic
		GmpH & Co. KG, Berlin,
		Deutschland
UV-Lampe	Prinz UV-Testlampe für	PRINZ Verlag GmbH,
	Netzbetrieb	Passau, Deutschland
Waagen	Sartorius MC1, Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen,
		Deutschland
	Sartorius LA1200S, Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen,
		Deutschland
	Sartorius 2004MP,	Sartorius AG, Göttingen,
	Ultrafeinwaage	Deutschland
Zellaufschluss	Sonopuls HD2070.	Bandelin electronic
	verschiedene Horngrößen (1.5-	GmbH & Co. KG. Berlin.
	50 mL)	Deutschland
Zentrifugen	Beckman Coulter Optima	Beckman Coulter, Brea, CA.
	L-80 XP. Ultrazentrifuge	USA
	Beckman Coulter	Beckman Coulter Brea CA
	Type 50 2 Ti Rotor	USA
	Festwinkelzentrifugationsrotor	00,1
	Ennendorf Centrifuge 5242R	Eppendorf AG Hamburg
	aekühlte Zentrifuae mit	Deutschland
	Festwinkelrotor für	Deatschand
	Peaktionsgefäße (15 + 2 ml.)	
	Eppendorf Centrifuge 5810P	Ennendorf AG Hamburg
	acküblte Zentrifuge mit	Doutschland
	Gerunne Zennnuge mit	Deutschland
	Pestwinkenotoriu	
	Reaktionsgelaise (15 + 50 mL)	
	Eppendori Concentrator 5301,	Eppendorr AG, Hamburg,
	Sorvail F10S-4x1000,	i nermo Fisner Scientific,
		vvaitnam, MA, USA
	Sorvall F9S,	Thermo Fisher Scientific,
	Festwinkelzentrifugationsrotor	Waltham, MA, USA
	Sorvall RC6+, gekühlte	Thermo Fisher Scientific,
	Standzentrifuge	Waltham, MA, USA

Software	Verwendung	Hersteller
Inkscape ²	Erstellung von	Freeware
	Vektorgrafiken	
Benchling ³	Planung von	Freeware
	Klonierungsstrategien	
ChemBioDraw 16.0 & 18.0	Zeichnen von	PerkinElmer Informatics
	Strukturformeln	
CloneManager	Planung von	Scientific & Educational
9.4 Professional	Klonierungsstrategien	Software
CorelDRAW 2018	Erstellung von	Corel Corporation
	Vektorgraf0iken	
Design Expert 11 & 12	Experimentaldesign und	StatEase, Inc.
	Auswertung	
ensochemLab 7.0.5	Elektronisches Laborjournal	<i>enso Software</i> GmbH
ImageJ ¹	Densitometrie	Freeware
MestReNova 10.0	Analyse von NMR Daten	Mestrelab Research S.L.
Microsoft Excel 2010 & 2016	Auswertung von	Microsoft Corp.
	Datensätzen	
Microsoft PowerPoint	Erstellung von	Microsoft Corp.
2010 & 2016	Präsentationen	
Microsoft Word 2010 & 2016	Erstellung von	Microsoft Corp.
	Textdokumenten	
OriginPro 9.0G & 2018	Lineare und nicht-lineare	OriginLab Corp.
-	Regression	
Schrödinger Release 2020-2	<i>In silico</i> Bestimmung	Schrödinger
-	Pharmakokinetischer Daten	-

Tabelle 30. Übersicht über in dieser Arbeit verwendete Software.

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Diverse Verbrauchsmaterialien wurden von Unterschiedlichen Herstellern bezogen und verwendet. Einwegmaterialien zur biologischen Nutzung (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Petrischalen) wurden vorwiegend von neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Sterile Einwegspritzen (1, 2.5, 5, 10 und 20 mL) wurden von B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland) erworben.

Dünnschichtchromatographie (DC) Platten mit Kieselgel 60 und für die Nutzung zur präparativen Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße 40–63 µm) verwendet von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen.

Durchsichtige und weiße Mikrotiterplatten (Nunclon®; weiße Nunc™ F96 MicroWell™, Polystyrol, flacher Boden) wurden Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

¹ Februar 2022: https://imagej.net/index.php?title=Welcome&oldid=38266

² Februar 2022: https://inkscape.org/de/

³ Februar 2022: https://www.benchling.com/

8.1.3 Chemikalien

Chemikalien wurden von *Alfa Aesar* (Karlsruhe, Deutschland), *Carl Roth* GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland), *Fermentas* GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland), *TCI Europe* (Zwijndrecht, Belgien), *Merck* (Darmstadt, Deutschland) und *VWR International* (Radnor, PA, USA) oder BLD Pharma (Kaiserslautern, Deutschland) erworben. Organische Lösungsmittel wurden entweder kommerziell mit der geeigneten Reinheit und wenn möglich wasserfrei erworben, oder vor Benutzung destilliert, um Stabilisatoren sowie andere Verunreinigungen zu entfernen.

8.1.4 Enzyme

Enzyme für die Nutzung in biologischen Methoden wurden von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, USA) oder *New England BioLabs* GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), abhängig von der jeweiligen Verfügbarkeit bezogen. Die Acetylcholinesterase (aus *Electrophorus electricus*, ≥1000 U/mg) sowie Butyrylcholinesterase (aus Pferdeserum, ≥900 U/mg) wurden von *Merck (Darmstadt*, Deutschland) bezogen.

8.1.5 Plasmide und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit genutzten Primer (Oligonukleotide) wurden von *Merck (Darmstadt*, Deutschland) erworben und anschließend in *dest*. H₂O gelöst (100 mM Stammlösung). Die genutzten Oligonukleotide und deren Sequenzen sind in **Tabelle 31** zusammengefasst. Synthetische Gene wurden bei GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA) im Vektor pUC57, pET28a(+) oder pET21a(+) bestellt. Eine Übersicht über die genutzten Gene ist in **Tabelle 32** zu finden

Tabe 5′→3′ Orien	lle 31. Übersicht über die ir ' Richtung angegeben. Die tierung der Primer ab.	dieser Arbe Suffixe "_fv	it verwendeten Oligonukleotide. Alle Sequenzen sind v" (<i>engl.</i> forward) und "_rv" (<i>engl.</i> reverse) bilden o	in die
-	Name Oligonukleotid	#	5′→3′-Sequenz	
			A A A A A A A A A A A A A A A A A A A	

Name Oligonukleotid	#	5′→3′-Sequenz
PSC_pET_psmD_T7P_Nde	1	AAGCGGGGTTACCGGTTTGGTTAGCGA
		GAAG
		AGCCAGTAATATACATATGATGCAGGGA
		CAGCCGCACCA
pET_T7P_rev	2	TGCGTCCGGCGTAGAGGATCG
pBR3	3	TCCCCATCGGTGATGTC
	1	
proet-re	4	AIGCIAGHAIIGCICAGC

Plasmid	Genotyp	Herkunft/Referenz
pET28a(+)	<i>lac</i> I, T7 Prom, T7 Term, f1 ori, Kan ^R , pBR322 Ori	Novagen
pET21a(+)	<i>lacl</i> , Amp ^r , T7 promotor, T7 transcription start, T7 terminator, f1 ori. pBR322 ori	Novagen
pET21a(+)- <i>mat_Tk</i>	pET21a(+); <i>Tk</i> MAT (<i>C</i> -His ₆)	diese Arbeit
pET21a(+)- <i>psmD_Sg</i>	pET21a(+);	diese Arbeit
pET21a(+)- <i>psmD_Sa</i>	pET21a(+);	^[296] , diese Arbeit
pET21a(+)- <i>psmC_Sg</i>	pET21a(+);	diese Arbeit
pET28a(+)- <i>hmt_Ct</i>	pET28a(+);	diese Arbeit
pET28a(+)- <i>psmB_Sg</i>	pET28a(+);	L. Winand ^a ; diese Arbeit

Tabelle 32. Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Plasmide.

^a Dr. Lea Winand, Institut für Technische Biologie, AG Nett, TU Dortmund.

8.1.6 Mikroorganismen

Mikroorganismus	Genotyp	Herkunft/Refer enz	Verwendung
E. coli BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3 [lacl lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]K ⁻ 12(λS)	Merck	Genexpression
<i>Ε. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK ⁻ , mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 qvrA96 relA1	Merck	Klonierung
<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3)	F ⁻ ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) dcm gal Tet ^r λ(DE3) endA Hte hsdR(rK ⁻ mK⁺)	Merck	Genexpression
E. coli Δmnt (DE3)	F ⁻ , Δ(araD-araB)567, pfs- 773(del) ΔlacZ4787(:rrnB- 3), λ ⁻ , <i>rph</i> -1, Δ(rhaD- rhaB)568, hsdR514, <i>λ</i> (DE3)	AG Seebeck ^[225]	Genexpression

8.2 Molekularbiologische Methoden

8.2.1 Design von Primern

Für das Design der Oligonukleotide wurde Benchling oder CloneManager verwendet. Die Länge der Primer variierte hierbei anwendungsbezogen, wobei der Schmelzpunkt zwischen 50–60 °C liegen und der GC-Gehalt nicht über 60 % betragen sollte. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes und zur Vorhersage von Sekundärstrukturen wurde Benchling benutzt. Die Primer wurden bei -20 °C gelagert.

8.2.2 PCR Methoden

Zur Amplifizierung von genomischer DNA oder Plasmiden wurden verschiedene Polymerasekettenreaktionstechniken verwendet. Hauptsächlich wurde dabei *Phire Hot Start II* oder *Phusion Hot Start II* verwendet. Alle PCR Reaktionen wurden nach einem Standardprotokoll (**Tabelle 34**) durchgeführt. Dieses wurde, wenn nötig an die jeweils verwendeten Primer sowie Polymerase hinsichtlich der Primerlänge, des GC-Gehalts und anderen beeinflussenden Faktoren angepasst. Die daraus folgenden Änderungen des Standardprotokolls wurden in den jeweiligen PCR Methoden vermerkt. Durch Zugabe von DMSO [1–20 % (*v/v*)] wurde die Schmelztemperatur der Primer gesenkt und erleichterte die Anlagerung der Primer an das Template, was besonders die Amplifikation GC reicher DNA-Abschnitte verbessern sollte.

Komponente	Konzentration	Volumen	Schritt	Temp. [°C]	Zeit	
Template DNA	20–200 ng/µL	1 µL	Initiale	98	30 s ^[a]	
			Denaturierung			
forward Primer	5 μΜ	0.5 µL	Denaturierung	98	10 s	
<i>reverse</i> Primer	5 μΜ	0.5 µL	Anlagerung		30 s	35×
dNTP-Mix	10 mM	0.4 µL	Elongation	72	15 s/kb	
Puffer	5×	4 µL	finale	72	10 min	
			Elongation			
Polymerase		0.1 µL	Lagerung	4	∞	
DMSO		0.2–4 µL				
ad. dest. H ₂ O		20 µL				

Tabelle 34. Allgemeine Zusammensetzung und	Temperaturprogramm	der Standard PCR Ansätze.
--	--------------------	---------------------------

^[a] Die Dauer der initialen Denaturierung wurden von 30 s auf 10 min für die Kolonie-PCR erhöht (8.2.2.1).

8.2.2.1 Kolonie-PCR

Zur Identifizierung positiver Klone nach erfolgter Transformation und Inkubation, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden dabei mit einer sterilen 20–200 µL Pipettenspitze von der Agarplatte abgetragen, auf eine Masterplatte gegeben und anschließend in einem PCR MasterMix (**Tabelle 34**) resuspendiert (Falls nicht selbst hergestellt wurde ein kommerzieller MasterMix verwendet (REDTaq[™], Merck (Darmstadt,

Deutschland)). Die initiale Denaturierung wurde für die Kolonie-PCR auf 10 Minuten erhöht. Das resultierende Ergebnis der Kolonie-PCR wurde *via* Agarosegelelektrophorese analysiert **(8.2.5)**.

8.2.2.2 Test-PCR

Zusätzlich zur Kolonie-PCR wurde die Test-PCR durchgeführt. Mit dieser Methode wurde das Vorhandensein eines *inserts* im Zielplasmid überprüft. Isolierten Plasmide (**8.2.3**) wurden als Template in der Test-PCR, welche unter Standardbedingungen durchgeführt wurde (**Tabelle 34**) eingesetzt, und *via* Agarosegelelektrophorese analysiert (**8.2.5**).

8.2.2.3 Overlap Extension PCR

Die Overlap Extension PCR wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um gezielt kürzere DNA-Abschnitte zu modifizieren. Dazu wurden zur DNA-Sequenz komplementäre Primer designt. Diese binden hinter der Zielstelle und beinhalteten in dieser Arbeit vor der Zielsequenz eine geeignete Restriktionsschnittstelle. Nach erfolgter Standard-PCR (**Tabelle 34**) wurde das veränderte *insert via* Agarosegelelektrophorese gesammelt (**8.2.5**) und eluiert (**8.2.5.1**). Im Anschluss wurde das modifizierte *insert* mit Hilfe von Restriktions-Ligationsklonierung (**8.2.4**) mit dem Zielvektor zusammengefügt.

8.2.3 Isolation von Plasmid DNA

Zur Isolation von Plasmid DNA aus 5–10 mL Zellkultur wurde ein kommerzielles Kit (innuPREP Plasmid Mini Kit, Analytik Jena AG Life Science, Jena, Deutschland) verwendet. Es wurde die Übernachtkultur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde den Herstellerangaben entsprechend behandelt und die Plasmid DNA isoliert. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde mit sterilem *dest.* H₂O eluiert, welches zuvor auf 50 °C erhitzt wurde.

8.2.4 Restriktionsverdau und Ligation

Die hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen, der sogenannte Restriktionsverdau, wurde mit Hilfe von *FastDigest* Restriktionsenzymen (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Zusammensetzung des Restiktionsansatzes wurde den Herstellerangaben entnommen. Eine Inkubationszeit von 10 Minuten war hierbei für den Restriktionsverdau ausreichend.

Die Inaktivierung der Restriktioinsendonukleasen sowie die Reinigung der der DNA-Fragmente erfolgte über sofortige Agarosegelelektrophorese (8.2.5). Sowohl der geschnittene Vektor als auch das PCR Amplifikat wurden vor der Ligation mittels Gelelution gereinigt (8.2.5.1). Die anschließende Ligation wurde mit der T4-DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) unter Standardbedingungen (**Tabelle 35**) durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde entsprechend **Tabelle 35** angesetzt und für 16 h bis maximal 24 h bei 16 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde der Ansatz direkt für die Transformation genutzt.

Bestandteil	Menge
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	2 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
PCR-Amplifikat	(3× Menge Vektor)
geschnittener Vektor	25–100 ng
dest. H ₂ O Vektor	ad. 20 µL

Tabelle 35. Komponenten und Zusammensetzung des Ligationsansatzes.

8.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die hydrolysierten DNA-Fragmente der DNA-Restriktionen sowie PCR Reaktionen wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese getrennt, analysiert und isoliert. Es wurden für diese Analytik 1 %ige (*w*/*v*) Agarosegele mit 0.5x TBE-Puffer verwendet. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose durch Aufkochen wurde anschließend 0.1 ‰ (*v*/*v*) Midori Green[™]Merck (*Darmstadt*, Deutschland) hinzugefügt.

Die zuvor hergestellte Agarose-Lösung wurde bei 60 °C im Dunkeln gelagert. Nach dem Gießen der Lösung ist eine Wartezeit von ca. 30 min notwendig, um die erhitze Lösung auskühlen und aushärten zu lassen. Anschließend wurde das Agarose-Gel in eine mit 0.5x TBE-Puffer befüllte Gelkammer gelegt. Die horizontalen Gelkammern wurden mit Proben beladen, welche zuvor mit DNA-Probenpuffer versetzt wurden. Als Größenstandard wurden 1.5 µL des 1 kb DNA Ladders (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) verwendet.

Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 40 min durchgeführt. Die visuelle Auswertung des Gels erfolgte mit einer Videodokumentationsanlage (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

Lösung	Komponente
10x TBE-Puffer	1.0 M TRIS
	20 mм EDTA (Stocklösung: 0.50 м, pH 8) 0.90 м Borsäure
5x DNA-Probenpuffer	0.10 м EDTA 40 % (<i>v\v</i>) Glycerin
	0.05 % (<i>w</i> / <i>v</i>) Bromophenolblau
Agarosegel	0.5x TBE-Puffer
	1% (w/v) Agarose [oder $2% (w/v)$]
	0.1‰ (<i>v</i> / <i>v</i>) Midori Green™

Tabelle 36. Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.

8.2.5.1 Gelelution aus dem Agarose-Gel

Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese von PCR Produkten, (geschnittenen) Plasmiden oder Primern, wurden die gewünschten Banden aus dem Agarosegel geschnitten. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgte mittels des innuPREP DOUBLEpure Kit (*AnalytikJena* AG, Jena, Deutschland). Abweichend vom Protokoll des Herstellers die DNA mit sterilem, auf 50 °C erwärmten, *dest.* H₂O eluiert

8.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm mithilfe des *NanoDrop2000* Spektralphotometer (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, USA) photometrisch bestimmt.

8.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen der isolierten Plasmide wurden als Auftragsarbeit von der Firma von *Eurofins Scientific* (Luxemburg, Luxemburg) durchgeführt.

8.3 Mikrobiologische Zellkultur

8.3.1 Anzucht und Lagerung von Mikroorganismen

Alle Medien und Geräte, die zum sterilen Arbeiten mit Mikroorganismen benötigt werden, wurden vor Beginn der Arbeiten bei 120 °C und 200 kPa für 20 min autoklaviert oder steril filtriert (Licht- und hitzeempfindliche Komponenten). Für die Herstellung von Festmedien wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1.5% (*w*/*v*) Agarose zugesetzt.

8.3.2 Komplexmedien

Tabelle 37. Komplexmedien und deren Zusammensetzung für die Anzucht von Mikroorganismen.

Medium	Bestandteil	Menge	Verwendung
TB-	Casein-Hydrolysat	12.0 g/L	Anzucht von E. coli
Medium	Hefeextrakt	24.0 g/L	
	K ₂ HPO ₄	12.5 g/L	
	KH₂PO₄	2.3 g/L	
	Glycerin	4.0 mL/L	
LB-	Trypton	10.0 g/L	Anzucht von <i>E. coli</i>
Medium	Hefeextrakt	5.0 g/L	
	NaCl	10.0 g/L	

8.3.3 Stammlösungen zur Kultivierung von Mikroorganismen

Stammlösung	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicillin (Amp, 1000x)	100 mg/mL	dest. H ₂ O
Kanamycin (Kan, 1 000x)	50.0 mg/mL	<i>dest.</i> H ₂ O
Streptomycin (Sm, 1000x)	80.0 mg/mL	<i>dest.</i> H ₂ O
IPTG (1000x)	1.00 м	dest. H ₂ O

Tabelle 38. Antibiotika und andere Stammlösungen.

8.3.4 Allgemeine Bedingungen zur Kultivierung von Mikroorganismen

Agarplatten wurden mit jeweils 50–200 µL Zellkultur von *E. coli* versetzt. Anschließend wurde die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt. Nachdem die Lösung für ca. eine Stunde bei Raumtemperatur eingezogen war, wurden die Platten für 12–16 Stunden bei 37 °C inkubiert. In Ausnahmefällen wurde die Inkubationszeit verlängert oder die Inkubationstemperatur verändert.

Zur Herstellung einer sogenannten Übernachtkultur wurde einer der gewachsenen Klone von der Agarplatte gepickt und in LB- oder TB-Medium, versetz mit entsprechendem Antibiotikum, für 12–16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Volumen der Übernachtkultur wurde jeweils an den folgenden Versuch angepasst, um ausreichend Zellmaterial zu garantieren. Vorranging wurden 5–10 mL Kulturen in Kulturröhrchen oder 25 mL Kulturen in Erlenmeyerkolben mit Schikane inkubiert. Darüber hinaus wurde die Expression der jeweiligen Gene sowie die Kultivierung in *E. coli* in Fernbachkolben durchgeführt. Generell gilt hier, dass maximal 20 % des Volumens mit Medium befüllt wurden. Um das Wachstum einzelner Kolonien zu

verbessern kann die Übernachtkultur bei 30 °C kultiviert oder unter Zugabe von 1 % (w/v) Glucose verwendet werden.

8.3.5 Generelles zur heterologen Expression von Zielenzymen in E. coli

Für die Produktion von Proteinen in *E. coli* wurde eine Übernachtkultur (**8.3.4**) im Verhältnis 1:1000 zu dem Nährmedium gegeben. Das weitere Vorgehen unterscheidet sich von Protein zu Protein und ist im Folgenden für alle in dieser Arbeit genutzten Enzyme einzeln aufgeführt und wurde in dieser Arbeit speziell für die entsprechenden Enzyme entwickelt oder bestehenden Arbeiten nachempfunden.

8.3.5.1 Heterologe Expression der C-Methyltransferase SgPsmD

Für die Expression von *psmD_Sg* wurden 5 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem entsprechend pET21a(+)-*psmD_sg* Plasmid, welche mit 1 % (*w/v*) Glukose und 200 µg/mL Ampicillin versetzt war, bei 10000 *rpm* für 10 Minuten in einem *Falcon-Tube* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde einmal mit TB-Medium, welches mit 1 % (*w/v*) Glukose und 200 µg/mL Ampicillin versetzt war, gewaschen und anschließend in 5 mL desselben Mediums resuspendiert. Diese 5 mL wurden anschließend zu 500 mL TB-Medium, welches mit 1 % (*w/v*) Glukose und 200 µg/mL Ampicillin versetzt war, in einem 5 L Erlenmeyerkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37 °C und 120 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀~0.5 geschüttelt. Die gezielte Proteinexpression wurde durch die Zugabe von 0.5 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 30 °C und 150 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 *rpm* für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

8.3.5.2 Heterologe Expression der N-Methyltransferase SgPsmC

Für die Expression von *psmc_Sg* wurden 5 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem entsprechend pET21a(+)-*psmC_Sg* Plasmid zu 500 mL TB-Medium, welches mit und 200 µg/mL Ampicillin versetzt war, in einem 5 L Erlenmeyerkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37 °C und 120 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀~0.5 geschüttelt. Die Expression wurde mit der Zugabe von 0.1 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 30 °C und 150 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 *rpm* für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

8.3.5.3 Heterologe Expression der Halogenid-Methyltransferase CtHMT

die hmt Ct wurden 5 mL Für Expression von einer Übernachtkultur von E. coli BL21 Amnt (DE3) mit dem entsprechend E. coli BL21 Gold (DE3) oder pET28a(+)-hmt Ct Plasmid zu 500 mL TB-Medium, welches mit und 50 µg/mL Kanamycin versetzt war, in einem 5 L Erlenmeverkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37°C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀~0.5 geschüttelt. Die Expression wurde mit der Zugabe von 0.1 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 30 °C und 150 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Die Anzucht und Expression wurde nach den von Liao et al. beschriebenen Bedingungen durchgeführt.^[225]

8.3.5.4 Heterologe Expression der C-Methyltransferase SaPsmD

Für die Expression von *psmD_Sa* wurden 5 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem entsprechend pET21a(+)-*psmD_sa* Plasmid zu 500 mL TB-Medium, welches mit 1% (*w/v*) Glukose und 200 µg/mL Ampicillin versetzt war, in einem 5 L Erlenmeyerkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37 °C und 120 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀ ~0.5 geschüttelt. Die Expression wurde mit der Zugabe von 0.5 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 37 °C und 150 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 *rpm* für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

8.3.5.5 Heterologe Expression der Methioninadenosyltransferase TkMAT

mat Tk wurden 5 mL einer Übernachtkultur Für die Expression von von E. coli Gold BL21 (DE3) mit dem entsprechend pET21a(+)-mat tk Plasmid zu 500 mL TB-Medium mit 200 µg/mL Ampicillin in einem 5 L Erlenmeyerkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37 °C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀~0.5 geschüttelt. Die Expression wurde mit der Zugabe von 0.2 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 25 °C und 150 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 rpm für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert. Die Anzucht und Expression wurde nach den von Andexer et al. beschriebenen Bedingungen durchgeführt.[225]

8.3.5.6 Heterologe Expression der Amid-Hydrolase SgPsmB

Für die Expression von *pmB_Sg* wurden 5 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* BL21 Gold (DE3) mit dem entsprechend pET28a(+)-*psmb_Sg* Plasmid zu 500 mL TB-Medium, welches mit und 50 µg/mL Kanamycin versetzt war, in einem 5 L Erlenmeyerkolben gegeben. Im Folgenden wurde die Kultur bei 37 °C und 120 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zu einer OD₆₀₀~0.5 geschüttelt. Die Expression wurde mit der Zugabe von 0.1 mM IPTG gestartet und für weitere 12–16 Stunden bei 30 °C und 150 *rpm* (2.5 cm Schütteldurchmesser) geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 *rpm* für 30 min bei 4 °C vom Überstand getrennt und geerntet werden. Das entstandene Zellpellet wurde direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

8.3.6 Herstellung von Glycerinkulturen zur Lagerung Mikroorganismen

Zur langfristigen Lagerung der verschiedenen Mikroorganismen wurden Glycerinkulturen hergestellt, indem 900 μ L einer Übernachtkultur mit 600 μ L einer sterilen 50 % igen Glycerinlösung (50 % Glycerin in *dest.* H₂O) versetzt wurden. Diese Glycerinkultur wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die hier beschriebene Methode beschreibt ein Standardprozedere des Instituts für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und wurde bereits mehrfach beschrieben.^[305, 306]

8.3.7 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen verläuft nach einem IBOC Standardprozedere. Sie wurde von verschiedenen Doktoranden des Instituts durchgeführt, sodass immer Zellen für die Allgemeinheit zur Verfügung standen. Das Protokoll, welches auf der Bocipedia festgehalten wurde, wird im Folgenden beschrieben. Dieses Verfahren wurde für die Herstellung aller chemisch kompetenten *E. coli* Stämme verwendet.

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen werden zunächst benötigte Lösungen (**Tabelle 39**) hergestellt und sterilfiltriert.

Lösung	Bestandteil	Konzentration
Α	MgCl ₂	100 mM
В	CaCl ₂	100 mM
	Glycerin	15% (<i>w/v</i>)

Tabelle 39. Lösungen zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB-Medium in einem 3 L Fernbachkolben mit Schikane mit 2 mL einer zuvor angesetzten Übernachtkultur des entsprechenden Stamms inokuliert. Sofern notwendig, wurden entsprechende Antibiotika als Selektionsmarker mit ins Medium gegeben. Die Kultur wurde bei 37 °C und 120 rpm (2.5 cm Schütteldurchmesser) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4–0.6 kultiviert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (10 min, 4500 rpm, 4 °C), der Überstand wurde verworfen und das zurückbleibende Zellpellet wurde vorsichtig in
10 mL auf Eis vorgekühlter Lösung A resuspendiert. Darauf folgte eine Inkubation 20–30 min des Zellgemischs auf Eis bevor die Zellen ein weiteres Mal für 10 Minuten bei 4500 rpm, 4°C pelletiert wurden. Der Überstand wurde wie zuvor verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in 2 mL der auf Eis vorgekühlter Lösung B resuspendiert und zu je 50 µL in sterile 1.5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Anschließend wurden die neu hergestellten, chemisch kompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff gefrohren und bei -80 °C bis zu ihrer Nutzung gelagert.

Zur Gewährleistung einer gleichbleibenden Qualität und dem Ausschluss von Resistenzen wurde ein Antibiogramm gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Kanamycin, Streptomycin und Tetracyclin erstellt. In LB-Medium wurden aus den zu prüfenden chemisch kompetenten Zellen Übernachtkulturen angesetzt und mit den zuvor benannten Antibiotika versetzt. Bei fehlendem Wachstum der Zellen konnte somit eine Restistenzbildung ausgeschlossen werden und die Zellen konnten verwendet werden.

Zusätzlich wurde mit der Durchführung einer Hitzeschocktransformation (**8.3.8**) die Transformationseffizienz der chemisch kompetenten Zellen bestimmt. Es wurde hierfür der Vektor pET21a(+) sowie als Negativkontrolle steriles *dest*. H₂O verwendet. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen auf LB_{Amp}-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Transformationseffizienz konnte somit durch die Bestimmung der *colony forming units* (CFU) unter Berücksichtigung der Konzentration der Plasmid DNA berechnet werden. Die Negativkontrolle mit *dest*. H₂O statt Plasmid DNA sollte kein Wachstum aufzeigen. Die hier beschriebene Methode beschreibt ein Standardprozedere des Instituts für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und wurde bereits mehrfach beschrieben.^[305, 306]

Transformationseffizenz = $\frac{CFU}{\mu g DNA ausplattiert}$

Formel 1. Berechnung der Transformationseffizienz.

8.3.8 Hitzeschocktransformation chemisch kompetenter Zellen

Die Transformation von chemisch kompetenten Zellen wurde *via* Hitzeschocktransformation durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot der genannten Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut, mit einer bestimmten Menge an Plasmid DNA (50–100 μ g) versetzt und anschließend 20 min bei 4°C inkubiert und aufgetaut. Für die Transformation unter Nutzung von Ligationsansätzen wurde eine geeignete Menge an Probe (meist 10 μ L) verwendet. Die darauffolgende Inkubation für 90 s bei 42 °C wird bei der Methode durch die hohe Temperatur als Hitzeschock bezeichnet. Nach einer Zugabe von 700 μ L LB-Medium zu den Zellen wurde der Transformationsansatz für 1–4 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurde erneut resuspendiert, jedoch dieses Mal in 50 μ L des aufgefangenen Überstands und auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

8.4 Proteinbiochemische Methoden

8.4.1 Zellaufschluss

Für die Freisetzung des im Bakterium enthaltenen Proteins wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Ultraschalllyse verwendet. Dazu wurden zunächst das durch Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde im 3–5-fachen Volumen KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5) resuspendiert und mittels SONOPULS Ultraschall Homogenisator (*Bandelin electronic* GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland; Sonotrode an Probenvolumen angepasst) aufgeschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4 °C und für 2 × 10 min (5× 10 % Zyklus, 35–38 % Leistung). Zusätzlich wurde das resuspendierte Pellet zwischen beiden den Ultraschallzyklen für mindestens 5–10 min auf einem Eis-Wassergemisch bei 4 °C inkubiert.

8.4.2 SDS Page

Proteinproduktion Proteinreinigungen wurden mittels SDS-Polyacrylamid oder Gelelektrophorese (SDS Page) analysiert. Dazu wurden Glycin-SDS-PAGE Gele selbst hergestellt, sowie kommerzielle Protein-Gele [NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) genutzt. Im Falle der Glycin-SDS-PAGE wurde mithilfe des Mini-Protean® Tetra Cell Casting Stand (Bio-Rad Laboratories GmbH. München. Deutschland) zunächst das Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 40) gegossen. Dieses wurde mit 2-Propanol, zur Erzeugung einer gleichmäßigen Oberfläche und zur Vermeidung fon Luftblasenbildung im Gel, überschichtet. Nach erfolgreicher Polymerisation des Trenngels, wurde das 2-Propanol entfernt, das Trenngel mit dem vorbereiteten Sammelgel überschichtet und ein geeigneter Probenkamm mit 10 oder 15 Taschen eingesetzt. Für ein klares Laufverhalten der aufgetragenen Proteinproben wurden diese abhängig von ihrer Konzentration bei Bedarf mit *dest*. H₂O verdünnt und anschließend mit 5× SDS-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 80 °C aufgekocht. Die Gele wurden in die vorgesehene Elektrophoresekammer eingebracht und fixiert, mit dem gewünschten Puffer aufgefüllt und vollständig benetzt und die Taschen mit jeweils 10 µL der Proteinproben befüllt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde zusätzlich 5 µL des Größenstandards Roti®-Mark 10-150 (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Bei der Durchführung einer Glycin-SDS-PAGE wurde eine konstante Spannung von 200 V für 40-50 min angelegt. Bei der Verwendung von NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris Protein-Gelen wurde eine konstante Spannung von 200 V für 45-50 min genutzt. Beim Erreichen der Lauffront am unteren Ende des Gels, wurde die Spannung entfernt und die Elektrophorese gestoppt. Die Gele wurden anschließend mit dest. H₂O gewaschen, für 10 min in Fixierlösung inkubiert und erneut mit dest. H₂O gewaschen. Nach dem Fixieren wurden die Gele in kolloidaler Coomassie G-250 Lösung über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt und das SDS-

Gel in *dest.* H₂O, gegebenenfalls unter der Zugabe von geringen Mengen Ethanol zur Erhöhung des Kontrastes, entfärbt. Die Dokumentation der Gele erfolgte unter Verwendung eines Weißlicht Tischs (*Edvotek Inc.*, Washington, DC, USA) und der digitalen EOS 1000D Spiegelreflexkamera mit einem EF-S 60 mm Objektiv (*Canon Deutschland* GmbH, Krefeld, Deutschland) mit folgenden Einstellungen: ISO 400, Belichtungszeit 1/250 s, Blende F/8.0. Die hier beschriebene Methode beschreibt ein Standardprozedere des Instituts für Bioorganische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und wurde bereits mehrfach beschrieben.^[305, 306]

Tabelle 40. Übersicht über alle für die SDS-PAGE benötigten Lösungen und deren Zusammensetzung.

Lösung	Zusammensetzung
Glycin-SDS-PAGE	
Trenngel (12 %, 4 Gele)	12 mL Trenngelpuffer (0.6 м Tris/HCl, pH 8.8, 0.2 % SDS), 7.9 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %, 37.5: 1; <i>Carl</i> <i>Roth</i>), 100 μL APS [Ammoniumperoxodisulfat; 10 % (<i>w</i> / <i>v</i>)], 100 μL <i>N.N.N'.N'</i> -Tetra-methylethylendiamin (TEMED)
Sammelgel (4.5 %, 4 Gele)	7.0 mL Sammelgelpuffer (0.1 M Tris/HCl, pH 6.8, 1 % SDS), 1.2 mL Acrylamid/Bisacrylamid Lösung (30 %, 37.5: 1; <i>Carl</i> <i>Roth</i>), 100 µL APS [10 % (<i>w</i> / <i>y</i>)], 100 µL TEMED
1× SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS, 0.8 mL Glycerin, 0.1 % (w/v) SDS
NuPAGE™ 4–12 % Bis- Tris Protein Gele	
20× MOPS-Puffer (NuPAGE™ 4–12% Bis- Tris Protein Gele)	50 mм MOPS, 50 mм TRIS, 0.1 % SDS, 1 mм EDTA, pH 7.7
Generelle Lösungen	
5× SDS-Ladepuffer	10 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 0.5 м Tris/HCl, pH 6.8, 50 mм DTT
Kolloidale Coomassie G-250 Lösung	2 % (w/v) H ₃ PO ₄ , 10 % (v/v) Ethanol, 5 % (w/v) Al ₂ (SO ₄) ₃ , 0.02 % (w/v) Coomassie Brilliant blue G-250

8.4.3 Proteinreinigung mit Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)

Alle zu reinigenden Proteine wurden mit einem *N*- oder *C*-terminalen His₆-Tag produziert und mittels IMAC isoliert. Dafür wurde das Zielprotein in *E. coli* BL21 Gold (DE3) produziert. Vom Zellpellet wurde 1 g in 5 mL KP_I-Puffer (50 mM, pH 7.5) mittels Ultraschalls aufgeschlossen (**8.4.1**). Das Lysat wurde zentrifugiert (20 min, 6000 *rpm*, 4 °C) und der Überstand für die anschließende Proteinisolation aufgefangen. Für die Proteinisolation wurde eine 5 mL Nickel(II)-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA) Säule (*Superflow Cartridge*, *Qiagen* GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt und mit 5 Säulenvolumina Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Die Säule wurde beladen, indem das Lysat für 20 min mithilfe einer Peristaltikpumpe zirkulierend über die Säule gepumpt wurde und so das Binden des Zielproteins an die Säulenmatrix *via* His₆-Tag

ermöglicht wurde. Nach dem Beladen der Säule wurde mit 3 Säulenvolumina Waschpuffer gespült, um nicht bindendes Protein von der Säule zu entfernen. Anschließend wurde das Zielprotein mit dem Elutionspuffer mit Hilfe einer hohen Konzentration von Imidazol von der Säule verdrängt und gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 3 Säulenvolumina Spülpuffer gereinigt und in 20 %er Ethanol Lösung gelagert.

Puffer	Bestandteile	pH-Wert
Äquilibierungspuffer	100 mм КР _і , 150 mм NaCl,	7.5
	20 mм Imidazol	
Waschpuffer	100 mм КР _і , 150 mм NaCl,	7.5
	100 mм Imidazol	
Elutionspuffer	100 mм КР _і , 150 mм NaCl,	7.5
	250 mм Imidazol	
Spülpuffer	50 mм КР _і , 150 mм NaCl, 1 м	7.5
	Imidazol	

 Tabelle 41. Für die Proteinisolation via IMAC genutzte Puffer und deren Bestandteile.

8.4.4 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Nach der Isolation des Zielproteins mittels IMAC, wurden die proteinhaltigen Fraktionen der gleichen Proteine vereint und unter Nutzung von *Vivaspin*® 20 Zentrifugalkonzentratoren (*Sartorius* AG, Göttingen, Germany) mit einem *molecular weight cut-off* von 10 kDa konzentriert. Die Proteinfraktionen wurden in die Zentrifugalkonzentratoren gegeben und bis zum gewünschten Zielvolumen zentrifugiert (4000 *rpm*, 4 °C). Zum Entfernen des aus der Proteinreinigung übrig gebliebenen Imidazols wurde je 3x 20 mL KP_I-Puffer (100 mM, pH 7.5) zugegeben. Nach diesem Prozess wurde die Proteinkonzentration der Proben mit der Berücksichtigung der spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmt. Hierfür wurde das Photometers *NanoDrop 2000c* verwendet. Die Proteinproben wurden anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

8.5 Durchführung der verschiedenen Biokatalyse Ansätze und Assays

8.5.1 Genereller Ablauf des PsmD in vitro assay

Zur Überprüfung der generellen Aktivität von PsmD Lysat und gereinigtem PsmD-Enzym wurde zunächst die natürliche Reaktion *in vitro* wie in **Schema 1** dargestellt nachempfunden und mit Hilfe der LC-MS nachgewiesen. Die Substrate für die Reaktion wurden zuvor wie unter **8.7.2** beschrieben hergestellt. Mit derselben Methodik wurde im Laufe der Arbeit auch das Substratspektrum untersucht und nachgewiesen.



Schema 1. Reaktionsschema des in vitro Assays für PsmD am Beispiel der natürlichen Reaktion. Durchgeführt wurde der in vitro Assay in 2.0 mL Reaktionsgefäßen und die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss *via* LC-MS Messungen nachgewiesen. Der in vitro Assay wurde auch mit Leervektorproben als Negativkontrolle durchgeführt. Die Expression von *psmD*, der Zellaufschluss und die Proteinreinigung wurden wie in 8.3.5.1, 8.4.1 und 8.4.3 beschrieben durchgeführt. Die Substrate für die Reaktion wurden wie unter 8.7.2 beschrieben hergestellt.

_		,	
	-	 _	

Bestandteil	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Substrat 4a	100 mм in DMSO	1 mM	10 µL
SAM	20 mм SAM 2HCl in KPipH 7.5	2 mM	100 µL
SgPsmD	10 μg/μL	5 μΜ	15 µL
Puffer	КР _і рН 7.5, 100 mм		875 µL
	-	Gesamtvolumen	1000 µL

In ein 2.0 mL Reaktionsgefäß wurden 860 μ L KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5) gegeben und mit 10 μ L der Substrat-Lösung (**4a**, 100 mM in DMSO) und 100 μ L der entsprechenden SAM-Lösung (20 mM in KP_i 100 mM, pH 7.5) versetzt. Durch Zugabe von 15 μ L PsmD (10 μ g/ μ L in KP_i 100 mM, pH 7.5) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 16 h bei 35 °C und 800 *rpm* geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 3x500 μ L Ethylacetat gestoppt. Die organische Phase wurde jeweils abgenommen und in ein neues 2.0 mL Reaktionsgefäß überführt, vereinigt und mit Hilfe der SpeedVac (40 °C, ca. 10-20 mbar, 1000 *rpm*) ein rotiert. Proben für nachfolgende LC-MS Messungen wurden anschließend zur Zielkonzentration durch Zugabe von Methanol (HPLC-rein) verdünnt.

8.5.2 Implementierung des CtHMT-SAM-Recycling im SgPsmD gekoppelten Ansatz

Im Folgenden wurde ein SAM Recyclingsystem für die Methyltransferase abhängigen Reaktionen etabliert. Für das Recycling wurde *Ct*HMT in einem Nukleosidase defizienten *E. coli* DE3 Stamm (Δnmt) wie unter **8.3.5.3** beschrieben produziert, durch Zellaufschluss wie in **8.4.3** lysiert und als solches direkt verwendet und die Reaktion wie in **Schema 2** dargestellt durchgeführt. Die Substrate für die Reaktion wurden wie unter **8.7.2** beschrieben hergestellt.



Schema 2. Reaktionsschema des *in vitro* Assay für SAM Recycling im gekoppelten Ansatz mit PsmD am Beispiel der natürlichen Reaktion.

In einem 2.0 mL Reaktionsgefäß wurden 465 μ L KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5) vorgelegt und mit 10 μ L der Substrat-Lösung (**4a**, 100 mM in DMSO), 10 μ L der Methyliodid-Lösung (500 mM in DMSO) und 500 μ L der entsprechenden *Ct*HMT Lysat-Lösung (in KP_i 100 mM, pH 7.5) versetzt. Durch Zugabe von 15 μ L PsmD (10 μ g/ μ L in KP_i 100 mM, pH 7.5) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 16 h bei 35 °C bei 800 rpm geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 3x500 μ L Ethylacetat gestoppt. Die organische Phase wurde jeweils abgenommen und in ein neues 2.0 mL Reaktionsgefäß überführt, vereinigt und mit Hilfe der SpeedVac (40 °C, ca. 10–20 mbar, 1000 *rpm*) ein rotiert. Proben für nachfolgende LC-MS Messungen wurden anschließend zur Zielkonzentration durch Zugabe von Methanol (HPLC-rein) verdünnt. Für die chirale HPLC Analytik wurden die Proben 200 μ L Isopropanol (HPLC-rein) gelöst und anschließend mit 800 μ L Heptan (HPLC-rein) verdünnt.

8.5.3 Optimierung der CtHMT gekoppelten SgPsmD-Reaktion

Die Experimente für die statistische Versuchsplanung zur Optimierung der gekoppelten *Sg*PsmD wurden mit der Software *Design Expert* (*StatEase, Inc.*) durchgeführt. Insgesamt wurden systematisch acht verschiedene Parameter für die Reaktion untersucht. Dafür wurde ein *factorial design* verwendet. Die Proben wurden behandelt wie unter **8.5.2** beschrieben. Die Analyse der Proben in diesem Fall mit Hilfe der HPLC Analytik an chiraler stationärer Phase durchgeführt und die Proben wie unter **8.5.2** hergestellt und verarbeitet. Als Beispielreaktion wurde, wie unter **8.5.2** beschrieben, die natürliche *Sg*PsmD-Reaktion genutzt. Ziel war es hier die maximale Umsetzung des Substrats zum Produkt bei gleichzeitig minimalem Einsatz von Enzym und anderen Komponenten zu erhalten. Die Substratkonzentration wurde nicht verändert und lag immer bei 1 mM. Die Versuche wurden randomisiert, sowie von der Software

vorgegeben pipettiert. Eine detaillierte Aufstellung über die getesteten Parameter findet sich im **Tabelle A2**.

8.5.4 Genereller Ablauf des PsmC in vitro Assays

Zur Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums von *Sg*PsmC wurde ein in vitro Assay wie in **Schema 3** dargestellt verwendet.



Schema 3. Reaktionsschema für das SgPsmC in vitro Assay.

Durchgeführt wurde der *in vitro* Assay in 2.0 mL Reaktionsgefäßen und die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss *via* GC-MS Messungen nachgewiesen. Der *in vitro* Assay wurde auch mit Leervektorproben als Negativkontrolle durchgeführt. Die Expression von *psmC_Sg*, der Zellaufschluss und die Proteinreinigung wurden wie in **8.3.5.2**, **8.4.1** und **8.4.3** beschrieben durchgeführt.

Tabelle 43.	Übersicht über	r die Bestano	dteile des in	vitro Assav	/s für PsmC.
	0.001010111 0.0001				

Bestandteil	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Substrat 88a	100 mм in DMSO	1 mM	10 µL
SAM	20 mM SAM 2HCl in KPipH 7.5	2 mM	100 µL
SgPsmC	10 µg/µL	20 µм	50 µL
Puffer	КР _і рН 7.5, 100 mм		860 µL
		Gesamtvolumen	1000 µL

In ein 2.0 mL Reaktionsgefäß wurden 860 μ L KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5) gegeben und mit 10 μ L der Substrat-Lösung (**88a**, 100 mM in DMSO) und 100 μ L der entsprechenden SAM-Lösung (20 mM in KP_i 100 mM, pH 7.5) versetzt. Durch Zugabe von 50 μ L PsmC (10 μ g/ μ L in KP_i 100 mM, pH 7.5) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 16 h bei 35 °C bei 800 *rpm* geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 3x500 μ L Ethylacetat gestoppt. Die organische Phase wurde jeweils abgenommen und in ein neues 2.0 mL Reaktionsgefäß überführt, vereinigt und mit Hilfe der SpeedVac (30 °C, ca. 10-20 mbar, 1000 *rpm*) ein rotiert. Proben für nachfolgende GC-MS Messungen wurden anschließend zur Zielkonzentration durch Zugabe von Ethylacetat (HPLC-rein) verdünnt.

8.5.5 Kinetische Racematspaltung mit SgPsmC

Zur Bestimmung der Umsetzung mit gereinigtem *Sg*PsmC-Enzym wurden artifizielle, chemisch einfach zugängliche racemische Substrate (*rac*-86b) wie in **Schema 4** dargestellt genutzt. Die Synthese des Substrats **rac-86b** erfolgte wie unter **8.7.2.4** beschrieben.



Schema 4. Reaktionsschema für die kinetische Racematspaltung mit *Sg*PsmC. Durchgeführt wurde der in vitro Assay in 2.0 mL Reaktionsgefäßen und die Reaktionsprodukte wurden im Anschluss *via* HPLC Messungen an chiraler stationärer Phase nachgewiesen. Die Expression *SgpsmC*, der Zellaufschluss und die Proteinreinigung wurden wie in 8.3.5.2, 8.4.1 und 8.4.3 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 44.	Übersicht über	die Bestandteile	des in vitro Ass	avs für PsmD
1 000110 44.		ale Destanatone	000 111 110 1 100	ayo lar i ollib

Bestandteil	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Substrat rac-86b	100 mм in DMSO	1 mM	10 µL
SAM	20 mм SAM [,] 2HCl in KP _i pH 7.5	2 mM	100 µL
SgPsmC	10 μg/μL	20 µM	50 µL
Puffer	KP _i pH 7.5, 100 mM		840 µL
	•	Gesamtvolumen	1000 µL

In ein 2.0 mL Reaktionsgefäß wurden 840 μ L KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5) gegeben und mit 10 μ L der Substrat-Lösung (*rac-86b*, 100 mM in DMSO) und 100 μ L der entsprechenden SAM-Lösung (20 mM in KP_i 100 mM, pH 7.5) versetzt. Durch Zugabe von 50 μ L *Sg*PsmC (10 μ g/ μ L in KP_i 100 mM, pH 7.5) wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz für 16 h bei 40 °C bei 800 *rpm* geschüttelt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von 3x500 μ L Ethylacetat gestoppt. Die organische Phase wurde jeweils abgenommen und in ein neues 2.0 mL Reaktionsgefäß überführt, vereinigt und mit Hilfe der SpeedVac (40 °C, ca. 10–20 mbar, 1000 rpm) ein rotiert. Proben für nachfolgende chirale HPLC Messungen wurden anschließend zur Zielkonzentration durch Zugabe von 100 μ L Isopropanol (HPLC-rein) und 900 μ L Heptan (HPLC-rein) verdünnt.

8.5.6 Bestimmung der Aktivität von CtHMT Lysat

Zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität von *Ct*HMT-Lysat wurde ein *in vitro* Assay verwendet wie **Schema 5** dargestellt durchgeführt.



Schema 5. Reaktionsschema zur Bestimmung der volumetrischen Aktivität von *Ct*HMT Lysat. In einem 2.0 mL Reaktionsgefäß wurden 480 μ L KP_i-Puffer (100 mM, pH 7.5) vorgelegt und mit 10 μ L der SAH-Lösung (100 mM in DMSO), 10 μ L der Methyliodid-Lösung (500 mM in DMSO) und 500 μ L der entsprechenden *Ct*HMT Lysat-Lösung (in KP_i 100 mM, pH 7.5) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 35 °C und 800 *rpm* geschüttelt und zu jeweils 5 Zeitpunkten eine Probe (200 μ L) entnommen. Die entnommenen Proben wurde mit 25 μ L TFA (0.5 % TFA in *dest*. H₂O) versetzt und die Reaktion damit abgestoppt und anschließend wurde die Proben durch Zentrifugation bei 10000 *rpm* für 5 min bei RT von ausgefallenem Protein befreit und direkt mit der RP-LC vermessen. Das Assay wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.^[307]

8.5.7 Mtase[™]-Glo Assay: Kalibrierung mit SAH

Zur Bestimmung der Aktivität von Methyltransferasen wurde in dieser Arbeit das sogenannte MtaseTM-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) verwendet.^[308]



Schema 6. Beispielhafte Darstellung des MtaseTM-Glo Assay zur Bestimmung der spezifischen Aktivität verschiedener Methyltransferasen. Adaptiert und verändert nach Hsiao *et al.*^[308]

Um über die Verbrauchte Menge an SAM und der damit verbundenen Freisetzung von SAH die Aktivität von Enzymen bestimmen zu können, wurde zuerst eine SAH Kalibriergerade aufgenommen. Dies wurde durchgeführt, wie vom Hersteller beschrieben. Aus einem kommerziellen SAH Stock (15 µM, im Assay Paket enthalten) wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Dazu wurden in die Vertiefung einer weißen Mikrotiterplatte 75 µL 1x Mtase-Puffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mg/mL BSA), vorgelegt (A2-A12). Anschließend wurde A1 mit 150 uL 10 uM SAH-Stammlösung versetzt. In einer zweifach Verdünnungsreihe wurden nun jeweils 75 µL aus der jeweils vorhergehenden Vertiefung in das nächste überführt und sorgfältig durchmischt. Aus A11 wurden abschließend 75 µL verworfen, A12 diente als Negativkontrolle. Im Anschluss wurde die Lösung mit 5 µL TFA (0.5 % ige Lösung in *dest.* H_2O) versetzt gefolgt von der Zugabe von 5 µL 5x Reaktionslösung und 30 min Inkubation. Abschließend wurden 25 µL der Detektionslösung hinzugefügt und nach weiteren 30 min Inkubationszeit die Gesamtlumineszenz in einem Platereader (Infinit Pro, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Durch lineare Regression konnte eine Kalibriergerade erstellt werden, welche in der Folge zur Bestimmung der entstandenen SAH-Konzentration benutzt wurde (Abbildung A).

8.5.8 Mtase[™]-Glo Assay: Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration

Vor Beginn der Aktivitätsmessung wurde für jedes der getesteten Enzyme ein geeigneter Konzentrationsrahmen festgelegt. Es sei hier generell noch angemerkt, dass die benötigte Enzymmenge auch von dem zu testenden Substrat abhängt und gegebenenfalls angepasst werden muss.

Der allgemein zu testende Enzymbereich lag zwischen 0.01 und 10 μ g Enzym pro Reaktion. Für jedes Enzym wurden 5–10 Verdünnungen getestet und in Triplikaten vermessen. In jede Vertiefung wurden 10 μ L der entsprechenden Enzymverdünnung vorgelegt. Um die Reaktion zu starten, wurden 10 μ L 2x Reaktionslösung (100 μ M SAM, 100 μ M MT Substrat), 4x Mtase-Puffer (100 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 0.4 mg/mL BSA) und *dest.* H₂O) dazu gegeben und bei 25–40 °C (je nach verwendetem Enzym) für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung mit 5 μ L TFA (0.5 % ige Lösung in *dest.* H₂O) versetzt, gefolgt von der Zugabe von 5 μ L 5x Reaktionslösung und 30 min Inkubation. Abschließend wurden 25 μ L der Detektionslösung hinzugefügt und nach weiteren 30 min Inkubationszeit die Gesamtlumineszenz in einem Platereader (Infinit Pro, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt.

8.5.9 Mtase[™]-Glo Assay: Bestimmung der kinetischen Parameter

Um die kinetischen Parameter einer Methyltransferase zu bestimmen, wurde generell das Protokoll des Herstellers zur Bestimmung des K_{M} benutzt. Wie in **8.5.8** beschrieben, wurde zunächst die optimale Enzymkonzentration für die zu testende Reaktion bestimmt.

8. Experimenteller Teil

Anschließend wurden 8–11 verschiedene 2x Reaktionslösungen (100 μM SAM, 0.1–200 μM MT Substrat, 4x Mtase-Puffe (100 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 4 mM DTT, 0.4 mg/mL BSA) und *dest*. H₂O) hergestellt.

Tabelle 45.	Übersicht übe	r die	Bestandteile	des	Mtase [™] -Glo	Assay	(Promega,	Fitchberg,	USA)	zur
Bestimmung	g der kinetische	en Pa	rameter.					-	,	

Bestandteil	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Reaktionslösung	2x (0.2–400 µм)	0.1–200 µм	10 µL
Enzym	2x (0.1 µg/µL)ª	0.05 µg/µL	10 µL
TFA in dest. H ₂ O	0.5 %	0.1 %	5 µL
Reagenz	5x	1x	5 µL
Detektionslösung	—	—	25 µL
		Gesamtvolumen	55 µL

^aDie hier genannte Enzymkonzentration ist exemplarisch und gilt nur für die Bestimmung der kinetischen Parameter von PsmD. Für alle weiteren Methyltransferasen weicht der angegebene Wert gegebenenfalls ab.

In jede Vertiefung wurden 10 µL der Enzymlösung (0.1 µg/µL) vorgelegt. Um die Reaktion zu starten, wurden 10 µL 2x Reaktionslösung (100 µM SAM, 0.2–400 µM MT Substrat, 4x Mtase-Puffer (100 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 0.4 mg/mL BSA) und *dest*. H₂O dazu gegeben und bei 35–40 °C (je nach verwendetem Enzym) für 7 min inkubiert. Nach 3, 5 und 7 min wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe von 5 µL TFA (0.5 %ige Lösung in *dest*. H₂O) gestoppt, gefolgt von der Zugabe von 5 µL 5x Reaktionslösung und 30 min Inkubation. Abschließend wurden 25 µL der Detektionslösung hinzugefügt und nach weiteren 30 min Inkubationszeit die Gesamtlumineszenz in einem Platereader (Infinit Pro, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Über die drei Werte wurde durch lineare Regression eine Gerade gelegt und die Steigung (Änderung der SAH-Konzentration über die Zeit) für jede der getesteten Substratkonzentrationen bestimmt und gegen die getestete Substratkonzentration aufgetragen. Die weitere Datenevaluierung wurde ebenfalls mit der *Origin* Software durchgeführt, mithilfe nicht-linearer Regression und der *Michaelis-Menten*-Kinetik. Alle Experimente wurden mindestens als Triplikat durchgeführt und sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_{M} + [S]}$$

Formel 2. Modell einer *Michaelis-Menten*-Kinetik (v = Reaktionsgeschwindigkeit, v_{max} = maximale Rea ktionsgeschwindigkeit, S = Substratkonzentration, K_M = Michaeliskonstante).

8.5.10 Mtase[™]-Glo Assay: Bestimmung der spezifischen Aktivität von MTs

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von verschiedenen Methyltransferasen mit Hilfe des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) wurde wie unter **8.5.8** beschrieben die passende Enzymkonzentration bestimmt. Für die Aktivitätsmessung wurde im Sättingungsbereich (V_{max}) der MT gemessen, welcher zuvor wie unter **8.5.9** beschrieben über die kinetischen Parameter bereits bestimmt wurde. Für jede neu gereinigte Enzym Charge

wurde die Aktivität zu Beginn bestimmt und das Enzym basierend darauf eingesetzt. Um die spezifische Aktivität zu bestimmen, wurden jeweils fünf verschiedene Zeitpunkte innerhalb von 0–10 min gewählt.

Tabelle 46. Übersicht über die Bestandteile des Mtase[™]-Glo Assay (*Promega*, Fitchberg, USA) zur Bestimmung der Enzymaktivität.

Bestandteil	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Reaktionslösung	2х (100 µм)	50 µм	10 µL
Enzym	2x (0.1 μg/μL)ª	0.05 µg/µL	10 µL
TFA in dest. H ₂ O	0.5 %	0.1 %	5 µL
Reagenz	5x	1x	5 µL
Detektionslösung	—	—	25 µL
		Gesamtvolumen	55 µL

^aDie hier genannte Enzymkonzentration ist exemplarisch und gilt nur für die Bestimmung der kinetische Parameter von PsmD. Für alle weiteren Methyltransferasen weicht der angegebene Wert gegebenenfalls ab.

In jede Vertiefung wurden 10 µL der Enzymlösung (0.1 µg/µL) vorgelegt. Um die Reaktion zu starten wurden 10 µL 2x Reaktionslösung (100 µM SAM, 100 µM MT Substrat, 4x Mtase-Puffer (100 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 4 mM EDTA, 4 mM DTT, 0.4 mg/mL BSA) und *dest.* H₂O dazu gegeben und bei 35 °C (je nach verwendetem Enzym) für 10 min inkubiert. Nach 1, 2.5, 5, 7.5 und 10 min wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe von 5 µL TFA (0.5 %ige Lösung in *dest.* H₂O) gestoppt, gefolgt von der Zugabe von 5 µL 5x Reaktionslösung und 30 min Inkubation. Abschließend wurden 25 µL der Detektionslösung hinzugefügt und nach weiteren 30 min Inkubationszeit die Gesamtlumineszenz in einem Platereader (Infinit Pro, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Über die ermittelten Werte wurde über lineare Regression eine Gerade ermittelt und die Steigung (Änderung der SAH Konzentration über die Zeit) bestimmt. Alle Experimente wurden mindestens als Triplikat durchgeführt und sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

8.5.11 Ellmanns Assay zur Bestimmung der IC₅₀-Werte von AChE und BChE Inhibitoren

Um die inhibitorische Aktivität von verschiedenen Substraten gegen die Acetylcholinesterase (Electrophorus electricus, *Merck*) und Butyrylcholinesterase (Pferdeserum, *Merck*) wurde das sogenannte Ellmanns Assay verwendet.



Schema 7. Vereinfachte Darstellung des Ellmanns Assay. Verschiedene Substrate (**Inhibitor**) und deren Effekt auf die Enzymaktivität der Acetylcholinesterase und Butyrylcholinesterase wurden hier untersucht.

Rivastigmin (*TCI* Deutschland GmbH, Eschborn, Germany) und Physostigmin (*EDQM*, Strasbourg, France) wurden als bekannte Inhibitoren als Referenzsubstanzen verwendet. Alle getesteten Substrate wurden entweder von einem kommerziellen Partner bezogen, von MolPort erworben oder innerhalb dieser Arbeit synthetisiert. Sofern es sich um kommerzielle Substrate handelt die in Verpackungsgrößen < 5 mg bezogen wurden, wurden diese direkt in DMSO zu einer 125 mM Stammlösung gelöst. Alle anderen Substanzen wurden eingewogen und entsprechend der Wage zu einer 125 mM Stammlösung mit DMSO versetzt. Alle weiteren Verdünnungsschritte wurden in der Folge mit KP_i pH 8 durchgeführt. Es wurden jeweils vierfach Verdünnungen in einer 96-MWP hergestellt, bis insgesamt 12 verschiedene Verdünnungen erreicht waren. Damit wurde ein Konzentrationsbereich von 31 mM bis 8 nM abgebildet. Jede Konzentration wurde mindestens als Triplikat gemessen und ist als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

 Tabelle 47. Übersicht über die Bestandteile des Ellmanns Assay zur Bestimmung der inhibitorischen

 Aktivität verschiedener Substrate

Bestandteil	Stammlösung	Volumen
DNTB Lösung	1.5 mм in KP₁pH 8	162 µL
Inhibitor	125 mм–8 nм in KP _i pH 8	8 µL
AChE ^a oder BChE ^b	0.5–5 U/mL	50 µL
Reaktionslösung	15 mM in KPi pH 8	30 µL
	•	250 µL

^a 0.5 U/mL gelöst in 100 mM KPi pH 8, Aktivität laut Herstellerangaben ^b 5 U/mL gelöst in 100 mM KPi pH 8, Aktivität laut Herstellerangaben

In einer 96-MWP wurden zu 162 µL einer DNTB Stammlösung (1.5 mM in KP_i pH 8, 100 mM) je 8 µL einer Substrat Verdünnung (125 mM–7 nM in KP_i pH 8, 100 mM) zugegeben. Die positive Kontrolle, die zur Normierung der Enzymaktivität verwendet wurde, enthielt nur DMSO mit KP_i pH 8. 50 µL der Enzymlösung (0.5 U/mL gelöst in 100 mM KP_i pH 8, 100 mM für die AChE und 5 U/mL gelöst in pH 8, 100 mM für die BChE) wurden dazu gegeben, bis auf die negative Kontrolle, gefolgt von 10 min Inkubation bei RT. Abschließend wurden 30 µL der Reaktionslösung (Acetylcholineiodid oder Butyrlylcholineiodid, 15 mM in KP_i pH 8, 100 mM) zugegeben. Mit Zugabe der Reaktionslösung startet die Enzymreaktion. Nach 5 sec schütteln wurde die Absorption bei 410 nm über 5 min alle 30 sec in einem Platereader (Infinit Pro, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) gemessen. Das Inhibitionsprofil der Substanzen wurde als IC₅₀-Wert angegeben, welcher durch Graphische Auswertung der Auftragung der logarithmischen Konzentration gegen die relative Aktivität über eine Substrat-Wirkungskurve ermittelt wurde.

8.5.12 Durchführung der in silico Experimente

Die in dieser Arbeit gezeigten *in silico* Untersuchungen wurden selbst oder von Dr. David Benoit (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt und sind entsprechend gekennzeichnet.

Alle ausgewählten Liganden wurden mit dem LigPrep-Modul der Maestro-Software (Schrödinger Release 2020-2: *Schrödinger*, LLC, New York, USA, 2020) einem 3-D*conformational sampling* unterzogen. Vor dem *docking* wurden alle Proteine mit Hilfe des Maestro Wizard (Schrödinger Release 2020-2: *Schrödinger*, LLC, New York, USA, 2020) Moduls vorbereitet.^[267, 309] Die resultierenden Konformere wurden anschließend mit dem Glide-Modul (Schrödinger Release 2020-2: *Schrödinger*, LLC, New York, USA, 2020) an die Substratbindungsstelle des zu untersuchenden molekularen Zielstrukturen modelliert, wobei die flexible Standard-Präzision (SP)-Methode genutzt wurde.^[310, 311] Alternativ wurde AutoDock (Version 3.0.5, *The Scripps Research Institute*, CA, USA) unter Berücksichtigung der *DrugScore PAIR2018 scoring function* eingesetzt.^[266] Das hier beschriebene Vorgehen wurde von Dr. Benoit David durchgeführt (IBG-4, Forschungszentrum Jülich).

Der *docking score* ist eine Annäherung an die freie Bindungsenergie des Liganden und steht eigentlich in Beziehung zum K_i (oder K_d) dieses spezifischen Liganden in Bezug auf seinen Rezeptor. Unter experimentellen Bedingungen wird natürlich ein molekulares Gleichgewicht angenommen, was zu der Beziehung führt, die die freie Bindungsenergie (deltaG) mit dem Ki (oder Kd) verbindet: deltaG = -RT.ln(K_i)D [kcal/mol] Zusätzlich wurde jeder *docking score* auf den clogP-Wert normalisiert, um den unterschied der Liganden hinsichtlich Ihrer Hydrophobizität und dessen Einfluss auf die Liganden-Rezeptor Bindung abzubilden.^[312] Das hier beschriebene Vorgehen wurde von Dr. Benoit David durchgeführt (IBG-4, Forschungszentrum Jülich) und die Daten zur weiteren Verarbeitung und Visulisierung übergeben.

Der *docking score* wurde als solcher direkt angegeben oder durch Subtraktion eines Schwellenwerts (*engl. thereshold*) als relativer *docking score* vermerkt.

Zur *in silico* Bestimmung der ADME-Parameter wurden alle ausgewählten Liganden wurden mit dem LigPrep-Modul der Maestro-Software (Schrödinger Release 2020-2: *Schrödinger*, LLC, New York, USA, 2020) einem 3-D-*conformational sampling* unterzogen mit Hilfe des Maestro Wizard (Schrödinger Release 2020-2: *Schrödinger*, LLC, New York, USA, 2020) Moduls vorbereitet. ^[267, 309] Anschließend wurden die pharmakokinetischen Parameter *in silico* mittels QikProp (integrierte Schrödinger Anwendung) analysiert.^[309]

8.6 Synthesevorschriften

8.6.1 Allgemeine chemische Methoden

8.6.1.1 Lösungsmittel

Petrolether (PE), Essigsäurethylester (EtOAc) und Dichlormethan (DCM) wurden vor Gebrauch mithilfe von Rotationsverdampfern destilliert. Alle anderen Lösungsmittel wurden ohne weitere Reinigung wie bestellt verwendet. Die absoluten Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF) und Dichlormethan wurden durch eine Lösungsmitteltrocknungsanlage (MB-SPS-800; *M. Braun Inertgas-Systeme* GmbH, Garching, Deutschland) bereitgestellt und für wasserfreie Reaktionen verwendet. Bei Analysen mittels GC-MS, NMR, IR, LC-MS und HR-MS wurden nur Lösungsmittel mit der geforderten Reinheit (engl. *grade*) verwendet.

8.6.1.2 Allgemeine Durchführung von Reaktionen

Falls nicht gesondert angemerkt, wurden alle Reaktionen unter inerten Bedingungen in zuvor ausgeheizten Glasgeräten unter Schutzgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) durchgeführt. Die Glaswaren wurden über Nacht im Trockenschrank (120 °C) ausgeheizt und bei Arbeiten unter *Schlenk*-Bedingungen zusätzlich mit einem Heißluftgebläse erhitzt. Inerte Reaktionen wurden in *Schlenk*-Kolben und unter Nutzung der *Schlenk*-Technik durchgeführt.

8.6.1.3 Allgemeine Durchführung von Reaktionskontrollen

Reaktionskontrollen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) unter Verwendung von DC-Folien mit Kieselgel 60 genutzt. Verbindungen wurden durch UV-Licht und/oder durch Anfärben mit KMnO₄ Lösung [1.5 g KMnO₄, 10 g K₂CO₃, 1.25 mL 10 % (*v*/*v*) NaOH, 200 mL H₂O] oder *Moly-Dip* (Cerium Ammonium Molybdän Lösung) [12.5 g H₃[PMo₁₂O₄₀, 5 g Ce (SO₄)₂, 30 mL konz. H₂(SO₄)₂, 470 mL H₂O] Lösung sichtbar gemacht. Nach Anfärben der DC-Folien wurden diese anschließend unter Nutzung eines Heißluftgebläses entwickelt.

8.6.1.4 Säulenchromatographie

Für die präparative Säulenchromatographie wurden Glassäulen gefüllt mit Kieselgel 60 genutzt. Die Elution der Verbindungen erfolgte mit verschiedenen Lösungsmittelgemischen. Zur Verbesserung der Trennung sehr polarer Substanzen wurde 1 % NH₃ (25 % kommerzielle Stammlösung) zu dem Methanol/Dichlormethan Gemisch hinzugefügt. Alle anderen Lösungsmittel wurden wie unter **9.7.1.1** beschrieben gereinigt und direkt verwendet.

8.6.1.5 GC (Gaschromatographie)-MS Messungen

GC (Gaschromatographie)-MS Messungen wurden mit einem Trace 1310 Gaschromatographen (*Thermo* Fisher *Scientific*, Waltham, MA, USA) gekoppelt

mit einem *I* Q[™] QD Single Quadrupole Massenspektrometer (*Thermo* Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Temperaturen des Injektors und des Detektors lagen konstant bei 250 °C bzw. 230 °C. Als Trägergas wurde Helium verwendet. Zur chromatographischen Trennung war der Gaschromatograph mit einer Optima 5MS Säule (30 m × 0.25 mm, 0.25 µM; *Macherey-Nagel*, Düren, Deutschland) ausgestattet. Das folgende Temperaturprogramm wurde verwendet: 1 min, 60 °C; 60–185 °C (15 °C/min); 185–280 °C (120 °C/min); 5 min, 280 °C. Die Ionisation des Analyten im Massenspektrometer erfolgte durch Elektronenstoßionisation bei 70 eV. Die Proben für GC-MS Messungen wurden in Methyl-*tert*-butylether (MTBE) oder Ethylacetat (EtOAc) gelöst.

8.6.1.6 HR (Hochauflösende)-MS Messungen

HR-MS Messungen wurden am *HHU Center of Molecular and Structural Analytics* (HHUCeMSA), dem gemeinsamen Analytikzentrum der Wissenschaftlichen Einrichtung Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Messungen am HHUCeMSA erfolgten mit einem UHR QTOF maXis 4G (*Bruker* Corporation, Billerica, MA, USA), wobei die in Methanol gelösten Proben per ESI ionisiert wurden.

8.6.1.7 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR) und Quantitative NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme aller NMR-Datensätze erfolgte an einem Advance/DRX 600 NMR Spektrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Die Messungen erfolgten bei 297 K in CDCl₃ oder CD₃OD bei 600 MHz bzw. 151 MHz. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und relativ zu den Signalen von CDCl₃ $[^{1}H: \delta(CDCl_{3}) = 7.26 \text{ ppm}$ und ¹³C: $\delta(CDCl_3) = 77.2 \text{ ppm}$], Methanol-D4 $[^{1}H: \delta(CD_{3}OD) = 3.31 \text{ ppm}$ ¹³C: δ (CD₃OD) = 49.2 ppm] und oder TMS $[^{1}H: \delta(TMS) = 0.00 \text{ ppm} \text{ und } {}^{13}C: \delta(TMS) = 0.0 \text{ ppm}]$. Neben ${}^{1}H$ - und ${}^{13}C$ -Spektren wurden zusätzlich DEPT (engl. distortionless enhancement by polarization transfer)-135° Puls-, ¹H-¹H-COSY (engl. correlation spectroscopy), ¹H-¹³C-HSQC (engl. heteronuclear single quantum coherence) und ¹H-¹³C-HMBC (engl. heteronuclear multiple bond correlation) Spektren aufgenommen und zur Zuordnung der Signale verwendet. Die Multiplizitäten der Signale wurden als Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Quartett (q), Multiplett (m) bezeichnet. Die Kopplungskonstanten (J) sind in Hz angegeben.

Zur Bestimmung der Reinheit von Substanzen wurden quantitative NMR-Messungen durchgeführt unter Verwendung von Ethylencarbonat (*Merck*, TraceCERT, Reinheit > 99 %) oder Trimethoxybenzol (*Merck*, TraceCERT, Reinheit > 99 %) als internem Standard. Die Peakfläche der charakteristischen Gruppen wurde als Referenz genutzt (Integral der Referenz wurde auf 100 normiert) und die Masse des Analyten über die nachfolgende Gleichung berechnet.

180

8. Experimenteller Teil

 $m_{\text{Produkt}} = m_{\text{Standard}} \cdot \frac{N_{\text{Standard}}}{N_{\text{Produkt}}} \cdot \frac{M_{\text{Produkt}}}{M_{\text{Standard}}} \cdot \frac{I_{\text{Produkt}}}{I_{\text{Standard}}}$

Formel 3. Formel zur Berechnung der Masse eines Analyten bei quantitativer NMR-Analyse (m = Masse, N = Anzahl der signalerzeugenden Protonen, M = molare Masse, I = Integral des Signals). Das charakteristische Signal des Standards wurde integriert und das Integral des Signals wurde auf 100 normiert. Entsprechend ist das Integral des Produkt Signals relativ dazu angegeben. Beide Signale wurden direkt im NMR-Spektrum integriert und sind als relatives Integral angegeben.

8.6.1.8 Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden auf einem *SpectrumTwo* IR Spektrometer (*Perkin Elmer* Inc., Waltham, MA, USA) aufgenommen. Die Messungen erfolgten mittels ATR-IR (*engl. attenuated total reflection*) und die Absorptionsbanden jedes Spektrums wurden als Wellenzahlen \tilde{v} (1/cm) aufgeführt. Flüssigkeiten wurden direkt vermessen, während Feststoffe in Chloroform oder Aceton gelöst und aufgetragen wurden. Die Messung wurde nach Verdampfen des Lösungsmittels begonnen.

8.6.1.9 LC (Liquid Chromatography)-MS Analyse

Die Analyten wurden mit einer Agilent 1100 LC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). ausgestattet mit einem Diodenarraydetektor (DAD) und API (engl. atmospheric pressure ionisation) Elektronenspray Massendetektor analysiert. Die Substanzen wurden auf einer reversed phase Atlantis T3 Säule (1 m × 3 mm, 3 µm) getrennt. Vor Gebrauch wurden die Lösungsmittel wurden 3 h im Ultraschallbad entgast. Wasser und Methanol mit jeweils 0.1% (v/v) Ameisensäure wurden als mobile Phase verwendet, wobei folgender Gradient verwendet, wurde: 0.00 min: Wasser/Methanol (90:10); 4.00 min: Wasser/Methanol (40:60); 6.00 min: Methanol. Nach 10 min wurde das Programm gestoppt. Flussrate und Säulentemperatur wurden konstant bei 0.6 mL/min bzw. 30 °C gehalten. Die Detektionswellenlangen des DAD betrugen λ = 220 nm, 250 nm und zusätzlich wurde das 3D-Feld (λ = 190–800 nm) gemessen. Die Analyten wurden in Methanol gelöst und 10 µL jeder Probe injiziert. Die MS Detektion erfolgte im positiven Modus in einem Bereich von m/z = 100-1000. Die Substanzen wurden über ihr UV-Absorptionsspektrum und das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) identifiziert.

8.6.1.10 RP-LC (Liquid Chromatography) Analyse

Für die RP-LC Analyse wurde das Jasco RP-HPLC System mit einer Hyperclone ODC (C_{18}) *reverse phase* Säule (125 × 4 mm, 5 µm, Phenomenex, USA) mit den unter **Tabelle 48** dargestellten Standardparametern genutzt. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch 3 h im Ultraschallbad entgast. Als mobile Phase wurden ein linearer Gradient aus MeOH/50 mM NH₄CHO₂ pH 4 genutzt. Für einzelne Experimente wurde die mobile Phase optimiert. *Tk*MAT Analysen: **Methode A**: 0 min: 0% MeOH, 4.1 min: 0 % MeOH, 8 min: 5 % MeOH, 13 min: 50 % MeOH, 16 min: 100 % MeOH, 17 min: 100 % MeOH, 17.1 min:

0 % MeOH, 20 min: 0 % MeOH *Ct*HMT Reaktionen: **Methode B** (0 min: 5 % MeOH, 1 min: 5 % MeOH, 7 min: 50 % MeOH, 8 min: 100 % MeOH, 10 min: 100 % MeOH, 11 min: 5 % MeOH). Die Bedingungen für die Analyse von SAM/SAH wurden bereits zuvor beschrieben und für die Bestimmung der *Ct*HMT Aktivität genutzt.^[307]

Tabelle 48. A. Zusammenfassung der genutzten RP-HPLC Bedingungen für Methode A und Methode B. **B.** Retentionszeit der zu trennenden Analyten.

(A) Trennbedingungen			
Stationäre Phase	Hyperclone [®] ODS (C ₁₈), 125 × 4 mm, 5 µm (Phenomenex,		
	USA)		
	(Fully porous silica, C ₁₈ -column)		
Mobile Phase	MeOH/50 mM NH ₄ CO ₂ H, pH 4.0 (entgast)		
Flussrate	1 mL/min		
Injektionsvolumen	30 µL		
Säulentemperatur	25 °C		
Detektion	UV, 260 nm		
(B) Standard	Retentionszeit Methode A	Retentionszeit Methode B	
SAM	~2.88 min	~1.96 min	
SAH	~8.89 min	~4.14 min	

8.6.1.11 Chirale Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Für die Analyse von chiralen Verbindungen wurde die Dionex UltiMate 3000 (*Thermo Fisher Scientific*), welche mit einer Chiralcel OD-H 250·4.6 mm 5 µm Säule bestückt wurde genutzt. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch 3 h im Ultraschallbad entgast. Als mobile Phase wurde eine Mischung aus *n*-Heptan/Isopropanol benutzt. Die Flussrate lag bei 0.5 mL/min. Das Injektionsvolumen lag bei 10 µL für jede Probe. Die Detektionswellenlängen des DAD betrugen λ = 205 nm, 225 nm und zusätzlich wurde das 3D-Feld (λ = 190–800 nm) gemessen. Für jede zu untersuchende Substanz wurde die Säule, sowie die mobile Phase angepasst und ist dort jeweils detailliert angegeben.

Tabelle 49	Zusammenfassung	der NP-HPI	C Standard	Bedingungen
Tabelle 45.	Zusammemassung		C Stanuaru	Deulingungen.

(A) Trennbedingungen		
Stationäre Phase	Chiralcel [®] OD-H, 250 × 4.6 mm, 5 µm (Daicel,	
	Japan)	
	(Chiral, Cellulose-basiert)	
Mobile Phase	<i>n</i> -Heptan/ <i>i</i> -PrOH (entgast)	
Flussrate	0.5 mL/min	
Injektionsvolumen	20 μL	
Säulentemperatur	25 °C	
Detektion	UV, 205 nm	

8.6.1.12 Bestimmung der optischen Rotation

Die spezifischen Drehwerter von neuen, synthetischen Verbindungen wurde an einem PerkinElmer 341 Polarimeter unter Nutzung der Natrium D-Linie (589 nm), in einer 10 mm langen Messzelle durchgeführt. Dafür wurde die zu bestimmende Verbindung vorab zu einer Konzentration von 10 mg/mL in CHCl₃ gelöst. Es wurden 5 Messungen durchgeführt und der Mittelwert genommen. Die Angabe des Mittelwerts erfolgte nachfolgender Formel

$$[\alpha]^{\mathsf{T}_{\lambda}} = \frac{\alpha}{\mathsf{d} \cdot \mathsf{c}}$$

Formel 4. Formel zur Berechnung des spezifischen Drehwerts (α = Mittelwert der Drehwerte, c = Konzentration der Probe, d = Durchmesser der Küvette, T = Temperatur, λ = Wellenlänge).

8.6.1.13 Ermittlung von ee-Werten

Für die Ermittlung von *ee*-Werten wurden die zu analysierenden Enantiomere über chiraler stationärer Phase (HPLC oder GC) getrennt. Anhand der jeweiligen Peakflächen konnte anschließend der Enantiomerenüberschuss bestimmt werden.

ee [%]=
$$\frac{SI (E1) SI (E2)}{SI (E1)+SI (E2)} \cdot 100\%$$

Formel 5. Formel zur Berechnung des *ee* (*ee* = Enantiomerenüberschuss, SI = Signalintensität, E1 = überschüssiges Enantiomer, E2 = Enantiomer 2).

8.6.1.14 Ermittlung der Selektivität (S)

Für die Ermittlung der Selektivität wurden die zu analysierenden Enantiomere über chiraler stationärer Phase (HPLC oder GC) getrennt. Anhand der relativen Signalintensitäten konnte anschließend die Selektivität bestimmt werden.^[313]

$$s = \frac{\ln[(1 \text{ c})(1 \text{ ee}_{\text{Substrat}})]}{\ln[(1 \text{ c})(1 + \text{ee}_{\text{Substrat}})]} s = \frac{\ln[(1 \text{ c})(1 \text{ ee}_{\text{Produkt}})]}{\ln[(1 \text{ c})(1 + \text{ee}_{\text{Produkt}})]} c = \frac{ee_{\text{Substrat}}}{ee_{\text{Substrat}} + ee_{\text{Produkt}}}$$

Formel 6. Formel zur Berechnung des sWert (*s* = Selektivität) *e*= Enantiomerenüberschuss (*engl. enantiomeric excess*) c-Wert (*c* = Reaktionsumsatz, *engl. reaction conversion*)

8.6.2 Generelle Methoden zur Synthese der Indol-Bibliothek

8.6.2.1 Synthese der Serotonin-Derivate



Schema 8. Allgemeines Reaktionsschema für die Herstellung von Serotonin-Derivaten. Alle in dieser Arbeit hergestellten und genutzten Serotonin-Derivate wurden nach demselben

Prinzip synthetisiert und sind in Tabelle 50 aufgeführt.

Verbindung	R ¹	Reagenz	Ausbeute ^a [%]
3a	Methyl	Essigsäureanhydrid	85
3b	Ethyl	Propionsäureanhydrid	57
3c	Propyl	Buttersäureanhydrid	80
3d	<i>iso</i> -Propyl	Isobuttersäureanhydrid	89
3e	<i>tert</i> Butyl	Pivalinsäureanhydrid	77
3f	Benzyl	Benzoesäureanhydrid	95
3g	Methyl	Essigsäureanhydrid	70 ^b
3h	Pentyl	Hexansäureanhydrid	67
3i	Methoxy	Chlorameisensäuremethylester	77
79c	tertButyl	Pivalinsäureanhydrid	62°
79d	Methoxy	Chlorameisensäuremethylester	83

 Tabelle 50. Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten Serotonin-Varianten.

^aAusbeute stellt die Gesamtausbeute über alle Stufen dar.

^b5'-unsubstituierte Verbindung

^cDiese Verbindung wurde ausgehend von 78b erhalten.

8.6.2.1.1 Generelle Vorschrift zur Synthese von N-alkyl Serotonin-Varianten

Natriumborhydrid (7.00 Äa.) vorsichtia wurde zu einer Lösuna aus 5-Benzyloxyindol-3-Acetonitril (78a. 1.00 Äg.). Anhvdrid (2.00 Äg.) and Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat (1.50 Äg.) in Methanol (0.05 mmol 78a pro mL THF) bei 0°C zugegeben. Im Anschluss an eine kräftige Reaktion bildete sich ein schwarzes Präzipitat. Unter Rühren wurde die Reaktion nach weiteren 20 Minuten bei Raumtemperatur abgebrochen. Das Überschüssige Methanol wurde unter Vakuum entfernt und das verbleibende Reaktionsgemisch in Ethylacetat (10 mL pro mmol 78a) und NaHCO3 gelöst (2.5 mL pro mmol 78a). Nach Zugabe von Magnesiumsulfat-Hydrat wurde die Lösung gefiltert und das übrige Präzipitat drei Mal mit Ethylacetat gewaschen. Die vereinten organischen Phasen wurden getrocknet (Na₂SO₄) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das 5'-Benzyloxy Serotonin (79a-f, i) wurde als Rohprodukt erhalten und als solches direkt für die nächste Reaktion verwendet wurde.^[314]

Im nächsten Schritt wurde zu dem in Ethanol (0.1 mmol/mL) gelösten Rohprodukt (**79a–f, i**) aus dem ersten Schritt Ammoniumformiat (5.00 Äq.) und 10 % Pd/C (0.10 Äq.) hinzugegeben und die Mischung für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Das Gemisch wurde filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Methanol + 1 % (*v*/*v*) 7 M Ammoniak in Methanol] ergab die Serotonin-Derivate **3a–f, i** als farbiges Öl.

N-Acetylserotonin (3a)



3a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.1.1** aus **78a** (2.5 g, 9.7 mmol) hergestellt und 1.80 g (8.3 mmol, 85 %, über zwei Schritte) als hellbraun/gelbes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol,

90:10 + 1% (*v*/*v*) 7 M Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.98 (s, 1H, 1-H), 7.14 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 6.98 (s, 1H, 2-H), 6.91 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.65 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.41 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.83 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.89 (s, 3H, 5'-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 173.27 (C-4'), 151.06 (C-5), 133.03 (C-7a), 129.46 (C-3a), 124.16 (C-2), 117.15 (C-3), 112.67 (C-4), 112.37 (C-7), 103.48 (C-6), 41.31 (C-2'), 26.30 (C-1'), 22.99 (C-5') **IR** (ATR-film): \bar{v} = 3292, 2494, 1623, 1466, 1369, 1200, 795 cm⁻¹; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 3.5 min; **MS** (EI, 70 eV): m/z = 219 [M⁺].

Die Daten Stimmen mit der Literatur überein.^[314]

N-Propionylserotonin (3b)



3b wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.1.1** aus **78a** (1.0 g, 3.9 mmol) hergestellt und 550 mg (2.2 mmol, 57 % über zwei Schritte) als hellbraunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in

Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.16 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.01 (s, 1H, 2-H), 6.94 (s, 1H, 4-H), 6.67 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.4 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'), 2.88 (t, ${}^{3}J_{1',2}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.19 (q, ${}^{3}J_{5',6}$ = 7.7 Hz, 2H, 5'-H), 1.12 (t, ${}^{3}J_{6',5'}$ = 7.7 Hz, 3H, 6'). 13 C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 175.63 (C-4'), 149.72 (C-5), 131.71 (C-7a), 128.08 (C-3a), 122.79 (C-2), 111.22 (C-6), 111.14 (C-3), 110.95 (C-7), 102.11 (C-4), 39.92 (C 2'), 28.86 (C-5'), 24.91 (C-1'), 9.12 (C-6'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3306, 1735, 1626, 1435, 1357, 1211 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₃H₁₆N₂O₂ +H⁺: 233.1285 [M+H]⁺;gefunden: 233.1286.

8. Experimenteller Teil

N-Butanoylserotonin (3c)



3c wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.1.1** aus **78a** (1.0 g, 3.9 mmol) hergestellt und 750 mg (3.1 mmol, 80 % über zwei Schritte) als hellbraunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung

[Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.16 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.01 (s, 1H, 2-H), 6.94 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.84 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.7 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.88 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.15 (t, ${}^{3}J_{5',6'}$ = 7.4 Hz, 2H, 5'-H), 1.62 (h, ${}^{3}J_{6',7,5}$ = 7.4 Hz, 2H, 6'-H), 0.93 (t, ${}^{3}J_{7',6'}$ = 7.4 Hz, 3H, 7'-H). 13 C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 174.72 (C-4'), 149.72 (C-5), 131.71 (C-7a), 128.08 (C-3a), 122.81 (C-2), 111.22 (C-6), 111.11 (C-3), 110.94 (C-7), 102.11 (C-4), 39.84 (C-2'), 37.69 (C-5'), 24.96 (C-1'), 19.00 (C-6'), 12.55 (C-7').IR (ATR-film): \tilde{v} = 3307, 1633, 1435, 1212, 795 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₄H₁₈N₂O₂ +H⁺: 247.1441 [M+H]⁺; gefunden: 247.1443.

N-Isobutanoylserotonin (3d)



3d wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.1.1** aus **78a** (500 mg, 1.9 mmol) hergestellt und 420 mg (1.7 mmol, 89 % über zwei Schritte) als braunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M

Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.16 (d, ³J_{7,6} = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.01 (s, 1H, 2-H), 6.95 (d, ⁴J_{4,6} = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.67 (dd, ³J_{6,7} = 8.7 Hz, ⁴J_{6,4} = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ³J_{2',1'} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.88 (t, ³J_{1',2'} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.40 (p, ³J_{5',6} = 6.9 Hz, 1H, 5'-H), 1.09 (d, ³J_{6',5'} = 6.9 Hz, 6H, 6'-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 178.70 (C-4'), 149.71 (C-5), 131.71 (C-7a), 128.09 (C-3a), 122.82 (C-2), 111.22 (C-6), 111.13 (C-3), 110.94 (C-7), 102.14 (C-4), 39.76 (C-2'), 34.94 (C-5'), 24.91 (C-1'), 18.46 (C-6'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3317, 2942, 1629, 1460, 1369, 1206 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₄H₁₈N₂O₂+H⁺: 247.1441 [M+H]⁺; gefunden: 247.1439.

8. Experimenteller Teil

N-PivaloyIserotonin (3e)



3e wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.1.1 aus 78a (500 mg, HO 5 4_{3a^3} $H_{4'}$ $5_{6'}$ 1.9 mmol) hergestellt und 380 mg (1.5 mmol, 77 % über zwei Schritte) als braunes Öl nach der säulenchromatographischen [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Reinigung

Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] 7.16 (d, ${}^{3}J_{7.6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.01 (s, 1H, 2-H), 6.97 (d, ${}^{4}J_{4.6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.67 (dd, ³J_{6.7}= 8.7 Hz, ⁴J_{6.4}= 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ³J_{2.1} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.88 (t, ³J_{1.2}= 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.15 (s, 9H, 6'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 179.92 (C-4'), 149.73 (C-5), 131.69 (C-7a), 128.11 (C-3a), 122.84 (C-2), 111.22 (C-6), 111.19 (C-7a), 110.97 (C-3), 102.20 (C-4), 40.12 (C-2'), 38.21 (C-5'), 26.43 (C-6'), 24.79 (C-1'). IR (ATR-film): v = 3329, 2488, 1634, 1448, 1174 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₂₀N₂O₂+H⁺: 261.1600 [M+H]⁺; gefunden: 261.1598.

N-Benzoylserotonin (3f)



3f wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.1.1 aus 78a HO 5 $\stackrel{4}{3a^3}$ $\stackrel{1}{B}$ $\stackrel{2}{4}$ $\stackrel{5}{3a^3}$ $\stackrel{6}{B}$ $\stackrel{1}{B}$ $\stackrel{1}{4}$ $\stackrel{5}{5}$ $\stackrel{6}{6}$ (500 mg, 1.9 mmol) hergestellt und 510 mg (1.8 mmol, 95 % is a scheme schem säulenchromatographischen Reinigung

[Dichlormethan/Methanol. 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.80-7.78 (m, 2H), 7.52 (t, ³J_{8'.7.6'} = 7.3 Hz, 1H, 8'-H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.18 (d, ³J_{7.6},1H, 7-H), 7.05 (s, 1H, 2-H), 7.01 (d, ⁴J_{4.6}=8.6 Hz, 1H, 4-H), 6.68 (d, ³J_{6,7} = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.66 (t, ³J_{2',1'} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 3.01 (t, ³J_{1',2'} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 168.94 (C-4'), 149.77 (C-5), 134.56 (C-7a), 131.72 (C-5'), 131.10 (C-3a), 128.10 (C-7'), 126.84 (C-6'), 122.86 (C-8'), 111.26 (C-6), 111.21 (C-7) 110.99 (C-4), 102.18 (C-3), 40.61 (C-2'), 24.94 (C-1').IR (ATR-film): v = 3307, 1629, 1533. 1478. 1200. 790 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₁₆N₂O₂+H⁺: 281.1285 [M+H]⁺: gefunden: 281.1289.

N-Acetyltryptamin (3g)



3g wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.1.1 aus 78c (1.4 g, 6.4 mmol) hergestellt und 1.1 g (4.5 mmol, 70 % über zwei Schritte) als arün/braunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol]

erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.56 (d, ³J_{4.5} = 7.9 Hz, 1H, 4-H), 7.33 (d, ³J_{7.6} = 8.1 Hz, 1H, 7-H), 7.11-7.06 (m, 2H), 7.01 (s, 1H, 2-H), 3.47 (t, ³J_{2',1'} = 7.3 Hz, 2H, 2-H), 2.89 (t, ³J_{1'.2}= 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.89 (s, 3H, 5'-H).¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 171.85 (C-4'), 136.77 (C-7a), 127.41 (C-3a), 121.94 (C-2), 120.90 (C-6), 118.17 (C-5), 117.83 (C-4), 111.87 (C-3), 110.81 (C-7), 40.16 (C-2'), 24.81 (C-5'), 21.19 (C-1'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3281, 2925, 2470, 1634, 1457, 743 cm⁻¹.

Die Daten Stimmen mit der Literatur überein.^[315]

N-Hexanoylserotonin (3h)



3h wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.1.1 aus 78a (700 mg, 2.7 mmol) hergestellt und 480 mg (1.8 mmol, 78a (700 mg, 2.7 mmol) hergestellt und 480 mg (1.8 mmol, 78a (700 mg, 2.7 mmol) hergestellt und 480 mg (1.8 mmol, 67% über zwei Schritte) als hellbraunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung

[Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4); δ [ppm] = 7.17 (d, ${}^{3}\text{J}_{76}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.02 (s, 1H, 2-H), 6.95 (d, ⁴J_{4,6} = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.67 (dd, ³J_{6,7}= 8.6 Hz, ⁴J_{6,4} = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.47 (t, ³J_{2,1} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.88 (t, ³J_{1'.2}= 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.17 (t, ³J_{5'.6}= 7.5 Hz, 2H, 5'-H), 1.62 (h, ³J_{6'.7'.5}= 7.4 Hz, 2H, 6'-H), 1.40-1.30 (m, 4H), 0.91 (t, ³J_{7.6} = 7.2 Hz, 3H, 9'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 174.91 (C-4'), 149.73 (C-5), 131.71 (C-7a), 128.08 (C-3a), 122.82 (C-2), 111.25 (C-6), 111.11 (C-3), 110.96 (C-7), 102.12 (C-4), 39.83 (C-2'), 35.82 (C-5'), 31.10 (C-7') 25.37 (C-8'), 24.96 (C-1'), 22.14 (C-6'), 12.88 (C-9').IR (ATR-film): \tilde{v} = 2929, 1619, 1478, 1358, 1196, 802 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₂N₂O₂ +H⁺: 275.1754 [M+H]⁺; gefunden: 275.1755.

N-Methoxycarbonylserotonin (3i)



3i wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.1.1** aus **78a** (1.7 g, **6.6** mmol) unter Nutzung von Chlorameisensäuremethylester hergestellt und 1.2 g (5.4 mmol) hellbraun/gelbes Öl nach der säulenchromatographischen

Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1% (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.15 (d, ³J_{7.6} = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 6.99 (s, 1H, 2-H), 6.93 (d, ⁴J_{4.6} = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.66 (dd, ³J_{6.7} = 8.6 Hz, ⁴J_{6.4} = 2.3 Hz, 1H, 6-H), 3.62 (s, 3H, 5'-H), 3.35 (t, ³J_{2'1'} = 7.4 Hz, 2H, 2'-H), 2.84 (t, ³J_{1'2'} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 158.22 (C-4'), 149.70 (C-5), 131.71 (C-7a), 128.05 (C-3a), 122.81 (C-2), 111.29 (C-3), 111.08 (C-4), 110.96 (C-7), 102.12 (C-6), 50.97 (C-5'), 41.29 (C-2'), 25.49 (C-1'). **IR** (ATR-film): $\tilde{v} = 2483$, 1693, 1470, 1431, 1403, 1171 cm⁻¹; **HRMS** (ESI): m/z berechnet für $C_{12}H_{14}N_2O_3 + H^+$: 235.1077 [M+H]⁺; gefunden: 235.1083.

5-O-Methyl-N-pivaloylserotonin (79c)

$$1" \begin{array}{c} & & 1' & 2' & 0 \\ & & & 1'' & 2' & 0 \\ & & & & 1'' & 0 \\ & & & & 1'' & 0 \\ & & & & 1'' & 0 \\ & & & & & 1''' & 0 \\ & & & & & 1''' & 0 \\ & & & & & 1''' & 0 \\$$

79c wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 78b 6' (2.5 g, 12.9 mmol) hergestellt und 2.2 g (8.0 mmol, 62 %) als 3' braunes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 2.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz,

Methanol-d4): δ [ppm] = 7.32 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.10 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 7.04 (s, 1H, H-2), 6.76 (dd, ${}^{3}J_{67}$ = 8.7 Hz, ${}^{4}J_{64}$ = 2.4 Hz 1H, 6-H), 3.84 (s, 3H, 1"-H), 3.47 $(t, {}^{3}J_{2,1} = 7.5 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, {}^{3}J_{1,2} = 7.5 Hz, 2H, 1'-H), 1.15 (s, 9H, 6'-H).$ ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 179.9 (C-4'), 153.5 (C-5), 132.0 (C-7a), 127.7 (C-3a), 122.8 (C-2), 111.7 (C-7a), 111.4 (C-6), 111.2 (C-3), 100.0 (C-4), 54.9 (C-1"), 40.1 (C-2'), 38.2 (C-5'), 26.4 (C-6'), 24.8 (C-1'). **IR** (ATR-film): $\tilde{v} = 3311$, 2942, 1629, 1435, 1363,1206, 1049, 789 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₂N₂O₂+H⁺: 247.1441 [M+H]⁺; gefunden: 247.1444.

5-Benzyl-N-Methoxycarbonylserotonin (79d)



79d wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **78a** (1 g, 3.5 mmol) unter Nutzung von Chlorameisensäuremethylester hergestellt und 1 g (3.0 mmol, 83 %) als gelbes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 2.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.45 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, 3"-H), 7.37 (dd,

 $J = 8.4, 6.8 \text{ Hz}, 2H, 4"-H), 7.34-7.28 \text{ (m, 1H, 5"-H)}, 7.23 \text{ (d, }^{3}J_{7,6} = 8.6 \text{ Hz}, 1H, 7-H), 7.15 \text{ (s, 1H, 2-H)}, 6.95 \text{ (d, }^{4}J_{4,6} = 2.3 \text{ Hz}, 1H, 4-H), 6.66 \text{ (dd, }^{3}J_{6,7} = 8.6 \text{ Hz}, ^{4}J_{6,4} = 2.3 \text{ Hz}, 1H, 6-H), 5.1 \text{ (s, 2H, 1"-H)}, 3.62 \text{ (s, 3H, 5'-H)}, 3.35 \text{ (t, }^{3}J_{2',1'} = 7.4 \text{ Hz}, 2H, 2'-H), 2.84 \text{ (t, }^{3}J_{1',2'} = 7.3 \text{ Hz}, 2H, 1'-H). ^{13}C-NMR (151 \text{ MHz}, \text{Methanol-d4}): <math>\delta[\text{ppm}] = 158.22 \text{ (C-4')}, 152.70 \text{ (C-5)}, 136.15 \text{ (C-2'')}, 131.71 \text{ (C-7a)}, 128.45 \text{ (C-4'')}, 128.05 \text{ (C-3a)}, 127.81 \text{ (C-5'')}, 127.60 \text{ (C-3'')}, 122.81 \text{ (C-2)}, 111.29 \text{ (C-6)}, 111.08 \text{ (C-3)}, 110.96 \text{ (C-7)}, 102.12 \text{ (C-4)}, 70.80 \text{ (C-1'')}, 50.97 \text{ (C-5')}, 41.29 \text{ (C-2')}, 25.49 \text{ (C-1')}. IR (ATR-film): <math>\tilde{v} = 2480, 1693, 1473, 1381, 1091, 790 \text{ cm}^{-1}; HRMS \text{ (ESI): m/z} \text{ berechnet für } C_{19}H_{20}N_2O_3 + H^+: 325.3802 \text{ [M+H]}^+; gefunden: 325.3805.$





Schema 9. Allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung von carbamoylierten Indolen. Alle in dieser Arbeit hergestellten und genutzten carbamoylierten Indole wurden nach demselben Prinzip synthetisiert und sind in **Tabelle 51** aufgeführt.

Verbindung	R ¹	R ²	R ³	Reagenz	Ausbeute [%]
4a	Ме	Ме	Н	Carbamoylchlorid	90
4b	Et	Me	Н	Isocyanat	71
4c	<i>n</i> Pr	Me	Н	Isocyanat	45
4d	<i>i</i> Prl	Me	Н	Isocyanat	61
4e	<i>t</i> Bu	Me	Н	Isocyanat	80
4f	Ph	Me	Н	Isocyanat	67
4g	Ме	Me	Me	Carbamoylchlorid	88
4h	Ме	Et	Н	Isocyanat	63
4i	Ме	<i>n</i> Pr	Н	Isocyanat	57
4j	Ме	<i>t</i> Bu	Н	Isocyanat	88
4k	Me	Ph	Н	Isocyanat	74

Tabelle 51. Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten N-Acylserotonin Derivate

8.6.2.2.1 Generelle Synthesevorschrift zur Herstellung der N-Acetylserotonin Derivate

Eine Lösung des Serotonin-Derivats (**3**, 1.00 Äq.) und Triethylamin (3.00 Äq.) in trockenem THF (0.07 mmol **3** pro mL THF) wurde für 15 Minuten bei RT unter inerten Bedingungen gerührt. Zu dieser Lösung wurden anschließend das entsprechende Isocyanat (1.10 Äq.) oder Carbamoylchlorid (5.00 Äq.) und DMAP (0.20 Äq.) zugegeben und die Reaktion bei 0 °C–RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt und die Temperatur bei Bedarf erhöht. Nachdem ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde, konnte die Reaktion durch Zugabe von 20 mL gesättigter Ammoniumchlorid Lösung gestoppt werden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; EtOAc/PE + 1–5% (v/v) Methanol] ergab die carbamoylierten Indole **4** als farbigen Schaum oder Öl.

5-O-Methylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4a)



4a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3a** (960 mg, 4.4 mmol) hergestellt und 1.10 g (4.0 mmol, 90 %) als weißer Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 2.5 % Methanol] erhalten.

¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.14 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 6.98 (s, 1H, 2-H), 6.91 (dd, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.65 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.41 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.83 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.67 (s, 3H, 3''-H) 1.89 (s, 3H, 5'-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 173.56 (C-4'), 159.35 (C-1''), 145.81 (C-5), 136.06 (C-3a), 129.27 (C-2), 125.22 (C-7a), 117.15 (C-7), 113.91 (C-4), 112.72 (C-3), 111.95 (C-6), 41.81 (C-2'), 27.91 (C-3''), 26.40 (C-1'), 22.88 (C-5'). **IR** (ATR-film): $\bar{\nu}$ = 3316, 2917, 2470, 1715, 1628, 1435, 1173, 1200, 795 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₄H₁₇N₃O₃+H⁺: 276.1348 [M+H]⁺; gefunden: 276.1346; **HPLC** (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm, 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min , UV 205 and 225 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 80:20) t_R: 43.4 min; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 5.60 min; **Gehalt:** 99.58 ± 0.54 % bestimmt durch qNMR Analyse.

5-O-Methylcarbamoyl-N-propionylserotonin (4b)



4b wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3b 1** (960 mg, 0.7 mmol) hergestellt und 130 mg (0.5 mmol, **1** (960 mg, 0.7 mmol, **1** (960 mg, 0.7

85:15 + 2.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.31 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.13 (s, 1H, 4-H), 6.82 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.46 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, ${}^{3}J_{1',2}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s, 3H, 3"-H), 2.18 (q, ${}^{3}J_{5',6}$ = 7.7 Hz, 2H, 5'-H), 1.11 (t, ${}^{3}J_{6',7'}$ = 7.7 Hz, 3H, 6'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 175.57 (C-4'), 159.35 (C-1''), 144.14 (C-5), 134.40 (C-7a), 127.62 (C-3a), 123.56 (C-2), 115.46 (C-6), 112.30 (C-3), 111.02 (C-7), 110.30 (C-4), 40.03 (C-2'), 28.84 (C-3''), 26.22 (C-1'), 24.78 (C-5'), 9.08 (C-6'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3401, 1738, 1393, 1206, 1025, 952 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₃ +H₊: 290.1505 [M+H]+; gefunden: 290.1503; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.42 min.

5-O-Methylcarbamoyl-N-butanoylserotonin (4c)



4c wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3c** (270 mg, 1.1 mmol) hergestellt und 140 mg (0.5 mmol, 45 %) als hellgelber Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE,

80:20 + 1 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.31 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.12 (s, 1H, 4-H), 6.84 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.7 Hz, 1H, 6-H), 3.46 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s. 3H, 3"-H), 2.14 (t, ${}^{3}J_{5',6'}$ = 7.4 Hz, 2H, 5'-H), 1.62 (q, ${}^{3}J_{6',7,5'}$ = 7.4 Hz, 2H, 6'-H), 1.20 (t, ${}^{3}J_{7',6'}$ = 7.4 Hz, 2H, 7'-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 174.74 (C-4'), 157.69 (C-1"), 144.13 (C-5), 134.40 (C-7a), 127.59 (C-3a), 123.56 (C-2), 115.46 (C-6), 112.28 (C-3) , 111.02 (C-7), 110.31 (C-4), 39.97 (C-2'), 37.68 (C-5'), 26.22 (C-3"), 24.81 (C-1), 18.97 (C-6'), 12.57 (C-7').IR (ATR-film): \tilde{v} = 3323, 1714, 1641, 1445, 1200 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H₊: 304.1656 [M+H]+; gefunden: 304.1657; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.87 min.

5-O-Methylcarbamoyl-N-isobutanoylserotonin (4d)

$$\begin{array}{c} 3'' & 1' & 2' & 0 \\ 2'' HN & 1'' & 0 & 5 & 4 \\ 0 & 6 & 7a & H & 1 \\ 0 & 6 & 7a & H & 1 \\ 0 & 6 & 7a & H & 1 \\ \end{array}$$

4d wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3c
(170 mg, 0.7 mmol) hergestellt und 110 mg (0.4 mmol, 61 %) als hellbrauner Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE,

85:15 + 0.5 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.32 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.6 Hz, 1H, 7-H), 7.28 (s, 1H, 2-H), 7.12 (s, 1H, 4-H), 6.84 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.91 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s, 3H, 3"-H), 2.39 (p, ${}^{3}J_{5',6}$ =6.9 Hz, 1H, 5'-H), 1.09 (d, ${}^{3}J_{6',7'}$ =6.9 Hz 6H, 6'-H). 13 **C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 178.74 (C-4'), 157.69 (C-1''), 144.12 (C-5), 134.40 (C-7a), 127.62 (C-3a), 123.59 (C-2), 115.46 (C-6), 112.30 (C-3), 111.02 (C-7), 110.34 (C-4), 39.88 (C-2'), 34.93 (C-5'), 26.22 (C-3''), 24.80 (C-1'), 18.46 (C-6').**IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3316, 1714, 1641, 1533, 1242, 1176 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H⁺: 304.1661 [M+H]⁺; gefunden: 304.1657; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 1.68 min.

5-O-Methylcarbamoyl-N-pivaloylserotonin (4e)



4e wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3e
5' 6' (130 mg, 0.5 mmol) hergestellt und 140 mg (0.4 mmol, 6' 80 %) als hellbrauner Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE,

80:20 + 0.5% Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.32-7.29 (m,2H, 7-H, 2-H), 7.11 (s, 1H, 4-H), 6.84 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ${}^{3}J_{2,1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, ${}^{3}J_{1',2}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s, 3H, 3"-H), 1.15 (s, 9H, 6'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 180.21 (C-4'), 157.41 (C-1"), 144.12 (C-5), 134.40 (C-7a), 127.62 (C-3a), 123.59 (C-2), 115.46 (C-6), 112.30 (C-3), 111.02 (C-7), 110.38 (C-4), 40.18 (C-2'), 38.34 (C-5'), 26.43 (C-3"), 26.20 (C-6'), 24.72 (C-1'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3329, 2960, 2476, 1718, 1629, 14.84, 1434, 14.02, 1170 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₂₃N₃O₃ +H⁺: 318.1817 [M+H]⁺; gefunden: 318.1810; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.60 min.

5-O-Methylcarbamoyl-N-benzoylserotonin (4f)

$$2"HN \frac{1"}{0} 0 \frac{4}{6778} \frac{1}{71} \frac{2'}{1} \frac{0}{1} \frac{1}{1} \frac{1}{1} \frac{2'}{1} \frac{0}{1} \frac{1}{1} \frac{1}{1$$

4f wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3f** (203 mg, 0.6 mmol) hergestellt und 135 mg (0.4 mmol, 67 %) als hellgelber Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE,

80:20 + 0.5 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.78 (d, ${}^{3}J_{6',5'}$ = 7.2 Hz, 2H, 6'-H), 7.52 (t, ${}^{3}J_{8',7',6'}$ = 8.6 Hz, 1H, 8'-H), 7.46-7.43 (m, 2H, 7-H), 7.34-7.31 (m, 2H, 2-H), 7.16 (s, 1H, 4-H), 6.85 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.66 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 3.05 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s, 3H, 3''-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 168.94 (C-4'), 157.67 (C-1''), 144.16 (C-5), 134.39 (C-7a), 131.09 (C-6'), 128.11 (C-3a), 127.59 (C-2), 126.84 (C-7'), 123.64 (C-5'), 122.86 (C-8'), 115.51 (C-6), 112.35 (C-3), 111.05 (C-7), 110.37 (C-4), 40.67 (C-2'), 26.23 (C-3'''), 24.84 (C-1').**IR** (ATR-film): $\bar{\nu}$ = 3325, 2965, 2464, 1717, 1633, 1435, 1182, 710 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₉H₁₉N₃O₃+H⁺: 338.1504 [M+H]⁺; gefunden: 338.1505; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.95-7.10 min.

5-O-Dimethylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4g)



4g wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3a** (175 mg, 0.8 mmol) hergestellt und 198 mg (0.7 mmol, 88 %) als hellgelber Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 1 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR**

 $(600 \text{ MHz}, \text{Methanol-d4}): \delta[\text{ppm}] = 7.32 \text{ (d, }^{3}\text{J}_{7.6} = 8.7 \text{ Hz}, 1\text{H}, 7\text{-H}), 7.27 \text{ (s, 1H, 2-H)}, 7.13 \text{ (s, 2H, 2-H)}, 7.13 \text{ (s,$ 1H, 4-H), 6.84 (d, ³J₆₇ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ³J₂₁ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 3.17 (s, 3H, 2''-H), 3.02 (s. 3H. 3"-H). 2.94-2.90 (m. 2H. 1'-H). 1.89 (s. 3H. 5'-H) ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 172.05 (C-4'), 156.64 (C-1"), 144.36 (C-5), 134.46 (C-7a), 127.59 (C-3a), 123.62 (C-2), 115.47 (C-6), 112.20 (C-3), 111.23 (C-7), 110.30 (C-4), 40.17 (C-2'),35,44 (2"), 35,26 (3"), 24.83 (1'), 21.05 (5'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3335, 2930, 2464, 1702, 1637, 1435, 1392, 1174 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₃+H⁺: 290.1504 [M+H]⁺; gefunden: 290.1501; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 7.00 min.

5-O-Ethylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4h)

4h wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3a (178 mg, 0.8 mmol) hergestellt und 132 mg (0.5 mmol, ^{5'} 63 %) als weißer Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 2.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.31 (d, ³J7,6 = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.13 (s, 1H, 4-H), 6.82 (d, ³J_{6.7} = 8.7 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ³J_{2',1'} = 7.2 Hz, 2H, 2'-H), 3.22 (m, 2H), 2.91 (t, ³J_{3',4'} = 7.3 Hz, 2H, 3''-H), 1.92 (s, 3H, 5'-H), 1.20 (t, ³J_{4".3"} = 7.2 Hz, 3H, 4"-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 173.16 (C-4'), 158.26 (C-1"), 145.38 (C-5), 135.65 (C-7a), 128.87 (C-3a), 124.79 (C-2), 116.78 (C-6), 113.52 (C-3), 112.28 (C-7), 111.57 (C-4), 41.43 (C-2'), 36,65 (C-3"), 25.99(C-1'), 22.46 (C-4'), 15,17 (C-5'). **IR** (ATR-film): ỹ = 3301, 2948, 2467, 1713, 1628, 1418, 1236, 1182, 979 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₃ +H⁺: 290.1504 [M+H]⁺; gefunden: 290.1503; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_{R} = 6.25 min.

5-O-Propylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4i)



4i wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.2.1** aus **3a** (156 mg, 0.7 mmol) hergestellt und 120 mg (0.4 mmol, 57 %) als hellbrauner Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 85:15 + 1 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4):

$$\begin{split} &\delta[ppm] = 7.32 \ (d,\ ^3J_{7,6} = 8.7 \ Hz,\ 1H,\ 7\text{-H}),\ 7.28 \ (s,\ 1H,\ 2\text{-H}),\ 7.17 \ (s,\ 1H,\ 4\text{-H}),\ 6.82 \ (d,\ ^3J_{6,7} = 8.6 \ Hz,\ 1H,\ 6\text{-H}),\ 3.45 \ (t,\ ^3J_{2',1'} = 7.3 \ Hz,\ 2H,\ 2'\text{-H}),\ 3.16 \ (t,\ ^3J_{3',4'} = 7.1 \ Hz,\ 2H,\ 3''\text{-H}),\ 2.92 \ (t,\ ^3J_{1',2'} = 7.3 \ Hz,\ 2H,\ 1'\text{-H}),\ 1.89 \ (s,\ 3H,\ 5'\text{-H}),\ 1.60 \ (h,\ ^3J_{4'',3'',5''} = 7.3 \ Hz,\ 2H,\ 4''\text{-H}),\ 0.99 \ (t,\ ^3J_{5'',4''} = 7.2 \ Hz,\ 2H,\ 5''\text{-H}).\ ^{13}\text{C-NMR}\ (151\ \text{MHz},\ \text{Methanol-d4}):\ \delta[ppm] = 173.73 \ (C\text{-4'}),\ 145.97\ (C\text{-1'}),\ 145.81\ (C\text{-5}),\ 136.21\ (C\text{-7a}),\ 129.44\ (C\text{-3a}),\ 125.36\ (C\text{-2}),\ 117.34\ (C\text{-6}),\ 114.10 \ (C\text{-3}),\ 112.85\ (C\text{-7}),\ 112.12\ (C\text{-4}),\ 44.22\ (C\text{-2'}),\ 41.43\ (C\text{-3''}),\ 26,55\ (C\text{-1'}),\ 24.50\ (C\text{-5''}),\ 23.02 \ (C\text{-5'}),\ 12,03\ (C\text{-5''}).\ \textbf{IR}\ (ATR-film):\ \tilde{v} = 3312,\ 2478,\ 1717,\ 1634,\ 1448,\ 1182\ cm^1.\ \textbf{HRMS}\ (ESI):\ m/z\ berechnet\ für\ C_{16}H_{21}N_3O_3+H^+:\ 304.1656\ [M+H]^+;\ gefunden:\ 304.1661;\ \textbf{LC-MS}\ (API-ES,\ 70 \ eV):\ t_R = 6.60\ min. \end{split}$$

5-O-tert-Butylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4j)



4j wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3a (171 mg, 0.8 mmol) hergestellt und 203 mg (0.7 mmol, 88 %)
5' als hellgelber Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 80:20 + 0.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.31 (d, ³J_{7,6} = 8.6

Hz, 1H, 7-H), 7.25 (s, 1H, 2-H), 7.15 (s, 1H, 4-H), 6.83 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.7 Hz, 1H, 6-H), 3.45 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.2 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.92 (s, 3H, 5'-H), 1.39 (s, 9H, 4"-H). 13 C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 171.90 (C-4'), 155.38 (C-1"), 143.94 (C-5), 134.34 (C-7a), 127.63 (C-3a), 123.46 (C-2), 115.72 (C-6), 112.26 (C-3), 110.99 (C-7), 110.45 (C-4), 49.81 (C-3"), 40.23 (C-2'), 27.65 (C-1'),24.73 (C-5'), 21.21 (C-4"). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3311, 2942, 2464, 1717, 1636, 1336, 1168 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₂₃N₃O₃+H⁺: 318.1817 [M+H]⁺; gefunden: 318.1815; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 7.15 min.

5-O-Benzylcarbamoyl-N-acetylserotonin (4k)



4k wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3a (372 mg, 1.7 mmol) hergestellt und 420 mg (1.3 mmol, 74 %) als hellorgangener Schaum nach der
5' säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 80:20 + 0.5 % Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz,

Methanol-d4): δ[ppm] = 7.52 (d, ${}^{3}J_{6'',7''}$ = 8.6 Hz, 2H, 6''-H), 7.38-7.30 (m, 4H, 7-H, 7''-H, 4-H), 7.15 (s, 1H, 2-H), 7.07 (m, 1H, 8''-H), 6.94 (d, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.47 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.94 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.92 (s, 3H, 5'-H). 13 **CNMR** (151 MHz, Methanol d4): δ[ppm] = 173.62 (C-4'), 155.83 (C-1''), 145.44 (C-5), 140.35 (C-3'') 136.06 (C-7a), 130.17 (C-5''), 129.36 (C-3a), 125.33 (C-2), 124.60 (C-6''), 120.30 (C-4''), 117.14 (C-6), 114.03 (C-3), 112.81 (C-7), 112.10 (C-4), 41.88 (C-2'), 26.41 (C-1'), 22.89 (C-5'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3326, 2476, 1630, 1444, 1226, 1176 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₉H₁₉N₃O₃+H⁺: 338.1504 [M+H]⁺; gefunden: 338.1500; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 7.15–7.20 min.

5-O-Methylcarbamoyl-N-heptanoylserotonin (4I)



4I wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3h (237 mg, 0.9 mmol) hergestellt und 210 mg (0.6 mmol, 67 %) als hellgelber Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE,

80:20 + 1 % Methanol] erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 7.31 (d, ³J_{7,6} = 8.7 Hz, 1H, 7-H), 7.27 (s, 1H, 2-H), 7.12 (s, 1H, 4-H), 6.85 (d, ³J_{6,7} = 8.6 Hz, 1H, 6-H), 3.47 (t, ³J_{2',1'} = 7.2 Hz, 2H, 2'-H), 2.92 (t, ³J_{1',2'} = 7.2 Hz, 2H, 1'-H), 2.81 (s. 3H, 3''-H), 2.16 (t, ³J_{5',6'} = 7.5 Hz, 2H, 5'-H), 1.62 (q, ³J_{6',7',5'} = 7.6 Hz, 2H, 6'-H), 1.35-1.25 (m, 4H), 0.92 (t, ³J_{7',6'} = 7.4 Hz, 2H, 9'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ [ppm] = 174.94 (C-4'), 157.69 (C-1''), 144.13 (C-5), 134.41 (C-7a), 127.59 (C-3a), 123.58 (C-2), 115.46 (C-6), 112.27 (C-3), 111.03 (C-7), 110.31 (C-4), 39.95 (C-2'), 35.68 (C-5'), 31.11 (C-8'), 26.24 (C-3''), 25.33 (C-7'), 24.81 (C-1), 22.02 (C-6'), 12.88 (C-9').IR (ATR-film): \tilde{v} = 3329, 2957, 1722, 1624, 1540, 1441, 1250, 1183 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₈H₂₅N₃O₃+H₊: 332.1969 [M+H]+; gefunden: 332.1972.

5-O-Methylcarbamoyl-N-methoxycarbonylserotonin (4m)



4m wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.2.1 aus 3i $N = 4^{+}$ (1.2 g, 4.8 mmol) hergestellt und 1.4 g (4.0 mmol, 83 %) 3' als weißer Schaum nach der säulenchromatographischen Reinigung [EE/PE, 90:10 + 2.5 % Methanol] erhalten.

¹**H-NMR** (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 7.21-7.14 (m, 2H), 7.00 (s, 1H, 2-H), 6.72 (dd, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 3.52 (s, 3H, 5'-H), 3.25 (t, ${}^{3}J_{2',1'}$ = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.83 (s, 3H, 3''-H), 2.78 (t, ${}^{3}J_{1',2'}$ = 7.3 Hz, 2H, 1'-H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] = 158.23 (C-4'), 157.69 (C-1''), 144.12 (C-5), 134.39 (C-3a), 127.57 (C-2), 123.55 (C-7a), 115.45 (C-7), 112.19 (C-4), 111.02 (C-3), 110.27 (C-6), 50.96 (C-5'), 41.33 (C-2'), 26.23 (C-3''), 25.35 (C-1'). **IR** (ATR-film): \bar{v} = 2483, 1698, 1470, 1403, 1171cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₄H₁₇N₃O₄+H⁺: 292.1292 [M+H]⁺; gefunden: 292.1297.



8.6.2.3 Synthese von 5-halogenierten N-Acetyltryptamin-Derivaten

Schema 10. Allgemeines Reaktionsschema zur Herstellung von 5-halogenierten *N*-Acetylserotonin-Derivaten.

Alle in dieser Arbeit hergestellten und genutzten 5-halogenierten *N*-Acetylserotonin-Derivate wurden nach demselben Prinzip synthetisiert. Als Startpunkt für die Synthese dienten kommerziell erhältliche 5-halogenierte Tryptamine.

8.6.2.3.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 5-halogenierten N-Acetyltryptamin-Derivaten

Essigsäureanhydrid (1.10 Äq.) und DMAP (0.20 Äq.) wurden bei 0 °C zu einer Lösung des entsprechenden Tryptamins (**81a–c**, 1.00 Äq.) und Triethylamin (1.00 Äq.) in trockenem THF (0.2 mmol **81a–c** pro mL THF) unter inerten Bedingungen gegeben. Anschließend wurde die Reaktion über 15 min auf RT aufgewärmt. Nachdem ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde, konnte die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid Lösung gestoppt werden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 3-mal mit Ethylacetat (25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; Dichlormethan/Methanol + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in Methanol] ergab die 5-halogenierten *N*-Acetyltryptamin-Derivate (**3j–I**) als saubere Verbindung.
5-Fluor-N-acetyltryptamin (3j)



3j wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.3.1 aus 81a (390 mg, F_{0} F_{0 [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in

Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] 7.29 (m, 1H, 7-H), 7.23 $(dd, {}^{4}J_{4,67} = 2.5 Hz, 1H, 4-H), 7.14 (s, 1H), 6.86 (td, {}^{3}J_{67} = 9.1, {}^{4}J_{64} = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 3.45$ (t, ³J_{2,1} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.90 (t, ³J_{1,2} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.93 (s, 3H, 5'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4); δ[ppm] 171.9 (C-4'), 158.2 (C-5), 156.0 (C-7a), 133.3 (C-3a), 124.0 (C-2), 112.1 (C-3), 111.5 (C-6), 109.0 (C-7), 102.5 (C-4), 40.0 (C-2'), 24.7 (C-1'), 21.2 (C-5').

Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[316]

5-Chlor-N-acetyltryptamin (3k)



3k wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.3.1 aus 81b (370 mg, $Cl = \begin{pmatrix} 1 & 2^{2} & 0 \\ 1 & 3a^{3} & 1 \\ 6 & N_{4} & 2^{2} & 3^{2} \end{pmatrix}$ Schaum nach der säulenchromaographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in

Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] 7.54 (s, 1H, 7-H), 7.29 $(d, {}^{4}J_{4,6} = 2.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, 4\text{-H}), 7.13 \text{ (s, 1H)}, 7.05 \text{ (td, } {}^{3}J_{6,7} = 9.1, {}^{4}J_{6,4} = 2.5 \text{ Hz}, 1\text{H}, 6\text{-H}), 3.45$ (t, ³J_{2',1'} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.90 (t, ³J_{1',2'} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.93 (s, 3H, 5'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] 172.0 (C-4'), 135.2 (C-5), 128.0 (C-7a), 124.1 (C-3a), 123.7 (C-2), 121.0 (C-6), 117.2 (C-7), 112.0 (C-4), 111.9 (C-3), 40.3 (C-2'), 24.6 (C-1'), 21.4 (C-5').

Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[317]

5-Brom-N-acetyltryptamin (31)



31 wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.3.1 aus 81c (410 mg, 1.7 mmol) hergestellt und 235 mg (0.8 mmol, 47 %) als hellgelber Schaum nach der säulenchromaographischen Reinigung [Dichlormethan/Methanol, 90:10 + 1 % (v/v) 7 M Ammoniak in

Methanol] erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] 7.70 (s, 1H, 7-H), 7.26 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.5 Hz, 1H, 4-H), 7.18 (td, ${}^{3}J_{6,7}$ = 9.1, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.5 Hz, 1H, 6-H), 7.12 (s, 1H), 3.44 (t, ³J_{2,1} = 7.3 Hz, 2H, 2'-H), 2.90 (t, ³J_{1,2} = 7.3 Hz, 2H, 1'-H), 1.93 (s, 3H, 5'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Methanol-d4): δ[ppm] 171.2 (C-4'), 135.4 (C-5), 129.3 (C-7a), 123.6 (C-6), 120.6 (C-7), 112.5 (C-4), 111.7 (C-3a), 111.5 (C-3), 40.1 (C-2'), 24.5 (C-1'), 21.2 (C-5').

Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[317]

8.6.2.4 Synthese von racemischen Standards für die Enantiomerenanalytik von verschiedenen Hexahydropyrrolo[2,3-b]indolinen über eine dearomatisierende Zyklisierung



2. Chemoselektive Schützung & Entschützung & Carbamoylierung



Schema 11. Allgemeines Reaktionsschema der Synthesen zu verschiedenen racemischen Standards für die Enantiomerenanalytik.

Alle racemischen Standard Verbindungen *rac-2a*, *rac-2e* und *rac-2m* wurden auf die unter **Schema 11** dargestellte Weise zugänglich gemacht.

8.6.2.4.1 Dearomatisierende Zyklisierung

79b, 79c, 79d oder 3g (aus 8.7.2.1) (1.00 Äq.) in trockenem THF (0.05 mmol (79b, 79c, 79d oder 3g) pro mL THF) wurden in einem Ofen getrockneten Schlenkkolben unter Argon Atmosphäre bei RT zu Kalium-tert-butanolat (3.00 Äg.) hinzugegeben und anschließend für 30 min gerührt. Zu dieser Lösung wurde Triethylboran (1 м in THF, 5.00 Äg.) langsam zugetropft und für 30 min bei RT gerührt. Durch Zugabe von Methyliodid (4.00 Äg.) wurde die Methylierung gestartet und die Reaktion für 24 h bei 40 °C gerührt. Nach Abschluss der Reaktion, welche mittels DC überwacht wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von Ammoniumchlorid gestoppt. Die wässrige Phase wurde im Anschluss 3-mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung + 1–5 % [Kieselgel; EE/PE (v/v)Methanol] die racemischen ergab Hexahydropyrrolo[2,3-b]indoline als gelbes Öl. Als Nebenprodukt konnten hier auch die N-methylierten Verbindungen isoliert werden.

1-(5-Methoxy-3a-methyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indol-1-yl)ethan-1-on (rac-2l)



rac-21 wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.4.1 aus 79a (1.2 g, O 5.2 mmol) hergestellt und 750 mg (3.1 mmol, 60 %) als orangenes
 O noch der mit Öl nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 80:20) isoliert. Zwei Rotamere konnten bei 20°C beobachtet werden.

¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.68 (d, ⁴J_{4,6} = 2.6 Hz, 1H, 4-H), 6.75 $(dd, {}^{3}J_{67} = 8.4 Hz, {}^{4}J_{64} = 2.6 Hz 1H, 6-H), 6.51 (d, {}^{3}J_{76} = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.14 (s, 1H, 8a-H),$ 3.74 (s, 3H, 1"'-H), 3.59-3.54 (m, 1H), 3.24-3.18 (m, 1H), 2.31-2.26 (m, 1H), 2.13-2.08 (m, 1H), 2.00 (s, 3H, 2'-H), 1.39 (s, 3H, 1"-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.19 (C-1'), 153.64 (C-7a), 142.72 (C-5), 134.69 (C-4a), 112.40 (C-6), 109.91 (C-4), 109.60 (C-7), 82.56 (C-8a), 56.04 (C-1'"), 52.64 (C-3a), 47.63 (C-2), 37.17 (C-3), 24.05 (C-1"), 22.66 (C-2'). IR (ATR-film): v = 3350, 2948, 1627, 1490, 1435, 1279, 1197, 1032 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₄H₁₈N₂O₂+H⁺: 276.1348 [M+H]⁺; gefunden: 276.1346.

Die Daten Stimmen mit der Literatur überein.^[140]

1-(5-Methoxy-3a-methyl-3.3a.8.8a-tetrahydropyrrolo[2.3-b]indol-1-yl)-2.2dimethylpropan-1-on (rac-2q)



rac-2q wurde entsprechend der Vorschrift 8.6.2.4.1 aus 79b (1.7 g, (EE/PE 60:40) isoliert. Zwei Rotamere konnten bei 20 °C

beobachtet werden. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.67 und 7.94 (d, ⁴J_{4.6} = 2.7 Hz, 1H, 4-H), 6.50 und 7.55 (dd, ${}^{3}J_{6.7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6.4}$ = 2.6 Hz 1H, 6-H), 6.50 und 6.87 (d, ³J_{7.6} = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.23 und 5.28 (s, 1H, 8a-H), 3.75 and 3.84 (s, 3H, 1"-H), 3.25 und 3.90 (m, 1H), 2.95-2.88 (m, 1H), 2.27-2.23 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.40 und 1.33 (s, 3H, 1"-H), 1.21 und 1.08 (s, 9H, 3'-H). ¹³C NMR-(151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = δ 178.26, 177.10, 158.93, 153.42, 148.46, 144.46, 121.88, 112.72, 112.68, 109.61, 109.43, 108.28, 84.73, 56.91, 55.97, 55.72, 47.66, 38.23, 36.33, 36.23, 27.35, 27.24, 24.27, 21.41. IR (ATRfilm): v = 3354, 2960, 1614, 1480, 1290, 1174, 1033, 845 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₂₄N₂O₂ +H⁺: 289.1911 [M+H]⁺; gefunden: 289.1915.

1-(3a-Methyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indol-1-yl)ethan-1-on (2m)



rac-2m wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.1** aus **3g** (410 mg, 2.0 mmol) hergestellt und 335 mg (1.5 mmol, 75 %) als hellgelber, klebriger Feststoff nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. Zwei Rotamere konnten dabei beobachtet

werden. ¹H-NMR (600 MHz, chloroform-d): δ[ppm] = 7.08-7.04 (m, 2H), 6.75 (t, ${}^{3}J_{5.7,6}$ = 8.1 Hz 1H, 5-H), 6.59-6.57 (m, 1H), 5.24 (s, 1H, 8-H), 5.16 (s, 1H, 8a-H), 3.59-3.54 (m, 1H), 3.24-3.18 (m, 1H), 2.31-2.26 (m, 1H), 2.13-2.08 (m, 1H), 2.00 (s, 3H, 2'-H), 1.41 (s, 3H, 1"-H).¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.16 (C-1'), 148.78 (C-7a), 133.05 (C-4a), 128.32 (C-6), 122.40 (C-4), 118.88 (C-5), 109.37 (C-7), 81.88 (C-8a), 52.27 (C-3a), 47.39 (C-2), 37.23 (C-3), 24.28 (C-1"), 22.64 (C-2'); HPLC (Chiracel OD-H 100A, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 95:5) t_R: (E₁) 36.8 min t_R: (E₂) 60.5 min.

Die Daten Stimmen mit der Literatur überein.^[140]

Methyl-5-(benzyloxy)-N-(methoxycarbonyl)-3a-methyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indol (rac-86b)



rac-86b wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.1** aus **79d** (425 mg, 1.3 mmol) hergestellt und 335 mg (1.0 mmol, 77 %) als hellgelber, klebriger Feststoff nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 7.42

(d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.37 (dd, J = 8.4, 6.8 Hz, 2H), 7.34-7.28 (m, 1H), 6.75 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 8.4, 4.5 Hz, 1H), 5.06 und 5.01 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.76 und 3.68 (s, 3H), 3.59 (ddd, J = 10.3, 8.1, 1.9 Hz, 1H), 3.14-3.03 (m, 1H), 2.20 (tdd, J = 12.8, 6.5, 2.0 Hz, 1H), 2.08-1.97 (m, 1H), 1.39 (d, J = 1.5 Hz, 3H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] =155.59, 154.78, 153.07, 152.94, 142.87, 142.53, 137.45, 137.41, 135.10, 135.04, 128.52, 127.87, 127.62, 114.21, 114.06, 110.93, 110.91, 109.97, 109.85, 82.97, 82.49, 77.25, 77.03, 76.82, 71.17, 54.29, 53.21, 52.57, 52.26, 46.21, 45.79, 37.07, 36.92, 24.35, 24.16. **IR** (ATR-film): $\tilde{v} = 2963$, 1694, 1490, 1442, 1376, 1281, 1190, 1024, 866 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₂₀H₂₂N₂O₃ +H⁺: 339.1703 [M+H]⁺; gefunden: 339.1711. **HPLC** (Chiracel OD-H 100A, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10) t_R: (E₁) 45.3 min t_R: (E₂) 55.5 min.

Als Nebenprodukt konnte die N-methylierte Verbindung (rac-87b) ebenfalls erhalten werden.

Methyl-5-(benzyloxy)-3a,8-Dimethyl-N-(methoxycarbonyl)-3,3a,8,8atetrahydropyrrolo[2,3-b]indol (rac-87b)



rac-87b wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.1** aus **79d** (425 mg, 1.3 mmol) hergestellt und 50 mg (0.2 mmol, 15 %) als hellgelber, klebriger Feststoff nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. Zwei Rotamere konnten bei 20 °C beobachtet

werden. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 7.43 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.35-7.29 (m, 1H), 6.77-6.71 (m, 2H), 6.32 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 5.15 und 5.03 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.72 und 3.70 (s, 3H), 3.23-3.12 (m, 1H), 2.95 und 2.85 (s, 3H), 2.10-2.00 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 1H), 1.40 (s, 3H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 152.13, 137.58, 128.49, 127.81, 127.59, 113.80, 111.01, 106.75, 89.93, 89.18, 77.22, 77.01, 76.80, 71.27, 52.42, 51.75, 46.45, 46.21, 38.83, 38.35, 34.27, 33.57, 24.44, 24.16. IR (ATR-film): $\bar{v} = 2955$, 1699, 1496, 1444, 1381, 1282, 1193, 1092, 865 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₂₁H₂₄N₂O₃ +H⁺: 353.1860 [M+H]⁺; gefunden: 353.1866. HPLC (Chiracel OD-H 100A, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10) t_R: (E₁) 22.1 min t_R: (E₂) 26.2 min.

5-(Benzyloxy)-3a,8-dimethyl-N-(acetyl)-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indol (rac-87a)



*rac-*87a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.1** aus **79** (425 mg, 1.3 mmol) hergestellt und 310 mg (0.9 mmol, 72 %) als hellgelbes Öl nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. Zwei Rotamere konnten bei 20 °C beobachtet werden. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d):

δ[ppm] = 7.42 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.37 (dd, *J* = 8.4, 6.8 Hz, 2H), 7.34-7.28 (m, 1H), 6.80-6.70 (m, 2H), 6.71 (dd, *J* = 8.4, 2.6 Hz, 1H), 6.53 (dd, *J* = 8.4, 4.5 Hz, 1H), 5.36 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.62 (m, 1H), 3.14-3.03 (m, 1H), 2.96 (s, 1H), 2.15 (tdd, *J* = 12.8, 6.5, 2.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.95 (m, 1H), 1.39 (d, *J* = 1.5 Hz, 3H). ¹³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.53, 152.12, 145.33, 137.53, 128.53, 128.51, 127.89, 127.85, 127.61, 113.78, 113.73, 110.97, 110.91, 107.43, 106.82, 91.41, 88.04, 77.24, 77.03, 76.82, 71.22, 71.14, 51.31, 47.63, 39.01, 34.83, 24.24, 24.19, 22.93. **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 2951, 1673, 1444, 1376, 1282, 1190, 1036, 866 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₂₁H₂₄N₂O₂ +H⁺: 337.1810 [M+H]⁺; gefunden: 337.1812.

8.6.2.4.2 Methoxy Entschützung, N-Benzyl Schützung und Carbamoylierung

Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol **rac-2l** oder **rac-2q** (1.00 Äq.) wurden in trockenem Dichlormethan (0.1 mmol **rac-2l** oder **rac-2q** pro mL DCM) gelöst und unter Argon Atmosphäre in einen Ofen getrockneten Schlenkkolben überführt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und vorsichtig Bortribromid Lösung (1 M in Dichlormethan, 5.00 Äq.) tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion auf RT über 30 min aufgewärmt. Nachdem die Reaktion vollständig abgelaufen war, was mit Hilfe von DC kontrolliert wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Hydrogencarbonat Lösung vorsichtig gestoppt, bis zum Ende der Gasund Blasenbildung.

Die wässrige Phase wurde im Anschluss 3-mal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Produkt wurde anschließend in einem trockenen Schlenkkolben für eine Stunde unter Vakuum getrocknet und als Rohprodukt direkt für die nächste Reaktion verwendet Im folgenden Schritt wurde das sorgfältig getrocknete Rohprodukt (1.00 Äq.) in trockenem Dichlormethan (0.1 mmol *rac-2*I oder *rac-2*q pro mL DCM) unter Argon Atmosphäre gelöst und bei 0 °C Benzylbromid (3.00 Äq.) zugegeben. Die Reaktion wurde anschließend bei 30 °C für 16 Stunden gerührt und nachdem die Reaktion vollständig abgelaufen war, welches mittels DC überprüft wurde, durch Zugabe von 1 M KPI-Puffer (pH 7.5) gestoppt. Die wässrige Phase wurde 3-mal mit Ethylacetat extrahiert, die gesammelte organische Phase mit gesättigter NaCl Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Um überschüssiges Benzylbromid zu entfernen, wurde das Rohprodukt 3-mal mit Pentan (0.01 mmol *rac-2*I oder *rac-2*q pro mL Pentan) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde als solches für den nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

Eine Lösung des Rohproduktes (1.00 Äq.) und Triethylamin (10.0 Äq.) in trockenem THF (0.07 mmol *rac-21* oder *rac-2q* pro mL THF) wurde für 15 Minuten bei RT unter inerten Bedingungen gerührt. Zu dieser Lösung wurden anschließend Carbamoylchlorid (5.00 Äq.) und DMAP (0.20 Äq.) zugegeben und die Reaktion bei 50 °C gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels DC verfolgt. Nachdem ein vollständiger Umsatz beobachtet wurde, konnte die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid Lösung gestoppt werden. Anschließend wurde der Reaktionsansatz 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; EE/PE + 1–5 % (v/v) Methanol] ergab die carbamoylierten und *N*-Benzyl geschützten Hexahydropyrolloindole als farbiges ÖI.

1-Acetyl-8-benzyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (rac-82a)



rac-82a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.2** aus *rac-2*I (750 mg, 2.2 mmol) hergestellt und 165 mg (0.4 mmol, 18 % über drei Schritte) als gelbes Öl nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 7.27-7.25 (m, 4H), 7.21-7.18 (m, 1H), 6.81 (d, ⁴J_{4,6} = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.73 (dd, ³J_{6,7} = 8.4 Hz, ⁴J_{6,4} = 2.4 Hz 1H, 6-H),

6.22 (d, ³J_{7.6} = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.64 (s, 1H, 8a-H), 4.67 (s, 2H, 1""-H), 3.62 (s, 3H, 2""-H), 3.65-3.58 (m, 1H), 3.40-3.35 (m, 1H), 2.87 (d, ³J_{3",2"} =5.0 Hz, 3H, 3"'-H), 2.25-2.20 (m, 1H), 2.02-1.98 (m. 1H). 1.97 (s, 3H, 2'-H), 1.36 (s. 3H. 1"-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.09 (C-1'), 156.11 (C-7a), 147.29 (C-1'''), 142.72 (C-5), 139.38 (C-2""), 134.59 (C-4a), 128.30 (C-3""), 127.00 (C-4""), 126.67 (C-5""), 121.02 (C-4), 116.44 (C-6), 106.12 (C-7), 85.84 (C-8a), 51.04 (C-1""), 50.65 (C-3a), 47.20 (C-2), 39.45 (C-3), 27.71 (C-3"), 25.14 (C-1"), 22.69 (C-2'). IR (ATR-film): v = 3324, 2949, 1693, 1643, 1519, 1412, 1209, 1147, 947 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₂₂H₂₅N₃O₃+H⁺:380.1969 [M+H]⁺; aefunden: 380.1971.

8-Benzyl-3a-methyl-1-pivaloyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (rac-82b)



rac-82b wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.2** aus *rac-2***q** (1.2 g, 3.4 mmol) hergestellt und 600 mg (1.4 mmol, 41 % über drei Schritte) als hellgelbes Öl nach der säulenchromatographischen Reinigung (EE/PE 70:30) isoliert. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 7.25-7.23 (m, 4H), 7.21-7.18 (m, 1H), 6.80 (d, ⁴J_{4,6} = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.73 (dd, ³J_{6,7})

= 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.4 Hz 1H, 6-H), 6.20 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.82 (s, 1H, 8a-H), 4.73 (d, ${}^{2}J_{1^{'''}a_1,1^{'''}b_1}$ = 16.3 Hz,1H, 1^{'''}a-H), 4.58 (d, ${}^{2}J_{1^{'''}a_1,1^{'''}a_2}$ = 16.3 Hz,1H, 1^{''''}b-H), 3.97 (m, 1H), 3.30 (m, 1H), 2.87 (d, ${}^{3}J_{3^{''},2^{'''}}$ =5.0 Hz, 3H, 3^{'''}-H), 2.25-2.20 (m, 1H), 1.96-1.90 (m, 1H), 1.38 (s, 3H, 1''-H), 1.10 (s, 9H, 3'-H), 1³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 176.84 (C-1'), 156.15 (C-7a), 147.98 (C-1'''), 142.77 (C-5), 139.92 (C-2'''), 134.69 (C-4a), 128.20 (C-3'''), 126.86 (C-4'''), 126.52 (C-5'''), 120.97 (C-4), 116.46 (C-6), 105.44 (C-7), 87.50 (C-8a), 50.94 (C-1'''), 50.15 (C-3a), 47.02 (C-2), 40.50 (C-3), 38.79 (C-2'), 27.73 (C-3'''), 27.39 (C-3'), 26.38 (C-1''). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3330, 2961, 1738, 1615, 1414, 1410, 1209, 1147, 949, 731 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₂₅H₃₁N₃O₃+H*: 422.2438 [M+H]*; gefunden: 422.2440.

1-Acetyl-3a,8-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-N-methylcarbamat (rac-5a)



rac-5a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.3** aus *rac-87a* (135 mg, 0.4 mmol) hergestellt und 34 mg (0.1 mmol, 25 % über zwei Schritte) als gelber Film nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 90:10) isoliert. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.85 (d, ⁴J₄₆ = 2.3

Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.52 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.16 (s, 1H, 8a-H), 3.57 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 2.96 (s, 3H, 1""-H), 2.88 (d, ${}^{3}J_{3",2"}$ = 4.9 Hz, 3H, 3""-H), 2.27-2.23 (m, 1H), 2.12-2.08 (m, 1H), 2.01 (s, 3H, 2'-H), 1.40 (s, 3H, 1"-H). 13 C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 170.23 (C-1'), 156.01 (C-7a), 146.17 (C-1"), 143.93 (C-5), 133.95 (C-4a), 121.22 (C-4), 116.33 (C-6), 109.39 (C-7) , 82.48 (C-8a), 52.47 (C-3a), 47.37 (C-2), 39.05 (C-1""), 37.11 (C-3), 27.73 (C-3"), 24.11 (C-1"), 22.64 (C-2'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3320, 2958, 1725, 1635, 1490, 1414, 1248, 1189, 1117, 733 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H⁺: 304.3123 [M+H]⁺; gefunden: 304.3126; HPLC (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 80:20) t_R (E₁): 24.6 min t_R (E₂): 37.4 min.

Die Daten stimmen mit der Literatur überein.^[34]

8.6.2.4.3 N-Benzyl Entschützung

Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol **rac-82a** oder **rac-82b** (1.00 Äq.) und 10 % Pd/C (0.10 Äq.) wurden unter Stickstoff Atmosphäre bei -40 °C in Methanol (7 µmol **rac-82a** oder **rac-82b** pro mL Methanol) gelöst. Anschließend wurde der Kolben 3-mal mit Wasserstoff aus einem mit Hilfe mit Wasserstoff gefülltem Ballon gespült, bis eine gesättigte Wasserstoffatmosphäre im Schlenkkolben erreicht war. Nach Abschluss der Reaktion, welche mittels DC überprüft wurde, wurde das Produktgemisch über Ceelite gefiltert und die vereinigte organische Phase unter reduziertem Druck konzentriert. Die säulenchromatographische Reinigung [Kieselgel; EE/PE] ergab die Hexahydropyrolloindole als farbiges ÖI.

1-Acetyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-N-methylcarbamat (rac-2a)



Rac-2a wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.3** aus *rac-82a* (55 mg, 145 μmol) hergestellt und 7 mg (20 μmol, 14 %) als farbloser Film nach der säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE 90:10) isoliert. ¹H-NMR

(600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 6.85 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.52 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.16 (s, 1H, 8a-H), 3.57 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 2.88 (d, ${}^{3}J_{3'',2''}$ = 4.9 Hz, 3H, 3'''-H), 2.27-2.23 (m, 1H), 2.12-2.08 (m, 1H), 2.01 (s, 3H, 2'-H), 1.40 (s, 3H, 1''-H). 1³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.23 (C-1'), 156.01 (C-7a), 146.17 (C-1'''), 143.93 (C-5), 133.95 (C-4a), 121.22 (C-4), 116.33 (C-6), 109.39 (C-7), 82.48 (C-8a), 52.47 (C-3a), 47.37 (C-2), 37.11 (C-3), 27.73 (C-3'''), 24.11 (C-1''), 22.64 (C-2'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 3323, 2930, 1720, 1635, 1484, 1442, 1254, 1186 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₃+H⁺: 290.1499 [M+H]⁺; gefunden: 290.1502; **HPLC** (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 μL, 0.5 mL/min , UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 80:20) t_R (E₁): 35.9 min t_R (E₂): 61.2 min.

3a-Methyl-1-pivaloyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-N-methylcarbamat (rac-2e)



Rac-2e wurde entsprechend der Vorschrift **8.6.2.4.3** aus *rac-82b* (105 mg, 245 µmol) hergestellt und 8 mg (30 µmol, 12 %) über drei Schritte) als farbloser, dünner Film nach der säulenchromaographischen Reinigung (EE/PE 90:10) isoliert. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.84 (d, ⁴J_{4.6} = 2.3 Hz,

1H, 4-H), 6.77(dd, ³J_{6.7} = 8.4 Hz, ⁴J_{6.4} = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.50 (d, ³J_{7.6} = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.25 (s, 1H, 8a-H), 3.90 (m, 1H), 3.27 (m, 1H), 2.88 (d, ³J_{3".2"} =5.0 Hz, 3H, 3"-H), 2.27-2.23 (m, 1H), 2.10-2.00 (m. 1H), 1.40 (s. 3H, 1"-H), 1.22 (s. 9H. 3'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 177.53 (C-1'), 156.05 (C-7a), 146.38 (C-1''), 143.69 (C-5), 134.69 (C-4a), 121.08 (C-4), 116.30 (C-6), 108.83 (C-7), 84.61 (C-8a), 54.13 (C-3a), 47.66 (C-2), 38.90 (C-2'), 38.32 (C-3), 28.90 (C-3''), 27.56 (C-3'), 24.39 (C-1''). IR (ATR-film): v = 3344, 2938, 1612, 1432, 1290, 1174, 845 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₈H₂₄N₃O₃+H⁺: 332.1969 [M+H]⁺; gefunden: 332.1964; **HPLC** (LuxAmylose-1, 250 × 4.6 mm, 25 °C, 10 µL, 1.0 mL/min , UV 205 nm, *n*-Heptan:Isopropanol 90:10) t_R(E₁): 24.8 min, t_R(E₂): 53.2 min.

8.7 Präparative Biokatalyse

8.7.1 Herstellung von Physostigmin Analoga mit SgPsmD und CtHMT



Schema 12. Reaktionsschema für die präparative biokatalytische Herstellung von Physostigmin Analoga mit PsmD aus *Streptomyces griseofuscus*.

Für jede Reaktion wurden 1.5 g *Ct*HMT Zellpellet in 25 mL Puffer (100 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Das entstandene Lysat wurde für 30 min zentrifugiert (6000 *rpm*, 4 °C) und der Überstand komplett für die nachfolgende Reaktion genutzt. Das *Ct*HMT Lysat (15 mL, 0.09 U/mL) wurde mit Puffer (100 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA) auf das passende Endvolumen angepasst und das jeweilige Substrat **4** (0.85 mL, 2 mM als 200 mM Stammlösung in DMSO, aus **8.6.2.2.1**) dazugegeben. Zu dieser Lösung wurden anschließend gereinigtes *Sg*PsmD (1.7 mL, 6.7 µM,16 U/g in 100 mM KP_i, pH 7.5), Methyliodid (2.2 mL, 13 mM als 500 mM Stammlösung in DMSO) und SAH (85 µL, 20 µM als 20 mM Stammlösung in DMSO) zugegeben. Nach 16 h bei 35 °C und 300 *rpm* wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethylacetat gestoppt. Das Produkt wurde anschließend dreimal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, mit NaS₂O₄ getrocknet und unter reduziertem Druck aufkonzentriert. Das finale Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol wurde durch Säulenchromatographie (EE/PE, 9:1) gereinigt.

(3aS,8aS)-1-Acetyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2a)



2a wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.1 hergestellt. Dafür säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

42 mg (145 µmol, 84 %) von 2a als hellgelbes Öl erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit rac-2a überein. HPLC (NP): (Chiracel OD-H, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, 205 nm, *n*-Heptan: Isopropanol 80:20) $t_{\rm R} = 61.2$ min; $[\alpha]^{20}{}_{\rm D} - 80$ (c = 1, CHCl₃); UV LC-MS (API-ES, 70 eV): $t_R = 6.12$ min. Gehalt: 93.5 ± 2.0 % (gNMR). Die analytischen Daten stimmen mit *rac-2a* überein.

(3aS.8aS)-3a-Methyl-1-pivaloyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2e)



2e wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.1 hergestellt. Dafür $HN_{1} = 0$ $HN_$ säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

14 mg (42 µmol, 25 %) von 2e als hellgelbes Öl erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit rac-2e überein. HPLC (NP): (LuxAmvlose-1, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 1.0 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan: Isopropanol 90:10) $t_R = 53.2$ min; $[\alpha]^{20}_D$ -84 (c = 1, CHCl₃); **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_{R} = 6.88 min. Die analytischen Daten stimmen mit *rac-2e* überein.

1-((3aS,8aS)-3a-Methyl-3,3a,8,8a-tetrahydropyrrolo[2,3-b]indol-1yl)ethan-1-on (2m)



2m wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.1 hergestellt. Dafür wurden 35 mg (0.17 mmol) des Substrats 4m und 160 mg (1.10 mmol) Methyliodid eingesetzt. Zur Umsetzung des Substrats 4m wurde über den Reaktionsverlauf hinweg mehrfach Enzym hinzugefügt, insgesamt die

10-Fache Menge Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden 8 mg (36 µmol. 21 %) 2m als farbloser Film erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit rac-2m überein. HPLC (NP): (Chiracel OD-H 100A, 250 × 4.6 mm², 25 °C, 10 µL, 0.5 mL/min, UV 205 nm, *n*-Heptan: Isopropanol 95:5) $t_R = 60.5$ min; $[\alpha]^{20}p$ -67 (c = 1, CHCl₃). Die analytischen Daten stimmen mit *rac-2m* überein.

8.7.2 Herstellung von Physostigmin Analoga mit SaPsmD und CtHMT



Schema 13. Reaktionsschema für die präparative biokatalytische Herstellung von Physostigmin Analoga mit PsmD aus *Streptomyces albulus*.

Für jede Reaktion wurden 3 g *Ct*HMT Zellpellet in 30 mL Puffer (100 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA) und 1.5 g *Sa*PsmD Zellpellet in 15 mL Puffer (100 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA) resuspendiert und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Das entstandene Lysat wurde für 30 min zentrifugiert (6000 *rpm*, 4°C) und der Überstand komplett für die nachfolgende Reaktion genutzt. Die Lysate wurden mit Puffer (100 mM KP_i, pH 7.5, 1 mM EDTA) auf das passende Endvolumen angepasst und Substrat **4** (1.10 mL, 2 mM als 200 mM Stammlösung in DMSO) dazugegeben. Zu dieser Lösung wurde anschließend Methyliodid (3.8 mL, 20 mM als 500 mM Stammlösung in DMSO) zugegeben. Nach 16–48 h bei 35 °C und 300 *rpm* wurde die Reaktion durch Zugabe von Ethylacetat gestoppt. Das Produkt wurde anschließend 3-mal mit je 50 mL Ethylacetat extrahiert, mit NaS₂O₄ getrocknet und unter reduziertem Druck konzentriert. Das Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol **4** wurde durch Säulenchromatographie (EE/PE, 9:1) gereinigt und als reine Verbindung erhalten.

(3aS,8aS)-1-Propanoyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2b)



2b wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.2 hergestellt. Dafür ³ ^{8a}N ¹ ¹ ¹ ¹ ¹ ² ³ ³ (1.65 mmol) wurden 61 mg (0.22 mmol) des Substrats 4b und 245 mg Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

44 mg (145 µmol, 66 %) von 2b als hellbraunes Öl erhalten. ¹H-NMR (600 MHz, Chloroformd): δ[ppm] = 6.87 (d, ⁴J_{4.6} = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.80 (dd, ³J_{6.7} = 8.3 Hz, ⁴J_{6.4} = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.61 (d, ³J_{7.6} = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 5.23 (s, 1H, 8a-H), 3.74-3.68 (m, 1H), 3.60-3.56 (m, 1H), 3.29-3.26 (m, 1H), 2.87 (d, ³J_{3",2"} = 4.7 Hz, 3H, 3"-H), 2.32-2.08 (m, 4H),1.40 (s, 3H, 1"-H), 1.11 (t, ³J_{3^m, 4^m} = 7.4 Hz, 3H, 3'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 173.55 (C-1'), 155.93 (C-7a), 144.61 (C-1""), 143.88 (C-5), 134.67 (C-4a), 121.34 (C-4), 116.37 (C-6), 110.47 (C-7), 82.63 (C-8a), 52.30 (C-3a), 46.52 (C-2), 37.26 (C-3), 27.84 (C-3"), 27.74 (C-2'), 24.10 (C-1"), 8.59 (C-3'). **IR** (ATR-film): \tilde{v} = 2929, 1726, 1629, 1484, 1432, 1250, 1184 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H⁺: 304.1656 [M+H]⁺; gefunden: 304.1658; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.42 min; Gehalt: 99.3 ± 3.0 % (qNMR). [α]²⁰_D -56 (c = 1. CHCl₃).

(3aS,8aS)-1-Butanoyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2c)



2c wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.2 hergestellt. Dafür säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

55 mg (172 µmol, 78 %) von **2c** als violettes Öl erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 6.87 (d, ⁴J_{4.6} = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.80 (dd, ³J_{6.7} = 8.4 Hz, ⁴J_{6.4} = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.62 (d, ³J_{7.6} = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.24 (s, 1H, 8a-H), 3.60 (m, 1H), 3.40-3.24 (m, 1H), 2.88 (d, ³J_{3",2"} = 4.9 Hz, 3H, 3"-H), 2.32-2.05 (m, 4H), 1.66 – 1.60 (m, 2H), 1.40 (s, 3H, 1"-H), 0.93 (t, ³J_{3',4'} = 7.4 Hz, 3H, 4'-H). ¹³C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 172.89 (C-1'), 155.90 (C-7a), 144.36 (C-1""), 142.68 (C-5), 134.68 (C-4a), 121.33 (C-4), 116.36 (C-6), 110.47 (C-7) , 82.57 (C-8a), 52.29 (C-3a), 46.65 (C-2), 37.28 (C-3), 36.61 (C-2') 27.29 (C-3'''), 24.09 (C-1''), 17.94 (C-3'), 13.91 (C-4'). IR (ATR-film): v = 2929, 1728, 1625, 1476, 1438, 1244, 1186 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₂₃N₃O₃+H⁺: 318.1818 [M+H]⁺; gefunden: 318.1812; LC-**MS** (API-ES, 70 eV): $t_R = 6.87$ min; **Gehalt:** 95.3 ± 2.3 % (qNMR). $[\alpha]^{20}_{P}$ -71 (c = 1, CHCl₃).

(3aS,8aS)-1-IsobutanoyI-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yI-Nmethylcarbamat (2d)



2d wurde entsprechend der Vorschrift 8.7.2 hergestellt. Dafür wurden 67 mg (0.22 mmol) des Substrats 4d und 245 mg (1.65 mmol) -3' Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden 35 mg (110 μmol, 50 %) von 2d als braunes Öl erhalten. ¹H NMR-(600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 6.85 (d, ⁴J_{4,6} =

2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.5 Hz 1H, 6-H), 6.51 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 5.18 (s, 1H, 8a-H), 3.68-3.63 (m, 1H), 3.30-3-25 (m, 1H), 2.88 (d, ${}^{3}J_{3",2"}$ = 4.9 Hz, 3H, 3'''-H), 2.57-2.52 (m, 1H), 2.29-2.25 (m, 1H), 2.12-2.08 (m, 1H), 1.40 (s, 3H, 1''-H), 1.12 (d, ${}^{3}J_{2',3'}$ = 6.8 Hz, 3H, 3'-H), 1.05 (d, ${}^{3}J_{2',3'}$ = 6.8 Hz, 3H, 3'-H). 13 C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 176.74 (C-1'), 156.04 (C-7a), 146.27 (C-1'''), 143.85 (C-5), 134.00 (C-4a), 121.18 (C-4), 116.32 (C-6), 109.22 (C-7), 82.71 (C-8a), 52.06 (C-3a), 46.35 (C-2), 37.28 (C-3), 29.71 (C-2'), 27.73 (C-3'''), 24.21 (C-1''), 18.92 (C-3'), 18.68 (C-3'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 2929, 1724, 1627, 1474, 1432, 1244, 1186 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₇H₂₃N₃O₃+H⁺: 318.1812 [M+H]⁺; gefunden: 318.1814; LC-MS (API-ES, 70 eV): t_R = 6.17 min.

(3aS,8aS)-3a-Methyl-1-pivaloyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2e)



2e wurde entsprechend der Vorschrift **8.7.2** hergestellt. Dafür wurden 70 mg (0.22 mmol) des Substrats **4e** und 245 mg (1.65 mmol) Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

14 mg (2 µmol, 19 %) von **2e** als hellgelbes Öl erhalten. Die analytischen Daten stimmen mit den zuvor erhaltenen Daten überein.

(3aS,8aS)-1-Acetyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-N,Ndimethylcarbamat (2g)



2g wurde entsprechend der Vorschrift8.7.2 hergestellt. Dafürwurden 63 mg (0.22 mmol) des Substrats4g und 245 mg(1.65 mmol)Methyliodideingesetzt.säulenchromatographischerReinigung (EE/PE, 9:1)

(159 µmol, hellgelbes Öl 46 mg 72 %) von 2q als erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.84 (d, ⁴J_{4.6} = 2.4 Hz, 1H, 4-H), 6.78 $(dd, {}^{3}J_{67} = 8.3 Hz, {}^{4}J_{64} = 2.4 Hz 1H, 6-H), 6.53 (d, {}^{3}J_{76} = 8.3 Hz, 1H, 7-H), 5.16 (s, 1H, 8a-H),$ 3.56 (m, 1H), 3.28-3.24 (m, 1H), 3.07 (3H, 3"-H), 2.99 (3H, 3"-H), 2.30-2.28 (m, 1H), 2.12-2.09 (m, 1H), 2.00 (s, 3H, 2'-H),1.40 (s, 3H, 1"-H).¹³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.25 (C-1'), 155.64 (C-7a), 145.84 (C-1'"), 144.52 (C-5), 134.02 (C-4a), 121.36 (C-4), 116.51 (C-6), 109.62 (C-7), 83.63 (C-8a), 52.50 (C-3a), 47.40 (C-2), 37.12 (C-3), 36.70 (C-3"), 36.39 (C-3"), 24.10 (C-1"), 22.64 (C-2'). IR (ATR-film): v = 2929, 1716, 1638, 1486, 1443, 1386, 1182, 1062 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H⁺: 304.1656 [M+H]⁺; gefunden: 304.1657; **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_{R} = 7.20 min; **Gehalt:** 96.8 ± 3.3 % (gNMR). $[\alpha]^{20}_{D}$ -91 (c = 1, CHCl₃).

(3aS,8aS)-1-Acetyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nethylcarbamat (2h)



2h wurde entsprechend der Vorschrift **8.7.2** hergestellt. Dafür wurden 64 mg (0.22 mmol) des Substrats **4h** und 245 mg (1.65 mmol) Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden

52 mg (171 μmol, 78 %) von **2h** als hellgelbes Öl erhalten. ¹**H-NMR** (600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 6.81 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.80 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.58 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.20 (s, 1H, 8a-H), 3.60-3.55 (m, 1H), 3.29-3.26 (m, 3H), 2.30-2.28 (m, 1H), 2.12-2.09 (m, 1H), 2.00 (s, 3H, 2'-H),1.40 (s, 3H, 1"-H), 1.20 (t, ${}^{3}J_{3", 4"}$ = 7.3 Hz, 3H, 4"'-H).¹³**C-NMR** (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 170.43 (C-1'), 155.10 (C-7a), 144.81 (C-1''), 143.93 (C-5), 134.71 (C-4a), 121.42 (C-4), 116.48 (C-6), 110.72 (C-7), 82.44 (C-8a), 52.58 (C-3a), 47.46 (C-2), 37.25 (C-3), 36.12 (C-3'''), 24.07 (C-1''), 22.63 (C-2'), 18.44 (C-4'''). **IR** (ATR-film): \bar{v} = 3314, 2969, 1721, 1624, 1483, 1443, 1235, 1184, 977 cm⁻¹. **HRMS** (ESI): m/z berechnet für C₁₆H₂₁N₃O₃+H⁺: 304.1654 [M+H]⁺; gefunden: 304.1661 **LC-MS** (API-ES, 70 eV): t_R = 6.69 min; **Gehalt:** 99.8 ± 4.5 % (qNMR). [α]²⁰_D -74 (p=1, CHCl₃).

(3aS,8aS)-1-Hexanoyl-3a-methyl-1,2,3,3a,8,8a-hexahydropyrrolo[2,3-b]indol-5-yl-Nmethylcarbamat (2r)



2r wurde entsprechend der Vorschrift **8.7.2** hergestellt. Dafür wurden 75 mg (0.22 mmol) des Substrats **4I** und 245 mg (1.65 mmol) Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden 15 mg (44 µmol, 20 %) von **2r** als hellgelbes Öl erhalten. ¹**H**-

NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 6.86 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.56 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.20 (s, 1H, 8a-H), 3.61-3.56 (m, 1H), 3.29-3.26 (m, 1H), 2.88 (d, ${}^{3}J_{3",2"}$ =5.0 Hz, 3H, 3"'-H), 2.32-2.03 (m, 5H), 1.66-1.55 (m, 3H), 1.40 (s, 3H, 1"-H), 1.33-1.20 (m, 3H), 0.85 (t, ${}^{3}J_{5',6'}$ = 7.3 Hz, 3H, 6'-H). 13 C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ [ppm] = 173.00 (C-1'), 155.97 (C-7a), 145.63 (C-1''), 144.26 (C-5), 133.33 (C-4a), 121.34 (C-4), 116.31 (C-6), 109.81 (C-7), 82.62 (C-8a), 52.25 (C-3a), 46.62 (C-2), 37.23 (C-3), 34.68 (C-3''), 31.56 (C-2'), 24.20 (C-3') 24.10 (C-1''), 22.37 (C-5'), 13.91 (C-6'). IR (ATR-film): \tilde{v} = 3329, 2957, 1722, 1624, 1540, 1485, 1441, 1250, 1183, 1115, 948 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₉H₂₇N₃O₃+H⁺: 346.2109 [M+H]⁺; gefunden: 346.2104.

(3aS,8aS)-3a-Methyl-5-((methylcarbamoyl)oxy)-N-(methoxycarbonyl)-3,3a,8,8atetrahydropyrrolo[2,3-b]indol (2s)



2s wurde entsprechend der Vorschrift **8.7.2** hergestellt. Dafür wurden 75 mg (0.22 mmol) des Substrats **4s** und 245 mg (1.65 mmol) Methyliodid eingesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (EE/PE, 9:1) wurden 45 mg (0.154 μmol, 70 %) von **2r** als farbloses Öl erhalten. ¹**H**-

NMR (600 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 6.84 (d, ${}^{4}J_{4,6}$ = 2.3 Hz, 1H, 4-H), 6.80 (dd, ${}^{3}J_{6,7}$ = 8.4 Hz, ${}^{4}J_{6,4}$ = 2.3 Hz 1H, 6-H), 6.54 (d, ${}^{3}J_{7,6}$ = 8.4 Hz, 1H, 7-H), 5.06 (s, 1H, 8a-H), 3.68 (s, 3H, 2'-H), 3.60-3.56 (m, 1H), 3.15-3.10 (m, 1H), 2.88 (d, ${}^{3}J_{3'',2''}$ =5.0 Hz, 3H, 3'''-H), 2.25-2.20 (m, 1H), 2.05-1.95 (m, 1H), 1.40 (s, 3H, 1''-H). 13 C-NMR (151 MHz, Chloroform-d): δ[ppm] = 156.29 (C-1'), 155.10 (C-7a), 145.92 (C-1'''), 144.58 (C-5), 134.46 (C-4a), 121.18 (C-4), 116.73 (C-6), 111.52 (C-7), 82.91 (C-8a), 52.30 (C-3a), 45.81 (C-2), 41.07 (C-2'), 37.11 (C-3), 29.17 (C-3'''), 27.74 (C-2), 25.74 (C-1'').IR (ATR-film): \tilde{v} = 2483, 1693, 1470, 1403, 1171 cm⁻¹. HRMS (ESI): m/z berechnet für C₁₅H₁₉N₃O₄+H⁺: 306.1451 [M+H]⁺; gefunden: 306.1448.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] B. Hauer, ACS Catal. 2020, 10, 8418-8427; 'Embracing Nature's Catalysts: A Viewpoint on the Future of Biocatalysis'.
- [2] C. K. Winkler, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 55-71; 'Power of Biocatalysis for Organic Synthesis'.
- [3] S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, Angew. Chem., Int. Ed. 2021, 60, 88-119; 'Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications'. Angew. Chem. 2021, 133, 89-123.
- [4] P. A. Romero, F. H. Arnold, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 866-876; 'Exploring protein fitness landscapes by directed evolution'.
- H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2015, *54*, 3351-3367;
 'Expanding the enzyme universe: accessing non-natural reactions by mechanism-guided directed evolution'. *Angew. Chem.* 2015, *127*, 3408-3426.
- [6] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nat.* 2012, 485, 185-194; 'Engineering the third wave of biocatalysis'.
- [7] A. A. Volkov. Frances H Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 54-59; 'Directed evolution of biocatalysts'.
- [8] J. B. Wang, G. Li, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* 2017, 53, 3916-3928; 'Enzymatic site-selectivity enabled by structure-guided directed evolution'.
- [9] G. Li, J. B. Wang, M. T. Reetz, *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 1241-1251; 'Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes'.
- [10] S. D. Stimple, M. D. Smith, P. M. Tessier, *AIChE J.* **2020**, *66*, e16814; 'Directed evolution methods for overcoming trade-offs between protein activity and stability'.
- [11] J. D. Fischer, G. L. Holliday, S. A. Rahman, J. M. Thornton, J. Mol. Biol. 2010, 403, 803-824; 'The structures and physicochemical properties of organic cofactors in biocatalysis'.
- [12] S. Mordhorst, J. N. Andexer, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1316-1333; 'Round, round we go strategies for enzymatic cofactor regeneration'.
- [13] M. D. Truppo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 476-480; 'Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed'.
- [14] J. Chapman, A. Ismail, C. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 238-264; 'Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks'.
- [15] F. Roschangar, R. A. Sheldon, C. H. Senanayake, *Green Chem.* 2015, 17, 752-768; 'Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry – the Green Aspiration Level[™] concept'.
- [16] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838; 'Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry'.
- [17] N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 285-288; 'Biocatalytic retrosynthesis'.
- [18] A. Wells, H.-P. Meyer, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 918-920; 'Biocatalysis as a Strategic Green Technology for the Chemical Industry'.
- [19] A. R. Alcántara, *Catalysts* **2019**, *9*; 792-800; 'Biocatalysis and Pharmaceuticals: A Smart Tool for Sustainable Development'.
- [20] J. Y. Trosset, P. Carbonell, *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 6285-6302; 'Synthetic biology for pharmaceutical drug discovery'.
- [21] K. S. Egorova, V. P. Ananikov, *Biophys. Rev.* **2018**, *10*, 881-900; 'Ionic liquids in wholecell biocatalysis: a compromise between toxicity and efficiency'.
- [22] M. Santi, L. Sancineto, V. Nascimento, J. Braun Azeredo, E. V. M. Orozco, L. H. Andrade, H. Groger, C. Santi, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 990-1024; 'Flow Biocatalysis: A Challenging Alternative for the Synthesis of APIs and Natural Compounds'.
- [23] S. Wu, Z. Li, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 2164-2178; 'Whole-Cell Cascade Biotransformations for One-Pot Multistep Organic Synthesis'.

- [24] J. L. Galman, F. Parmeggiani, L. Seibt, W. R. Birmingham, N. J. Turner, Angew. Chem., Int. Ed. 2021, 61, e202112855; 'One-Pot Biocatalytic In Vivo Methylation-Hydroamination of Bioderived Lignin Monomers to Generate a Key Precursor to L-DOPA'. Angew. Chem. 2021, 134, e202112855.
- [25] A. S. Klein, H. U. C. Brass, D. P. Klebl, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, S. Sievers, K. E. Jaeger, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1545-1552; 'Preparation of Cyclic Prodiginines by Mutasynthesis in *Pseudomonas putida KT2440*'.
- [26] A. S. Klein, A. Domroese, P. Bongen, H. U. C. Brass, T. Classen, A. Loeschcke, T. Drepper, L. Laraia, S. Sievers, K. E. Jaeger, J. Pietruszka, ACS Synth. Biol. 2017, 6, 1757-1765; 'New Prodigiosin Derivatives Obtained by Mutasynthesis in Pseudomonas putida'.
- [27] J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 25-34; 'Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products'.
- [28] S. D. Dreher, *React. Chem. Eng.* **2019**, *4*, 1530-1535; 'Catalysis in medicinal chemistry'.
- [29] S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner, S. L. Flitsch, ACS Catal. 2016, 7, 710-724; 'Constructing Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways'.
- [30] M. Å. Huffman, *Science* **2019**, *366*, 1-27; 'Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir'.
- [31] E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France, A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Nat. Rev. Meth. Pri.* 2021, *1*; 1-27; 'Biocatalysis'.
- [32] A. W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, J. Micklefield, *ChemBioChem* 2012, 13, 2642-2655; 'S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications'.
- [33] Z. Guo, *Acta. Pharm. Sin B* **2017**, 7, 119-136; 'The modification of natural products for medical use'.
- J. Liu, T. Ng, Z. Rui, O. Ad, W. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, 53, 136-139;
 'Unusual acetylation-dependent reaction cascade in the biosynthesis of the pyrroloindole drug physostigmine'. Angew. Chem. 2014, 126, 140-143.
- [35] D. A. Dias, S. Urban, U. Roessner, *Metabolites* **2012**, *2*, 303-336; 'A historical overview of natural products in drug discovery'.
- [36] A. S. Biondich, J. D. Joslin, *Emerg. Med. Int.* **2016**, *2016*, 4048764; 'Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition'.
- [37] I. Bauer, *Trop. Dis. Travel Med. Vaccines* **2019**, 5, 1-14; 'Travel medicine, coca and cocaine: demystifying and rehabilitating Erythroxylum a comprehensive review'.
- [38] E. Freye, in *Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs: A comprehensive review on their mode of action, treatment of abuse and intoxication, Springer Niederlande,* **2010**, S. 49-60.
- [39] R. Gaynes, *Emerging Infect. Dis.* **2017**, *23*, 849-853; 'The Discovery of Penicillin New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use'.
- [40] D. J. Newman, G. M. Cragg, J. Nat. Prod. 2020, 83, 770-803; 'Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019'.
- [41] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *82*, 775-789; 'Drugs and Drug Candidates from Marine Sources: An Assessment of the Current "State of Play".
- [42] C. Imperatore, A. Aiello, F. D'Aniello, M. Senese, M. Menna, *Molecules* 2014, 19, 20391-20423; 'Alkaloids from marine invertebrates as important leads for anticancer drugs discovery and development'.
- [43] J. S. Zarins-Tutt, T. T. Barberi, H. Gao, A. Mearns-Spragg, L. Zhang, D. J. Newman, R. J. Goss, *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33, 54-72; 'Prospecting for new bacterial metabolites: a glossary of approaches for inducing, activating and upregulating the biosynthesis of bacterial cryptic or silent natural products'.
- [44] D. J. Newman, Front. Microbiol. 2016, 7, 1832-1847; 'Predominately Uncultured Microbes as Sources of Bioactive Agents'.

- [45] C. F. Stratton, D. J. Newman, D. S. Tan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 4802-4807; 'Cheminformatic comparison of approved drugs from natural product versus synthetic origins'.
- [46] F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005, *4*, 206-220; 'The evolving role of natural products in drug discovery'.
- [47] A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2021, 20, 200-216; 'Natural products in drug discovery: advances and opportunities'.
- [48] Z. Zhang, W. Tang, *Acta. Pharm. Sin. B* **2018**, *8*, 721-732; 'Drug metabolism in drug discovery and development'.
- [49] C. Eurtivong, J. Reynisson, *Mol. Inform.* 2019, 38, e1800068; 'The Development of a Weighted Index to Optimise Compound Libraries for High Throughput Screening'.
- [50] W.-J. Lin, Chem. Res. Toxicol. 2021, 35, 5-6; 'The Dawn of a New Era in Drug Discovery? Drug Screening and the Increasing Biological Complexity of Testing Models'.
- [51] M. Sorokina, C. Steinbeck, *J. Cheminf.* **2020**, *12*, 1-51; 'Review on natural products databases: where to find data in 2020'.
- [52] G. D. Wright, *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 55-57; 'Unlocking the potential of natural products in drug discovery'.
- [53] N. Tripathi, B. Goel, N. Bhardwaj, B. Sahu, H. Kumar, S. K. Jain, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020, 39, 3449-3458; 'Virtual screening and molecular simulation study of natural products database for lead identification of novel coronavirus main protease inhibitors'.
- [54] L. T. Ferreira, J. V. Borba, J. T. Moreira-Filho, A. Rimoldi, C. H. Andrade, F. T. M. Costa, *Biomolecules* 2021, *11*, 459-471; 'QSAR-based virtual screening of natural products database for identification of potent antimalarial hits'.
- [55] M. A. Ibrahim, K. A. Abdeljawaad, A. H. Abdelrahman, M.-E. F. Hegazy, J. Biomol. Struct. Dyn.2021, 39, 5722-5734; 'Natural-like products as potential SARS-CoV-2 Mpro inhibitors: in-silico drug discovery'.
- [56] K. Roy, *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana, New York, **2021**, S.761-780.
- [57] E. Glaab, G. B. Manoharan, D. Abankwa, *bioRxiv* 2021, 61, 4082-4096; 'A pharmacophore model for SARS-CoV-2 3CLpro small molecule inhibitors and *in vitro* experimental validation of computationally screened inhibitors'.
- [58] S. Saikia, M. Bordoloi, *Curr. drug targets* **2019**, *20*, 501-521; 'Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective'.
- [59] X. Liu, D. Shi, S. Zhou, H. Liu, H. Liu, X. Yao, *Expert Opin. Drug Discovery* 2018, 13, 23-37; 'Molecular dynamics simulations and novel drug discovery'.
- [60] P. Śledź, A. Caflisch, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018, 48, 93-102; 'Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics'.
- [61] A. A. Naqvi, T. Mohammad, G. M. Hasan, M. Hassan, *Curr. Trends Med. Chem.* 2018, 18, 1755-1768; 'Advancements in docking and molecular dynamics simulations towards ligand-receptor interactions and structure-function relationships'.
- [62] D. Mulnaes, P. Golchin, F. Koenig, H. Gohlke, J. Chem. Theory Comput. 2021, 17, 4599-4613; 'TopDomain: Exhaustive Protein Domain Boundary Metaprediction Combining Multisource Information and Deep Learning'.
- [63] D. Paul, G. Sanap, S. Shenoy, D. Kalyane, K. Kalia, R. K. Tekade, *Drug Discovery Today* **2021**, *26*, 80; 'Artificial intelligence in drug discovery and development'.
- [64] N. Aulner, A. Danckaert, J. Ihm, D. Shum, S. L. Shorte, *Trends in parasitology* 2019, 35, 559-570; 'Next-generation phenotypic screening in early drug discovery for infectious diseases'.
- [65] S. Ziegler, S. Sievers, H. Waldmann, *Cell Chem. Biol.* 2021, 28, 300-319; 'Morphological profiling of small molecules'.
- [66] J. G. Moffat, F. Vincent, J. A. Lee, J. Eder, M. Prunotto, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2017, 16, 531-543; 'Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective'.
- [67] A. C. Pushkaran, R. Biswas, C. G. Mohan, in *Structural Bioinformatics: Applications in Preclinical Drug Discovery Process*, Springer, **2019**, S. 307-346.

- [68] I. H. Gilbert, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7719-7726; 'Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches: miniperspectives series on phenotypic screening for antiinfective targets'.
- [69] N. E. Thomford, D. A. Senthebane, A. Rowe, D. Munro, P. Seele, A. Maroyi, K. Dzobo, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1578-1591; 'Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery'.
- [70] J. P. Hughes, S. Rees, S. B. Kalindjian, K. L. Philpott, *Br. J. Pharmacol.* 2011, *162*, 1239-1249; 'Principles of early drug discovery'.
- [71] R. Zhang, X. Xie, Acta Pharmacol. Sin. 2012, 33, 372-384; 'Tools for GPCR drug discovery'.
- [72] A. Cannaert, J. Storme, F. Franz, V. Auwaerter, C. P. Stove, *Anal. Chem.* 2016, 88, 11476-11485; 'Detection and activity profiling of synthetic cannabinoids and their metabolites with a newly developed bioassay'.
- [73] S. Li, J. Zhao, R. Huang, M. F. Santillo, K. A. Houck, M. Xia, *Toxicol. In Vitro* 2019, 56, 93-100; 'Use of high-throughput enzyme-based assay with xenobiotic metabolic capability to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase activity by organophosphorous pesticides'.
- [74] F. Sams-Dodd, *Drug. Discovery today* **2005**, *10*, 139-147; 'Target-based drug discovery: is something wrong?'.
- [75] D. Brown, Drug Discovery Today 2007, 12, 1007-1012; 'Unfinished business: targetbased drug discovery'.
- [76] B. D. Kana, P. C. Karakousis, T. Parish, T. Dick, *Tuberculosis* **2014**, *94*, 551-556; 'Future target-based drug discovery for tuberculosis?'.
- [77] G. E. Croston, *Expert Opin. Drug Discovery* **2017**, *12*, 427-429; 'The utility of targetbased discovery'.
- [78] N. Thorne, Stem Cells Transl. Med. 2016, 5, 613-627; 'High-throughput phenotypic screening of human astrocytes to identify compounds that protect against oxidative stress'.
- [79] J. G. Moffat, J. Rudolph, D. Bailey, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 588-602; 'Phenotypic screening in cancer drug discovery past, present and future'.
- [80] D. Haasen, U. Schopfer, C. Antczak, C. Guy, F. Fuchs, P. Selzer, Assay Drug Dev. Technol. 2017, 15, 239-246; 'How phenotypic screening influenced drug discovery: lessons from five years of practice'.
- [81] U. H. Manjunatha, P. W. Smith, *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23, 5087-5097; 'Perspective: Challenges and opportunities in TB drug discovery from phenotypic screening'.
- [82] S. Pushpakom, F. Iorio, P. A. Eyers, K. J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Guilliams, J. Latimer, C. McNamee, *Nat. Rev. Drug Discovery* 2019, *18*, 41-58; 'Drug repurposing: progress, challenges and recommendations'.
- [83] Z. Zhang, L. Zhou, N. Xie, E. C. Nice, T. Zhang, Y. Cui, C. Huang, Signal Transduction Targeted Ther. 2020, 5, 1-25; 'Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing'.
- [84] S. Mignani, J. Rodrigues, H. Tomas, R. Jalal, P. P. Singh, J.-P. Majoral, R. A. Vishwakarma, *Drug Discovery Today* 2018, *23*, 605-615; 'Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified?'.
- [85] L. Hoffer, C. Muller, P. Roche, X. Morelli, *Mol. Inf.* 2018, 37, 18059-18068; 'Chemistry-driven Hit-to-lead Optimization Guided by Structure-based Approaches'.
- [86] T. J. Moore, H. Zhang, G. Anderson, G. C. Alexander, JAMA Intern. Med. 2018, 178, 1451-1457; 'Estimated costs of pivotal trials for novel therapeutic agents approved by the US Food and Drug Administration, 2015-2016'.
- [87] J. A. DiMasi, H. G. Grabowski, R. W. Hansen, *J. Health Economics* **2016**, *47*, 20-33; 'Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs'.

9. Literaturverzeichnis

- [88] J. Strovel, S. Sittampalam, N. P. Coussens, M. Hughes, J. Inglese, A. Kurtz, A. Andalibi, L. Patton, C. Austin, M. Baltezor, *Assay Guidance Manual* 2016; 'Early drug discovery and development guidelines: for academic researchers, collaborators, and start-up companies'.
- [89] M. H. Gelb, F. S. Buckner, ACS Infect. Dis. 2021, 7, 1874-1876; 'Early Stages of Drug Discovery in an Academic Institution and Involvement of Pharma for Advancing Promising Leads'.
- [90] A. B. Deore, J. R. Dhumane, R. Wagh, R. Sonawane, *Asian J. Pharm. Res. Dev.* **2019**, 7, 62-67; 'The stages of drug discovery and development process'.
- [91] B. Bhhatarai, W. P. Walters, C. E. Hop, G. Lanza, S. Ekins, *Nat. Mater.* **2019**, *18*, 418-422; 'Opportunities and challenges using artificial intelligence in ADME/Tox'.
- [92] W. Z. Shou, *J. Pharm. Anal.* **2020**, *10*, 201-208; 'Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery'.
- [93] F. L. Christopher, A. Lipinski, B. W. Dominy, P. J. Feeney, Adv. Drug Delivery Rev. 1996, 46, 3-26; 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings'.
- [94] M. D. Shultz, J. Med. Chem. 2018, 62, 1701-1714; 'Two decades under the influence of the rule of five and the changing properties of approved oral drugs: miniperspective'.
- [95] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, J. Comb. Chem. 1999, 1, 55-68; 'A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery.
- [96] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, J. Med. Chem. 2002, 45, 2615-2623; 'Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates'.
- [97] Y. Li, Q. Meng, M. Yang, D. Liu, X. Hou, L. Tang, X. Wang, Y. Lyu, X. Chen, K. Liu, A. M. Yu, Z. Zuo, H. Bi, *Acta. Pharm. Sin B* 2019, *9*, 1113-1144; 'Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics'.
- [98] F. E. Stuurman, B. Nuijen, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, *Clin. Pharmacokinet.* 2013, 52, 399-414; 'Oral anticancer drugs: mechanisms of low bioavailability and strategies for improvement'.
- [99] J. Krauss, F. Bracher, *Sci. Pharm.* **2018**, *86*; 'Pharmacokinetic Enhancers (Boosters)-Escort for Drugs against Degrading Enzymes and Beyond'.
- [100] N. Schneider, D. M. Lowe, R. A. Sayle, M. A. Tarselli, G. A. Landrum, *J. Med. Chem.* 2016, *59*, 4385-4402; 'Big Data from Pharmaceutical Patents: A Computational Analysis of Medicinal Chemists' Bread and Butter'.
- [101] K. W. Kuntz, J. E. Campbell, H. Keilhack, R. M. Pollock, S. K. Knutson, M. Porter-Scott, V. M. Richon, C. J. Sneeringer, T. J. Wigle, C. J. Allain, *J. Med. Chem.* 2016, 59, 1556-1564; 'The importance of being me: magic methyls, methyltransferase inhibitors, and the discovery of tazemetostat'.
- [102] H. Schoenherr, T. Cernak, Angew. Chem., Int. Ed. 2013, 52, 12256-12267; 'Profound methyl effects in drug discovery and a call for new C-H methylation reactions'. Angew. Chem. 2013, 125, 1240-12492.
- [103] Y. Chen, *Chem. Eur.* 2019, 25, 3405-3439; 'Recent Advances in Methylation: A Guide for Selecting Methylation Reagents'.
- [104] T. W. Johnson, R. A. Gallego, M. P. Edwards, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 6401-6420; 'Lipophilic Efficiency as an Important Metric in Drug Design'.
- [105] E. J. Barreiro, A. E. Kuemmerle, C. A. Fraga, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215-5246; 'The methylation effect in medicinal chemistry'.
- [106] S. Sun, J. Fu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018, 28, 3283-3289; 'Methyl-containing pharmaceuticals: Methylation in drug design'.
- [107] D. Aynetdinova, M. C. Callens, H. B. Hicks, C. Y. X. Poh, B. D. A. Shennan, A. M. Boyd, Z. H. Lim, J. A. Leitch, D. J. Dixon, *Chem. Soc. Rev.* 2021, *50*, 5517-5563; 'Installing the "magic methyl"- C-H methylation in synthesis'.
- [108] C. S. Leung, S. S. Leung, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, J. Med. Chem. 2012, 55, 4489-4500; 'Methyl effects on protein-ligand binding'.

- [109] I. Shamovsky, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7706-7723; 'Increasing selectivity of CC chemokine receptor 8 antagonists by engineering nondesolvation related interactions with the intended and off-target binding sites'.
- [110] I. J. AP, D. Guo, *Trends Biochem. Sci.* **2019**, *44*, 861-871; 'Drug-Target Association Kinetics in Drug Discovery'.
- [111] J. Mondal, R. A. Friesner, B. J. Berne, *J. Chem. Theory Comput.* **2014**, *10*, 5696-5705; 'Role of Desolvation in Thermodynamics and Kinetics of Ligand Binding to a Kinase'.
- [112] M. Pilla, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7521-7524; 'The identification of novel orally active mGluR5 antagonist GSK2210875'.
- [113] C. Molck, K. Harpsoe, D. E. Gloriam, J. M. Mathiesen, S. M. Nielsen, H. Brauner-Osborne, *Neurochem. Res.* 2014, 39, 1862-1875; 'mGluR5: exploration of orthosteric and allosteric ligand binding pockets and their applications to drug discovery'.
- [114] J. Y. Hwang, D. Smithson, F. Zhu, G. Holbrook, M. C. Connelly, M. Kaiser, R. Brun, R. K. Guy, *J. Med. Chem.* 2013, 56, 2850-2860; 'Optimization of chloronitrobenzamides (CNBs) as therapeutic leads for human African trypanosomiasis (HAT)'.
- [115] W. R. Judd, P. M. Slattum, K. C. Hoang, L. Bhoite, L. Valppu, G. Alberts, B. Brown, B. Roth, K. Ostanin, L. Huang, D. Wettstein, B. Richards, J. A. Willardsen, *J. Med. Chem.* 2011, *54*, 5031-5047; 'Discovery and SAR of methylated tetrahydropyranyl derivatives as inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT)'.
- [116] A. K. Ghosh, J. Takayama, K. V. Rao, K. Ratia, R. Chaudhuri, D. C. Mulhearn, H. Lee, D. B. Nichols, S. Baliji, S. C. Baker, M. E. Johnson, A. D. Mesecar, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 4968-4979; 'Severe acute respiratory syndrome coronavirus papain-like novel protease inhibitors: design, synthesis, protein-ligand X-ray structure and biological evaluation'.
- [117] L. Wasef, H. Shaheen, A. M. Beshbishy, E. K. Rashwan, E. H. Nadwa, L. M. Alkazmi, G. E.-S. Batiha, J. Drug Delivery Ther. 2020, 10, 187-190; 'Physostigmine: A Plant Alkaloid Isolated from Physostigma venenosum: A Review on Pharmacokinetics, Pharmacological and Toxicological Activities'.
- [118] A. M. Arens, T. Kearney, J. Med. Toxicol. 2019, 15, 184-191; 'Adverse Effects of Physostigmine'.
- [119] A. M. Arens, K. Shah, S. Al-Abri, K. R. Olson, T. Kearney, *Clin. Toxicol.* 2018, 56, 101-107; 'Safety and effectiveness of physostigmine: a 10-year retrospective review'.
- [120] D. E. Lorke, G. A. Petroianu, J. Appl. Toxicol. 2019, 39, 101-116; 'Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review'.
- [121] Z. J. Zhan, H. L. Bian, J. W. Wang, W. G. Shan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 1532-1534; 'Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities'.
- [122] R. M. Lane, S. G. Potkin, A. Enz, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2006**, *9*, 101-124; 'Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia'.
- [123] K. Lao, N. Ji, X. Zhang, W. Qiao, Z. Tang, X. Gou, *J. Drug Target* **2019**, *27*, 164-173; 'Drug development for Alzheimer's disease: review'.
- [124] N. G. Blackstone, A. Olson, B. Ainapurapu, *Cureus.* 2020, *12*, e11739; 'Physostigmine in Anticholinergic Poisoning: An Old Antidote With Resurgence'.
- [125] H. Bauer, Archiv für Gewerbepathologie und Gewerbehygiene 1960, 18, 91-106;
 'Bestimmung der Cholinesterasen im Blut und neurologische Überwachung bei beruflicher Gefährdung durch Organophosphate'.
- [126] S. Somani, S. Dube, *Int. J. Clin. Pharmacol.* **1989**, *27*, 367-387; 'Physostigmine an overview as pretreatment drug for organophosphate intoxication'.
- [127] M. Balali-Mood, M. Shariat, Am. J. Physiol. 1998, 92, 375-378; 'Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes'.
- [128] J. Jenner, A. Saleem, D. Swanston, *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, 47, 206-212; 'Transdermal delivery of physostigmine. A pretreatment against organophosphate poisoning'.

- [129] C.-S. Chaw, C.-W. Tan, Y.-Y. Yang, L. Wang, S. Moochhala, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1271-1277; 'Design of physostigmine-loaded polymeric microparticles for pretreatment against exposure to organophosphate agents'.
- [130] D. J. Triggle, J. M. Mitchell, R. Filler, *Cns Drug Rev* **1998**, *4*, 87-136; 'The Pharmacology of Physostigmine'.
- [131] K. S. Nigel *et. al.*, *Curr. Alzheimer Res.* 2005, 3, 281-290; 'An Overview of Phenserine Tartrate, A Novel Acetylcholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease'.
- [132] B. Truong, J. P. Quiroz, R. Priefer, *Medical Research Archives* 2020, 8, 1-27; 'Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's disease Past, Present, and Potential Future'.
- [133] S. Auriacombe, J. J. Pere, Y. Loria-Kanza, B. Vellas, *Curr. Med. Res. Opin.* 2002, 18, 129-138; 'Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease who failed to benefit from treatment with donepezil'.
- [134] Z.-J. Zhan, H.-L. Bian, J.-W. Wang, W.-G. Shan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 1532-1534; 'Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities'.
- P. L. Julian, J. Pikl, *J. Am. Chem. Soc* 1935, *57*, 755-757; 'Studies in the Indole Series.
 V. The Complete Synthesis of Physostigmine (Eserine)'.
- [136] M. Polonovski, C. Nitzberg, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1916**, *4*, 33-36; 'Conversion of L-Eseroline to L-Physostigmine'.
- [137] P. Ruiz-Sanchis, S. A. Savina, F. Albericio, M. Álvarez, *Chem.* 2011, *17*, 1388-1408; 'Structure, bioactivity and synthesis of natural products with hexahydropyrrolo [2,3-*b*] indole'.
- [138] D. Crich, A. Banerjee, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 151-161; 'Chemistry of the hexahydropyrrolo [2,3-b] indoles: configuration, conformation, reactivity, and applications in synthesis'.
- [139] A. Roy, A. Maity, M. Saina-Shaheeda, R. Giri, A. Bisai, Org. Chem. 2020, 437-471; 'Hexahydropyrrolo [2,3-b] indole alkaloids of biological relevance: proposed biosynthesis and synthetic approaches'.
- [140] J. C. Yi, C. Liu, L. X. Dai, S. L. You, *Chem. Asian J.* 2017, *12*, 2975-2979; 'Synthesis of C3-Methyl-Substituted Pyrroloindolines and Furoindolines *via* Cascade Dearomatization of Indole Derivatives with Methyl Iodide'.
- [141] S. Lucarini, F. Bartoccini, F. Battistoni, G. Diamantini, G. Piersanti, M. Righi, G. Spadoni, Org. Lett. 2010, 12, 3844-3847; 'A Novel One-Pot Approach of Hexahydropyrrolo[2,3-b]indole Nucleus by a cascade addition/cyclization strategy: Synthesis of (±)-Esermethole'.
- [142] T. Bui, S. Syed, C. F. Barbas III, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 8758-8759; 'Thioureacatalyzed highly enantio-and diastereoselective additions of oxindoles to nitroolefins: application to the formal synthesis of (+)-physostigmine'.
- [143] S. K. Manjal, S. Pathania, R. Bhatia, R. Kaur, K. Kumar, R. K. Rawal, J. Heterocycl. Chem. 2019, 56, 2318-2332; 'Diversified synthetic strategies for pyrroloindoles: An overview'.
- [144] Y. Li, Z. Ding, A. Lei, W. Kong, Org. Chem. Front. 2019, 6, 3305-3309; 'Ni-Catalyzed enantioselective reductive aryl-alkenylation of alkenes: application to the synthesis of (+)-physovenine and (+)-physostigmine'.
- [145] M. Chen, X. Wang, P. Yang, X. Kou, Z. H. Ren, Z. H. Guan, Angew. Chem., Int. Ed. 2020, 59, 2199–12205; 'Palladium-Catalyzed Enantioselective Heck Carbonylation with a Monodentate Phosphoramidite Ligand: Asymmetric Synthesis of (+)-Physostigmine,(+)-Physovenine, and (+)-Folicanthine'. Angew. Chem. 2020, 132, 12297-12303.
- [146] A. D. Marchese, M. Wollenburg, B. Mirabi, X. Abel-Snape, A. Whyte, F. Glorius, M. Lautens, ACS Catalysis 2020, 10, 4780-4785; 'Nickel-Catalyzed Enantioselective Carbamoyl Iodination: A Surrogate for Carbamoyl Iodides'.
- [147] B. Zhao, S. M. Moochhala, S. Tham, *J. Chromatogr. B.* **2004**, *812*, 183-192; 'Biologically active components of *Physostigma venenosum*'.

- [148] J. B. EO, C. Ikpa, *Am. J. Sci. Ind. Res.* **2013**; 'Isolation, characterisation and anticholinesterase activities of *Physostigma venenosum*'.
- [149] N. A. Yahya, N. Attan, R. A. Wahab, Food Bioprod. Process. 2018, 112, 69-85; 'An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds'.
- [150] F. Chemat, M. Abert-Vian, A. S. Fabiano-Tixier, J. Strube, L. Uhlenbrock, V. Gunjevic, G. Cravotto, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 248-263; 'Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges'.
- [151] M. Chartrain, L. Katz, C. Taylor, J. Zhang, T. Brix, P. Salmon, R. Greasham, J. Ind. Microbiol. 1995, 15, 414-417; 'Physostigmine production by Streptomyces griseofuscus NRRL 5324: process development and scale-up studies'.
- [152] J. Zhang, C. Martin, M. Shifflet, P. Salmon, T. Brix, R. Greasham, B. Buckland, M. Chartrain, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *44*, 568-575; 'Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*'.
- [153] D. Yi, T. Bayer, C. P. S. Badenhorst, S. Wu, M. Doerr, M. Hoehne, U. T. Bornscheuer, *Chem. Soc. Rev.* 2021, *50*, 8003-8049; 'Recent trends in biocatalysis'.
- [154] H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329-335; 'Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence'.
- [155] Q. Sun, M. Huang, Y. Wei, *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *11*, 632-650; 'Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes'.
- [156] M. Zhang, J. Y. Xu, H. Hu, B. C. Ye, M. Tan, *Proteomics* 2018, 18, 17300-17313; 'Systematic Proteomic Analysis of Protein Methylation in Prokaryotes and Eukaryotes Revealed Distinct Substrate Specificity'.
- [157] D. K. Liscombe, G. V. Louie, J. P. Noel, Nat. Prod. Rep. 2012, 29, 1238-1250; 'Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases'.
- [158] S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 99-104; 'A new tool for biotechnology: AdoMet-dependent methyltransferases'.
- [159] Y. Dor, H. Cedar, Lancet 2018, 392, 777-786; 'Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine'.
- [160] D. Pechalrieu, C. Etievant, P. B. Arimondo, *Biochem. Pharmacol.* 2017, 129, 1-13; 'DNA methyltransferase inhibitors in cancer: From pharmacology to translational studies'.
- [161] C. Selvaraj, D. C. Dinesh, U. Panwar, R. Abhirami, E. Boura, S. K. Singh, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020, 39, 4582-4593; 'Structure-based virtual screening and molecular dynamics simulation of SARS-CoV-2 Guanine-N7 methyltransferase (nsp14) for identifying antiviral inhibitors against COVID-19'.
- [162] B. P. S. Chouhan, S. Maimaiti, M. Gade, P. Laurino, *Biochemistry* 2019, 58, 166-170; 'Rossmann-Fold Methyltransferases: Taking a "beta-Turn" around Their Cofactor, S-Adenosylmethionine'.
- [163] C. Zubiet, X.-Z. He, R. A. Dixon, J. P. Noel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2001, *8*, 271-279; 'Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases'.
- [164] R. M. Kagan, S. Clarke, Arch. Biochem. Biophys. 1994, 203, 491-497; 'Amino Acid Polymorphisms of the Human L-Isoaspartyl/D-Aspartyl Methyltransferase Involved in Protein Repair'.
- [165] D. O'Hagan, J. W. Schmidberger, Nat. Prod. Rep. 2010, 27, 900-918; 'Enzymes that catalyse SN₂ reaction mechanisms'.
- [166] R. W. Woodard, J. Leonard Mascaro, R. Horhammer, S. Eisenstein, H. G. Flos, J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 6314-6318; 'Stereochemistry of Indolmycin Biosynthesis. Steric Course'.
- [167] I. J. W. McKean, P. A. Hoskisson, G. A. Burley, *ChemBioChem* 2020, *21*, 2890-2897; 'Biocatalytic Alkylation Cascades: Recent Advances and Future Opportunities for Late-Stage Functionalization'.

- [168] T. Pavkov-Keller, K. Steiner, M. Faber, M. Tengg, H. Schwab, M. Gruber-Khadjawi, K. Gruber, *PLoS One* 2017, *12*, e0171056; 'Crystal Structure and Catalytic Mechanism of CouO, a Versatile C-Methyltransferase from *Streptomyces rishiriensis*'.
- [169] L. L. Bengel, B. Aberle, A. N. Egler-Kemmerer, S. Kienzle, B. Hauer, S. C. Hammer, Angew. Chem., Int. Ed. 2021, 60, 5554-5560; 'Engineered Enzymes Enable Selective N-Alkylation of Pyrazoles With Simple Haloalkanes'. Angew. Chem. 2021, 133, 5614-5620.
- [170] B.-G. Kim, S. H. Sung, Y. Chong, Y. Lim, J.-H. Ahn, *J. Plant Biol.* **2010**, *53*, 321-329; 'Plant Flavonoid O-Methyltransferases: Substrate Specificity and Application'.
- [171] J. C. Sadler, C. H. Chung, J. E. Mosley, G. A. Burley, L. D. Humphreys, ACS Chem. Biol. 2017, 12, 374-379; 'Structural and Functional Basis of C-Methylation of Coumarin Scaffolds by NovO'.
- [172] C. Sommer-Kamann, A. Fries, S. Mordhorst, J. N. Andexer, M. Mueller, Angew. Chem., Int. Ed. 2017, 56, 4033-4036; 'Asymmetric C-Alkylation by the S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase SgvM'. Angew. Chem. 2017, 129, 4091-4094.
- [173] I. Engelbrecht, J. P. Petzer, A. Petzer, Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem. 2019, 19, 133-145; 'Evaluation of selected natural compounds as dual inhibitors of catechol-Omethyltransferase and monoamine oxidase'.
- [174] P. Bastos, T. Gomes, L. Ribeiro, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2017, *173*, 1-39; 'Catechol-O-methyltransferase (COMT): an update on its role in cancer, neurological and cardiovascular diseases'.
- [175] B. J. Law, M. R. Bennett, M. L. Thompson, C. Levy, S. A. Shepherd, D. Leys, J. Micklefield, Angew. Chem., Int. Ed. 2016, 55, 2683-2687; 'Effects of Active-Site Modification and Quaternary Structure on the Regioselectivity of Catechol-O-Methyltransferase'. Angew. Chem. 2016, 128, 2733-2737.
- [176] S. H. Lee, B. Kim, K. J. Kim, J. Agri.c Food Chem. 2021, 69, 2531-2538; 'Crystal Structure and Regiospecificity of Catechol O-Methyltransferase from Niastella koreensis'.
- [177] M. R. Bennett, S. A. Shepherd, V. A. Cronin, J. Micklefield, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 97-106; 'Recent advances in methyltransferase biocatalysis'.
- [178] K. Li, J. Frost, J. Am. Chem. Soc 1998, 120, 10545-10546; 'Synthesis of vanillin from glucose'.
- [179] R. Roddan, F. Subrizi, J. Broomfield, J. M. Ward, N. H. Keep, H. C. Hailes, *Org. Lett.* 2021, 23, 6342-6347; 'Chemoenzymatic Cascades toward Methylated Tetrahydroprotoberberine and Protoberberine Alkaloids'.
- [180] S.-H. Sung, B.-G. Kim, J.-H. Ahn, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *21*, 854-857; 'Optimization of rhamnetin production in *Escherichia coli*.
- [181] L. A. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, M. Dippe, Curr. Opin. Chem. Bio. 2013, 17, 229-235; 'Alkylating enzymes'.
- [182] J. Siegrist, J. Netzer, S. Mordhorst, L. Karst, S. Gerhardt, O. Einsle, M. Richter, J. N. Andexer, *FEBS Lett.* 2017, 591, 312-321; 'Functional and structural characterisation of a bacterial O-methyltransferase and factors determining regioselectivity'.
- [183] S. Singh, J. G. McCoy, C. Zhang, C. A. Bingman, G. N. Phillips, J. S. Thorson, J. Biol. Chem. 2008, 283, 22628-22636; 'Structure and mechanism of the rebeccamycin sugar 4'-O-methyltransferase RebM'.
- B. J. Law, A.-W. Struck, M. R. Bennett, B. Wilkinson, J. Micklefield, *Chem. Sci.* 2015, 6, 2885-2892; 'Site-specific bioalkylation of rapamycin by the RapM 16-O-methyltransferase'.
- [185] M. Gallant, J. T. Link, S. J. Danishefsky, J. Org. Chem. 1993, 58, 343-349; 'A stereoselective synthesis of indole-beta-N-glycosides: an application to the synthesis of rebeccamycin'.
- [186] K. Nicolaou, T. Chakraborty, A. Piscopio, N. Minowa, P. Bertinato, J. Am. Chem. Soc 1993, 115, 4419-4420; 'Total synthesis of rapamycin'.
- [187] J. Mahatthananchai, A. M. Dumas, J. W. Bode, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10954-10990; 'Catalytic selective synthesis'.

- [188] R. Goikhman, T. L. Jacques, D. Sames, J. Am. Chem. Soc 2009, 131, 3042-3048; 'C-H bonds as ubiquitous functionality: a general approach to complex arylated pyrazoles via sequential regioselective C-arylation and N-alkylation enabled by SEM-group transposition'.
- [189] R. S. Shinde, A. Haghi, *Modern Green Chemistry and Heterocyclic Compounds: Molecular Design, Synthesis, and Biological Evaluation, CRC Press,* **2020**.
- [190] E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardarson, J. Med. Chem. 2014, 57, 10257-10274; 'Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among US FDA approved pharmaceuticals: miniperspective'.
- [191] P. Pissios, *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 340-353; 'Nicotinamide *N*-methyltransferase: more than a vitamin B3 clearance enzyme'.
- [192] O. Khersonsky, R. Lipsh, Z. Avizemer, Y. Ashani, M. Goldsmith, H. Leader, O. Dym, S. Rogotner, D. L. Trudeau, J. Prilusky, *Molecular cell* **2018**, 72, 178-186; 'Automated design of efficient and functionally diverse enzyme repertoires'.
- [193] F. Ospina, K. H. Schuelke, S. C. Hammer, *ChemPlusChem* 2022, 87, e202100454; 'Biocatalytic Alkylation Chemistry: Building Molecular Complexity with High Selectivity'.
- [194] D. Popadić, D. Mhaindarkar, M. H. D. Thai, H. C. Hailes, S. Mordhorst, J. N. Andexer, RSC Chem. Biol. 2021, 2, 883-89; 'A bicyclic S-adenosylmethionine regeneration system applicable with different nucleosides or nucleotides as cofactor building blocks'.
- [195] K. H. Schuelke, F. Ospina, K. Hoemschemeyer, S. Gergel, S. C. Hammer, *ChemBioChem* 2022, 23, e202100632; 'Substrate profiling of anion methyltransferases for promiscuous synthesis of S-adenosylmethionine analogs from haloalkanes'.
- [196] D. A. Amariei, N. Pozhydaieva, B. David, P. Schneider, T. Classen, H. Gohlke, O. H. Weiergraeber, J. Pietruszka, ACS Catal. 2022, 22, 14130-14139; 'Enzymatic C3-Methylation of Indoles Using Methyltransferase PsmD–Crystal Structure, Catalytic Mechanism, and Preparative Applications'.
- [197] P. Gatti-Lafranconi, F. Hollfelder, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 285-292; 'Flexibility and reactivity in promiscuous enzymes'.
- [198] H. Li, Y. Qiu, C. Guo, M. Han, Y. Zhou, Y. Feng, S. Luo, Y. Tong, G. Zheng, S. Zhu, *Chem. Commun. (Camb)* **2019**, 55, 8390-8393; 'Pyrroloindoline cyclization in tryptophan-containing cyclodipeptides mediated by an unprecedented indole C3 methyltransferase from *Streptomyces sp. HPH0547*'.
- [199] A. D. Borthwick, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3641-3716; '2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products'.
- [200] H. Wang, S. E. Reisman, Angew. Chem., Int. Ed. 2014, 53, 6206-6210; 'Enantioselective total synthesis of (-)-lansai B and (+)-nocardioazines A and B'. Angew. Chem. 2014, 126, 6320-6324.
- [201] P. Fu, P. Liu, H. Qu, Y. Wang, D. Chen, H. Wang, J. Li, W. Zhu, J. Nat. Prod. 2011, 74, 2219-2223; 'α-Pyrones and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete Nocardiopsis dassonvillei HR10-5'.
- [202] P. Tuntiwachwuttikul, T. Taechowisan, A. Wanbanjob, S. Thadaniti, W. C. Taylor, *Tetrahedron* 2008, 64, 7583-7586; 'Lansai A–D, secondary metabolites from *Streptomyces sp. SUC1*'.
- [203] R. Raju, A. M. Piggott, X.-C. Huang, R. J. Capon, Org. Lett. 2011, 13, 2770-2773; 'Nocardioazines: A novel bridged diketopiperazine scaffold from a marine-derived bacterium inhibits P-glycoprotein'.
- [204] N. Alqahtani, S. K. Porwal, E. D. James, D. M. Bis, J. A. Karty, A. L. Lane, R. Viswanathan, *Org. Biomol. Chem.* 2015, *13*, 7177-7192; 'Synergism between genome sequencing, tandem mass spectrometry and bio-inspired synthesis reveals insights into nocardioazine B biogenesis'.
- [205] P. Schneider, B. Henssen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, 60, 23412-23418 'Biocatalytic C3-Indole Methylation A Useful Tool for Natural Product Inspired Stereoselective Synthesis of Pyrroloindoles'. *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 23600-23606.
- [206] L. E. Zetzsche, A. R. Narayan, *Nat. Rev. Chem.* **2020**, *4*, 334-346; 'Broadening the scope of biocatalytic C–C bond formation'.

- [207] E. E. Schultz, N. R. Braffman, M. U. Luescher, H. H. Hager, E. P. Balskus, Angew. Chem., Int. Ed. 2019, 58, 3151-3155; 'Biocatalytic Friedel–Crafts alkylation using a promiscuous biosynthetic enzyme'. Angew. Chem. 2019, 131, 3183-3187.
- [208] H. Štecher, M. Tengg, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, Angew. Chem., Int. Ed. 2009, 48, 9546-9548; 'Biocatalytic Friedel-Crafts Alkylation Using Non-natural Cofactors'. Angew. Chem. 2009, 121, 9710-9712.
- [209] M. Pacholec, J. Tao, C. T. Walsh, *Biochemistry* 2005, 44, 14969-14976; 'CouO and NovO: C-methyltransferases for tailoring the aminocoumarin scaffold in coumermycin and novobiocin antibiotic biosynthesis'.
- [210] T. Awakawa, L. Zhang, T. Wakimoto, S. Hoshino, T. Mori, T. Ito, J. Ishikawa, M. E. Tanner, I. Abe, *J. Am. Chem. Soc* 2014, *136*, 9910-9913; 'A methyltransferase initiates terpene cyclization in teleocidin B biosynthesis'.
- [211] F. Yu, M. Li, C. Xu, B. Sun, H. Zhou, Z. Wang, Q. Xu, M. Xie, G. Zuo, P. Huang, Biochem. J. 2016, 473, 4385-4397; 'Crystal structure and enantioselectivity of terpene cyclization in SAM-dependent methyltransferase TleD'.
- [212] S. S. Azam, A. Abro, S. Raza, A. Saroosh, *Mol. Biol. Rep.* 2014, 41, 4279-4293; 'Structure and dynamics studies of sterol 24-C-methyltransferase with mechanism based inactivators for the disruption of ergosterol biosynthesis'.
- [213] H. Guan, Y. Zhao, P. Su, Y. Tong, Y. Liu, T. Hu, Y. Zhang, X. Zhang, J. Li, X. Wu, L. Huang, W. Gao, Acta. Pharm. Sin B 2017, 7, 603-609; 'Molecular cloning and functional identification of sterol C24-methyltransferase gene from Tripterygium wilfordii'.
- [214] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 1988, 6, 221-270; 'Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis'.
- [215] H. Zhao, W. A. Van Der Donk, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 583-589; 'Regeneration of cofactors for use in biocatalysis'.
- [216] W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369-384; 'Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis'.
- [217] V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, 946-957; 'Cofactor regeneration–an important aspect of biocatalysis'.
- [218] J. Chapman, A. E. Ismail, C. Z. Dinu, *Catalysts* **2018**, *8*, 238-245; 'Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks'.
- [219] R. A. Sheldon, D. Brady, *ChemSusChem* **2019**, *12*, 2859-2881; 'Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis'.
- [220] C. J. Hartley, C. C. Williams, J. A. Scoble, Q. I. Churches, A. North, N. G. French, T. Nebl, G. Coia, A. C. Warden, G. Simpson, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 1006-1015; 'Engineered enzymes that retain and regenerate their cofactors enable continuous-flow biocatalysis'.
- [221] M. P. Thompson, I. Peñafiel, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* 2018, 23, 9-18; 'Biocatalysis using immobilized enzymes in continuous flow for the synthesis of fine chemicals'.
- [222] B. Baumer, T. Classen, M. Pohl, J. Pietruszka, Adv. Synth. Catal. 2020, 362, 2894-2901; 'Efficient Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate [NADP (H)] Recycling in Closed-Loop Continuous Flow Biocatalysis'.
- [223] B. Poznansky, L. A. Thompson, S. A. Warren, H. A. Reeve, K. A. Vincent, Org. Process Res. Dev. 2020, 24, 2281-2287; 'Carbon as a simple support for redox biocatalysis in continuous flow'.
- [224] S. Mordhorst, J. Siegrist, M. Mueller, M. Richter, J. N. Andexer, Angew. Chem., Int. Ed. 2017, 56, 4037-4041; 'Catalytic alkylation using a cyclic S-adenosylmethionine regeneration system'. Angew. Chem. 2017, 129, 4095-4099.
- [225] C. Liao, F. P. Seebeck, Nat. Catal. 2019, 2, 696-701; 'S-adenosylhomocysteine as a methyl transfer catalyst in biocatalytic methylation reactions'.
- [226] I. J. McKean, P. A. Hoskisson, G. A. Burley, *ChemBioChem* 2020, *21*, 2890-2897; 'Biocatalytic Alkylation Cascades: Recent Advances and Future Opportunities for Late-Stage Functionalization'.
- [227] J. Micklefield, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 644-645; 'Streamlined recycling of S-adenosylmethionine'.

- [228] I. J. W. McKean, J. C. Sadler, A. Cuetos, A. Frese, L. D. Humphreys, G. Grogan, P. A. Hoskisson, G. A. Burley, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, *58*, 17583-17588; 'S-Adenosyl Methionine Cofactor Modifications Enhance the Biocatalytic Repertoire of Small Molecule C-Alkylation'. *Angew. Chem.* **2019**, *131*, 17747-17752.
- [229] T. D. Huber, B. R. Johnson, J. Zhang, J. S. Thorson, *Curr. Med. Res. Opin.* **2016**, *42*, 189-197; 'AdoMet analog synthesis and utilization: current state of the art'.
- [230] J. C. Sadler, L. D. Humphreys, R. Snajdrova, G. A. Burley, *ChemBioChem* 2017, 18, 992-995; 'A Tandem Enzymatic sp²-C-Methylation Process: Coupling in Situ S-Adenosyl-L-Methionine Formation with Methyl Transfer'.
- [231] S. Singh, J. G. McCoy, C. Zhang, C. A. Bingman, G. N. Phillips, J. S. Thorson, Angew. Chem., Int. Ed. 2014, 53, 3965-3969; 'Facile chemoenzymatic strategies for the synthesis and utilization of S-adenosyl-L-methionine analogues'. Angew. Chem. 2014, 126, 4046-4050.
- [232] J. Schlesier, J. Siegrist, S. Gerhardt, A. Erb, S. Blaesi, M. Richter, O. Einsle, J. N. Andexer, *BMC Struct. Biol.* 2013, *13*, 1-10; 'Structural and functional characterisation of the methionine adenosyltransferase from *Thermococcus kodakarensis*'.
- [233] I. R. Bothwell, M. Luo, Org. Lett. 2014, 16, 3056-3059; 'Large-scale, protection-free synthesis of Se-adenosyl-L-selenomethionine analogues and their application as cofactor surrogates of methyltransferases'.
- [234] J. M. Lipson, M. Thomsen, B. S. Moore, R. P. Clausen, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *ChemBioChem* 2013, 14, 950; 'A Tandem Chemoenzymatic Methylation via S-Adenosyl-L-methionine'.
- [235] C. Liao, F. P. Seebeck, Angew. Chem., Int. Ed. 2020, 59, 7184-7187; 'Asymmetric β-Methylation of L-and D-α-Amino Acids by a Self-Contained Enzyme Cascade'. Angew. Chem. 2020, 132, 7251-7254,
- [236] F. Michailidou, A. Rentmeister, Org. Biomol. Chem. 2021, 19, 3756-3762; 'Harnessing methylation and AdoMet-utilising enzymes for selective modification in cascade reactions'.
- [237] Q. Tang, C. W. Grathwol, A. S. Aslan-Üzel, S. Wu, A. Link, I. V. Pavlidis, C. P. Badenhorst, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 1524-1527; 'Directed evolution of a halide methyltransferase enables biocatalytic synthesis of diverse SAM analogs'. *Angew. Chem.*, **2021**, *133*, 1547-1551.
- [238] J. Peng, C. Liao, C. Bauer, F. P. Seebeck, Angew. Chem., Int. Ed. 2021, 60, 27178-27183; 'Fluorinated S-Adenosylmethionine as a Reagent for Enzyme-Catalyzed Fluoromethylation'. Angew. Chem., 2021, 133, 27384-27389.
- [239] A. S. Aslan-Uezel, A. Beier, D. Kovář, C. Cziegler, S. K. Padhi, E. D. Schuiten, M. Doerr, D. Boettcher, F. Hollmann, F. Rudroff, *ChemCatChem* 2020, *12*, 2032-2039; 'An ultrasensitive fluorescence assay for the detection of halides and enzymatic dehalogenation'.
- [240] N. V. Cornelissen, F. Michailidou, F. Muttach, K. Rau, A. Rentmeister, *Chem. Commun.* 2020, 56, 2115-2118; 'Nucleoside-modified AdoMet analogues for differential methyltransferase targeting'.
- [241] T. D. Huber, B. R. Johnson, J. Zhang, J. S. Thorson ACS Chem. Biol. 2016, 11, 2484-2491; 'Functional AdoMet isosteres resistant to classical AdoMet degradation pathways'.
- [242] J. R. Marshall, J. Mangas-Sanchez, N. J. Turner, *Tetrahedron* 2021, 82, 131926-131938; 'Expanding the synthetic scope of biocatalysis by enzyme discovery and protein engineering'.
- [243] H. Minges, N. Sewald, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 4450-4470; 'Recent advances in synthetic application and engineering of halogenases'.
- [244] A. M. Kunjapur, J. C. Hyun, K. L. Prather, *Microb. Cell Fact.* 2016, 15, 1-17; 'Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli de novo* vanillin biosynthesis pathway'.
- [245] H. Chen, Z. Wang, H. Cai, C. Zhou, World J. Microbiol. Biotechnol. 2016, 32, 1-8; 'Progress in the microbial production of S-adenosyl-L-methionine'.

- [246] L. M. Posnick, L. D. Samson, J. Bacteriol. 1999, 181, 6756-6762; 'Influence of S-adenosylmethionine pool size on spontaneous mutation, dam methylation, and cell growth of Escherichia coli'.
- [247] W. Zhao, F. Shi, B. Hang, L. Huang, J. Cai, Z. Xu, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016, 178, 1263-1272; 'The improvement of SAM accumulation by integrating the endogenous methionine adenosyltransferase gene SAM2 in genome of the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain'.
- [248] H. Hu, J. Qian, J. Chu, Y. Wang, Y. Zhuang, S. Zhang, J. Biotechnol. 2009, 141, 97-103; 'DNA shuffling of methionine adenosyltransferase gene leads to improved S-adenosyl-L-methionine production in Pichia pastoris'.
- [249] C. Zhang, S. A. Sultan, X. Chen, *Biores. Biopro.* 2021, 8, 1-21; 'Biotechnological applications of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases for natural products biosynthesis and diversification'.
- [250] C. Dalhoff, M. Hueben, T. Lenz, P. Poot, E. Nordhoff, H. Koester, E. Weinhold, *ChemBioChem* 2010, *11*, 256-265; 'Synthesis of S-Adenosyl-L-homocysteine Capture Compounds for Selective Photoinduced Isolation of Methyltransferases'.
- [251] B. Pacheco, L. Crombet, P. Loppnau, D. Cossar, *Protein Expr. Purif.* 2012, *81*, 33-41; 'A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment'.
- [252] J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 783-793; 'SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold'.
- [253] A. Brossi, X.-F. Pei, in *The alkaloids: chemistry and biology, Vol. 50*, Elsevier, **1998**, S. 109-139.
- [254] T. Matsuura, L. E. Overman, D. J. Poon, *J. Am. Chem. Soc* **1998**, *120*, 6500-6503; 'Catalytic asymmetric synthesis of either enantiomer of the *calabar* alkaloids physostigmine and physovenine'.
- [255] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410; 'Basic local alignment search tool'.
- [256] N. Pozhydaieva, Masterarbeit; 'C methyltransferases as a powerful tool for organic synthesis – characterisation, optimisation and application for the stereoselective formation of indole alkaloids', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), 2020.
- [257] Y. Xu, Y. Wu, G. Sun, H. Zhang, T. Chen, L. Liu, *Bioresour. Technol.* 2021, 332, 125071-125084; 'Design and construction of novel biocatalyst for bioprocessing: Recent advances and future outlook'.
- [258] R. A. Sheldon, D. Brady, ACS Sustainable Chem. Eng. 2021, 9, 8032-8052; 'Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis'.
- [259] A. S. Klein, A. C. Albrecht, J. Pietruszka, *Catalysts* 2021, *11*, 1389; 'Chemoenzymatic One-Pot Process for the Synthesis of Tetrahydroisoquinolines'.
- [260] D. R. Liston, J. A. Nielsen, A. Villalobos, D. Chapin, S. B. Jones, S. T. Hubbard, F. W. White, *Eur. J. Pharmacol.* 2004, 486, 9-17; 'Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease'.
- [261] G. Marucci, M. Buccioni, D. Dal Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, F. Amenta, *Neuropharmacology* 2021, 190, 108352; 'Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease'.
- [262] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 7, 88-95; 'A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity'.
- [263] M. Aminpour, C. Montemagno, J. A. Tuszynski, *Molecules* 2019, 24, 1693; 'An overview of molecular modeling for drug discovery with specific illustrative examples of applications'.
- [264] C. R. Corbeil, N. Moitessier, J. Chem. Inf. Model. 2009, 49, 997-1009; 'Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 3. Impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs'.

- [265] V. T. Sabe, T. Ntombela, L. A. Jhamba, G. E. Maguire, T. Govender, T. Naicker, H. G. Kruger, *Eur. J. Med. Chem.* 2021, 224, 113705; 'Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review'.
- [266] J. Dittrich, D. Schmidt, C. Pfleger, H. Gohlke, *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *59*, 509-521; 'Converging a knowledge-based scoring function: DrugScore2018'.
- [267] J. C. Shelley, A. Cholleti, L. L. Frye, J. R. Greenwood, M. R. Timlin, M. Uchimaya, J. Comput. Aided Mol. Des. 2007, 21, 681-691; 'Epik: a software program for pK a prediction and protonation state generation for drug-like molecules'.
- [268] B. David, P. Schneider, P. Schaefer, J. Pietruszka, H. Gohlke, J. Enzyme. Inhib. Med. Chem. 2021, 36, 491-496; 'Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: virtual screening and in vitro characterisation'.
- [269] D. Gioia, M. Bertazzo, M. Recanatini, M. Masetti, A. Cavalli, *Molecules* 2017, 22, 2029; 'Dynamic docking: a paradigm shift in computational drug discovery'.
- [270] P. Cozzini, G. E. Kellogg, F. Spyrakis, D. J. Abraham, G. Costantino, A. Emerson, F. Fanelli, H. Gohlke, L. A. Kuhn, G. M. Morris, *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 6237-6255; 'Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design'.
- [271] P. Schaefer, 'Discovery and Synthesis of novel cholinesterase inhibitors based on physostigmine ', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2020**.
- [272] K. C. Gross, P. G. Seybold, *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, *85*, 569-579; 'Substituent effects on the physical properties and *pKa* of phenol'.
- [273] P. Pérez, L. R. Domingo, M. Duque-Noreña, E. Chamorro, J. Mol. Struct.: THEOCHEM 2009, 895, 86-91; 'A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic aromatic substitutions'.
- [274] D. D. Perrin, B. Dempsey, E. P. Serjeant, *pKa* prediction for organic acids and bases, Vol. 1, Springer, **1981**.
- [275] K. C. Gross, P. G. Seybold, *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, *80*, 1107-1115; 'Substituent effects on the physical properties and *pKa* of aniline'.
- [276] R. M. Siloto, R. J. Weselake, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2012, 1, 181-189; 'Site saturation mutagenesis: Methods and applications in protein engineering'.
- [277] J. Korp, M. S. V. Gurovic, M. Nett, *Beilstein J. Org. Chem.* 2016, 12, 594-607; 'Antibiotics from predatory bacteria'.
- [278] D. J. Vollmann, T. Busche, C. Rueckert, M. Nett, *Microbiol. Resour. Announce.* 2021, 10, e00989; 'Complete Genome Sequence of the Nonmotile *Myxococcus xanthus* Strain *NM*'.
- [279] J. Korp, L. Winand, A. Sester, M. Nett, *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e01789; 'Engineering pseudochelin production in *Myxococcus xanthus*'.
- [280] A. Šester, L. Winand, S. Pace, W. Hiller, O. Werz, M. Nett, J. Nat. Prod. 2019, 82, 2544-2549; 'Myxochelin-and pseudochelin-derived lipoxygenase inhibitors from a genetically engineered Myxococcus xanthus strain'.
- [281] L. Winand, A. Sester, M. Nett, ChemMedChem 2021, 16, 767-776; 'Bioengineering of Anti-Inflammatory Natural Products'.
- [282] M. V. Jones, V. E. Wells, FEBS Lett. 1980, 117, 103-106; 'S-Adenosylmethionine biosynthesis in Myxococcus xanthus'.
- [283] L. Winand, P. Schneider, S. Kruth, N.-J. Greven, W. Hiller, M. Kaiser, J. Pietruszka, M. Nett, Org. Lett. 2021, 23, 6563-6567; 'Mutasynthesis of Physostigmines in Myxococcus xanthus'.
- [284] A. Bollinger, S. Thies, E. Knieps-Gruenhagen, C. Gertzen, S. Kobus, A. Hoeppner, M. Ferrer, H. Gohlke, S. H. Smits, K.-E. Jaeger, *Front. Microbiol.* 2020, *11*, 114-121; 'A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri*-Structural and functional insights'.
- [285] A. Bollinger, R. Molitor, S. Thies, R. Koch, C. Coscolín, M. Ferrer, K.-E. Jaeger, *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, 86, 106-120; 'Organic-solvent-tolerant carboxylic ester hydrolases for organic synthesis'.
- [286] T. W. Greene, P. G. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, Wiley, **1991**.

- [287] Z. Wu, C. Liu, Z. Zhang, R. Zheng, Y. Zheng, *Biotechnol. Adv.* 2020, 43, 107574; 'Amidase as a versatile tool in amide-bond cleavage: From molecular features to biotechnological applications'.
- [288] J. Nazor, J. Liu, G. Huisman, *Curr. Opin. Biotech.* **2021**, 69, 182-190; 'Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades'.
- [289] M. J. Fuerst, C. Martin, N. Lončar, M. W. Fraaije, *Methods Enzymol.* 2018, 608, 151-187; 'Experimental protocols for generating focused mutant libraries and screening for thermostable proteins'.
- [290] F. S. Aalbers, M. J. Fuerst, S. Rovida, M. Trajkovic, J. R. G. Castellanos, S. Bartsch, A. Vogel, A. Mattevi, M. W. Fraaije, *eLIFE* 2020, 9, e54639; 'Approaching boiling point stability of an alcohol dehydrogenase through computationally-guided enzyme engineering'.
- [291] M. J. Fuerst, M. Boonstra, S. Bandstra, M. W. Fraaije, *Biotechnol. Bioeng.* 2019, *116*, 2167-2177; 'Stabilization of cyclohexanone monooxygenase by computational and experimental library design'.
- [292] U. T. Bornscheuer, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-143; 'Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design'.
- [293] Q. Liu, G. Xun, Y. Feng, *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 530-537; 'The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization'.
- [294] T. Cernak, K. D. Dykstra, S. Tyagarajan, P. Vachal, S. W. Krska, *Chem. Soc. Rev.* 2016, 45, 546-576; 'The medicinal chemist's toolbox for late stage functionalization of drug-like molecules'.
- [295] D. C. Blakemore, L. Castro, I. Churcher, D. C. Rees, A. W. Thomas, D. M. Wilson, A. Wood, *Nat. Chem.* 2018, 10, 383-394; 'Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery'.
- [296] P. Grunwald, Pharmaceutical Biocatalysis: Fundamentals, Enzyme Inhibitors, and Enzymes in Health and Diseases, *CRC Press*, **2019**, *Chapter 2*.
- [297] M. R. Bennett, M. L. Thompson, S. A. Shepherd, M. S. Dunstan, A. J. Herbert, D. R. Smith, V. A. Cronin, B. R. Menon, C. Levy, J. Micklefield, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 10600-10604; 'Structure and Biocatalytic Scope of Coclaurine N-Methyltransferase'. *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 10760-10764.
- [298] R. J. Polinsky, *Clinical therapeutics* **1998**, 20, 634-647; 'Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease'.
- [299] M. W. Jann, *Pharmacotherapy* **2000**, *20*, 1-12; 'Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease'.
- [300] B. R. Williams, A. Nazarians, M. A. Gill, *Clinical therapeutics* **2003**, *25*, 1634-1653; 'A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor'.
- [301] K. Sharma, *Mol. Med. Rep.* **2019**, *20*, 1479-1487; 'Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics'.
- [302] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, V. M. Vasic, *Curr. Neuropharmacol.* 2013, 11, 315-335; 'Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology'.
- [303] L. Fan, C. Mao, X. Hu, S. Zhang, Z. Yang, Z. Hu, H. Sun, Y. Fan, Y. Dong, J. Yang, Front. neurol. 2020, 10, 1312-1324; 'New insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease'.
- [304] C. Jang, D. K. Yadav, L. Subedi, R. Venkatesan, A. Venkanna, S. Afzal, E. Lee, J. Yoo, E. Ji, S. Y. Kim, *Sci. Rep.* 2018, 8, 1-21; 'Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors designed by pharmacophore-based virtual screening, molecular docking and bioassay'.
- [305] H. U. C. Brass, Inaugural-Dissertation, 'Die farbenfrohe Welt der Prodiginine-Neue Enzyme f
 ür die Synthese bioaktiver Naturstoffderivate', Heinrich-Heine-Universit
 ät D
 üsseldorf (D
 üsseldorf), 2021.
- [306] A. S. Klein, Inaugural-Dissertation, 'Methoden zur Herstellung von Prodigininen als Wirkstoffe – Eine farbenfrohe Brücke zwischen Chemie und Biologie', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), 2017.

- [307] B. C. Chapple, Masterarbeit, 'Enzymatic alkyl-derivatization of a physostigmine precursor using two different SAM-supply systems', Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf), **2021**.
- [308] K. Hsiao, H. Zegzouti, S. A. Goueli, *Epigenomics* 2016, 8, 321-339; 'Methyltransferase-Glo: a universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases'.
- [309] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, J. Comput.-Aided Mol. Des. 2013, 27, 221-234; 'Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments'.
- [310] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. Klicic, D. Mainz, M. Repasky, E. Knoll, M. Shelley, D. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1739-1749; 'Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy'.
- [311] T. A. Halgren, R. B. Murphy, R. A. Friesner, H. S. Beard, L. L. Frye, W. T. Pollard, J. L. Banks, *J. Med. Chem.* 2004, 47, 1750-1759; 'Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening'.
- [312] B. T. Burlingham, T. S. Widlanski, J. Chem. Educ. 2003, 80, 214; 'An intuitive look at the relationship of K_i and IC₅₀: a more general use for the Dixon plot'.
- [313] M. D. Greenhalgh, J. E. Taylor, A. D. Smith, *Tetrahedron* 2018, 74, 5554-5560; 'Best practice considerations for using the selectivity factor, s, as a metric for the efficiency of kinetic resolutions'.
- [314] C. Markl, W. P. Clafshenkel, M. I. Attia, S. Sethi, P. A. Witt-Enderby, D. P. Zlotos, Arch. Pharm. 2011, 344, 666-674; 'N-Acetyl-5-arylalkoxytryptamine Analogs: Probing the Melatonin Receptors for MT1-Selectivity'.
- [315] H. Yokoo, A. Ohsaki, H. Kagechika, T. Hirano, *Tetrahedron* 2016, 72, 5872-5879; 'Structural development of canthin-5, 6-dione moiety as a fluorescent dye and its application to novel fluorescent sensors'.
- [316] G. Spadoni, C. Balsamini, A. Bedini, A. Carey, G. Diamantini, B. Di Giacomo, A. Tontini, G. Tarzia, R. Nonno, V. Lucini, *Med. Chem. Res.* **1998**, *41*, 1-13; '*N*-Acyl-5-and-2, 5substituted tryptamines: synthesis, activity and affinity for human mt1 and MT2 melatonin receptors'.
- [317] M. Hasegawa, K. Yamada, Y. Nagahama, M. Somei, *Heterocycles* **1999**, *51*, 2815-2821; 'A novel methodology for preparing 5-chloro-and 5-bromotryptamines and tryptophans, and its application to the synthesis of (±)-bromochelonin B'.

10. ANHANG

10.1 Rohdaten der Optimierung des SAM Recyclings durch statistische

Versuchsplanung

Tabelle A 1. Rohdaten der statistischen Versuchsplanung (DoE) zur Optimierung des SAM Recyclingsystems (DoE 1) für die SgPsmD gekoppelte Reaktion.

		Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Ergebnis
Nummer	Versuch	A:c(SAH)	B:c(MeI)	C:EDTA	D:T	E:pH	rel. Umsatz
		μΜ	Äq.	mм	°C	рН	%
23	1	50	5	0	35	7.5	89
19	2	50	1	0	35	8	47
24	3	50	5	0	35	7.5	95
26	4	20	1	1	35	8	58
11	5	50	1	1	25	8	48
28	6	50	1	1	35	7.5	55
9	7	20	1	1	25	7.5	45
5	8	20	5	0	25	7.5	51
12	9	50	1	1	25	8	53
17	10	20	1	0	35	7.5	44
8	11	50	5	0	25	8	54
27	12	50	1	1	35	7.5	48
22	13	20	5	0	35	8	n.d.
31	14	50	5	1	35	8	82
15	15	50	5	1	25	7.5	56
18	16	20	1	0	35	7.5	50
3	17	50	1	0	25	7.5	52
21	18	20	5	0	35	8	50
16	19	50	5	1	25	7.5	45
20	20	50	1	0	35	8	70
14	21	20	5	1	25	8	57
1	22	20	1	0	25	8	52
25	23	20	1	1	35	8	43
6	24	20	5	0	25	7.5	59
7	25	50	5	0	25	8	53
13	26	20	5	1	25	8	55
30	27	20	5	1	35	7.5	88
2	28	20	1	0	25	8	47
4	29	50	1	0	25	7.5	53
10	30	20	1	1	25	7.5	48
29	31	20	5	1	35	7.5	74
32	32	50	5	1	35	8	95

		Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Ergebnis
Std	Run	A:c(MeI)	B:PsmD	C:HMT	rel. Umsatz
		тм	μL	μL	%
			-	-	
16	1	20	24.1	738	56
22	2	13	1	500	42
31	3	13	15.5	500	46
9	4	6	6,9	738	48
14	5	6	24.1	738	100
30	6	13	15.5	500	100
1	7	6	6.9	262	100
8	8	20	24.1	262	100
29	9	13	15.5	500	49
28	10	13	15.5	900	49
32	11	13	15.5	500	37
13	12	6	24.1	738	51
10	13	6	6.9	738	100
18	14	1	15.5	500	100
26	15	13	15.5	100	100
27	16	13	15.5	900	100
12	17	20	6.9	738	43
20	18	25	15.5	500	46
17	19	1	15.5	500	94
2	20	6	6.9	262	86
4	21	20	6.9	262	7
3	22	20	6.9	262	2
25	23	13	15.5	100	100
15	24	20	24.1	738	100
23	25	13	30	500	90
5	26	6	24.1	262	94
11	27	20	6.9	738	90
24	28	13	30	500	85
21	29	13	1	500	81
19	30	25	15.5	500	85
6	31	6	24.1	262	81
7	32	20	24.1	262	82
33	33	13	15.5	500	84

 Tabelle A 2.
 Rohdaten der statistischen Versuchsplanung (DoE) zur Optimierung des SAM

 Recyclingsystems (DoE 2) für die SgPsmD gekoppelte Reaktion.

10.2 Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

10.2.1 Vektorkarte pET21a(+)_psmD_Sg



Abbildung A 1. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET21a(+)_psmD_Sg.

Nukleotidsequenz psmD_Sg

Aminosäuresequenz SgPsmD

MMQGQPHQDAGMPEPYAATADVYDRLVDYAIAEWGECPRPQMADFVEQAWAARGHRVRRVLELC CGTGLMTEQLVRRGYEVTAVDRSETMLALAKQRVGGAADFHQIELPAPLPDGADAVVCTAAAFNYQA SARSLGETLRAVATVLPAGATFVFDIETAALLKGHWGNRVWAADEGDLAFIWDFTSEPDTTYCDVHYT QFTRHEAGADAYTGVREVHRLYAFDHDTVRAQARAAGFAQAEVFDNYTERPATDTTRYETWVLTRD ERSR<u>HHHHHH</u>*





Abbildung A 2. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET21a(+)_psmc_Sg.

Nukleotidsequenz psmc_Sg

Aminosäuresequenz SgPsmC

MADDAHAPMYGAIAEIYDRLDDWIVATWHEQPVPERVAFLRKRWEQRDGEVRDVLDLCCGTGSVLH ELKGAGYEVTGLDQSPQMLGLARQRLGDGTALIQAQLPDIPVPDAAMDAVCSTGAALSYTPGEAALA QILLAVHRVLRPGGVFVFDVLSRHMITEHAGRHVWAADQGDFAFIWEFTNPSEKYSEAFYTQFLREG GPDSARYVRTSEKHRLYVLDHSPVRRAAERAGFTTAEVLDNYTDTPAHESTLYDTWVLTRAPR<u>HHHH</u> <u>HH</u>*
10.2.3 Vektorkarte pET21a(+)_psmD_Sa



Abbildung A 3. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET21a(+)_psmD_Sa.

Nukleotidsequenz psmD_Sa

Aminosäuresequenz SaPsmD

MQGQPHQDAGMPEPYAATADVYDRLVAYAIAQWGESPRPRMADFIEQAWKARGQRVRRVLELCCG TGLMTEELVRRGYEVTAVDRSETMLALAKKRVGGAADFRQIELPAPLPGDTDAVVCTAAAFNYQSSA HSLGETLHAVATVLPAGATFVFDIETAALLKGHWGNRMWAADEGDLAFIWNFTSQPDTTYCDVHYTQ FTRSEAGPDTYTGTREVHRLYAFDHDTVRAQARAAGFARAEVFDNYTERPATDATHYETWFLTRDES LE<u>HHHHHH</u>*

10.2.4 Vektorkarte pET28a(+)_hmt_Ct



Abbildung A 4. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET28a(+)_hmt_Ct

Nukleotidsequenz hmt_Ct

ATGGGCCATCATCATCATCACCATGCAGAAAATCTGTATTTTCAGGGTAGCGGCCTGGGTATGGA TGCAGATACCGCAAGTTTTTGGGAAGAAAAATATCGTGCAGATCTGACCGCCTGGGATCGTGGTG GTGTGAGTCCGGCACTGGAACATTGGCTGGCAGAAGGCGCCCTGAAACCGGGTCGCATTCTGAT TCCGGGCTGTGGTTATGGTCATGAAGTGCTGGCCCTGGCACGTCGTGGCTTTGAAGTGTGGGGT CTGGATATTGCACTGACCCCGGTTCGTCGCCTGCAGGAAAAACTGGCACAGGCCGGTCTGACCG CCCATGTTGTTGAAGGTGACGTGCGTACCTGGCAGCCGGAACAGCCGTTTGATGCAGTGTATGA ACAGACCTGCCTGTGGCGCACTGAGTCCGGAAGATTGGCCGCGCTATGAAGCCCAGCTGTGCCG CTGGCTGCGCCCTGGTGGTCGTCTGTTTGCCCTGTGGATGCAGACCGATCGTCCGGGTGGCCC GCCGTATCATTGCGGCCTGGAAGCCATGCGTGTGCTGTTTGCACTGGAACGTTGGCGTTGGGTT GAACCGCCGCAGCGTACCGTGCCGCATCCGACAGGCTTTTCGAATATGCCGCAATTCTGGAAC GCCTGGTTTAACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

Aminosäuresequenz CtHMT

MG<u>HHHHH</u>AENLYFQGSGLGMDADTASFWEEKYRADLTAWDRGGVSPALEHWLAEGALKPGRILIP GCGYGHEVLALARRGFEVWGLDIALTPVRRLQEKLAQAGLTAHVVEGDVRTWQPEQPFDAVYEQTC LCALSPEDWPRYEAQLCRWLRPGGRLFALWMQTDRPGGPPYHCGLEAMRVLFALERWRWVEPPQ RTVPHPTGFFEYAAILERLVHHHHHH*

```
10.2.5 Vektorkarte pET21a(+)_mat_Tk
```



Abbildung A 5. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET21a(+)_mat_Tk.

Nukleotidsequenz mat_Tk

ATGGCTGGCAAAGTTCGTAATATTGTTGTTGAAGAACTGGTTCGTACACCTGTTGAAATGCAAAAA GTTGAACTGGTTGAACGTAAAGGGATCGGGCATCCGGATAGCATTGCAGATGGGATTGCAGAAG CAGTTAGCCGTGCTCTGTCCCGTGAATATGTGAAACGTTATGGTATCATACTGCATCATAATACAG ATCAAGTTGAAGTTGTTGGTGGCCGTGCATATCCGCAATTTGGTGGTGGGGAAGTTATCAAACCG ATCTATATCCTGCTGTCCGGCCGTGCAGTTGAAATGGTTGATCGTGAATTTTTTCCGGTTCACGAA ATTGCTTTAAAAGCAGCTAAAGATTATCTGCGTAAAGCAGTTCGTCATCTGGATCTGGAACATCAT GTTATCATTGATTCCCGGATCGGCCAAGGCAGCGTAGATCTGGTTGGCGTTTTTAATAAAGCTAA CAGTTGGGGAAGATATCAAAGTTATGGGGCTGCGTAAAGGCGATGAAATTGATCTGACAATCGCA GCTGCAATCGTTGATAGCGAAGTTGATAATCCGGATGACTATATGGCAGTGAAAGAAGCAATCTA TGAAGCAGCAAAAGGAATCGTTGAATCCCATACTGAACGTCCGACAAATATCTATGTGAATACAG CAGACGACCCGAAAGAAGGTATCTATTATATTACAGTTACTGGCACTAGCGCAGAAGCAGGTGAT GATGGGTCCGTTGGCCGTGGTAATCGTGTTAATGGTCTGATCACCCGAATCGTCACATGAGCAT GGAAGCTGCTGCTGGGAAAAATCCGGTGAGCCATGTTGGGAAAATCTATAATATCCTGTCGATGC TGATTGCTAATGATATTGCAGAACAAGTTGAAGGTGTTGAAGAAGTTTATGTTCGCATCCTGAGCC AAATAGGCAAACCGATTGATGAACCCCTGGTTGCAAGCGTGCAAATTATCCCGAAAAAAGGTTAT TCGATCGATGTTCTGCAAAAACCGGCTTATGAAATTGCAGATGAATGGTTAGCAAATATTACTAAA ATTCAAAAAATGATCCTGGAAGATAAAGTAAATGTTTTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

Aminosäuresequenz mat_Tk

MAGKVRNIVVEELVRTPVEMQKVELVERKGIGHPDSIADGIAEAVSRALSREYVKRYGIILHHNTDQVE VVGGRAYPQFGGGEVIKPIYILLSGRAVEMVDREFFPVHEIALKAAKDYLRKAVRHLDLEHHVIIDSRIG QGSVDLVGVFNKAKKNPIPLANDTSFGVGYAPLSETEKIVLETEKYLNSDEFKKKYPAVGEDIKVMGLR KGDEIDLTIAAAIVDSEVDNPDDYMAVKEAIYEAAKGIVESHTERPTNIYVNTADDPKEGIYYITVTGTSA EAGDDGSVGRGNRVNGLITPNRHMSMEAAAGKNPVSHVGKIYNILSMLIANDIAEQVEGVEEVYVRIL SQIGKPIDEPLVASVQIIPKKGYSIDVLQKPAYEIADEWLANITKIQKMILEDKVNVFLEH<u>HHHHH</u>*

```
10.2. Vektorkarte pET21a(+)_psmB_Sg
```



Abbildung A 6. Vektorkarte des in dieser Arbeit verwendeten Plasmids pET28a(+)_psmB_Sg.

Nukleotidsequenz-psmB_Sg:

CATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTG GTGGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGTGCTCGAACC CCGCATCAAAGAACGCTTCCTCGACGGTCTCAACACGGCCCCGCCGTTGGAAGGGACGACTCCC GACGCCTTGCGCGGAGCGGTTGAGGAACTGCTCTCCTTCTGCGCGCCGCCTCTCCCCGTCGCC CAGGTCATGGACGGCACGACCACGGAAGCCACGGGGGGCAGTGCCGTTCCGGGTCTACCATCCG CGGCCGGGGGTCCCCCTCCCGCTGGTCGTGTACTTCCACGGCGGCGGCTGGATGGCCGGCAG CATCGCGTTCATGGATCCTCCGCTGCGCGCCCTGGCGGTCGAGGCCGGCGTGGTGGTGCTGAG TCACCTCCTGGGCCTACGAGAACGCCGCCGCGCCGCGGCCGACCCCGAGCGGTTCGCGGTC GCCGGGGACAGTGCGGGCGCGCGCCTCTCGCCGTCGTCGCACTTGAGGCCCGTGGCTCGGC CGTCTCCATCGGCCACCAGCTCCTGATCAATCCGGCCGTCGACCCGCGGATGAACACCGCCTCC TACCGGGAGTTCGCGACGGGCTACCAGAACAGCGCGTCGATGATGAACCTGTGCTGGCGCACG TACCTGAACCGGCCCGACGGGCCCCTGGACGACGCGCCCTGGCAGGCCGCCCCGGTCTTCGC CCCGGACCTCTCCGGCCTGCCGCCGACCACCGTCATCACGGTCGAGTACGACCCGCTGCGCGA CGAGGGCGAGGCATACGCCGCGCGGGATGGCCGCCGCGGGGTGCCGACCACGCTGGTGCGCT GCCCGGGTCTCATCCACTGCTCACTCCACCTGGACGGCGTAGCCCCTCACGCCGCCTCCCTACG GCAGCACGCGGTGCGGGCGCTGACCACCGCGTTCGCCTGA

Aminosäuresequenz-psmB_Sg:

MGSS<u>HHHHHH</u>SSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELRRQACVLEPRIKERFLDGLNTAPPLEG TTPDALRGAVEELLSFCAPPLPVAQVMDGTTTEATGAVPFRVYHPRPGVPLPLVVYFHGGGWMAGSI AFMDPPLRALAVEAGVVVLSAEYRLAPEHPFPAGLHDAQAVTSWAYENAAALGADPERFAVAGDSA GAALAVVVALEARGSAVSIGHQLLINPAVDPRMNTASYREFATGYQNSASMMNLCWRTYLNRPDGPL DDAPWQAAPVFAPDLSGLPPTTVITVEYDPLRDEGEAYAARMAAAGVPTTLVRCPGLIHCSLHLDGVA PHAASLRQHAVRALTTAFA*



10.3 Konzentrations-Wirkungs-Diagramme zur Bestimmung der IC₅₀-Werte

Abbildung A 7. Konzentrations-Wirkungs-Kurven die zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert) genutzt wurde. A. Physostigmin (1); B. Eserolin (12); C. Esermethol (30); D. Rivastigmin (18); E. Donepezil (94)



Abbildung A 8. Konzentrations-Wirkungs-Kurven die zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration (IC₅₀-Wert) genutzt wurde. A. 2a; B. 2g; C. 2h; D. 2b; E. 2c; F. 2e.

10.4 NMR-Spektren



Abbildung A 9.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3a in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 10. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3b in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 11. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3c in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).

 $\begin{array}{c} 7.17\\ 7.17\\ 7.17\\ 7.15\\ 7.01\\ 6.95\\ 6.66\\$ C1.10 (1 11 1 0 N H HO Ĥ 3d 1:00 € 0:93 0.03 0.07 F-16.0 1.00-± 2.09-I 2.12 I 6.12 -≭ 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 f1 (ppm) 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 111.22 111.13 110.94 -24.91 190 100 90 f1 (ppm) 40 0 180 170 160 150 140 130 120 110 80 70 60 50 30 20 10

Abbildung A 12.¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3d in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).

3.46 3.45 3.45 3.33 MeOD 3.33 MeOD 3.33 MeOD 3.32 MeOD 3.32 MeOD 2.87 2.89 2.81 6.66 6.66 6.66 <1.15 <1.15 / / 1 11 1 0 HO NH 3e 2.09-I 1.00 → 1.01 J 2.05 I 9.36 ⊒ 7.0 7.5 4.5 4.0 f1 (ppm) 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 6.5 6.0 5.5 5.0 3.5 ---40.12 ---38.21 190 180 100 90 f1 (ppm) 30 20 10 0 170 160 150 140 130 120 110 80 70 60 50 40

Abbildung A 13.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3e in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 14: ¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3f in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 15.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3g in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 16. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3h in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 17. 1 H- und 13C-NMR-Spektrum von 3i in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 18.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3j in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 19.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3k in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 20. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 3I in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 21. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4a in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 22. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4b in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 23. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4c in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 24.¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4d in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 26.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4f in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 27. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4g in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 28.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4h in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 29. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4i in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 30.¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4j in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 31. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4k in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 32.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4I in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 33. ¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 4m in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 35.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von rac-2a in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 36.¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2b in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 37.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2c in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 38.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2d in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).
-7.26 CDCI3 --5.25 -1.22- 3.91 - 3.90 - 3.88 225 225 225 225 225 226 226 206 -3.28 -3.28 -3.28 -3.26 -3.28 -3.28 -3.26 -3.28 -3.28 -2.88 1 1 17 7 ļ ΗŃ 0 ő H 2e 1.8 1.08 - I 3.76 -≖ 9.91 -= 0.94 -3.35 -≖ 1.15 <u>–</u>I 1.38 - ± 1.00 ↓ 1.00 ↓ 0.98 -6.5 2.0 7.5 5.0 7.0 6.0 5.5 4.5 f1 (ppm) 4.0 3.5 3.0 2.5 1.5 ×38.90 38.32 27.73 27.23 -24.39 -47.66 180 70 170 160 140 130 120 100 f1 (ppm) 80 40 30 150 110 90 60 50

Abbildung A 39.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2e in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 40.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von rac-2e in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 41. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2g in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

-7.26 CDCl3 (6.81 (6.77 (6.78 (6.59 (6.59 -5.20 11-1 C 10 0 2h 문 지 3.5 T 158 7651 2.0 3.16 -≖ 1.00 1 1.04 -3.74 -€ 500 2.44 8.0 4.5 4.0 f1 (ppm) 2.5 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 3.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -82.44 77.25 0003 76.83 0003 -144.81 -121.42 <116.48 -116.41 -110.72 -58.43 -52.58 -47.46 -29.70 -24.07 -22.63 -18.44 -15.17 170 160 150 140 130 120 110 100 90 f1 (ppm) 80 70 60 50 40 30 20 10 0

Abbildung A 42.¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2h in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).

Abbildung A 43.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 2m in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 44. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac-2m* in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 45. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac-2*I in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 46.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac-*2q in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 47. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac-5a* in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 48.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 79b in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 49.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von 79i in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).





Abbildung A 50.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von rac-82a in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 51.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac*-82b in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 52.¹ H- und ¹³C-NMR-Spektrum von *rac-86b* in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 53. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von rac-87a in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 54. ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von rac-87b in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



10.4.1 Quantitative NMR Spektren



Abbildung A 56. ¹H-qNMR-Spektrum von 3a in Methanol-D4 (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 57. ¹H-qNMR-Spektrum von 2a in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 58. ¹ H-qNMR-Spektrum von 2a in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 59. ¹H-qNMR-Spektrum von 2g in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 60. ¹H-qNMR-Spektrum von 2g in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 61. ¹H-qNMR-Spektrum von 2g in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 62. ¹H-qNMR-Spektrum von 2h in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 63. ¹H-qNMR-Spektrum von 2h in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 64. ¹H-qNMR-Spektrum von 2b in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 65.¹H-qNMR-Spektrum von 2b in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 66.¹ H-qNMR-Spektrum von 2c in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 67. ¹H-qNMR-Spektrum von 2c in CDCI₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 68.¹ H-qNMR-Spektrum von 1 in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 69.¹ H-qNMR-Spektrum von 1 in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 70. ¹H-qNMR-Spektrum von 30 in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).



Abbildung A 71.¹H-qNMR-Spektrum von 30 in CDCl₃ (600 MHz/151 MHz).

10.5 LC-MS Daten



Abbildung A 72. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4g (M = 289.4 g/mol) zu 2g (M = 303.3 g/mol).



Abbildung A 73. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4h (M = 289.4 g/mol) zu 2h (M = 303.4 g/mol).



Abbildung A 74. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4i (M = 303.4 g/mol) zu 2i (M = 317.4 g/mol).



Abbildung A 75. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4j (M = 317.4 g/mol). Es konnte keine Produktbildung detektiert werden.



Abbildung A 76. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4k (M = 337.3 g/mol). Es konnte keine Produktbildung detektiert werden.



Abbildung A 77. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4b (M = 289.3 g/mol) zu 2b (M = 304.3 g/mol).



Abbildung A 78. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4c (M = 303.4 g/mol) zu 2c (M = 317.4 g/mol).



Abbildung A 79. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4d (M = 303.3 g/mol) zu 2d (M = 317.4 g/mol).



Abbildung A 80. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4e (M = 317.4 g/mol) zu 2e (M = 331.3 g/mol).



Abbildung A 81. Massenchromatogramm und Massenspektrum der Biotransformation von 4f (M = 337.3 g/mol) zu 2f (M = 351.3 g/mol).

10.6 Kalibriergeraden

10.6.1 NP-LC Kalibrierung



Abbildung A 82. Kalibriergeraden für die Analytik via NP-HPLC. Substrat (4a) links; Produkt (2a) rechts; interner Standard (3-Methylindol) Mitte.





Abbildung A 83. Kalibriergerade der RP-LC von SAM (links) und SAH (rechts).
10.6.3 GC-MS Kalibrierung



Abbildung A 84. Kalibrierung der GC-MS mit Substrat [Indol (88a)] (links) und interner Standard Trimethoxybenzol (rechts).

10.6.3 Mtase Glo Assay SAH Kalibrierung



Abbildung A 85. SAH Kalibrierung für das Mtase Glo Assay.

10.7 Eigenanteile an den veröffentlichten Publikationen dieser Arbeit

<u>P. Schneider</u>, B. Henssen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. P. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23412-23418; 'Biocatalytic C3-Indole Methylation - A Useful Tool for the Natural-Product-Inspired Stereoselective Synthesis of Pyrroloindoles'

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Expression wurde in Zusammenarbeit mit Beatrix Paschold durchgeführt. Die Charakterisierung der C-3 Indol-Methyltransferase wurde von mir durchgeführt. Die Expression und Reinigung der HMT wurde von mir Durchgeführt, die Enzymaktivität wurde von Benjamin Chapple bestimmt. Die Synthesearbeiten zur Herstellung von Referenzverbindungen wurden von mir durchgeführt. Die Synthese von Substraten zur Evaluierung des Substratspektrums wurde in Zusammenarbeit mit Marcel Schatton durchgeführt Die Erhebung der analytischen Daten wurde zu großen Teilen durchgeführt, während die Implementierung und Optimierung der HPLC-Analytik von Birgit Henßen durchgeführt wurde. Biotransformationen im analytischen und präparativen Maßstab wurde von mir durchgeführt. Die erste Entwurf des Manuskripts wurde in Zusammenarbeit mit Jörg Pietruszka und Tom Classen verfasst. Das Finale Manuskript wurde von Jörg Pietruszka verfasst.

L. Winand, <u>P. Schneider</u>, S. Kruth, N.-J. Greven, W. Hiller, M. Kaiser, J. Pietruszka, M. Nett, *Org. Lett.* **2021**, *23*, 6563-6567; 'Mutasynthesis of Physostigmines in Myxococcus xanthus'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Die Synthese der Verbindungen **3j-I** wurde durchgeführt. Die analytischen Daten für die Verbindungen **3j-I** wurden erhoben. Die biologische Testung der erhaltenen Verbindungen mit Hilfe des Acetylcholinesterase Assays (AChE und BChE Assay) wurde durchgeführt.

B. David, <u>P. Schneider</u>, P. Schaefer, J. Pietruszka, H. Gohlke, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 491-496; "Discovery of new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: virtual screening and in vitro characterization".

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Etablierung des Acetylcholinesterase Assays, welches für die Evaluierung der Bioaktivität genutzt wurde. Planung und Bestellung der Testsubstanzen. Bestimmung des Inhibitionsprofils der potenziellen, neuen Inhibitoren. Erstellung eines Teils des ersten Entwurfs des Manuskripts in Zusammenarbeit mit Dr. Benoit David.

D. A. Amariei, N. Pozhydaieva, B. David, <u>P. Schneider</u>, T. Classen, H. Gohlke, O. H. Weiergraber, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 14130-14139; 'Enzymatic C3-Methylation of Indoles Using Methyltransferase PsmD – Crystal Structure, Catalytic Mechanism, and Preparative Applications'.

Die oben genannte Publikation enthält die folgenden Eigenanteile: Generierung der biochemischen Daten zur Charakterisierung von *Sg*PsmD und Bestimmung des Substratspektrums. Synthese von Start und Referenzmaterialien (Substrat, Produkt und Nebenprodukt) zur Kalibrierung der HPLC und Bestimmung des Substratspektrums von *Sa*PsmC. Planung und Gestaltung der gerichteten Evolution von *Sg*PsmD im Rahmen der Masterarbeit von N. Pozhydaieva. Die Suche nach einem geignenten *Sg*PsmD Homolog wurde durchgeführt, die Sequenz erhalten und die Bestellung der Gene gemeinsam mit T. Classen durchgeführt.

11. FORMELREGISTER

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen aufgeführt und die entsprechende Nummerierung im Laborbuch vermerkt.

			$HN \rightarrow O \rightarrow H = HN + O \rightarrow H = HN + O \rightarrow H = HN + HN +$
3	R ¹ =methyl; PSC_P_NAc (3a) R ¹ =ethyl; PSC_P_P_NAc (3b) R ¹ =propyl; PSC_P_B_NAc (3c) R ¹ = <i>iso</i> -propyl; PSC_P_IB_NAc (3d) R ¹ = <i>tert</i> butyl; PSC_P_TMA_NAc (3e) R ¹ =phenyl; PSC_P_BA_NAc (3f)	4	R ¹ =methyl; PSC_Carb_P (4a) R ¹ =ethyl; PSC_P_P (4b) R ¹ =propyl; PSC_B_P (4c) R ¹ = <i>iso</i> -propyl; PSC_IB_P (4d) R ¹ = <i>tert</i> butyl; PSC_TMA_P (4e) R ¹ =phenyl; PSC_BA_P (4f)
	$ \begin{array}{c} R^2 \\ HN \\ O \\ O \\ HN \\ HN \\ H \\$		
4	R ² =ethyl; PSC_Et_Carb_P (4h) R ² =propyl; PSC_Prop_Carb_P (4i) R ² =tertbutyl; PSC_tBu_Carb_P (4j) R ² =phenyl; PSC_Phen_Carb_P (4k)	2	R ¹ =methyl; PSC_Prep_a_P (2a) R ¹ = <i>tert</i> butyl; PSC_Prep_b_P (2e) R ¹ =ethyl; PSC_Prep_P_P (2b) R ¹ =propyl; PSC_Prep_B_P (2c) R ¹ = <i>iso</i> -propyl; PSC_Prep_IB_P (2d)
4g	PSC_NDi_Carb_P	2h	PSC_Prep_Et_carb_P
2g	PSC_Prep_NDi_Carb_P	2m	PSC_Prep_V046_P



12. DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jörg Pietruszka. Er ermöglichte mir basierend auf meiner Ausbildung einen neuen Weg einzuschlagen und so ein multidisziplinäres Thema mit verschiedenen Schwerpunkten zu entwickeln. Besonders war dabei die Freiheit, jeder Idee die konzeptionell in den Rahmen dieser Arbeit passte, einschlagen zu können. Durch ein konstruktives Miteinander konnten wir die Methyltransferasen als neue Enzymklasse im IBOC etablieren und zu einem gemeinschaftlichen Projekt entwickeln, welches dir hoffentlich über viele Jahre hinweg Freude bereiten wird. Darüber hinaus bin ich dir sehr dankbar, dass ich bereits früh Verantwortung für unser Projekt, auch außerhalb des Instituts, übernehmen durfte. Über die Zeit der Doktorarbeit hinweg konnte ich mich so als Wissenschaftler weiterentwickeln und bin sehr glücklich diesen Weg auch in Zukunft weiter gehen zu dürfen.

Bei Prof. Dr. Holger Gohlke möchte ich mich für die Übernahme des Korreferats bedanken und ebenfalls für seine Bereitschaft und der Freude an dem gemeinsamen Kooperationsprojekt. Zusätzlich gilt mein Dank an dieser Stelle auch Dr. Benoit David Euch verdanke ich viele spannende Gespräche und tiefe Einblicke in die geheime *in silico* Welt. Ohne diese Zusammenarbeit hätte sich das Projekt niemals in diese Richtung entwickeln können.

Ein weiterer Dank geht an das gesamte CKB (CLIB-Kompetenzzentrum Biotechnologie) Team. Aus diesem Konsortium heraus ergaben sich großartige Möglichkeiten zur Kooperation und zum wissenschaftlichen Austausch. Besonders hervorheben möchte ich dabei Prof. Dr. Markus Nett und Dr. Lea Winand. Vielen Dank für die hervorragende Zusammenarbeit. Die gemeinsamen Meetings waren stets geprägt von gegenseitigem wissenschaftlichem Interesse und Respekt, unterstrichen durch großartige Ergebnisse.

Zusätzlich möchte ich dem kompletten Team des IBI-1, insbesondere Arnd und Sabine für Ihre herzliche Art und Bereitschaft, uns neue Methoden und Sichtweisen beizubringen, Danken. Die wenigen Monate, die wir zusammen Verbringen durften, waren eine Freude.

Vielen Dank auch an alle Person aus dem Institut für Bioorganische Chemie. Vielen Dank Birgit für einen unermüdlichen Einsatz und die unzähligen Stunden die du allein oder mit mir zusammen an der HPLC oder MS verbracht hast. Ohne dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank Bea für deine Unterstützung und Begeisterung für das Projekt. Vielen Dank Tom, für deine Unterstützung vor allem zu Beginn meiner Arbeit. Vielen Dank Moni für die herausragende Kommunikation, mir hat es niemals an Nachschub gefehlt. Ein zusätzlicher Dank gilt allen Studenten, die mich über die letzten Jahre hinweg begleitet haben und durch Ihre Mitarbeit Teile dieser Arbeit ermöglichten, für welche sonst schlicht die Zeit gefehlt hätte. Zu guter Letzt gilt der größte Dank meiner Familie und Freunden. Vielen Dank allen fleißigen Lesern und Kritikern, ohne euch hätte ich dir Arbeit nicht in dieser Zeit verfassen können.

Insbesondere bei meinen Eltern möchte ich mich für die unendliche Unterstützung über all die Jahre hinweg bedanken. Das größte Geschenk ist die Freiheit, tun zu können was man liebt. Am Ende des Weges schließt sich der Kreis: Vielen Dank liebe Oma, lieber Opa, ihr seid immer an meiner Seite.

13. ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt. Es wurde zuvor kein weiterer Promotionsversuch unternommen.

P-12

Pascal Schneider

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich

Band 31 **Development and Characterisation of Galactosynthases for Application in Organic Synthesis** B. W. Berntsson (2018), xvi, 226, A-1 – B-5 pp ISBN: 978-3-95806-321-1

Band 32

Lichtregulierte Genexpression mittels photolabil geschützter Effektormoleküle in Saccharomyces cerevisiae

P. M. Kusen (2018), 215 pp ISBN: 978-3-95806-322-8

Band 33

α,β-Ungesättigte δ-Lactone als Schlüsselbausteine für die Synthese von Isocumarinen und Naphthopyranonen
– Neue Wirkstoffkandidaten und theoretische Betrachtungen –
A. Weber (2018), 340 pp
ISBN: 978-3-95806-325-9

Band 34 Methoden zur Herstellung von Prodigininen als Wirkstoffe – Eine farbenfrohe Brücke zwischen Chemie und Biologie A. S. Klein (2018), IX, 265 pp ISBN: 978-3-95806-343-3

Band 35 Ammoniumylide in der asymmetrischen Organokatalyse L. Öhler (2019), V, 377 pp ISBN: 978-3-95806-407-2

Band 36 Enantioselektive Totalsynthese von Altersolanolen B. Mechsner (2019), I, V, 311 pp ISBN: 978-3-95806-412-6

Band 37 Glycosynthases – tuning glycosidase activity towards glycoside diversification and synthesis M. R. Hayes (2019), VI, 225 pp ISBN: 978-3-95806-441-6

Band 38 **Chemoenzymatische Synthesemethoden – Zugang zur duftenden Welt der Chemie und darüber hinaus** C. Kumru (2019), V, 338 pp ISBN: 978-3-95806-446-1

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität im Forschungszentrum Jülich

Band 39 Oxidoreduktasen für die Bereitstellung von Schlüsselbausteinen der Natur- und Wirkstoffsynthese R. Krug (2020), 216 pp ISBN: 978-3-95806-454-6

Band 40 Die farbenfrohe Welt der Prodiginine – Neue Enzyme für die Synthese bioaktiver Naturstoffderivate

H. U. C. Braß (2021), IX, 349 pp ISBN: 978-3-95806-523-9

Band 41 Oxidoreduktasen: Von neuen Biokatalysatoren bis zum fertigen Naturstoff D. Dickmann (2021), 274 pp ISBN: 978-3-95806-573-4

Band 42 **Chemie ohne Grenzen – Biokatalysatoren und Bororganyle als wertvolle Hilfsmittel für die zielmolekülorientierte, enantioselektive Synthese** M. R. Mantel (2021), 487 pp ISBN: 978-3-95806-585-7

Band 43 **Über tetraolbasierte Allylboronsäureester und deren Potential in der stereoselektiven Synthese** P. Ullrich (2022), xii, 324 pp ISBN: 978-3-95806-618-2

Band 44 Design, Synthese und Charakterisierung neuartiger photocaged compounds – Optimierte Werkzeuge zur Etablierung wellenlängenselektiver Genexpression F. Hogenkamp (2022), V, 456 pp ISBN: 978-3-95806-637-3

Band 45 Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-b]indol basierten Naturstoffen P. Schneider (2023), x, 315 pp ISBN: 978-3-95806-690-8

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf im Forschungszentrum Jülich

Herausgegeben von Jörg Pietruszka

Der Einsatz von Enzymen zur stereo- und chemoselektiven Synthese von Wirk- und Naturstoffen zeigt sich zunehmend als wertvolles Instrument in der chemischen und pharmazeutischen Industrie. Dabei liegt der Fokus der aktuellen Forschung auf der Entdeckung von neuartigen Enzymen, sowie der Optimierung von bereits bekannten Biokatalysatoren. Beschleunigt wird diese Entwicklung durch computergestützte Analyse von genomischen Daten, Vorhersage von Struktur-Wirkbeziehungen und modernen molekularbiologischen Methoden. Die Verknüpfung dieser Bausteine in Kombination mit klassischer organischer und analytischer Chemie ermöglicht die gezielte Implementierung von Biokatalysatoren und leistet somit einen beachtlichen Beitrag zu der Transformation der chemischen- und pharmazeutischen Industrie hin zu einer nachhaltigen Zukunft.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Etablierung von C- und N-Methyltransferasen zur biokatalytischen und stereoselektiven Bereitstellung bioaktiver Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol-Alkaloide, die sich von dem Naturstoff Physostigmin ableiten. Zentrale Aspekte der Untersuchung waren dabei die biochemische Charakterisierung von geeigneten Enzymen, ihre präparative Nutzung unter Verwendung eines Cosubstrat-Regenerationssystems und die Untersuchung der Bioaktivität der hergestellten Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole.

Innerhalb dieser Arbeit konnte durch den Einsatz von Enzymen unterschiedlich substituierte Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indole im präparativen Maßstab biokatalytisch hergestellt werden. Die bis dato chemisch nicht zugänglichen Physostigmin-Derivate wurden hinsichtlich ihrer Bioaktivität gegenüber den medizinisch relevanten molekularen Zielstrukturen AChE (Acetylcholinesterase) und BChE (Butyrylcholinesterase) untersucht. Dabei wurde eine Inhibition dieser Enzyme im nanomolaren Bereich nachgewiesen und eine für bisher charakterisierte Physostigmin-Derivate unübliche Selektivität gegenüber einer der beiden Zielstrukturen nachgewiesen.

Band 45 ISBN 978-3-95806-690-8