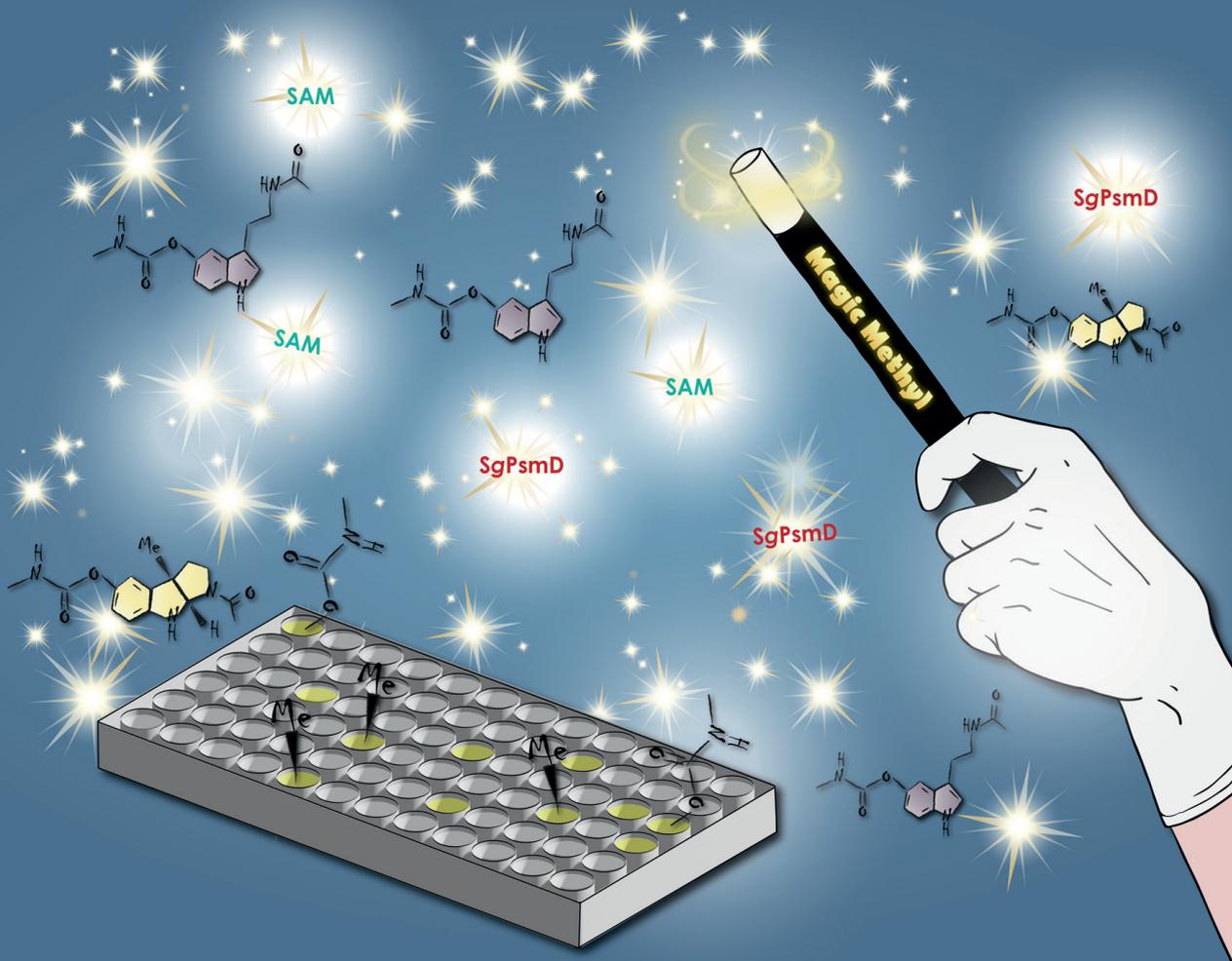


## Charakterisierung von Methyltransferasen zur enantioselektiven Synthese von Hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indol basierten Naturstoffen

Pascal Schneider



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

# INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort.....	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 „ <i>magic methyl effect</i> “.....	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 N-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 Schöne neue Welt der Methyltransferasen.....	50
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 .....	80
6.3.1 Expression und Reinigung der Halogenid-Methyltransferase C <sub>t</sub> 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 .....	88
6.4 Nutzung von Methyltransferasen zur präparativen Synthese und Evaluierung der Bioaktivität .....	89
6.4.1 Anwendung von SgPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese .....	89
6.4.2 Anwendung von SaPsmD zur präparativen biokatalytischen Synthese .....	91
6.4.3 Testung biologischer Aktivität produzierter Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indole .....	94
6.4.4. Bestimmung von molekularen Zielstrukturen von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indolen und in-silico Evaluierung .....	97
6.4.5 Bestimmung der ADME Parameter produzierter Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indole .....	106
6.4.6 Zusammenfassung des Kapitels .....	108
6.5 N-Methyltransferase SgPsmC .....	109
6.5.1 Expression und Reinigung von SgPsmC .....	110
6.5.2 Synthese der racemischen Referenz zur Bestimmung der Selektivität der SgPsmC Reaktion .....	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 Totalsynthese von enantiomerenreinen Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indolen .....	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-Methyltransferasen .....	130
7.2	Mutasynthese und Ganzzellbiokatalyse – Das native SAM-Recycling.....	131
7.2.1	Generierung von Physostigmin Derivaten durch Mutasynthese in <i>Myxococcus xhantus</i> .....	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 Biokatalyse.....	137
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 kinetischen Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indolen .....	140
7.5.1	Perspektiven und Anknüpfungspunkte.....	141
7.5.2	Anwendung zur kinetischen Racematspaltung von Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indolen .....	141
7.5.3	Gezielte Modifizierung von <i>N</i> -Heterozyklen .....	142
7.6	Erweiterung und Testung der Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indol-Bibliothek .....	144
7.6.1	Perspektiven und Anknüpfungspunkte.....	146
7.6.2	QSAR-Modell zur Optimierung von bioaktiven Hexahydropyrrolo[2,3- <i>b</i> ]indol.....	146
7.6.3	Entdeckung neuer Acetylcholinesterase Inhibitoren zur Bekämpfung von Alzheimer .....	147
8.	Experimenteller Teil.....	150
8.1	Allgemeines .....	150
8.1.1	Geräte und Software .....	150
8.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	153
8.1.3	Chemikalien.....	154
8.1.4	Enzyme .....	154
8.1.5	Plasmide und Oligonukleotide .....	154
8.1.6	Mikroorganismen.....	155
8.2	Molekularbiologische Methoden .....	156
8.2.1	Design von Primern .....	156
8.2.2	PCR Methoden .....	156
8.2.2.1	Kolonie-PCR.....	156
8.2.2.2	Test-PCR.....	157
8.2.2.3	Overlap Extension PCR.....	157
8.2.3	Isolation von Plasmid 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 <i>E. coli</i> .....	161
8.3.5.1 Heterologe Expression der C-Methyltransferase <i>SgPsmD</i> .....	161
8.3.5.2 Heterologe Expression der N-Methyltransferase <i>SgPsmC</i> .....	161
8.3.5.3 Heterologe Expression der Halogenid-Methyltransferase <i>CtHMT</i> .....	162
8.3.5.4 Heterologe Expression der C-Methyltransferase <i>SaPsmD</i> .....	162
8.3.5.5 Heterologe Expression der Methioninadenosyltransferase <i>TkMAT</i> .....	162
8.3.5.6 Heterologe Expression der Amid-Hydrolase <i>SgPsmB</i> .....	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 .....	169
8.5.3 Optimierung der CtHMT gekoppelten SgPsmD-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 CtHMT Lysat.....	172
8.5.7 Mtase <sup>TM</sup> -Glo Assay: Kalibrierung mit SAH .....	172
8.5.8 Mtase <sup>TM</sup> -Glo Assay: Bestimmung der optimalen Enzymkonzentration .....	173
8.5.9 Mtase <sup>TM</sup> -Glo Assay: Bestimmung der kinetischen Parameter .....	173
8.5.10 Mtase <sup>TM</sup> -Glo Assay: Bestimmung der spezifischen Aktivität von MTs .....	174
8.5.11 Ellmanns Assay zur Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von AChE und BChE Inhibitoren .....	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-Spektroskopie .....	180
8.6.1.8 Infrarotspektroskopie (IR) .....	181
8.6.1.9 LC (Liquid Chromatography)-MS Analyse.....	181
8.6.1.10 RP-LC (Liquid Chromatography) Analyse .....	181
8.6.1.11 Chirale Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	182
8.6.1.12 Bestimmung der optischen Rotation .....	183
8.6.1.13 Ermittlung von ee-Werten .....	183
8.6.1.14 Ermittlung der Selektivität (S) .....	183
8.6.2 Generelle Methoden zur Synthese der Indol-Bibliothek .....	184
8.6.2.1 Synthese der Serotonin-Derivate .....	184
8.6.2.1.1 Generelle Vorschrift zur Synthese von <i>N</i> -alkyl Serotonin-Varianten.....	184
8.6.2.2 Synthese der verschiedenen carbamoylierten <i>N</i> -Acetylserotonin Derivate .....	191
8.6.2.2.1 Generelle Synthesevorschrift zur Herstellung der <i>N</i> -Acetylserotonin Derivate .....	191
8.6.2.3 Synthese von 5-halogenierten <i>N</i> -Acetyltryptamin-Derivaten .....	199
8.6.2.3.1 Allgemeine Vorschrift zur Synthese von 5-halogenierten <i>N</i> -Acetyltryptamin- Derivaten.....	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, <i>N</i> -Benzyl Schützung und Carbamoylierung.....	205
8.6.2.4.3 <i>N</i> -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 Versuchsplanung .....	232

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

# 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.