

Charakterisierung der N-Methyltransferase SgPsmC: Anwendung in der kinetischen Racematspaltung von Pyrroloindolinen

Benjamin Panagiotis Chapple, Lia Nitz, Pascal Schneider, Birgit Henßen,
Sebastian Myllek, Mona Haase, Thomas Classen, und Jörg Pietruszka

Article - Version of Record

Suggested Citation:

Chapple, B. P., Nitz, L., Schneider, P., Henßen, B., Myllek, S., Haase, M., Classen, T., & Pietruszka, J. (2025). Charakterisierung der N-Methyltransferase SgPsmC: Anwendung in der kinetischen Racematspaltung von Pyrroloindolinen. *Angewandte Chemie*, 138(2), Article e15459. <https://doi.org/10.1002/ange.202515459>

Wissen, wo das Wissen ist.



UNIVERSITÄTS-UND
LANDESBIBLIOTHEK
DÜSSELDORF

This version is available at:

URN: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:061-20260402-122153-3>

Terms of Use:

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

For more information see: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Biokatalyse

Charakterisierung der *N*-Methyltransferase SgPsmC: Anwendung in der kinetischen Racematspaltung von Pyrroloindolinen

Benjamin Panagiotis Chapple, Lia Nitz, Pascal Schneider, Birgit Henßen, Sebastian Myllek, Mona Haase, Thomas Classen, und Jörg Pietruszka*

Gewidmet Professor Steven V. Ley anlässlich seines 80. Geburtstags

Zusammenfassung: Viele Naturstoffe und pharmazeutische Verbindungen weisen ein Pyrroloindolin-Gerüst auf, was die Bedeutung des heterozyklischen Motivs unterstreicht. In dieser Arbeit haben wir uns das Ziel gesetzt, den Werkzeugkasten für die selektive Synthese von Pyrroloindolinen durch die Charakterisierung der *N*-Methyltransferase SgPsmC aus *Streptomyces griseofuscus*, welche an der Biosynthese von Physostigmin beteiligt ist, und durch ihre Anwendung in der selektiven kinetischen Racematspaltung von Pyrroloindolinen im präparativen Labormaßstab zu erweitern.

Einleitung

Die Notwendigkeit höchster optischer Reinheit für immer komplexere synthetische Zielverbindungen im pharmazeutischen Bereich hat die Nachfrage an neuen und maßgeschneiderten Synthesewerkzeugen steigen lassen.^[1] Im Hinblick auf letztere haben sich Enzyme als nützliche Ergänzung des Werkzeugkastens des Syntheschemikers erwiesen,^[2] vor allem aufgrund ihrer hohen Selektivität, ihrer Anpassungsfähigkeit durch rationales *engineering* und gerichtete Evolution,^[3] sowie ihres Potenzials für *late-stage* Modifikationen^[4] und für die umweltfreundlichere Gestaltung chemischer Prozesse.^[5]

Eine Enzymklasse, die in den vergangenen Jahren ein besonderes Interesse genießen durfte, waren die *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Methyltransferasen, deren Hauptfunktion die selektive Übertragung einer aktivierten Methylgruppe von ihrem Kosubstrat SAM auf eine Reihe verschiedener Akzeptorsubstrate ist.^[6] Es ist nicht nur ihr breites Substratspektrum, welches sie zu nützlichen Katalysatoren macht, sondern auch ihre Promiskuität andere Transfer-Reaktionen als nur „schlichte“ Methylierung katalysieren zu können.^[7–14] Wenn das entsprechende (unnatürliche) SAM-Analog bereitgestellt werden kann, können Methyltransferasen als „Allzweck“-Alkyltransferasen dienen.^[15,16] Das zunehmende Interesse an Methyltransferasen ist auch auf die Entwicklung verschiedener Systeme zur Kosubstrat-Generierung und dessen Recycling zurückzuführen,^[17–20] welche die chemische Instabilität^[21] und die schwierige Synthese^[7] von SAM und dessen Analoga zu umgehen versuchen. Zu den am häufigsten verwendeten Systemen gehören eine lineare Versorgungskaskade, bei der eine Methionin-Adenosyl-Transferase (MAT) zur Bildung von SAM aus Adenosintriphosphat (ATP) und L-Methionin eingesetzt wird,^[10,18,22] sowie ein echtes Recyclingsystem, das auf einer Halogenid-Methyltransferase (HMT) und einem Opfersubstrat (wie CH₃I oder CH₃OTs^[23]) für die Rückmethylierung von *S*-Adosylhomocystein (SAH) zu SAM basiert.^[24]

Neben der *in situ* Bereitstellung von SAM aus relativ kostengünstigen Ausgangsverbindungen können diese Systeme auch dazu verwendet werden, Zugang zu SAM-Analoga zu erhalten und so den mittels Methyltransferasen zugänglichen chemischen Raum zu erweitern.^[10,25] Auch wenn Methyltransferasen noch in einem frühen Anwendungsstadium sind, so haben die Entwicklung und Optimierung oben genannter Systeme stark zu ihrer Nutzung beigetragen und es ermöglicht, ihre hohe Chemo-,^[20,26–28] Regio-^[10,27,29–33] und Enantioselektivität hervorzuheben.^[34–38]

Pyrroloindoline (siehe Abbildung 1 für ausgewählte Strukturen **1–6**) bilden eine umfangreiche Gruppe natürlich vorkommender Alkaloide.^[39] Sie weisen verschiedene biologische Aktivitäten auf, die von analgetischen und antikanzerogen bis hin zu antimikrobiellen und anticholinergen Eigenschaften reichen,^[40–44] was das Interesse an deren Synthese und Derivatisierung erklärt. Es überrascht nicht, dass eine Reihe chemischer Synthesen – sowohl zu racemischen^[45,46] als auch zu enantiomerenreinen Produkten^[47–49] – beschrieben wurden, um das trizyklische Gerüst darzustellen.

[*] B. P. Chapple, L. Nitz, Dr. P. Schneider, B. Henßen, S. Myllek, M. Haase, Prof. Dr. J. Pietruszka
Institut für Bioorganische Chemie, Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf am Forschungszentrum Jülich, 52426 Jülich,
Deutschland
E-mail: j.pietruszka@fz-juelich.de

B. Henßen, Dr. T. Classen, Prof. Dr. J. Pietruszka
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG-1: Bioorganische
Chemie), Forschungszentrum Jülich, 52426 Jülich, Deutschland

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section

© 2025 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der [Creative Commons Attribution License](#), die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

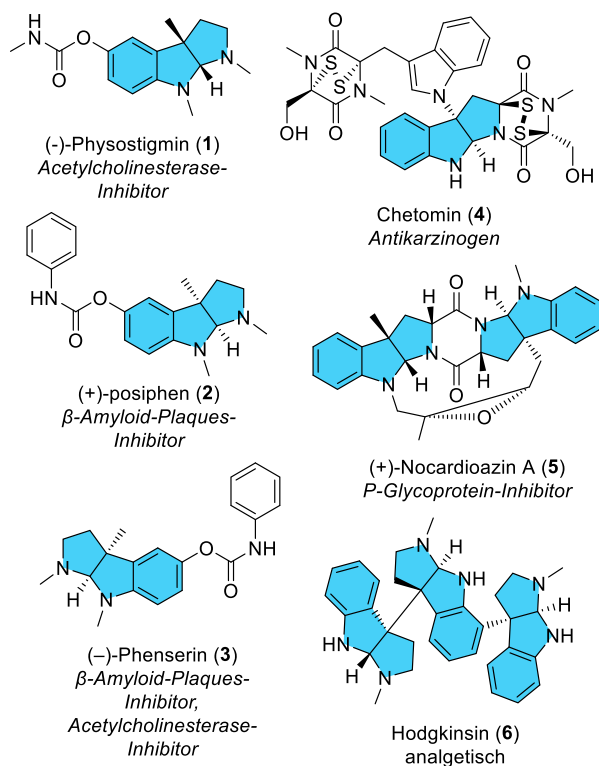
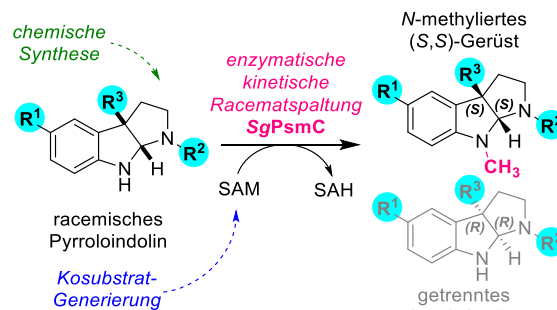


Abbildung 1. Beispiele für natürlich vorkommende Alkaloide (mit Ausnahme von 2), die das Pyrroloindolin-Gerüst aufweisen (hervorgehoben in blau).

Kürzlich wurde auch der chemoenzymatische enantio- und diastereoselektive Zugang zum Gerüst mithilfe von C-Methyltransferasen ermöglicht.^[34–36] Diese Katalysatoren wurden sowohl für die hochselektive Bildung des (S,S)-konfigurierten C3-methylierten Gerüsts genutzt, als auch für die Synthese von Derivaten von Physostigmin (1) im präparativen Labormaßstab. Sie erlauben jedoch nicht die Bildung des (R,R)-Enantiomers.

Ein Zugang zu beiden Enantiomeren ist von großer Bedeutung, um das volle biologische Potential des Pyrroloindolin-Motivs auszuschöpfen. Dieser Umstand wird sowohl durch das natürliche Vorkommen biologisch aktiver Pyrroloindoline beider Konfigurationen unterstrichen,^[40–44] als auch durch das Enantiomerenpaar (+)-Posiphen (2) und (–)-Phenserin (3). Beide Physostigmin-Derivate hemmen nachweislich die Translation des Amyloid-Vorläuferproteins^[50,51] und von α -Synuclein,^[52] jedoch inhibiert (–)-Phenserin (3) zusätzlich die Acetylcholinesterase, während die Inhibition durch (+)-Posiphen (2) viel schwächer ausfällt.^[53] Die unterschiedlichen Wirkungsweisen werden durch gegensätzliche Konfigurationen erzielt, was in diesem Fall die Verabreichung unterschiedlich hoher Dosierungen ermöglichen würde.

In dieser Arbeit haben wir eine systematische Expressionsoptimierung und biochemische Charakterisierung der N-Methyltransferase SgPsmC unternommen und zeigen hierbei die Vorteile dieses Katalysators beim chemoenzymatischen und enantioselektiven Zugang ausgewählter Pyrroloindoline (Schema 1) auf. SgPsmC ist Teil des Biosyntheseklusters von Physostigmin in *Streptomyces griseofuscus*,^[54]



Schema 1. Schematische Übersicht dieser Arbeit. Die N-Methyltransferase SgPsmC kann für die kinetische Racematspaltung (KR) chemisch zugänglicher, racemischer Pyrroloindoline verwendet werden. Dies führt zur Bildung des N-methylierten (S,S)-Gerüsts, sowie zum getrennten (R,R)-Gerüst.

und wirkt direkt nach der enzymkatalysierten und mittels Methylierung induzierten Bildung des Pyrroloindolin-Motivs durch die C-Methyltransferase SgPsmD. Wir nutzen die hohe Enantioselektivität von SgPsmC für eine auf Methylierung basierte kinetische Racematspaltung (KR) – ein allgemein ungewöhnlicher Ansatz in der chemischen^[55] und eine unterrepräsentierten Strategie in der enzymatischen KR^[37] – von leicht zugänglichen racemischen Pyrroloindolinen. Wir zeigen, dass SgPsmC als complementäres System zu früheren SgPsmD-basierten^[34,35,56] Methoden verwendet werden kann, um auch auf das (R,R)-konfigurierte Gerüst zuzugreifen, und schlagen daher seine Verwendung als zusätzliches Werkzeug für den Zugang zum heterocyclischen Motiv vor.

Ergebnisse und Diskussion

Biochemische Charakterisierung

Enzymprofiling: Für die biochemische Charakterisierung wurde gereinigtes Enzym und das Modellsubstrat 5-Methylindolin (7) verwendet. SgPsmC wurde unter optimierten Bedingungen in *Escherichia coli* Tuner(DE3) exprimiert. Die optimierten Bedingungen wurden durch statistische Versuchsplanung (*design-of-experiment*) bestimmt. Hierbei wurde ein *central-composite-design* mit drei Faktoren und fünf Stufen gewählt. Dabei ergab sich, dass niedrige Kultivierungstemperaturen und niedrige Induktorkonzentrationen zu den höchsten Enzymaktivitäten führten. Die optische Dichte (OD₆₀₀) zum Induktionszeitpunkt hatte nur einen minimalen Einfluss, sodass ein einfaches Kultivierungsprotokoll bei 22 °C, 104 μ M IPTG und variabler OD₆₀₀ möglich war (für Details, siehe Abbildung S1a–S1d).

Das pH-Optimum lag nahe pH 8.5 (Abbildung 2a) und die höchste Aktivität wurde bei \sim 45 °C beobachtet (Abbildung 2b). SgPsmC zeigte jedoch eine schnelle thermische Inaktivierung (Schmelztemperatur $T_M = \sim$ 43 °C) nach 10 min Inkubationszeit vor Durchführung der Enzymreaktion (Abbildung 2c). Um einen Mittelweg zwischen höchster Aktivität und höchster Stabilität einzuschlagen, wurde die Halbwertszeit von SgPsmC bei 35 °C bestimmt, bei welcher

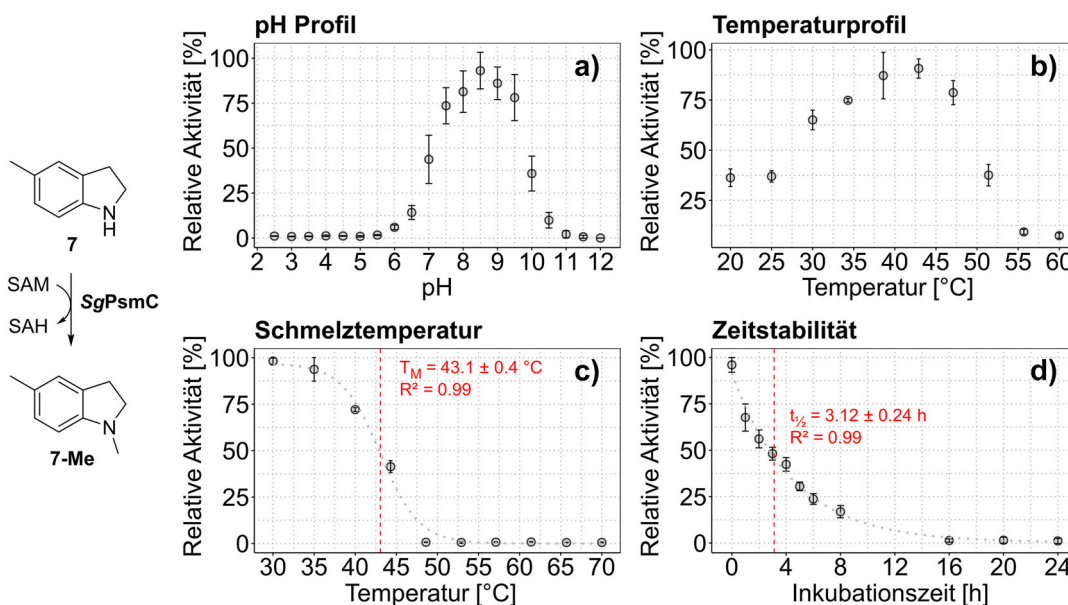


Abbildung 2. Ergebnisse des Enzymprofilings von SgPsmC auf Basis der N-Methylierung von 5-Methylindolin (**7**) als Modells substrat (links). a) Das aufgezeichnete pH-Profil weist auf ein Optimum nahe pH 8.5 hin. b) Das aufgezeichnete Temperaturprofil weist auf höchste Aktivität bei $\sim 45 \text{ °C}$ hin. c) Schmelzkurve von SgPsmC, bestimmt über enzymatische Restaktivität (Schmelztemperatur $T_M = \sim 43 \text{ °C}$). d) Zeitstabilität, Halbwertszeit $t_{1/2} \sim 3 \text{ h}$. Enzymaktivität wurde mit gereinigtem SgPsmC und $n = 3$ Replikaten bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. Fehler der bestimmten Parameter sind Standardfehler. Relative Aktivität wurde auf das Maximum normiert. Siehe SI für Ausgleichungsparameter.

das Enzym $\sim 75 \%$ seiner maximalen Aktivität während des Temperaturscreenings gezeigt hatte. Die Halbwertszeit bei 35 °C betrug $\sim 3 \text{ h}$, was auf eine begrenzte Stabilität hinwies (Abbildung 2d). Informationen zur Lösungsmitteltoleranz und dem oligomeren Zustand sind in SI zu finden (Abbildung S10, S11).

Kinetische Analyse: Für die kinetische Analyse wurden Einzel-Substrat-Kinetiken für das „Minimalsubstrat“ Indolin (**8**) und für das natürliche Pyrroloindolin-Substrat (**S,S**)-**9** von SgPsmC aufgezeichnet (Abbildung S13). Die Synthese des natürlichen Substrates (**S,S**)-**9** wurde bereits zuvor beschrieben.^[34] Ausgehend vom entsprechenden Tryptamin, wurde die Carbamoylierung mittels Methylaminoformylchlorid durchgeführt, gefolgt von der enzymatischen Zyklisierung unter Verwendung der C-Methyltransferase SgPsmD zum Pyrroloindolin.

Für die kinetische Untersuchung wurde der kommerziell erhältliche, Lumineszenz-basierte MTase-Glo™ Assay zur Quantifizierung des gebildeten SAH verwendet.^[57] Substratkonzentrationen wurden zwischen $1 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ variiert, und die SAM-Konzentration wurde bei $50 \mu\text{M}$ konstant gehalten. Der K_M -Wert für das Pyrroloindolin (**S,S**)-**9** war signifikant niedriger ($2.33 \pm 0.27 \mu\text{M}$ vs $18.51 \pm 3.46 \mu\text{M}$), und der k_{cat} -Wert war 205-fach höher ($3.52 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ vs $1.16 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) als für das Modells substrat **8** (Tabelle 1). Der daraus resultierende Unterschied in der Spezifitätskonstante betrug etwa das 2400-fache.

Indolin-Substratspektrum: Da Indoline in Vorversuchen durch SgPsmC umgewandelt wurden, wurde eine größere Auswahl

an Indolin-Substraten getestet, um das Substratspektrum des Enzyms für das kleinere Gerüst zu untersuchen und Erkenntnisse über den Einfluss von Substitutionen (primär an 5-Position) zu gewinnen (Abbildung 3). Die Substrate können basierend auf ihrer relativen Aktivität in drei Cluster eingeteilt werden. Die mit Abstand am besten akzeptierten Substrate waren 5-Methylindolin (= 100 % relative Aktivität) und 5-Methoxyindolin (60 % relative Aktivität).

Verbindungen des zweiten Clusters wiesen 9-35 % relative Aktivität auf, unter ihnen auch 1,2,3,4-Tetrahydroisochinolin (THIQ, $\sim 9 \%$) und 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin (THQ, $\sim 9 \%$). Die übrigen sechs Verbindungen zeigten eine geringe Restaktivität oder nahezu keine Aktivität. Im Allgemeinen variierte die Aktivität stark, aber es konnte kein klarer Trend hinsichtlich der aktivierenden und deaktivierenden Gruppen beobachtet werden, mit Ausnahme der an der 5-Position halogenierten Indoline. Hier folgte die relative Aktivität der Reihenfolge $F < Cl < Br$, ebenso wie die deaktivierende Wirkung der genannten Halogene.

Die folgenden Punkte sind zusätzlich erwähnenswert. Erstens zeigte SgPsmC zwar eine schwache, aber dennoch vorhandene Selektivität für die beiden racemischen Substrate 2-Methyl- und 3-Methylindolin. Die E-Werte konnten anhand der ee -Werte der jeweiligen Substrate (ee_S) und Produkte (ee_P) bestimmt werden, die mittels Gaschromatographie (GC) mit chiraler stationärer Phase ermittelt wurden und für 2-Methyl- und 3-Methylindolin 10.9 ± 0.3 bzw. 4.4 ± 0.4 betragen (Abbildung 3 und Abbildung S15, S16a und S16b). Ein Versuch, den Unterschied in den E-Werten für die beiden Indolinsubstrate zu erklären, kann mit einem einfachen isosterischen Modell unternommen werden (Abbildung S17): Die Methylgruppe von 2-Methylindolin hat – unabhängig

Tabelle 1: Einzel-Substrat-Kinetiken für das „Minimalsubstrat“ Indolin (**8**) und für das natürliche Pyrroloindolin-Substrat (**S,S**)-**9**. Durchgeführt mit $n = 3$ Replikaten pro Zeitpunkt und Substratkonzentration. Ausgewiesene Fehler sind Standardfehler.

| | V_{max} [$\mu\text{M}/\text{min}$] | K_M [μM] | k_{cat} [s^{-1}] | k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$] |
|----------------|---|--------------------------------|---|--|
| 8 | $2.30 \times 10^{-1} \pm 1.24 \times 10^{-2}$ | 18.51 ± 3.46 | $1.16 \times 10^{-3} \pm 6.25 \times 10^{-5}$ | $6.25 \times 10^{-5} \pm 1.22 \times 10^{-5}$ |
| (S,S)-9 | $3.50 \times 10^{-1} \pm 8.35 \times 10^{-3}$ | $2.33 \pm 2.70 \times 10^{-1}$ | $3.52 \times 10^{-1} \pm 8.40 \times 10^{-3}$ | $1.51 \times 10^{-1} \pm 1.79 \times 10^{-2}$ |

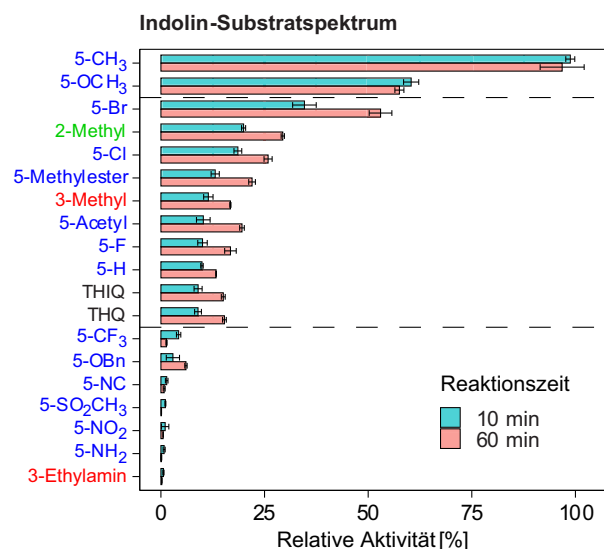


Abbildung 3. Relative Enzymaktivität von SgPsmC gegenüber verschiedenen substituierten Indolinen. Ergebnisse nach 10 min bzw. 60 min Reaktionszeit. Gegen die racemischen Substrate 2-Methylindolin und 3-Methylindolin zeigte SgPsmC eine geringe Enantioselektivität (E-Werte von 10.9 ± 0.3 bzw. 4.4 ± 0.4). Enzymaktivität wurde mit gereinigtem SgPsmC und $n = 3$ Replikaten bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung. Relative Aktivität wurde auf das Maximum normiert. Gestrichelte Linien trennen Cluster voneinander (k -Means-Algorithmus, 10 min Reaktionszeit).

von der absoluten Konfiguration des C2-Zentrums – ein isosteres Atom auf dem 3 α -methylierten (**S,S**)-konfigurierten Pyrroloindolin-Gerüst des natürlichen Substrats von SgPsmC, was nur für (**R**)-, nicht aber für (**S**)-3-Methylindolin der Fall ist. Obleich diese Werte nicht auf Augenhöhe mit Selektivitäten nicht-enzymatischer Methoden (die einen Selektivitätsfaktor von $s = 25$ für 2-Methylindolin zeigen^[58]) sind, bleibt abzuwarten, ob SgPsmC eine stärkere Stereodiskriminierung für stärker substituierte Indoline aufweist.

Zweitens kann ein Vergleich mit der C-Methyltransferase SgPsmC aus demselben Biosynthesecluster gezogen werden. Während bei SgPsmD die Höhe des Umsatzes

von Tryptamin-Substraten (und somit hin zur Bildung von Pyrroloindolin-Produkten) primär von der Substratgröße und dem Vorhandensein einer Carbamoyl-Gruppe an 5-Position abhängt,^[34,35] scheint letzteres bei SgPsmC keine Einschränkung zu sein. Dies könnte jedoch schlicht auf die geringeren sterischen Anforderungen der Indoline im Vergleich zu den Tryptaminen zurückzuführen sein, da erstere eine flexiblere produktive Substratbindung erlauben könnten. Wenn jedoch das Vorhandensein der Carbamoyl-Gruppe keine Voraussetzung für die Substratazeptanz von SgPsmC wäre, würde dies einen zusätzlichen chemischen Raum für die potenzielle Anwendung von SgPsmC eröffnen.

Selektivität gegenüber Pyrroloindolinen

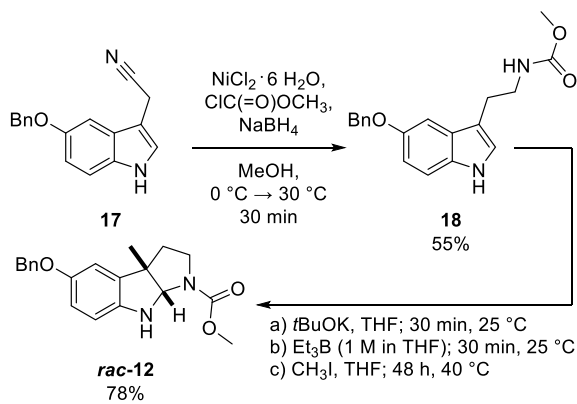
Pyrroloindolin-Substratspektrum und relative Enantioselektivität: Um die Enantioselektivität von SgPsmC zu untersuchen und einen besseren Vergleich zwischen SgPsmC und SgPsmD zu ziehen, wurde ein Satz racemischer Pyrroloindoline getestet (**rac-9** bis **rac-16**, Tabelle 2). Dazu gehörten das racemische natürliche Substrat **rac-9** sowie das Derivat **rac-10** ohne Modifikation an der 5-Position, um die Notwendigkeit der Carbamatfunktionalität zu bestimmen. Zusätzlich wurden größere Substrate mit einem *t*Bu-Amid (**rac-11**) sowie einem *O*-Benzyl-geschützten Methylcarbammat (**rac-12**) getestet. Weitere Substrate waren C3-zyklisierte Melatonin-Derivate mit verschiedenen Modifikationen an der 3 α -Position (**rac-13** bis **rac-15**). Die Synthese dieser Verbindungen wurde bereits zuvor beschrieben.^[34,59] Verbindungen **rac-12** und **rac-16** wurden auf ähnliche Weise erhalten. Verbindung **rac-12** wurde in zwei Stufen ausgehend vom entsprechenden *O*-Benzyl-geschützten Nitril **17** mittels Carbamoylierung mit Methylaminoformylchlorid und anschließender Zyklisierung mit CH_3I mit 43 % Gesamtausbeute synthetisiert (Schema 2). Der zweite Schritt wurde auch für die Darstellung von **rac-16** unter Verwendung von Ethyliodid und ausgehend vom entsprechenden *N*-Acetyl-Tryptamin genutzt (siehe **SI**).

Der untersuchte Satz an Substraten zeigte, dass SgPsmC eine hohe Enantioselektivität aufweist – zumindest soweit

Tabelle 2: Substratspektrum und Enantioselektivität von SgPsmC gegenüber einer Auswahl an Pyrroloindolinen. Zur Bestimmung von E-Werten^[62,63] wurden Datenpaare von ee_S und ee_P Werten von Reaktionsproben mittels chiraler HPLC bestimmt und die Funktion $ee_P(ee_S, E)$ den aufgenommenen Daten angepasst. ee Werte >98 % wurden auf 98 % gesetzt. In Fällen, in denen nur die Bestimmung von ee_S möglich war, wurde der Umsatz parallel mittels achiraler HPLC gemessen. Die Funktion Umsatz(ee_S, E) wurde diesem alternativen Datensatz angepasst. Aufgrund der fehleranfälligen Bestimmung des Umsatzes sollten die endgültigen E-Werte, die mit der letztgenannten Methode ermittelt wurden, nur als qualitatives Maß betrachtet werden. Aufgrund der Genauigkeit der aufgezeichneten Daten im Allgemeinen werden E-Werte >100 hier nicht angegeben.^[61] Die absolute Konfiguration des bevorzugten Substrat-Enantiomers wurde durch den Vergleich chiraler HPLC-CD-Chromatogramme mit berechneten ECD-Spektren bestimmt. Für weitere Details, siehe SI.

| | <i>rac-9</i> | <i>rac-10</i> | <i>rac-11</i> | <i>rac-12</i> | <i>rac-13</i> | <i>rac-14</i> | <i>rac-15</i> | <i>rac-16</i> |
|---------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| R¹ | | | | | | | | |
| R² | | | | | | | | |
| R³ | | | | | | | | |
| E-Wert | >100 ^[a] | >100 ^[b] | not accepted ^[c] | >100 ^[b] | >100 ^[d] | 12 ^[d] | n.d. ^[e] | 53 ^[b] |
| Bevorzugte Konfiguration | (S,S) | (S,S) | not accepted ^[c] | (S,S) | (S,S) | (R,R) | n.d. ^[e] | (S,S) |

^{a)} E-Wert bestimmt über konstanter Konzentration des nicht-bevorzugten Substrat- und Produkt-Enantiomers. ^{b)} E-Wert bestimmt durch Anpassung der Funktion $ee_P(ee_S, E)$. ^{c)} Es wurde keine SAH-Bildung nach 30 min Reaktionszeit beobachtet. ^{d)} E-Wert bestimmt durch Anpassung der Funktion Umsatz(ee_S, E). ^{e)} Chirale Trennung nicht erreicht.



Schema 2. Synthese von *rac-12*, analog durchgeführt zur zuvor berichteten Synthese von *rac-9* bis *rac-11*.^[34]

dies durch chirale Chromatographie zuverlässig bestimmt werden konnte –, ohne auf die Carbamoylgruppe seines natürlichen Substrats *rac-9* beschränkt zu sein, da die kleineren 5-Methoxy (*rac-13*) und 5-unsubstituierten (*rac-10*) Derivate ebenfalls mit ebenso hoher Enantioselektivität umgewandelt wurden ($E > 100$). Während SgPsmC bis zu einem gewissen Grad Substrate mit höherer sterischer Hinderung akzeptierte (*rac-12*, 5-Benzylether und *N*-Methylcarbamoyl, $E > 100$, siehe Abbildung 4), wurde das *N*-*t*Bu-Amid *rac-11* nicht umgesetzt.

Reaktionen mit den Melatonin-abgeleiteten Verbindungen zeigten, dass SgPsmC auch Substrate mit anderen Resten

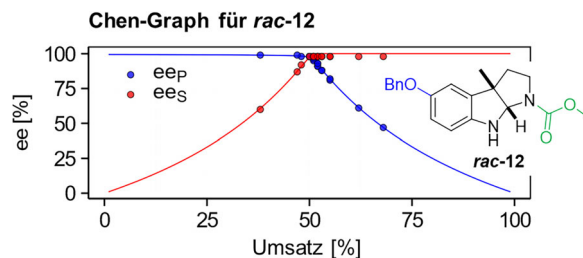


Abbildung 4. Chen-Graph^[60] für die *N*-Methylierung von *rac-12* als Beispiel für die hohe Enantioselektivität von SgPsmC. Punkte kennzeichnen experimentelle Datenpaare, die auch Daten aus der Reaktionsoptimierung enthalten (siehe unten). Aufgrund der begrenzten Präzision der Messmethoden wurden scheinbare ee -Werte >98 % auf 98 % gesetzt und E-Werte >100 hier nicht angegeben.^[61] E-Wert bestimmt durch nicht-linearen Fit von $ee_P(ee_S, E)$ (siehe SI).

als Methyl an 3*a*-Position akzeptiert, jedoch mit abnehmendem Umsatz und Selektivität (Tabelle 2). Verglichen mit den entsprechenden 3*a*-methylierten Substraten, für welche Selektivitäten von $E > 100$ bestimmt wurden, zeigte SgPsmC gegenüber dem 3*a*-ethylierten *rac-16* und 3*a*-prenylierten *rac-14* niedrigere Selektivität ($E = \sim 53$ bzw. $E = \sim 12$). Es scheint, dass ein wichtiger Faktor für die Enantioselektivität von SgPsmC in der Größe des Restes an der 3*a*-Position liegt. Während eine Umwandlung des 3*a*-Hydroxysubstrats *rac-15* beobachtet wurde, konnte keine Enantiomeren-trennung erreicht werden, sodass kein E-Wert für diese Verbindung bestimmt werden konnte.

Absolute Konfiguration: Da sowohl das natürliche Produkt des *psm* Geneclusters Physostigmin (**1**), als auch das natürliche Substrat von SgPsmC (*S,S*)-konfiguriert sind,^[34,54] liegt die Vermutung nahe, dass Selbiges auch für die absolute Stereopräferenz von SgPsmC gelten muss. Um dies zu überprüfen, wurden die elektronischen Circular dichroismus-Spektren (ECD-Spektren) von allen umgesetzten Pyrroloindolin berechnete. Die berechneten Spektren stimmten qualitativ mit den experimentellen Spektren überein, die während der Trennung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an chiraler stationärer Phase im *stop-flow* Modus aufgezeichnet wurden (Abbildung S21a–S28a). Aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit konnte die Polarität der schwächsten Signale bei ~310 nm nicht für alle Verbindungen genau angegeben werden (siehe SI). Daher stützte sich die Konfigurationszuordnung hauptsächlich auf den charakteristischen Peak bei ~240 nm. Der Vergleich der berechneten ECD-Spektren mit chiralen HPLC-CD-Chromatogrammen von racemischen Substraten ermöglichte die Zuordnung zwischen Konfiguration und Substratpeaks. Der Vergleich mit HPLC-UV-Chromatogrammen enzymatischer Reaktionen zeigte wiederum, dass das bevorzugte Gerüst von SgPsmC (innerhalb des getesteten Satzes an Substraten) tatsächlich (*S,S*)-konfiguriert ist. Eine Ausnahme bildete das 3*a*-prenylierte *rac*-**14** (Abbildung S26a), jenes Substrat, für das die niedrigste Selektivität von $E = \sim 12$ zuvor ermittelt wurde. Die Ergebnisse für *rac*-**14** wurden durch Anwendung der gleichen Methodik auf das *N*-methylierte Produkt *rac*-**14-Me** (Abbildung S26b) bestätigt.

Die hohe Enantioselektivität von SgPsmC für 3*a*-methylierte Pyrroloindoline in Kombination mit ihrer unkomplizierten asymmetrischen chemischen Synthese veranlasste uns, die Möglichkeit der Verwendung von SgPsmC in einer enzymatischen KR zu untersuchen. Während SgPsmD einen enantioselektiven Zugang zum 3*a*-methylierten (*S,S*)-konfigurierten Gerüst ermöglicht, würde eine chemo-enzymatische Synthese unter Verwendung von SgPsmC den Zugang zum entsprechenden (*R,R*)-konfigurierten Substrat und auch zum *N*-methylierten (*S,S*)-Produkt ebnet.

Präparativer Labormaßstab

Wahl des Substrates, Katalysatorformulierung und Reaktionsoptimierung: Um die Anwendbarkeit von SgPsmC für eine KR zu untersuchen, haben wir uns für das Substrat *rac*-**12** entschieden, da dieses (a) einfach chemisch herzustellen und (b) ein flexibler Startpunkt für anschließende Modifizierungen ist. Beispielsweise ließen sich nach der SgPsmC-katalysierten KR das *N*-methylierte Produkt und das getrennte Substrat in einer gespiegelten chemischen Synthese verwenden, um (+)-Posiphen (**2**) bzw. (-)-Phenserin (**3**) herzustellen.

Mit Blick auf die Anwendbarkeit wäre die Verwendung von gereinigtem Enzym sehr arbeitsintensiv gewesen: Idealerweise sollte die Katalysatorformulierung leicht zugänglich sein. Die Verwendung von zellfreien Extrakten (*cell-free extracts*, CFEs) ist zwar simpel, lieferte aber bei Verwendung von 1 mM *rac*-**12** einen maximalen Umsatz von nur ~39 %,

was selbst unter idealen Bedingungen nur zu einem ee_S von ~62 % führen würde (unter der Annahme von $E = 100$). Dies könnte auf die begrenzte Stabilität des Katalysators zurückzuführen sein, die bereits bei der Erstellung des Enzymprofils festgestellt worden war (siehe Abbildung 2d). Darüber hinaus könnte eine scheinbare Abnahme des Umsatzes über eine längere Reaktionszeit in ausgewählten Fällen auf einen Produktabbau hinweisen (siehe Abbildung S29). Da jedoch keine Abbauprodukte beobachtet wurden, ist dieser Hinweis nicht eindeutig, und die Beobachtung könnte auch durch niedrige Wiederfindungsraten erklärt werden. Unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache wurde (anstatt die Katalysatordichte mit CFEs unbegrenzt zu erhöhen), um einen Umsatz von 50 % zu erreichen, und um vorsorglich zu verhindern, dass die Verbindungen längeren Reaktionszeiten ausgesetzt werden, ausgesalzene SgPsmC getestet.

Die Verwendung von ausgesalzene Enzymen ermöglicht eine einfache Konzentrierung des Katalysators. Ferner kann diese Art der Formulierung während der Lagerung der Enzyme eine stabilisierende Wirkung haben.^[64] Es wurde ein Ausfällungsprofil für SgPsmC unter Verwendung von $(NH_4)_2SO_4$ aufgezeichnet, und es wurde eine hochkonzentrierte und teilweise (wenn auch schwach, nur ~5.9-fach) gereinigte Katalysatorformulierung erhalten (Abbildung S30a und S30b). Mit dem ausgesalzene Katalysator wurden Umsätze nahe 50 % erreicht. Um eine ausreichende Katalysatorbeladung und Reaktionszeit zu bestimmen, wurde der ee_P während entsprechender Reaktionsverläufe gemessen (Abbildung S32). Wie erwartet,^[65] führte eine starke Verlängerung der Reaktionszeit oder eine zu starke Erhöhung der Katalysatorbeladung zu einem Abfall des ee_P . Ähnliche Beobachtungen wurden für das kleinere Pyrroloindolin *rac*-**10** gemacht (Abbildung S22b). Eine Erhöhung der Reaktionszeit auf 24 h unter Verwendung der niedrigsten getesteten Katalysatorbeladung (0.08 U mL^{-1} Aktivität gegen 5-Methylindolin (**7**)) führte zu einem Rückgang des ee_P auf ~91 %. Ein ähnlicher Verlust an chiraler Auflösung wurde bei der Verwendung von 0.16 U mL^{-1} Katalysator nach 6 h Reaktionszeit beobachtet ($ee_P \sim 93 \%$). Nahezu optimale Ergebnisse wurden bei einer Katalysatorladung von 0.08 U mL^{-1} und einer Reaktionszeit von 4 h erzielt.

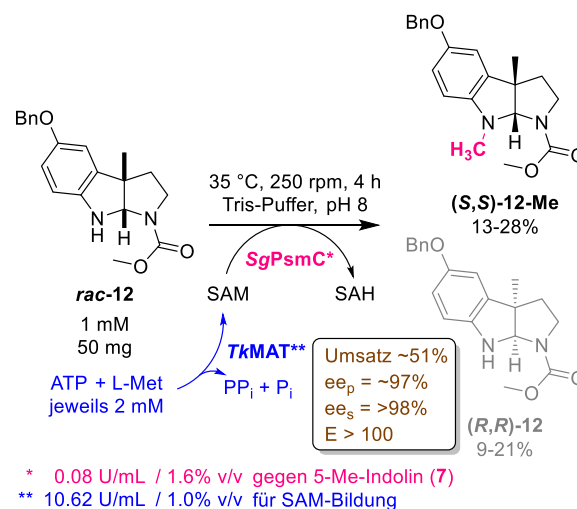
SAM-Generierung: Für die präparative Reaktion musste die Kofaktorgenerierung adressiert werden. Es wurden verschiedene enzymatische Systeme für die SAM-Generierung und das SAM-Recycling beschrieben,^[10,18,19,24,66,67] aber die beiden einfachsten Systeme sind gleichzeitig die am häufigsten verwendeten. Das eine System erzeugt SAM aus ATP und L-Methionin in einer linearen Enzymkaskade unter Verwendung einer MAT, optional gemeinsam mit einer SAH-Nukleosidase, um eine Produkthemmung zu verhindern,^[18,22] das andere System re-methyliert das gebildete SAH unter Verwendung einer HMT und dem Opfersubstrat CH_3I .^[24] Unter üblichen Bedingungen^[34] führte die Verwendung des Recyclingsystems in der KR aufgrund von nicht-selektiver *N*-Methylierung durch die Anwesenheit von CH_3I zu Selektivitätseinbußen (Abbildung S33 und S34a). Das System mit TkMAT aus *Thermococcus kodakarensis*^[68] hingegen

fürte zu keiner Hintergrundreaktion und wurde daher als bevorzugtes Kofaktorsystem gewählt, da der Ausschluss einer unselektiven Hintergrundmethylierung für den Einsatz der KR unerlässlich ist.

Wenn auch in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, wären zusätzliche Optionen verfügbar, um die Hintergrundmethylierung des HMT-Systems zu reduzieren. Die hier verwendete *CtHMT* aus *Chloracidobacterium thermophilum* ist vergleichsweise schwach performant ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 51 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[24] Die Verwendung leistungsfähigerer HMTs wie aus *Arabidopsis thaliana* ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 4200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)^[13] oder *Aspergillus clavatus* (vollständige Umsetzung von 1 mM SAH nach $\sim 5 \text{ min}$ ^[33]; $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 200 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Methyltosylat^[23]) könnte zu einer geringeren Hintergrundmethylierung durch schnelleren Verbrauch von Methyljodid führen, vorausgesetzt der limitierende Faktor des gekoppelten Systems ist nicht die Methyltransferase. Im vorliegenden Fall wurden wie in früheren Arbeiten 20 μM SAH (2 mol%) verwendet.^[34] Eine Erhöhung der SAH- (oder SAM-) Konzentration in Kombination mit der Verwendung einer effizienteren HMT wäre ebenfalls eine sinnvolle Strategie zur Senkung der Hintergrundreaktion. Es ist jedoch zu beachten, dass sowohl HMT- als auch MAT-basierte Systeme ihre jeweiligen Vor- und Nachteile haben, so dass die endgültige Wahl vom Einzelfall abhängt (siehe **SI** für eine detaillierte Diskussion).

Abschließendes Scale-up: Ähnlich wie für *SgPsmC* wurde ein Ausfallungsprofil für *TkMAT* bestimmt (Abbildung **S35b** und **S35c**). Aufgrund der schnellen thermischen Inaktivierung von *SgPsmC* wurde eine Reaktionstemperatur von 35 °C für das gekoppelte System gewählt, die unterhalb der Temperatur lag, bei welcher *TkMAT* ihre höchste Aktivität zeigte (Abbildung **S36**). Ähnliche pH-Profile (Abbildung **S37**) ermöglichten, die Reaktion nahe dem optimalen pH-Wert beider Enzyme ablaufen zu lassen. Die finalen Bedingungen für die hochskalierte Reaktion sind in Schema 3 dargestellt. Nach 4 h Reaktionszeit wurden ein Umsatz von $\sim 51 \%$ und ein ee_{P} von $\sim 97 \%$ erreicht, was einem E-Wert von >100 entspricht und damit die Selektivität und Skalierbarkeit des Systems aufzeigt.

Die isolierten Ausbeuten waren jedoch gering (13 % für **(S,S)-12-Me**, 9 % für reisoliertes **(R,R)-12**), was in erster Linie auf eine ineffiziente Aufarbeitung der Reaktionsmischung mit hoher Proteindichte zurückzuführen war, die während der Extraktion eine ausgeprägte Interphase bildete. Eine Wiederholung der hochskalierten Reaktion unter Zuhilfenahme von Zentrifugation zur Phasentrennung und wiederholtes Waschen des Enzypellets mit Puffer und MeOH (siehe **SI**) führte zu verbesserten, wenn auch immer noch unzufriedenstellenden, isolierten Ausbeuten von 28 % für **(S,S)-12-Me** und 21 % für **(R,R)-12**. Alternative Ansätze zur Umgehung und/oder Verbesserung der problematischen Aufarbeitung könnten in der Verwendung von vorgereinigtem, immobilisiertem Enzym bestehen, das in *batch* oder im kontinuierlichen Durchfluss eingesetzt wird und die Katalysatorabtrennung erleichtern könnte.



Schema 3. Finale Reaktionsbedingungen für die KR von *rac-12* unter Verwendung von ausgesalzenen *SgPsmC* und *TkMAT* im präparativen Labormaßstab. Isolierte Ausbeuten basieren auf zwei unabhängigen Synthesen.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit haben wir eine biochemische Charakterisierung der *N*-Methyltransferase *SgPsmC* unternommen und das Potenzial des Katalysators für den Zugang zu Pyrroloindolinen aufgezeigt. *SgPsmC* scheint im Vergleich zur *C*-Methyltransferase *SgPsmD* (die in der Biosynthese von Physostigmin (**1**) einen Schritt früher agiert)^[34,35,54] weniger durch die Funktionalität in der 5-Position des Pyrroloindolin-Gerüsts eingeschränkt zu sein und akzeptiert darüber hinaus *3a*-ethylierte oder sogar *3a*-prenylierte Substrate, was die Erschließung eines anderen chemischen Raums ermöglicht. Allerdings wurde eine geringere Selektivität für Substrate mit anderen Resten als Methyl an der *3a*-Position beobachtet. Interessanterweise kehrt sich die allgemeine absolute Stereo-Präferenz von *SgPsmC* für das *(S,S)*-konfigurierte Gerüst für das *3a*-prenylierte Substrat um. Die hohe Enantioselektivität des Katalysators gegenüber *3a*-methylierten Pyrroloindolinen, die bei der Erstellung des Substratprofils festgestellt wurde, deutete auf seine Verwendung in der KR von leicht zugänglichen racemischen Pyrroloindolinen hin.

Die katalytische KR ist eine wohletablierte Strategie, um Zugang zu enantiomerenangereicherten Aminen zu erhalten und wird trotz Fortschritten in der asymmetrischen Synthese weiterhin in jenen Fällen genutzt, in denen die Herstellung der racemischen Amine einfacher ist.^[69] Hierbei auf *N*-Alkylierung^[70,71] oder noch genauer auf *N*-Methylierung^[55] zurückzugreifen, ist ein ungewöhnlicher Ansatz in der KR. Dies ist vermutlich auf die starke Nukleophilie der Amine in Kombination mit den allgemein reaktiven Alkylierungs-/Methylierungsreagenzien zurückzuführen, was zu mangelnder Selektivität und zu Hintergrundreaktionen führt. Während Enzyme (hauptsächlich Hydrolasen,^[72] aber auch Oxygenasen^[73] und andere^[74]) häufig als Katalysatoren in KR genutzt werden, sind Methyltransferasen hierbei unterrepräsentiert,^[37] und *N*-Methyltransferasen wurden

bisher noch gar nicht verwendet. Die hohe Enantioselektivität von SgPsmC in Kombination mit dem Ausbleiben unselektiver Hintergrundmethylierung dank des linearen MAT-Systems zur Bereitstellung des Kosubstrates SAM ermöglichte erst die Anwendung einer auf *N*-Methylierung basierenden KR in dieser Arbeit.

Während Enzym *engineering* von Pyrroloindolin-bildenden C3-Methyltransferasen zur Umkehrung ihrer Enantioselektivität eine weitere geeignete Strategie für den Zugang zu beiden Enantiomeren des Pyrroloindolin-Gerüsts wäre, verfolgten wir hier die enzymatische KR als alternativen Ansatz und haben ihre Anwendbarkeit mit dem zugänglichen Substrat *rac*-**12** gezeigt. Von hier aus ist eine Derivatisierung in Richtung der Enantiomere (+)-Posiphen (**2**) und (-)-Phenserin (**3**)^[50,52] möglich, ebenso wie der generelle Zugang zu beiden Enantiomeren des *N*-methylierten Gerüsts durch anschließende chemische Methylierung. Die Anwendbarkeit des Systems könnte jedoch durch die Suche nach stabileren Enzymformulierungen und Homologen sowie nach promiskuitiven Katalysatoren, die eine KR auf andere Weise als nur durch Methylierung ermöglichen würden, noch erweitert werden. Da die molekulare Grundlage der Selektivität von SgPsmC noch unbekannt ist, sind Kristallisierungsexperimente und *in silico* Untersuchungen im Gange, die auch dazu beitragen können, festzustellen, wie das Wissen über den Mechanismus und die Selektivität verschiedener Pyrroloindolin-assoziiierter Methyltransferasen zwischen Katalysatoren übertragen werden kann, um sie zu optimieren und ihre Anwendbarkeit noch weiter zu erweitern.

Zusätzliche Informationen

Die Autoren haben weitere Referenzen in den Zusätzlichen Informationen, kurz **SI**, zitiert.

Danksagung

Wir danken dem Land Nordrhein-Westfalen (NRW) und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE) für die Förderung des Projekts im Rahmen des "CLIB-Kompetenzzentrums Biotechnologie", Förderkennzeichen 34-EFRE-0300096 und 34-EFRE-0300097, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, „Modellregion, BioRevierPlus: BioökonomieREVIER Innovationscluster Biotechnologie & Kunststofftechnik-BioTech", Förderkennzeichen 031B1134A), sowie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dem Forschungszentrum Jülich GmbH für ihre kontinuierliche Unterstützung. Außerdem danken wir B. Paschold, D. Amariei und L. Böhmer für ihren wissenschaftlichen Beitrag und ihre Unterstützung, sowie V. Warth für ihre Hilfe bei der organischen Synthese. Ferner danken wir auch dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie für den Zugang zu ihrem BioLector Mikrobioreaktor.

Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Schlüsselwörter: Biokatalyse · Enzyme · Heterozyklen · Kinetische Racematspaltung

- [1] P. N. Devine, R. M. Howard, R. Kumar, M. P. Thompson, M. D. Truppo, N. J. Turner, *Nat. Rev. Chem.* **2018**, *2*, 409–421, <https://doi.org/10.1038/s41570-018-0055-1>.
- [2] S. P. France, R. D. Lewis, C. A. Martinez, *JACS Au* **2023**, *3*, 715–735, <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00712>.
- [3] M. D. Truppo, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 476–480, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00114>.
- [4] E. Romero, B. S. Jones, B. N. Hogg, A. R. Casamajo, M. A. Hayes, S. L. Flitsch, N. J. Turner, C. Schnepel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 16824–16855.
- [5] R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838, <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>.
- [6] E. Abdelraheem, B. Thair, R. F. Varela, E. Jockmann, D. Popadić, H. C. Hailes, J. M. Ward, A. M. Iribarren, E. S. Lewkowicz, J. N. Andexer, P. Hagedoorn, U. Hanefeld, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200212.
- [7] C. Dalhoff, G. Lukinavičius, S. Klimasauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31–32, <https://doi.org/10.1038/nchembio754>.
- [8] B. J. C. Law, A.-W. Struck, M. R. Bennett, B. Wilkinson, J. Micklefield, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2885–2892.
- [9] C. Zhang, R. L. Weller, J. S. Thorson, S. R. Rajski, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2760–2761, <https://doi.org/10.1021/ja056231t>.
- [10] S. Singh, J. Zhang, T. D. Huber, M. Sunkara, K. Hurley, R. D. Goff, G. Wang, W. Zhang, C. Liu, J. Rohr, S. G. Van Lanen, A. J. Morris, J. S. Thorson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3965–3969, <https://doi.org/10.1002/anie.201308272>.
- [11] K. Hartstock, B. S. Nilges, A. Ovcharenko, N. V. Cornelissen, N. Püllen, A.-M. Lawrence-Dörner, S. A. Leidel, A. Rentmeister, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6342–6346, <https://doi.org/10.1002/anie.201800188>.
- [12] C. Sommer-Kamann, A. Fries, S. Mordhorst, J. N. Andexer, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4033–4036, <https://doi.org/10.1002/anie.201609375>.
- [13] Q. Tang, C. W. Grathwol, A. S. Aslan-Üzel, S. Wu, A. Link, I. V. Pavlidis, C. P. S. Badenhorst, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 1524–1527, <https://doi.org/10.1002/anie.202013871>.
- [14] H. Stecher, M. Teng, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9546–9548, <https://doi.org/10.1002/anie.200905095>.
- [15] J. Peng, C. Liao, C. Bauer, F. P. Seebeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 27178–27183, <https://doi.org/10.1002/anie.202108802>.
- [16] H. Simon-Baram, S. Roth, C. Niedermayer, P. Huber, M. Speck, J. Diener, M. Richter, S. Bershtein, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200162, <https://doi.org/10.1002/cbic.202200162>.
- [17] J. M. Lipson, M. Thomsen, B. S. Moore, R. P. Clausen, J. J. La Clair, M. D. Burkart, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 950–953, <https://doi.org/10.1002/cbic.201300221>.

- [18] S. Mordhorst, J. Siegrist, M. Müller, M. Richter, J. N. Andexer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4037–4041, <https://doi.org/10.1002/anie.201611038>.
- [19] D. Popadić, D. Mhaindarkar, M. H. N. D. Thai, H. C. Hailes, S. Mordhorst, J. N. Andexer, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 883–891.
- [20] E. Jockmann, F. Subrizi, M. K. F. Mohr, E. M. Carter, P. M. Hebecker, D. Popadić, H. C. Hailes, J. N. Andexer, *ChemCatChem* **2023**, *15*, e202300930, <https://doi.org/10.1002/cctc.202300930>.
- [21] J. L. Hoffman, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4444–4449, <https://doi.org/10.1021/bi00363a041>.
- [22] J. Siegrist, S. Aschwanden, S. Mordhorst, L. Thöny-Meyer, M. Richter, J. N. Andexer, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2576–2579, <https://doi.org/10.1002/cbic.201500410>.
- [23] X. Wen, F. Leisinger, V. Leopold, F. P. Seebeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202208746, <https://doi.org/10.1002/anie.202208746>.
- [24] C. Liao, F. P. Seebeck, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 696–701, <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0300-0>.
- [25] K. H. Schülke, J. S. Fröse, A. Klein, M. Garcia-Borràs, S. C. Hammer, *ChemBioChem* **2024**, *25*, e202400079.
- [26] H. Coiner, G. Schröder, E. Wehinger, C.-J. Liu, J. P. Noel, W. Schwab, J. Schröder, *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2006**, *46*, 193–205, <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02680.x>.
- [27] F. Ospina, K. H. Schülke, M. Schnutenhaus, A. Klein, O. Desai, S. Jain, C. Krofta, L. Stratmann, J. Yang, H. Gröger, S. C. Hammer, *Angew. Chem.* **2025**, *137*, e202510300.
- [28] E. Jockmann, H. Girame, W. Steinchen, K. Kind, G. Bange, K. Tittmann, M. Müller, F. Feixas, M. Garcia-Borràs, J. N. Andexer, *ACS Catal.* **2025**, *15*, 6410–6425, <https://doi.org/10.1021/acscatal.5c00834>.
- [29] L. L. Bengel, B. Aberle, A. Egler-Kemmerer, S. Kienzle, B. Hauer, S. C. Hammer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 5554–5560, <https://doi.org/10.1002/anie.202014239>.
- [30] Q. Tang, U. T. Bornscheuer, I. V. Pavlidis, *ChemCatChem* **2019**, *11*, 3227–3233, <https://doi.org/10.1002/cctc.201900606>.
- [31] B. J. C. Law, M. R. Bennett, M. L. Thompson, C. Levy, S. A. Shepherd, D. Leys, J. Micklefield, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 2733–2737.
- [32] R. Roddan, A. Sula, D. Méndez-Sánchez, F. Subrizi, B. R. Lichman, J. Broomfield, M. Richter, J. N. Andexer, J. M. Ward, N. H. Keep, H. C. Hailes, *Commun. Chem.* **2020**, *3*, 1–10, <https://doi.org/10.1038/s42004-020-00416-8>.
- [33] F. Ospina, K. H. Schülke, J. Soler, A. Klein, B. Prosenc, M. Garcia-Borràs, S. C. Hammer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202213056, <https://doi.org/10.1002/anie.202213056>.
- [34] P. Schneider, B. Henßen, B. Paschold, B. P. Chapple, M. Schatton, F. P. Seebeck, T. Classen, J. Pietruszka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23412–23418.
- [35] D. A. Amariei, N. Pozhydaieva, B. David, P. Schneider, T. Classen, H. Gohlke, O. H. Weiergräber, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 14130–14139, <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c04240>.
- [36] M. Haase, B. David, B. Paschold, T. Classen, P. Schneider, N. Pozhydaieva, H. Gohlke, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2024**, *14*, 227–236, <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c04952>.
- [37] S. Rydzek, F. Guth, S. Friedrich, J. Noske, B. Höcker, F. Hahn, *ChemCatChem* **2024**, *16*, e202400883, <https://doi.org/10.1002/cctc.202400883>.
- [38] S. Ju, K. P. Kuzelka, R. Guo, B. Krohn-Hansen, J. Wu, S. K. Nair, Y. Yang, *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 5704, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40980-w>.
- [39] C. Sun, W. Tian, Z. Lin, X. Qu, *Nat. Prod. Rep.* **2022**, *39*, 1721–1765, <https://doi.org/10.1039/D2NP00030J>.
- [40] R. Raju, A. M. Piggott, X.-C. Huang, R. J. Capon, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2770–2773, <https://doi.org/10.1021/ol200904v>.
- [41] P. W. Moore, J. J. Rasimas, J. W. Donovan, *J. Med. Toxicol.* **2015**, *11*, 159–160, <https://doi.org/10.1007/s13181-014-0442-z>.
- [42] E. Viziteu, C. Grandmougin, H. Goldschmidt, A. Seckinger, D. Hose, B. Klein, J. Moreaux, *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 519–523, <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.20>.
- [43] T. A. Amador, L. Verotta, D. S. Nunes, E. Elisabetsky, *Planta Med.* **2000**, *66*, 770–772, <https://doi.org/10.1055/s-2000-9604>.
- [44] A. Galli, G. Renzi, E. Grazzini, R. Bartolini, P. Aiello-Malmberg, A. Bartolini, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 1233–1238, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90009-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90009-0).
- [45] M. G. Kulkarni, A. P. Dhondge, A. S. Borhade, D. D. Gaikwad, S. W. Chavhan, Y. B. Shaikh, V. B. Ningdale, M. P. Desai, D. R. Bihade, M. P. Shinde, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2411–2413, <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.03.012>.
- [46] J.-C. Yi, C. Liu, L.-X. Dai, S.-L. You, *Chem. Asian J.* **2017**, *12*, 2975–2979, <https://doi.org/10.1002/asia.201701151>.
- [47] E. C. Gentry, L. J. Rono, M. E. Hale, R. Matsuura, R. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3394–3402, <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13616>.
- [48] T. Bui, S. Syed, C. F. I. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8758–8759, <https://doi.org/10.1021/ja903520c>.
- [49] J. E. Spangler, H. M. L. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6802–6805, <https://doi.org/10.1021/ja4025337>.
- [50] A. F. Teich, E. Sharma, E. Barnwell, H. Zhang, A. Staniszewski, T. Utsuki, V. Padmaraju, C. Mazell, A. Tzekou, K. Sambamurti, O. Arancio, M. L. Maccacchini, *Alzheimers Dement. N. Y. N* **2018**, *4*, 37–45.
- [51] K. T. Y. Shaw, T. Utsuki, J. Rogers, Q.-S. Yu, K. Sambamurti, A. Brossi, Y.-W. Ge, D. K. Lahiri, N. H. Greig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7605–7610, <https://doi.org/10.1073/pnas.131152998>.
- [52] S. Mikkilineni, I. Cantuti-Castelvetri, C. M. Cahill, A. Balliedier, N. H. Greig, J. T. Rogers, *Park. Dis* **2012**, *2012*, 142372.
- [53] Q. Yu, X.-F. Pei, H. W. Holloway, N. H. Greig, A. Brossi, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2895–2901, <https://doi.org/10.1021/jm970210v>.
- [54] J. Liu, T. Ng, Z. Rui, O. Ad, W. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 136–139, <https://doi.org/10.1002/anie.201308069>.
- [55] J. Blum, D. Gelman, Z. Aizenshtat, S. Wernik, H. Schumann, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5611–5614, [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)01054-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)01054-5).
- [56] D. A. Amariei, J. Tenhaef, T. Classen, B. David, T. M. Rosch, H. Gohlke, S. Noack, J. Pietruszka, *Catal. Sci. Technol.* **2024**, DOI <https://doi.org/10.1039/D4CY00657G>.
- [57] K. Hsiao, H. Zegzouti, S. A. Goueli, *Epigenomics* **2016**, *8*, 321–339, <https://doi.org/10.1021/epi.15.113>.
- [58] F. O. Arp, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14264–14265, <https://doi.org/10.1021/ja0657859>.
- [59] D. A. Amariei, M. Haase, M. K. T. Klischan, M. Wäscher, J. Pietruszka, *ChemCatChem* **2024**, *16*, e202400052, <https://doi.org/10.1002/cctc.202400052>.
- [60] C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299, <https://doi.org/10.1021/ja00389a064>.
- [61] J. Pietruszka, A. C. M. Rieche, T. Wilhelm, A. Witt, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1273–1286, <https://doi.org/10.1002/adsc.200303137>.
- [62] J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051–1056, [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90053-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90053-5).
- [63] A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559–571, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00066-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00066-5).
- [64] K. C. Duong-Ly, S. B. Gabelli in *Methods Enzymol.* (Ed.: J. Lorsch), Academic Press, San Diego, Waltham, Amsterdam, Oxford, London, **2014**, pp. 85–94.
- [65] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2011**, <https://doi.org/10.1007/978-3-642-17393-6>.

- [66] M. Thomsen, S. B. Vogensen, J. Buchardt, M. D. Burkart, R. P. Clausen, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7606, <https://doi.org/10.1039/c3ob41702f>.
- [67] L. Gericke, D. Mhaindarkar, L. C. Karst, S. Jahn, M. Kuge, M. K. F. Mohr, J. Gagsteiger, N. V. Cornelissen, X. Wen, S. Mordhorst, H. J. Jessen, A. Rentmeister, F. P. Seebeck, G. Layer, C. Loenarz, J. N. Andexer, *ChemBioChem* **2023**, *24*, e202300133.
- [68] J. Schlesier, J. Siegrist, S. Gerhardt, A. Erb, S. Blaesi, M. Richter, O. Einsle, J. N. Andexer, *BMC Struct. Biol.* **2013**, *13*, 22, <https://doi.org/10.1186/1472-6807-13-22>.
- [69] W. Liu, D. Wang, D. Zhang, X. Yang, *Synlett* **2022**, *33*, 1788–1812.
- [70] S. Shirakawa, X. Wu, K. Maruoka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14200–14203, <https://doi.org/10.1002/anie.201308237>.
- [71] X. L. Hou, B. H. Zheng, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1789–1791, <https://doi.org/10.1021/ol9002543>.
- [72] M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6781–6802, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.049>.
- [73] L. A. Harwood, L. L. Wong, J. Robertson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 4434–4447, <https://doi.org/10.1002/anie.202011468>.
- [74] C. Aranda, G. Oksdath-Mansilla, F. R. Bisogno, G. De Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1233–1257, <https://doi.org/10.1002/adsc.201901112>.

Manuskript erhalten: 15. Juli 2025

Überarbeitetes Manuskript erhalten: 27. Oktober 2025

Manuskript akzeptiert: 27. Oktober 2025

Endgültige Fassung online: 22. November 2025