

# Enzymkatalysierte regioselektive *N*-Methylierung und *N*-Alkylierung von Pyrazolen

Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte  
Abhandlung.

## **Dissertation**

Vorgelegt von

**Ludwig Leopold Bengel**

aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors

Vorsitzender: Prof. Dr. Arnd Heyer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2021

Institut für Biochemie und Technische Biochemie

Abteilung Technische Biochemie

- 2021 -

*„Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört.“*

Justus von Liebig (1803-1873)

## **ERKLÄRUNG ÜBER DIE EIGENSTÄNDIGKEIT DER DISSERTATION**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Enzymkatalysierte regioselektive *N*-Methylierung und *N*-Alkylierung von Pyrazolen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren bestätige ich ausdrücklich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

## **DECLARATION OF AUTHORSHIP**

I hereby declare that the presented thesis entitled “Enzyme catalyzed regioselective *N*-methylation and *N*-alkylation of pyrazoles” is the result of my own work, that all sources used or quoted have been indicated, and that I have not used any illegitimate means. I further declare that I have not submitted this thesis for a degree in some form or another.

Stuttgart, 26.05.2021

Ludwig Leopold Bengel

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung und unter Anleitung von Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Biochemie und Technische Biochemie in der Abteilung für Technische Biochemie der Universität Stuttgart. Die experimentellen Arbeiten entstanden im Zeitraum von Februar 2018 bis November 2020 im Rahmen des Projektes *Maßgeschneiderte Inhaltsstoffe - Verbundvorhaben: 'MakeSAM: Methylierung als Basis zur mikrobiellen Herstellung von L-Methionin, S-Adenosylmethionin (SAM), Pharma- und Aromastoffen aus Zucker'* (Teilprojekt B) des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen 031B0359B).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden folgende Fachartikel publiziert:

**Bengel, L.L.,** Aberle, B., Egler-Kemmerer, A.N., Kienzle, S., Hauer, B. & Hammer, S.C.. *Engineered enzymes enable selective N-alkylation of pyrazoles with simple haloalkanes.* Angewandte Chemie International Edition, (2021), 60, 5554-5560

In deutscher Übersetzung:

**Bengel, L.L.,** Aberle, B., Egler-Kemmerer, A.N., Kienzle, S., Hauer, B. & Hammer, S.C.. *Modifizierte Enzyme ermöglichen die selektive N-Alkylierung von Pyrazolen unter Verwendung einfacher Halogenalkane.* Angewandte Chemie International Edition, (2021), 133, 5614-5620

# DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit auf die eine oder andere Weise nicht zustande gekommen wäre.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des sehr interessanten und vielseitigen Themas, ebenso wie für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung. Besonders die wertvollen Ratschläge und Hilfeleistungen während vieler Diskussionen inspirierten mich stets sehr.

Herrn Prof. Dr. Ing. Ralf Takors möchte ich vielmals für die freundliche Übernahme des Koreferats, sowie für die vielen interessante Diskussionen während der MakeSAM-Meetings danken. Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Arnd Heyer für die freundliche Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Jun.-Prof. Dr. Stephan Hammer, für die ausgezeichnete Betreuung, sowie die wertvollen Ratschläge und alle spannenden Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswertung von NMR-Daten sowie für die Überarbeitung von Manuskripten und dieser Arbeit bedanken. Vielen Dank auch für die großzügige Unterstützung während dieser Zeit und die gemeinsamen tollen Erlebnisse.

Mein weiterer Dank gilt Benjamin Aberle für die vielen spannenden Diskussionen, der Zusammenarbeit und Unterstützung auf vielen Ebenen und der gemeinsamen Unternehmungen des ‚*Team Methyltransferase*‘.

Auch bei Frau Dr. habil. Bettina Nestl und Herrn Dr. Bernd Nebel möchte ich mich für die vielen spannenden Diskussionen und Tipps bedanken. Bei Herrn Dr. Bernd Nebel möchte ich mich besonders für die Unterstützung im Bereich der analytischen Chemie und das Teilen seiner Erfahrung in der Instandhaltung der Messgeräte bedanken.

Bei Herrn Sven Richter möchte ich mich für die Unterstützung bei der Enzymreinigung und das Teilen seines Wissens darüber bedanken.

Ich bedanke mich herzlichst für die tolle Zusammenarbeit bei allen Praktikanten, Bachelor- und Masterstudenten. Ich danke Samuel Kienzle für die herausragende Leistung beim Etablieren der Plattform für die Synthese von NSAs. Alexander-Nicholas Egler-Kemmerer danke ich besonders für den unermüdlichen Einsatz und die exzellente Unterstützung beim Etablieren der

bienzymatischen Alkylierungskaskade. Meinem Praktikanten Andreas Greulich danke ich für die Unterstützung bei der Charakterisierung der INMT.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Max-Philipp Fischer, für die ausgezeichnete Begleitung während meiner Masterthesis und damit der Wegbereitung zu meiner Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen herzlich für das tolle Arbeitsklima der letzten drei Jahre bedanken. Besonders für die Hilfsbereitschaft und die Bereitschaft jederzeit über Problemstellungen jeglicher Art zu diskutieren möchte ich mich bedanken. Die gemeinschaftlichen Unternehmungen nach Feierabend, die Grill- und Filmveranstaltungen waren immer eine große Freude.

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes.

Zum Abschluss möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie und in dem Zusammenhang besonders bei Iris für die Korrektur meiner Arbeit und vor allem bei Evelyn für die stetige Unterstützung bedanken.

*Für Evelyn und Felix,*

*Danke.*





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>15</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>17</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>21</b>
1.1 Regioselektive Methylierung: Eine Wunschreaktion der synthetischen Chemie .....	21
1.2 Pyrazole als Schlüsselstrukturen biologisch aktiver Wirkstoffe.....	22
1.3 Chemische Methylierung und Alkylierung von Heterozyklen .....	24
1.4 Methylierung in der Natur.....	26
1.4.1 Struktur von Methyltransferasen.....	27
1.4.2 Mechanismus der enzymatischen Methylierung.....	30
1.5 Regeneration von <i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin .....	31
1.6 Anwendung von SAM-abhängigen Methyltransferasen in der Biokatalyse.....	34
1.7 Enzyme Engineering von Methyltransferasen .....	35
1.8 Nicht-natürliche <i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin-Analoga.....	36
1.9 Potentielle <i>N</i> -Methyltransferasen für die Methylierung von Pyrazolen .....	38
1.10 Computergestützte Methoden zum Erstellen von Variantenbibliotheken .....	44
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>47</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1 Identifikation von promiskuitiven <i>N</i> -Methyltransferasen.....	49
3.1.1 Charakterisierung der promiskuitiven Reaktion .....	50
3.2 Enzyme-Engineering durch computergestütztes Design einer Mutantenbibliothek..	52
3.2.1 Pyrazol-Auswahl für die Untersuchung der Substratbreite von Enzym-Varianten.....	54
3.2.2 Produktgemische als Resultat der chemischen Synthese von Produktstandards	55
3.3 Entwicklung eines <i>Deep-Well</i> -Platten-Screenings.....	57
3.4 Screening der Mutantenbibliothek .....	58

3.5	Charakterisierung ausgewählter FuncLib-Varianten .....	61
3.5.1	Endpunktbestimmungen unter stöchiometrischem Einsatz von SAM.....	61
3.5.2	Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen ...	63
3.6	<i>In vivo</i> Methylierung von 3-Methylpyrazole mit <i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	65
3.7	Identifikation promiskuitiver Halogenid-Methyltransferasen.....	66
3.8	Alkylierung von Pyrazolen unter Verwendung von Halogenalkanen.....	69
3.8.1	Präparative enzymatische Synthese von 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol mit der bienzymatischen Kaskade .....	72
3.8.2	Enzymatische Ethylierung und Propylierung von 3-Cyclopropylpyrazol .....	74
3.9	Identifikation einer weiteren promiskuitiven <i>N</i> -Methyltransferase .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>81</b>
4.1	Pyrazol- <i>N</i> -Methyltransferasen .....	81
4.1.1	Identifikation von pyrazolmethylierenden <i>N</i> -Methyltransferasen .....	81
4.1.2	Enzym-Engineering von Pyrazolmethyltransferasen.....	83
4.1.2.1	Regioselektive Methylierung von Pyrazolen .....	83
4.1.2.2	Aktivität von engineernten Pyrazol- <i>N</i> -Methyltransferasen .....	85
4.1.3	Computergestütztes Enzym-Design von Pyrazolmethyltransferasen .....	88
4.1.4	<i>In vivo</i> Methylierung von Pyrazolen .....	89
4.2	SAM-Analoga aus einfachen Halogenidalkanen .....	89
4.3	Enzymatische Methylierung und Alkylierung von Pyrazolen unter Verwendung einfacher Halogenalkane.....	91
<b>5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>99</b>
6.1	Chemikalien und kommerzielle Enzyme .....	99
6.2	Molekular- und Mikrobiologische Kits.....	99
6.1	<i>E. coli</i> Stämme .....	99
6.2	Plasmide .....	100

6.3	Klonierung von Wildtyp <i>N</i> -Methyltransferasen, FuncLib-Varianten und Halogenid-Methyltransferasen.....	100
6.4	Kultivierung und Protein-Expression.....	103
6.4.1	Verwendete Komplexmedien.....	103
6.4.2	Expression.....	103
6.4.2.1	Expression von <i>N</i> -Methyltransferasen und Varianten.....	103
6.4.2.2	Expression der Wildtyp-NMTs für das Screening der promiskuitiven Aktivität mit 3-Methylpyrazol und zur Bestätigung der natürlichen Aktivität.	104
6.4.2.3	Expression der wtNNMT und Varianten für die Enzymreinigung.....	104
6.4.2.4	Expression in 24- <i>Deep-Well</i> Platten.....	104
6.4.2.5	Expression von Halogenid-Methyltransferasen.....	104
6.5	Proteinreinigung.....	105
6.5.1	Proteinreinigung zur Bestimmung der natürlichen Aktivität von PNMT und HNMT.....	105
6.5.2	Proteinreinigung der wtNNMT und FuncLib-Varianten.....	105
6.5.3	Proteinreinigung der NSA-Synthase ( <i>ac/HMT</i> ).....	106
6.5.4	Proteinreinigung von INMT.....	106
6.6	Biotransformationen.....	107
6.6.1	Untersuchung der promiskuitiven Aktivität der Wildtyp-NMTs.....	107
6.6.2	Bestätigung der natürlichen Aktivität von PNMT und HNMT.....	108
6.6.3	Charakterisierung der Reaktion von wtNNMT und INMT mit 3-Methylpyrazol.....	108
6.6.4	Inhibition von wtNNMT in der Methylierung von 3-Methylpyrazol.....	108
6.6.5	Charakterisierung und Inhibition von INMT in der Methylierung von 3-Methylpyrazol.....	109
6.6.6	24- <i>Deep-Well</i> -Platten-Screening.....	109
6.6.7	Biotransformationen für Endpunktbestimmungen der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen.....	110

6.6.8	Biotransformationen für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen .....	111
6.6.9	In vivo Methylierung von 3-Methylpyrazol in <i>E. coli</i> .....	111
6.6.10	Biotransformationen des Screenings von HMTs für die enzymatische Synthese von Alkyl-SAM-Analoga.....	112
6.6.11	Biotransformationen für die enzymatische Synthese von Alkyl-SAM-Analoga .....	112
6.6.12	Biotransformationen der enzymatischen Kaskade zur Methylierung von 3-Methylpyrazol.....	112
6.6.13	Biotransformationen der enzymatischen Kaskade zur Alkylierung von 3-Cyclopropylpyrazol .....	113
6.6.14	Biotransformation im präparativen Maßstab durch die enzymatische Kaskade zur Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol.....	113
6.7	Allgemeines Protokoll zur chemischen Synthese von alkylierten Pyrazolen .....	114
6.8	Analytische Methoden .....	115
6.8.1	NMR-Analyse .....	115
6.8.2	Hochauflösende-Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie (HR-ESI-MS).....	115
6.8.3	Gaschromatographie .....	115
6.8.3.1	3-Methylpyrazol (1), 1,3-Dimethylpyrazol (1a), 1,5-Dimethylpyrazol (1b).....	116
6.8.3.2	3,4-Dimethylpyrazol (2), 1,3,4-Trimethylpyrazol (2a), 1,4,5-Trimethylpyrazol (2b).....	117
6.8.3.3	3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Methyl-3-cyclopropylpyrazol (3a), 1-Methyl-5-cyclopropyl-pyrazol (3b) .....	117
6.8.3.4	3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Ethyl-3-cyclopropylpyrazol (7a), 1-Ethyl-5-cyclopropylpyrazol (7b) <sup>[223]</sup> .....	117
6.8.3.5	3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Propyl-3-cyclopropylpyrazol (8a), 1-Propyl-5-cyclopropyl-pyrazol (8b) <sup>[223]</sup> .....	118

6.8.3.6	3(2-Furyl)-Pyrazol (4), 1-Methyl-3(2-Furyl)-Pyrazol (4a), 1-Methyl-5(2-Furyl)-Pyrazol (4b) .....	118
6.8.3.7	3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5), 1-Methyl-3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5a), 1-Methyl-5(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5b).....	118
6.8.3.8	3-Methyl-4-Phenylpyrazol (6), 1,3-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (6a), 1,5-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (6b).....	119
6.8.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie .....	119
6.8.4.1	Detektion von SAH und SAM zum Nachweis der natürlichen Reaktion..	119
6.8.4.2	Detektion und Quantifizierung von SAH, SAM und Alkyl-SAM-Analoga.....	119
6.8.4.3	Massendetektion von SAH, SAM und Alkyl-SAM-Analoga.....	120
6.9	Bioinformatische Methoden.....	120
6.9.1	Strukturalignment.....	120
6.9.2	Erstellen der FuncLib <sup>[1]</sup> -Mutantenbibliothek.....	120
6.9.3	Erstellen eines Homologiemodells.....	121
6.9.4	Erstellen eines Sequenzähnlichkeitsnetzwerkes .....	121
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
8.1	Zusätzliche Abbildungen und Tabellen .....	143
8.2	Enzymsequenzen.....	165
8.3	Chemische Synthese von Produktstandards.....	181
8.4	NMR-Analyse der enzymatischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol mit Iodmethan im präparativen Maßstab (1,0 mmol).....	185



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )	ITPG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Å	Ångström (1 Å = 1 × 10 <sup>-10</sup> m)	k	kilo (10 <sup>3</sup> )
AA	Aminosäure	KP <sub>i</sub>	anorganisches Kaliumphosphat
ACN	Acetonitril	LB	<i>lysogeny broth</i>
ADK	Adenosinkinase	LC	Flüssigkeitschromatographie
AI	Autoinduktion	LV	Leervektor
ATP	Adenosintriphosphat	m	Masse
bp	Basenpaare	M	Molar
ButBr	Brombutan	MAT	Methioninadenosyltransferase
ButCl	Chlorbutan	MeI	Iodmethan
ButI	Iodbutan	MET	L-Methionin
bzw.	beziehungsweise	min	Minute
CIDA	5-Chloro-Desoxyadenosin	MS	Massenspektrometrie
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferase	MT	Methyltransferase
COSY	Homonukleare Korrelationspektroskopie	MW	Molekulargewicht
Da	Dalton (1 Da = 1,660538782 × 10 <sup>-27</sup> kg)	MW	Mittelwert
DAD	Diodenarray (-Detektor)	NaH	Natriumhydrid
DCM	Dichlormethan	NCA	Nicotinamid
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt deionisiertes Wasser	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	NMR	Kernspinresonanz (-Messung)
DWP	<i>Deep-Well</i> -Platte	NMT	<i>N</i> -Methyltransferase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NNMT	Nicotinamid- <i>N</i> -Methyltransferase
<i>et.al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)	NovO	Coumarin- <i>C</i> <sup>8</sup> -Methyltransferase
EtBr	Bromethan	NSAs	nicht-natürliche SAM-Analoga
EtI	Iodethan	OMT	<i>O</i> -Methyltransferase
FDA	5-Fluoro-Deoxyadenosin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FID	Flammenionisationsdetektor	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
GC	Gaschromatographie	PDB	<i>Protein Data Base</i>
FID	Flammenionisationsdetektor	PFOMT	Phenylproanoid und Flavonoid- <i>O</i> -Methyltransferase
h	Stunde	pKa	Säuredissoziationskonstante
HAL	Halogenase	PNMT	Phenylethanolamin- <i>N</i> -Methyltransferase
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie	PPK	Phosphokinase
HMBC	Heteronukleare Mehrfachbindungskohärenz	ppm	<i>parts per million</i>
HMT	Halogenidmethyltransferase	PropI	1-Iodpropan
HNMT	Histamin- <i>N</i> -Methyltransferase	PSSM	<i>point-specific scoring matrix</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	PTE	Phosphotriesterase
HSQC	Heteronukleare Einzelquantenkohärenz	s	Sekunde
IMAC	Metallionen-Affinitäts-Chromatographie		
INMT	Indolethylamin- <i>N</i> -Methyltransferase		

SAB	<i>S</i> -Adenosyl-L-Butionin	TB	terrific broth
SAE	<i>S</i> -Adenosyl-L-Ethionin	THF	Tetrahydrofuran
SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocystein	TLC	Dünnschichtchromatographie
SAHH	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocysteinhydrolase	Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan- Hydrochlorid
SAHN	<i>S</i> -Adenosyl-L-Homocysteinnukleosidase	$V_0$	Anfangsgeschwindigkeit
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-Methionin	WT/wt	Wildtyp
SAP	<i>S</i> -Adenosyl-L-Propionin	z. B.	zum Beispiel
Sgvm	alpha-Ketovaleriansäure- $C^3$ - Methyltransferase	$\delta$	chemische Verschiebung
SDS	Natriumdodecylsulfat		



## ZUSAMMENFASSUNG

Eine katalysator kontrollierte Methode für „einfache“ Methylierungs-, bzw. Alkylierungsreaktionen von Heterozyklen mit mehreren Heteroatomen wie beispielsweise Imidazole, Pyridone und Pyrazole ist eine der Herausforderungen der synthetischen Chemie. Gerade *N*-alkylierte Pyrazole sind jedoch von großer Bedeutung für bioaktive Wirkstoffe. In der Natur knüpfen *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängige Methyltransferasen (MTs) C-Heteroatom-Bindungen mit unerreichter Präzision an einer Vielzahl an Substraten. Trotz dieser Vielfalt besitzen wenige Methyltransferasen ein breites (nicht-natürliches) Substratspektrum. Für die Methylierung von Pyrazolen, die nahezu nicht in der Natur vorkommen, sind daher bislang noch keine natürlicherweise evolvierten Enzymsequenzen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher eine enzymatische Plattform für die regioselektive *N*-Alkylierung von Pyrazolen zu entwickeln.

In einem ersten Teil der Arbeit wurden drei potentiell promiskuitive *N*-Methyltransferasen in der Literatur identifiziert und hinsichtlich einer Startaktivität mit Pyrazolen untersucht. Mit der humanen Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (NNMT) konnte eine geringe, nicht-regioselektive Startaktivität identifiziert werden. Die Kombination phylogenetischer und energetischer Berechnungen durch den web-basierten FuncLib-Algorithmus<sup>[1]</sup> resultierte in einer kleinen, fokussierten Mutantenbibliothek von 50 Pyrazol-MTs mit mehrfachen Mutationen in den aktiven Zentren der Enzyme. Diese Variantenbibliothek wurde hinsichtlich ihrer Aktivität und Regioselektivität mit sechs strukturell verschiedenen und asymmetrisch substituierten Pyrazolen untersucht. Hierzu wurde ein 24-*Deep-Well*-Platten-Screening entwickelt, in dem insgesamt mehr als 90 % der Varianten eine Aktivität mit mindestens einem der untersuchten Pyrazole zeigten. Eine Aktivitätssteigerung im Vergleich zum Wildtyp konnte für 10-30 % der Varianten beobachtet werden. Zudem wurde in der Variantenbibliothek eine hohe Diversität an Regioselektivitäten gefunden, darunter auch regiodivergente Varianten. Die Charakterisierung von sechs ausgewählten Varianten mit gereinigtem Enzym ergab im Allgemeinen Aktivitätssteigerungen um einen Faktor  $\geq 10$ . Zusätzlich fand sich auch eine Variante mit dramatischen Aktivitätsverbesserungen um Faktoren von 72 und 118 für das jeweilige Pyrazol. Umso bedeutender wird dieser Umstand, da dies bei gleichzeitiger exzellenter Regioselektivität bis zu >99 % geschah. Im Vergleich dazu erzeugten die chemische Methylierung und der NNMT-Wildtyp für alle Pyrazol-Substrate Produktgemische. Die Anwendbarkeit von Methyltransferasen ist jedoch aufgrund des teuren und gleichzeitig chemisch instabilen Cofaktors SAM stark eingeschränkt. In einem Versuch zur prinzipiellen Machbarkeit der *in*

*vivo*-Methylierung von Pyrazolen gelang es 3-Methylpyrazol mittels des *E. coli*-eigenen Regenerationssystems für SAM, mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle, zu methylieren.

Nach der regioselektiven Methylierung wurde das System hinsichtlich der regioselektiven Alkylierung erweitert. Traditionelle chemoenzymatische Alkylierungen sind durch die aufwändige Synthese alkylierter Methionin-Analoga und der komplexen, instabilen Alkyl-donoren in ihrer Anwendbarkeit limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine zyklische, bienzymatische Kaskade zur Alkylierung von Pyrazolen etabliert. In einem ersten Schritt wurde hierfür eine promiskuitive Halogenidmethyltransferase (NSA-Synthase) identifiziert die in der Lage ist nicht-natürliche SAM-Analoga (NSAs) aus *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) und einfachen Halogenalkanen zu synthetisieren. Neben Iodmethan, Iodethan, Iodpropan und Iodbutan konnten hier sogar teilweise analoge Chlor- und Brom-Alkane als weniger toxische Ausgangsmaterialien eingesetzt werden. Mit der Kaskade aus NSA-Synthase und NNMT-Varianten konnte daraufhin die regioselektive Methylierung und Alkylierung anhand zweier Pyrazole *in vitro* demonstriert werden. Interessanterweise zeigte sich hierbei schnell, dass in den gereinigten Enzymen gebundenes SAH für eine effiziente Katalyse genügt. Der Verzicht auf den teuren Cofaktor SAH ist ein bedeutender Schritt in Richtung einer Anwendbarkeit. Im Rahmen der Arbeit konnte 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol durch die bienzymatische Kaskade zu 62 % bei einer exzellenten Regioselektivität von >99 % generiert werden. In einer präparativen Reaktion konnten 37 mg 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol mit einer exzellenten Regioselektivität (>97 %) produziert werden. Die Ethylierung und Propylierung von 3-Cyclopropylpyrazol mit der Kaskade erreichte exzellente Regioselektivitäten von 98 %, bzw. 97 % des jeweiligen 1,5-Isomers.

Zusammengefasst demonstriert diese Arbeit eine potentiell generalisierbare Methode, um chemisch anspruchsvolle Alkylierungen von Heteroatomen unter Katalysatorkontrolle durchzuführen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass computergestützte Werkzeuge zum Design von Mutantenbibliotheken wie FuncLib<sup>[1]</sup> äußerst effektiv sind. Auf diese Weise konnte eine geringe Startaktivität eines Wildtyp-Enzyms in eine kleine Familie von Pyrazol-*N*-Methyltransferasen transformiert werden. Diese Arbeit kann daher zusammen mit weiteren kürzlich veröffentlichten Studien interessante neue Ansätze für die selektive Bildung von C-Heteroatom-Bindungen in bioaktiven Molekülen bieten.

## ABSTRACT

A catalyst-controlled method for "simple" methylation, or alkylation reactions of heterocycles with multiple heteroatoms, such as imidazoles, pyridones and pyrazoles, is one of the challenges of synthetic chemistry. However, *N*-alkylated pyrazoles in particular are of great importance for bioactive agents. In nature, *S*-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent methyltransferases (MTs) form *C*-heteroatom linkages with unmatched precision to a wide variety of substrates. Despite this diversity, few methyltransferases possess a broad (non-natural) substrate spectrum. Thus, no naturally evolved enzyme sequences are yet known for the methylation of pyrazoles, which are almost absent in nature. The aim of this work was therefore to develop an enzymatic platform for the regioselective *N*-alkylation of pyrazoles.

In a first part of the work, three potentially promiscuous *N*-methyltransferases were identified in the literature and investigated with respect to a starting activity with pyrazoles. With human nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT), a low, non-regioselective start activity was identified. The combination of phylogenetic and energetic calculations by the web-based FuncLib-algorithm<sup>[1]</sup> resulted in a small focused mutant library of 50 pyrazole-MTs with multiple mutations in the enzymes' active sites. This variant library was evaluated for activity and regioselectivity with six structurally distinct and asymmetrically substituted pyrazoles. For this purpose, a 24-deep-well plate screening was developed, in which overall more than 90% of the variants showed activity with at least one of the screened pyrazoles. An increase in activity compared to the wildtype was observed for 10-30% of the variants. In addition, a high diversity of regioselectivities was found within the mutant library, including regiodivergent variants. Characterization of six selected variants with purified enzyme generally revealed activity increases by a factor  $\geq 10$ . In addition, a variant with dramatic activity improvements by factors of 72 and 118 for the respective pyrazole was found. This fact becomes all the more significant since this occurred with simultaneously excellent regioselectivity up to >99%. In comparison, chemical methylation and the NNMT wild-type generated product mixtures for all pyrazole substrates. However, the applicability of methyltransferases is severely limited due to the expensive and at the same time chemically unstable cofactor SAM. In an experiment on the principal feasibility of *in vivo* methylation of pyrazoles, 3-methylpyrazole was successfully methylated using *E. coli*'s own regeneration system for SAM, with glucose as the sole carbon source.

After the achievement of the regioselective methylation, the system was extended with respect to regioselective alkylation. Traditional chemoenzymatic alkylations are limited in their

applicability by the complex synthesis of alkylated methionine analogs and the complex, unstable alkyl donors. Therefore, within this work a cyclic, bienzymatic cascade was established for the alkylation of pyrazoles. In a first step, a promiscuous halide methyltransferase (NSA-synthase) capable of synthesizing non-natural SAM analogs (NSAs) from *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) and simple haloalkanes was identified. In addition to iodomethane, iodethane, iodopropane, and iodobutane, even analogous chloro- and bromoalkanes could partially be used as less toxic starting materials. The cascade of NSA-synthase and NNMT variants was then used to demonstrate regioselective methylation and alkylation using two pyrazoles *in vitro*. Interestingly, it quickly became apparent that SAH bound in the purified enzymes was sufficient for efficient catalysis. The elimination of the expensive cofactor SAH is a significant step towards applicability. In this work, 1-methyl-5-cyclopropylpyrazole could be generated by the bienzymatic cascade at 62% with an excellent regioselectivity of >99%. In a preparative scale reaction, 37 mg of 1-methyl-5-cyclopropylpyrazole was produced with excellent regioselectivity (>97%). Ethylation and propylation of 3-cyclopropylpyrazole with the cascade achieved excellent regioselectivities of 98%, and 97% of the respective 1,5-isomer.

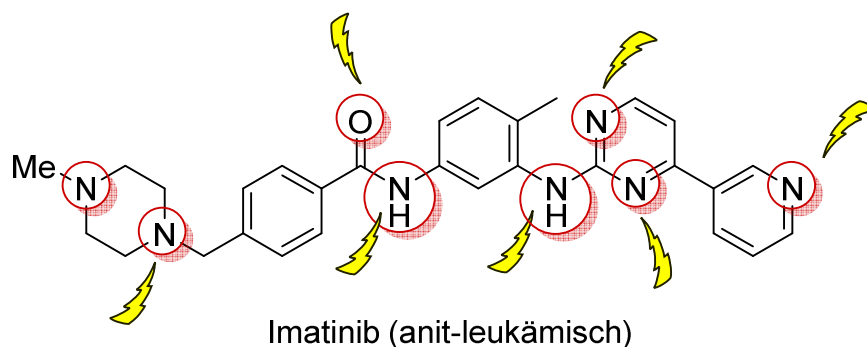
In summary, this work demonstrates a potentially generalizable method to perform the chemically challenging alkylation of heteroatoms under catalyst-control. Furthermore, it was shown that computer-assisted mutant library design tools such as FuncLib<sup>[1]</sup> are highly effective. In this way, a low starting activity of a wild-type enzyme could be transformed into a small family of pyrazole *N*-methyltransferases. Hence, this work, together with other recently published studies, could provide interesting new possibilities for the selective formation of *C*-heteroatom bonds in bioactive molecules.

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Regioselektive Methylierung: Eine Wunschreaktion der synthetischen Chemie

Eine der verbleibenden Wunschreaktionen der organisch synthetischen Chemie ist die selektive Methylierung von Molekülen mit gleich mehreren ähnlichen Heteroatomen (Abb. 1).<sup>[2-5]</sup> *N*-Methylierungen in der synthetischen Chemie werden vor allem durch Verwendung von Methylierungsreagenzien wie beispielsweise Dimethylsulfat, Methyljodid, Methanol, Diazomethan, Trimethyloxoniumtetrafluorborat, Methylpalladium oder Methylolithium durchgeführt.<sup>[6,7]</sup> Die meisten dieser Verbindungen sind aufgrund ihrer starken Methylierungsfähigkeit toxisch und /oder benötigen tiefe oder sehr hohe Reaktionstemperaturen.<sup>[8,9]</sup> Einhergehend mit starker Methylierungsfähigkeit schwinden Regio- und Chemo-selektivität und Edukte mit mehreren *N*-Heteroatomen werden nicht-selektiv methyliert.<sup>[7,10]</sup> Dies ist besonders der Fall für *N*-heterozyklische Verbindungen wie Pyrazole, Pyridone und Triazole, bei denen die Tautomerie zu einer vergleichbaren Reaktivität der Heteroatome führt.<sup>[11]</sup> Die Alkylierung solcher *N*-heterozyklischen Verbindungen verläuft gewöhnlich unter Substratkontrolle und resultiert in Produktmischungen, die oft nur schwer trennbar sind.<sup>[12]</sup> Die selektive Alkylierung erfordert daher den Einsatz von Schutzgruppen<sup>[10]</sup> und eine allgemeine katalysatorgesteuerte Alkylierung ist bisher nicht existent.<sup>[3,4]</sup>

Deutlich wird die Notwendigkeit selektiver Alkylierungsmethoden, anhand der Vielzahl von *C-N*-Alkylierungen in der medizinisch-pharmazeutischen Chemie.<sup>[13,14]</sup> Hier sind höchste Chemo-, Stereo- und Regioselektivitäten in der Modifikation von Wirkstoffgrundgerüsten erforderlich.<sup>[15-17]</sup> Auch die Bedeutung von *N*-alkylierten Heterozyklen als wichtige Struktur-



**Abb. 1: Mehrere Möglichkeiten der Methylierung von Heteroatomen am pharmazeutischen Kinase-Inhibitor Imatinib.** Das selektive Adressieren dieser Heteroatome ist eine große Herausforderung für die synthetische Chemie. Abbildung verändert nach Blakemore *et al.*<sup>[4]</sup>

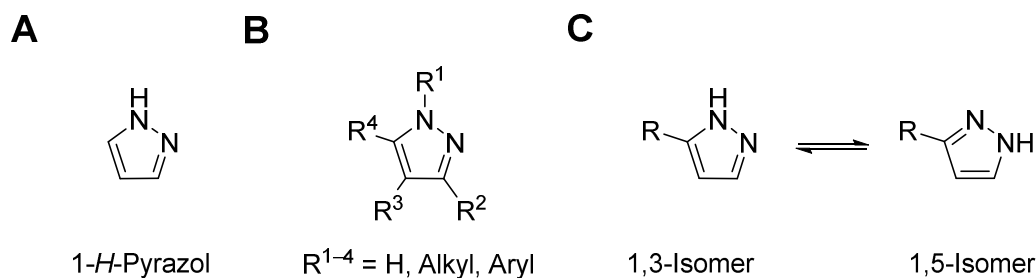
elemente in biologisch aktiven Wirkstoffen,<sup>[18]</sup> verdeutlicht, warum selektive Alkylierungsmethoden regelmäßig weit oben auf der Wunschliste in der organisch-synthetischen Chemie stehen.<sup>[3,4,19]</sup> Daher könnten neue Methoden, die solche C-N-Bindungen selektiv bilden, aktuelle Syntheserouten vereinfachen und darüber hinaus neue Moleküle verfügbar machen, die bisher nur schwer oder gar nicht zugänglich sind.

## 1.2 Pyrazole als Schlüsselstrukturen biologisch aktiver Wirkstoffe

Stickstoff-Heterozyklen gehören zu den in Pharmazeutika am meisten vorkommenden strukturellen Komponenten.<sup>[10]</sup> So enthalten 84 % einer Datenbank von U.S. FDA freigegebenen Wirkstoffen aus kleinen Molekülen ein oder mehrere Heteroatome und insgesamt 59 % einen N-Heterozyklus.<sup>[18]</sup> Als Schlüsselstrukturen tragen fünfgliedrige Heterozyklen aufgrund ihrer herausragenden pharmakophoren und biomimetischen Eigenschaften unter anderem maßgeblich zur Verbesserung moderner Agrochemikalien und Pharmazeutika bei.<sup>[11,20–24]</sup> Insbesondere Pyrazole zeigen vielfältige bioaktive Wirkungen auf Pflanzen, Tiere und Menschen.<sup>[6,25,26]</sup> Pyrazole sind fünfgliedrige, ungesättigte Heterozyklen, die zwei vizinale Stickstoff-Atome in ihrem Ringsystem tragen und meist einen aromatischen Charakter zeigen. Die Stammstruktur der Pyrazole ist das nichtsubstituierte 1-*H*-Pyrazol (Abb. 2A). Häufig sind Pyrazole an den Kohlenstoff-Atomen C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> und C<sub>5</sub> substituiert (Abb. 2B), was je nach Anzahl und Art der Substitutionen zu einer molekularen Asymmetrie führt.

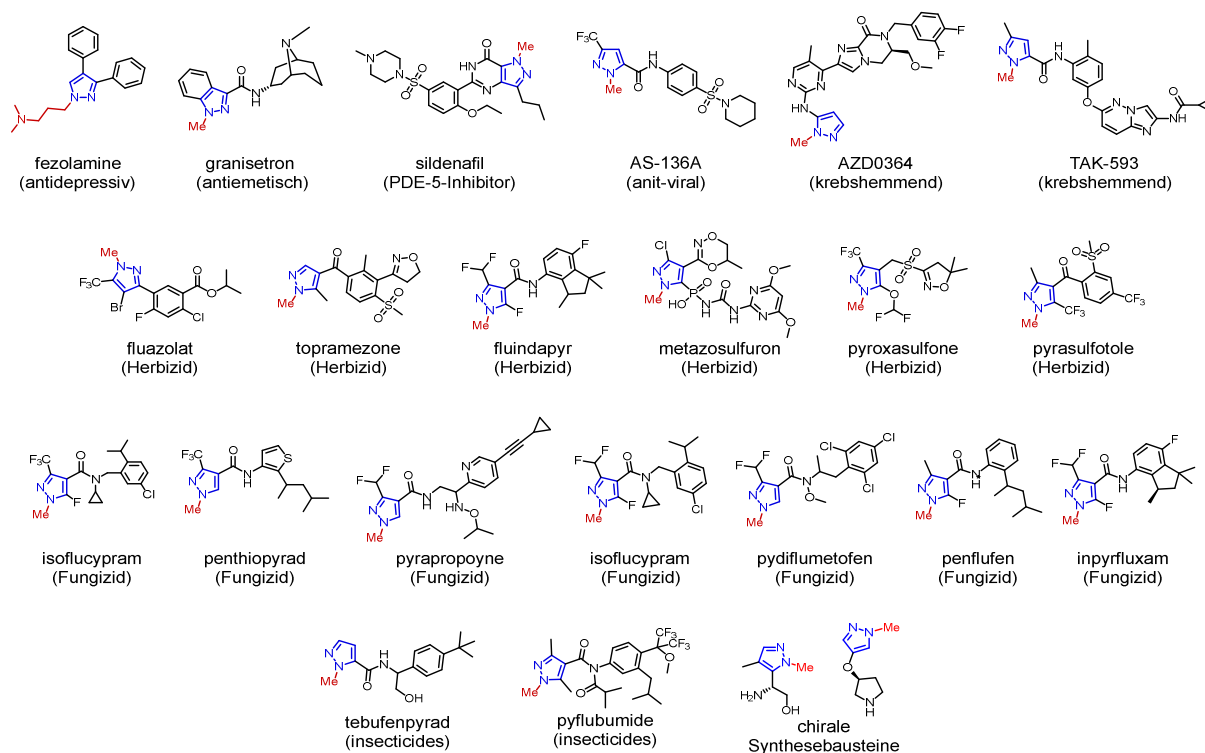
Obgleich Pyrazole äußerst selten in natürlichen Produkten vorkommen,<sup>[27]</sup> sind sie Bestandteil vieler biologisch aktiver und pharmazeutischer Wirkstoffe, in denen sie unter anderem antimikrobiell<sup>[28,29]</sup>, antiviral<sup>[20,30]</sup>, antidepressiv<sup>[21,31]</sup>, antioxidativ<sup>[32]</sup>, anticonvulsiv<sup>[33]</sup>, antiprotozoisch<sup>[34]</sup>, blutdrucksenkend<sup>[35]</sup>, entzündungshemmend<sup>[23,36,37]</sup>, fiebersenkend<sup>[38]</sup>, fungizid<sup>[39–43]</sup>, herbizid<sup>[42,44]</sup>, insektizid<sup>[41,42]</sup>, krampflösend, krebshemmend<sup>[45]</sup> und schmerzstillend<sup>[46]</sup> wirken.

Unter diesen Verbindungen finden sich auch häufig Pyrazole, die an einem der Ringstickstoffe methyliert wurden (Abb. 3). Diese zusätzliche Addition einer Methylgruppe kann zum Beispiel die Lipophilie, die Membranlöslichkeit und -gängigkeit erhöhen und die Verbindungen vor dem enzymatischen Abbau im Wirkorganismus schützen.<sup>[15,47–49]</sup> Somit kann der Wirkstoffmetabolismus gezielt und effizient gesteuert werden. Diese Methylierungen können auch die Konformität kleiner Moleküle durch stereoelektronische und sterische Effekte verändern, sowie schwache Wechselwirkungen in Form von London Dispersionskräften über-



**Abb. 2: Struktur von Pyrazolen.** Stammstruktur von Pyrazol (A), Grundstruktur substituierter Pyrazole (B) und Tautomerisierung von einfach substituiertem 1-*H*-Pyrazol (C).

tragen, die die Bindungsinteraktionen zwischen Liganden und biologischen Targets modulieren können. Weiterhin zählen *N*-methylierte Pyrazole zu den stärksten Wasserstoffbrückenakzeptoren.<sup>[11,15,47,50,51]</sup> Aus diesen Gründen gehört die strategische Platzierung von Methylgruppen heute zu den am häufigsten angewandten Funktionalisierungen in pharmazeutischen Wirkstoffen.<sup>[52]</sup> Die bis *dato* am häufigsten gewählten *de novo* Ansätze zur Herstellung mehrfach substituierter Pyrazolderivate umfassen die Kondensation von substituierten Hydrazinderivaten mit bifunktionalisierten Carbonylverbindungen, die 1,3-dipolare [3 + 2]-Cycloaddition von Alkinen und Diazoverbindungen, sowie die Übergangsmetall-katalysierte Kreuzkupplung an niedriger substituierten Pyrazolen.<sup>[5,28,53]</sup> Alternativ ermöglicht die späte Funktionalisierung (*late-stage*) die Modifikation von Molekül-



**Abb. 3: Beispiele von bioaktiven Agrochemikalien und Pharmazeutika, sowie chirale Synthesebausteine mit *N*-methylierten und *N*-alkylierten Pyrazol-Kernstrukturen.**

en an vielfältigen Reaktionszentren zu verschiedenen bioaktiven Wirkstoffen in einem späteren Syntheseschritt, was Synthesen und Ausgangsmaterialien einsparen kann.<sup>[5,54]</sup> Die regioselektive *N*-Alkylierung ambident nukleophiler Pyrazole ist jedoch aufgrund der starken Tautomerisierung (Abb. 2C) und der damit verbundenen gleichwertigen Reaktivität beider *N*-Atome aus chemischer Sicht problematisch.<sup>[4,5,11,55,56]</sup>

### 1.3 Chemische Methylierung und Alkylierung von Heterozyklen

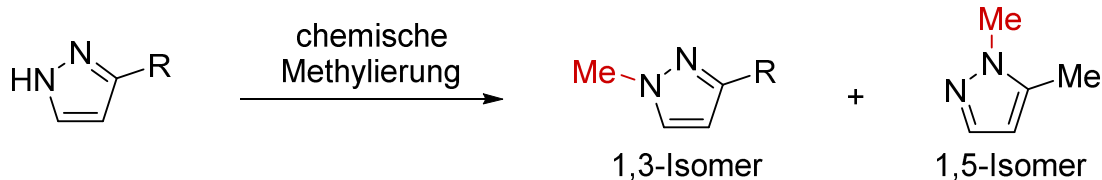
Die Methylierung ist die einfachste Form der Alkylierung und beschreibt zum einen die Addition einer Methylgruppe an ein Substrat, als auch die Substitution eines Atoms oder einer Atomgruppe durch eine Methylgruppe. Abhängig von der Reaktionsführung, der Stoffklasse des zu methylierenden Substrats und des Methylierungsreagenzes laufen Methylierungen nach unterschiedlichen Mechanismen ab.<sup>[57]</sup>

Besonders häufig werden Methylierungsreaktionen mit elektrophilen Methylierungsreagenzien wie Methyljodid,<sup>[57]</sup> Dimethylcarbonat<sup>[58]</sup> und Dimethylsulfat<sup>[59]</sup> durchgeführt. Diese Agenzien methylieren Substrate mit nur einem Nukleophil über einen konzentriert verlaufenden  $S_N2$ -Mechanismus<sup>[57]</sup> äußerst schnell und effektiv. Die regioselektive Methylierung einzelner Atome in Molekülen mit nukleophilen Zentren ist jedoch schwierig. Das ist vor allem der Fall für Pyrazole, da in diesen Heteroaromaten aufgrund spontaner Tautomerisierung beide *N*-Atome eine nahezu gleiche Reaktivität aufweisen (Abb. 2C).<sup>[11]</sup> Dies führt bei asymmetrisch substituierten Substraten zu einer Bildung von Produktgemischen aus Regioisomeren (Abb. 4A). Das Verhältnis dieser Mischungen hängt maßgeblich von der Wahl der Substituenten ab, die durch sterische und elektronische Einflüsse auf die Regioselektivität wirken. Dabei kommt besonders der Sterik von Substituenten große Bedeutung zu, da ein raumeinnehmender Substituent in direkter Nachbarschaft eines der *N*-Atome das freie Elektronenpaar gegen elektrophile Angriffe abschirmen kann, sodass die Reaktion bevorzugt am entfernteren *N*-Atom stattfindet.<sup>[60]</sup> Auch mesomere Effekte ( $\pm M$ -Effekte) eines z. B. aromatischen oder funktionalisierten Substituenten nehmen Einfluss auf die Elektronendichte im  $\pi$ -System des Pyrazols und modulieren somit die Nukleophilie der Ringstickstoffe.<sup>[61]</sup> Wird die Tautomerisierung durch chelatbildende oder dirigierende Gruppen eingeschränkt, verlangsamt, oder gar verhindert, kann auch dieses die Regioselektivität der Alkylierung direkt bestimmen. Zusätzlich kann die Wahl des Alkylierungsreagenz ebenfalls durch sterische und elektronische Effekte die Regioselektivität beeinflussen.<sup>[62]</sup>



Trotz all dieser Einflussmöglichkeiten sind vollständig regioselektive Methoden selten. Selbst bei regioselektiver Reaktionsführung entstehen bei den meisten Alkylierungen, und besonders beim Methyltransfer, Produktmischungen. Diese beeinflussen durch die Kombination aus Sub-

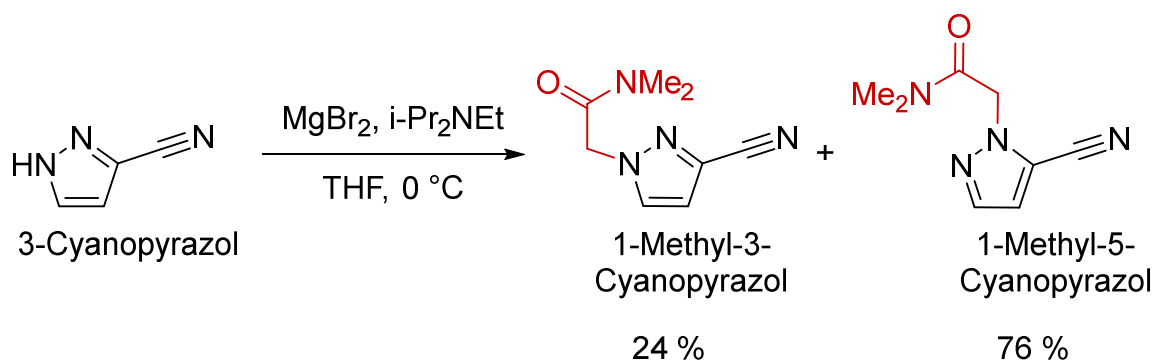
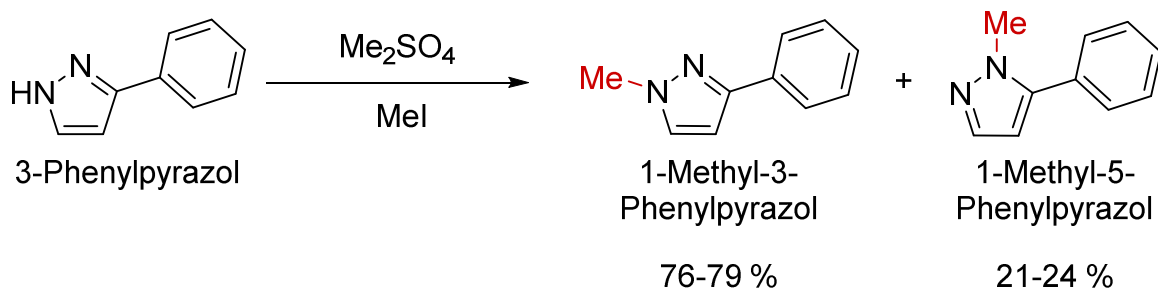
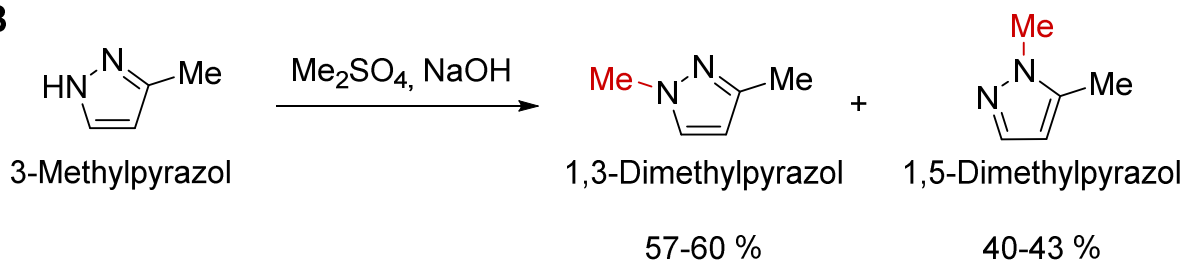
**A**



Beeinflusst durch:

- Sterik der Substituenten/ Methylierungsreagenzien
- Mesomere- und induktive Effekte der Substituenten
- Koordinierung der Alkyldonoren durch das Substrat

**B**



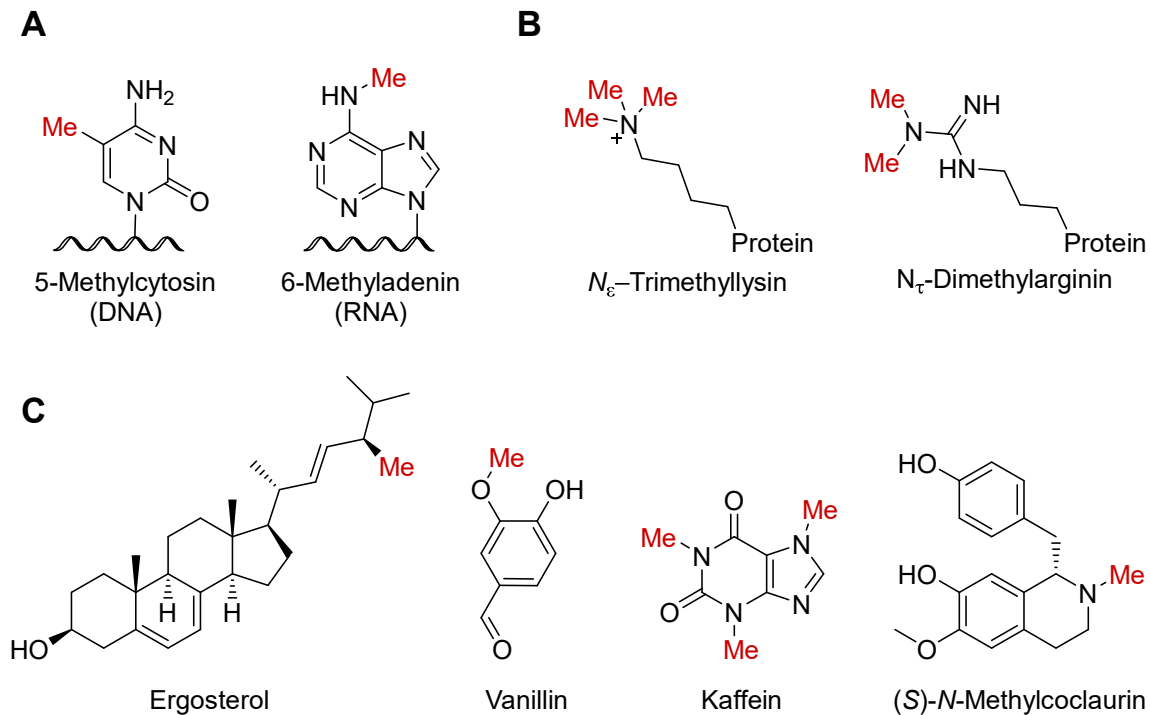
**Abb. 4: Die elektrophile Methylierung von asymmetrischen Pyrazolen (R ≠ H) mit chemischen Standardreagenzien resultiert in Produktgemischen von Regioisomeren.** (A) Sterische und elektronische Effekte von Substituenten beeinflussen die Regioselektivität in elektrophilen Alkylierungsreaktionen. Der sterische Anspruch eines Substituenten schirmt den Zugang zum freien Elektronenpaar des Stickstoffatoms ab. Mesomere Effekte verschieben die Elektronendichte des π-Systems. Dirigierende Gruppen stabilisieren ein Tautomer. (B) Beispielhafte Methylierung und Alkylierung von Pyrazolen. Die Methylierung von 3-Methylpyrazol (oben) mit Dimethylsulfat (Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)<sup>[63,64]</sup>, von 3-Phenylpyrazol (mittig) mit Me<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und MeI und Alkylierung von 3-Cyanopyrazol mit 2-Bromo-*N,N*-Dimethylacetamid (unten) führen zu Produktgemischen.<sup>[62]</sup>

straten, eingesetzter Alkylierungsreagenzien und des Reaktionsmediums das Isomerenverhältnis.<sup>[4,57,61,65,66]</sup> So entsteht beispielsweise bei der Methylierung von 3-Methylpyrazol mit Dimethylsulfat eine 60:40 Mischung der beiden möglichen Produkte (Abb. 4B), die in der Folge aufwändig separiert werden muss.<sup>[63,64]</sup> Die Methylierung von 3-Phenylpyrazol dagegen erzeugt favorisiert durch den sterischen und elektronischen Einfluss der Phenylgruppe das Produkt 1-Methyl-3-Phenylpyrazol. Hier entsteht das nichtfavorisierte Produkt 1-Methyl-5-Phenylpyrazol mit Dimethylsulfat als Methylierungsreagenz zu 24 %<sup>[67]</sup>, mit Methyljodid nur noch zu 21 %<sup>[68]</sup>. Die Alkylierung von 3-Cyanopyrazol mit 2-Bromo-*N,N*-Dimethylacetamid als weiteres Beispiel resultiert ebenfalls in einer Produktmischung von 76:24 für das 1,5-Isomer. Die einzige Möglichkeit einer völligen Regioselektivität bietet die Schutzgruppenchemie, häufig unter Einbußen des Ertrags und mit aufwändigen Prozessen zur Aufarbeitung der Produkte.<sup>[10]</sup> Methoden, in denen ein Katalysator die (Regio-) Selektivität einer Alkylierung solcher ambidenter Heterozyklen kontrolliert, sind obgleich umfangreicher Forschung in der chemischen Katalyse derzeit kaum existent.<sup>[3,4]</sup> Eine solche Methode könnte jedoch bereits existierende Synthesen vereinfachen und den Weg zu neuen, komplexen und schwierig zu alkylierenden Produkten ebnet.

## 1.4 Methylierung in der Natur

Die Natur hat jedoch in der Evolution Methoden und Strategien zur Synthese komplexer und bioaktiver Moleküle entwickelt, die den katalytischen Prozessen der synthetischen Chemie in Hinsicht auf Selektivität, Effizienz und Nachhaltigkeit oftmals überlegen sind. Daraus resultierte in den vergangenen Jahren ein steigendes Interesse der synthetischen Chemie an biokatalytischen Methoden für die Synthese schwieriger und/oder bis *dato* unmöglicher Reaktionen.<sup>[69–72]</sup> Die selektive Alkylierung von Heteroatomen wird in der Natur von verschiedenen Enzymen mit beispielloser Präzision und Aktivität durchgeführt.<sup>[73,74]</sup> So knüpfen Methyltransferasen C-Heteroatom-Bindungen mit hoher Selektivität und Aktivität.

Neben Cobalamin-abhängigen Methyltransferasen<sup>[75,76]</sup> wird die größte Familie innerhalb der Transferasen durch *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängige Methyltransferasen (MTs) gebildet. Diese MTs sind in der Natur allgegenwärtig und methylieren unter SAM-Verbrauch und der Bildung von *S*-Adenosyl-L-Homocystein als Nebenprodukt eine Vielzahl von Substraten. Das Substratspektrum von MTs beinhaltet unter anderem DNA, RNA, Proteine, Peptide und kleine Moleküle (Abb. 5).<sup>[47,77,78]</sup> DNA-MTs wirken regulatorisch auf die Epigenetik von Organismen ein,<sup>[79]</sup> Protein-MTs modifizieren unter anderem die Eigenschaften



**Abb. 5: Beispielsubstrate von Methyltransferasen.** A) DNA- und RNA-Methyltransferasen methylieren Cytosin bzw. Adenin. B) Protein-Methyltransferasen methylieren Lysin und Arginin. C) C-, O- und N-Methyltransferasen für kleine Moleküle methylieren u.a. Steroide, Geschmacks- und Geruchsstoffe, sowie Alkaloide. Abbildung inspiriert von Tang (2020).<sup>[82]</sup>

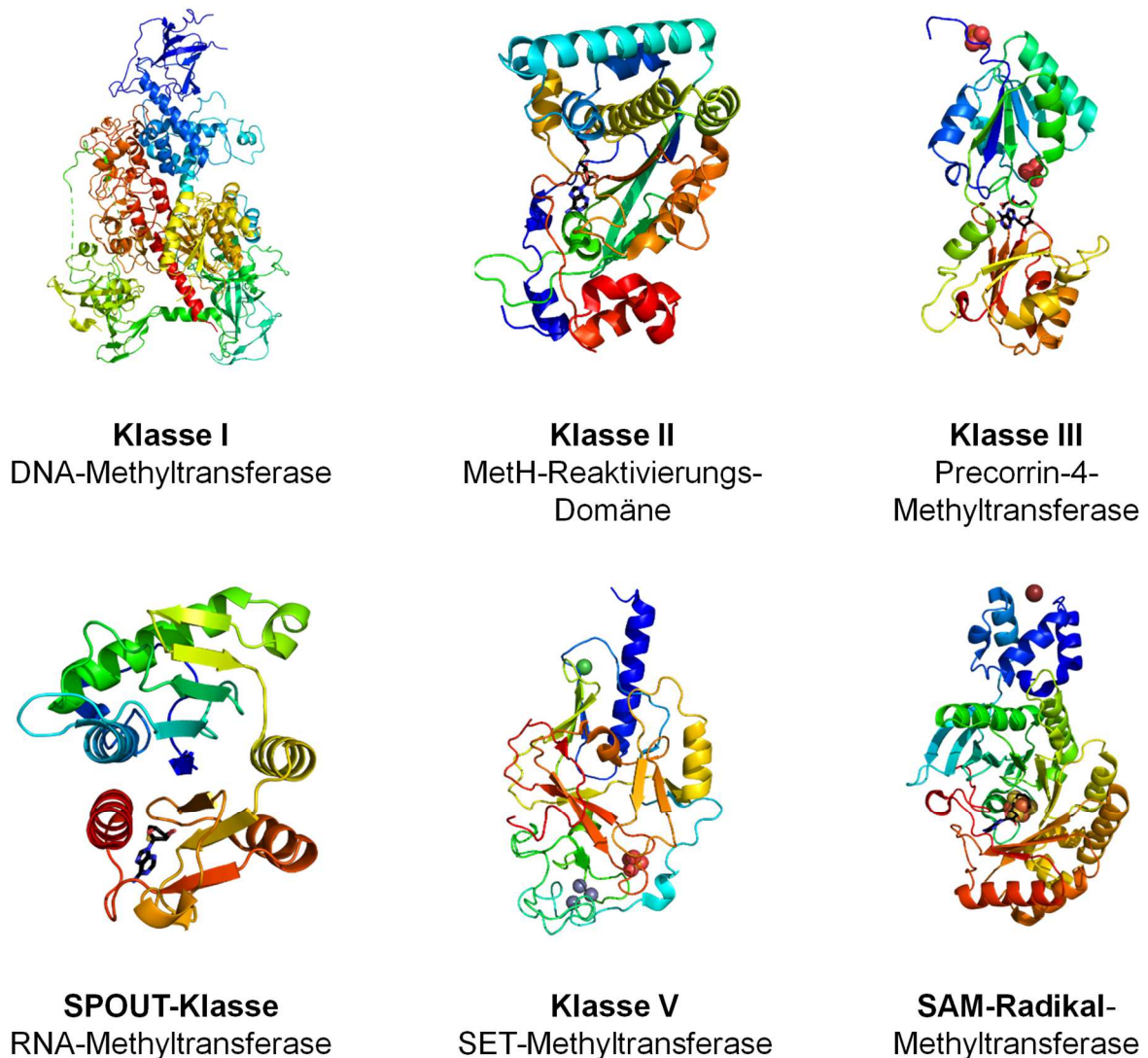
von Enzymen,<sup>[80]</sup> und kleine Moleküle-MTs sind an der Synthese von Metaboliten des Sekundärstoffwechsels beteiligt.<sup>[81]</sup> Beispielsweise ist das Produkt 1-Methylnicotinamid der Nicotinamid-N-MT (NNMT) ein Abbauprodukt von  $NAD^+$ , das ein Schlüsselmolekül in der Modulation des energetischen Metabolismus ist.<sup>[83]</sup> Durch die Erzeugung aktiver Metabolite und die Beeinflussung des SAM/SAH-Verhältnisses, sowie der Balance des Zellmethylierungszustandes ist die NNMT in etliche metabolische Pfade involviert.<sup>[84]</sup> Dies führt zu einer Beteiligung der NNMT in vielerlei Krankheiten wie beispielsweise diverse Krebsarten<sup>[85–89]</sup>, Parkinson<sup>[90,91]</sup>, Fettleibigkeit und Diabetes Typ 2<sup>[92–94]</sup>, Herzkrankheiten<sup>[95]</sup>, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD)<sup>[96]</sup>, Arteriosklerose<sup>[97]</sup> und Zirrhose<sup>[98]</sup>. Die Methylierung von Histamin ist ein kritischer Schritt im Abbau von Histamin und unter anderem von Wichtigkeit für die Aufrechterhaltung neurobiologischer Prozesse.<sup>[99]</sup> Eine Fehlfunktion der Histamin-N-MT resultiert hierbei vor allem in allergischen Reaktionen<sup>[100]</sup> und degenerativen Erkrankungen des Gehirns.<sup>[101]</sup>

### 1.4.1 Struktur von Methyltransferasen

Methyltransferasen werden aufgrund ihrer hohen Strukturähnlichkeit nach derzeitigem Kenntnisstand in 5 Klassen (Klasse I-V) unterteilt (Abb. 6).<sup>[102]</sup> Aufgrund der zunehmenden

Strukturaufklärung und der breiten Substratspektra enthalten diese Klassen die vielversprechendsten Enzyme für eine biotechnologische Anwendung.<sup>[47]</sup> Die Klassen II-IV beinhalten vor allem Enzyme, deren Strukturmotiv selten vorkommt, wie die MetH-Reaktivierungs-Domäne (Klasse II), die Precorrin-4-MT (Klasse III) und die SPOUT-Familie der RNA-MTs.<sup>[102,103]</sup> Klasse V MTs, auch bekannt als SET-Domäne MTs, enthalten vor allem Mitglieder der Protein-Lysin-MTs, die vor allem in Eukaryoten gefunden werden.<sup>[80,104–106]</sup>

Eine neue Klasse von MTs, die SAM-Radikale generiert und zur Übertragung von Methyl auf nicht-aktivierte C-C-Bindungen nutzen, wurde 2001 der Superfamilie der SAM-abhängigen Methyltransferasen hinzugefügt.<sup>[107]</sup> In der Klasse I der SAM-abhängigen MTs finden sich neben allen DNA-MTs die meisten MTs, die kleine Moleküle besonders aus sekundären Stoff-

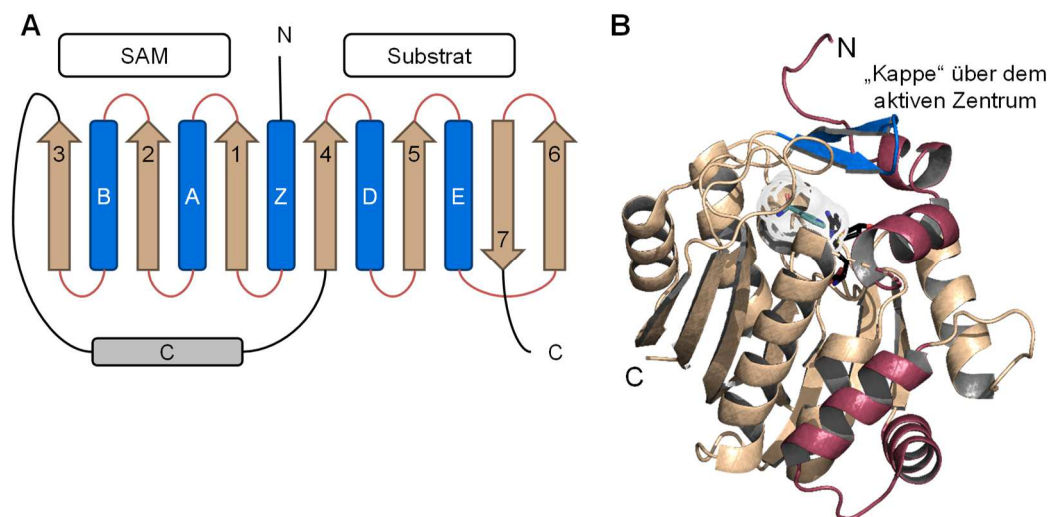


**Abb. 6:** Einteilung von Methyltransferasen (MTs) in verschiedenen Klassen anhand ihrer Struktur. MTs besitzen trotz geringer Sequenzübereinstimmungen häufig eine ähnliche Faltung. Daher können MTs anhand ihrer Struktur in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Die abgebildeten Strukturen entstammen den PDB-Dateien 4wxx, 6bm6, 1cbf, 3aia, 1mvh, 6fz6. Abbildung inspiriert durch Trievel *et al.*<sup>[102]</sup> und Chouhan *et al.*<sup>[107]</sup>

wechselwegen zu ihren Substraten zählen. Obwohl die Sequenzähnlichkeit dieser Klasse I-MTs teilweise weniger als 10 % beträgt, zeigen die Kristallstrukturen einer Vielzahl dieser Enzyme eine bemerkenswerte strukturelle Übereinstimmung in einer Rossmann-ähnlichen Superfaltung<sup>[77,108]</sup> und sind zwischen ~200-500 Aminosäuren (AA) lang, bei einem Molekulargewicht (MW) von ~25-55 kDa.<sup>[109]</sup> Die MT-Grundstruktur besteht aus 7  $\beta$ -Faltblättern, die jeweils von  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Abb. 7A). Allerdings sind besonders die *N*- und *C*-Termini, sowie die  $\alpha$ -Helix C mit den umgebenden *Loops* nicht konserviert und variieren teilweise stark zwischen den verschiedenen MTs.

Eines der Enzyme mit der Klasse I Rossmannfaltung ist die NNMT (Abb. 7). Sie besteht aus 264 Aminosäuren (AA) und hat ein Molekulargewicht von 29,6 kDa. Peng *et al.* konnten zeigen, dass die NNMT-Struktur mehrere Modifikationen der konservierten Rossmannfaltung aufweist.<sup>[110]</sup> So sind etwa zwei  $\alpha$ -Helices am *N*-Terminus und eine umgekehrte  $\beta$ -Haarnadel von Y203 bis S212 hinzugefügt, die zusammen eine "Kappe" über dem aktiven Zentrum bilden. Des Weiteren sind zwei  $\alpha$ -Helices innerhalb von W107-A134 eingefügt, die an einen Satz von flankierenden Helices angrenzen (Abb. 7B).

Auch die Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase (PNMT) weist einige Modifikationen zur konservierten MT-Faltung auf. So sind am *N*-Terminus zwei  $\alpha$ -Helices eingefügt. Ungewöhnlicherweise trägt das Enzym 2  $\alpha$ -Helices zwischen  $\alpha$ B und  $\beta$ 3, eine Loop-Region an-



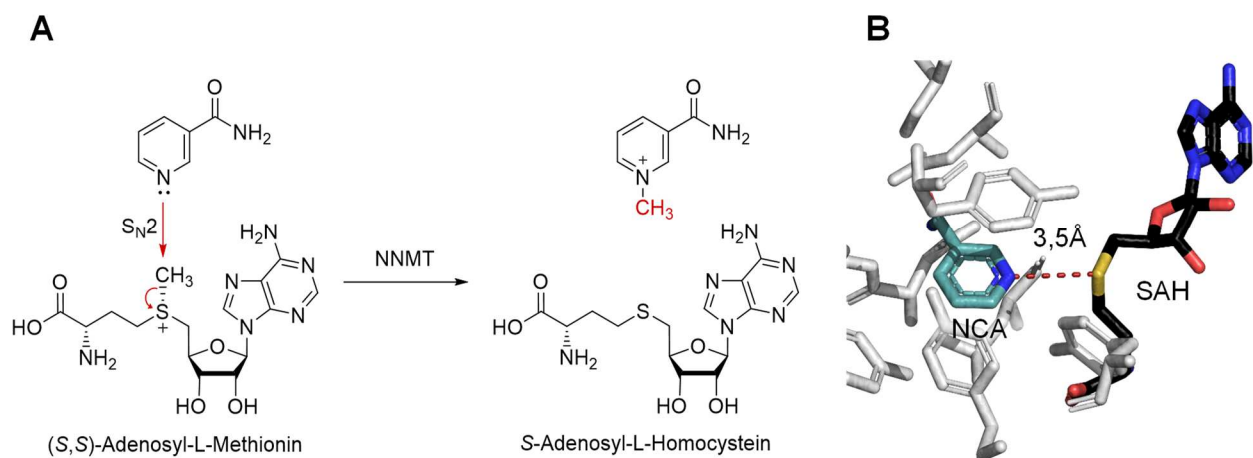
**Abb. 7: Topologie der konservierten Rossmann-Faltung von Klasse I S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) abhängigen Methyltransferasen.** **A)** Topologie von MTs mit angedeuteter Cofaktor- und Substratbinderegionen.  $\alpha$ -Helices sind als blaue Rechtecke dargestellt,  $\beta$ -Faltblätter als gelbe Pfeile. Nichtkonservierte und variierende Regionen (auch  $\alpha$ -Helix C) sind in grau dargestellt. **B)** Topologie der humanen Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (NNMT, pdb 2iip). Abweichungen von der konservierten Kernstruktur sind in Rot ( $\alpha$ -Helices) und Blau (umgekehrte  $\beta$ -Haarnadel) dargestellt, Nicotinamid (NCA) in Cyan, S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) in Schwarz und das aktive Zentrum ist als grauer Schatten angedeutet. Abbildung verändert nach Martin *et al.*<sup>[77]</sup> und Peng *et al.*<sup>[110]</sup>

stelle der sonst in MTs verhältnismäßig konservierten  $\alpha$ -Helix C. Ebenso unkonventionell ist das Vorhandensein einer kleinen  $\alpha$ -Helix zwischen  $\beta$ 4 und  $\alpha$ D, zwei gegenläufig angeordnete  $\beta$ -Faltblätter zwischen  $\beta$ 5 und  $\alpha$ E, sowie ein  $\omega$ -Loop zwischen  $\beta$ 6 und  $\beta$ 7. Diese besonderen Modifikationen führen dazu, dass PNMT eine in MTs seltene, geschlossene Substratbindetasche aufweist. Zu den strukturellen Besonderheiten zählt darüber hinaus das Fehlen einer Modifikation des C-terminalen *Loops*.<sup>[111]</sup>

### 1.4.2 Mechanismus der enzymatischen Methylierung

Die enzymkatalysierte Methylierung kleiner Moleküle verläuft gewöhnlich nach einem bimolekularen Substitutions-Mechanismus ( $S_N2$ , Abb. 8A). Durch diesen  $S_N2$ -Mechanismus können MTs eine Vielfalt an Nucleophilen selektiv methylieren. Die Bandbreite dieser Nucleophile reicht von einfachen Halogenid-Ionen ( $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ )<sup>[112,113]</sup>, bis hin zu *O*-, *N*- und *C*-Heteroatomen und seltener *S*-, *Se*-, *Te*- und *As*-Nucleophile.

Die Acidität des *S*-Atoms von SAM ermöglicht den enzymatischen Methyltransfer. Ursache dieser hohen Acidität ist die zu übertragende Methylgruppe, die zu einer partiellen positiven Ladung am Schwefel des SAMs führt. Dadurch erhält die Methylgruppe einen elektrophilen Charakter und kann leicht von einem nucleophilen Heteroatom angegriffen werden.<sup>[112]</sup> Ausgelöst wird die Methylierung durch die räumliche Annäherung des Substrats an die zu übertragende Methylgruppe von SAM. In dieser reaktiven Konformation wird gewöhnlich ein Abstand von 3-5 Å zwischen der Methylgruppe von SAM, bzw. dem *S*-Atom von SAH und dem als nucleophil agierenden Heteroatom beobachtet (Abb. 8B).<sup>[110,114,115]</sup> So weist der ternäre



**Abb. 8: Mechanismus der enzymatischen Methylierung durch Methyltransferasen.** A) Bimolekularer Substitutionsmechanismus ( $S_N2$ ) von Methyltransferasen am Beispiel der Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (NNMT). B) Für die selektive Methylierung müssen das Nicotinamid (NCA) und *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) in einer reaktiven Konformation ausgerichtet werden. Abbildung verändert nach Peng *et al.*<sup>[110]</sup>

NNMT-SAH-NCA-Komplex Abstände des NCA-Stickstoffs zum SAH-Schwefelatom im Bereich von 3,5 bis 4,2 Å auf (Abb. 8B). Diese *N-S*-Abstände sind etwas größer als die Summe der Kohlenstoff-Schwefel- (Donor) und Kohlenstoff-Stickstoff-Einfachbindungen (Akzeptor) (1,8 bzw. 1,5 Å). Sie stimmen mit dem überein, was für ein  $S_N2$ -ähnliches Intermediat mit einer linearen Anordnung der Atome  $N_{(NCA-Nukleophil)}-C_{(Methyl)}-S_{(SAH-Abgangsgruppe)}$  zu erwarten wäre. Diese beobachteten Abstände sind zudem vergleichbar mit den in anderen Methyltransferasen gemessenen.<sup>[110]</sup> Loring *et al.* konnten zeigen, dass für den Reaktionsmechanismus zuerst SAM in das Enzym bindet, gefolgt von NCA. Nach einem Übergangszustand, in dem es zur Methylgruppenübertragung auf NCA kommt, wird zuerst Methylnicotinamid und danach SAH freigegeben.<sup>[116]</sup> Der Methyl donor SAM ist nach Adenosin triphosphat (ATP) das häufigste Substrat von Enzymen<sup>[117]</sup> und wird *in vivo* durch die Methioninadenosyltransferase (MAT) gebildet.<sup>[118]</sup> Der Großteil des in den Zellen vorhandenen SAMs (ca. 80 %) wird für Methylierungsreaktionen aufgewandt.<sup>[119]</sup> Das chirale Zentrum der Sulfoniumgruppe des Moleküls führt dazu, dass SAM in zwei verschiedenen Epimeren vorliegt.<sup>[120]</sup> Bis auf wenige Ausnahmen<sup>[121]</sup> ist nur das (*S,S*)-Diastereomer biologisch aktiv, für das (*R,S*)-Diastereomer ist sogar ein zumeist inhibitorischer Effekt gegenüber MTs beschrieben.<sup>[122]</sup> Für das hohe Übertragungspotential der Methylgruppe ist die Azidität der Thioethergruppe mit einem  $pK_a$ -Wert von -5,4 verantwortlich, die am Schwefel positiv geladenen ist.<sup>[123]</sup> Die Tatsache, dass die meisten methylierten Nucleophile deutlich schwächere Azide ausbilden führt in der Folge dazu, dass der Methyltransfer *in vivo* nahezu irreversibel ist. Diese hohe Reaktivität führt jedoch zu einer chemischen Instabilität von SAM. So beträgt die Halbwertszeit in wässrigen Lösungen bei pH 8,0 weniger als 16 h,<sup>[118]</sup> unter sauren Bedingungen wird unter anderem die Schwefel-Kohlenstoff-Bindung hydrolysiert,<sup>[124]</sup> wohingegen bei einem  $pH \leq 1,5$  sich der Zerfall deutlich reduziert.<sup>[125]</sup> Diese Instabilität, kombiniert mit hohen Kosten für SAM und das Fehlen eines effizienten Regenerationssystems führt dazu, dass Methyltransferasen in der Industrie bislang kaum eine Anwendung finden.

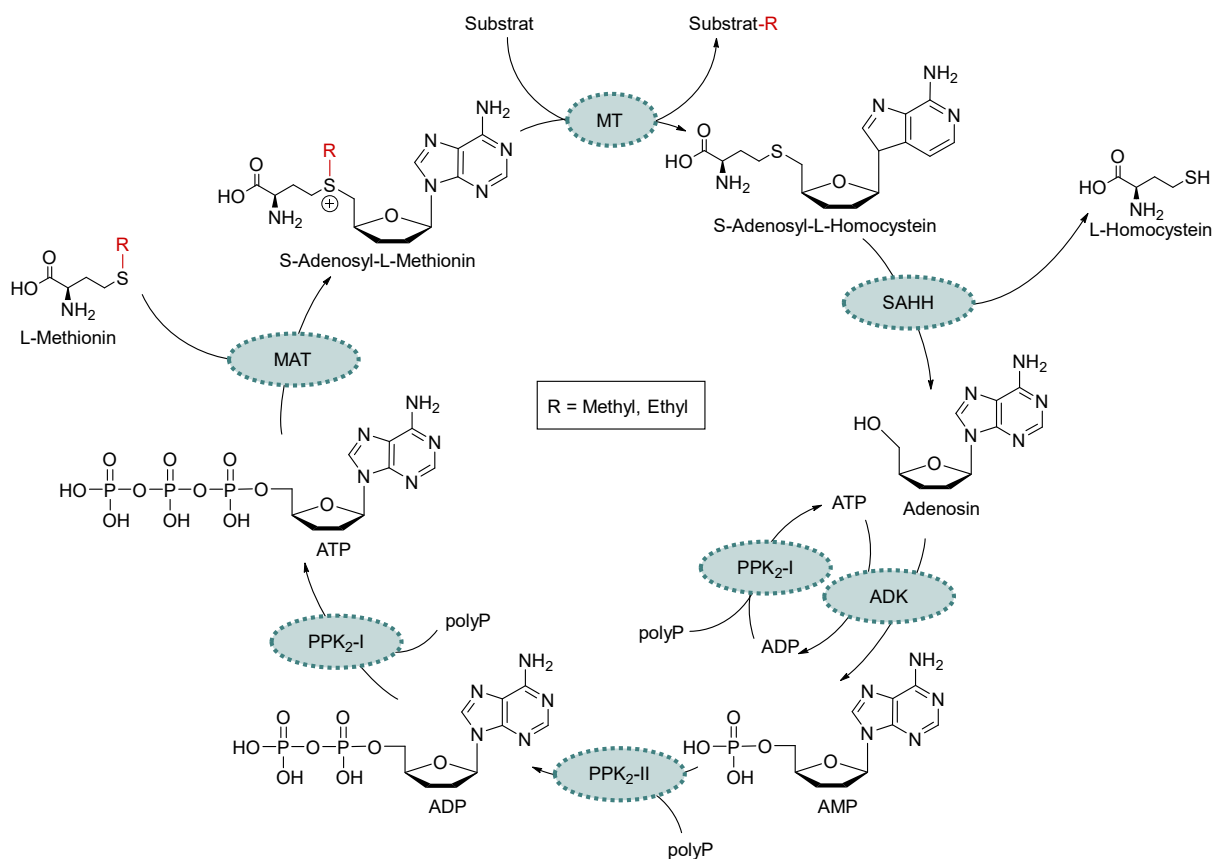
## 1.5 Regeneration von S-Adenosyl-L-Methionin

In der Natur regenerieren Organismen den Cofaktor SAM nach dem Methyltransfer durch eine MT in einem ersten Schritt durch die Hydrolyse von SAH mittels SAH-Hydrolase (SAHH) zu L-Homocystein und Adenosin. Adenosin wird daraufhin in drei Schritten von Kinasen zu Adenosin triphosphat (ATP) phosphoryliert, und L-Homocystein zu L-Methionin (Met) mithilfe von Methyltetrahydrofolat durch die Methioninsynthase remethyliert. Durch die finale



Kondensation von Methionin und ATP durch die Methioninadenosyltransferase (MAT) wird im letzten Schritt des Kreislaufs SAM erneut bereitgestellt. <sup>[118,123,126]</sup>

Mordhorst *et al.* gelang es 2017 erstmalig einen *in vitro*-Kreislauf für die Synthese von SAM darzustellen.<sup>[127]</sup> Die Regeneration des Cofaktors gelang in diesem Ansatz primär anhand der Regeneration von ATP durch die Adenosinkinase (ADK) aus *Saccharomyces cerevisiae*, sowie Polyphosphatkinasen I und II (PPK<sub>2</sub>-I und PPK<sub>2</sub>-II) aus *Acinetobacter johnsonii*, bzw. *Sinorhizobium meliloti* (Abb. 9) Als Methyldonor dient in stöchiometrischen Mengen die kostengünstigere und chemisch stabile Aminosäure L-Methionin. Anders als im natürlichen Vorbild wird L-Homocystein nicht wieder in den Kreislauf zurückgeführt. Mit diesem Prinzip gelang es den Cofaktor SAM in regioselektiven Methylierungsreaktionen mit bereits bekannten oder natürlichen Substraten von jeweils zwei verschiedenen NMTs und OMTs in bis zu 11 Zyklen zu regenerieren. Eine lineare Bereitstellungskaskade von SAM führte zu einer deutlich höheren Produktbildung. Ein Vergleich der beiden Regenerationsmodelle lässt vermuten, dass der limitierende Schritt der zyklischen Kaskade die Degradation von SAH durch SAHH dar-



**Abb. 9:** *In vitro* Regenerationssystem für S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) nach Mordhorst *et al.* L-Methionin dient als stöchiometrisches Substrat und wird durch die Methioninadenosyltransferase (MAT) zu SAM kondensiert. Nach erfolgtem Methyltransfer wird das Nebenprodukt S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) durch SAH-Hydrolase zu Adenosin und L-Homocystein hydrolysiert. Abbildung verändert nach Mordhorst *et al.*<sup>[127]</sup>

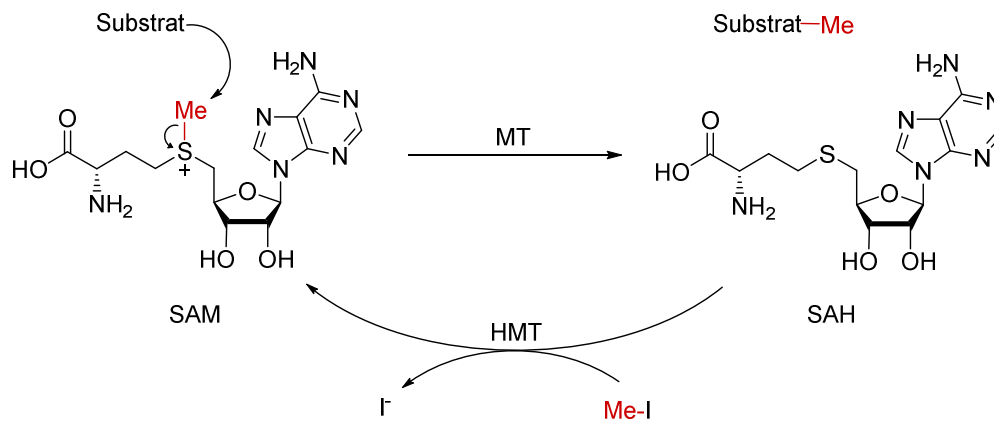


stellt.<sup>[127]</sup> Eine Anwendung des zyklischen Regenerationssystems, das aus insgesamt sechs Enzymen und 14 Metaboliten besteht, ist jedoch schwierig. Die Vielzahl der benötigten Enzyme schränkt die Reaktionsbedingungen und die Substratvielfalt ein. Darüber hinaus wäre es teuer in der Skalierung in industriell relevante Maßstäbe und nur komplex über Enzym-Engineering anzupassen.<sup>[123,127]</sup>

Jüngst wurde von Liao *et al.* ein großer Schritt in Richtung der *in vitro*-Regeneration von SAM erreicht. Unter der Verwendung einer Halogenidmethyltransferase (HMT) aus *Chloracidobacterium thermophilum* und einfachem Iodmethan als Methyl donor wird in diesem System SAM aus dem Methyltransferasenebenprodukt SAH regeneriert (Abb. 10).<sup>[123]</sup>

HMTs sind in verschiedenen Organismen aus allen Lebensbereichen wie Bakterien, Pilzen, Halophyten und Algen für die Bildung von Methylhalogeniden verantwortlich, indem sie die Methylgruppe von SAM auf Halogenid-Ionen wie Iodid ( $I^-$ ), Bromid ( $Br^-$ ) und Chlorid ( $Cl^-$ ) übertragen.<sup>[112]</sup> Die Enzymklasse der HMTs ist jedoch bislang kaum weitergehend erforscht. Bislang wurde erst in jüngerer Vergangenheit eine einzige Kristallstruktur einer HMT aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben.<sup>[112]</sup> Die bislang umfassendste Studie zu HMTs wurden durch Bayer *et al.* durchgeführt. In einer breit angelegten metagenomischen Untersuchung wurden aus der NCBI-Datenbank 89 mutmaßliche HMTs aus den Bereichen der Plantae, Fungi und Bacteria untersucht.<sup>[113]</sup> Alle beschriebenen Enzyme waren zu dem Methyltransfer von SAM auf  $I^-$ ,  $Br^-$  und  $Cl^-$  fähig. Die Triebkraft der intrazellulären Halogenmethanbildung ist vermutlich auf das Entfernen der Produkte aus dem Reaktionsgleichgewicht zurückzuführen.<sup>[123]</sup> Im Falle des gebildeten Halogenmethans geschieht dies durch Evaporation, während SAH degradiert wird.<sup>[112,123]</sup> Der genaue metabolische Nutzen ist bis *dato* jedoch nicht eindeutig festgestellt. Der gängigen Hypothese nach erfüllt die Bildung dieser Halogenmethane eine regulatorische Aufgabe als Methyltransporter.<sup>[112]</sup>

Ausgangspunkt des neuen SAM-Regenerationssystems war nun die Beobachtung, dass das Gleichgewicht der natürlichen Reaktion von HMTs mittels der überschüssigen Zugabe von Iodmethan und lediglich katalytischem Einsatz von SAH umkehrbar ist.<sup>[123]</sup> Lao *et al.* demonstrierten dieses Regenerationssystem anhand der Methylierung von Histidin zu Trimethylhistidin, einem Vorläufer des vulnerablen Ergothionins, durch die Histidin- $N_\alpha$ -Methyltransferase EgtD. HPLC-Analysen zeigten jedoch, dass die SAHH das katalytische SAH in den Reaktionen hydrolysiert, das zu einer Limitation der Produktivität des Systems führt. Durch die Produktion der Enzyme in einem SAHH-defizienten Stamm konnte schlussendlich ein Umsatz von 97 % mit bis zu 290 Regenerationszyklen erreicht werden.



**Abb. 10: SAM-Regenerationssystem durch Transmethylierung von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) zu S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) durch eine Halogenid-Methyltransferase (HMT) und Iodmethan (MeI).** MT, Methyltransferase. Abbildung verändert nach Liao *et al.*<sup>[123]</sup>

Nach weiterer Optimierung waren sogar 580 Regenerationszyklen möglich. Die Konzentration von SAH im stationären Zustand betrug dabei nur 2  $\mu\text{M}$  bei eingesetzten 50  $\mu\text{M}$ .<sup>[123]</sup> Dies ist von besonderem Vorteil, da wie bereits beschrieben, viele MTs an einer Produktinhibition durch SAH leiden. Eine nichtenzymatische Methylierung von SAH oder Histidin wurde von den Autoren nicht beobachtet. Die Anwendbarkeit des Systems wurde zusätzlich für die selektive Methylierung von verschiedenen Substraten in Kombination mit *O*-, *N*- und *C*-spezifischen MTs demonstriert. Die vier Enzyme Inositol-4*O*-MT, Putrescin-NMT,  $\alpha$ -Ketovaleriansäure-*C*<sub>3</sub>-MT (SgvM) und Coumarin-*C*<sub>8</sub>-MT (NovO) konnten in der Kaskade mit guten Aktivitäten ihre natürlichen Substrate methylieren.<sup>[123]</sup>

## 1.6 Anwendung von SAM-abhängigen Methyltransferasen in der Biokatalyse

Promiskuitive Methyltransferasen wurden bislang hauptsächlich in Kombination mit metabolischem Engineering zur Erzeugung von synthetisch relevanten Produkten in ihrer natürlichen Aminosäuresequenz eingesetzt. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion Geruchsstoffs Vanillin durch Catechol-*O*-MTs (COMT).<sup>[128,129]</sup> Auch die Synthese des Antibiotikums Novobiocin ist im Zusammenhang mit einem metabolischen Engineering beschrieben.<sup>[130]</sup> Die Überexpression der SAM-Synthase führte in einer weiteren Studie zu einer erhöhten Produktion des Antibiotikums Actinorhodin.<sup>[131]</sup> In einem engineereten *E. coli*-Stamm konnte die Synthese von Opiaten unter anderem durch den Einsatz der (R)-Reticulin-MT realisiert werden.<sup>[132]</sup> Die Expression einer Phenylalkylamin-MT in *E. coli* ermöglichte die Produktion von Adrenalin.<sup>[133]</sup> Auch die *in vivo*-Methylierung in *E. coli* von Coclaurin durch

die Coclaurin-NMT wurde bereits gezeigt.<sup>[134]</sup> Generell wird in diesen Biokatalysen die Produktivität durch ein Stamm-Engineering erhöht. Die Verwendung optimierter Methyltransferasen könnte hier neben einer Produktivitätssteigerung auch den Zugang zu neuen Substraten bieten.

## 1.7 Enzyme Engineering von Methyltransferasen

Ein Enzyme-Engineering von MTs wurde bislang häufig unter der Prämisse des Verständnisses der Reaktionsmechanismen von NMTs, der Bindung und Orientierung der natürlichen Substrate durchgeführt. Dennoch gibt es auch einige Veröffentlichungen, in denen verschiedene *O*-Methyltransferasen direkt modifiziert wurden, wenn auch häufig in einem enzymologischen und nicht unter einem biokatalytischen Aspekt. Bhuiya *et al.* demonstrierten 2010 die Mutagenese der Phenol-*O*-Methyltransferase zu einer neuen Monolignol-4-*O*-Methyltransferase, indem sie eine direkte Evolution und eine strukturbasierte iterative Sättigungsmutagenese anwandten<sup>[135]</sup>. Die finale Dreifachmutante erhöhte die Substrat-Bindfähigkeit des monomeren Lignin-Vorläufers Monolignol, die katalytische Effizienz und führte zu einer *para*-selektiven Methylierung. In einer weiteren Arbeit mit Hybrid-Espen führte die Expression dieses Enzyms zu einer um 62 % erhöhten Freisetzung von Einfachzuckern und in Folge zu einer um 49 % erhöhten Ausbeute an Ethanol für Biotreibstoffe nach enzymatischer Digestion und Fermentation in Hefe.<sup>[136]</sup> Joe *et al.* konnten 2010 in einem weiteren Beispiel anhand einer fehleranfälligen Polymerase-Kettenreaktion eine neue Regioselektivität einer Flavonoid-*O*-Methyltransferase aus *Populus deltoids* erzeugen.<sup>[137]</sup> Die Mutante trug hierbei eine einzige Mutation und methylierte an 3,7-*O*-Dimethylkaempferol bzw. 3,7-*O*-Dimethylquercetin die 3-Hydroxygruppe zusätzlich zur 7-Hydroxygruppe, jedoch nur im  $\mu$ -molaren Maßstab.

Eine der am häufigsten untersuchten MT ist die COMT. In einer rein enzymologischen Studie und mit rationalen Mutationen konnten Zhang *et al.* eine Änderung der Regioselektivität bei der Methylierung von Dopamin demonstrieren.<sup>[138]</sup> Trauzettel konnte 2017 in seiner Arbeit anhand einer fokussierten Mutantenbibliothek in den beweglichen Loopregionen der Phenylpropanoid und Flavonoid-*O*-Methyltransferase (PFOMT) eine Beeinflussung der Regioselektivität und durch eine Vergrößerung der aktiven Tasche mittels einer rationalen Mutagenesestrategie die Übertragung von Alkylgruppen bis um das Dreifache erhöhen.<sup>[139]</sup> Jüngst konnten Herbert *et al.* zwei Enzyme, die Catechol-*O*-Methyltransferase und die Coclaurin-*N*-Methyltransferase, durch ein strukturbasiertes, rationales Enzym-Engineering die Akzeptanz eines natürlichen SAM-Analogs, Carboxy-*S*-Adenosyl-*L*-Ethionin, verbessern.

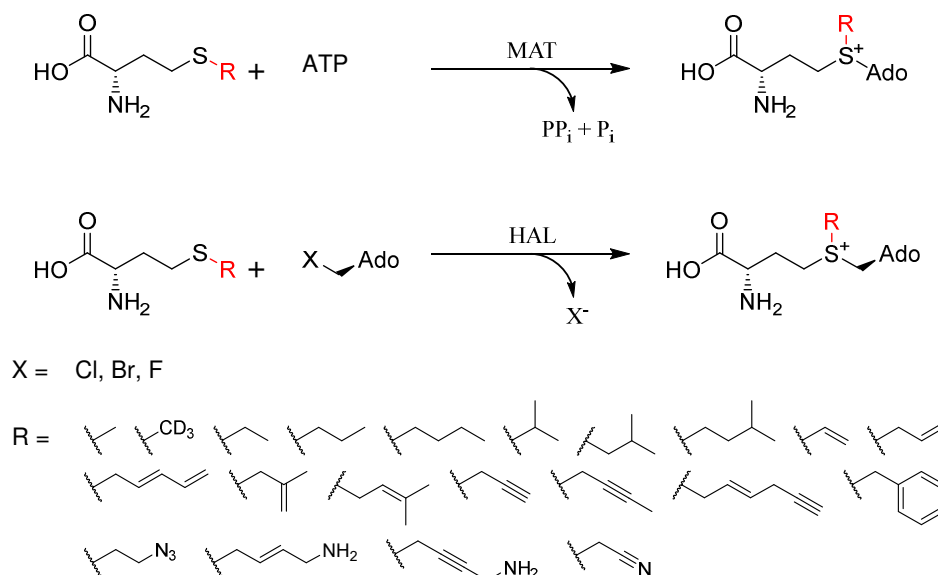
Durch eine einzelne Mutation in der Coclaurin-*N*-Methyltransferase konnte in einer bienzymatischen Kaskade mit dem Carboxy-*S*-Adenosyl-*L*-Ethioninsynthetisierenden Enzym CmoA-MT und Tetrahydroisoquinolin als Substrat die Aktivität um 7 % im Vergleich zum WT bei einem Enantiomerenüberschuss von 95 % gesteigert werden. Für die Catechol-*O*-Methyltransferase konnte mit einer Einzelmutation zwar nicht die Gesamtaktivität, jedoch die Selektivität erhöht werden. Eine daraus kombinierte Doppelmutation führte zu einer erhöhten Aktivität bei gesteigerter Selektivität.<sup>[140]</sup>

Während all diese Beispiele meist einer rationalen Vorgehensweise folgen oder den Weg der gerichteten Evolution beschreiten, bietet das Feld der bioinformatisch gestützten Enzym-Modifikation und -Entwicklung einen neuartigen Ansatz. Da die klassische gerichtete Evolution (iterativ oder auch nicht-iterativ) einem Pfad lokaler Suchen folgt, ist das Ergebnis dieses Weges häufig „nur“ ein lokales Maximum, das stark von dem gewählten Startpunkt abhängig ist. Ein Maximum, das durch ein lokales Minimum vom Startpunkt getrennt ist, würde bei solch einem Vorgehen nicht gefunden werden.<sup>[141,142]</sup> Auch epistatische Effekte, die sich aus der Kombination mehrerer Aminosäuren ergeben, die alleine jedoch nicht vorteilhaft sind,<sup>[143–148]</sup> werden in klassischen Ansätzen kaum gefunden. In der Natur, genauso wie in klassischem Enzym-Engineering, wird der Erfolg der Mutagenese hauptsächlich durch die Proteinstabilität limitiert. Funktionsverbesserte Mutationen neigen dazu, die Stabilität des Enzyms zu beeinträchtigen,<sup>[149–151]</sup> sodass die Akkumulation solcher Mutationen nur bis zu einer Schwelle stattfinden kann, ab der zusätzliche Mutationen nicht länger toleriert werden.<sup>[152,153]</sup> Um große Aktivitäts- und Selektivitätssteigerungen zu erreichen, sind jedoch in der Regel durchschnittlich 10 Mutationen nötig.<sup>[154,155]</sup> Für deren Identifikation ist ein enormer Aufwand in Hochdurchsatz- und Ultra-Hochdurchsatz-Screenings (meist >12 Evolutionsrunden) notwendig.<sup>[154–158]</sup> Diese Hochdurchsatz-Methoden sind jedoch nicht für alle Engineering-Ziele geeignet. So können oft nur Gesamtaktivitäten verfolgt werden, wohingegen innerhalb des Screenings häufig keine Aussage zur Selektivität der Reaktion getroffen werden kann. Zusätzlich verhindern besonders die Inhibition durch SAH und ein fehlendes *in vitro*-Regenerationssystem des teuren und instabilen Cofaktors SAM bislang den breiten Einsatz von Methyltransferasen.<sup>[74,159]</sup>

## 1.8 Nicht-natürliche *S*-Adenosyl-*L*-Methionin-Analoga

In jüngster Zeit wurden insbesondere bei der Nutzung von MTs erhebliche Fortschritte in Richtung enzymatischer Alkylierungschemie mit leicht zugänglichen Alkylierungsreagenzien

erzielt. MTs verwenden das Cosubstrat *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) oder ein natürliches carboxyliertes Analogon<sup>[140]</sup> in hochselektiven Methylierungs- und Carboxymethylierungsreaktionen. MTs akzeptieren auch nicht-natürliche SAM-Analoga (NSAs) als Substrate. Auf diese Weise wurde bereits eine Vielzahl von Alkylgruppen hochselektiv übertragen.<sup>[74,118,160,161]</sup> Dabei zeigte sich, dass die Aktivität der MTs drastisch sank, je raumfordernder die Modifikation der NSAs wurde.<sup>[162]</sup> Diese NSAs werden vorzugsweise chemoenzymatisch mit MAT aus ATP und chemisch synthetisierten MET-Analoga produziert (Abb. 11). Singh *et al.* identifizierten aus 44 verschiedenen MATs die  $\alpha$ -Untereinheit der humanen MAT und eine MAT aus *Sulfolobus solfataricus* als besonders promiskuitive Enzyme.<sup>[126]</sup> Ebenso zur chemoenzymatischen Synthese von NSAs werden Halogenasen (HAL) wie zum Beispiel Sall oder FDAS eingesetzt (Abb. 11).<sup>[118,122]</sup> Wie mit MAT werden hierbei ebenfalls MET-Analoga chemisch synthetisiert, die jedoch enzymatisch anstelle von ATP mit 5-Chloro- oder 5-Fluoro-5-Deoxyadenosin (CIDA und FDA) mit dem entsprechenden Halogenid als Abgangsgruppe fusioniert werden.<sup>[122]</sup> Das Reaktionsgleichgewicht liegt *in vivo* zwar auf Seiten der Degradation von SAM, kann jedoch durch Überschüsse von MET und FDA, bzw. CIDA zu Seiten von SAM oder der NSAs verschoben werden. Auf diese Weise wurden schon verschiedene, teilweise funktionalisierte Alkylgruppen auf eine Bandbreite von MT-Substraten übertragen. Die Verwendung von MET-Analoga hat im Vergleich zur direkten chemischen Synthese von NSAs den Vorteil, dass sie



**Abb. 11: Chemoenzymatische Verfahren zur Synthese von nichtnatürlichen *S*-Adenosyl-L-Methionin-Analoga (NSAs) aus chemisch synthetisierten Methionin-Analoga mittels Methioninadenosyltransferasen (MAT) und Halogenasen (HAL).** Als R bezeichnet sind einige der bereits erfolgreich auf diesen Wegen synthetisierte und durch Methyltransferasen übertragene NSAs abgebildet. Abbildung verändert nach Huber *et al.*<sup>[116]</sup>

häufig stabiler sind und die NSAs durch MAT in der biologisch verwendbaren Konformation gebildet werden, während die rein chemische Synthese von NSAs zu einem Gemisch der beiden möglichen Epimere führt.<sup>[118,163]</sup> Gekoppelt an eine Methyltransferasereaktion verliert die chemische Instabilität der NSAs zudem an Bedeutung.<sup>[118]</sup> Für beide Enzymfamilien, MATs und HALs, beschreiben inzwischen etliche Studien die Verbesserung der Aktivität hinsichtlich der Synthese von NSAs durch gerichtete Evolution, sowie die Reduktion von Produktinhibitionen durch die NSAs.<sup>[126,163,164]</sup> Die aufwändige Synthese der Met-Analoga verkompliziert diese klassischen Synthesestrategien von NSAs jedoch sehr, führt durch die komplexen Abgangsgruppen zu einer schlechten Atomökonomie der Gesamtreaktionen und schränkt somit ihre Anwendungen ein.<sup>[74,118,165]</sup>

Durch die Kombination der enzymatischen Alkylierung mit der Verwendung einfacher und leicht verfügbarer Alkyldonoren könnten Lösungen für viele Herausforderungen der organischen Chemie entwickelt werden.

Das unlängst von Liao *et al.* veröffentlichte SAM-Regenerationssystem (siehe Kapitel 3.5 & Abb. 10) trägt das Potential der enzymatischen Alkylierung anhand einfacher Halogenalkane. Das System wurde bislang von den Autoren jedoch ausschließlich an der Methylierung von natürlichen Substraten unter der Verwendung von Methyl-Analoga von Iodmethan (Iodmethan, Iod-Mono-Fluor-Methan<sup>[166]</sup>, deuteriertes Iodmethan) gezeigt.<sup>[167-169]</sup> Daher gibt es bislang nur wenig Hinweise darauf, dass dieses System über Methylierungsreaktionen hinaus angewandt werden kann. Jedoch birgt es nicht zuletzt aufgrund der guten Atomökonomie durch den Einsatz einfachster Iodmethane ein enormes Potential für die erweiternde Übertragung von verschiedenen Halogenalkanen.

## 1.9 Potentielle *N*-Methyltransferasen für die Methylierung von Pyrazolen

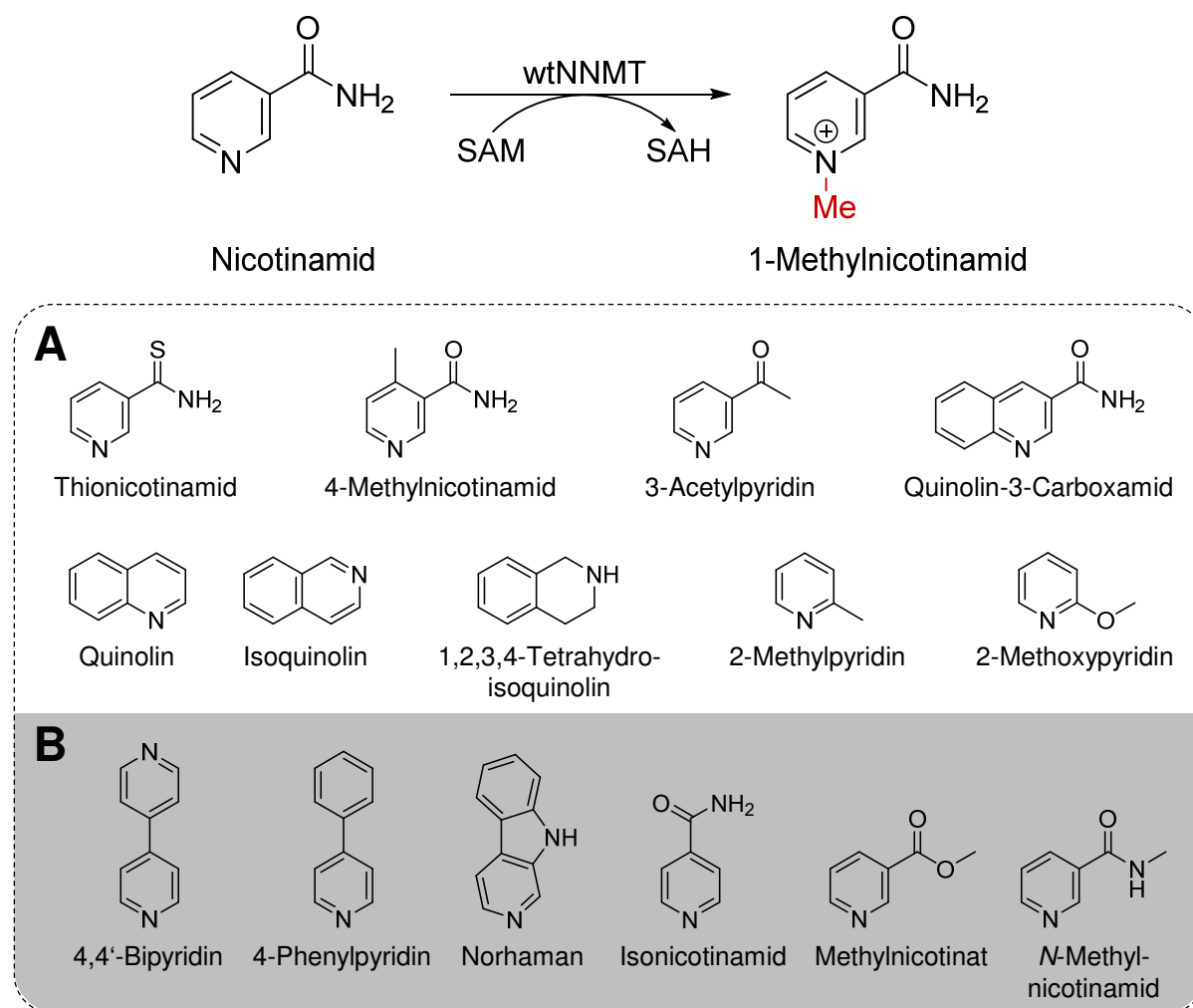
Aus der Gruppe der MTs, die niedermolekulare Moleküle methylieren, sind SAM-abhängige *N*-Methyltransferasen (NMTs) am interessantesten für eine selektive Methylierung von Pyrazolen. NMTs unterscheiden sich anhand der Eigenschaften des Stickstoffs, auf den die Methylgruppe übertragen wird. Zum einen werden durch NMTs aliphatische Stickstoffe methyliert, während im Gegensatz dazu auch heteroaromatische Stickstoffe methyliert werden können. Viele dieser Enzyme sind jedoch aufgrund ihrer Rollen in der Regulation und Signaltransduktion sehr substratspezifisch. Auch bei der Methylierung von kleinen Molekülen wie zyklischen Peptiden<sup>[170]</sup> und der Synthese von Koffein<sup>[171]</sup> werden nur bestimmte Substratstrukturen akzeptiert. Die Substrate dieser Enzyme werden im aktiven Zentrum durch

polare Wechselwirkungen, insbesondere durch Wasserstoffbrückenbindungen orientiert.<sup>[172]</sup> Diese bedingen exakte Winkel und Entfernungen zwischen Substrat und Aminosäure-Residuen des Enzyms, sodass häufig nur Substrate mit demselben Interaktions-Motiv umgesetzt werden können. Im Allgemeinen zeigen viele promiskuitive Enzyme hydrophobe Enzym-Substrat-Interaktionen.<sup>[173]</sup> Somit stellen Enzyme, die bereits unpolare oder unpolare-substituierte Substrate akzeptieren einen guten Startpunkt für die Erweiterung der Substratspezifität dar. Einige literaturbekannte natürliche Enzyme sind bereits in der Lage *N*-Heterozyklen, wie z. B. Alkaloide, durch eine selektive Methylierung zu modifizieren.

Unter diesen Enzymen finden sich beispielsweise die Coclaurin-*N*-Methyltransferase<sup>[134,174–176]</sup>, die Reticulin-*N*-Methyltransferase<sup>[177,178]</sup>, die Kaffein-Synthase(n)<sup>[171,179–181]</sup> und die Anthranilat-*N*-Methyltransferase.<sup>[182]</sup> Daneben ist die Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (NNMT) ein gut untersuchtes Enzym. Das monomere, cytoplasmatische Enzym überträgt die Methylgruppe von SAM auf Nicotinamid (NCA) und produziert dabei 1-Methylnicotinamid, sowie als Nebenprodukt SAH (Abb. 12).<sup>[183]</sup> Für die NNMT sind auch Reaktionen mit einem erweiterten Substratspektrum beschrieben. So kann z. B. das  $\beta$ -Carbolin Norharman am *N*<sub>2</sub> zu 2-Methylnorharman methyliert werden.<sup>[184]</sup> Das umfassendste Substratspektrum der NNMT beschrieben 2016 Van Haren und Kollegen im Rahmen einer Assay-Entwicklung mit dem Ziel des verbesserten Testens von potentiellen Inhibitoren.<sup>[185]</sup> Die Autoren konnten bei 17 von 27 getesteten Substraten eine Methylierungsaktivität der NNMT nachweisen (Abb. 12A & B). Die untersuchten Moleküle sind hierbei bis auf wenige Ausnahmen strukturell dem natürlichen Substrat Nicotinamid nahe und büßten an Aktivität ein, je weiter sie sich von dieser Grundstruktur entfernten. Peng *et al.* untersuchten 2011 mit gezielten AA-Austauschen den Einfluss auf die Enzymaktivität von vier Aminosäuren (Y20, D197, S201, S213), die mit dem natürlichen Substrat NCA im aktiven Zentrum des Enzyms interagieren.<sup>[110]</sup> Die Mutation Y20A inaktivierte das Enzym fast gänzlich (0,6 % der Wildtypaktivität), ebenso wie D197A mit fast 98 % Aktivitätsverlust. Y20F reduzierte die Aktivität nur um ca. 50 %, die Mutagenese von S201A und S213A beeinträchtigte die Katalyse von NCA nicht.

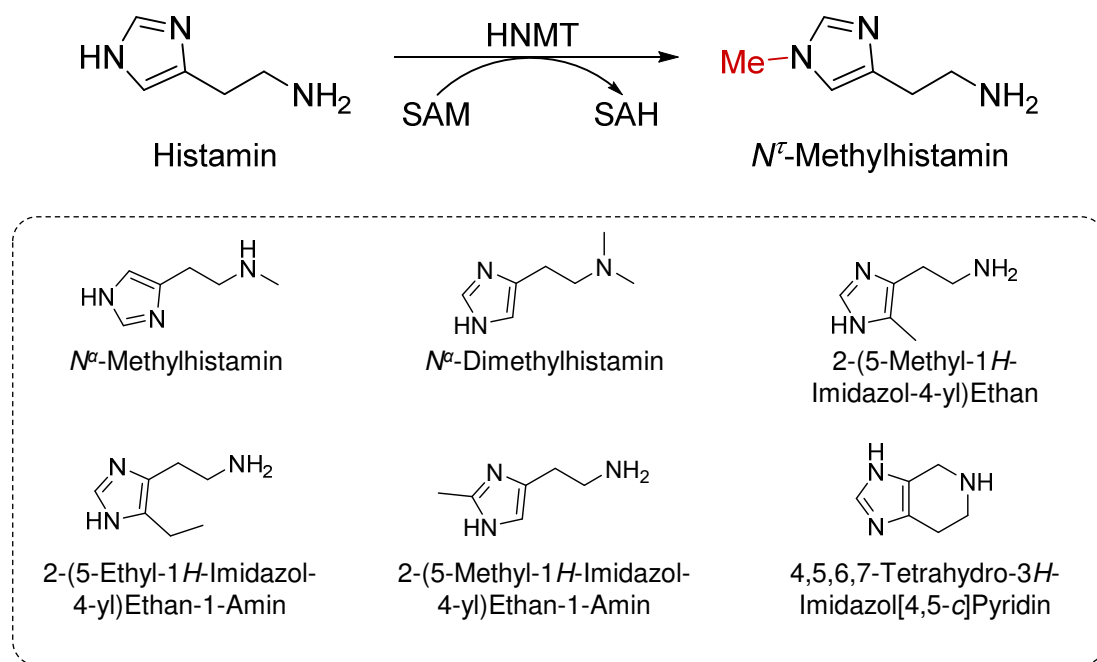
Ein weiterer potentieller Kandidat für die Methylierung von Pyrazolen ist die Histamin-*N*-Methyltransferase (HNMT). Das monomere, cytoplasmatische Enzym (292 AA, 33 kDa) katalysiert die Methylierung von Histamin zu *N*<sup>ε</sup>-Methylhistamin (Abb. 13).<sup>[100,186,187]</sup> Die Histamin-Bindetasche besteht hauptsächlich aus 14 hydrophoben, aromatischen AA<sup>[101,188]</sup> und ist daher potentiell in der Lage promiskuitive Aktivität aufzuweisen. Die bisherigen Untersuchungen von HNMT sind hauptsächlich pharmazeutisch motiviert, sei es zur

Wirkstofffindung<sup>[101,187,189–192]</sup> oder zum Studium der Auswirkungen natürlich vorkommender Mutationen in diversen Krankheitsbildern<sup>[99,100,188,193]</sup>. 1980 und 1982 wurden jedoch von Barth *et al.*<sup>[194]</sup> und Dent *et al.*<sup>[195]</sup> auch zwei enzymologische Studien zur Substrattoleranz von HNMT durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass das Enzym zwar einige Modifikationen in Form von Ethyl- und Methylgruppen am Imidazolring und am aliphatischen Stickstoff der Seitenkette des Histamins akzeptiert, jedoch wurden darüber hinaus keine von der Imidazolstruktur abweichenden aktiven Substrate beschrieben (Abb. 13). Neben den Kaffein-Synthasen ist die HNMT jedoch das einzige Enzym, das bereits einen Heterozyklus mit zwei Ringstickstoffen methylieren kann.



**Abb. 12: Reaktion und bekanntes Substratspektrum der humanen Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT).** (Oben) Natürliche Reaktion von Nicotinamid zu 1-Methylnicotinamid unter Verbrauch von *S*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM) und Bildung von *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein (SAH) durch wtNNMT. (Unten) Bekanntes Substratspektrum der wtNNMT. Während die Moleküle in **A** mit guter Aktivität umgesetzt werden, können die Substrate in **B** nur in geringem Maße methyliert werden. Abbildung verändert nach Van Haren *et al.*<sup>[185]</sup>

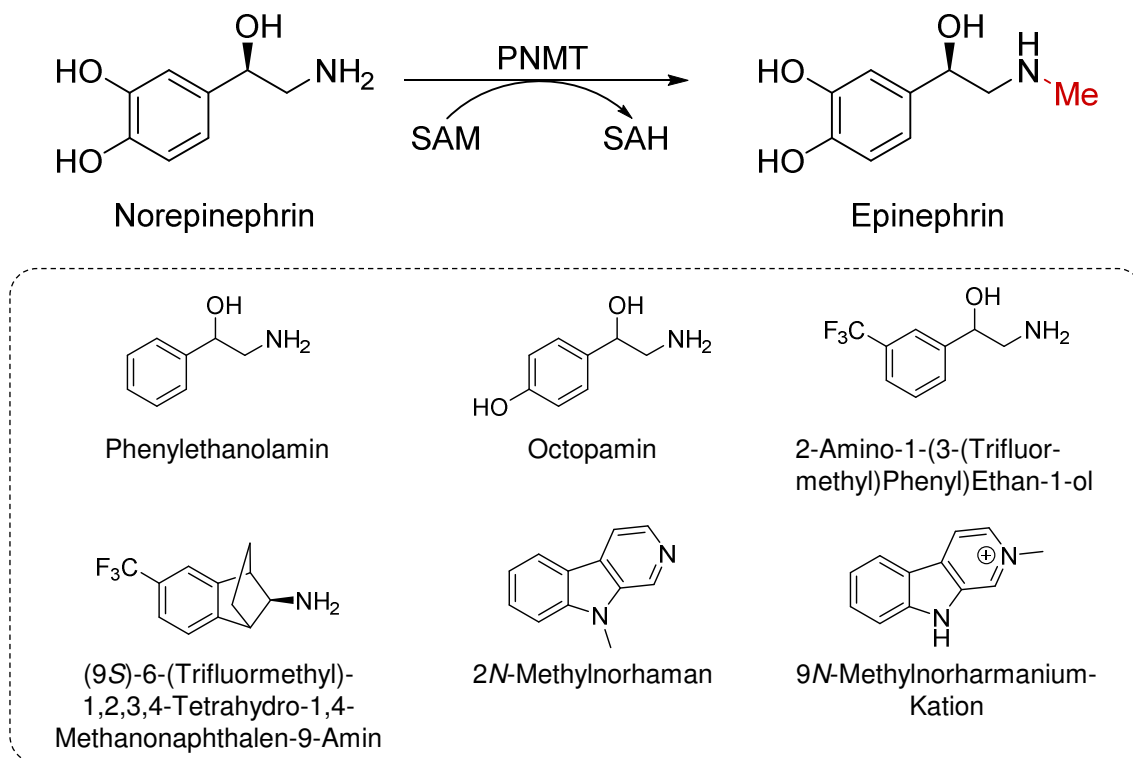




**Abb. 13: Reaktion und bekanntes Substratspektrum der Histamin-N-Methyltransferase (HNMT).** Natürliche Reaktion (oben) von Histamin zu  $N^\epsilon$ -Methylhistamin unter Verbrauch von *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und Bildung von *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) und bekanntes Substratspektrum (unten) der HNMT. Abbildung verändert nach Barth *et al.*<sup>[194]</sup>

Ein dritter Kandidat ist die 30 kDa schwere und 282 AA große PNMT aus *Homo sapiens*. PNMT gehört zu den NMTs, die an aliphatischen Stickstoffen methylieren, und katalysiert die Methylübertragung von SAM auf Norepinephrin zu Epinephrin (Abb. 14)<sup>[196,197]</sup>. 1996 wurde PNMT erstmalig von Caine *et al.* in *E. coli* exprimiert.<sup>[198]</sup> Für PNMT ist bereits Aktivität mit einer Reihe an unpolaren Substraten gezeigt (Abb. 14),<sup>[199]</sup> was prinzipiell auf ein promiskuitives Enzym schließen lässt. Viele dieser Substrate sind strukturell nahe am natürlichen Substrat und es zeigt sich, dass kleine Änderungen zur Inhibition des Enzyms führen.<sup>[200]</sup> Dennoch ist für PNMT auch Aktivität mit den  $\beta$ -Carbolinen 2*N*-Methylnorharman und dem 9*N*-Methyl-norharmanium-Kation beschrieben, das zeigt, dass auch *N*-heterozyklische Substrate im aktiven Zentrum koordiniert werden können.<sup>[201]</sup>

Ansher und Jakoby zeigten 1986 in einer Studie an Leberextrakten aus Kaninchen unter anderem einen Methyltransfer auf die Pyrazolstammstruktur 1-*H*-Pyrazol durch zwei Methyltransferasen, die sie im Folgenden als Amin-*N*-Methyltransferase A und Amin-*N*-Methyltransferase B bezeichneten. Nach mehreren Stufen der Proteinchromatographie und Filtration zur Konzentrierung der Enzyme beschrieben die Autoren das Molekulargewicht für beide Enzyme als 30 kDa und zeigten, dass sich beide Transferasen lediglich in ihrem isoelektrischen Punkt unterscheiden.<sup>[202]</sup> Crooks *et al.* nutzten 1988 ebenfalls diese beiden Enzyme, frisch aus Kaninchen extrahiert, für die Bildung quarternärer Amine durch die Methyl-

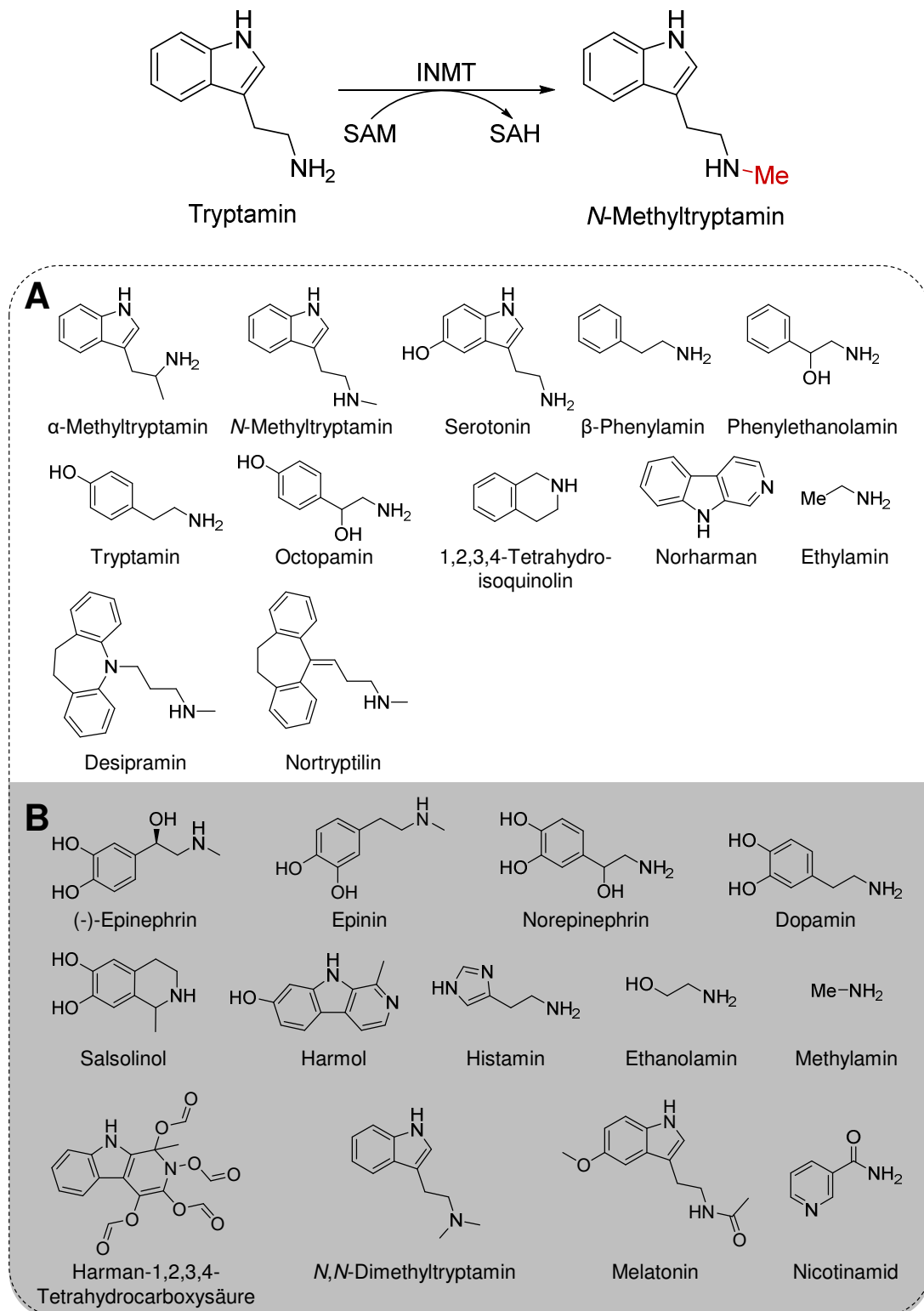


**Abb. 14: Reaktion und bekanntes Substratspektrum der Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT).** Natürliche Reaktion (oben) von Norepinephrin zu N-Methylepinephrin unter Verbrauch von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) und Bildung von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) und bekanntes Substratspektrum (unten). Abbildung verändert nach Drinkwater *et al.*<sup>[199]</sup> und Gearhart *et al.*<sup>[201]</sup>

ierung von Azoheterozyklen, darunter wiederum 1-*H*-Pyrazol.<sup>[203]</sup> Eine Charakterisierung hinsichtlich der Struktur, oder wichtiger, der Sequenzen dieser Transferasen erfolgte jedoch in keiner der beiden Studien. Die Arbeiten zu diesen Enzymen wurden nicht weitergeführt.

Ein weiteres vielversprechendes Enzym ist daher die *Oryctolagus cuniculus* Indolethylamin-N-Methyltransferase (INMT).<sup>[202]</sup> INMT methyliert Tryptamin zu N-Methyltryptamin (Abb. 15) und in einem zweiten Methylierungsschritt zur psychoaktiven Substanz N,N-Dimethyltryptamin.<sup>[204]</sup> Lange blieb die Frage ungeklärt, ob die Methylierung von Tryptamin durch ein einzelnes Enzym mit einem erweiterten Substratspektrum oder durch eine Reihe von verwandten Enzymen erfolgt. Thompson *et al.* klonierten die INMT 1998 in COS-1 Zellen, um die vormals beschriebenen Aktivitäten erstmalig mit isoliertem Enzym zu studieren.<sup>[205]</sup> In ihrer Studie untersuchten die Autoren 26 Substrate und konnten für 13 dieser Substrate gut messbare Methylierungsaktivität (Abb. 15A) beobachten. Die Aktivität innerhalb dieser Substratgruppe sank jedoch drastisch, wenn das Indolmotiv am Benzylring modifiziert wurde (-89 %) oder den Substraten fehlte (>95 % Aktivitätsverlust verglichen mit der natürlichen Reaktion). Die restlichen Substrate konnten immerhin noch mit einer relativen Aktivität von <0,5 % der natürlichen Methylierung von Tryptamin umgesetzt werden (Abb. 15B). Nahezu alle der unter-

suchten Moleküle enthielten mindestens einen Aromaten oder einen *N*-Heterozyklus. Darunter auch Norharman mit 58 % normierter Aktivität, Histamin und *N*<sub>α</sub>-Methylhistamin<sup>[206]</sup>, sowie



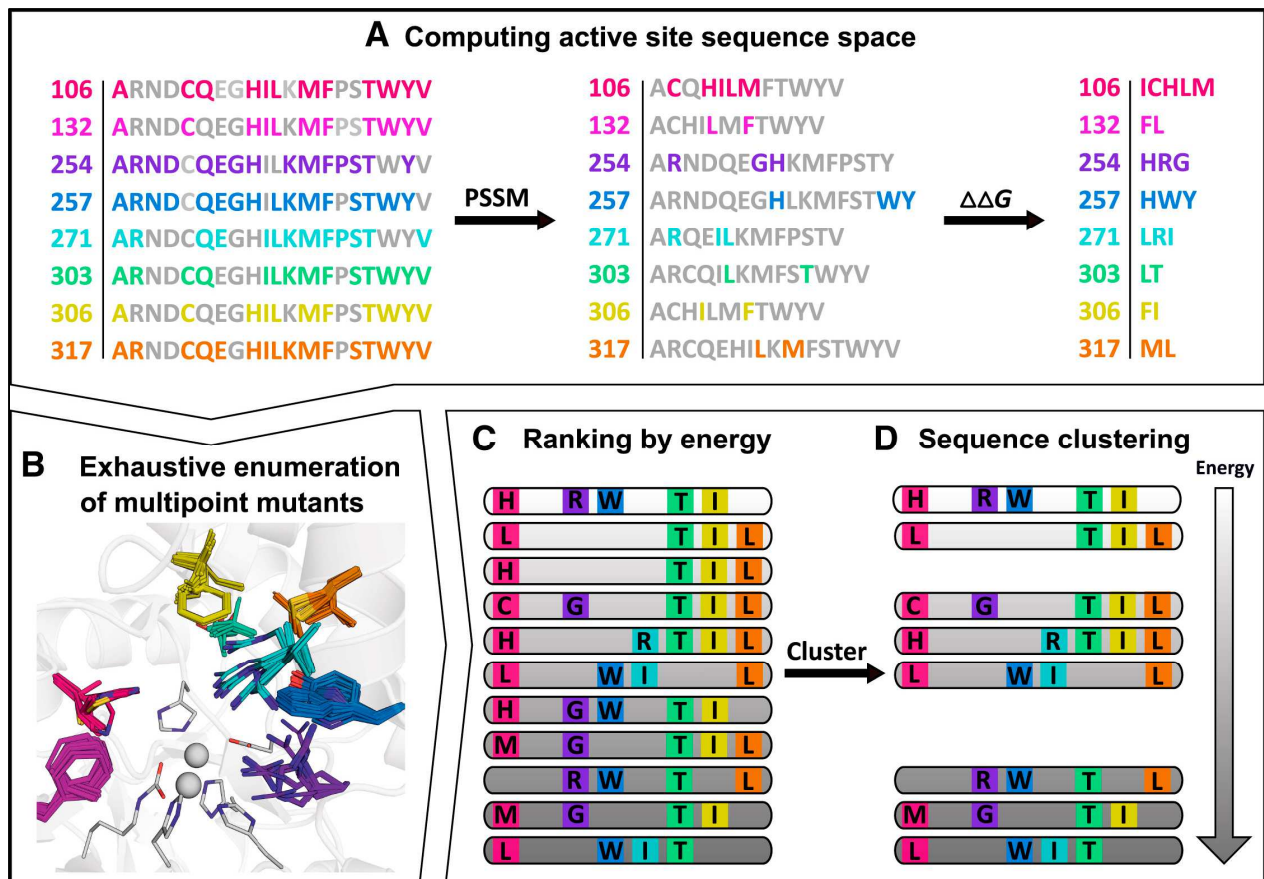
**Abb. 15: Reaktion und bekanntes Substratspektrum der Indolethylamin-*N*-Methyltransferase (INMT).** Natürliche Reaktion (oben) von Tryptamin zu *N*-Methyltryptamin unter Verbrauch von *S*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM) und Bildung von *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein (SAH) und bekanntes Substratspektrum (unten). Die Substrate in **A** werden mit hoher Aktivität methyliert, die Produkte der Substrate in **B** konnten nur noch in Spuren nachgewiesen werden. Abbildung verändert nach Thompson *et al.*<sup>[205]</sup>

Nicotinamid mit geringer Methylierung. Auch sehr kleine Moleküle wie Ethylamin oder Ethanolamin zählen zu den durch INMT methylierbaren Substraten. Trotz einer Sequenzidentität von 88 % zur humanen INMT zeigte die *Oryctolagus cuniculus* INMT deutlich geringere  $K_M$ -Werte für Indolamine.<sup>[205,207]</sup> In einer Fortführung der Studie von 1988 im Jahr 2001 erstellten Thompson *et al.* ein Homologiemodell der INMT. Mithilfe der gewonnenen Strukturinformationen und durch ortsgerichtete Mutagenese studierten die Autoren die Aktivität der humanen und der *Oryctolagus cuniculus* INMT.<sup>[208]</sup> Für die in den Studien beschriebenen Substrate, die deutlich von der Kernstruktur der Indolamine abweichen, finden sich jedoch keine Aussagen in Bezug auf die Regio- bzw. Chemo-selektivitäten dieser Reaktionen. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand wurde INMT zudem noch nicht in einem Mikroorganismus wie *E. coli* exprimiert.

## 1.10 Computergestützte Methoden zum Erstellen von Variantenbibliotheken

Computergestützte Verfahren zur Enzym-Modifikation basierten in der Vergangenheit darauf verbessernde Punktmutationen oder fokussierte Bibliotheken zu erstellen.<sup>[209–214]</sup> Jedoch werden häufig nur geringe Aktivitätssteigerungen und geringe katalytische Effizienzen erreicht.<sup>[215–220]</sup> In jüngster Vergangenheit wurden jedoch computergestützte Algorithmen entwickelt, die es ermöglichen, mit gleichzeitigen, multiplen Mutationen eine hohe Diversität an Reaktivitäten zu schaffen. Einer dieser Algorithmen, genannt FuncLib<sup>[1]</sup>, wurde 2018 von Khersonsky *et al.* entwickelt und kann effizient den theoretisch tolerierten Sequenzraum<sup>[221]</sup> des aktiven Zentrums eines Enzymes berechnen (Abb. 16). Ziel dieser automatisierten Enzym-Designmethode ist es, durch die Kombination phylogenetischer und energetischer Berechnungen eine kleine Mutantenbibliothek mit stabilen und funktionell diversen Varianten zu erstellen, die im aktiven Zentrum multiple Mutationen aufweisen.

Zu Beginn wird dafür der Sequenzraum mit von der Natur tolerierten Varianten im aktiven Zentrum definiert. Hierzu werden aus einer Homologiesuche alle in homologen Sequenzen vorkommenden Aminosäuren der ausgewählten Aminosäurepositionen extrahiert. In einem nächsten Schritt werden alle Punktmutationen eliminiert, die das Wildtyp-Enzym gemäß der atomistischen Modellierung durch Rosetta substanziell destabilisieren. Dieser Schritt verringert bereits drastisch die Anzahl an möglichen Kombinationen von multiplen Mutationen. Aus diesem vorgefilterten Sequenzraum werden alle möglichen multiplen Mutationen im aktiven Zentrum des Enzymes in Rosetta modelliert. Um die Diversität zu erhöhen wird eine Mutationsfrequenz von 3-5 Mutationen relativ zum Wildtyp-Enzym definiert. Die Rosetta-



**Abb. 16: Flussdiagramm zur Veranschaulichung der wichtigsten Schritte des FuncLib-Algorithmus zum Design einer Mutantenbibliothek.** In diesem Beispiel wird eine Bibliothek Phosphotriesterase-Enzymen ausgehend von einer bakteriellen Phosphotriesterase (PTE; PDB: 1HZY) erstellt. (A) Aminosäurepositionen im aktiven Zentrum werden für das Design ausgewählt und an jeder Position wird der Sequenzraum durch evolutionäre Erhaltungsanalyse (positionsspezifische *Scoring*-Matrix [PSSM]) und Stabilitätsberechnungen von Einpunktmutationen ( $\Delta\Delta G$ ) eingegrenzt. (B) Alle möglichen Varianten mit mehrfachen Mutationen werden mit Rosetta berechnet. Die Designs werden nach ihrer berechneten Faltungsenthalpie geordnet (C), und anschließend geclustert, um ein kleines Repertoire an verschiedenen, energieminierten Designs für experimentelle Untersuchungen zu erhalten (D). Abbildung übernommen von Khersonsky *et al.*<sup>[1]</sup>

Kalkulationen umfassen die Energieminimierung des Peptidrückgrates und der Aminosäureseitenketten. Das ermöglicht radikale Mutationen wie von kleinen zu großen Aminosäureseitenketten. Die berechneten multiplen Varianten werden nach ihrer vorhergesagten Stabilität sortiert und für eine weitere Diversifizierung so zusammengefasst (geclustert), dass alle Designs mit weniger als z. B. 2 Mutationen Unterschied zu anderen Varianten und auch zum Wildtyp eliminiert werden.

Dieses Design-Werkzeug wurde von den Autoren anhand einer Phosphotriesterase untersucht, das hinsichtlich der Hydrolyse von Nervengiften wie VX, Soman und Cyclosarin optimiert werden sollte. Aus mehreren hundert Entwürfen, für die alle eine stabilere Faltung als die des Wildtyps berechnet wurde, wählten die Autoren die besten 49 für weitere Untersuchungen. In dieser kleinen Mutantenbibliothek finden sich einige dutzend Varianten, die mit nur 3-6

Mutationen im aktiven Zentrum, 10-4000-fache Aktivitätssteigerungen und Aktivitäten für eine Bandbreite an Substraten aufwiesen. Anhand einer der aktivsten Mutanten mit 4 Mutationen im aktiven Zentrum konnten die Autoren demonstrieren, dass die Aktivität nicht durch eine Aneinanderreihung von Einpunktmutationen erreichbar war und somit nur durch epistatische Effekte aller Mutationen zustande kam. Der Vorteil dieser Strategie ist, dass sie für jedes natürliche Enzym angewandt werden kann, sofern eine Kristallstruktur und homologe Sequenzen vorhanden sind, und sie ermöglicht aufgrund der geringen Größe der Mutantenbibliothek ein Ultra-Niederdurchsatz-Screening.

## 2 ZIELSETZUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine biokatalytische Plattform für die regioselektive Methylierung und Alkylierung von *N*-Heterozyklen entwickelt werden.

Eine der großen Herausforderungen in der synthetischen Chemie ist die selektive Alkylierung von Heterozyklen, die wie Pyrazole mehr als ein Heteroatom tragen. Die Alkylierung durch chemische Standardreagenzien verläuft dabei im Allgemeinen nicht-selektiv und ist substratkontrolliert.<sup>[7,10,12]</sup> Katalysatorkontrollierte Methoden sind bislang nicht bekannt, jedoch sehr gesucht.<sup>[3,4]</sup> Obwohl Methyltransferasen in der Lage sind *C*-Heteroatom-Bindungen mit unerreichbarer Selektivität zu knüpfen, ist jedoch bis *dato* keine Enzymsequenz bekannt, die in der Lage ist, Pyrazole zu alkylieren. Auch ist die Anwendbarkeit von Methyltransferasen in Alkylierungsreaktionen durch komplexe und instabile Cofaktoren eingeschränkt. Ein biokatalytischer Ansatz zur Alkylierung von Pyrazolen mit einfachen Alkyldonoren ist daher ein äußerst attraktives Ziel um den Zugang zu neuen bioaktiven Molekülen zu ermöglichen.

Ziel dieser Arbeit war es daher promiskuitive, pyrazolmethylierende *N*-Methyltransferasen zu identifizieren und die Anwendbarkeit in Methylierung und Alkylierung von Pyrazolen zu studieren.



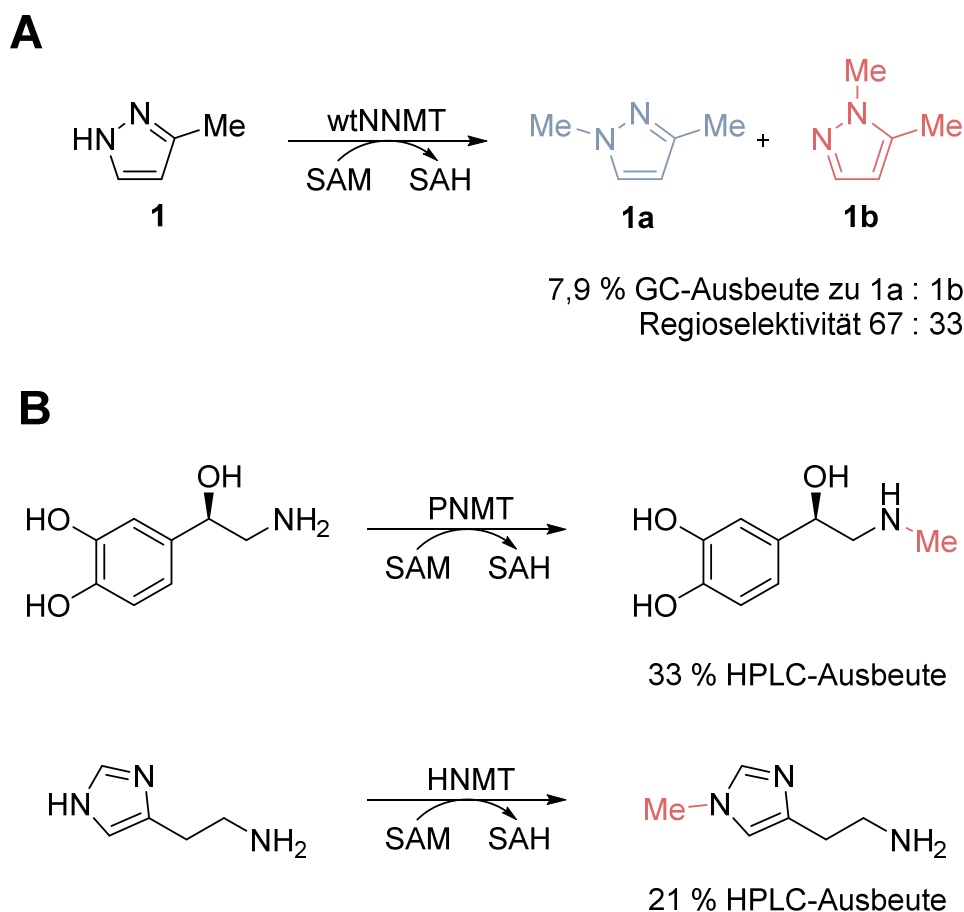


## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Identifikation von promiskuitiven *N*-Methyltransferasen

Für die chemische Synthese ist die selektive Methylierung von Heterozyklen mit mehrfachen Heteroatomen, wie z. B. bei Pyrazolen, eine große Herausforderung. In der Natur werden solche Reaktionen mit höchster Selektivität von Methyltransferasen durchgeführt. Bislang ist jedoch noch keine Enzymsequenz bekannt, die Pyrazole als Substrate akzeptieren. In einer Literaturrecherche wurden drei potentiell promiskuitive Enzyme (PNMT, HNMT, NNMT) als vielversprechende Startpunkte identifiziert (Abb. 12-Abb. 14). Als Kriterien dienten bereits bekannte Substratspektren, die Hydrophobizität dieser Substrate, eine hydrophobe Substratbindetasche und/oder die strukturelle Ähnlichkeit von bereits umgesetzten Substraten zum Zielsubstrat Pyrazol. Ein weiterer Vorteil dieser Enzyme besteht darin, dass sie bereits in *E. coli* exprimiert wurden und ihre Strukturen bekannt sind.<sup>[110,188,222]</sup>

Die ausgewählten Enzyme wurden als Genblöcke bestellt, in pET28a(+) kloniert, in *E. coli*<sup>®</sup> EXPRESS BL21 (DE3) transformiert und exprimiert (8.3, 8.4.2.2). Die NMTs wurden in Reaktionen mit Zelllysat anhand des Substrats 3-Methylpyrazol (**1**) auf ihre promiskuitive Aktivität untersucht (8.6.1). Einzig die wtNNMT zeigte im Vergleich zum Leervektor und zu einer Reaktion ohne Enzym, Produktpeaks mit der Retentionszeit von 1,3-Dimethylpyrazol (**1a**) und 1,5-Dimethylpyrazol (**1b**). Um zu bestätigen, dass die mit **1** nicht aktiven Enzyme PNMT und HNMT funktional exprimieren, wurde deren natürliche Reaktionen mit gereinigtem Enzym nachgewiesen (8.6.2). Für die beiden Enzyme PNMT (33 %) und HNMT (21 %) konnte eine Bildung des äquimolar zum natürlichen Produkt gebildeten SAH beobachtet werden (Abb. 17B). In Kontrollreaktionen (Enzympräparation aus *E. coli* mit Leervektor und systematischem Weglassen von Substraten) wurde deutlich weniger SAH detektiert. Dies bestätigt, dass beide Enzyme aktiv exprimiert und gereinigt wurden. Nach der Reinigung der wtNNMT (8.5.2) konnte in einem ersten Experiment bei dem Einsatz von 10 µM Enzym, 2 mM des Pyrazols **1** und SAM, 7,9 % Produktbildung und einer Regioselektivität von 67:33 für 1,3-Dimethylpyrazol (**1a**) über 1,5-Dimethylpyrazol (**1b**) quantifiziert werden (Abb. 17A).

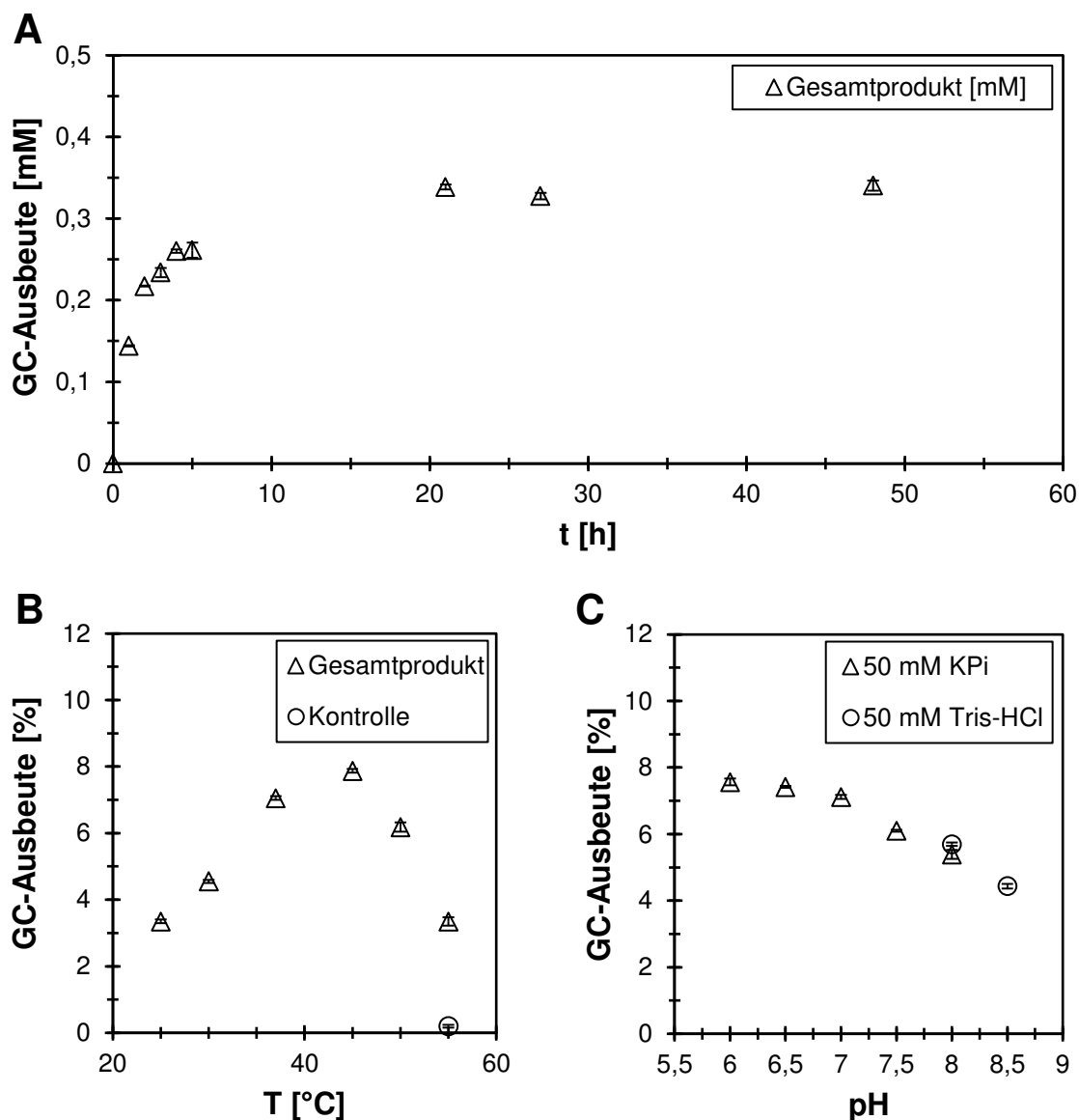


**Abb. 17: Methyltransferaseaktivitäten der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT), Phenylethanol-*N*-Methyltransferase (PNMT) und Histamin-*N*-Methyltransferase (HNMT). A) Promiskuitive Aktivität der wtNNMT mit 3-Methylpyrazol (**1**). Eingesetzt wurden 10  $\mu$ M wtNNMT und je 2 mM *S*-Adenosyl-*L*-Methionin (SAM) und **1** bei 37 °C für 20 h. SAH, *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein. Die Standardabweichung von Triplikaten betrug weniger als 0,5%. B) Natürliche Aktivität der PNMT und der HNMT mit Phenylethanolamin und Histamin als jeweiliges Substrat. Gemessen wurde die Bildung von SAH als Folge des Verbrauchs des Methyl donors SAM. Die Bildung von SAH korreliert dabei mit der Bildung des methylierten Produkts. Kontrollen zeigten, dass SAH durch die enzymatische Reaktion und nicht als Zerfallsprodukt über die Zeit gebildet wurde. Dies bestätigt, dass die Enzyme aktiv exprimiert wurden. Eingesetzt wurde 10  $\mu$ M Enzym, 2 mM Phenylethanolamin oder Histamin und 2 mM SAM bei 37 °C für 20 h.**

### 3.1.1 Charakterisierung der promiskuitiven Reaktion

Da der Umsatz von **1** mit der wtNNMT gering ausfiel und um mehr über diese erste enzymatische Methylierung eines asymmetrisch substituierten Pyrazols zu erfahren, wurden Experimente zur Charakterisierung dieser Reaktion durchgeführt. Mit einem Zeitverlauf der Reaktion (gleiche Bedingungen wie in 8.6.1) wurde geprüft, nach welcher Reaktionszeit die maximale Produktkonzentration erreicht wird. Der Reaktionsverlauf lässt darauf schließen, dass die Reaktion nach ca. 20 h ein Plateau erreicht in dem keine weitere Produktbildung zu beobachten ist (Abb. 18A). Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Reaktion wurden mit gereinigter wtNNMT (8.5.2) in dem Bereich um die physiologische Kerntemperatur von 37 °C des Ursprungsorganismus *Homo sapiens* durchgeführt.

Die höchste Produktbildung (7,9 %) erfolgte bei 45 °C, gefolgt von 7,1 % bei 37 °C (Abb. 18C). Die beiden äußersten Temperaturpunkte zeigen mit 3,5 % die geringste Produktbildung. Die Kontrolle ohne Enzym bei 55 °C zeigt keine Produktbildung und bestätigt, dass keine autokatalytische Hintergrundreaktion stattfand.

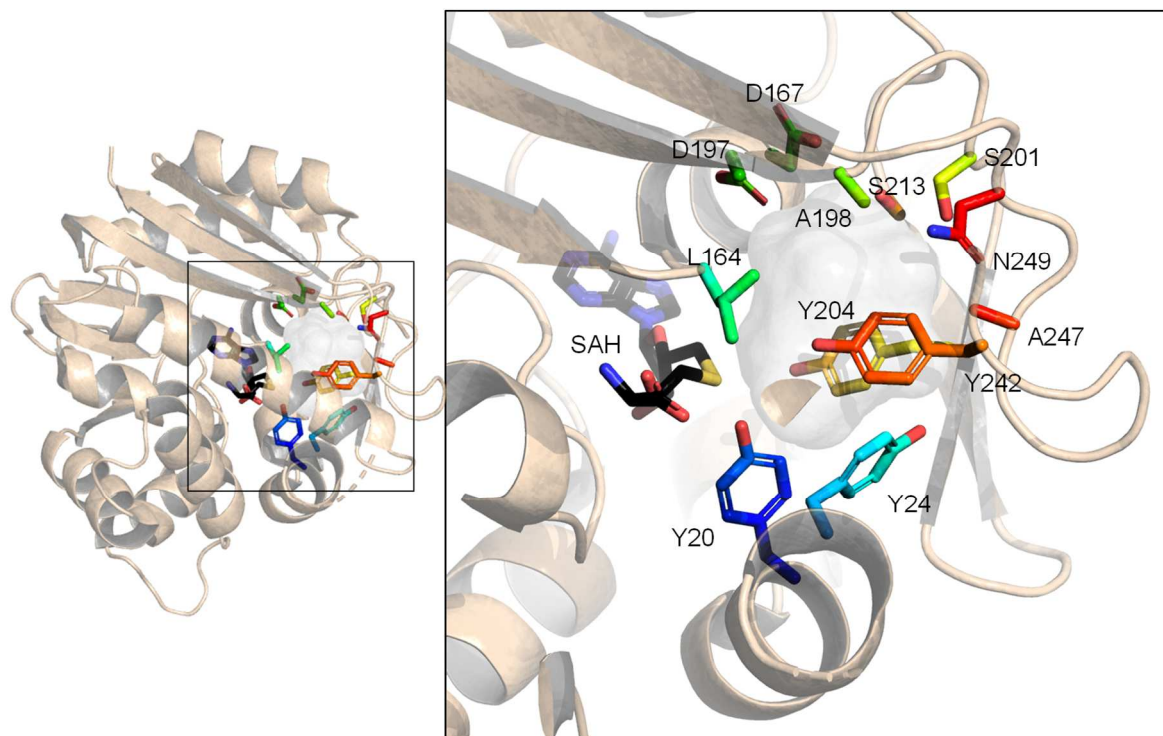


**Abb. 18: Charakterisierung der promiskuitiven Methylierung von 1-Methylpyrazol (1) mit der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT). A) Zeitverlauf der Reaktion mit 445  $\mu$ L wtNNMT-Lysat, 2 mM SAM und 2 mM von 1, bei 37 °C. Die Fehlerbalken zeigen die Abweichung von Duplikaten. B) Temperaturabhängigkeit der Reaktion mit 10  $\mu$ M wtNNMT, 2 mM SAM und 2 mM 1, bei 37 °C und mit 50 mM KPi pH 7,0. Eine Kontrolle ohne Enzym bei 55 °C bestätigt, dass keine temperaturbedingte Hintergrundreaktion stattfindet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten. C) pH-Abhängigkeit der Reaktion mit 10  $\mu$ M wtNNMT, 2 mM SAM und 2 mM von 1, bei 37 °C. Gezeigt ist die GC-Ausbeute des Gesamtproduktes. Um einen möglichst breiten physiologischen pH-Bereich abzudecken wurden zwei Puffersysteme untersucht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten. KPi, Kaliumphosphatpuffer; Tris-HCl, Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid.**

Methylierungsreaktionen mit wtNNMT werden in der Literatur oft bei einem pH von 8,0 oder 8,5 durchgeführt. Da es bei diesem pH-Wert zu verstärkter Deprotonierung der Ringstickstoffe von Pyrazolen kommen kann, wurde untersucht, wie sich geringere pH-Werte auf die Reaktion auswirken. Zusätzlich zu Tris-HCl (Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid) wurde diese Untersuchung durch Kaliumphosphat-Puffer (KP<sub>i</sub>) ergänzt. Mit absteigendem pH-Werten erhöhte sich für die untersuchte Reaktion die Produktbildung nahezu linear von pH 8,5 (4,4 %) bis pH 7,0 (7,1 %) und steigt dann nur noch geringfügig bis zu ihrem Maximum von 7,6 % bei pH 6,0 an (Abb. 18C). Die Produktbildung beider Puffersysteme bei pH 8,0 (5,4 %/5,6 %) offenbart, dass in diesem Fall die Wahl des Puffers nicht entscheidend zu einer erhöhten Produktbildung führt. Um Reaktionsbedingungen für ein möglichst breites Substratspektrum zu kreieren, wurden daraufhin die Folgeexperimente bei pH 7,0 und 37 °C für 20 h durchgeführt.

### **3.2 Enzyme-Engineering durch computergestütztes Design einer Mutantenbibliothek**

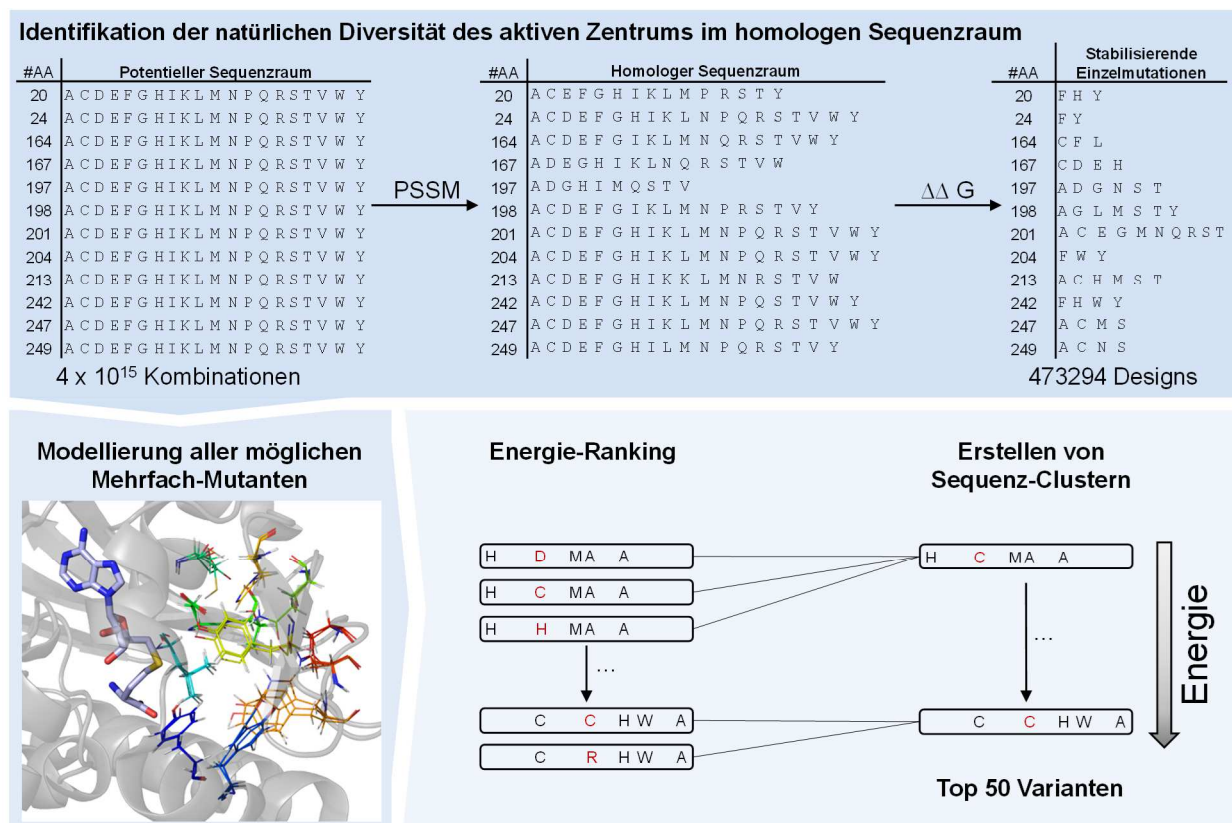
Ausgehend von der promiskuitiven Aktivität der wtNNMT war es das Ziel, eine Enzymbibliothek zu entwickeln. Im Gegenzug zu klassischen Enzym-Engineering Methoden wie z. B. die iterative Sättigungsmutagenese, sollte die Mutantenbibliothek Aktivitäten für ein breites Spektrum an Pyrazolen aufzuweisen. Zu diesem Zweck wurde der kürzlich von Sarel Fleishman und Kollegen entwickelte FuncLib-Algorithmus<sup>[1]</sup> angewandt. Der Algorithmus ermöglicht es mehrere Mutationen parallel in ein aktives Zentrum einzubauen. Dies geschieht anhand der Kombination phylogenetischer und energetischer Berechnungen, die die Stabilität der multiplen Mutationen im aktiven Zentrum *in silico* analysieren. Für die Erstellung dieser Mutantenbibliothek wurde im Vorfeld die substratbindenden Aminosäurereste der wtNNMT anhand der Analyse der Kristallstrukturen (PDB: 2iip, 3rod, 5yif, 6b1a, 6chh) untersucht. Um strukturelle Unterschiede der Kristallstrukturen zu analysieren, wurden diese mittels PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.6, Schrodinger LLC.) überlagert (8.9.1). In der Analyse der überlagerten Kristallstrukturen fand sich kein struktureller Unterschied im aktiven Zentrum der wtNNMT-Kristalle. Die Aminosäuren der Substratbindetasche wurden daraufhin in einem Radius von 5 Å zu dem in 5yif gebundenen Inhibitor (6-Methoxy-1-Methyl-2H-Pyridine-3-Carboxamide) identifiziert. Zwölf Aminosäuren (Y20, Y24, L164, D167, D197, A198, S201, Y204, S213, Y242, A247, und N249) wurden in diesem Prozess unter der Voraussetzung ausgewählt, dass diese Aminosäuren keine Interaktion mit SAM oder SAH eingehen (Abb. 19).



**Abb. 19: Struktur der Wildtyp Nicotinamid-N-Methyltransferase (wtNNMT, pdb 2iip) mit Zoom (rechts) auf das aktive Zentrum.** Ausgewählte und mittels FunLib<sup>[1]</sup> randomisierte Aminosäuren der Substratbindetasche sind als *Sticks* dargestellt. Das kokristallisierte *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) ist als schwarze *Sticks* gezeigt und die Form der Substratbindetasche als grauer Schatten. Die Darstellung erfolgte mit PyMOL.

Eine totale Randomisierung dieser 12 ausgewählten Aminosäurepositionen mit allen proteinogenen Aminosäuren spannt hierbei einen enormen Sequenzraum von insgesamt  $\sim 4 \times 10^{15}$  mögliche Kombinationen auf.

Das Testen all dieser Kombination ist nahezu unmöglich. Um diesen Sequenzraum zu verringern, werden die möglichen Mutationen auf die in homologen, natürlichen Sequenzen zu findenden Variationen reduziert. Nach Berechnung der Faltungsentropien ( $\Delta\Delta G$ , aus Rosetta-Design-Kalkulationen) der Einzelmutationen werden ausschließlich stabilisierende Mutationen für die nächste Kalkulation beibehalten. Dies verringerte die Anzahl der möglichen Kombinationen bereits drastisch. In einem nächsten Schritt werden wiederum alle möglichen Varianten mit 3-5 gleichzeitigen Mutationen im aktiven Zentrum konstruiert und nach ihrer Faltungsentropie geordnet. Um eine möglichst große Diversität der aktiven Zentren zu gewährleisten, werden Varianten so geclustert, dass sich jede Sequenz um mindestens drei Mutationen unterscheidet (Abb. 20). Die daraus entstandenen 50 energetisch stabilsten Varianten (Tabelle 9) sind alle rechnerisch stabiler als die wtNNMT. Die Aminosäure L164 ist in allen Entwürfen konserviert, Y204 nur in einer Variante (v44) zu einem Phenylalanin mutiert. Die höchste Mutationsrate weisen die Aminosäurepositionen D167 (88 %), A198 (62 %), S201 (88 %), S213 (68 %), Y242 (48 %) und N249 (58%) auf.

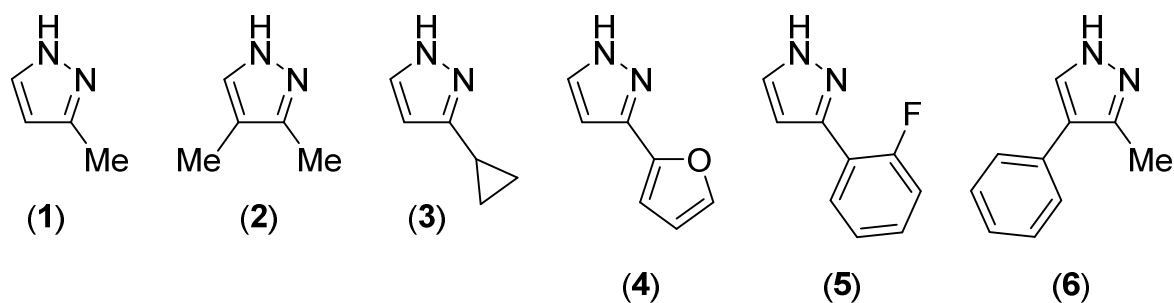


**Abb. 20:** Arbeitsfluss zum Erstellen einer computergestützten Mutantenbibliothek der humanen Nicotinamid-*N*-Methyltransferase mittels FuncLib-Algorithmus<sup>[1]</sup>. Der potentielle Sequenzraum des aktiven Zentrums wird durch eine Homologiesuche und eine spezifische Punktbewertungs-Matrix (*point-specific scoring matrix*) [PSSM] auf die natürlich vorkommenden Aminosäuren reduziert. Berechnungen der Differenz der Faltungsenergien (bezogen auf das Wildtyp-Enzym) reduzieren weiter den Sequenzraum. Alle möglichen Varianten mit 3-5 Mutationen werden konstruiert und in ihrer Faltungsenergie geordnet. Abbildung inspiriert durch Khersonsky *et al.*<sup>[1]</sup>

Die Positionen Y20 (26 %), Y24 (14 %), D197 (14 %) und A247 (10 %) wurden weniger häufig variiert. Die Varianten wurden als synthetische DNA gekauft und in das pET28a(+)-Templat der wtNNMT durch Gibson-Assembly, Overlap-PCR und QuikChange<sup>®</sup>-PCR eingefügt und in *E. coli* exprimiert (8.3, 8.4.2.3). Die Varianten wurden im Anschluss auf ihre Aktivität und Regioselektivität anhand eines beispielhaften Substratspektrums an Pyrazolen untersucht.

### 3.2.1 Pyrazol-Auswahl für die Untersuchung der Substratbreite von Enzym-Varianten

Um die Substratbreite der Mutantenbibliothek zu untersuchen, wurden neben 3-Methylpyrazol (**1**) weitere Pyrazole getestet (Abb. 21). Alle Pyrazole sind so ausgewählt, dass sie asymmetrisch an Position 3 (**1**, 3,4-Dimethylpyrazol (**2**), 3-Cyclopropylpyrazol (**3**), 3(2-Furyl)-Pyrazol (**4**) und 3(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (**5**)) und in einem Fall zusätzlich an Position 4 (3-Methyl-4-Phenylpyrazol (**6**)) substituiert sind. Zudem erhöht sich der sterische Anspruch der Substituenten von **1** bis **6**. Für eine selektive Katalyse müssen diese Substrate exakt in den aktiven Zentren von Enzymen ausgerichtet



**Abb. 21: Getestete asymmetrisch substituierte Pyrazole.** 3-Methylpyrazol (1), 3,4-Dimethylpyrazol (2), 3-Cyclopropylpyrazol (3), 3(2-Furyl)-Pyrazol (4), 3(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (5), 3-Methyl-4-Phenylpyrazol (6).

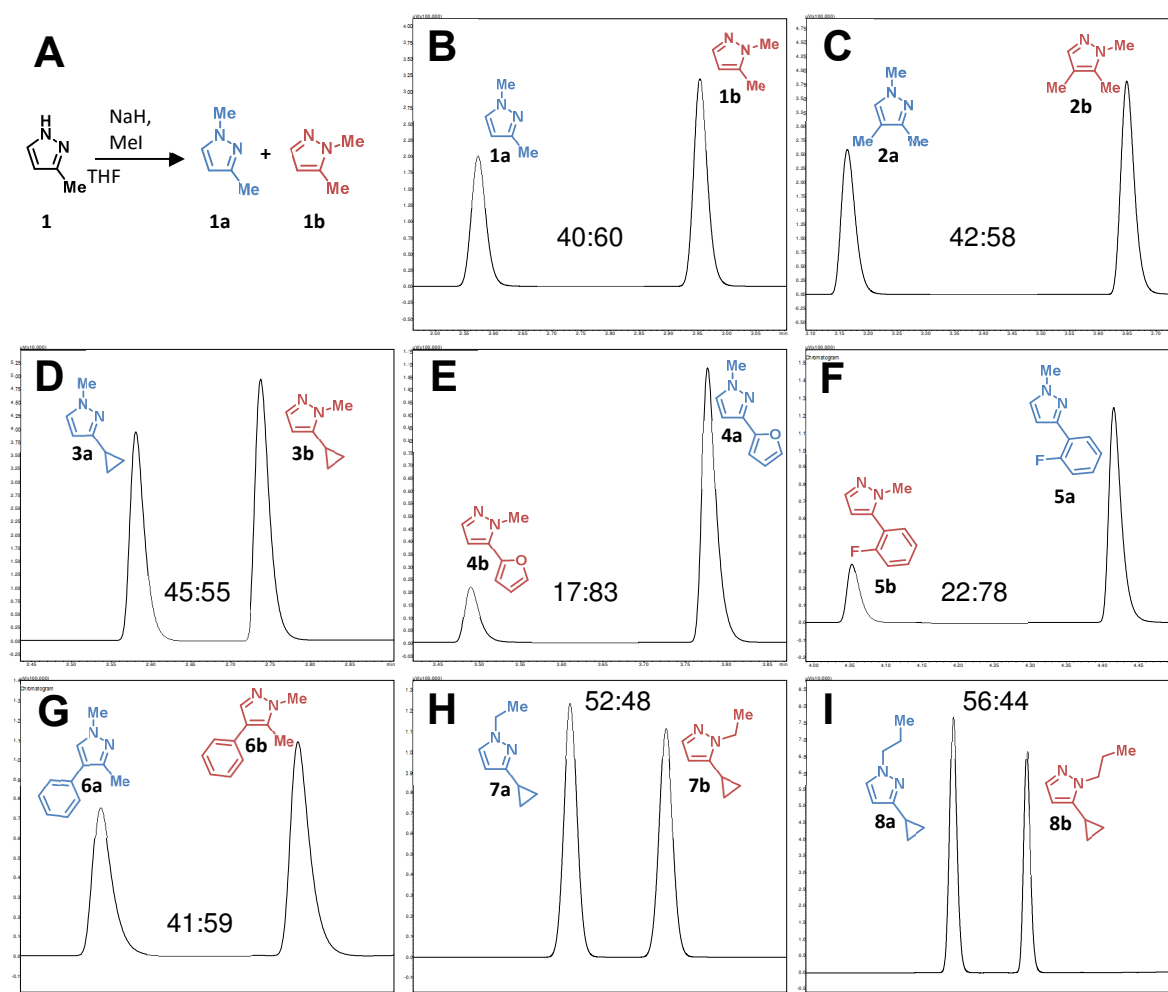
werden. Dabei stellen kleine Substituenten (bei **1** und **2**) eine Herausforderung für die selektive (chemische und enzymatische) Methylierung dar, da sich die tautomeren Strukturen nur geringförmig unterscheiden. Sterisch anspruchsvollere Pyrazole hingegen sind ebenso herausfordernd da viele Interaktionen mit den Aminosäuren des aktiven Zentrums exakt aufeinander abgestimmt sein müssen, dass es zu einer selektiven Methylierung kommt. Aus chemischer Sicht führen raumbeanspruchende Substituenten von Pyrazolen oft zu einer Favorisierung des entfernteren *N*-Atoms.<sup>[67,68]</sup> Mesomere Effekte ( $\pm$ M-Effekte) der Substituenten von **4**, **5** und **6** auf den Pyrazol-Ring, üben zudem einen Einfluss auf die Reaktivität der Ringstickstoffe aus. Eine selektive, regiodivergente Methylierung dieser Substrate kann daher nur durch die Kontrolle des Katalysators erreicht werden.

### 3.2.2 Produktgemische als Resultat der chemischen Synthese von Produktstandards

Um die Selektivitäten enzymatischer Methylierungsreaktionen beurteilen und quantifizieren zu können, wurden alle in dieser Arbeit erzeugten Produkte durch chemische Alkylierung mit den entsprechenden Halogenalkanen dargestellt. Dies war notwendig, da viele der erzeugten Produkte nicht kommerziell erhältlich und in einigen Fällen auch nicht literaturbekannt sind. Zu Beginn der Arbeit konnten ausschließlich die methylierten Produkte von **1** als Standards käuflich erworben werden, später noch für die methylierten Produkte von **3**. Ethylierte und propylierte Produktstandards von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) wurden in der begleiteten Masterthesis von Alexander-N. Egler-Kemmerer synthetisiert und identifiziert.<sup>[223]</sup> Die Synthese der methylierten, ethylierten und propylierten Produktstandards (8.7) orientierte sich dabei an dem von Broom *et al.* beschriebenen Protokoll<sup>[224]</sup>. Dabei wird zuerst der protonierte Ringstickstoff des Pyrazols mit Natriumhydrid deprotoniert und im Folgenden durch einen 1,5-fachen Überschuss des entsprechenden Iodalkans (Iodmethan, Iodethan und 1-Iodpropan) alkyliert (Abb. 22A). Direkt aus dem Reaktionsgemisch entnommene Proben wurden mittels GC-FID analysiert. Die synthetisierten Standards wurden mittels NMR-Analyse ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, COSY, Kapitel 8.8.1) in Zusammenarbeit mit Jun. Prof.

Stephan Hammer identifiziert und über die exakten Massen aus der hochauflösenden Elektrospray-Ionisation Massenspektroskopie (8.8.2) bestätigt (siehe Kapitel 10.3).

Die chemische Alkylierung führte für alle Edukte zu Produktmischungen (Abb. 22B-I). Mit Ausnahmen der Produkte von **4** (a:b = 17:83) und **5** (a:b = 22:78) lagen diese Produktgemische in einem ungefähren Verhältnis von 50:50 vor. Eine vollständige Separation der reinen Produkte von **2**, **3**



**Abb. 22: Selektivitäten chemischer Synthesen alkylierter Pyrazole mittels Iodalkanen.** A) Beispielreaktion der Methylierung von 3-Methylpyrazol (**1**) mittels Iodmethan mit der Bildung von 1,3-Dimethylpyrazol (**1a**) und 1,5-Dimethylpyrazol (**1b**). B) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von **1** mit dem Produktgemisch von **1a/1b**. C) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von 3,4-Dimethylpyrazol (**2**) mit der Bildung von 1,3,4-Trimethylpyrazol (**2a**) und 1,4,5-Trimethylpyrazol (**2b**). D) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) mit der Bildung von 1-Methyl-3-Cyclopropylpyrazol (**3a**) und 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol (**3b**). E) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von 3(2-Furyl)-Pyrazol (**4**) mit der Bildung von 1-Methyl-3(2-Furyl)-Pyrazol (**4a**) und 1-Methyl-5(2-Furyl)-Pyrazol (**4b**). F) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von 3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (**4**) mit der Bildung von 1-Methyl-3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (**5a**) und 1-Methyl-5(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (**5b**). G) GC-Chromatogramm der chemischen Methylierung von 3-Methyl-4-Phenylpyrazol (**6**) mit der Bildung von 1,3-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (**6a**) und 1,5-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (**6b**). H) GC-Chromatogramm der chemischen Ethylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) mit der Bildung von 1-Ethyl-3-Cyclopropylpyrazol (**7a**) und 1-Ethyl-5-Cyclopropylpyrazol (**7b**).<sup>[223]</sup> I) GC-Chromatogramm der chemischen Propylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) mit der Bildung von 1-Propyl-3-Cyclopropylpyrazol (**8a**) und 1-Propyl-5-Cyclopropylpyrazol (**8b**).<sup>[223]</sup>

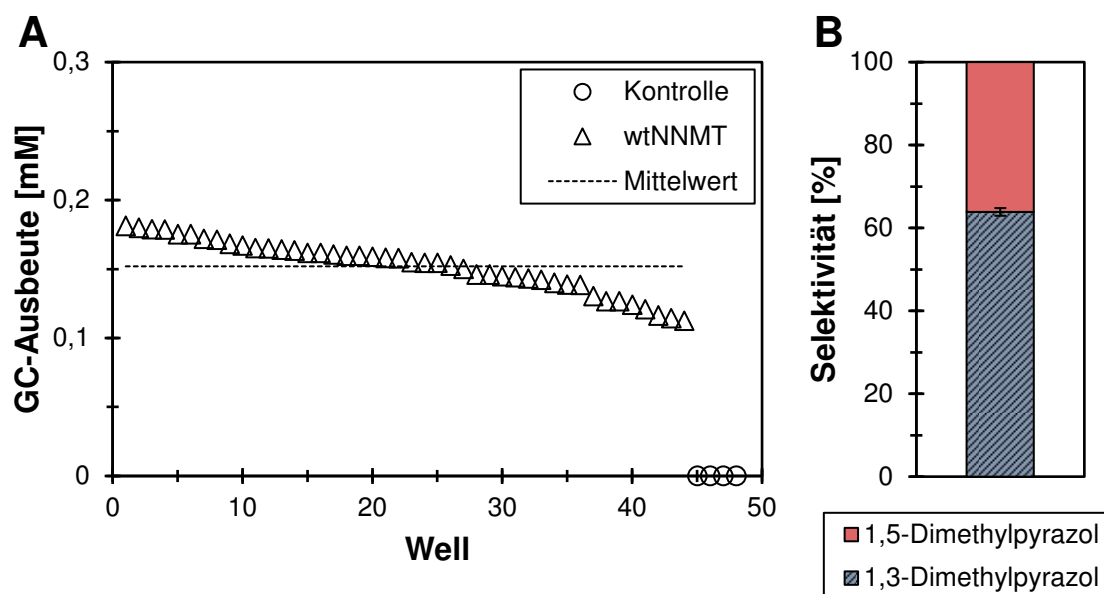


(ethylierte und propylierte Produkte<sup>[223]</sup>), **4**, **5**, **6** mittels Säulenchromatographie konnte in keinem der Fälle erreicht werden. Der Hauptteil der gesammelten Fraktionen enthielt jeweils Mischung beider regioisomeren Produkte. Dies verdeutlicht, dass alkylierte *N*-Heterozyklen schwer trennbar sind und unterstreicht die Notwendigkeit einer selektiven Alkylierungs-Methode.

### 3.3 Entwicklung eines *Deep-Well-Platten-Screenings*

Für eine effiziente Untersuchung der Methylierung des Substratpanels (Abb. 21D) durch die Mutantenbibliothek wurde ein *Deep-Well-Platten* (DWP)-Screening entwickelt. Aufgrund der geringen Produktbildung der wtNNMT mit **1** wurden hierfür 24-DWPs eingesetzt. Diese ermöglichen eine höhere Enzymproduktion im Vergleich zu 96-DWPs aufgrund der Steigerung des Kulturvolumens pro *Well*. Die dadurch im Vergleich zu 96-DWPs verringerte Anzahl an *Wells*/Platte ist hier aufgrund der reduzierten Anzahl an Varianten der fokussierten Mutantenbibliothek vernachlässigbar. In der vorliegenden Arbeit konnte somit auf Basis von 24-DWPs ein Assay entwickelt werden, der ein schnelles und sensitives Screening von Substraten mit der gesamten Mutantenbibliothek ermöglichte. Die Aktivität der Enzyme wurde hierbei in Form der Produktbildung mittels Gaschromatographie (GC) ermittelt. Diese Analyse ermöglicht die Detektion der Produkte mittels Flammenionisationsdetektor (FID) oder Massenspektrometer (MS). Letzteres hat den Vorteil, dass selbst geringste Produktkonzentrationen detektiert werden können und die Produktbildung, z. B. in Abwesenheit von Produktstandards, über einen Massenhit bestätigt werden kann.

Um die Aussagekraft des entwickelten 24-DWP-Assays (8.6.6) zu untersuchen, wurde die relative Standardabweichung (*cv*) des 24-DWP-Assays untersucht. Hierfür wurde die wtNNMT in zwei 24-DWPs exprimiert, wobei pro Platte je eine Reihe mit jeweils zwei *Wells* der wtNNMT, ein *Well* mit dem pET28a(+)-Leervektor und ein *Well* mit einem sterilen Zahnstocher ohne Zellen als Kontrollen inokuliert wurden (Abb. 42). Das *Well* mit ausschließlich Medium diente hierbei als Sterilitäts- und Kontaminationskontrolle. Nach Aufschluss mittels Lysozym und DNaseI und anschließender Zentrifugation, wurde Pyrazol **1** mit der wtNNMT aus dem löslichen Überstand und stöchiometrischen Konzentrationen von SAM methyliert (8.6.6). Die Produktbildung wurde nach der Extraktion mit DCM mittels GC-FID (8.8.3.1) quantifiziert. Die Gesamtproduktbildung über alle 44 untersuchten *Wells* betrug im Mittel 0,15 mM, begrenzt von dem höchsten gemessenen Wert von 0,18 mM und dem kleinsten gemessenen Wert von 0,11 mM (Abb. 23A). Die vier Kontrollen (2× Medium und 2× Leervektor) zeigten keine Produktbildung. Die mittlere Standardabweichung des untersuchten Assays beträgt 12 % für die Produktbildung, die Kontrollen ausgenommen. Zusätzlich zur Produktbildung wurde die Regioselektivität der wtNNMT-Reaktion im Platten-Assay untersucht.



**Abb. 23: Relative Standardabweichung (A) und Regioselektivität (B) des 24-Deep-Well-Platten (24-DWPs) Assays.** Gemessen wurden zwei 24-DWPs der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT, 400  $\mu$ L Lysat/Well) mit 2 mM 3-Methylpyrazol (**1**) und 2 mM *S*-Adenosyl-*L*-Methionin bei 37 °C für 20 h. Als Kontrollen dienten je ein Well mit Medium und je ein Well mit pET28a(+)-Leervektor pro Platte.

Die mittlere Selektivität betrug 64 % für 1,3-Dimethylpyrazol (**1a**) zu 36 % für 1,5-Dimethylpyrazol (**1b**) mit einer Standardabweichung von 1 % (Abb.23B). Damit ist der 24-DWP-Assay gut geeignet, um die Methylierung von Pyrazolen durch die Mutantenbibliothek zu untersuchen.

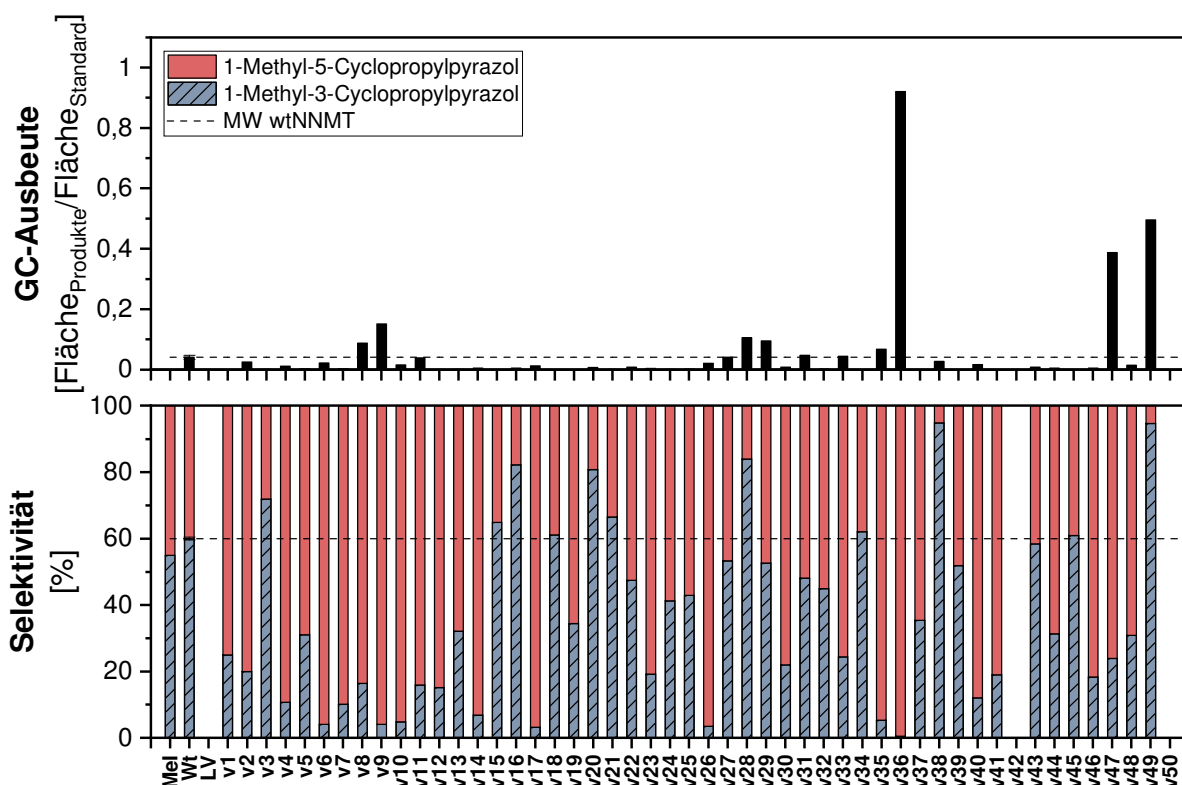
### 3.4 Screening der Mutantenbibliothek

Mit dem entwickelten 24-DPW-Protokoll wurde die Mutantenbibliothek auf ihrer Substratbreite, sowie auf die Aktivität und die Selektivität der einzelnen Varianten untersucht (8.6.6). Als Substrate dienten die bereits beschriebenen Pyrazole **1-6** (Abb. 21). Während **1** mittels GC-FID quantifiziert (8.8.3.1) werden konnte, wurden alle anderen Pyrazole mangels Produktstandards und aufgrund der höheren Nachweisgrenze mittels GC-MS im SIM-Modus (8.8.3.2-8.8.3.8) gemessen. Die Produktbildung wurde für diese Messungen anhand des Flächenverhältnisses der Produktpeaks zum internen Standard dargestellt.

Viele der Varianten waren im Screening der Mutantenbibliothek mit dem Pyrazolpanel aktiver und regioselektiver als die wtNNMT. Über alle Substrate hinweg waren mehr als 90 % der Varianten aktiv, 10-30 % der Varianten waren pro Substrat aktiver und/oder regioselektiver als der Wildtyp. 74 % der Varianten zeigten für mindestens ein Pyrazol eine höhere Produktbildung als der Wildtyp, nahezu alle Varianten waren für mindestens ein Substrat regioselektiver (Abb. 24 & Abb. 47-Abb. 51). Das Screening des bereits mit der wtNNMT untersuchten Modellsubstrats **1** ergab mehrere regioselektive,

darunter auch regiodivergente Varianten (Abb. 47). Dabei erreichten 12 % der Varianten eine höhere Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp. 20 % der Varianten wiesen mit Pyrazol **2** eine Regioselektivität von >80 % auf (Abb. 48). Die höchsten Regioselektivitäten wurden jedoch ausschließlich für **2b** erreicht, einzig zwei Varianten erreichten Selektivitäten von knapp unter 80 % für **2a**. Für Pyrazol **3**, mit dem sterisch etwas anspruchsvollen Cyclopropyl-Substituenten, konnten deutlich mehr Varianten eine regioselektive Methylierung erreichen. Fast die Hälfte aller Varianten wiesen eine Selektivität von 80 % oder mehr auf (Abb. 24).

In diesem Fall lag die Mehrheit der regioselektiven Produktbildungen bei Produkt **3b**. Nur vier Varianten erreichten in der Methylierung von **4** eine Regioselektivität von > 80 % für **4b** im Vergleich zu 13 Varianten für **4a** (Abb. 49). Die Varianten v28, v36 und v38 zeichnen sich durch exzellente Regioselektivitäten von jeweils >99 % aus. Die selektive Methylierung zu **4b** führte zu erheblichen Aktivitätsverlusten. Insgesamt waren mit **4** zehn Varianten aktiver als der Wildtyp. Mit 3-(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (**5**) konnte keine erhöhte Selektivität für Produkt **5b** beobachtet werden.



**Abb. 24: Screening der enzymatischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) durch die Mutantenbibliothek.** Die obere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Regioselektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken der wtNNMT beschreiben die Standardabweichung von Hexaplikaten.

Mehr als 75 % aller Varianten erreichten jedoch eine erhöhte Regioselektivität (>80 %) für Produkt **5a** auf (Abb. 50). Insgesamt 26 Varianten zeigten eine höhere Aktivität als die wtNNMT. Im Substratscreening mit Pyrazol **6** konnten insgesamt 72 % der 50 Varianten das Pyrazol besser umsetzen als das Wildtyp-Enzym, das mit diesem Pyrazol nahezu kein Produkt bildete (Abb. 51). Davon erreichten zwölf Varianten eine Selektivität von über 80 %. Über alle Substrate hinweg zeigte sich eine Abnahme der Aktivität des Wildtyp-Enzyms einhergehend mit der ansteigenden Sterik von Substrat **1** bis **6**.

Zusammengefasst demonstrierte das Screening eindrucksvoll die breite Aktivität der Mutantenbibliothek für alle untersuchten Substrate, sowie die hohe Diversität der Regioselektivitäten der Varianten. Zur Evaluation der gefundenen Aktivitätssteigerungen und Selektivitäten wurden in einem nächsten Schritt die Varianten v17, v22, v28, v31, v36, v38, v40 und v49 mit gereinigtem Enzym charakterisiert.

### 3.5 Charakterisierung ausgewählter FuncLib-Varianten

Im nächsten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Varianten aus dem Screening weitergehend untersucht und die von ihnen katalysierten Methylierungsreaktionen hingehend verbesserter Produktivität und Selektivität charakterisiert. Hierfür wurden alle ausgewählten Varianten exprimiert und durch ihren C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag per Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) an einer Äkta™ Purifier gereinigt (8.5.2).

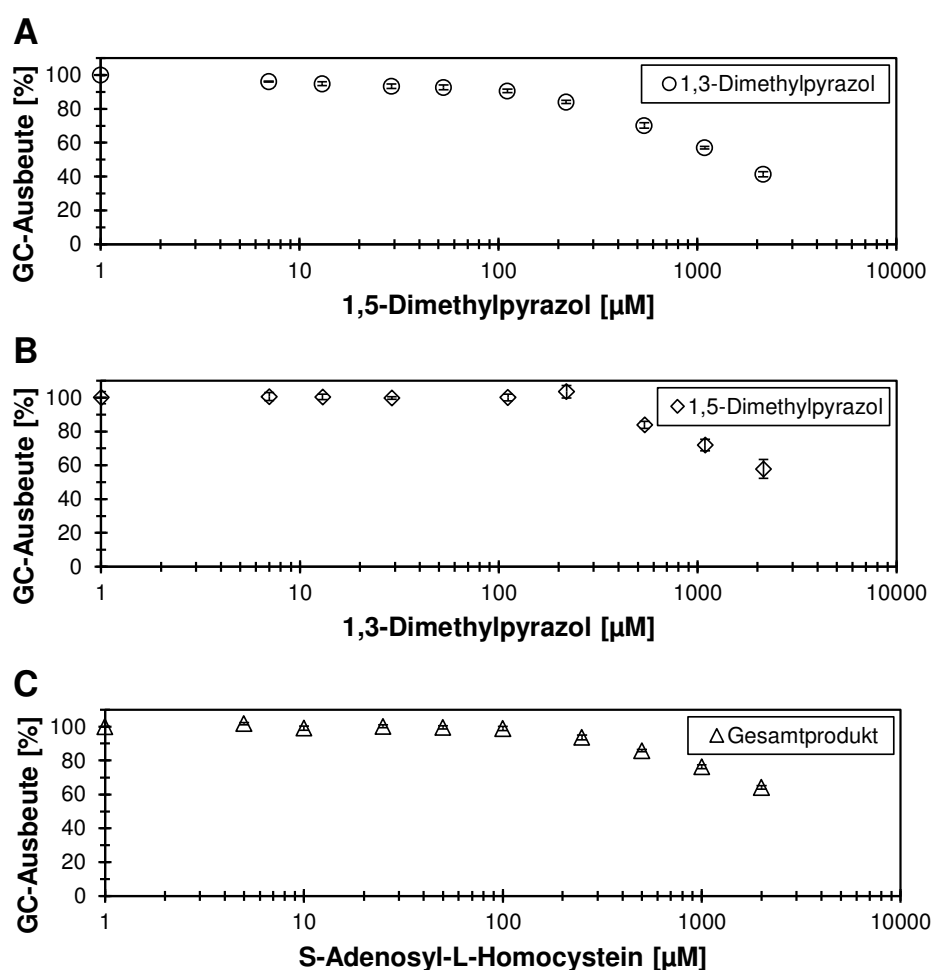
#### 3.5.1 Endpunktbestimmungen unter stöchiometrischem Einsatz von SAM

Eine Möglichkeit enzymatische Reaktionen zu beurteilen besteht darin, am Ende der Reaktion die Produktbildung und die Selektivität zu bestimmen (8.6.7). Hierfür wurden aus dem Screening für jedes Substrat Varianten ausgewählt, die im Vergleich zur wtNNMT eine erhöhte Aktivität bei gleichzeitig verbesserter Regioselektivität aufwiesen. Zusätzlich wurden Varianten ausgewählt, die das regiodivergente Produkt, der zuvor ausgewählten Varianten, produzierten. Alle ausgewählten Varianten methylierten die jeweiligen Pyrazole mit guter bis exzellenter Regioselektivität von bis zu >99 % und teilweise regiodivergent (Abb. 26 & Tabelle 10). So konnten für **1** (93 % **1b**) und **2** (96 % **2a**) hohe Regioselektivitäten, für **1** zudem auch Regiodivergenz (v17 & v49) beobachtet werden. Die höchsten Regioselektivitäten (>99 %) wurden in der Methylierung von **3** (v36 für **3a**), mit allen untersuchten Varianten für Pyrazol **4** (für **4a** & **4b**) und mit 50 % der Varianten mit **5** (v28 & v38 für **5a**) gefunden. Neben der Regiodivergenz von **4** methylierten die Mutanten der Bibliothek auch die Substrate **3** und **6** regiodivergent.

Es zeigte sich jedoch anhand der Produktbildung, dass die Varianten möglicherweise durch eine Inhibition limitiert wurden. So unterschieden sich die Differenzen der Produktbildung im Vergleich zur wtNNMT teilweise extrem zu denen des Screenings (Tabelle 10, Abb. 24, Abb. 47-Abb. 51). Mögliche Produktinhibitionen werden auch in der Literatur für das Wildtyp-Enzym beschrieben.<sup>[116,225]</sup> Daher wurde anhand der wtNNMT die Auswirkung der möglichen Produktinhibitionen auf die Methylierung der Pyrazole untersucht. Als Modellsubstrat hierfür diente 3-Methylpyrazol (**1**) bei dem die wtNNMT die höchste Produktbildung aufwies. Die Inhibition der methylierten Produkte wurde anhand von Zugabe-Experimenten (*spiking*) untersucht (8.6.4). Hierbei wird die Produktbildung des nicht zu Reaktionsbeginn zugegebenen Regioisomers beobachtet und auf die Produktbildung ohne die Zugabe eines potentiellen Inhibitors normiert. Die in Kontrollreaktionen ohne Enzym gemessenen Produktkonzentrationen wurden zudem von der Produktbildung der

enzymatischen Reaktion subtrahiert, um die Reinheit der Produktstandards **1a** und **1b** (je 97 %) zu berücksichtigen.

Sowohl für die methylierten Produkte, als auch für SAH konnte eine deutliche Produktinhibition nachgewiesen werden (Abb. 25). Auffällig ist, dass die Inhibition bei der Zugabe von jeweils  $\sim 100 \mu\text{M}$  des jeweiligen Produktes eintrat. Die Inhibition von SAH war dabei etwas geringer, als die der methylierten Produkte und konnte durch die Addition von SAHN kompensiert werden (Abb. 58). Insgesamt zeigen diese Versuche jedoch eine multiple Produktinhibition der wtNNMT, die mutmaßlich für die geringen Umsätze verantwortlich ist.

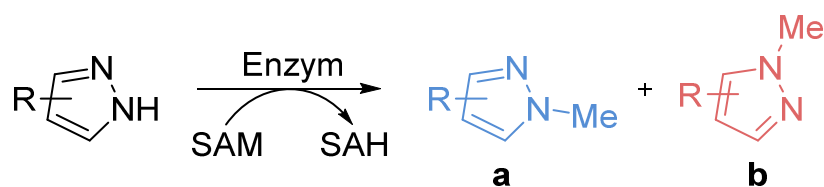


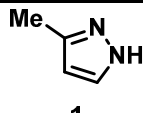
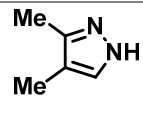
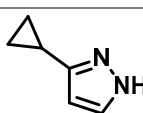
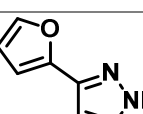
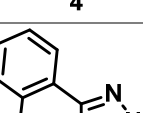
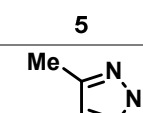
**Abb. 25: Inhibitionen der enzymatischen Methylierung von 3-Methylpyrazol (**1**) mit der Wildtyp-NNMT.** **A)** Inhibition durch zugegebenes 1,5-Dimethylpyrazol, gemessen an der Produktbildung von 1,3-Dimethylpyrazol. **B)** Inhibition durch zugegebenes 1,3-Dimethylpyrazol, gemessen an der Produktbildung von 1,5-Dimethylpyrazol. **C)** Inhibition durch zugegebenes *S*-Adenosyl-L-Homocystein, gemessen an der Gesamtproduktbildung von 1,3-Dimethylpyrazol und 1,5-Dimethylpyrazol. Eingesetzt wurden  $10 \mu\text{M}$  wtNNMT,  $2 \text{ mM}$  **1**,  $2 \text{ mM}$  SAM,  $50 \text{ mM}$  KPi, pH 7.0 für 20 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Produktbildung ist über der logarithmisch aufgetragenen InhibitorKonzentration dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar, die X-Achsen sind in logarithmischer Form dargestellt. Die Reinheit der Pyrazol-Produktstandards wurde bei der Berechnung der gemessenen Produktbildung berücksichtigt.

### 3.5.2 Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen

Da die Experimente zur Produktinhibition der wtNNMT auf eine Beeinflussung durch die methylierten Produkte und SAH hinwiesen, war es das Ziel, ausgewählte Varianten in einem durch Inhibition möglichst unbeeinträchtigten System zu untersuchen. Hierfür wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen untersucht, da diese höchstwahrscheinlich nicht durch eine Inhibition beeinträchtigt werden. Für die Vergleichbarkeit aller Enzyme wurden dieselben Reaktionsbedingungen für alle Reaktionen mit 50  $\mu\text{M}$  gereinigtes Enzym, 2 mM der Pyrazole und SAM und 37 °C Reaktionstemperatur angewandt. Auch wurden alle Reagenzien und Reaktionsgefäße bei 37 °C vorgewärmt, um eine Verzögerungs-Phase (*lag-phase*) zu vermeiden. Die  $V_0$  wurde in Microsoft Excel als Steigung eines linearen Fits der Messpunkte bestimmt (8.6.8).

Neben den exzellenten Regioselektivitäten (<99%) und der Regiodivergenz für nahezu alle Pyrazolsubstrate (5.5.1) wurden in der Analyse der Anfangsgeschwindigkeiten deutliche Aktivitätssteigerungen der Varianten beobachtet (Abb. 26 & Abb. 59). Einige Varianten zeigten eine Steigerung der Aktivität um Faktoren von ~10 im Vergleich zur wtNNMT. Für zwei Substrate (**2** und **6**) erreichte Variante v49 sogar eine 72- bzw. 118-fache Aktivität des Wildtyps. Die Aktivität der wtNNMT sank dabei mit steigender Sterik der Pyrazolsubstituenten. Dies in Zusammenhang mit den erreichten exzellenten Selektivitäten bei gleichzeitigen Aktivitätssteigerungen zeigt die Verbesserung der Mutanten gegenüber dem Wildtyp-Enzym dar. Die meisten deutlichen Aktivitätssteigerungen fanden sich darüber hinaus für die selektive Methylierung des chemisch nicht-favorisierten Pyrazol-Stickstoffs.



Substrat	Variante	Aktivität [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	Selektivität <sup>a)</sup> [%] (a:b)	Aktivitäts- Steigerung <sup>b)</sup>
 <b>1</b>	wtNNMT	0,64	67 : 33	
	v17	0,03	7 : <b>93</b>	0,05
	v49	5,7	<b>86</b> : 14	8,9
 <b>2</b>	wtNNMT	0,92	40 : 60	
	v40	0,59	4 : <b>96</b>	0,65
	v49	66	13 : <b>87</b>	<b>72</b>
 <b>3</b>	wtNNMT	0,78	62 : 38	
	v36	8,9	1 : <b>&gt;99</b>	<b>11</b>
	v49	5,4	<b>90</b> : 10	7,0
 <b>4</b>	wtNNMT	0,22	42 : 58	
	v28	0,05	<b>&gt;99</b> : 1	0,21
	v36	0,85	1 : <b>&gt;99</b>	3,8
 <b>5</b>	wtNNMT	0,01	41 : 59	
	v28	0,08	<b>&gt;99</b> : 1	7
	v49	0,18	<b>92</b> : 8	<b>17</b>
 <b>6</b>	wtNNMT	0,014	57 : 43	
	v22	0,57	<b>96</b> : 4	<b>41</b>
	v49	1,6	6 : <b>94</b>	<b>118</b>

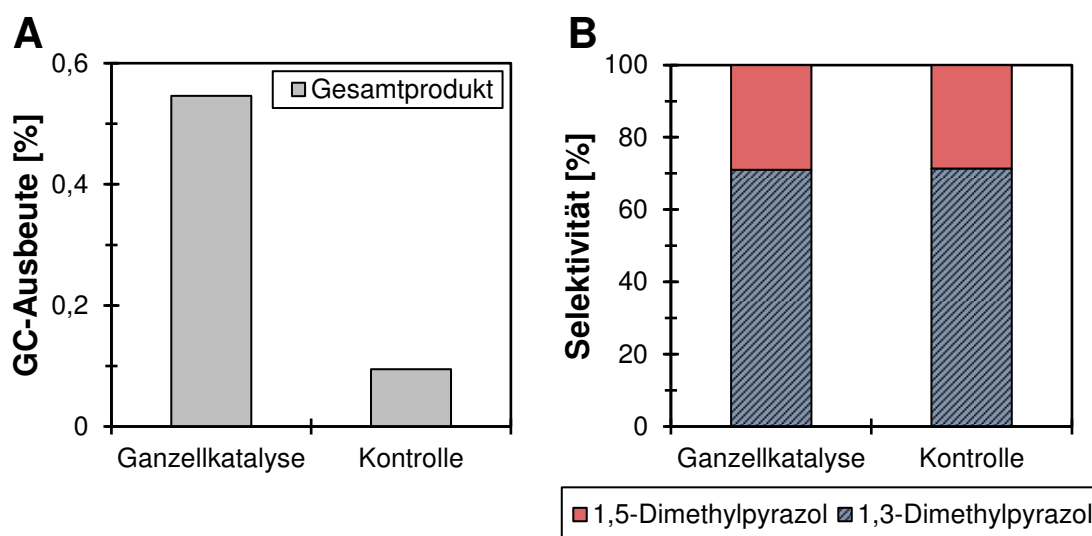
**Abb. 26: Analyse der Anfangsgeschwindigkeit der Methylierungsreaktionen von ausgewählten Varianten mit den Pyrazolen 1-6.** Eingesetzt wurden 2 mM Pyrazol, 2 mM SAM und 50  $\mu\text{M}$  Enzym bei 37 °C. Alle enzymatischen Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Bestimmtheitsmaße für alle Anfangsgeschwindigkeiten können im Detail Abb. 59 entnommen werden. <sup>a)</sup>Die Regioselektivitäten wurden in Endpunktmessungen in Triplikaten bestimmt. Die jeweiligen Standardabweichungen können im Detail Tabelle 10 entnommen werden. <sup>b)</sup>Die Aktivitätssteigerung wurde anhand der Division der Anfangsgeschwindigkeit der Variante durch die Anfangsgeschwindigkeit des NNMT-Wildtyps berechnet.



### 3.6 *In vivo* Methylierung von 3-Methylpyrazole mit *E. coli* BL21 (DE3)

Die Anwendbarkeit von MTs wird in der Regel durch den teuren und instabilen Cofaktor SAM limitiert. Eine *in vivo*-Methylierung von Pyrazolen bietet den Vorteil, dass das benötigte SAM durch *E. coli* selbst synthetisiert und vor allem regeneriert wird. Der Einsatz von teurem SAM kann somit vermieden werden, das besonders für ein technische Anwendungen von Vorteil ist. Die Möglichkeit einer solchen Ganzzellkatalyse wurde in einer *proof of concept*-Studie untersucht. Hierfür wurde mit Variante v49 in *E. coli* Express (*E. coli* BL21 (DE3) Stamm) das Modellsubstrat 3-Methylpyrazol (**1**) umgesetzt. Nach der Expression wurden die Zellen schonend zentrifugiert, einmal mit Reaktionspuffer gewaschen und zuletzt mit einem Puffer mit zusätzlich 10 mM Glucose resuspendiert. Eingesetzt wurde eine finale Biomassekonzentration von 100 mg<sub>cww</sub>/mL, mit 10 mM **1** bei 37 °C und 180 rpm für 72 h (8.6.9). Im Vergleich zur zuvor aufgeschlossenen Kontrollreaktion konnte eine deutlich höhere Produktbildung beobachtet werden (Abb. 27).

Diese Ergebnisse geben einen ersten Hinweis darauf, dass eine Methylierung von Pyrazolen mithilfe einer glucosebasierten natürlichen Regeneration in ganzen Zellen möglich ist.



**Abb. 27:** *In vivo* Methylierung von 3-Methylpyrazol. Gesamtproduktbildung (A) und Regioselektivitäten (B) der Ganzzellkatalyse von 3-Methylpyrazol (**1**) mit v49 in *E. coli* Express im Vergleich zu einer Kontrollreaktion mit aufgeschlossenen Zellen. Eingesetzt wurde eine finale Biomassekonzentration von 100 mg<sub>cww</sub>/mL mit 10 mM **1** und 10 mM Glucose in 500  $\mu$ L Reaktionen in 50 mM KP<sub>i</sub> bei 37 °C für 72 h.

### 3.7 Identifikation promiskuitiver Halogenid-Methyltransferasen

Um zu demonstrieren, dass mit der Mutantenbibliothek nicht nur Methyl- sondern auch Alkyl-Gruppen (Ethyl, Propyl) übertragen werden können, wurde in einem ersten Schritt ein SAM-Regenerationssystem nach dem von Liao und Seebeck<sup>[123]</sup> beschriebenen Prinzip etabliert. In diesem System belädt eine Halogenid-Methyltransferase (HMT) in einer zyklischen Kaskade SAH mit der Methylgruppe von Iodmethan und hat das Potential aus SAH und einfachen Halogenalkanen nicht-natürliche SAM-Analoga (NSAs) enzymatisch zu synthetisieren. Da die publizierte HMT aus *Chloracidobacterium thermophilum* (*cthHMT*) nach aktuellem Stand auf den Transfer von Methylgruppen beschränkt ist, wurden in Kooperation mit Benjamin Aberle aus einer enzymologischen Studie von 2009<sup>[113]</sup> fünf weitere HMTs als Startpunkte identifiziert. Drei dieser HMTs gehören den verschiedenen Bereichen der evolutionären Entwicklung der Plantae (*bmaHMT* aus *Batis maritima*), Fungi (*acHMT* aus *Aspergillus clavatus*) und Bacteria (*bxeHMT* aus *Burkholderia xenovrans*) an und wurden aufgrund ihrer Aktivität in der Übertragung von Methyl aus Iod-, Chlor- und Brommethan ausgewählt. Eine weitere HMT aus *Arabidopsis thaliana* (*athHMT*) wurde auf Grund der vorhandenen Kristallstruktur gewählt, die als einzige dieser Enzymfamilie gelöst ist<sup>[112]</sup>. Nach der Analyse eines Sequenz-Ähnlichkeits-Netzwerks (8.9.4) wurde zusätzlich eine HMT aus *Synechococcus elongatus* (*seHMT*) der Auswahl hinzugefügt, da diese mit einem ganzen Cluster direkt verbunden ist, d.h. zu allen Sequenzen des Clusters in direkter Nachbarschaft liegt. Die Auswahl der HMTs wurde als synthetische DNA bestellt, in Zusammenarbeit mit Benjamin Aberle in das Plasmid pBAD33 kloniert und in den SAHN-knockout Stamm *E. coli* JW0155 aus der Keio-Kollektion<sup>[226]</sup> transformiert, da dieser Stamm den SAH-Cofaktor der HMTs nicht degradiert (8.3).

In der, in Kooperation mit Benjamin Aberle, begleiteten Bachelorarbeit von Samuel Kienzle<sup>[227]</sup> wurden diese sechs Enzyme charakterisiert. Dafür wurden sie hinsichtlich ihrer promiskuitiven Fähigkeit enzymatisch aus SAH und verschiedenen Halogenalkanen NSAs zu synthetisieren untersucht. In ersten Experimenten wurde die Promiskuität der HMTs hinsichtlich verschiedener Halogenalkane studiert. Alle getesteten HMTs konnten in löslicher Form exprimiert werden (Abb. 44) und waren in der Lage, Iodmethan (MeI) für die Bildung von SAM aus SAH zu nutzen (Tabelle 1). Chlor- und Brommethan wurden aufgrund ihrer toxischen Eigenschaften aus Sicherheitsgründen nicht untersucht.. Die Bildung der NSAs wurde durch LC-MS-Analysen anhand der Massenspektren und der Detektion der Hauptmassen der NSAs bestätigt (Abb. 60).

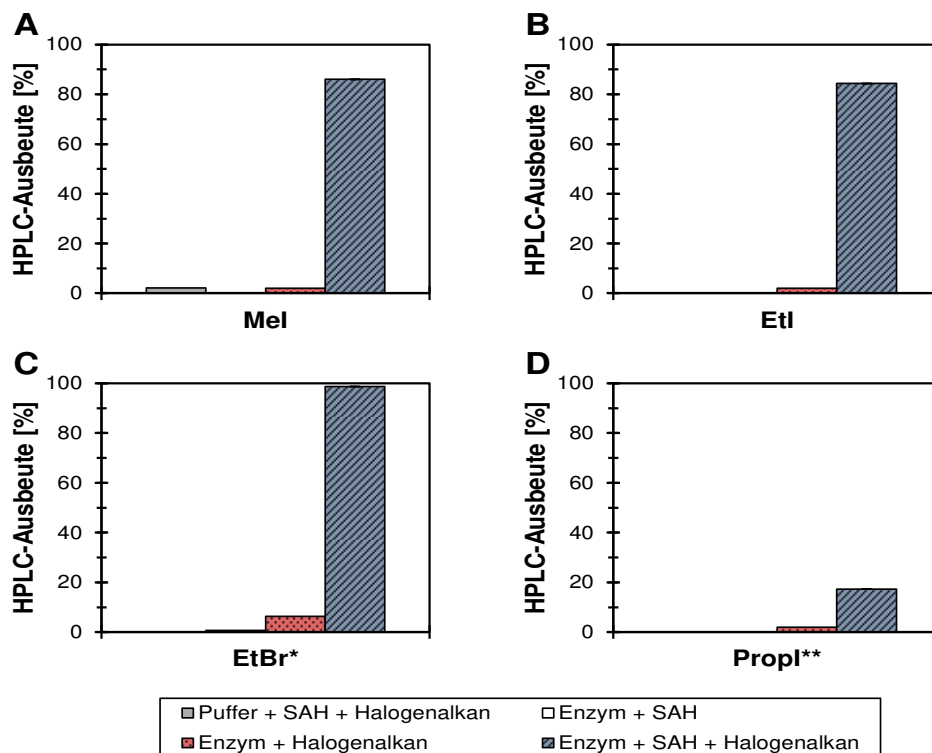
Für die anderen getesteten Halogenalkane zeigten sich die meisten Enzyme zumeist sehr restriktiv, einzig die HMT aus *Aspergillus clavatus* (*acHMT*) konnte alle getesteten Halogenethane, -propane

**Tabelle 1: Substratscreening von Halogenid-Methyltransferasen (HMTs) mit verschiedenen Halogenalkanen.** Jedes Halogenalkan wurde in einem individuellen Experiment getestet, um die Promiskuität der verschiedenen HMTs zu vergleichen. In 500 µL Biotransformationen wurden 245 µL Lysat, 1 mM *S*-Adenosyl-L-Homocystein und 40-80 Äquivalente (Äquiv.) der Halogenalkane eingesetzt und bei 25 °C für 20 h inkubiert. MeI, Iodmethan; EtI, Iodethan; EtBr, Bromethan; PropI, 1-Iodpropan; ButI, Iodbutan; ButBr, Brombutan, ButCl, Clorbutan. Tabelle verändert nach S. Kienzle (2020)<sup>[227]</sup>

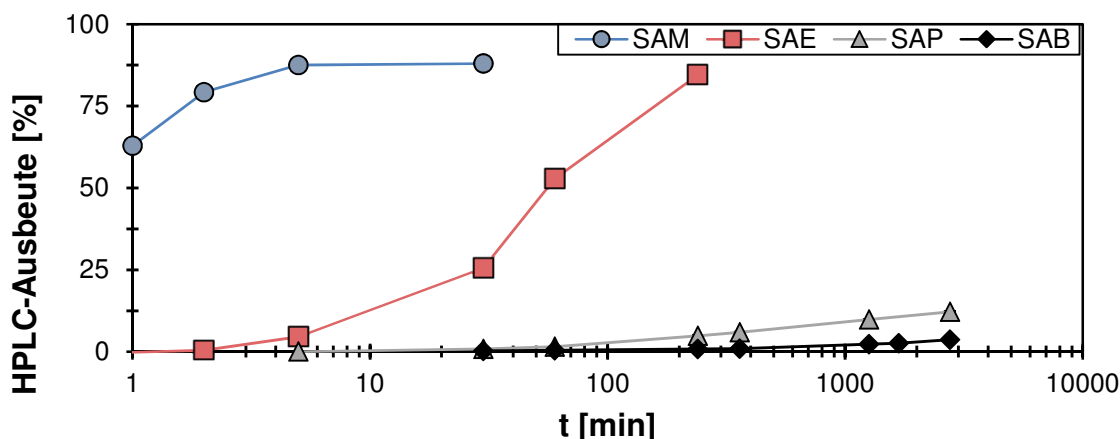
	<b>MeI</b> (80 Äquiv.)	<b>EtI</b> (60 Äquiv.)	<b>EtBr</b> (70 Äquiv.)	<b>PropI</b> (50 Äquiv.)	<b>ButI</b> (40 Äquiv.)	<b>ButBr</b> (50 Äquiv.)	<b>ButCl</b> (50 Äquiv.)
HPLC-Ausbeute [%]							
Puffer	1						
Leervektor	10						
<i>cth</i> HMT	97	1			1		
<i>ath</i> HMT	100	44	1				
<i>acl</i> HMT	100	78	99	31	3	2	1
<i>bma</i> HMT	99	81	100	1			
<i>bxe</i> HMT	99	2	2				
<i>sel</i> HMT	100	61	21	3	1		

und -butane umsetzen. In der Folge wird dieses Enzym als NSA-Synthase bezeichnet. Die Kombination von Halogenalkanen mit der NSA-Synthase zeigte das Alkylierungspotential des mit dem Enzym co-aufgereinigten SAHs, dessen Anwesenheit durch HPLC-Analyse von NSA-Lösungen zusätzlich bestätigt werden konnte. Kontrollexperimente unter Zugabe von SAH und MeI, jedoch ohne NSA-Synthase, zeigten, dass diese Reaktionen enzymkatalysiert und nicht in einer chemischen Hintergrundreaktion stattfand (Abb. 28).

In einer begleiteten Masterarbeit wurde die Bildung von NSAs mit Iodmethan, -ethan, -propan und -butan durch die NSA-Synthase in Zeitverläufen von A.N. Egler-Kemmerer<sup>[223]</sup> weiter charakterisiert. Im Allgemeinen zeichnete sich der Trend ab, dass die Aktivität der NSA-Synthase mit steigender Kettenlänge der Halogenalkane abnahm (Abb. 29). Während *S*-Adenosyl-L-Ethionin (SAE) noch zu ca. 85 % gebildet wurde, synthetisierte die NSA-Synthase *S*-Adenosyl-L-Propionin (SAP) nach 46 h nur noch zu 12 %, *S*-Adenosyl-L-Butionin (SAB) nur noch zu 3,6 %. Die Reaktionen mit EtI, PropI und ButI verliefen dabei teilweise deutlich langsamer als mit MeI.



**Abb. 28: Die NSA-Synthase-katalysierte Alkylierung von S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) und Kontrollreaktionen.** A) Enzymatische Methylierung von SAH mit Iodmethan (MeI) und B) enzymatische Ethylierung von SAH mit Iodethan (EtI). Eingesetzt wurden 1 mM SAH, 10 Äquivalenten des entsprechenden Halogenalkans und 50  $\mu$ M gereinigtes Enzym bei 25°C für 20 h. C) Die Reaktion mit Bromethan (EtBr\*) wurde unter den gleichen Bedingungen wie mit MeI und EtI durchgeführt, jedoch mit 67 Äquivalenten EtBr in Lysatreaktionen (245  $\mu$ L Lysat anstelle des gereinigten Enzyms). D) Die Reaktion mit Iodpropan (PropI\*\*) wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Reaktionen mit MeI und EtI durchgeführt, jedoch mit 50 Äquivalenten PropI. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten, mindestens jedoch von Duplikaten und können so klein sein, dass sie vom Rahmen der Säulen überlagert werden. Abbildung verändert nach S. Kienzle (2020)<sup>[227]</sup> und A.N. Egler-Kemmerer (2020).<sup>[223]</sup>



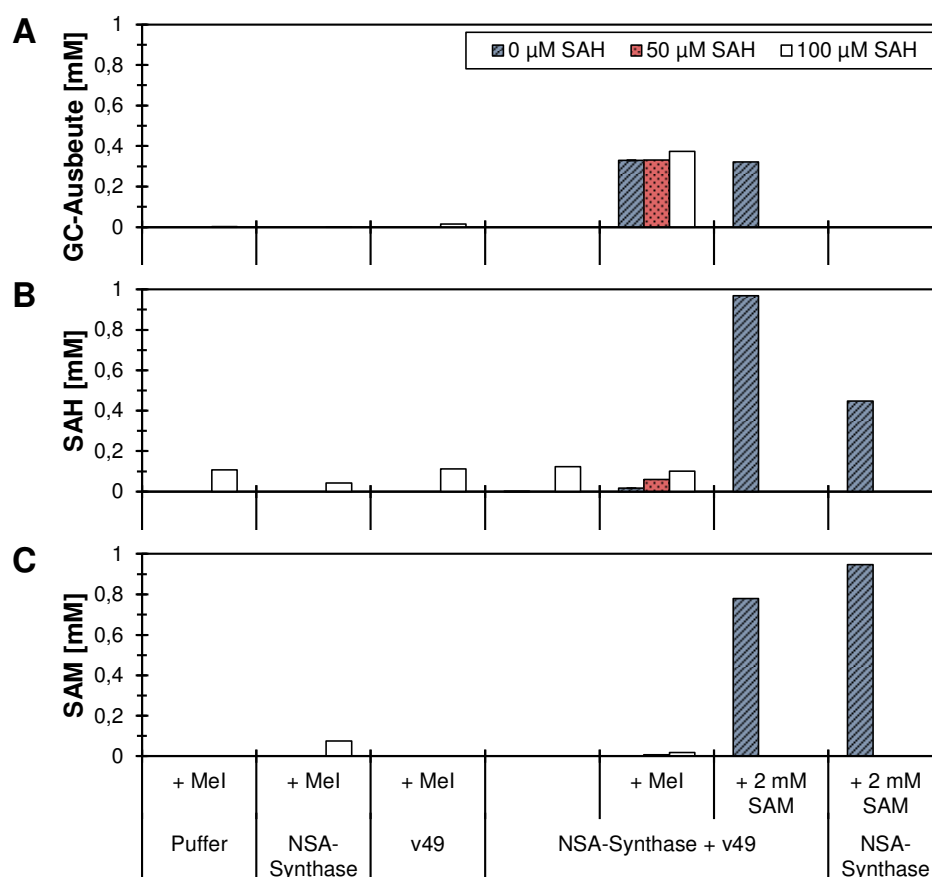
**Abb. 29: Zeitlicher Verlauf der Bildung nicht-natürlicher S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Analoge durch die NSA-Synthase.** SAM wurde mit der höchsten Aktivität bei Verwendung von Iodmethan gebildet, gefolgt von S-Adenosyl-L-Ethionin (SAE) bei Verwendung von Iodethan und der langsamsten Bildung von S-Adenosyl-L-Propionin (SAP) und S-Adenosyl-L-Butionin (SAB) bei Verwendung von Iodpropan bzw. Iodbutan. 50  $\mu$ M NSA-Synthase, 1 mM SAH und 10 Äquivalente jedes Halogenalkans wurden in 500  $\mu$ L Reaktionen bei 25°C inkubiert. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von Triplikaten und können so klein sein, dass sie von den Markierungen überlagert werden. Die Reaktionszeit ist in logarithmischer Form dargestellt. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020).<sup>[223]</sup>

### 3.8 Alkylierung von Pyrazolen unter Verwendung von Halogenalkanen

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass NSAs enzymatisch durch die NSA-Synthase synthetisiert werden können, wurde diese in einem nächsten Schritt auf Pyrazole übertragen. In ersten Versuchen mit NSA-Synthase, v49 und Modellsubstrat **1** konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Methylierung mit Iodmethan in diesem bienzymatischen Cofaktorregenerationssystem möglich ist (Abb. 30A). Die höchste Produktbildung der Kaskade war vergleichbar mit der bei stöchiometrischem Einsatz von SAM. Ein Unterschied der Produktbildung bei den verschiedenen SAH-Konzentrationen konnte nicht beobachtet werden. Die geringe Produktbildung der Kontrollreaktionen von v49 mit MeI und 100  $\mu$ M SAH, zeigt eine marginale chemische Methylierung von SAH durch MeI. Außer einer geringen chemischen Hintergrundreaktion in den Reaktionen der NSA-Synthase mit MeI und 100  $\mu$ M SAH, sowie der Pufferkontrolle zeigte keine der Negativkontrollen eine Produktbildung der methylierten Pyrazole. Die Selektivität der Methylübertragung auf **1** mit v49 betrug im Mittel aller Reaktionen 80 % für **1a**. HPLC-Messungen der Proben zeigten, dass die Enzymlösungen bereits (co-aufgereinigtes) SAH enthielten (Abb. 30B). Die Konzentration des co-aufgereinigten SAHs betrug für beide Enzyme gemeinsam 0,017 mM. Die Untersuchung der SAM-Konzentrationen der Proben zeigte, dass SAM nur in den Biotransformationen mit 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M SAH gebildet wurde (Abb. 30C). Die einzige Ausnahme stellte die Kontrollreaktion mit der natürlichen Reaktion der NSA-Synthase mit 100  $\mu$ M SAH und MeI dar. Interessanterweise konnten in diesem Experiment nur 64 % des theoretisch zu Verfügung stehenden SAHs zu SAM umgesetzt werden.

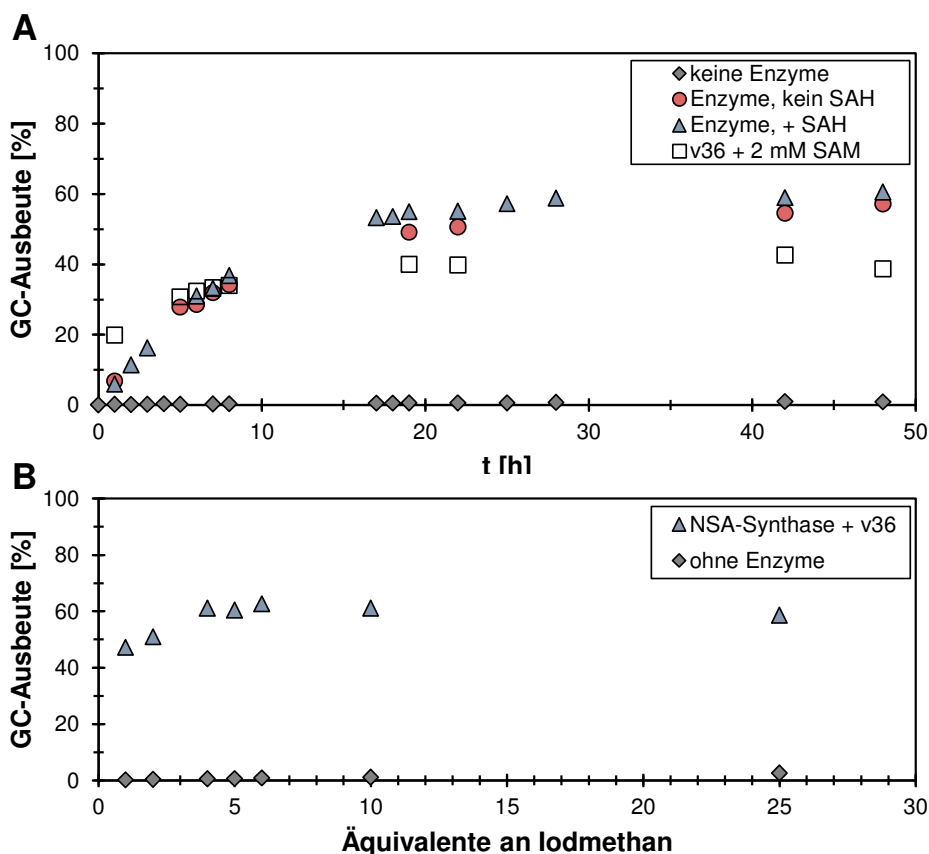
Diese ersten Ergebnisse zur zyklischen enzymatischen Methylierungskaskade mittels MeI wurden in weiteren Experimenten anhand einer aktiveren und regioselektiveren Substrat-Enzym-Kombination eingehender studiert. Aus der Endpunktbestimmung der enzymatischen Methylierung mit stöchiometrischem Einsatz von SAM wurde hierfür Variante v36 mit 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) als die selektivste Enzym-Substrat-Kombination (>99 % **3b**) bei gleichzeitig hoher Produktbildung (35 %) identifiziert.

Von A.N. Egler-Kemmer wurde in einer begleiteten Masterarbeit im Folgenden die Produktbildung der bienzymatischen Kaskade mit v36 und **3**, mit dem Ziel einer Reaktion im präparativen Maßstab optimiert. In einem ersten Experiment wurde der Zeitverlauf der bienzymatischen Kaskade mit und ohne Zugabe des Cofaktors SAH untersucht (Abb. 31A). In den ersten 5 h der bienzymatischen Kaskade mit Zugabe von SAH (blau) stieg die Produktbildung linear an, um nach 28 h die maximale Produktbildung von ~60 % zu erreichen. Während der ersten 8 h konnte hierbei zwischen mit oder



**Abb. 30: Bienzymatische Kaskade mit NSA-Synthase und v49 und Kontrollreaktionen zur enzymatischen Methylierung von 3-Methylpyrazol (1) mit Iodmethan (MeI) bei variierender Konzentration von *S*-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). A) Gesamtproduktbildung von 1,3-Dimethylpyrazol (1a) und 1,5-Dimethylpyrazol (1b), gemessen über GC-FID. B) HPLC-DAD-Ausbeute von SAH und C) von *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM). Eingesetzt wurden je 50 μM Enzym, 2 mM 1, 1 mM SAM und 10 Äquivalente MeI bei 37 °C für 20 h. In Kontrollreaktionen mit stöchiometrischem Einsatz von SAM wurden 2 mM des Cofaktors eingesetzt. Alle in Kontrollreaktionen ausgeschlossenen Reagenzien und Enzyme wurden jeweils in gleichem Volumen durch Reaktionspuffer (50 mM KP<sub>i</sub>, pH 7,0) ersetzt.**

ohne Zugabe von SAH kein Unterschied beobachtet werden. Im weiteren Reaktionsverlauf zeigte sich eine etwas geringere Produktbildung ohne die Zugabe von SAH, jedoch war die Differenz der Unikate nie größer als 5 %. Am Ende der Reaktion betrug die Differenz sogar nur noch 2 %. Im Vergleich hierzu verläuft die Methylierung unter Verwendung von SAM zu Beginn der Reaktion schneller, blieb allerdings nach rund 20 h bei ca. 40 % gebildetem Produkt. Die Selektivität der Produktbildung (>99 % **3b**) entsprach in diesen Versuchen der enzymatischen Methylierung mit v36 (vergleiche Abb. 24). Kontrollreaktionen ohne Enzyme, jedoch mit **3** und MeI zeigten eine langsam über die Zeit ansteigende chemische Hintergrundreaktion, die über den gesamten Reaktionsverlauf immer kleiner als 1 % blieb. Diese Experimente offenbarten die optimale Reaktionsdauer von 30 h für die bienzymatische Kaskade und bestätigten erneut, dass eine zusätzliche Supplementation des Cofaktors SAH nicht notwendig ist.<sup>[223]</sup>



**Abb. 31: Charakterisierung der enzymatischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) durch die bienzymatische Kaskade mit der NSA-Synthase und v36 mittels Iodmethan (MeI). A) Zeitverläufe der Reaktion von NSA-Synthase und v36 (je 50  $\mu$ M) mit 2 mM von **3**, 10 Äquivalenten MeI und mit/ohne Zugabe von 100  $\mu$ M SAH bei 37 °C. Eine Vergleichsreaktion wurde mit 2 mM SAM durchgeführt. B) Produktbildung der enzymatischen Kaskade zur Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (**3**) mit variierenden Iodmethan-Überschüssen. Eingesetzt wurden je 50  $\mu$ M der Enzyme v36 und NSA-Synthase, sowie 2 mM **3** bei 37 °C für 20 h. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020)<sup>[223]</sup>**

Als nächstes wurde die Produktbildung des methylierten Produkts als Funktion des MeI-Überschusses (1, 2, 4, 5, 6, 10, 25 Äquivalente) in Bezug auf 2 mM des Substrats **3** untersucht. Die höchste Produktbildung (61 %) wurde mit 10 Äquivalenten MeI erreicht (Abb. 31B). Eine Reduktion zu einem äquimolaren Verhältnis verringerte die Produktbildung nur geringfügig auf 47 %. Mit steigendem Überschuss an MeI erhöhte sich jedoch die nichtenzymatische Hintergrundreaktion. Temperatur- und pH-Studien ergaben ein Temperaturoptimum von 37 °C und ein pH-Optimum bei pH 7,0 für die bienzymatische Kaskade (Abb. 61A,B). Während bei 45 °C nur noch 7 % Produktbildung beobachtet werden konnte, fand bei 55 °C keine Katalyse mehr statt. Eine Reduktion auf 30 °C führte zu einem Aktivitätsverlust. Eine Steigerung der Substratkonzentration mit je 10 Äquivalenten MeI zeigte ab 20 mM MeI starke nichtenzymatische Reaktionen für nur geringfügig gesteigerte Substratkonzentrationen (Abb. 62).

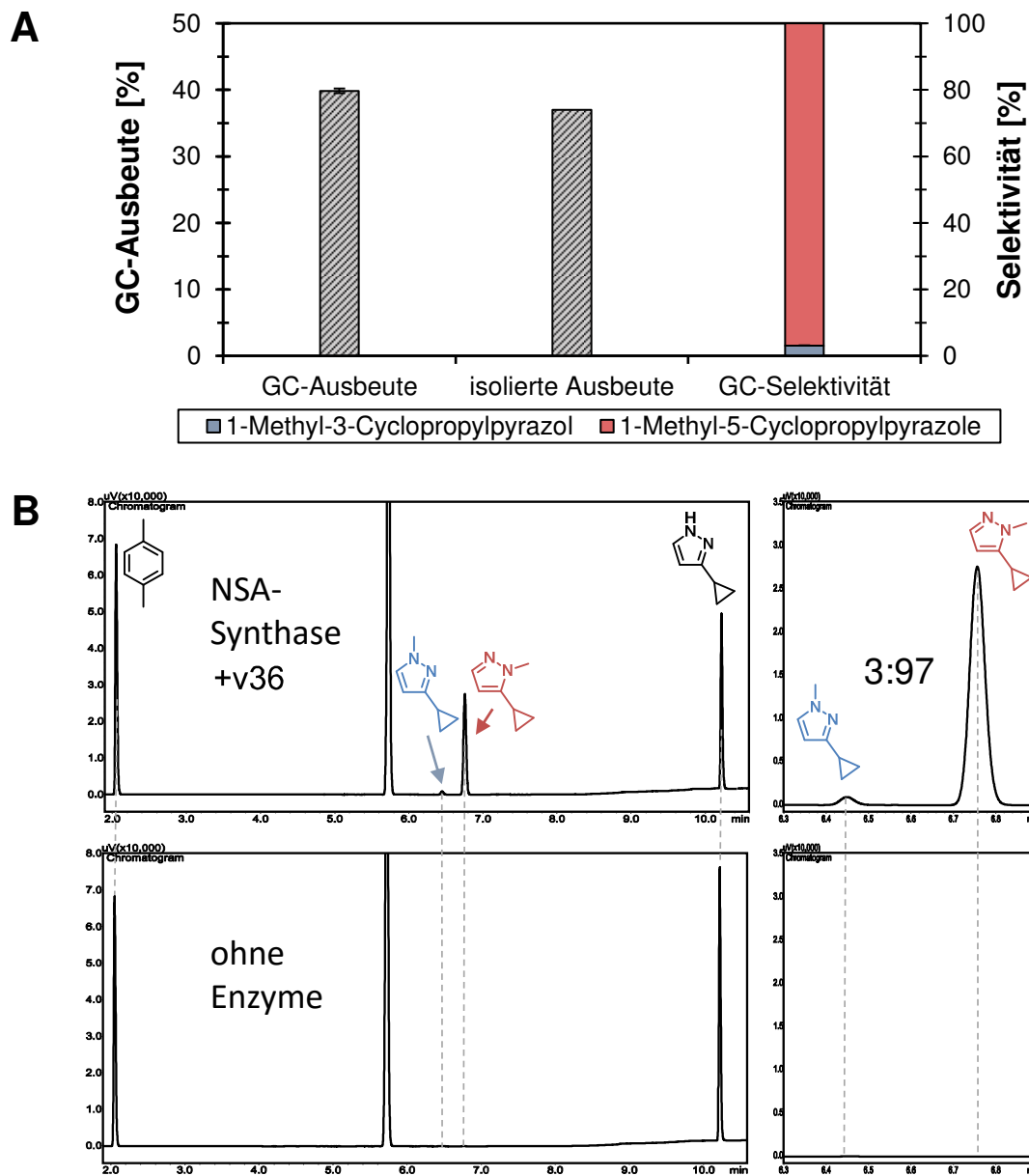
Mit konstanten 20 mM MeI konnte die Substratkonzentration bis 25 mM bei gleichzeitiger Steigerung der Produktkonzentration bis 5,2 mM erhöht werden (Abb. 61C). Auch mit 50 mM **3** konnte noch 7 % Produktbildung beobachtet werden. Die prozentuale GC-Ausbeute nahm von 67 % bei 1 mM bis 50 mM **3** nahezu exponentiell ab (Abb. 61D).

In *Feeding*-Experimenten wurde von A.N. Egler-Kemmerer zudem untersucht, ob die Produktbildung der Kaskade durch eine veränderte Reaktionsführung verbessert werden kann. Die einmalige Zugabe der einzelnen Enzyme, SAH, MeI, und **3**, eine gemeinsame Zugabe von **3** und MeI nach 20 h, sowie eine kontinuierliche Zugabe von MeI bzw. **3** durch eine Spritzenpumpe, konnten in Experimenten über 92 h keinen positiven Effekt auf die Produktbildung der Kaskade ausüben (Abb. 64 & Abb. 65).

### 3.8.1 Präparative enzymatische Synthese von 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol mit der bienzymatischen Kaskade

Um die Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurde in einer begleiteten Masterarbeit<sup>[223]</sup> die enzymatische Methylierung mittels der etablierten Kaskade und Iodmethan im präparativen Maßstab von A.N. Egler-Kemmerer durchgeführt (8.6.14). Hierfür wurde das Reaktionsvolumen 1000-fach auf 500 mL in einer 1 l-Schottflasche erhöht. Die Enzymkonzentrationen (je 50  $\mu$ M) und die Substratkonzentration (2 mM  $\cong$  110 mg) entsprachen der Reaktionen im kleinen Maßstab. Einzig die 10 Äquivalente Iodmethan wurden zuerst in bereits temperiertem Puffer gelöst, sodass auf das Cosolvent DMSO in Hinsicht auf die Produktreinigung via Säulenchromatographie verzichtet werden konnte. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der beiden Enzyme gestartet. Aufgrund der veränderten Geometrie des Reaktionsgefäßes wurde die Reaktion mit 135-150 rpm in einem Aquatron-Schüttler durchmischt. Nach Ende der Reaktion wurden drei Proben für eine GC-Analyse entnommen. Diese ergab eine Produktbildung von 40 % **3b** und eine kalkulierte Ausbeute von 47,4 mg bei einer exzellenten Selektivität von >97 % (Abb. 32). Die Trennung der Konstitutionsisomere, zuerst über Kugelrohrdestillation und später über eine Säulenchromatographie, konnte nicht erreicht werden. Die säulenchromatographisch vom Substrat getrennte Gesamtproduktfraktion enthielt nach NMR-Analyse 46,1 mg beider Produkte, in denen 44,1 mg **3b** vertreten war. Dies entspricht einer isolierten Ausbeute von 37 % **3b** in Bezug auf das eingesetzte Startmaterial. Darüberhinaus konnten 55 % des Startmaterials in Reinform zurückgewonnen werden. Die Kontrollreaktion ohne Enzyme wies keine Produktbildung auf (Abb. 32B).

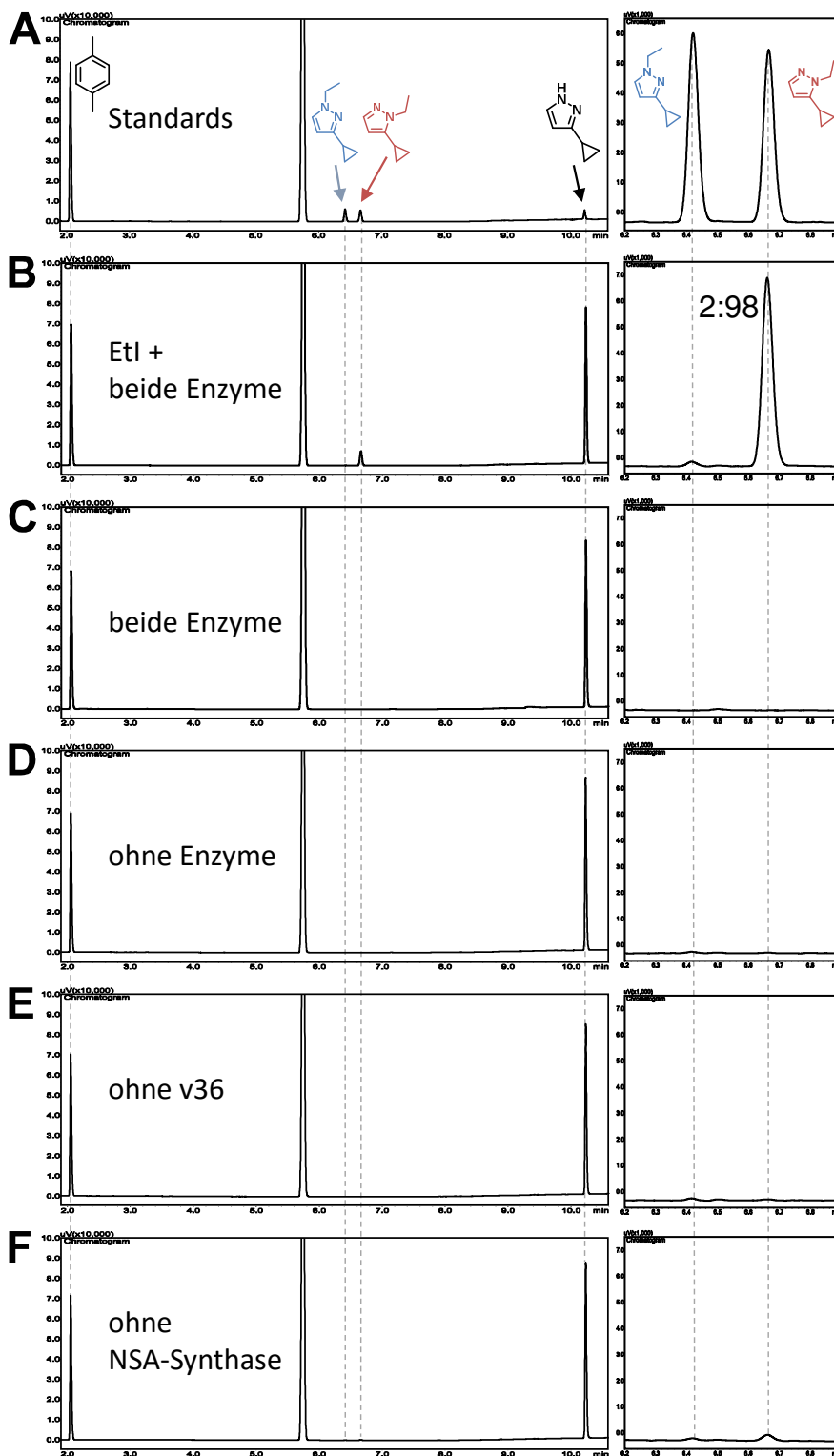




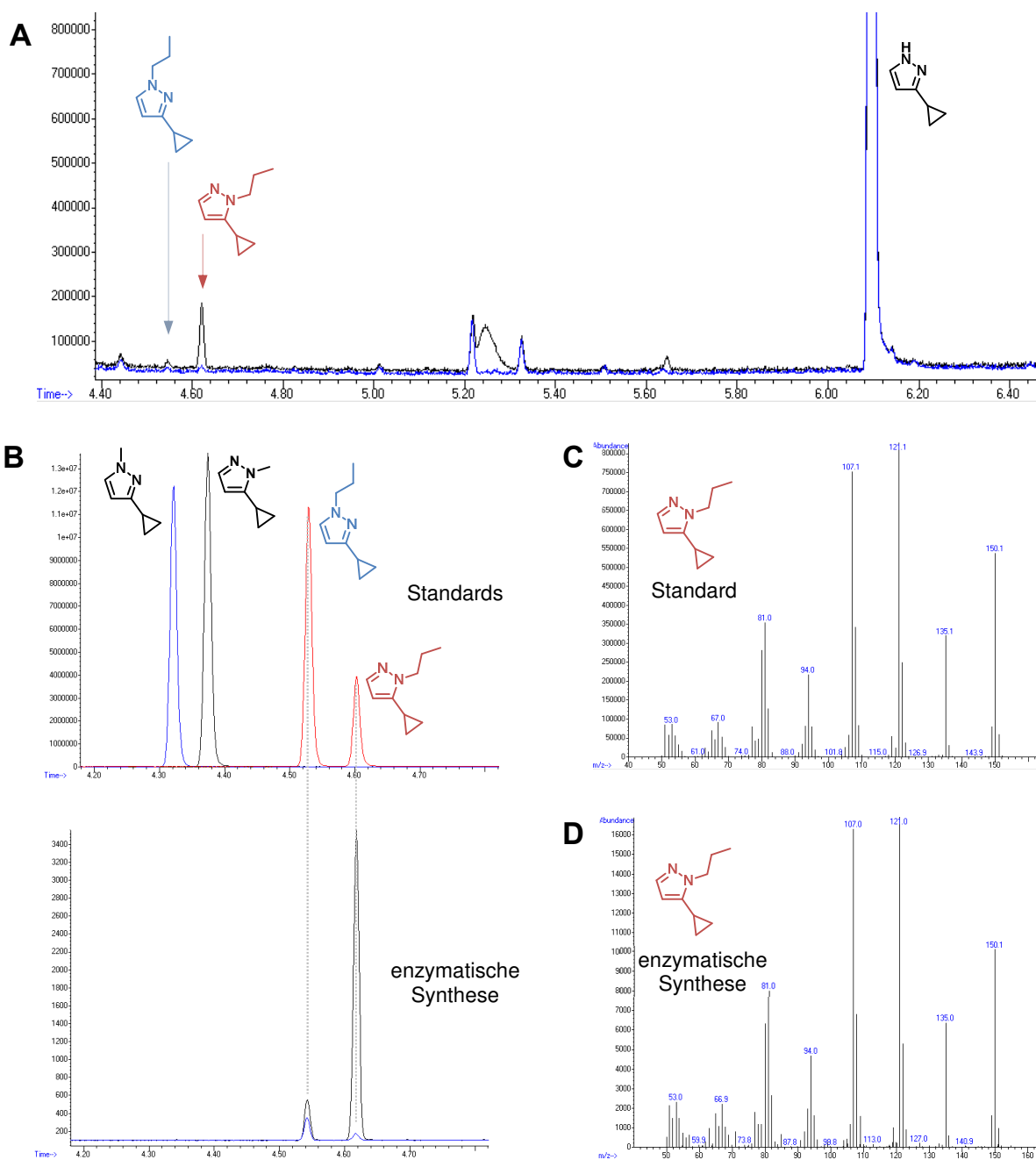
**Abb. 32: Synthese von 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol (3b) im präparativen Maßstab durch die bienzymatische Kaskade von NSA-Synthase und v36. A) GC-Ausbeute und isolierte Ausbeute, sowie Selektivität der Reaktion. B) GC-Chromatogramme der präparativen Reaktion (oben) und einer Kontrollreaktion ohne Enzyme (unten) mit Vergrößerung der Produktpeaks (rechts). Die Chromatogramme zeigen den internen Standard, die methylierten Produkte und das Substrat. In der 500 mL-Reaktion wurden je 50  $\mu$ L der beiden Enzyme eingesetzt, sowie 2 mM 3-Cyclopropylpyrazol (3) und 10 Äquivalente Iodmethan eingesetzt. Die Reaktion dauerte 40 h bei 37 °C. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020).<sup>[223]</sup>**

### 3.8.2 Enzymatische Ethylierung und Propylierung von 3-Cyclopropylpyrazol

Das Ziel der folgenden Experimente der begleiteten Masterarbeit von A.N. Egler-Kemmerer<sup>[223]</sup> war es, erstmals länger-kettige Alkylgruppen mit der bienzymatischen Kaskade zu übertragen. Da die NSA-Synthase mit Halogenethanen und -propan die höchsten Produktbildungen nach Iodmethan erreichte, lag der Fokus dieser Studien auf der Übertragung von Iod- und Bromethan, sowie von Iodpropan auf **3**. Unter den gleichen Bedingungen wie für die Methylierung konnte für Iodethan eine Produktbildung von 7 % 1-Ethyl-5-Cyclopropyl (**7b**) mit 97-prozentiger Selektivität beobachtet werden (Abb. 33). Die Ethylierung konnte nach einer Optimierung der Reaktionstemperatur zu 30 °C (Abb. 633) und einer Verlängerung der Reaktionsdauer auf 72 h zu einer Produktbildung von 9 % mit >98 % **7b** gesteigert werden. Die Alkylierung von **3** mit Bromethan gelang zu 6 % mit einer Selektivität von >97 % **7b**. Jedoch konnte auch unter diesen für den Ethyl-Transfer optimierten Bedingungen keine Übertragung von Propyl auf **3** festgestellt werden. Da sich die Bildung von SAP durch die NSA-Synthase bereits in vorherigen Experimenten als gering zeigte (Abb. 29), sollte die Propylgruppe von Iodpropan anhand einer zweistufigen *one-pot*-Kaskade auf **3** übertragen werden. Dies ermöglichte beide Reaktionsschritte zu den jeweils besten bekannten Bedingungen durchzuführen. Zuerst synthetisierte die NSA-Synthase (75 µM) bei 25 °C und für 20 h das propylierte SAM-Analog. Im Anschluss wurde die Variante v36 (75 µM) für die finale Propylierung bei 37 °C für 30 h hinzugefügt. Auf diese Weise konnte 3,0 µM 1-Propyl-5-Cyclopropylpyrazol (**8b**) mit einer Selektivität von >97 % synthetisiert werden (Abb. 34). Das Produkt konnte anhand der Übereinstimmung der Retentionszeit eines authentischen Standards, und aufgrund der aufgenommenen MS-Spektren bestätigt werden (Abb. 34C und D). Die Kontrollreaktion ohne Enzyme zeigte eine geringe, nichtselektive Hintergrundreaktion.



**Abb. 33: GC-Chromatogramme der enzymatischen Ethylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) durch NSA-Synthase und v36 mittels Iodethan (EtI).** A) Standardkomponenten (interner Standard p-Xylen, DMSO (Retentionszeit 5,75 in), ethylierte Produkte (7a,b), und 3. B) Produkt der enzymatischen Ethylierung von 3. C) Reaktion mit beiden Enzymen, ohne EtI. D) Reaktion mit EtI, ohne Enzyme. E) Reaktion ohne v36 und F) ohne NSA-Synthase. Eingesetzt wurden 50  $\mu$ M der Enzyme, 2 mM 3 und 10 Äquivalente EtI bei 30 °C für 72 h. Abbildung erstellt aus Rohdaten der begleiteten Masterarbeit von A.N. Egler-Kemmerer.<sup>[223]</sup>



**Abb. 34: Enzymatische Propylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) mit Iodpropan durch die bienzymatische Kaskade mit NSA-Synthase und v36.** GC-MS-Scan-Chromatogramm der enzymatischen Propylierung von 3 mit Iodpropan (schwarz) im Vergleich zur Kontrollreaktion ohne Enzyme (blau) und **B**) Vergleich der GC-MS-SIM-Chromatogramme von Standardverbindungen (oben) mit dem Produkt der selektiven enzymatischen Propylierung mit Iodpropan (unten). Die Reaktion erfolgte mit 75  $\mu$ M NSA-Synthase und 75  $\mu$ M v36, 1 mM SAH, 2 mM 3 und 10 Äquivalenten Iodpropan bei 30 °C für 50 h. Das Chromatogramm der Standards (oben) zeigt auch die Retention der methylierten Verbindungen zum Beweis, dass die Methylierung bei der enzymatischen Reaktion nicht beobachtet wird. Das Chromatogramm der enzymatischen Reaktion (unten) zeigt die enzymkatalysierte Reaktion (schwarz) im Vergleich mit dem Kontrolleperiment (ohne Enzym in blau). Daraus ist ersichtlich, dass es eine nicht-selektive, nicht-enzymkatalysierte Hintergrundreaktion gibt. **C**) und **D**) zeigen die entsprechenden MS-Spektren für die enzymkatalysierte selektive Synthese von 1-Propyl-5-Cyclopropylpyrazol (**8b**) (**D**) im Vergleich zum authentischen Standard (**C**). Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer.<sup>[223]</sup>

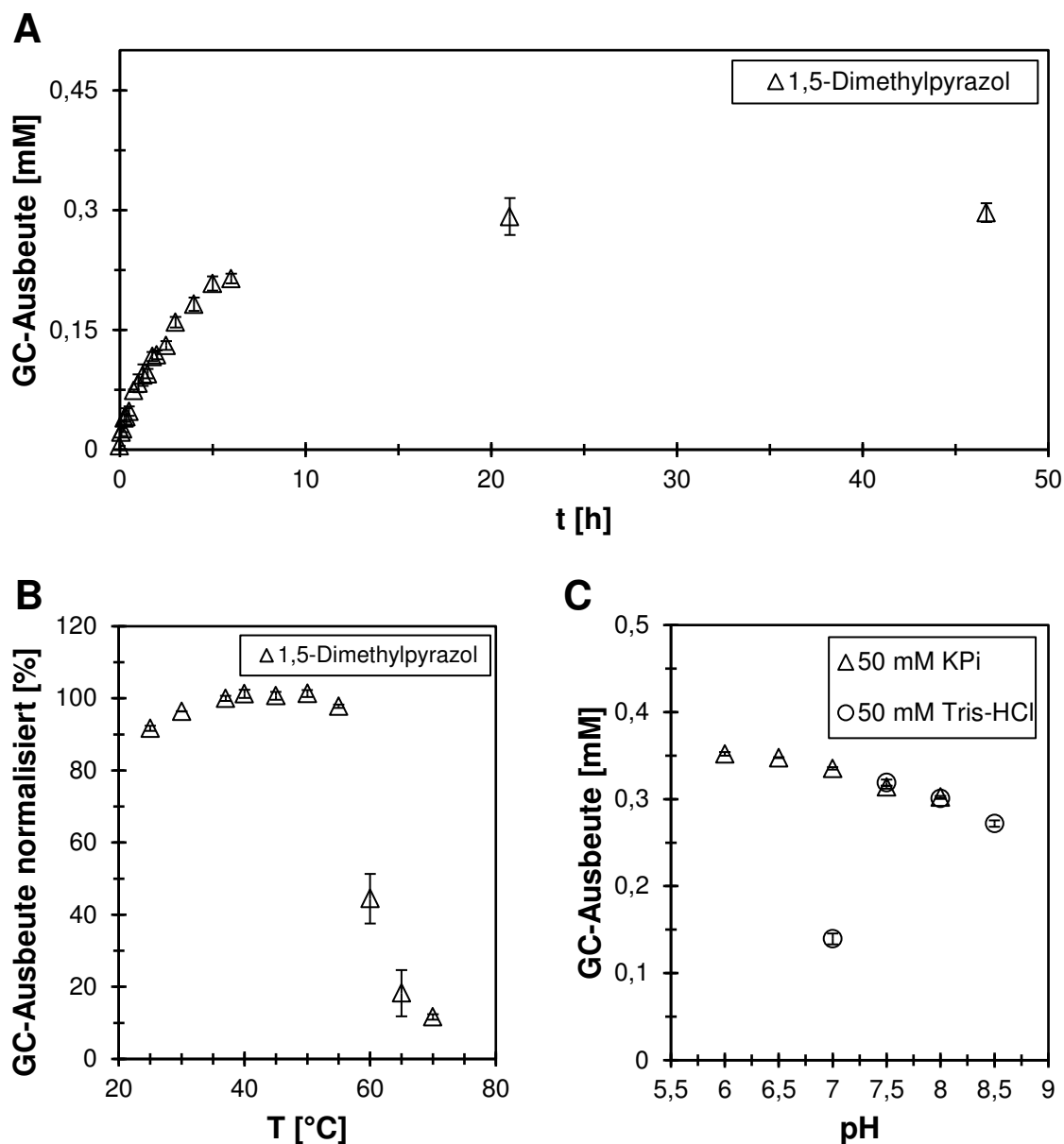
### 3.9 Identifikation einer weiteren promiskuitiven *N*-Methyltransferase

Im Laufe der vorliegenden Arbeit konnte eine vierte NMT hinsichtlich der promiskuitiven Methylierung von Pyrazolen untersucht werden. Die Indolethylamin-*N*-Methyltransferase aus *Oryctolagus cuniculus* (INMT) mit dem natürlichen Substrat Tryptamin zeichnet sich durch ein breites promiskuitives Substratspektrum aus. Einige Beispiele für nicht-natürliche Substrate von INMT sind *N*-Heterozyklen wie Nicotinamid und Histamin, sowie bis hin zu kleinen Molekülen wie Ethylamin.<sup>[205]</sup> Auch diese NMT wurde als synthetischer, codonoptimierter Genblock bestellt, über Gibson-Assembly in pET28a(+) kloniert und in *E. coli*® EXPRESS BL21(DE3) transformiert (8.3). Da für INMT noch keine Expression in *E. coli* beschrieben wurde, wurde das Enzym mit dem Expressionsprotokoll der wtNNMT exprimiert (8.4.2.1), das zu einer Expression in löslicher Form führte (Abb. 43C). Das Enzym wurde über IMAC an einem Äkta™ Purifizier mit einem linearen Elutionsgradienten gereinigt (8.5.4, Abb. 46). Die Promiskuität der INMT wurde anhand des Modellsubstrats 3-Methylpyrazol (**1**) untersucht. Ein Zeitverlauf der Reaktion ergab mit 0,29 mM eine 16-prozentige Produktbildung nach 20 h (Abb. 35A) bei einer Selektivität von >99 % für **1b**. Eine weitere Produktbildung über 20 h hinaus konnte nicht festgestellt werden.

Für die Charakterisierung der Reaktion wurde das Temperatur- und pH-Profil der INMT analysiert (8.6.3). Für das Enzym konnte ein breites Temperaturoptimum von 37-50 °C beobachtet werden, die Produktausbeute unterschied sich in diesem Temperaturbereich nicht nennenswert (Abb. 35B). Eine Erhöhung der Temperatur auf 55 °C reduzierte die Produktbildung nur geringfügig. Bei 60 °C konnten immer noch 45 % der Produktbildung bei 37 °C erreicht werden. Selbst bei 75 °C konnte noch eine Produktbildung beobachtet werden.

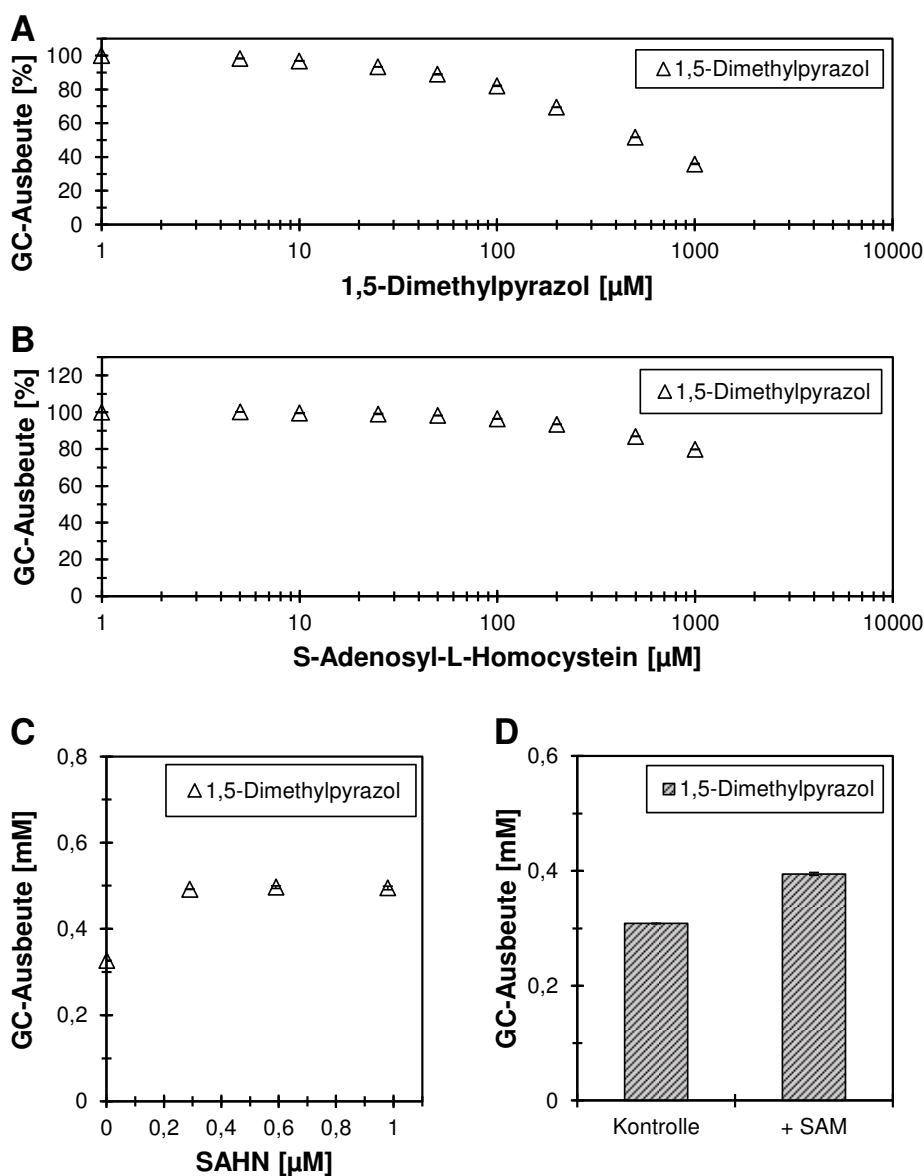
In pH-Studien wurde sowohl ein 50 mM KP<sub>i</sub>-Puffer (pH 6,0-7,5), als auch ein 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0 – 8,5) eingesetzt, um ein möglichst breites pH-Spektrum abzudecken (Abb. 35C). Die Produktbildung mit den beiden Puffersystemen bei pH 7,0 und 7,5 wies keinen Unterschied auf. Es kam jedoch zu einem Einbruch der Produktbildung mit Tris-HCl, pH 7,0. Mit sinkendem pH-Wert von 8,5 auf 6,0 konnte für INMT eine steigende Produktbildung gemessen werden. Die höchste Produktbildung wurde bei pH 6,0 beobachtet. Dies ist jedoch nur eine geringe Steigerung von <1 % im Vergleich zu der Produktbildung bei pH 7,0. Da viele MTs und, wie bereits untersucht, auch die wtNNMT durch Produktinhibition beeinträchtigt sind, stellte sich die Frage, ob dies auch bei der INNMT der Fall ist. Da die Reaktion von INMT mit **1** bereits produktselektiv stattfindet, wurde nur der Einfluss des gebildeten **1b** auf die Reaktion untersucht. Dafür wurde die Produktbildung unter variierender Zugabe von **1b** gemessen (8.6.5) und die gemessene Produktkonzentration von

Kontrollreaktionen ohne Enzym abgezogen. Dabei zeigte sich bis 10  $\mu\text{M}$  **1b** nur eine geringe Reduktion um 3 % der Produktbildung (Abb. 36A). Ab 100  $\mu\text{M}$  **1b** reduzierte sich die Produktbildung stark. Durch SAH wurde INMT weniger stark inhibiert als durch **1b** (Abb. 36B). Insgesamt reduzierte die Zugabe von höheren SAH-Konzentrationen die Produktbildung nur geringfügig. Bei 1 mM SAH konnte noch 80 % der Ausgangsproduktbildung gezeigt werden.



**Abb. 35: Promiskuitive Reaktion der Indolethylamin-*N*-Methyltransferase aus *Oryctolagus cuniculus* (INMT) mit 3-Methylpyrazol (**1**). A) Zeitverlauf der enzymatischen Methylierung von **1** mit INMT. B) Temperaturabhängigkeit normiert auf die Produktbildung bei 37 °C (bei pH 7,0) und C) pH-Abhängigkeit der enzymatischen Methylierung von **1** mit INMT gemessen als Gesamtproduktbildung bei 37 °C für 20 h. Eingesetzt wurden 10  $\mu\text{M}$  INMT, je 2 mM **1** und SAM in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von Triplikaten.**

Die Zugabe von SAHN konnte unabhängig von der eingesetzten Konzentration die Produktbildung um 9 % steigern (Abb. 36C). Eine weitere Zugabe von 2 mM SAM nach 20 h zeigte, dass das Enzym noch immer aktiv war (Abb. 36D). In einer Kontrollreaktion konnte nach dieser Zeit keine weitere Produktbildung festgestellt werden (vergleiche Abb. 35A).



**Abb. 36: Inhibitionen der enzymatischen Methylierung von 3-Methylpyrazol (1) mit der Indolethylamin-*N*-Methyltransferase (INMT).** **A)** Inhibition durch zugegebenes 1,5-Dimethylpyrazol, gemessen an der Produktbildung von 1,5-Dimethylpyrazol durch Subtraktion der Kontrollreaktion ohne Enzym. **B)** Inhibition durch zugegebenes *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein, gemessen an der Produktbildung von 1,5-Dimethylpyrazol. Eingesetzt wurden 10  $\mu\text{M}$  INMT, 2 mM 1, 2 mM SAM, 50 mM KPi, pH 7,0 für 20 h bei 37 °C. Die Produktbildung ist über der logarithmisch aufgetragenen InhibitorKonzentration dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von Triplikaten dar. **C)** Zugabe von *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein-Nukleosidase (SAHN, 2,6  $\mu\text{g}$ ) zur Reaktion der Indolethylamin-*N*-Methyltransferase (10  $\mu\text{M}$ ) mit 2 mM 3-Methylpyrazol (1) und 2 mM *S*-Adenosyl-*L*-Methionin für 20 h bei 37 °C. **D)** Die weitere Zugabe von 2 mM SAM nach 20 h zeigt, dass INMT noch immer aktiv ist. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von Triplikaten.





## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Dissertation war es die katalysator kontrollierte Methylierung und Alkylierung von *N*-Heterozyklen am Beispiel asymmetrisch substituierter Pyrazole zu demonstrieren. Solche selektiven Methylierungen sind eine bislang ungelöste Herausforderung der Katalysatorforschung. In der Natur werden Transferreaktionen dieser Art mit unerreichter Kontrolle und Präzision von Enzymen durchgeführt. Da Pyrazole jedoch in der Natur überaus selten vorkommen, sind bislang keine pyrazolmethylierende Enzyme bekannt. Somit war ein erstes Ziel der Arbeit die Identifikation von *N*-Methyltransferasen, die promiskuitiv Pyrazole methylieren. Die Verbesserung der Aktivität und Selektivität dieser Enzyme mittels eines computergestützten Enzym-Engineerings ermöglichte einen Zugang zu dieser Enzymfunktion. Aufbauend darauf wurde mittels einer zyklischen bienzymatischen Kaskade die selektive Alkylierung von Pyrazolen gezeigt. Hierfür war es das Ziel eine promiskuitive Halogenid-Methyltransferase zu identifizieren, die in der Lage ist, nicht-natürliche SAM-Analoga unter Verwendung einfacher Halogenalkane zu synthetisieren.

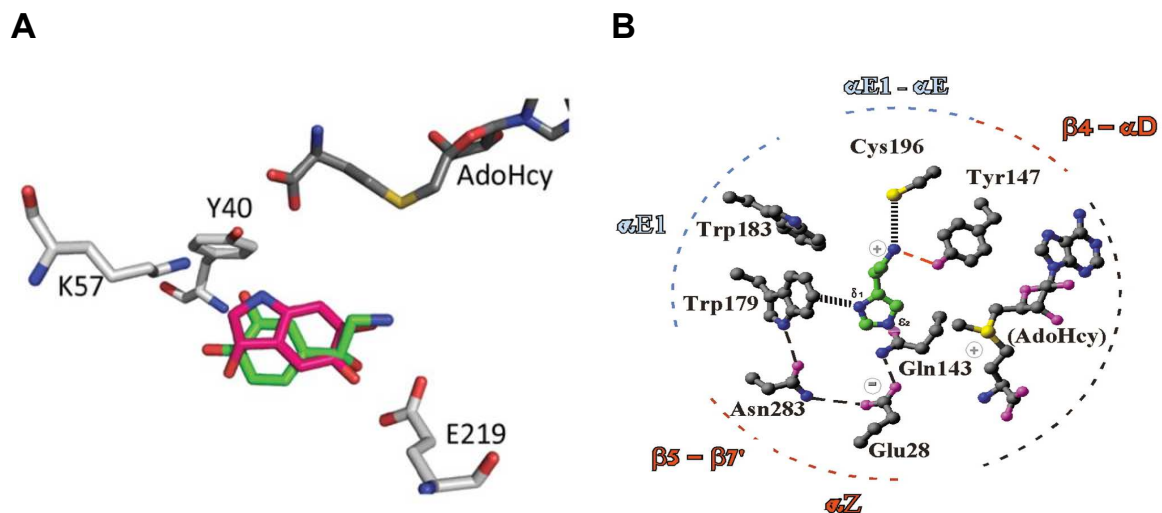
### 4.1 Pyrazol-*N*-Methyltransferasen

#### 4.1.1 Identifikation von pyrazolmethylierenden *N*-Methyltransferasen

Das erste Schlüsselement für die Methylierung von Pyrazolen war die Identifikation promiskuitiver *N*-Methyltransferasen. Mit PNMT, HNMT und wtNNMT<sup>[184,185,228]</sup> konnten drei potentiell promiskuitive NMTs in der Literatur identifiziert werden. Die beiden Enzyme PNMT und HNMT waren nicht in der Lage das Modellsubstrat 3-Methylpyrazol (**1**) zu methylieren. PNMT scheint somit, trotz des mutmaßlichen hydrophoben aktiven Zentrums, nicht für den Methyltransfer auf einen *N*-Heterozyklus geeignet zu sein. Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass für dieses Enzym bislang ausschließlich der Methyltransfer auf aliphatische Stickstoffe gezeigt wurde, wobei schon geringe Veränderungen von Substituenten ein Substrat in einen Inhibitor umwandelten.<sup>[199]</sup> In dem beschriebenen Fall genügte das Versetzen einer Trifluormethyl-Gruppe in Anti-9-Amino-6-(Trifluormethyl)-Benzonorbernen vom C<sub>6</sub> auf das C<sub>5</sub>-Atom des Moleküls, um die PNMT zu inhibieren. Anhand von Kristallstrukturen konnten die Autoren zudem zeigen, dass die Substratbindung unter anderem durch  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen mit den aromatischen Strukturelementen von Substraten, im von SAM abgewandten Teil der Substratbindetasche stattfindet. Noradrenochrom als Substrat zeigte hierbei eine Drehung um 180 Grad im Vergleich zum natürlichen Substrat, sodass nun die 5-Oxo-Gruppe des Substrats in Richtung des Methyltransferbereichs ausgerichtet ist (Abb. 37A). Dies könnte dazu führen,

dass der aromatische 5-Ring des Pyrazols ebenfalls fernab des möglichen Methyltransfers gebunden wird. Interessant wäre hier die Untersuchung von Pyrazolen mit aromatischen Substituenten, wie beispielsweise die Pyrazole **3-6**. Hier könnten die aromatischen Substituenten der Substrate eine Reorientierung in eine reaktive Konformation bewirken.

Für HNMT, die bereits natürlicherweise einen Imidazol-Stickstoff methyliert<sup>[100,186]</sup>, ist dieses Ergebnis jedoch überraschend. Horton *et al.* zeigten 2001 in Kristallstrukturen von HNMT mit gebundenen Histamin, dass das Substrat unter anderem über polare Interaktionen der Aminogruppe im aktiven Zentrum koordiniert wird (Abb. 37B).<sup>[188]</sup> Das untersuchte 3-Methylpyrazol (**1**) kann solche polaren Interaktionen jedoch aufgrund des fehlenden polaren Substituenten nicht ausbilden, sodass hier möglicherweise keine optimale Ausrichtung des Pyrazols in eine reaktive Konformation zustande kommen kann. Weitere Untersuchungen könnten jedoch mit dem Pyrazol-Analogon des natürlichen Substrats Histamin oder mit polaren Substituenten am Pyrazolring durchgeführt werden. In der Natur kommt noch eine weitere HNMT-Variante (I105) vor, die im Vergleich zur hier untersuchte Variante T105 als aktiver beschrieben wird.<sup>[188]</sup> Eine höhere natürliche Aktivität kann in der Folge das Identifizieren einer neuen Startaktivität vereinfachen. Im Gegensatz zu PNMT und HNMT zeigte die wtNNMT bereits in ersten Experimenten eine anfängliche Aktivität mit 3-Methylpyrazol (**1**) und SAM als Methyl donor.



**Abb. 37: Bindungskonformationen von Substraten in den untersuchten N-Methyltransferasen Phenylethanol-N-Methyltransferase (PNMT) und Histamin-N-Methyltransferase (HNMT).** A) Bindungskonformation von Noradrenochrom (pink), überlagert mit Noradrenalin (grün) in Gegenwart von S-Adenosyl-L-Homocystein in PNMT. Abbildung verändert nach Drinkwater *et al.*<sup>[199]</sup> B) Polare Interaktionen der Bindung von Histamin (grün) im aktiven Zentrum der HNMT (T105-Variante). Abbildung verändert nach Horton *et al.*<sup>[188]</sup>

Die geringe Produktbildung und die Produktmischung von 67:33 **1a:1b** veranschaulichen jedoch, dass die Orientierung von **1** im aktiven Zentrum nicht besonders spezifisch ist, sodass die wtNNMT nicht zwischen den beiden *N*-Atomen von **1** unterscheiden kann. Etliche Studien konnten jedoch bereits demonstrieren, dass die fehlende (Regio-) Selektivität einen guten Startpunkt bietet, um (divergent) selektive Enzymvarianten durch ein Enzym-Engineering zu erstellen.<sup>[229–231]</sup>

Im Verlauf der Arbeit wurde die Indolethylamin-*N*-Methyltransferase aus *Oryctolagus cuniculus* (INMT) erstmalig in löslicher Form in *E. coli* exprimiert und mittels IMAC gereinigt. Mit Modellsubstrat **1** konnte im Vergleich zu wtNNMT eine höhere Produktbildung beobachtet werden, bei gleichzeitiger exzellenter Selektivität. Bislang beschränkte sich die Methylierung vor allem auf aliphatische *N*-Atome.<sup>[205]</sup> Nach dem aktuellen Kenntnisstand konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass INMT in der Lage ist ein heteroaromatisches *N*-Atom zu methylieren. Ein großer Vorteil dieses Enzyms ist seine hohe Temperaturstabilität (siehe Abb. 35), die in einem Enzym-Engineering eine höhere Anzahl an destabilisierenden Mutationen erlaubt.<sup>[232]</sup>

Wie bereits in der Literatur für verschiedene Substrate beschrieben,<sup>[116,205,225,233]</sup> werden sowohl wtNNMT, als auch INMT durch die methylierten Produkte und SAH inhibiert (siehe Abb. 25 und Abb. 36). Die Inhibition durch SAH wird in der Literatur dabei als kompetitiv beschrieben. Die Degradation von SAH durch SAHN führte für beide Enzyme zu einer Steigerung der Produktausbeute (siehe Abb. 58 & Abb. 36). Diese Steigerungen decken sich mit den in der Literatur bekannten Werten (15 - 40 %), wobei sie sich dort im unteren Bereich einordnen.<sup>[126]</sup> Dies kann vielfältige Gründe haben, am wahrscheinlichsten ist hierbei, dass der inhibitorische Effekt der methylierten Pyrazole die Inhibition durch SAH überwiegt (siehe Abb. 25 & Abb. 36). Für einen genauen Vergleich müssen jedoch kinetische Studien über die inhibitorischen Effekte der methylierten Pyrazole durchgeführt werden.

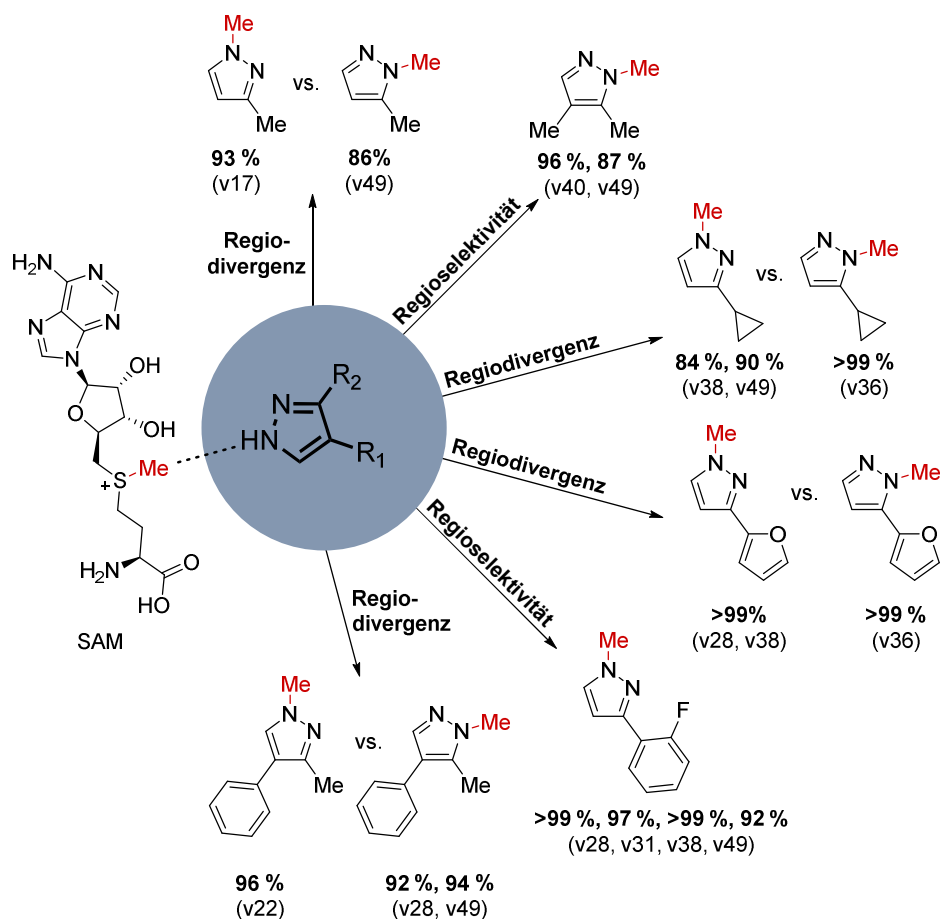
## 4.1.2 Enzym-Engineering von Pyrazolmethyltransferasen

### 4.1.2.1 Regioselektive Methylierung von Pyrazolen

Das nächste Ziel dieser Arbeit war es eine Bibliothek an Transferasen für ein breites Panel an Substraten zu erstellen. Die Startaktivität der wtNNMT mit **1** bildete die Basis für die Verbesserung der Enzymaktivität mittels eines computergestützten Designs für Mutantenbibliotheken (FuncLib<sup>[11]</sup>). Zusammengefasst konnten über 90 % der Varianten mindestens eines der untersuchten Pyrazole umsetzen, bemerkenswerterweise trotz der hohen

Unterschiede von 3-5 Mutationen der aktiven Zentren (siehe Abb. 24 & Abb. 47 - Abb. 51). Insgesamt ergab sich in 10-30 % der Varianten eine erhöhte Aktivität und/oder Selektivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym, darunter regiodivergente Varianten und exzellente Regioselektivitäten (>99 %). Dabei konnten regioselektive Varianten selbst für die Pyrazole **1** und **2** gefunden werden (siehe Abb. 26), bei denen sich die Pyrazol-Tautomere ausschließlich in der Position einer relativ kleinen Methylgruppe unterscheiden. Im Gegensatz dazu führt die Methylierung von **1** mit der wtNNMT (siehe Abb. 26) und chemischen Standardreagenzien zu Produktgemischen<sup>[63,64,66]</sup> (in dieser Arbeit Abb. 22B). Dieses Produktgemisch ist nur unter hohem Energieeinsatz und zusätzlichen Prozessstufen trennbar.<sup>[64]</sup> Die durch die chemische Methylierung von **2** und **6** entstandene Produktgemische (siehe Abb. 22C) ließen sich durch Säulenchromatographie nicht trennen. Dies verdeutlicht einmal mehr die Notwendigkeit einer regioselektiven Alkylierungsmethode für solche *N*-Heterozyklen.

Selbst für sterisch anspruchsvollere, Position 3-substituierte Pyrazole (**3**, Cyclopropylpyrazol) und mit (hetero-) aromatischen Gruppen substituierte Pyrazole (**4**, Furyl- und **5**, Fluorophenylpyrazol) wurden hohe Regioselektivitäten und teilweise Regiodivergenz gefunden. Die methylierten Produkte dieser Pyrazole sind sehr gesucht.<sup>[234-236]</sup> Die chemische Synthese verläuft jedoch substratkontrolliert und führt in der Regel, wie auch bei der wtNNMT, zu Produktgemischen (vergleiche Abb. 22 & Abb. 26). Für die Substrate **4** und **5** wird in der chemischen Methylierung das *N*<sub>1</sub>-Atom des Pyrazols aufgrund der sterischen Abschirmung des *N*<sub>2</sub>-Atoms favorisiert.<sup>[67]</sup> Chemische Katalysatoren die eine selektive Methylierung des *N*<sub>2</sub>-Atoms solcher Pyrazole durchführen können sind bislang kaum bekannt.<sup>[3,4]</sup> Gerade die höchst selektive Methylierung des *N*<sub>2</sub>-Atoms durch Varianten der Mutantenbibliothek (siehe Abb. 38 und für Details Abb. 24 & Abb. 26, sowie Abb. 49 & Abb. 50) demonstriert eindrücklich die Katalysatorkontrolle der Enzyme über diese Reaktionen. Selbiges gilt für sterisch anspruchsvolle Substituenten an Position 4, wie bei Pyrazol **6** (3-Methyl-4-Phenylpyrazol, siehe Abb. 26 & Abb. 51). Sowohl die wtNNMT (siehe Abb. 26), als auch die chemische Methylierung<sup>[237]</sup> (in dieser Arbeit Abb. 22F) können nicht zwischen den beiden Ringstickstoffen dieses Pyrazols unterscheiden. Einmal mehr beweisen die modifizierten Enzyme der Mutantenbibliothek (besonders v22, v28 & v49) durch höchste Selektivitäten und Regiodivergenz die Katalysatorkontrolle über die Reaktion (siehe Abb. 26 & Abb. 51).



**Abb. 38:** Übersicht der regioselektiven enzymatischen Methylierung von Pyrazolen durch die erstellte Mutantenbibliothek. Für alle Substrate konnten hochselektive Varianten gefunden werden. Für die meisten Substrate konnten zusätzlich regiodivergente Varianten gefunden werden. Die hochselektive Methylierung kann jedoch nur stattfinden, wenn Substrate in den aktiven Zentren hochpräzise in einer reaktiven Konformation (*near attack conformation*) gebunden werden.

#### 4.1.2.2 Aktivität von engineernten Pyrazol-*N*-Methyltransferasen

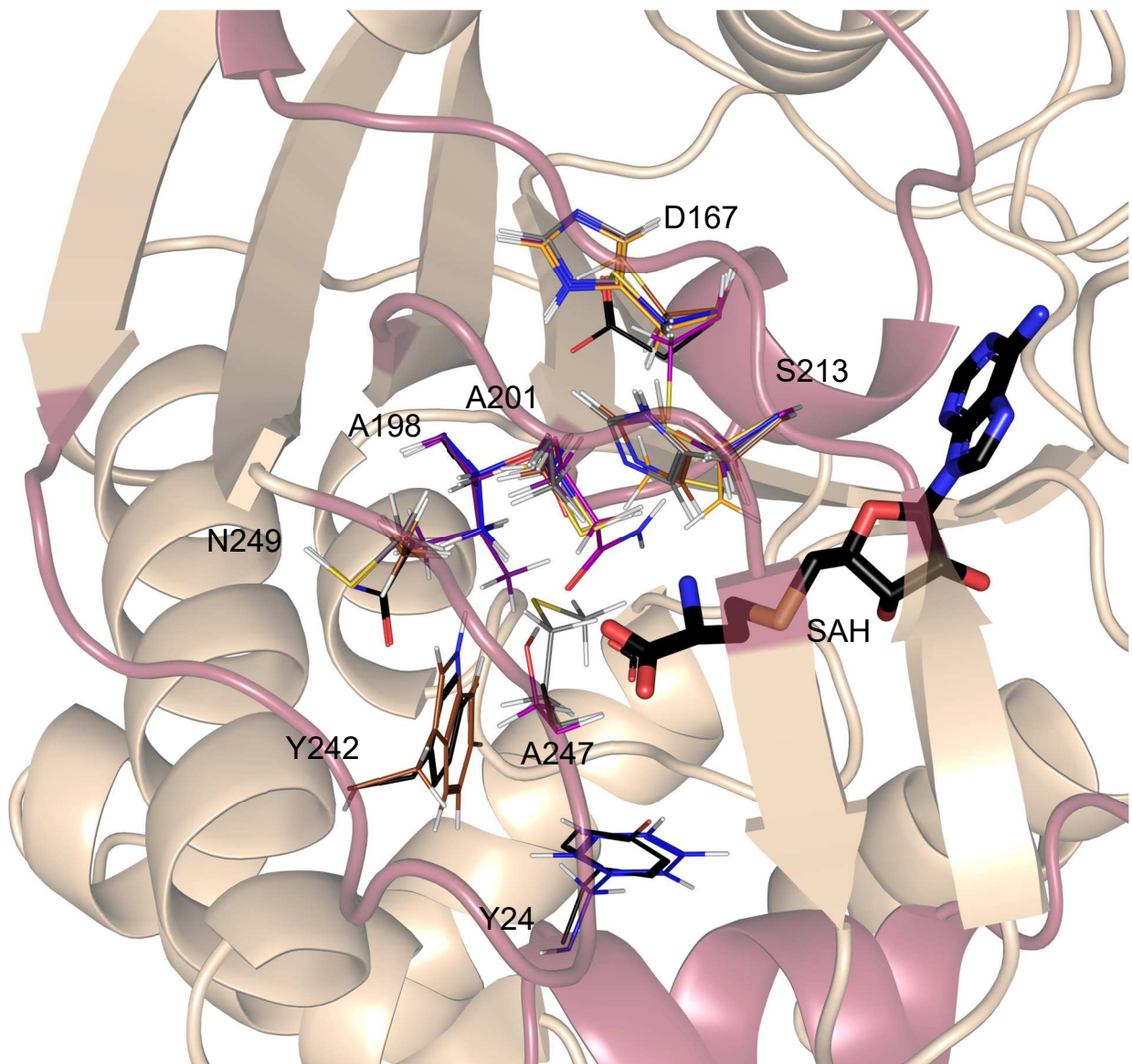
Neben der Selektivität wurde in dieser Arbeit auch die Aktivität der Pyrazol-MTs untersucht. Früh zeigte sich, dass die methylierten Pyrazol-Produkte und auch SAH inhibitorisch auf die untersuchten Wildtyp-Enzyme wirken (siehe Abb. 25 & Abb. 36). Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, die beschreibt, dass viele MTs durch die gebildeten Produkte und besonders durch SAH inhibiert werden.<sup>[116,238–243]</sup> So beobachteten Cundy *et al.* und später Loring *et al.* eine Inhibition der wtNNMT durch die beiden Produkte SAH und 1-Methylnicotinamid.<sup>[116,225]</sup> Fuller *et al.* zeigten 1967 eine nichtkompetitive Inhibition durch das Produkt Epinephrin der PNMT.<sup>[244]</sup> Auch die HNMT wird durch ihr Produkt *N*-Methylhistamin inhibiert<sup>[188]</sup>. Für INMT ist eine nichtkompetitive Inhibition des natürlichen Produkts *N,N*-Dimethyltryptamin<sup>[205]</sup> und des promiskuitiven Produkts Bufotein<sup>[233]</sup> bekannt. Die Inhibition durch SAH wird in der Literatur generell sowohl für die wtNNMT, die HNMT und die INMT als kompetitiv gegenüber SAM beschrieben.<sup>[188,205,233,245]</sup>

Da es möglich ist, dass diese Produktinhibitionen auch auf die Enzymvarianten einwirken, wurden die Enzymaktivitäten anhand von Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen verglichen. Diese sind potentiell nicht durch eine Inhibition beeinträchtigt. Sechs verschiedene Varianten (v17, v22, v28, v36, v40, v49) wurden hierfür detailliert untersucht. Allgemein wiesen viele der Varianten eine Aktivitätssteigerung um einen Faktor >10 verglichen zur wtNNMT auf (siehe Abb. 26 & Abb. 59). Es konnten sogar Steigerungen um Faktoren von 72 und 118 beobachtet werden, bemerkenswerterweise bei gleichzeitig exzellenter Selektivität (siehe Abb. 26).

Insgesamt 8 der 12 Ziel-Aminosäuren im aktiven Zentrum wurden in den sechs näher untersuchten Varianten mutiert (siehe Abb. 39). Fünf der am häufigsten variierten Aminosäuren liegen räumlich nebeneinander und sind Teil der variablen Regionen (*Loops*), die die 4-5, 5-6 und 6-7  $\beta$ -Faltblätter in der konservierten Rossmann-Faltung<sup>[110]</sup> verbinden (siehe Abb. 39). Es fällt auf, dass drei der Aminosäuren (D167, S201, S213) in allen der sechs Varianten verändert sind. Die zwei anderen (A198, N249) in etwas mehr als der Hälfte. Da diese Aminosäuren dem SAH gegenüberliegend angeordnet sind, bilden sie vermutlich die Bindetaschen für die verschiedenen Substituenten der Pyrazole.

Die in den vorteilhaften Varianten eingeführten Mutationen an diesen fünf Schlüssel-Positionen sind sehr divers (siehe Abb. 39), sodass die Identifikation allgemein aktivierender Mutationen für die Pyrazol-Methylierung auf dieser Datengrundlage nicht möglich war. Nahezu alle Einzelmutationen vorteilhafter Varianten kommen ebenso in weniger aktiven und /oder regioselektiven Varianten vor (vergleiche Tabelle 9, Abb. 24 & Abb. 47 - Abb. 51). Auch ein Vergleich mit der bislang einzig weiteren bekannten Mutagenese der wtNNMT mit dem natürlichen Substrat NCA<sup>[110]</sup> liefert keine Erklärung für die hier beobachteten vorteilhaften Mutationen. Eine Epistase hingegen kann die beobachteten großen Schritte in der Steigerung der Selektivität und Aktivität erklären.<sup>[143-148]</sup> Kürzlich wurde berichtet, dass aus dem FuncLib-Algorithmus entstandene Enzymvarianten mit Mehrfachmutationen oft ein nicht-additives Verhalten aufweisen, das durch Epistase erklärt werden kann.<sup>[1]</sup> Solch epistatisches Verhalten erschwert jedoch das Nachvollziehen der Wirkungsweise. Eine naheliegende Vermutung ist allerdings, dass die jeweiligen Mutationen in jeder einzelnen der besten Varianten zu einer selektiven Bindung der jeweiligen Pyrazole in einer reaktiven Konformation führt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, die beschreibt, dass MTs ihre Substrate für eine effiziente Katalyse in solch einer reaktiven *Near-Attack*-Konformation binden.<sup>[110,114]</sup> In einer kürzlich

veröffentlichten Studie wurde zudem für FuncLib-Varianten berechnet, dass sich der Übergangszustand der Reaktion der Varianten nahezu nicht vom WT unterscheidet.<sup>[246]</sup>



#	Aminosäurepositionen des aktiven Zentrums											
	20	24	164	167	197	198	201	204	213	242	247	249
wtNNMT	Y	Y	L	D	D	A	S	Y	S	Y	A	N
<b>Varianten</b>												
v17	Y	Y	L	C	D	T	Q	Y	A	Y	S	N
v22	Y	Y	L	H	D	A	A	Y	H	Y	M	C
v28	Y	Y	L	H	D	A	C	Y	M	Y	A	A
v36	Y	F	L	C	D	T	C	Y	A	Y	A	N
v40	Y	Y	L	H	D	L	A	Y	C	Y	A	C
v49	Y	Y	L	C	D	A	C	Y	H	W	A	A

**Abb. 39: Lokalisierung der Mutationen der charakterisierten Pyrazolmethyltransferasen.** Die Mutationen der sechs ausgewählten Varianten (v17, v22, v28, v36, v40, v49) liegen auf den *Loops*, die das aktive Zentrum der Pyrazol-NMTs bilden (oben). Die Wildtyp-Aminosäuren (pdb 2iip) und SAM sind als schwarze Stäbchen dargestellt, nichtmutierte Aminosäuren sind nicht gezeigt. Die Homologiemodelle der Varianten wurden mithilfe des Robetta-Servers<sup>[247]</sup> erstellt und in PyMOL überlagert. Die Tabelle (unten) zeigt eine Übersicht der Mutationen der sechs ausgewählten Varianten. Mutationen gegenüber der Wildtyp-Sequenz sind rot markiert.

### 4.1.3 Computergestütztes Enzym-Design von Pyrazolmethyltransferasen

Ein großer Nachteil vieler computerbasierter Enzym-Design-Methoden ist, dass sie ein bioinformatisches Expertenwissen voraussetzen.<sup>[211,248]</sup> Dies schränkt solche Methoden in ihrer Anwendbarkeit im experimentellen Laboralltag stark ein, sodass die Entwicklung neuer Enzymaktivitäten einem kleinen Expertenkreis vorbehalten war. In jüngster Vergangenheit werden jedoch immer mehr online verfügbare Plattformen veröffentlicht, die Nicht-Experten die Nutzung solcher Werkzeuge zugänglich machen. Die meisten dieser Werkzeuge dienen jedoch der Suche gleicher bzw. ähnlicher Enzymaktivitäten in Datenbanken, der Analyse von Enzymeigenschaften (z. B. bei rational eingefügten Mutationen) oder dem Auffinden von Energiebarrieren und Schlüsselpositionen.<sup>[214]</sup> Andere web-basierte Algorithmen, wie beispielsweise FireProt<sup>[249]</sup>, dienen der Vorhersage vorteilhafter, enzymstabilisierender Mutationen. Ein Vorteil von FuncLib<sup>[1]</sup> ist, dass durch die Einführung mehrerer gleichzeitiger Mutationen große Schritte im Sequenzraum erreicht werden können. Dafür benötigt das FuncLib-Design nur eine Runde der Evolution und des Screenings.

Die Autoren des FuncLib-Algorithmus fanden eine Vielzahl von Varianten, die 10-4000-fache Steigerungen der katalytischen Effektivität und ein breites Substratspektrum aufwiesen.<sup>[1]</sup> Als Startpunkt diente ihnen ein zuvor mittels PROSS<sup>[232]</sup> stabilisiertes Enzym, das bereits 20 Mutation beinhaltete. Außer von den FuncLib-Autoren selbst und in dieser Arbeit wurde FuncLib bislang nur in einer weiteren Studie angewandt. Die Autoren nutzten den Algorithmus um eine *de novo* erstellte Kemp-Elementase zu optimieren.<sup>[246]</sup> Dabei wurden zwar nur geringe Aktivitätssteigerungen erreicht, jedoch war es das Hauptziel der Autoren stabile Enzymvarianten zu erzeugen. Trotz einer geringeren Anzahl an Mutanten waren alle Enzymvarianten aktiv.

Mit konventionellen Mutagenesestrategien sind die in dieser Arbeit gezeigten, herausragende Aktivitätssteigerungen üblicherweise nicht zu erreichen.<sup>[250]</sup> Die iterative Sättigungsmutagenese oder die zufällige Mutagenese benötigen hierfür oft viele Runden der Evolution, die in vielen Fällen nur Aktivitätsverbesserungen um Faktoren von 2-4 pro Runde erreichen.<sup>[221,251–254]</sup> Das FuncLib-Design beweist, dass computergestützte Design-Methoden zum Erstellen von Mutantenbibliotheken sehr effektiv sind. Durch die kondensierte Anzahl an Varianten in der fokussierten Bibliothek wird die Enzymentwicklung beschleunigt. Dies wird bestätigt durch die stabile Expression von mehrfach-mutierten Varianten, die breiten Substratspektren der Bibliotheken und die Möglichkeit neue Enzymaktivitäten zu erzeugen.<sup>[1,246]</sup>



#### 4.1.4 *In vivo* Methylierung von Pyrazolen

Die Anwendbarkeit von MTs wird durch den teuren, instabilen, sowie atomökonomisch unvorteilhaften Cofaktor SAM stark beschränkt.<sup>[126]</sup> Eine *in vivo*-Methylierung hat daher gegenüber *in vitro*-Prozessen einige Vorteile. So entfallen die Zeit und Kosten-aufwändigen Schritte der Enzymreinigung, das Aufschließen von Zellen und besonders die Bereitstellung des teuren Cofaktors. Stattdessen genügt in der Regel Glucose als Energiequelle, um die zelleigenen Regenerationssysteme für Cofaktoren wie SAM zu betreiben.<sup>[255]</sup> In dieser Arbeit konnte erfolgreich die *in vivo*-Methylierung von **1** demonstriert werden, basierend einzig auf der glucosebasierten Regeneration von SAM durch *E. coli*. Mehrere Gründe können für die geringe Produktausbeute verantwortlich sein. Am wahrscheinlichsten wurde die eingesetzten Glucose (10 mM) bei einer Konzentration von 100 mg<sub>Zellnassgewicht</sub>/mL Biokatalysator innerhalb kürzester Zeit durch den Erhaltungsstoffwechsel von *E. coli*<sup>[256,257]</sup> verbraucht. Eine mögliche Sauerstofflimitierung im gewählten Versuchsaufbau könnte möglicherweise zusätzlich die Regeneration von SAM einschränken. Obgleich die *in vivo*-Methylierung von Pyrazolen erst an ihrem Anfang steht und noch tiefere Untersuchungen benötigt, stellt diese Arbeit einen Machbarkeitsbeweis dar, der das Feld der Forschung zu diesem Thema eröffnet.

#### 4.2 SAM-Analoga aus einfachen Halogenidalkanen

Die Synthese nichtnatürlicher SAM-Analoga aus einfachen Halogenidalkanen markierte einen Schlüsselpunkt in der enzymatischen *late-stage*-Funktionalisierung bioaktiver Moleküle durch MTs.<sup>[126]</sup> In traditionellen Protokollen werden NSAs chemoenzymatisch mithilfe promiskuitiver Methioninadenosyltransferasen oder Halogenasen erstellt.<sup>[118,122,126,163,164]</sup> Die chemische Synthese der benötigten Vorläufermoleküle (Methionin-Analoga) sind jedoch aufwändig und die resultierenden Met-Analoga häufig instabil. Die Komplexität der Alkyldonoren senkt die Atomökonomie und verhindert eine breite synthetische Anwendung von Alkyltransferasen.<sup>[74,118,165]</sup> Das Cofaktor-Regenerations-System für SAM von Liao *et al.*<sup>[123]</sup> (siehe Abb. 10) trägt das Potenzial der enzymatischen Synthese und Regeneration von NSAs aus leicht verfügbaren Halogenalkanen.<sup>[169]</sup> Jedoch konnten in diesem System bislang nur Methylierungsreaktionen realisiert werden.<sup>[123,167,258]</sup>

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher eine promiskuitive Halogenidmethyltransferase (NSA-Synthase) aus sechs ausgewählten Wildtyp-Enzymen identifiziert und erstmalig die Alkylierung von SAH nach Prinzip der bienzymatischen Kaskade<sup>[123]</sup> demonstriert (siehe Kapitel 5.7). Hierbei zeigte sich, dass die bereits beschriebene

*cthHMT*<sup>[123,166,168]</sup> für die Alkylierung von SAH eher weniger geeignet ist (siehe Tabelle 1), das in einer zeitgleichen Studie<sup>[259]</sup> bestätigt wurde. Während die meisten anderen HMTs ebenso restriktiv sind, war die NSA-Synthase über die Bildung von SAM hinaus nicht nur in der Lage Iodethan,-propan und -butan zu nutzen. Auch die analogen Chlor- und Bromalkane (siehe Tabelle 1) zählten zu ihrem Substratspektrum. Die Substitution von Iodalkanen durch Chlor- und Bromalkane ist aufgrund der Toxizität ersterer äußerst gefragt.<sup>[169]</sup>

Interessanterweise ist die NSA-Synthase im Vergleich zu anderen HMTs für die Methylierung von Halogeniden mittels SAM nur moderat aktiv.<sup>[113]</sup> Möglicherweise spricht dies für eine flexiblere Bindung der natürlichen Substrate, aus der sich eine erhöhte Promiskuität ergeben kann.<sup>[260]</sup> Allgemein sank die Aktivität der NSA-Synthase je länger die Kettenlänge der Halogenidalkane wurden. Dieses Verhalten wurde auch in einer zeitgleich veröffentlichten Untersuchung einer engineerierten Variante der *acHMT* beobachtet.<sup>[259]</sup> Zeitverläufe der Synthese von NSAs zeigen, dass die evolutionäre Spezialisierung der NSA-Synthase eindeutig auf der Bildung des Methyl donors SAM liegt (siehe Abb. 29). Es wird davon ausgegangen, dass es für eine Alkylierung von SAH wie bei anderen MTs, eine reaktive Konformation der beiden Substrate im aktiven Zentrum<sup>[110,114]</sup> notwendig ist. Das Verlängern der Alkylkette könnte somit durch den erhöhten Raumbedarf die Einnahme der benötigten reaktiven Konformation vermindern.<sup>[261]</sup> Zusätzlich lässt sich eine Verringerung der Aktivität mit steigendem Atomradius des Halogenids beobachten (siehe Kapitel 5.8.2). Eine mögliche Begründung findet sich in der allgemein geringeren Reaktivität in  $S_N2$ -Reaktionen von Brom- und Chloralkanen gegenüber vergleichbaren Iodalkanen, die aus der leichteren Abspaltung eines Iodid-Anions resultiert.<sup>[262,263]</sup> Auch könnte hier eine verringerte Substrataffinität oder eine veränderte Ausrichtung der Molekülorbitale die NSA-Synthase beeinflussen, hervorgerufen und verstärkt durch die Erhöhung der Kettenlänge der eingesetzten Halogenalkane. Selbst in der Synthese von SAM durch die NSA-Synthase, trotz hoher MeI-Überschüsse, kam es nie zu einem Vollumsatz (siehe Abb. 29). Die Degradation von SAM unter den Reaktionsbedingungen und nach so kurzen Reaktionszeiten gilt als unwahrscheinlich.<sup>[264–267]</sup> Die natürliche Reaktion von HMTs ist die Methylierung von Halogenid-Ionen, darunter auch Cl-Anionen.<sup>[113]</sup> Die gewünschte Bildung von SAM mit MeI wird nur durch eine Verschiebung des Gleichgewichts durch überschüssige Zugabe des Halogenalkans erreicht.<sup>[268]</sup> Während der IMAC-Proteinreinigung werden häufig Puffer eingesetzt, die in der Regel hohe Konzentrationen an NaCl enthalten. Diese hohe Konzentration an Chlorid-Anionen wirkt nun der erstrebten Gleichgewichtsverschiebung entgegen. Selbiges

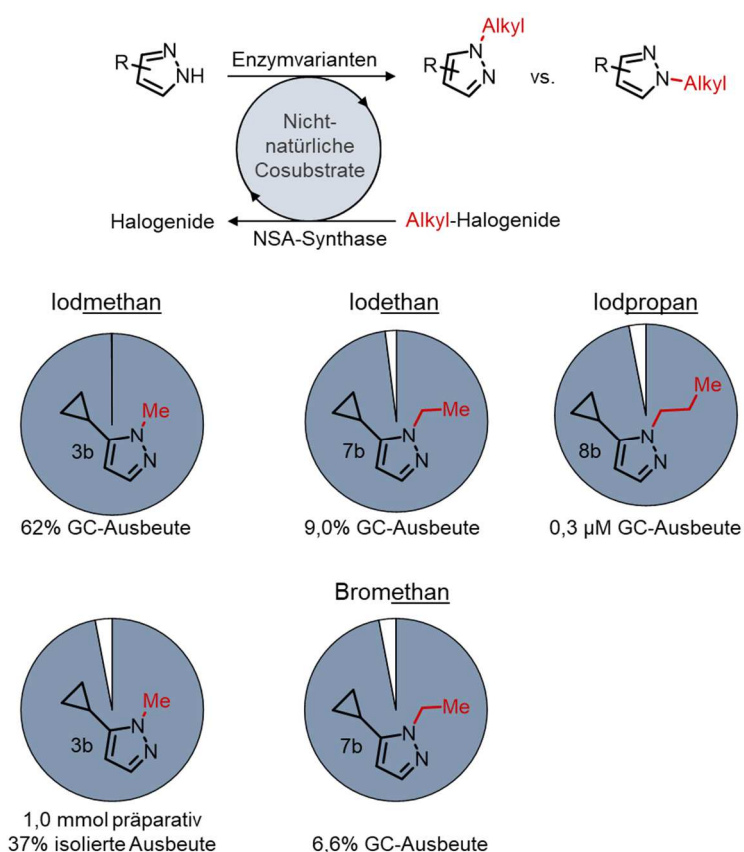
gilt auch für das in der Reaktion freiwerdende Halogenid, sodass ab einem bestimmten Punkt des Reaktionsverlaufes die natürliche Reaktion der HMT wieder an Triebkraft gewinnt.

### 4.3 Enzymatische Methylierung und Alkylierung von Pyrazolen unter Verwendung einfacher Halogenalkane

Im Rahmen dieser Arbeit konnte an zwei Beispielsubstraten (**1** und **3**) erstmalig die enzymatische Alkylierung von Pyrazolen mit einfachen Halogenalkanen (Iodmethan, Iodethan, Bromethan, Iodpropan) demonstriert werden (siehe Kapitel 5.8). Anders als bisher in der Literatur beschrieben,<sup>[123,167,259]</sup> genügte das in den gereinigten Enzymen gebundene SAH, um die Alkylierung von **1** effizient zu betreiben (siehe Abb. 30 & Abb. 31A). Dies konnte in der begleiteten Abschlussarbeit von A.N. Egler-Kemmerer<sup>[223]</sup> anhand der Alkylierung von **3** bestätigt werden. Die Alkylierung von **3** erfolgte dabei mit exzellenten Selektivitäten (>97->99 %, siehe Abb. 41). Für die Anwendbarkeit cofaktorabhängiger enzymatischer Katalysatoren ist eine kostengünstige und effektive Regeneration von Cofaktoren von großer Bedeutung.<sup>[70,269–271]</sup> Wird berücksichtigt, dass die Kosten für SAH ähnlich hoch sind wie für SAM, wohingegen Halogenalkane äußerst erschwinglich sind, ist die mögliche Einsparung von SAH ein großer Vorteil. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von MeI in äquimolarer Konzentration zum Pyrazol die Produktausbeute nur gering sank (siehe Abb. 31B). Dies ist in Einklang mit der Literatur, die zeigt, dass mit weiterer Optimierung nur wenige Äquivalente bis äquimolare Konzentrationen an Iodmethanen eingesetzt werden können.<sup>[123]</sup> Tang *et al.* beschreiben dagegen den Einsatz von bis zu 8 Halogenalkan-Äquivalenten für die enzymatische Alkylierung,<sup>[261]</sup> das gut mit unseren gefundenen Optima übereinstimmt.

Es zeigte sich, dass die bienzymatische Kaskade kein generelles Temperaturoptimum aufwies (siehe Kapitel 5.8). Da die NSA-Synthase in der Lage ist SAM äußerst schnell aus MeI und SAH zu synthetisieren, stellt für die Methylierung von **3** vermutlich die Aktivität von v36 den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (vergleiche Abb. 29 & Abb. 31). Dies resultierte in der Reaktionstemperatur im mutmaßlichen Optimum der FuncLib-Variante. Für die herausfordernde Bereitstellung ethylierter und propylierter NSAs muss das Reaktionsoptimum jedoch in Richtung des Reaktionsoptimums der NSA-Synthase verschoben werden (siehe Abb. 633). Der deutliche generelle Aktivitätsverlust der bienzymatischen Kaskade mit steigender Kettenlänge der NSAs (vergleiche Abb. 40) kann diversen Gründen entspringen. Ein möglicher Grund könnte der Tatsache geschuldet sein, dass die eingesetzte Variante v36 als

effizientes Methyl-übertragendes Enzym selektioniert wurde. Obwohl viele MTs sehr tolerant gegenüber SAM-Analoga sind,<sup>[47]</sup> muss dies jedoch nicht bedeuten, dass v36 Ethyl oder Propyl ebenso effektiv wie Methyl übertragen kann. Möglicherweise kommt es im aktiven Zentrum in Anwesenheit der NSAs zu sterischen Hinderungen, die zu einer herabgesetzten Affinität des Pyrazols führen. Wie bereits beschrieben, wird angenommen, dass für eine erfolgreiche Alkylierung mit MTs eine reaktive Konformation eingenommen werden muss, bei der es zu einer exakt ausgerichteten Überlappung der Molekülorbitale kommt. Eine sterische Beeinflussung durch NSAs könnte die Ausrichtung der Molekülorbitale erschweren. So stellten Dalhoff *et al.* bereits 2006 die These auf, dass neben elektronischen Faktoren auch sterische Limitationen durch die Architektur der aktiven Zentren von DNA-MTs die effiziente Transalkylierung beeinflussen können.<sup>[162]</sup> Auch in einer jüngst veröffentlichten Studie beobachteten Tang *et al.* einen Aktivitätsverlust bei der Alkylierung natürlicher Substrate mittels Iodethan und -propan (41 %, bzw. 5 % Umsatz).<sup>[259]</sup>



**Abb. 40:** Übersicht der regioselektiven enzymatischen Alkylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) mit Halogenalkanen durch die bienzymatische Kaskade aus NSA-Synthase und v36. Dargestellt sind die identifizierten Regioselektivitäten der Alkylierungen durch die Kaskade. Die Umsätze, der in der Literatur beschriebenen Kaskaden mit Iodmethan<sup>[123,167,258]</sup> und mit Iodethan<sup>[259]</sup>, können zwar nicht erreicht werden, es gilt jedoch zu beachten, dass in dieser Arbeit erstmalig ein nichtnatürliches MT-Substrat alkyliert wurde. Weiterhin ist zu bemerken, dass die erreichten exzellenten Regioselektivitäten denen der chemischen Synthese mit Standardreagenzien weit überlegen sind.

Als ein weiterer Einflussfaktor verlangsamt möglicherweise die niedrigere Reaktions-temperatur in der Ethylierungs- und Propylierungskaskade die Aktivität der Pyrazol-NMTs. Wie bereits für die Methylierung diskutiert, kommt auch eine Produktinhibition der MT durch alkylierte Pyrazole als Ursache der geringen Alkylierungs-Umsätze in Betracht. Eine weitere mögliche Ursache für geringere Produktbildung mit NSAs könnte darin liegen, dass bei der Alkylierung von SAH zwei epimere Formen der NSAs erzeugt werden können.<sup>[265]</sup> Dies geschieht aufgrund des stereochemisch aktiven freien Elektronenpaars von Sulfonium-Spezies.<sup>[120]</sup> Der gängigen Theorie nach sind MTs nur mit dem (*S,S*)-Epimer von SAM aktiv.<sup>[122]</sup> Es ist derzeit unbekannt, welches der Epimere von der NSA-Synthase produziert wird und ob Methyltransferasen wie v36 beide NSA-Epimere als Cosubstrat akzeptieren. Einzig Homocystein-Methyltransferasen sind bislang mit dem sonst von MTs nicht akzeptierten (*R,S*)-Epimer als aktiv beschrieben.<sup>[121]</sup>



## 5 AUSBLICK

Der FuncLib-Algorithmus hat sich als ein effizientes Werkzeug erwiesen, um aus einem promiskuitiven Enzym eine Familie von Pyrazol-*N*-Methyltransferasen zu erstellen, die ein diverses Substratspektrum aufweist. Gleichzeitig vereint diese generierte Enzymfamilie hohe Aktivitätssteigerungen und höchste Selektivitäten in der Methylierung strukturell verschiedener Pyrazole. Die Entschlüsselung der Effekte der positiven Mutationen der Varianten gestaltet sich jedoch aufgrund epistatischer Effekte als schwierig. In zukünftigen Studien können ausgewählte Varianten aus Einpunktmutationen und derer Kombination rekonstruiert werden, um Effekte von Aminosäuresubstitutionen sichtbar zu machen. Mit zunehmenden experimentellen Daten können zudem Algorithmen für maschinelles Lernen<sup>[15]</sup> helfen, die Aminosäureinteraktionen nachzuvollziehen und somit neue Ansätze für die weitere Verbesserung der Enzyme schaffen.

In der erstellten Mutantenbibliothek gibt es jedoch auch weniger aktive Varianten. Durch die hohe Randomisierung des aktiven Zentrums des Wildtyp-Enzyms durch das Engineering liegt es nahe, dass mit der Bibliothek auch Varianten mit neuen katalytischen Fähigkeiten generiert wurden. Dies ist besonders im Rahmen des Möglichen, da die Koordination von Substraten in eine reaktive Konformation der Mechanismus vieler verschiedener Methyltransferasen ist. Die Umsetzung weiterer bedeutender, bioaktiver Heterozyklen (siehe Abb. 42) ist ein logischer nächster Schritt für zukünftige Studien. Nicht zuletzt bleibt zu untersuchen, ob eine *late phase*-Funktionalisierung größerer pharmakophorer Wirkstoffe mit der generierten Mutantenbibliothek durchgeführt werden kann. Durch die gezeigte breite Anwendbarkeit der Mutantenbibliothek auf verschiedene Substrate kann diese zukünftig eingesetzt werden, um nach Startaktivitäten für gänzlich neue Substrate zu suchen. In der Folge kann die Mutantenbibliothek daher als Startpunkt neuer Enzym-Engineerings dienen.



**Abb. 41: Bedeutende Heterozyklen in der medizinischen Chemie als potentielle Methylierungs- und Alkylierungssubstrate für die generierte Mutantenbibliothek.** Abbildung verändert nach Jordan *et al.* und Barmade *et al.*<sup>[272,273]</sup>

Die verbessernden Mutationen der Varianten befinden sich hauptsächlich in den beweglichen Loopregionen, die Teil der aktiven Tasche sind. Die Modifikationen von Loopregionen konnten in der Literatur bereits beeindruckende Ergebnisse hervorbringen.<sup>[274–281]</sup> Ein Loopengineering durch Insertion/Deletion oder Loop-Crafting könnte somit neben einer einfachen Mutagenese helfen die Enzyme weiter zu verbessern. Ein weiteres Enzym-Engineering könnte zusätzlich die mutmaßlich in den Varianten verbliebene Produktinhibition des Wildtyps korrigieren.<sup>[282–286]</sup> Hierzu sind verschiedene Strategien möglich, wie beispielsweise die iterative Evolution des aktiven Zentrums, zufallsgenerierte Mutationen, sowie weitere computergestützte Modifikationen.

Neben den Top 50 Varianten des FuncLib-Algorithmus werden noch weitere (tausende) Sequenzen berechnet, die ebenfalls strukturell divers und stabiler sind, als das Wildtyp-Enzym. Auch in diesem, nichtuntersuchten Sequenzraum können sich weitere neue Enzym-Funktionalitäten finden. Mit den geeigneten Ressourcen könnten zukünftige Experimente den gesamten kalkulierten Sequenzraum einschließen, was jedoch ein Ultra-Hochdurchsatz-Screening bedingt. Die Kombination mit maschinellem Lernen oder die iterative Durchführung des computerbasierten Designs von Mutantenbibliotheken könnte zukünftig die gerichtete Enzym-Evolution beschleunigen.<sup>[43]</sup>

Für die technologische Anwendung von Methylierungsreaktionen ist auch ein *in vivo*-System interessant, um auf eine Zugabe teurer Cofaktoren zu verzichten. Die prinzipielle Machbarkeit der *in vivo*-Methylierung von Pyrazolen wurde in einem *proof of concept*-Experiment gezeigt. Hier müssen noch weitere, tiefgreifende Studien durchgeführt werden. (i) Genügt das natürliche Regenerationssystem von *E. coli* oder (ii) wird ein Stamm benötigt, der beispielsweise in erhöhtem Maße SAM bereitstellen kann? Ebenso vorstellbar ist, dass ein Stamm vorteilhaft ist, bei dem die SAM-Synthase *metK* für ein verbessertes SAM-Recycling überexprimiert ist. Auch spannend sind der zeitliche Verlauf von *in vivo*-Reaktionen und kinetische Untersuchungen. Diese könnten Aufschluss darüber geben ob und wann eine mögliche Beeinträchtigung der Enzymaktivität durch Produktinhibitionen eintritt. Eine kontinuierliche Zugabe von Glucose und eine Sauerstoffzufuhr könnten zusätzlich die Regenerationsfähigkeit von SAM verbessern.

Mit INMT konnte eine weitere natürliche Pyrazol-NMT identifiziert werden, die in zukünftigen Studien aufgrund der guten Eigenschaften wie Temperaturstabilität und einer gesteigerten Startaktivität weiter untersucht werden sollte. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass INMT mit **2** ebenfalls eine Regioselektivität von >99 % erreicht. Interessant zu sehen wäre, ob



das Enzym seine natürlich gegebene Regioselektivität in einem größeren Substratspektrum und mit anderen Heterozyklen aufrechterhalten kann. Die oben genannten Eigenschaften von INMT machen das Enzym zudem zu einem interessanten Startpunkt für ein Enzym-Engineering. Ohne eine Kristallstruktur ist das Anwenden von strukturbasierten Enzym-Engineering jedoch limitiert. Ein Homologiemodell von INMT wurde bereits erstellt<sup>[208]</sup>; durch das Auflösen der Kristallstruktur könnte das Enzym jedoch für das gesamte Spektrum von Enzym-Engineering-Methoden geöffnet werden.

Die etablierte *in vitro*-Kaskade zur enzymatischen Alkylierung von Pyrazolen besitzt bislang ein überschaubares Substratspektrum (siehe Tabelle 1). Zeitgleich zu dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktivität und das Substratspektrum von *athHMT* mittels rationalem Enzym-Engineering und einer einzigen Mutation (V140T) maßgeblich gesteigert werden konnte.<sup>[287]</sup> Der *acHMT*-Wildtyp ist jedoch weniger promiskuitiv als die NSA-Synthase (siehe Tabelle 1). Ein Enzym-Engineering, bzw. das Übertragen der *athHMT*-Mutante auf die NSA-Synthase wäre daher eine Möglichkeit die Synthese neuer nichtnatürlicher SAM-Analoga zu ermöglichen. So ist es auch vorstellbar, dass nicht nur diverse nicht-funktionalisierte Alkyle übertragen werden können. Auch könnten beispielsweise mit Alkoholen oder Aminen funktionalisierte Halogenalkane als Substrate eingesetzt werden. Da auf die Methylierung spezialisierte Pyrazol-NMT-Varianten nicht automatisch für den Alkyltransfer geeignet sein müssen, sollte in zukünftigen Studien die gesamte Mutantenbibliothek auf den Alkyltransfer hin untersucht werden. Eine regioselektive Modifikation von Molekülen mit verschiedensten Alkylen, Alkoholen oder Aminen ermöglicht zusätzlich anschließende ortsspezifische chemische Modifikationen (bsp. Fluoreszenz-Markierungen oder „click“-Chemie) und würde somit neue Wege in der Wirkstofffindung eröffnen.<sup>[47,118,164]</sup>

Die aufgezeigten Beispiele für naheliegende zukünftige Arbeiten zeigen das große Potential der Pyrazol-Transferasen als selektive Alkylierungskatalysatoren. Im Zusammenhang mit der bienzymatischen Kaskade und der Alkylierung durch einfache Halogenalkane könnte dies einen wichtigen Beitrag für die Wirkstofffindung und Synthese neuer bioaktiver Moleküle leisten. Spannend zu sehen wird darüber hinaus, wie sich computergestützte Algorithmen zum Enzymdesign weiterentwickeln und dazu beitragen werden neue Biokatalysatoren für die potentiell grüne Synthese zu konstruieren.



## 6 MATERIAL UND METHODEN

### 6.1 Chemikalien und kommerzielle Enzyme

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden, soweit nicht anders beschrieben, von den kommerziellen Anbietern: Sigma Aldrich (Steinheim, DE), abcr GmbH (Karlsruhe, DE), Alfa Aesar (Karlsruhe, DE), Apollo Scientific (Bredbury, UK), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, US), Enamine (Riga, LV), Fluorochem (Hadfield, UK), Roth® (Karlsruhe, DE) und VWR (Darmstadt, DE) bezogen und ohne zusätzliche Aufreinigung verwendet. *S*-Adenosyl-L-Methionin-Disulfat-Tosylat wurde von abcr (Kat.-Nr.: AB436584), *S*-Adenosyl-L-Homocystein von Sigma-Aldrich (Kat.-Nr.: A9384), Lysozym von Roth® (Kat.-Nr.: 8259.3), DNaseI von Gold Biotechnology® (Kat.-Nr.: D-300-5, St. Louis, Missouri, US) erworben. Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, T5-Exonuclease, *Taq* DNA-Ligase und Dpn1 wurden von NEB (Frankfurt, DE) bezogen.

### 6.2 Molekular- und Mikrobiologische Kits

Für die Anwendung verschiedener Molekular- und mikrobiologischen Methoden wurden das Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit, das DNA Clean and Concentrator™ und das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit der Firma Zymo Research (Irvine, US), sowie das Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher (Braunschweig, DE) eingesetzt.

### 6.1 *E. coli* Stämme

In dieser Arbeit kamen zwei *E. coli* Stämme zum Einsatz. Für Klonierungsarbeiten und die Expression von *N*-Methyltransferasen und FuncLib-Varianten wurde *E. coli* cloni® EXPRESS BL21(DE3) der Firma LGC Biosearch Technologies (Hoddeston, UK) eingesetzt (Tabelle 2). Für die Expression von Halogenid-Methyltransferasen wurde der *S*-Adenosyl-L-Homocystein-Nukleosidase defiziente Stamm *E. coli* JW0155 der Keio-Kollektion<sup>[226]</sup> eingesetzt.

**Tabelle 2: *E. coli*-Stämme mit zugehörigen Genotypen.**

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> <sup>®</sup> EXPRESS BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdSB (rB- mB -) gal dcm lon λ (DE3) [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]
<i>E. coli</i> JW0155	F- Δ(araD-araB)567 Δpfs-773::kann ΔlacZ4787(ΔrrnB-3) λ-rph-1 Δ(rhaD- rhaB)568 hsdR514

## 6.2 Plasmide

Für die heterologe Expression und Herstellung von N-Methyltransferasen, der FuncLib-Varianten und der Halogenid-Methyltransferasen wurden verschiedene Expressionssysteme angewandt, die den Einsatz zweier verschiedener Plasmide erforderten (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Eingesetzte Plasmide.**

Plasmid	Empfänger-stamm	Resistenzmarker	Operon	Induktor	Anwendung
pET28a(+)	<i>E. coli</i> <sup>®</sup> EXPRES S BL21(DE3)	Kanamycin-Resistenz	Lactose-Operon	IPTG/ Lactose	NMTs Varianten
pBAD33 <sup>[288]</sup> <sub>1</sub>	<i>E. coli</i> JW0155	Chloramphenicol-Resistenz	Arabinose-Operon	L(+)- Arabinose	HMTs

## 6.3 Klonierung von Wildtyp N-Methyltransferasen, FuncLib-Varianten und Halogenid-Methyltransferasen

Die Enzymsequenzen der *Homo sapiens* Nicotinamid-N-Methyltransferase (wtNNMT, UniProtKB: P40261), *Homo sapiens* Phenylethanolamin-N-Methyltransferase (PNMT, UniProtKB: P11086), *Homo sapiens* Histamin-N-Methyltransferase (HNMT, UniProtKB P50135) und *Oryctolagus cuniculus* Indolethylamin-N-Methyltransferase (INMT, UniProtKB: O97972) wurden für *E. coli* codonoptimiert (<https://eu.idtdna.com>), bei Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Kalifornien, US) bestellt und mittels Gibson Assembly<sup>[289]</sup> in das Plasmid pET28 a(+) kloniert. Die Enzyme sind über einen Leucin-Glutamat-Linker (LE-Linker) mit C-terminalen His<sub>6</sub>-tag versehen, was die Möglichkeit bietet, reines Enzym zu gewinnen. Das Plasmid wurde durch Hitzeschocktransformation<sup>[290]</sup> in zuvor hergestellte chemisch kompetente Zellen<sup>[291]</sup> von *E. coli*<sup>®</sup> Express BL21(DE3) (Tabelle 2) der Firma Lucigen (Biosearch™ Technologies, Wisconsin, US) transformiert.

Die FuncLib-Varianten v1-v50 (Tabelle 12) wurden mittels Gibson Assembly<sup>[289]</sup>, Overlap-Extension-PCR<sup>[292]</sup> und QuikChange-PCR<sup>™</sup> mit dem Template von pET28a(+):wtNNMT konstruiert. 300 bp große Gibson Assembly-Fragmente, die die Mutationen L164X, D167X, D197X, A198X, S201X, Y204X, S213X, Y242X, A247X und N249X abdecken, wurden bei TWIST Bioscience (Kalifornien, US) bestellt. Einzelmutationen an Y20 und Y24 wurden mittels Overlap-Extension-PCR<sup>[292]</sup> durchgeführt, die Doppelmutationen für diese Position wurden mittels QuikChange-PCR<sup>™</sup> durchgeführt. Die Plasmide wurden jeweils mittels Hitzeschocktransformation<sup>[290]</sup> in zuvor hergestellte chemisch kompetente Zellen<sup>[291]</sup> von *E. coli*<sup>®</sup> Express BL21(DE3) (Tabelle 2) transformiert.

Die Halogenid-Methyltransferasen NSA-Synthase aus *Aspergillus clavatus* (aclHMT, UniProtKB: A1CIS5), die *Chloracidobacterium thermophilum*-HMT (cthHMT, UniProtKB: G2LF24), *Arabidopsis thaliana*-HMT (athHMT, UniProtKB: Q6AWU6), *Batis maritima*-HMT (bmaHMT, UniProtKB: Q7ZSZ7), *Burkholderia xenovorans*-HMT (bxehMT, NCBI: WP\_011486779) und *Synechococcus elongatus*-HMT (selHMT, UniProtKB: Q31S13), wurden in Kooperation mit Benjamin Aberle für *E. coli* codon-optimiert (<https://eu.idtdna.com>) codonoptimiert, bei TWIST Bioscience (Kalifornien, USA) bestellt und in einen pBAD33-Vektor, der einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag mit einem LE-Linker enthält, mittels Gibson Assembly<sup>[289]</sup> eingefügt. Die Plasmide wurden in einer begleiteten Bachelorthesis durch S. Kienzle<sup>[227]</sup> mittels Hitzeschocktransformation<sup>[290]</sup> in zuvor hergestellte chemisch kompetente Zellen<sup>[291]</sup> des *S*-Adenosyl-L-Homocystein-Nukleosidase-Knockout-Stammes *E. coli* JW0155 (Tabelle 2) der Keio-Kollektion<sup>[226]</sup> transformiert. Die Ergebnisse aller Klonierungsarbeiten wurden durch Sequenzierung (Eurofins-GATC, Ebersberg, DE und Microsynth.Sequlab, Göttingen, DE) nach vorangegangener Plasmidisolation (Zyppy<sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit, verwendet nach Herstellerangaben) überprüft.

**Tabelle 4: Oligonukleotide für die Konstruktion von Wildtyp *N*-Methyltransferasen mittels Gibson Assembly.**

Primer	Plasmid	Richtung	Sequenz
<b>pET28-T7-Fwd</b>	pET28a(+)	vorwärts	TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATG
<b>pET28-T7-Rev</b>	pET28a(+)	rückwärts	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAA
<b>pET28-Term-Fwd</b>	pET28a(+)	vorwärts	CTGCTAACAAAGCCCGAAAG
<b>pET28-Term-Rev</b>	pET28a(+)	rückwärts	CTTTCGGGCTTTGTTAGCAG

**Tabelle 5: Oligonukleotide für die Konstruktion von FuncLib-Varianten mit der Wildtyp-Sequenz der NNMT als Templat. Der Austausch von Basenpaaren ist durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.**

Primer	Plasmid	Richtung	Methode	Sequenz
<b>FL1_ff</b>	pET28a(+)	vorwärts	Gibson Assembly	GATTGTGTATTGTCAACCCTTTGC
<b>FL1_br</b>	pET28a(+)	rückwärts	Gibson Assembly	GCAAAGGGTTGACAATACACAATC
<b>FL1_bf</b>	pET28a(+)	vorwärts	Gibson Assembly	GCTTATTTTCGCTGGTTGCTC
<b>FL1_fr</b>	pET28a(+)	rückwärts	Gibson Assembly	GAGCAACCAGCGAAAATAAGC
<b>FL1_Y20H_forward</b>	pET28a(+)	vorwärts	Overlap-PCR	GTCATTTTAACCCGCGCGACcACTTG AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGC
<b>FL1_Y20F_forward</b>	pET28a(+)	vorwärts	Overlap-PCR	GTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTA GAAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCC
<b>FL1_Y20X_reverse</b>	pET28a(+)	rückwärts	Overlap-PCR	GTCGCGGGTTAAAATGACTCAAAT AAGTGTCTTACTCGTAAATCC
<b>FL1_Y24F_forward</b>	pET28a(+)	vorwärts	Overlap-PCR	CGCGCGACTACTTAGAAAAATtCTAC AAGTTTGGGAAGCCGC
<b>FL1_Y24X_reverse</b>	pET28a(+)	rückwärts	Overlap-PCR	TTTTTCTAAGTAGTCGCGCGGGTTAA AATGACTCAAATAAGTGTCTTACT
<b>FL1_Y20H_Y24F_f</b>	pET28a(+)	vorwärts	QuikChange-PCR™	GTCATTTTAACCCGCGCGACcACTTA GAAAAATtCTACAAGTTTGGGAAGC
<b>FL1_Y20H_Y24F_r</b>	pET28a(+)	rückwärts	QuikChange-PCR™	GCTTCCAACTTGTAGaATTTTTCTA AGTgGTCGCGCGGGTTAAAATGAC

## 6.4 Kultivierung und Protein-Expression

### 6.4.1 Verwendete Komplexmedien

Alle Komplexmedien (Tabelle 6) wurden nach der Präparation bei 121 °C und 2 bar für 30 min autoklaviert und anschließend mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Komplexmedien.** <sup>a)</sup>10× TB-Salze enthalten 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

Medium	Zusammensetzung		Medium	Zusammensetzung	
LB-Medium	Trypton	10 g	TB-Medium	Trypton	12 g
	Hefeextrakt	5 g		Hefeextrakt	24 g
	NaCl	10 g		Glycerin	5 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L		10× TB-Salze <sup>a)</sup>	0,1 L
			ddH <sub>2</sub> O	ad	0,9 L
LB-Agar	Trypton	10 g	AI-Medium	Trypton	12 g
	Hefeextrakt	5 g		Hefeextrakt	24 g
	NaCl	10 g		Glycerin	5 g
	Agar-Agar	16 g		D-(+)-Glucose Monohydrat	2,9 g
	ddH <sub>2</sub> O	ad 1 L		α-Lactose Monohydrat	7,6 g
			10x TB-Salze <sup>a)</sup>	ad	0,1 L
			ddH <sub>2</sub> O	ad	0,9 L

### 6.4.2 Expression

Für die Heterologe Proteinexpression, sowie die Isolation von Plasmiden wurden alle Hauptkulturen aus Vorkulturen (Übernachtskulturen) inokuliert, die in 12 mL Reagenzgläsern mit 5 L LB-Medium und 0,1 % des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Diese Übernachtskulturen wurden entweder von Einzelkolonien auf LB-Agar-Platten oder aus Kryostocks (25 % Glycerin, Lagerung bei -80 °C) inokuliert.

#### 6.4.2.1 Expression von *N*-Methyltransferasen und Varianten

Die Expression von NMTs in Erlenmeyerkolben erfolgte entweder in LB-Medium (Tabelle 6) oder für die Proteinreinigung zur Charakterisierung ausgewählter Varianten mit Autoinduktionsmedium (AI-Medium, Tabelle 6).

#### **6.4.2.2 Expression der Wildtyp-NMTs für das Screening der promiskuitiven Aktivität mit 3-Methylpyrazol und zur Bestätigung der natürlichen Aktivität.**

Mit Übernachtskulturen mit 30 mg/L Kanamycin wurden Hauptkulturen in 400 mL LB-Medium (Tabelle 6) das 30 mg/L Kanamycin enthält, bis zu einer Startkonzentration von 1 % (v/v) angeimpft und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach 15-minütiger Kühlung im Eisbad wurden die Expression mit 1 mM IPTG für 20 h bei 25 °C und 180 rpm induziert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 8.000 × g und 4 °C. Die Zellpellets wurden bei -20 °C eingefroren und für mindestens eine Nacht bei derselben Temperatur gelagert.

#### **6.4.2.3 Expression der wtNNMT und Varianten für die Enzymreinigung**

Mit Übernachtskulturen mit 30 mg/L Kanamycin wurden Hauptkulturen in 400 mL Autoinduktionsmedium (Tabelle 6) das 30 mg/L Kanamycin enthält, bis zu einer Startkonzentration von 1 % (v/v) angeimpft und die Expression durch Autoinduktion gestartet. Die Kulturen wurden für 24 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 × g und 4 °C geerntet und direkt verwendet oder eingefroren und bei -20 °C gelagert.

#### **6.4.2.4 Expression in 24-Deep-Well Platten**

Übernachtskulturen in 24 DWPs mit 4 mL/Well TB-Medium (Tabelle 6) und 30 mg/L Kanamycin wurden mit Einzelkolonien von LB-Agarplatten (Tabelle 6) mit der gleichen Konzentration an Kanamycin inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkulturen wurden mit 400 µL der Übernachtskultur in 24 DWPs mit 3,4 mL/Well TB-Medium (mit 30 mg/L Kanamycin) inokuliert und für 4 h bei 37 °C und 180 rpm Schütteln inokuliert. Jede Platte hatte Kontrollen von 2× wtNNMT, 1× Leervektor und 1 Well nur mit Medium. Nach dem Abkühlen der Platten im Eisbad für 15 min wurde die Expression durch Induktion mit 1 mM IPTG für 20 h bei 25 °C und 180 rpm gestartet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3220 × g und 4 °C geerntet und eingefroren und bei -20 °C für mindestens eine Nacht gelagert.

#### **6.4.2.5 Expression von Halogenid-Methyltransferasen**

Hauptkulturen in 400 mL TB-Medium (Tabelle 6), die 50 mg/L Chloramphenicol enthielten, wurden mit Übernachtskulturen bis zu einer Startkonzentration von 1 % (v/v) inokuliert und für 3 h bei 37 °C, 180 rpm inkubiert. Nach 15-minütiger Kühlung der



Kulturen im Eisbad wurde die Expression durch Induktion mit 100 mM L-Arabinose für 20 h bei 25 °C und 180 rpm gestartet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei  $10.000 \times g$  bei 4 °C geerntet und direkt verwendet oder eingefroren und bei -20 °C gelagert.<sup>[227]</sup>

## 6.5 Proteinreinigung

### 6.5.1 Proteinreinigung zur Bestimmung der natürlichen Aktivität von PNMT und HNMT

Die gefrorenen Zellen (8.4.2.2) wurden in 3 mL/ $g_{\text{cww}}$  Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 300 mM NaCl) mittels Ultraschallaufschluss für 3-5 min auf Eis aufgeschlossen. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei  $16.900 \times g$  und 4 °C wurde der filtrierte (0,2  $\mu\text{m}$ ) lösliche Überstand jedes Enzyms auf je eine Talon GraviTrap-Säule (2 mL Säulenvolumen, beladen mit  $\text{Co}^{2+}$ ) geladen und mit 2 Säulenvolumen (*column volume*, cv) Lysepuffer gewaschen. In einem weiteren Waschschrift wurden 5 mL Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol) eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 5 mL Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol). Die enzymhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE detektiert, zusammengeführt und mit einem Dialysebeutel (6-8 kDa *Cutoff*) in Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 300 mM NaCl, 5 % Glycerin) über Nacht und  $2\times$  für 3 h am nächsten Tag dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Micro BCA™ -Assay (Thermo Scientific, Prod.-# 23225) gemessen und Aliquote des Enzyms wurden eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 6.5.2 Proteinreinigung der wtNNMT und FuncLib-Varianten

Die gefrorenen Zellen (8.4.2.3) wurden in 3 mL/ $g_{\text{cww}}$  Lysepuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,6) resuspendiert und homogenisiert und bei 4 °C und 800 bar mit einem Emulsiflex-C5 (Avestin Inc., Mannheim, DE) aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde nach Zentrifugation (4 °C,  $55.000 \times g$ , 1 h) gewonnen und durch 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Die Enzymreinigung erfolgte bei 4 °C mit einem Äkta™ Purifier (GE-healthcare, UK) und einer Histrap HP 5 mL Säule (GE-Healthcare, UK), die mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladen wurde. Die Aufreinigung wurde mit einem UV/Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Säule wurde mit Lysepuffer für 2 Säulenvolumina bei 5 mL/min Fluss equilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule geladen und die nichtbindenden Proteine

mit 20 cv von der Säule gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 12 cv und 10 % Elutionspuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,6) und die Elution erfolgte für 7 cv und 50 % Elutionspuffer, gefolgt von einem Auswaschen der Säule mit 100 % Elutionspuffer für 5 cv und einem erneuten Equilibrieren für 3 cv mit Lysepuffer. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE detektiert, zusammengeführt und mit einem Dialysebeutel (6-8 kDa Cutoff) in Dialysepuffer (5 mM  $\text{KPi}$ , 5 % Glycerin, pH 7,6) über Nacht und 2× für 3 h am nächsten Tag dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Micro BCA™-Assay (Thermo Scientific, Prod.-# 23225) gemessen und Aliquote des Enzyms wurden eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 6.5.3 Proteinreinigung der NSA-Synthase (*ac/HMT*)

Die gefrorenen Zellen (8.4.2.5) wurden in 3 mL/ $\text{g}_{\text{cww}}$  Lysepuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , 10 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,6) resuspendiert und homogenisiert und bei 4°C und 800 bar mit einem Emulsiflex-C5 (Avestin Inc.) aufgeschlossen. Die lösliche Fraktion wurde nach Zentrifugation (4 °C, 55.000 × g, 1 h) gewonnen und durch 0,2 µm filtriert. Die Enzymreinigung erfolgte bei 4 °C mit einem Äkta™ Purifier (GE-healthcare) und einer mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladenen Histrap HP 5 mL Säule. Die Aufreinigung wurde mit einem UV/Vis-Detektor bei 280 nm verfolgt. Die Säule wurde für 2 cv mit Lysepuffer bei 5 mL/min Fluss equilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule geladen und mit 20 cv von der Säule gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte bei 6% Elutionspuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7,6) für 7 cv, der zweite Waschschrift bei 13 % Elutionspuffer für 7 cv und die Elution erfolgte bei 25 % Elutionspuffer für 7 cv, gefolgt von einem Auswaschen der Säule mit 100 % Elutionspuffer für 5 cv und einem erneuten Equilibrieren mit Lysepuffer für 3 cv. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden zusammengefasst und mit einem Dialysebeutel (6-8 kDa Cutoff) in Dialysepuffer (5 mM  $\text{KPi}$ , 5 % Glycerin, pH 7,6) über Nacht und 2× für 3 h am nächsten Tag dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Micro BCA™-Assay gemessen und Aliquote des Enzyms wurden eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 6.5.4 Proteinreinigung von INMT

Die gefrorenen Zellen (8.4.2.2) wurden in 3 mL/ $\text{g}_{\text{cww}}$  Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin,) resuspendiert und homogenisiert und bei 4 °C und 800 bar mit einem Emulsiflex-C5 (Avestin Inc., Mannheim, DE) aufgeschlossen.

Die lösliche Fraktion wurde nach Zentrifugation (4 °C, 55.000 × g, 1 h) gewonnen und durch 0,2 µm filtriert. Die Enzymreinigung erfolgte bei 4 °C mit einem Äkta™ Purifier (GE-healthcare, UK) und einer Histrap HP 5 mL Säule (GE-healthcare, UK), die mit Ni<sup>2+</sup> beladen wurde. Die Aufreinigung wurde mit einem UV/Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die Säule wurde mit Lysepuffer für 5 Säulenvolumina (cv) bei 5 mL/min Fluss equilibriert. Das Lysat wurde auf die Säule geladen und die nichtbindenden Proteine mit 12 cv von der Säule gewaschen. Der lineare Elutionsgradient begann bei 0 % Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 5 % Glycerin) und erhöhte sich über 15 cv auf 30 % Elutionspuffer, gefolgt von einem Auswaschen der Säule mit 100 % Elutionspuffer für 5 cv und einem erneuten Equilibrieren für 3 cv mit Lysepuffer. Die enzymhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE detektiert, zusammengeführt und mit einem Dialysebeutel (6-8 kDa Cutoff) in Dialysepuffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,5, 5 % Glycerin) über Nacht und 2× für 3 h am nächsten Tag dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Micro BCA™-Assay (Thermo Scientific, Prod.-# 23225) gemessen und Aliquote des Enzyms wurden eingefroren und bei -80 °C gelagert.

## 6.6 Biotransformationen

### 6.6.1 Untersuchung der promiskuitiven Aktivität der Wildtyp-NMTs

Gefrorene Zellen (8.4.2.2) wurden in 3 mL/g<sub>cell</sub> 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 resuspendiert und mittels Sonifier 250 A (Branson, Danbury, Connecticut, US) für 3-5 min auf Eis aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 3220 × g für 15 min wurden 445 µL des löslichen Überstandes mit 2 mM SAM und 3-Methylpyrazol (**1**) in 500 µL Reaktionen bei 37 °C für 20 h in einem Eppendorf Thermomixer inkubiert. Die Extraktion für die Analytik mittels Gaschromatographie (8.8.3.1) erfolgte mit 500 µL DCM nach vorheriger Zugabe von 2-Methylpyridine als internen Standard. 16.900 × g für 15 min wurden 450 µL des löslichen Überstands in 500 µL Reaktionen mit 2 mM 3-Methylpyrazol (**1**) und SAM-Tosylat in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 angesetzt. Die Biotransformation dauerte 20 h bei 37 °C und 600 rpm in einem Eppendorf Thermomixer. Als Negativkontrollen dienten Reaktionen des Leervektors und Pufferreaktionen ohne Enzym.

### 6.6.2 Bestätigung der natürlichen Aktivität von PNMT und HNMT

In 500  $\mu$ L Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurden 1,2 mg PNMT bzw. 0,5 mg HNMT (8.5.1) mit je 2 mM Phenylethanolamin bzw. Tryptamin, 2 mM SAM Tosylat in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 bei 37 °C und für 20 h inkubiert. Anschließend wurde das Protein mit 500  $\mu$ L Acetonitril gefällt, zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC (8.8.4.1) vermessen. Als Kontrollexperimente dienten jeweils 2 mM SAH als Standard, nur Enzym, Enzym + SAM, Enzym + Substrat und Enzym + SAM + Substrat eingesetzt. Nach Fällung der Proteine mit 750  $\mu$ L Acetonitril und Zentrifugation bei  $16.900 \times g$  für 15 min wurden die Proben mittels HPLC (8.8.4.1) vermessen.

### 6.6.3 Charakterisierung der Reaktion von wtNNMT und INMT mit 3-Methylpyrazol

In 500  $\mu$ L Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurden 10  $\mu$ M gereinigte wtNNMT (8.5.2), bzw. INMT (8.5.4), falls nicht anderweitig beschrieben, mit 2 mM SAM und 2 mM **1** eingesetzt. Die Reaktionen fanden bei 37 °C für 20 h statt. Die Extraktion wurde mit 500  $\mu$ L DCM durchgeführt und 2-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-FID-Messung (8.8.3.1) zugegeben. Die Temperaturstudien wurden mit 50 mM  $KP_i$ , pH 7,0 bei variierenden Temperaturen für 20 h in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Für wtNNMT wurde bei 55 °C zusätzlich eine Pufferkontrolle durchgeführt. Die pH-Studien wurden mit den zwei Puffersystemen  $KP_i$  (pH 6,0/ 6,5/ 7,0/ 7,5/ 8,0) und Tris-HCl für wtNNMT bei pH 8,0 und 8,5, sowie für INMT bei pH 7,0/ 7,5/ 8,0/ 8,5 bei 37 °C für 20 h durchgeführt.

### 6.6.4 Inhibition von wtNNMT in der Methylierung von 3-Methylpyrazol

In 500  $\mu$ L Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurden 10  $\mu$ M gereinigte wtNNMT (8.5.2) mit 2 mM SAM und 2 mM **1** eingesetzt. In separaten Reaktionen wurden variierende Konzentrationen der Produkte **1a** (0-2 mM), **1b** (0-2 mM) und SAH (0-2 mM) zu Reaktionsbeginn zugefügt. Die Reaktionen fanden bei 37 °C für 20 h statt. Zusätzlich wurden für die Addition von **1a** und **1b** Kontrollreaktionen ohne Enzym durchgeführt. Die Extraktion wurde mit 500  $\mu$ L DCM durchgeführt und 2-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-FID-Messung (8.8.3.1) zugegeben. Um der inhibitorischen Effekt für die Addition von **1a** und **1b** zu beurteilen, wurde die gemessene Konzentration der Produkte in den Kontrollreaktionen von der enzymatischen Methylierung subtrahiert.

Der Einfluss von SAHN auf die Inhibition der Methylierung von **1** mit wtNNMT wurde mit 2,6  $\mu\text{g}$  SAHN mit 10  $\mu\text{M}$  wtNNMT, 2 mM SAM und **1**, bei 37 °C für 20 h im Vergleich zu einer Reaktion ohne SAHN untersucht.

### 6.6.5 Charakterisierung und Inhibition von INMT in der Methylierung von 3-Methylpyrazol

In 500  $\mu\text{L}$  Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurden 10  $\mu\text{M}$  gereinigte INMT (8.5.4) mit 2 mM SAM und 2 mM **1** eingesetzt. In separaten Reaktionen wurden variierende Konzentrationen der Produkte **1b** (0-2 mM) und SAH (0-2 mM) zu Reaktionsbeginn zugefügt. Die Reaktionen fanden bei 37 °C für 20 h statt. Zusätzlich wurden für die Addition von **1b** Kontrollreaktionen ohne Enzym durchgeführt. Um den inhibitorischen Effekt für die Addition **1b** zu beurteilen, wurde die gemessene Konzentration der Produkte in den Kontrollreaktionen von der enzymatischen Methylierung subtrahiert. Der Einfluss von SAHN auf die Inhibition der Methylierung von **1** mit INMT wurde mit variierenden Konzentrationen von SAHN (0,3  $\mu\text{M}$ , 0,6  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ) mit 10  $\mu\text{M}$  wtNNMT, 2 mM SAM und **1**, bei 37 °C für 20 h im Vergleich zu einer Reaktion ohne SAHN untersucht. Die Addition von zusätzlichen 2 mM SAM nach 20 h Reaktion bei 37 °C im Vergleich zu einer Kontrollreaktion der Puffer zugegeben wurde, sollte zeigen, dass die Inhibition durch SAH einem kompetitiven Mechanismus folgt. Temperatur-Studien erfolgten in 500  $\mu\text{L}$  Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit 10  $\mu\text{M}$  Enzym, 2 mM **3** und SAM in 50 mM  $\text{KPi}$ , pH 7,0 für 20 h. pH-Studien erfolgten in 500  $\mu\text{L}$  Reaktionen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit 10  $\mu\text{M}$  Enzym, 2 mM **3** und SAM bei 37 °C für 20 h. Die Extraktion wurde für die jeweiligen Experimente mit 500  $\mu\text{L}$  DCM durchgeführt und 2-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-FID-Messung (8.8.3.1) zugegeben.

### 6.6.6 24-Deep-Well-Platten-Screening

Für ein effizientes Screening der Mutantenbibliothek sollte ein *Deep-Well*-Platten-Assay entwickelt werden. Um maximal viel Enzym für die Reaktionen verfügbar zu haben, wurden 24-*Deep-Well*-Platten (24-DWPs) mit pyramidenförmigen Böden eingesetzt. Diese Geometrie führt zu einer erhöhten Durchmischung und damit zu einem erhöhten Zellwachstum mit der Folge erhöhter Enzymkonzentrationen. Die Varianten und Kontrollen wurden so angeordnet, dass auf jeder Platte zwei Mal wtNNMT exprimiert wurde, sowie jede Platte eine Leervektor-Kontrolle, sowie eine Kontaminationskontrolle

(nur Medium) enthält. Die in 24-DWPs eingefrorenen Zellpellets (8.4.2.4) wurden aufgetaut und mit 500  $\mu$ L/Well Lysepuffer (50 mM  $KP_i$ , pH 7,0, 1 mg/mL Lysozym und 0,2 mg/mL DNase1) für 1 h bei 37 °C und 180 rpm lysiert. Der Zellrohextrakt wurde bei 4 °C mit  $3320 \times g$  für 15 min zentrifugiert, um den löslichen Überstand zu erhalten. 500  $\mu$ L Biotransformationen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE) mit 400  $\mu$ l Lysat, 2 mM des entsprechenden Pyrazols (**1-6**), 2 mM SAM-Disulfat-Tosylat und 1 % (v/v) DMSO für 20 h bei 37 °C und 180 rpm in einem Infors Multitron Pro (Infors HAT, Einsbach, DE) durchgeführt. Die Extraktion wurde mit 500  $\mu$ L DCM durchgeführt und 2-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-MS-Messung (8.8.3) zugegeben.

	1	2	3	4	5	6
A	Variante	Variante	Variante	Variante	wtNNMT	Variante
B	Variante	Variante	Variante	Variante	wtNNMT	Variante
C	Variante	Variante	Variante	Variante	Medium	Variante
D	Variante	Variante	Variante	Variante	Leervektor	Variante

**Abb. 42: Beispiel einer 24-Deep-Well-Platte für das Screening der Mutantenbibliothek.** Als Kontrollen dienen auf jeder Platte zwei Mal die Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT) in den Wells A5 und B5, ein Well (C5), das nur mit Medium befüllt ist, und mit einem sterilen Zahnstocher inokuliert wird, sowie die Expression des Leervektors in Well D5. Inokuliert wurde stets mit Einzelkolonien von Agarplatten.

### 6.6.7 Biotransformationen für Endpunktbestimmungen der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen

Eingefrorene Enzyme (8.5.2) wurden schnell aufgetaut und 500  $\mu$ l Biotransformationen wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE) mit 50  $\mu$ M des gereinigten Enzyms, 2 mM des entsprechenden Pyrazols (**1-6**), 4 mM SAM-Disulfat-Tosylat und 1 % (v/v) DMSO in 50 mM  $KP_i$ , pH 7,0 für 20 h bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt. Die Extraktion

wurde mit 500  $\mu\text{L}$  DCM durchgeführt und 2-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-FID-Messung (8.8.3) zugegeben.

### **6.6.8 Biotransformationen für die Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen**

Gefrorene Enzyme (8.5.2) wurden bei 37°C (schnell) aufgetaut und 500  $\mu\text{L}$  Biotransformationen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Deutschland) mit 50  $\mu\text{M}$  gereinigtem Enzym, 2 mM des entsprechenden Pyrazols (**1-6**), 2 mM SAM-Disulfat-Tosylat und 1 % (v/v) DMSO bei 37 °C und 550 rpm in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Die Reaktionsmischungen wurden bei 37 °C vorgewärmt und durch die Zugabe von SAM gestartet. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  DCM und Mischen für 40 s gestoppt. p-Xylol wurde als interner Standard für die GC-FID-Messung (8.8.3) zugegeben. Die Steigungen der Anfangsraten wurden mit Microsoft Excel berechnet.

### **6.6.9 In vivo Methylierung von 3-Methylpyrazol in *E. coli***

Variante v49 wurde in *E. coli* Express (8.1) exprimiert (8.4.2.2). Nach der Expression wurden die Zellen schonend zentrifugiert ( $3220 \times g$ , 4 °C, 10 min), einmal mit Reaktionspuffer 50 mM  $\text{KPi}$ , pH 7,0 gewaschen und zuletzt mit Reaktionspuffer, versetzt mit 10 mM Glukose, resuspendiert. Eingesetzt wurde eine finale Biomassekonzentration von 100  $\text{mg}_{\text{cww}}/\text{mL}$ , die mit 10 mM **1** bei 37 °C und 180 rpm für 72 h in 1,5 mL Reaktionsgefäßen geschüttelt wurde. Als Kontrolle diente eine Reaktion mit direkt vor Reaktionsbeginn durch Ultraschall aufgeschlossenen Zellen. Nach der Reaktion wurde der lösliche Überstand der Ganzzellkatalyse (Zentrifugation bei  $16.900 \times g$ , 4 °C, 10 min) mit 500  $\mu\text{L}$  DCM extrahiert. Von einem zweiten Ganzzellansatz wurde durch Zentrifugation das Zellpellet gewonnen, mit Reaktionspuffer gewaschen und für die Analyse der in den Zellen verbliebenen Produkte chemisch mittels B-PER™ (Thermo Scientific™ Kalifornien, US, Produktnummer: 89821) aufgeschlossen und ebenfalls extrahiert. Die Kontrollreaktion mit aufgeschlossenen Zellen wurde als Ganzes extrahiert. Die Proben wurden mittels GC-FID (8.8.3.1) analysiert.

### 6.6.10 Biotransformationen des Screenings von HMTs für die enzymatische Synthese von Alkyl-SAM-Analoga

Gefrorene Zellen der ausgewählten HMTs (8.4.2.5) wurden in 3 mL/g<sub>cww</sub> 50 mM KPi, pH 7,0 resuspendiert und mittels Sonifier 250 A (Branson, Danbury, Connecticut, US) für 3-5 min auf Eis aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 16.900 × g für 15 min wurden 245 µL des löslichen Überstandes in 500 µL Biotransformationen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE) mit 1 mM SAH, 40-80 Äquivalente (Tabelle 7) des entsprechenden Halogenalkans und 1 % (v/v) DMSO bei 25 °C und 550 rpm für 20 h in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Als Kontrollreaktionen dienten Pufferreaktionen und Reaktionen mit dem pET28a(+)-Leervektor. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 32 %iger Salzsäure (HCl) und 200 µl Acetonitril (ACN) und Mischen für 40 s gestoppt. Nach Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion für HPLC- und LC-MS-Messungen überführt.<sup>[227]</sup>

**Tabelle 7: Eingesetzte Äquivalente der Halogenalkane Iodmethan (MeI), Iodethan (EtI), Bromethan (EtBr), Iodpropan (PropI), Iodbutan (ButI), Brombutan (ButBr) und Chlorbutan (ButCl) in Bezug auf 1 mM S-Adenosyl-L-Homocystein zum Screening von HMTs.**

Halogenalkan	MeI	EtI	EtBr	PropI	ButI	ButBr	ButCl
Äquivalente	80	60	70	50	40	50	50

### 6.6.11 Biotransformationen für die enzymatische Synthese von Alkyl-SAM-Analoga

500 µL Biotransformationen wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE) mit 50 µM gereinigter NSA-Synthase (aclHMT, 8.5.3), 1 mM SAH, 10 mM (10 Äquivalente) des entsprechenden Halogenalkans und 1 % (v/v) DMSO bei 25 °C und 550 rpm für 20 h in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 32 %iger Salzsäure (HCl) und 200 µl Acetonitril (ACN) und Mischen für 40 s gestoppt. Nach Zentrifugation wurde die lösliche Fraktion für HPLC- und LC-MS-Messungen überführt.<sup>[227]</sup>

### 6.6.12 Biotransformationen der enzymatischen Kaskade zur Methylierung von 3-Methylpyrazol

500 µL Biotransformationen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE) mit jeweils 50 µM der gereinigten Variante v49 (8.5.2) und der NSA-Synthase (8.5.3), 2 mM von 1, 20 mM Halogenalkan und 1 % (v/v) DMSO bei 37 °C und 550 rpm für 20 h in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Als Kontrollreaktionen (Tabelle 8) diente das



systematische Ersetzen von Reagenzien mit Reaktionspuffer (50 mM  $\text{KPi}$ , pH 7,0). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  DCM und Mischen für 40 s gestoppt. 1-Methylpyridin wurde als interner Standard für die GC-FID- oder GC-MS-Messung (8.8.3) zugegeben. Die lösliche Fraktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  32 %iger Salzsäure (HCl) und 200  $\mu\text{l}$  Acetonitril (ACN), Mischen und Zentrifugation für die Messung über HPLC (8.8.4.2) vorbereitet.

**Tabelle 8: Reaktionen und Kontrollreaktionen der enzymatischen Methylierung von 3-Methylpyrazol (1) mittels v49 und NSA-Synthase mit Iodmethan (MeI).**

#	v49 [ $\mu\text{M}$ ]	NSA-Synthase [ $\mu\text{M}$ ]	Substrat 1 [mM]	SAH [ $\mu\text{M}$ ]	MeI [mM]	SAM [mM]
1	50	50	2			2
2		50	2			2
3			2	100 $\mu\text{M}$	20	
4	50	50	2	100 $\mu\text{M}$		
5		50	2	100 $\mu\text{M}$	20	
6	50		2	100 $\mu\text{M}$	20	
7-9	50	50	2	0/50/100 $\mu\text{M}$	20	

### 6.6.13 Biotransformationen der enzymatischen Kaskade zur Alkylierung von 3-Cyclopropylpyrazol

500  $\mu\text{L}$  Biotransformationen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, DE), falls nicht anders beschrieben, mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  der gereinigten Variante v36 (8.5.2) und der NSA-Synthase (8.5.3), 2 mM von **3**, 20 mM Halogenalkan und 1 % ( $v/v$ ) DMSO bei 37 °C und 550 rpm für 30 h bis 72 h in einem Eppendorf Thermomixer durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  DCM und Mischen für 40 s gestoppt. p-Xylol wurde als interner Standard für die GC-FID- oder GC-MS-Messung (8.8.3) zugegeben.<sup>[223]</sup>

### 6.6.14 Biotransformation im präparativen Maßstab durch die enzymatische Kaskade zur Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol

500 mL Biotransformation (1000-faches Skalierung zum Labormaßstab) wurden in einer 1 L Schott®-Flasche mit jeweils 50  $\mu\text{M}$  der gereinigten Variante v36 und der NSA-Synthase (acIHMT), 2 mM von **3**, 20 mM Iodmethan (MeI) bei 37 °C und 135 rpm für 15 h, sowie 150 rpm für 25 h in einem Infors Aquatron durchgeführt (Nach 15 h waren

Aggregate von denaturiertem Enzym zu beobachten. Die Geschwindigkeit des Schüttlers wurde daraufhin zur besseren Durchmischung für weitere 25 h auf 150 rpm erhöht). 3 Proben á 500 µL wurden am Ende der Reaktion entnommen und mit 500 µL DCM extrahiert, um die GC-Ausbeute mit p-Xylol als internen Standard zu bestimmen. Das verbliebene Reaktionsmedium wurde 4× mit 250 mL DCM extrahiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet und vorsichtig mit einem Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck konzentriert. Die Produkte wurden mit einer Kieselgel-M60-Säule mit DCM:Ethylacetat (4:1) als Laufmittelgemisch vom Edukt getrennt und mittels Dünnschichtchromatographie (TLC) mit Vanillefärbung und GC-FID-Messungen (8.8.3.3) verfolgt. Fraktionen, die entweder das Produkt oder das Edukt enthielten, wurden jeweils vereinigt, vorsichtig mit einem Rotationsverdampfer konzentriert und mittels NMR (8.8.1) analysiert.<sup>[223]</sup>

## **6.7 Allgemeines Protokoll zur chemischen Synthese von alkylierten Pyrazolen**

Die Synthese wurde nach einem zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt.<sup>[224]</sup> Das Pyrazol-Edukt **1-6** (1 Äquivalent) wurde in trockenem Tetrahydrofuran (THF) bei 0 °C unter mäßigem Rühren gelöst. 1 Äquivalent Natriumhydrid (NaH) und 1,5 Äquivalente Halogenalkan wurden bei Raumtemperatur zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktion mit ddH<sub>2</sub>O gequenchet und 2-4× mit DCM extrahiert. Eine Probe des Rohprodukts wurde für die Messung der chemischen Selektivität mittels GC-FID entnommen. Das Rohprodukt wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und mit einem Rotationsverdampfer unter reduziertem Druck konzentriert. Der beständige Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie mit Kieselgel M60 und Mischungen aus Ethylacetat und Cyclohexan als Lösungsmittel getrennt. Die Trennung wurde durch Dünnschichtchromatographie durchgeführt und wurde durch das Fluoreszenzquenching bei 254 nm, Vanillefärbung oder durch GC-FID-Messungen (8.8.3) verfolgt. Die Reinheit der gesammelten Fraktionen wurde immer mittels GC-FID bestimmt. Die reinen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer getrocknet. Die Proben wurden mittels NMR (8.8.1) charakterisiert. Identifizierte Strukturen wurden durch hochauflösende Massenanalyse (8.8.2) bestätigt.

## 6.8 Analytische Methoden

### 6.8.1 NMR-Analyse

NMR-Analysen wurden zur Identifizierung der Produkte durchgeführt. 2 bis 10 mg der Substanzen wurden in deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) gelöst mit einem Bruker 500 MHz-Gerät aufgenommen und auf Tetramethylsilan referenziert. Die Daten für  $^1\text{H}$ -NMR werden in der üblichen Form berichtet: chemische Verschiebung ( $\delta$  ppm), Multiplizität (d = Dublett, dd = Dublett von Dubletten, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett), Kopplungskonstante (Hz), Integration. Die Daten für  $^{13}\text{C}$ -NMR werden als chemische Verschiebung angegeben. Die korrekte Zuordnung der chemischen Verschiebungen wurde durch zweidimensionale Korrelationsmessungen bestätigt, einschließlich heteronuklearer Einzelquantenkohärenz (HSQC), heteronuklearer Mehrfachbindungskohärenz (HMBC) und homonuklearer Korrelationspektroskopie (COSY).

### 6.8.2 Hochauflösende-Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie (HR-ESI-MS)

Hochauflösende Massenspektren zur Produktbestätigung wurden mittels Elektrospray-Ionisation im positiven Modus auf einem microTOFQ Bruker Daltonics Massenspektrometer gemessen, das an eine Flüssigkeitschromatographie mit einer Agilent 1200 Serie LC gekoppelt ist. Der Scan begann bei 50 m/z und endete bei 1500 m/z. Die Kapillare war auf 4500 V eingestellt, der Endplatten-Offset auf -500 V, die Kollisionszelle RF auf 180,0 Vpp, der Nubilizer auf 0,4 bar, die Trockenheizung auf 200 °C, das Trockengas auf 4,0 L/min.

### 6.8.3 Gaschromatographie

Die Analyse von Pyrazolen wurde mittels Gaschromatographie (GC) durchgeführt. Dies ist möglich, da alle getesteten Pyrazole in organischem Lösungsmittel extrahierbar sind und ihre Siedepunkte unterhalb der Höchsttemperaturen der eingesetzten Säulen lagen.

Die Gaschromatographie wurde entweder mit Flammenionisationsdetektion (FID) oder Massendetektion (MS) durchgeführt. Als interner Standard für die Startaktivität und Charakterisierung von wtNNMT mit **1**, das Substratscreening und die Endpunktmessungen

wurde 2-Methylpyridin (in ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Für die Messungen der Anfangsraten der enzymatischen Reaktionen wurde p-Xylol (in DMSO) als interner Standard verwendet.

Die GC-MS-Analysen des 24-DWPs-Screenings wurden, falls nicht anders beschrieben, mit einer Shimadzu GC2010, die mit einem Shimadzu QP2010-Massenspektrometer ausgestattet ist, unter Verwendung einer Phenomenex ZB-5MSi-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm-Film, Teilenummer 7HG-G018-11) mit Helium als Trägergas und Druck (26,7 kPa) als Kontrollmodus durchgeführt. Injektortemperatur: 250 °C. Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 10 bei 1 µL Injektion. Temperatur der Ionenquelle: 200 °C, Temperatur der Schnittstelle: 280 °C.

Die GC-FID-Analysen für die Startaktivität und Charakterisierung von wtNNMT mit **1**, sowie die Endpunkt- und Anfangsratenmessungen wurden, falls nicht anders beschrieben, mit einer Shimadzu GC2010 Plus unter Verwendung einer Agilent J&W DB-WAX-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film, Teilenummer 122-7032) mit Wasserstoff als Trägergas und linearer Geschwindigkeit (41 cm/s) als Flusssteuerungsmodus durchgeführt. Injektortemperatur: 250 °C. Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 15 bei 1 µL Injektion. Detektor-Temperatur: 260 °C.

Die GC-FID-Analysen zur Messung der Selektivitäten von chemischen Synthesen wurden, falls nicht anders beschrieben, mit einer Shimadzu GC2010 Plus unter Verwendung einer Phenomenex ZB-5-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film, Teilenummer 7HK-G002-28) mit Wasserstoff als Trägergas und linearer Geschwindigkeit (41 cm/s) als Flusssteuerungsmodus durchgeführt. Injektortemperatur: 250 °C. Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 50 bei 1 µL Injektion. Detektor-Temperatur: 315 °C.

#### **6.8.3.1 3-Methylpyrazol (1), 1,3-Dimethylpyrazol (1a), 1,5-Dimethylpyrazol (1b)**

##### GC-FID-Analysen des Screenings, der Endpunktmessungen und der Selektivität der

chemischen Synthese: GC-FID-Analysen wurden mit einer Shimadzu GC2010 Plus unter Verwendung einer Agilent J&W DB-WAX-Säule (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Film, Teilenummer 122-7032) mit Wasserstoff als Trägergas und linearer Geschwindigkeit (33,1 cm/s) als Flusssteuerungsmodus durchgeführt. Injektortemperatur: 200 °C. Split-Modus mit einem Split-Verhältnis von 15 bei 1 µL Injektion. Detektor-Temperatur: 260 °C. Ofentemperatur: 120 °C, für 1 min aufrechterhalten, 17,5 °C/min bis 140 °C, 40 °C/min bis 230 °C gehalten für 3 min.

GC-FID-Analysen der Anfangsratenmessungen: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 17,5 °C/min bis 135 °C, 40 °C/min bis 230 °C gehalten für 3 min.

**6.8.3.2 3,4-Dimethylpyrazol (2), 1,3,4-Trimethylpyrazol (2a), 1,4,5-Trimethylpyrazol (2b)**

GC-MS-Analysen des 24-DWP-Screenings: Ofentemperatur: 60 °C, gehalten für 4 min, 15 °C/min bis 85 °C, 25 °C/min bis 170 °C, 50 °C/min bis 320 °C, gehalten für 3 min. SIM-Modus mit 93 m/z, 95 m/z und 109 m/z.

GC-FID-Analysen der Endpunkt- und Anfangsratenmessungen: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 25 °C/min bis 120 °C, 50 °C/min bis 230 °C, gehalten für 2 min.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 85 °C, für 2 min aufrechterhalten, 25 °C/min bis 120 °C, 15 °C/min bis 140 °C.

**6.8.3.3 3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Methyl-3-cyclopropylpyrazol (3a), 1-Methyl-5-cyclopropyl-pyrazol (3b)**

GC-MS-Analysen des 24-DWP-Screenings: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 50 °C/min bis 280 °C, gehalten für 2 min. SIM-Modus mit 93 m/z, 108 m/z und 122 m/z.

GC-FID-Analysen der Endpunktmessungen: Ofentemperatur: 110 °C, für 2 min aufrechterhalten, 25 °C/min bis 120 °C, für 3,5 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 230 °C, für 2 min aufrechterhalten.

GC-FID-Analysen der Anfangsratenmessung: Ofentemperatur: 110 °C, für 3 min aufrechterhalten, 25 °C/min bis 135 °C, für 3 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 230 °C, für 2,5 min aufrechterhalten.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, aufrechterhalten für 2 min, 50 °C/min bis 280 °C, aufrechterhalten für 2 min.

**6.8.3.4 3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Ethyl-3-cyclopropylpyrazol (7a), 1-Ethyl-5-cyclopropylpyrazol (7b)<sup>[223]</sup>**

GC-FID-Analysen von Endpunktmessungen und von Selektivitätsmessungen der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 3 min, 25 °C/min bis 135 °C, gehalten für 3 min, 50 °C/min bis 230 °C, gehalten für 2,5 min. Als interner Standard diente p-Xylol.

### 6.8.3.5 3-Cyclopropylpyrazol (3), 1-Propyl-3-cyclopropylpyrazol (8a), 1-Propyl-5-cyclopropyl-pyrazol (8b)<sup>[223]</sup>

GC-MS-Analysen der Endpunktmessungen (durchgeführt von Stephan Hammer, Universität Bielefeld): Die GC-MS-Analysen wurden mit einer Agilent 8860 GC, ausgestattet mit einem Agilent 5977B Massenspektrometer unter Verwendung einer Agilent DB-HeavyWAX-Säule (25 m x 0,25 mm, 0,20 µm Film, Teilenummer 122-7127) mit Helium als Trägergas und konstantem Druck als Kontrollmodus durchgeführt. Eingestellt wurde ein Split-Modus mit einem Splitverhältnis von 40, bei 1 µL Injektion. Ofentemperatur: 80 °C, gehalten für 2,25 min, 40 °C/min bis 270 °C, gehalten für 3 min. Als interner Standard diente p-Xylol.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, für 3 min gehalten, 25 °C/min bis 135 °C, für 3 min gehalten, 50 °C/min bis 230 °C, für 2,5 min gehalten.

### 6.8.3.6 3(2-Furyl)-Pyrazol (4), 1-Methyl-3(2-Furyl)-Pyrazol (4a), 1-Methyl-5(2-Furyl)-Pyrazol (4b)

GC-MS-Analysen des 24-DWP-Screenings: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 50 °C/min bis 280 °C, gehalten für 2 min. SIM-Modus mit 93 m/z, 134 m/z und 148 m/z.

GC-FID-Analysen der Endpunktmessungen: Ofentemperatur: 100 °C, gehalten für 2,25 min, 50 °C/min bis 230 °C, gehalten für 4,5 min.

GC-FID-Analysen der Anfangsratenmessung: Ofentemperatur: 100 °C für 2,25 min gehalten, 50 °C/min bis 230 °C, 6,5 min gehalten.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, 2 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 280 °C, 2 min aufrechterhalten.

### 6.8.3.7 3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5), 1-Methyl-3(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5a), 1-Methyl-5(2-Fluorphenyl)-Pyrazol (5b)

GC-MS-Analysen des 24-DWP-Screenings: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 50 °C/min bis 280 °C, gehalten für 2 min. SIM-Modus mit 93 m/z, 162 m/z und 176 m/z.

GC-FID-Analysen der Endpunktmessungen: Ofentemperatur: 100 °C, gehalten für 2,25 min, 50 °C/min bis 230 °C, gehalten für 6 min.

GC-FID-Analysen der Anfangsratenmessung: Ofentemperatur: 100 °C, für 2,25 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 230 °C, für 9 min aufrechterhalten.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, für 2 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 280 °C, für 2 min aufrechterhalten.

### **6.8.3.8 3-Methyl-4-Phenylpyrazol (6), 1,3-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (6a), 1,5-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (6b)**

GC-MS-Analysen des 24-DWP-Screenings: Ofentemperatur: 110 °C, gehalten für 2 min, 50 °C/min bis 280 °C, gehalten für 2 min. SIM-Modus mit 93 m/z, 158 m/z und 172 m/z.

GC-FID-Analysen der Endpunktmessungen: Ofentemperatur: 100 °C, gehalten für 2,25 min, 50 °C/min bis 230 °C, gehalten für 8 min.

GC-FID-Analysen der Anfangsratenmessung: Ofentemperatur: 100 °C, für 2,25 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 230 °C, für 12,75 min aufrechterhalten.

GC-FID-Analysen der Selektivitätsmessung der chemischen Synthese: Ofentemperatur: 110 °C, für 2 min aufrechterhalten, 50 °C/min bis 280 °C, für 2 min aufrechterhalten.

## **6.8.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

### **6.8.4.1 Detektion von SAH und SAM zum Nachweis der natürlichen Reaktion**

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analysen wurden mit einer Agilent-LC der Serie 1200, ausgestattet mit einem Diodenarray-Detektor, unter Verwendung einer Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 µm 120 Å (50 x 3 mm, Teilenummer AG699975-302) und den Puffern A (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) und Puffer B (ddH<sub>2</sub>O + 0,1 % Ameisensäure) und Detektion bei 260 nm durchgeführt. Temperatur der Säule: 35 °C mit 1 µL Injektion. Gradient: 100 % B bei einer Flussrate von 0,3 mL/min, reduziert über 2 min bis 78,7 % B, nach 1 s auf 1 mL/min erhöht und über 59 s auf 68 %B reduziert, nach 1 s auf 0 % B und für 2 min 59 s gehalten, danach für 2 min auf 100 % B und danach die Flussrate auf 0,3 mL/min reduziert.

### **6.8.4.2 Detektion und Quantifizierung von SAH, SAM und Alkyl-SAM-Analoga**

Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)-Analysen wurden mit einer Agilent-LC der Serie 1200, ausgestattet mit einem Diodenarray-Detektor, unter Verwendung einer Phenomenex Luna® 5 µm SCX 100 Å (100 x 4,6 mm, Teilenummer 00D-4398-E0) und

den Puffern A (20 mM KPi pH 2,5, 25 % (v/v) ACN) und Puffer B (20 mM KPi pH 2,5, 25 % (v/v) ACN, 400 mM Kaliumchlorid) und Detektion bei 260 nm durchgeführt. Temperatur der Säule: 40 °C bei einer Flussrate von 0,5 mL/min mit 4 µL Injektion. Gradient: 10 % B, erhöht über 8 min bis 90 % B, für 2 min gehalten, reduziert über 4 min bis 10 % B, für 3 min gehalten.<sup>[227]</sup>

#### **6.8.4.3 Massendetektion von SAH, SAM und Alkyl-SAM-Analoga**

Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektroskopie (LC/MS)-Analysen wurden mit einer Agilent 1260 infinity durchgeführt, ausgerüstet mit einem Quadrupol-LC/MS 6130-Detektor unter Verwendung einer Merck KGaA ZIC®-PHILIC-Säule (50 x 4,6 mm, Teilenummer 1.50463.0001). Für die Methode wurden die Puffer A (90 % ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 2,8) und Puffer B (10 % ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 2,8) bei einer Detektion bei 260 nm über DAD und 250-600 m/z im positiven Modus über MS-Detektor eingesetzt. Die Flussrate betrug 1 mL/min bei 40 µL Injektion. Gradient: 20 %B, gehalten für 1 min, erhöht über 11 min bis 75 % B, 2 min bis 100 % B, gehalten für 2 min, reduziert über 4 min bis 20 % B, gehalten für 10 min.<sup>[227]</sup>

## **6.9 Bioinformatische Methoden**

### **6.9.1 Strukturalignment**

Für einen strukturellen Vergleich verschiedener Wildtyp-NNMT-Strukturen, sowie von FuncLib-Varianten wurden Strukturalignments mit der freien Software PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.6, Schrödinger, LLC) durchgeführt. Hierbei werden die Strukturen so überlagert, dass die Summe aller räumlichen Abstände zwischen den Strukturen minimiert wird.

### **6.9.2 Erstellen der FuncLib<sup>[1]</sup>-Mutantenbibliothek**

Die Analyse der Kristallstrukturen von wtNNMT (PDB: 2iip, 3rod, 5yif, 6b1a, 6chh) anhand von Strukturüberlagerungen (8.9.1) zeigte trotz der verschiedenen gebundenen Moleküle keinen strukturellen Unterschied im aktiven Zentrum der wtNNMT-Kristalle. Mittels PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0.6, Schrödinger, LLC) wurden die Aminosäuren der substratbindenden Tasche im Abstand von 5 Å zum gebundenen Inhibitor in 5yjf identifiziert. Aminosäuren, die mit SAM oder SAH interagieren, wurden dabei ausgeschlossen. Für die Anwendung des FuncLib-Algorithmus



wurden so 12 Aminosäuren (Y20, Y24, L164, D167, D197, A198, S201, Y204, S213, Y242, A247 und N249) ausgewählt.

Die Mutantenbibliothek wurde über die Web-Anwendung des FuncLib-Algorithmus<sup>[1]</sup> (<http://funclib.weizmann.ac.il/bin/steps>) unter Verwendung des PDB-Codes von wtNNMT 2iip, der Kette A mit SAH als Ligand (4001A) erstellt. Als Variablen wurden die folgenden Standardeinstellungen beibehalten: min ID 0,3, max. Targets 3000, Coverage 0,6 und einen E-Wert von 0,0001. Dies führte zu 473.294 Designs im ersten Schritt. Für die Energieberechnungen und das Clustering wurden folgende Parameter eingestellt: minimale Anzahl von Mutationen pro Design = 3, maximale Anzahl von Mutationen pro Design = 5, minimaler PSSM-Schwellenwert = -1,  $\Delta\Delta G = 5,5$  und Differenz zwischen geclusterten Varianten = 3.

### 6.9.3 Erstellen eines Homologiemodells

Homologiemodelle von FuncLib-Varianten wurden mithilfe des Robetta-Servers<sup>[247]</sup> (<https://rosetta.bakerlab.org/>) der Baker-Gruppe erstellt. Die Struktur der jeweiligen Variante wurde anhand der vergleichenden Modellierung (CM only, CM = *comparative modelling*) mit der PDB-Struktur 2iip und der Kette A modelliert.

### 6.9.4 Erstellen eines Sequenzähnlichkeitsnetzwerkes

Das Sequenzähnlichkeitsnetzwerk der HMTs wurde in Kooperation mit Benjamin Aberle im Rahmen der begleiteten Bachelorthesis von S. Kienzle<sup>[227]</sup> anhand der bereits literaturbekannten HMT- Sequenzen<sup>[113]</sup> erstellt. Hierfür wurde eine Blast-Suche (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) mit den bereits bekannten Sequenzen als Templat durchgeführt. Dies geschah unter Verwendung der Standardparameter mit der Ausnahme, dass die Anzahl der Zielsequenzen auf 1000 eingestellt wurde. Nach dem Herunterladen jeder einzelnen Sequenz in der FASTA-Notation wurde mittels des webbasierten EFI – *Enzyme Similarity Tools*<sup>[293]</sup> (<https://efi.igb.illinois.edu/efi-est/>) ein Multisequenzalignment erstellt. Das Sequenzähnlichkeitsnetzwerk wurde anschließend mit der freien Software Cytoscape 3 (<https://cytoscape.org/>) erstellt.



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] O. Khersonsky, R. Lipsh, Z. Avizemer, Y. Ashani, M. Goldsmith, H. Leader, O. Dym, S. Rogotner, D. L. Trudeau, J. Prilusky, P. Amengual-Rigo, V. Guallar, D. S. Tawfik, S. J. Fleishman, *Mol. Cell* **2018**, *72*, 178–186.
- [2] J. W. Bode, J. Mahatthananchai, A. M. Dumas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10954–10990.
- [3] K. Krämer, *Chemistryworld* **2019**, DOI 10.1038/s41557-018-0021-z.
- [4] D. C. Blakemore, L. Castro, I. Churcher, D. C. Rees, A. W. Thomas, D. M. Wilson, A. Wood, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 383–394.
- [5] M. Suri, T. Jousseume, J. J. Neumann, F. Glorius, *Green Chem.* **2012**, *14*, 2193–2196.
- [6] N. K. Terrett, A. S. Bell, D. Brown, P. Ellis, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1819–1824.
- [7] J. Yamawaki, T. Ando, T. Hanafusa, *Chem. Lett.* **1981**, 1143–1146.
- [8] GESTIS-Stoffdatenbank, gefunden unter <http://gestis.itrust.de>, **2018**.
- [9] T. Oku, Y. Arita, H. Tsuneki, T. Ikariya, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7368–7377.
- [10] R. Goikhman, T. L. Jacques, D. Sames, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3042–3048.
- [11] K. Ajay Kumar, P. Jayaroopa, *Int. J. PharmTech Res.* **2013**, *5*, 1473–1486.
- [12] L. C. Behr, R. Fusco, C. H. Jarboe, in *Chem. Heterocycl. Compd.* (Ed.: A. Weissberger), John Wiley & Sons, **1967**.
- [13] S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451–3479.
- [14] D. G. Brown, J. Boström, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 4443–4458.
- [15] E. J. Barreiro, A. E. Kümmerle, C. A. M Fraga, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5215–5246.
- [16] S. Sun, J. Fu, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3283–3289.
- [17] R. B. Silverman, M. W. Holladay, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action: Third Edition*, Elsevier Inc., **2015**.

- [18] E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardarson, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274.
- [19] D. J. C. Constable, P. J. Dunn, J. D. Hayler, G. R. Humphrey, J. L. Leazer, Jr., R. J. Linderman, K. Lorenz, J. Manley, B. A. Pearlman, A. Wells, A. Zaks, T. Y. Zhang, *Green Chem.* **2007**, *9*, 411–420.
- [20] O. I. El-Sabbagh, M. M. Baraka, S. M. Ibrahim, C. Pannecouque, G. Andrei, R. Snoeck, J. Balzarini, A. A. Rashad, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3746–3753.
- [21] M. Abdel-Aziz, G. E. D. A. Abu-Rahma, A. A. Hassan, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3480–3487.
- [22] D. Raffa, B. Maggio, M. V. Raimondi, S. Cascioferro, F. Plescia, G. Cancemi, G. Daidone, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 732–746.
- [23] D. Raffa, O. Migliara, B. Maggio, F. Plescia, S. Cascioferro, M. G. Cusimano, G. Tringali, C. Cannizzaro, F. Plescia, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2010**, *343*, 631–638.
- [24] M. A. M. Gomaa, D. K. Hassan, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2019**, *352*, 320–331.
- [25] W. Zhan, J. Che, L. Xu, Y. Wu, X. Hu, Y. Zhou, G. Cheng, Y. Hu, X. Dong, J. Li, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *180*, 72–85.
- [26] K. v. Auwers, W. Kohlhaas, *Justus Liebig's Ann. der Chemie* **1924**, *437*, 36–63.
- [27] A. Ansari, A. Ali, M. Asif, S. Shamsuzzaman, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 16–41.
- [28] R. Sridhar, P. T. Perumal, S. Etti, G. Shanmugam, M. N. Ponnuswamy, V. R. Prabavathy, N. Mathivanan, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 6035–6040.
- [29] S. R. Stauffer, Y. R. Huang, Z. D. Aron, C. J. Coletta, J. Sun, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen, *Bioorganic Med. Chem.* **2001**, *9*, 151–161.
- [30] R. Storer, C. J. Ashton, A. D. Baxter, M. M. Hann, C. L. P. Marr, A. M. Mason, C. L. Mo, P. L. Myers, S. A. Noble, C. R. Penn, N. G. Weir, J. M. Woods, P. L. Coe, *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 203–216.
- [31] P. T. Birmann, A. M. Casaril, D. Hartwig, R. G. Jacob, F. K. Seixas, T. Collares, L. Savegnago, *Brain Res.* **2020**, *1741*, 146880.
- [32] S. Tarun, Mithilesh, S. Raju, C. Pooja, S. S. K., *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2012**, *2*, 81–96.

- [33] N. D. Amnerkar, K. P. Bhusari, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 149–159.
- [34] X. Zhang, X. Li, G. F. Allan, T. Sbriscia, O. Linton, S. G. Lundeen, Z. Sui, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3857–3869.
- [35] G. Turan-Zitouni, P. Chevallet, F. S. Kiliç, K. Erol, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 635–641.
- [36] A. A. Bekhit, H. M. A. Ashour, Y. S. Abdel Ghany, A. E. D. A. Bekhit, A. Baraka, *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 456–463.
- [37] S. M. El-Moghazy, F. F. Barsoum, H. M. Abdel-Rahman, A. A. Marzouk, *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1722–1733.
- [38] G. Menozzi, L. Mosti, P. Schenone, D. Donnoli, F. Schiariti, E. Marmo, *Farmaco* **1990**, *45*, 167–186.
- [39] X. Liu, L. Qiao, Z. Zhai, P. Cai, C. L. Cantrell, C. Tan, J. Weng, L. Han, H. Wu, *Pest Manag. Sci.* **2019**, ps.5463.
- [40] N. B. Sun, Y. Lu, J. Yu, S. L. Wang, W. Ke, L. Wang, in *Sviridov Readings 2018 8<sup>th</sup> Intern. Conf. Chem. Chem. Educ.*, Minsk, Belarus, **2018**, pp. 97–99.
- [41] Y. Ren, N. Yang, Y. Yue, H. Jin, K. Tao, T. Hou, *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26*, 2280–2286.
- [42] C. Lamberth, J. Dinges, *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, **2012**.
- [43] J. L. Huppatz, J. N. Phillips, B. Witzens. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 45-50.
- [44] B. He, J. Dong, H. Y. Lin, M. Y. Wang, X. K. Li, B. F. Zheng, Q. Chen, G. F. Hao, W. C. Yang, G. F. Yang, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 10844–10852.
- [45] S. Zhou, L. Xu, M. Cao, Z. Wang, D. Xiao, S. Xu, J. Deng, X. Hu, C. He, T. Tao, W. Wang, A. Guan, X. Yang, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2019**, *352*, e1900075.
- [46] A. K. Verma, *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* **2014**, *4*, 21–24.
- [47] A. W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2642–2655.

- [48] C. S. Leung, S. S. F. Leung, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4489–4500.
- [49] J. Chatterjee, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 254–269.
- [50] A. Gomtsyan, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2012**, *48*, 7–10.
- [51] O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon, A. Hoffman, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 479–487.
- [52] H. Schönherr, T. Cernak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12256–12267.
- [53] B. Sun, K. Liu, J. Han, L. Y. Zhao, X. Su, B. Lin, D. M. Zhao, M. S. Cheng, *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, *23*, 6763–6773.
- [54] J. Börgel, T. Ritter, *Chem* **2020**, *6*, 1877–1887.
- [55] F. Aguilar-parrilla, C. Cativiela, M. Dolores, D. De Villegas, J. Elguero, C. F.- Faces, G. Laureiro, F. Hernandez, H. Limbach, J. A. S. Smithe, C. Toironc, **1992**, *3*, 1737–1742.
- [56] V. Kumar, K. Kaur, G. K. Gupta, A. K. Sharma, *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 735–753.
- [57] P. Yurkanis Bruice, *Organic Chemistry 8th Edition*, Pearson, Santa Barbara, **2016**.
- [58] P. Tundo, M. Selva, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 706–716.
- [59] H. Ogawa, Y. Ichimura, T. Chihara, S. Teratani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 2481–2483.
- [60] X. J. Wang, J. Tan, L. Zhang, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3107–3109.
- [61] U. M. C. E. Mortimer, *Das Basiswissen Der Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New-York, **2015**.
- [62] D. Xu, L. Frank, T. Nguyen, A. Stumpf, D. Russell, R. Angelaud, F. Gosselin, *Synlett* **2019**, *31*, 595–599.
- [63] A. V. Ivachtchenko, D. V. Kravchenko, V. I. Zheludeva, D. G. Pershin, *J. Heterocycl. Chem.* **2004**, *41*, 931–939.
- [64] V. V. Rusak, M. I. Zaretsky, V. V. Semenov, E. M. Chartov, B. I. Ugrak, Z. N. Nysenko, *Coke Chem.* **2015**, *58*, 275–278.

- [65] K. Krämer, *Chemistryworld* **2019**, DOI 10.1038/s41557-018-0021-z.
- [66] L. C. Behr, R. Fusco, C. H. Jarboe, in *Chem. Heterocycl. Compd.* (Ed.: A. Weissberger), John Wiley & Sons, **1967**.
- [67] M. Grimmett, K. Lim, R. Weavers, *Aust. J. Chem.* **1979**, *32*, 2203–2213.
- [68] A. M. Roe, *J. Chem. Soc.* **1963**, 2189–2194.
- [69] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [70] B. Hauer, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 8418–8427.
- [71] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095.
- [72] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kessler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- [73] L. A. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, M. Dippe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 229–235.
- [74] M. R. Bennett, S. A. Shepherd, V. A. Cronin, J. Micklefield, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 97–106.
- [75] S. Pompei, C. Grimm, J. E. Farnberger, L. Schober, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 5977–5983.
- [76] J. E. Farnberger, K. Hiebler, S. Bierbaumer, W. Skibar, F. Zepeck, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 3900–3905.
- [77] J. L. Martin, F. M. McMillan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 783–793.
- [78] B. A. Moffatt, E. A. Weretilnyk, *Physiol. Plant.* **2001**, *113*, 435–442.
- [79] R. Z. Jurkowska, T. P. Jurkowski, A. Jeltsch, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 206–222.
- [80] S. C. Dillon, X. Zhang, R. C. Trievel, X. Cheng, *Genome Biol.* **2005**, *6*, 227.
- [81] R. M. Weinshilboum, D. M. Otterness, C. L. Szumlanski, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 19–52.

- [82] Q. Tang, Engineering of Methyltransferases : Exploring Their Catalytic Promiscuity, Dissertation, Universität Greifswald, **2020**.
- [83] M. V. Makarov, S. A. J. Trammell, M. E. Migaud, *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *47*, 131–147.
- [84] P. Pissios, *Trends Endocrinol. Metab.* **2017**, *28*, 340-353.
- [85] W. H. Kuo, Y. Y. Chang, L. C. Lai, M. H. Tsai, C. K. Hsiao, K. J. Chang, E. Y. Chuang, *PLoS One* **2012**, *7*, e45831.
- [86] M. Roeßler, W. Rollinger, S. Palme, M. L. Hagmann, P. Berndt, A. M. Engel, B. Schneidinger, M. Pfeffer, H. Andres, J. Karl, H. Bodenmüller, J. Rüschoff, T. Henkel, G. Rohr, S. Rossol, W. Rösch, H. Langen, W. Zolg, M. Tacke, *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 6550–6557.
- [87] D. Sartini, R. Seta, V. Pozzi, S. Morganti, C. Rubini, A. Zizzi, M. Tomasetti, L. Santarelli, M. Emanuelli, *Biol. Chem.* **2015**, *396*, 225–234.
- [88] X. M. Lu, H. Long, *Neoplasma* **2018**, *65*, 656–663.
- [89] C. D. Rogers, N. Fukushima, N. Sato, C. Shi, N. Prasad, S. R. Hustinx, H. Matsubayashi, M. Canto, J. R. Eshleman, R. H. Hruban, M. Goggins, *Cancer Biol. Ther.* **2006**, *5*, 1383–1389.
- [90] R. B. Parsons, S. W. Smith, R. H. Waring, A. C. Williams, D. B. Ramsden, *Neurosci. Lett.* **2003**, *342*, 13–16.
- [91] R. B. Parsons, M. L. Smith, A. C. Williams, R. H. Waring, D. B. Ramsden, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2002**, *61*, 111–124.
- [92] H. Neelakantan, V. Vance, M. D. Wetzel, H. Y. L. Wang, S. F. McHardy, C. C. Finnerty, J. D. Hommel, S. J. Watowich, *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *147*, 141–152.
- [93] M. Liu, L. Li, J. Chu, G. Dai, W. Ju, Z. Wang, Z. Fang, *J. Hypertens.* **2016**, *34*, e393–e394.
- [94] A. Kannt, A. Pfenninger, L. Teichert, A. Tönjes, A. Dietrich, M. R. Schön, N. Klötting, M. Blüher, *Diabetologia* **2015**, *58*, 799–808.



- [95] M. Liu, A. He, J. Chu, C. Chen, S. Zhang, Y. He, W. Tao, M. Lu, M. Hua, W. Ju, Z. Fang, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–6.
- [96] C. K. Ho, M. Mofarrahi, T. Vassilakopoulos, F. Maltais, I. Sigala, R. Debigare, I. Bellenis, S. N. A. Hussain, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**, *181*, 797–805.
- [97] Ł. Mateuszuk, T. I. Khomich, E. Słomińska, M. Gajda, L. Wójcik, M. Łomnicka, P. Gwóźdź, S. Chłopicki, *Pharmacol. Reports* **2009**, *61*, 76–85.
- [98] R. Cuomo, M. Dattilo, R. Pumpo, G. Capuano, L. Boselli, G. Budillon, *J. Hepatol.* **1994**, *20*, 138–142.
- [99] C. Tongsook, J. Niederhauser, E. Kronegger, G. Straganz, P. Macheroux, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2017**, *1863*, 188–199.
- [100] K. Yamauchi, K. Sekizawa, H. Suzuki, H. Nakazawa, Y. Ohkawara, D. Katayose, H. Ohtsu, G. Tamura, S. Shibahara, M. Takemura, *Am J Physiol* **1994**, *267*, L342-9.
- [101] J. R. Horton, K. Sawada, M. Nishibori, X. Cheng, *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 334–344.
- [102] H. L. Schubert, R. M. Blumenthal, X. Cheng, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329–335.
- [103] V. Anantharaman, E. V. Koonin, L. Aravind, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1427–1464.
- [104] R. C. Trievel, E. M. Flynn, R. L. Houtz, J. H. Hurley, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 545–552.
- [105] C. Qian, M. M. Zhou, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 2755–2763.
- [106] P. Z. Kozbial, A. R. Mushegian, *BMC Struct. Biol.* **2005**, *5*, 1–26.
- [107] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097–1106.
- [108] B. P. S. Chouhan, S. Maimaiti, M. Gade, P. Laurino, *Biochemistry* **2019**, *58*, 166–170.
- [109] D. K. Liscombe, G. V. Louie, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1238.
- [110] Y. Peng, D. Sartini, V. Pozzi, D. Wilk, M. Emanuelli, V. C. Yee, *Biochemistry* **2011**, *50*, 7800–7808.
- [111] J. L. Martin, J. Begun, M. J. McLeish, J. M. Caine, G. L. Grunewald, *Structure* **2001**, *9*, 977–985.

- [112] J. W. Schmidberger, A. B. James, R. Edwards, J. H. Naismith, D. O'Hagan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3646–3648.
- [113] T. S. Bayer, D. V. Santi, C. A. Voigt, K. Temme, D. M. Widmaier, E. A. Mirsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6508–6515.
- [114] T. C. Bruice, *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 139–148.
- [115] Q. Sun, M. Huang, Y. Wei, *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11*, 632–650.
- [116] H. S. Loring, P. R. Thompson, *Biochemistry* **2018**, *57*, 5524–5532.
- [117] T. Bottiglieri, *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 1151S–1157S.
- [118] T. D. Huber, B. R. Johnson, J. Zhang, J. S. Thorson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 189–197.
- [119] D. F. Iwig, S. J. Booker, *Biochemistry* **2004**, *43*, 13496–13509.
- [120] J. Zhang, Y. G. Zheng, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 583–597.
- [121] K. Li, G. Li, L. M. T. Bradbury, A. D. Hanson, S. D. Bruner, *Biochem. J.* **2016**, *473*, 277–284.
- [122] M. Thomsen, S. B. Vogensen, J. Buchardt, M. D. Burkart, R. P. Clausen, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7606–7610.
- [123] C. Liao, F. P. Seebeck, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 696–701.
- [124] H. K. Chenault, E. S. Simon, G. M. Whitesides, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6*, 221–270.
- [125] J. L. Hoffman, *Biochemistry* **1986**, *25*, 4444–4449.
- [126] 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.
- [127] S. Mordhorst, J. Siegrist, M. Müller, M. Richter, J. N. Andexer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4037–4041.

- [128] N. J. Walton, A. Narbad, C. B. Faulds, G. Williamson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 490–496.
- [129] A. M. Kunjapur, J. C. Hyun, K. L. J. Prather, *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, DOI 10.1186/s12934-016-0459-x.
- [130] X. Q. Zhao, B. Gust, L. Heide, *Arch. Microbiol.* **2010**, *192*, 289–297.
- [131] S. Okamoto, A. Lezhava, T. Hosaka, Y. Okamoto-Hosoya, K. Ochi, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 601–609.
- [132] A. Nakagawa, E. Matsumura, T. Koyanagi, T. Katayama, N. Kawano, K. Yoshimatsu, K. Yamamoto, H. Kumagai, F. Sato, H. Minami, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10390.
- [133] J. S. Morris, R. A. Groves, J. M. Hagel, P. J. Facchini, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 13364–13376.
- [134] T. Morishige, K.-B. Choi, F. Sato, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 939–941.
- [135] M. W. Bhuiya, C. J. Liu, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 277–285.
- [136] Y. Cai, K. Zhang, H. Kim, G. Hou, X. Zhang, H. Yang, H. Feng, L. Miller, J. Ralph, C. J. Liu, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11989.
- [137] E. J. Joe, B. G. Kim, B. C. An, Y. Chong, J. H. Ahn, *Mol. Cells* **2010**, *30*, 137–141.
- [138] J. Zhang, J. P. Klinman, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17134–17137.
- [139] P. O. Trauzettel, *O-Methyltransferasen für die chemo- und regioselektive Alkylierung phenolischer Synthesebausteine*, Dissertation, Universität Stuttgart, **2017**.
- [140] A. J. Herbert, S. A. Shepherd, V. A. Cronin, M. R. Bennett, R. Sung, J. Micklefield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, anie.202004963.
- [141] J. Weinstein, O. Khersonsky, S. J. Fleishman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, *63*, 58–64.
- [142] K. K. Yang, Z. Wu, F. H. Arnold, *Nat. Methods* **2019**, *16*, 687–694.
- [143] J. A. G. M. de Visser, T. F. Cooper, S. F. Elena, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, *278*, 3617–3624.
- [144] E. Dellus-Gur, M. Elias, E. Caselli, F. Prati, M. L. M. Salverda, J. A. G. M. De Visser, J. S. Fraser, D. S. Tawfik, *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 2396–2409.

- [145] P. C. Phillips, *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 855–867.
- [146] T. N. Starr, J. W. Thornton, *Protein Sci.* **2016**, *25*, 1204–1218.
- [147] C. M. Miton, N. Tokuriki, *Protein Sci.* **2016**, *25*, 1260–1272.
- [148] D. M. Weinreich, R. A. Watson, L. Chao, *Evolution* **2005**, *59*, 1165–1174.
- [149] D. M. Weinreich, N. F. Delaney, M. a Depristo, D. L. Hartl, *Science* **2006**, *312*, 111–114.
- [150] X. Wang, G. Minasov, B. K. Shoichet, *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 85–95.
- [151] B. K. Shoichet, W. A. Baase, R. Kuroki, B. W. Matthews, *PNAS USA* **1995**, *92*, 452–456.
- [152] S. Bershtein, M. Segal, R. Bekerman, N. Tokuriki, D. S. Tawfik, *Nature* **2006**, *444*, 929–932.
- [153] J. D. Bloom, S. T. Labthavikul, C. R. Otey, F. H. Arnold, *PNAS USA* **2006**, *103*, 5869–5874.
- [154] J. D. Bloom, F. H. Arnold, *Light Evol.* **2009**, *3*, 149–163.
- [155] M. Goldsmith, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2017**, *47*, 140–150.
- [156] C. A. Tracewell, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 3–9.
- [157] A. N. Bigley, C. Xu, T. J. Henderson, S. P. Harvey, F. M. Raushel, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10426–10432.
- [158] K. M. Esvelt, J. C. Carlson, D. R. Liu, *Nature* **2011**, *472*, 499–503.
- [159] K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. Del Cardayr, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948–3959.
- [160] M. Tengg, H. Stecher, L. Offner, K. Plasch, F. Anderl, H. Weber, H. Schwab, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1354–1360.
- [161] H. Stecher, M. Tengg, B. J. Ueberbacher, P. Remler, H. Schwab, H. Griengl, M. Gruber-Khadjawi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9546–9548.
- [162] C. Dalhoff, G. Lukinavičius, S. Klimašauskas, E. Weinhold, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 31–32.

- [163] M. Dippe, W. Brandt, H. Rost, A. Porzel, J. Schmidt, L. A. Wessjohann, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 3637–3640.
- [164] B. J. C. Law, A. W. Struck, M. R. Bennett, B. Wilkinson, J. Micklefield, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 2885–2892.
- [165] I. J. W. McKean, P. A. Hoskisson, G. A. Burley, *ChemBioChem* **2020**, 2890–2897.
- [166] F. P. Liao, Cangsong; Seebeck, *Method for the Biocatalytic Alkylation of a Substrate*, **2019**, WO2020053196A1.
- [167] C. Liao, F. P. Seebeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7184–7187.
- [168] M. A. Beliaeva, R. Burn, D. Lim, F. P. Seebeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, DOI 10.1002/anie.202011096.
- [169] J. Micklefield, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 644–645.
- [170] J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342.
- [171] N. Yoneyama, H. Morimoto, C.-X. X. Ye, H. Ashihara, K. Mizuno, M. Kato, A. Kouichi, M. Ae, M. Kato, *Mol. Genet. Genomics* **2006**, *275*, 125–135.
- [172] A. A. McCarthy, J. G. McCarthy, *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 879–889.
- [173] A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 200–207.
- [174] A. M. Bennett, M. L. Thompson, S. A. Shepherd, A. J. Herbert, M. S. Dunstan, A. J. Herbert, D. R. M. Smith, V. A. Cronin, B. R. K. Menon, C. Levy, J. Micklefield, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 10600–10604.
- [175] K. B. Choi, T. Morishige, N. Shitan, K. Yazaki, F. Sato, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 830–835.
- [176] K.-B. Choi, T. Morishige, F. Sato, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 649–655.
- [177] J. S. Morris, P. J. Facchini, *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 23416–23427.
- [178] H. Minami, J.-S. Kim, N. Ikezawa, T. Takemura, T. Katayama, H. Kumagai, F. Sato, *PNAS USA* **2008**, *105*, 7393–7398.
- [179] E. Kulikowska, B. Kierdaszuk, D. Shugar, *Acta Biochim. Pol.* **2004**, *51*, 493–531.

- [180] K. Mizuno, M. Kato, F. Irino, N. Yoneyama, T. Fujimura, H. Ashihara, *FEBS Lett.* **2003**, *547*, 56–60.
- [181] S. S. M. Waldhauser, J. A. Kretschmar, T. W. Baumann, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 853–859.
- [182] B. Rohde, J. Hans, S. Martens, A. Baumert, P. Hunziker, U. Matern, *Plant J.* **2008**, *53*, 541–553.
- [183] S. Aksoy, C. L. Szumlanski, R. M. Weinshilboum, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 14835–14840.
- [184] M. G. Thomas, D. Sartini, M. Emanuelli, M. J. van Haren, N. I. Martin, D. M. Mountford, D. J. Barlow, F. Klamt, D. B. Ramsden, M. Reza, R. B. Parsons, *Biochem. J.* **2016**, *473*, 3253–3267.
- [185] M. J. van Haren, J. Sastre Toraño, D. Sartini, M. Emanuelli, R. B. Parsons, N. I. Martin, J. S. Toraño, D. Sartini, M. Emanuelli, R. B. Parsons, N. I. Martin, J. Sastre Toraño, D. Sartini, M. Emanuelli, R. B. Parsons, N. I. Martin, *Biochemistry* **2016**, *55*, 5307–5315.
- [186] S. Aksoy, R. Raftogianis, R. Weinshilboum, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 548–554.
- [187] H. Stark, *Histamine H4 Receptor: A Novel Drug Target in Immunoregulation and Inflammation*, Versita, London, **2013**.
- [188] J. R. Horton, K. Sawada, M. Nishibori, X. Zhang, X. Cheng, *Structure* **2001**, *9*, 837–849.
- [189] M. A. Beaven, R. E. Shaff, *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 183–188.
- [190] H. Fukuda, A. Yamatodani, I. Imamura, K. Maeyama, T. Watanabe, H. Wada, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* **1991**, *567*, 459–464.
- [191] G. Pacifici, P. Donatelli, L. Giuliani, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *34*, 322–327.
- [192] T. Biegański, J. Kusche, K. D. Feußner, R. Hesterberg, H. Richter, W. Lorenz, *Agents Actions* **1980**, *10*, 108–110.

- [193] I. Marasović-Šušnjara, V. Palada, I. Marinović-Terzić, N. Mimica, J. Marin, D. Muck-Seler, M. Mustapić, P. Presečki, N. Pivac, V. Folnegović-Šmalc, J. Marinović-Ćurin, J. Terzić, *Neurosci. Lett.* **2011**, *489*, 119–121.
- [194] H. Barth, M. Crombach, W. Schunack, W. Lorenz, *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 1399–1407.
- [195] C. Dent, F. Nilam, I. R. Smith, *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 2297–2300.
- [196] J. Axelrod, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1657–1660.
- [197] N. Kirshner, M. Goodall, *BBA - Gen. Subj.* **1957**, *24*, 658–659.
- [198] J. M. Caine, I. G. Macreadie, G. L. Grunewald, M. J. Mcleish, *Protein Expr. Purif.* **1996**, *8*, 160–166.
- [199] N. Drinkwater, C. L. Gee, M. Puri, K. R. Criscione, M. J. McLeish, G. L. Grunewald, J. L. Martin, *Biochem. J.* **2009**, *422*, 463–471.
- [200] R. W. Fuller, J. M. Hunt, *Biochem. Pharmacol.* **1965**, *14*, 1896–1897.
- [201] D. A. Gearhart, E. J. Neafsey, M. A. Collins, *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 611–620.
- [202] S. S. Ansher, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 3996–4001.
- [203] P. A. Crooks, C. S. Godin, L. A. Damani, S. S. Ansher, W. B. Jakoby, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 1673–1677.
- [204] J. Axelrod, *Science* **1961**, *134*, 343.
- [205] M. A. Thompson, R. M. Weinshilboum, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34502–34510.
- [206] K. S. Herman, R. R. Bowsher, D. P. Henry, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 12336–40.
- [207] M. A. Thompson, E. Moon, U.-J. J. Kim, J. Xu, M. J. Siciliano, R. M. Weinshilboum, *Genomics* **1999**, *61*, 285–297.
- [208] M. A. Thompson, R. M. Weinshilboum, J. El Yazal, T. C. Wood, Y. P. Pang, *J. Mol. Model.* **2001**, *7*, 324–333.
- [209] A. Pavelka, E. Chovancova, J. Damborsky, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 376–383.
- [210] M. T. Reetz, L. W. Wang, M. Bocola, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1236–1241.

- [211] J. Damborsky, J. Brezovsky, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 26–34.
- [212] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 447–470.
- [213] H. J. Wijma, R. J. Floor, S. Bjelic, S. J. Marrink, D. Baker, D. B. Janssen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3726–3730.
- [214] S. M. Marques, J. Planas-iglesias, J. Damborsky, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *69*, 19–34.
- [215] I. Cherny, P. Greisen, Y. Ashani, S. D. Khare, G. Oberdorfer, H. Leader, D. Baker, D. S. Tawfik, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2394–2403.
- [216] C. P. S. Badenhorst, U. T. Bornscheuer, *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 180–198.
- [217] O. Khersonsky, G. Kiss, D. Röthlisberger, O. Dym, S. Albeck, K. N. Houk, D. Baker, D. S. Tawfik, *PNAS USA* **2012**, *109*, 10358–10363.
- [218] R. Blomberg, H. Kries, D. M. Pinkas, P. R. E. Mittl, M. G. Grütter, H. K. Privett, S. L. Mayo, D. Hilvert, *Nature* **2013**, *503*, 418–421.
- [219] D. Baker, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 1817–1819.
- [220] S. D. Khare, Y. Kipnis, P. J. Greisen, R. Takeuchi, Y. Ashani, M. Goldsmith, Y. Song, J. L. Gallaher, I. Silman, H. Leader, J. L. Sussman, B. L. Stoddard, D. S. Tawfik, D. Baker, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 294–300.
- [221] S. C. Hammer, A. M. Knight, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2017**, *7*, 23–30.
- [222] Q. Wu, C. L. Gee, F. Lin, J. D. Tyndall, J. L. Martin, G. L. Grunewald, M. J. McLeish, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7243–7252.
- [223] A.-N. Egler-Kemmerer, Enzymatische Synthese regioselektiv alkylierter Pyrazole, Masterthesis, Universität Stuttgart, **2020**.
- [224] N. J. P. Broom, J. S. Elder, P. C. T. Hannan, J. E. Pons, P. J. O’Hanlon, G. Walker, J. Wilson, P. Woodall, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1995**, *48*, 1336–1344.
- [225] K. C. Cundy, P. A. Crooks, C. Steven Godin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *128*, 312–316.



- [226] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 2006.0008.
- [227] S. Kienzle, Biokatalytische Darstellung von *S*-Adenosyl-L-Methionin Derivaten durch enzymatische *S*-Adenosyl-L-Homocystein Funktionalisierung, Bachelorthesis, Universität Stuttgart, **2020**.
- [228] M. J. van Haren, M. G. Thomas, D. Sartini, D. J. Barlow, D. B. Ramsden, M. Emanuelli, F. Klamt, N. I. Martin, R. B. Parsons, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *98*, 127–136.
- [229] C. Schnepel, N. Sewald, *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 12064–12086.
- [230] M. Pogson, G. Georgiou, B. L. Iverson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 390–397.
- [231] L. G. Otten, F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 46–54.
- [232] A. Goldenzweig, S. J. Fleishman, *Annu. Rev. Biochem.* **2018**, *87*, 105–129.
- [233] R. L. Lin, N. Narasimhachari, H. E. Himwich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *54*, 751–759.
- [234] Z. Changkuo, W. Xianheng, Z. Yiqi, L. Liangye, G. Wehang, H. Ting, X. Lang, *Preparation Technology of 3-Cyclopropyl-1-Methyl-1H-Pyrazole-4-Formaldehyde*, **2018**, CN109053575 (A).
- [235] C. Liu, K. Leftheris, J. Lin, *Benzothiazole and Azabenzothiazole Compounds Useful as Kinase Inhibitors*, **2006**, WO2007016392 (A2).
- [236] J. P. Whitten, Y. Pei, J. Cao, Z. Wang, E. Rogers, B. Dyck, J. Grey, *Compounds That Modulate Intracellular Calcium*, **2011**, US 2011/0263612 A1.
- [237] C. L. Habraken, J. A. Moore, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1892–1896.
- [238] J. K. Coward, M. D'Urso-Scott, W. D. Sweet, *Biochem. Pharmacol.* **1972**, *21*, 1200–1203.
- [239] J. K. Coward, E. P. Slisz, F. Ying-Hsiueh Wu, *Biochemistry* **1973**, *12*, 2291–2297.
- [240] Y. Huang, J. Komoto, K. Konishi, Y. Takata, H. Ogawa, T. Gomi, M. Fujioka, F. Takusagawa, *J. Mol. Biol.* **2000**, *298*, 149–162.
- [241] D. K. Liscombe, A. R. Usera, S. E. O'Connor, *PNAS USA* **2010**, *107*, 18793–18798.

- [242] L. Misson, R. Burn, A. Vit, J. Hildesheim, M. A. Beliaeva, W. Blankenfeldt, F. P. Seebeck, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 1333-1342.
- [243] M. Aktas, F. Narberhaus, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 2033–2041.
- [244] R. W. Fuller, J. M. Hunt, *Life Sci.* **1967**, *6*, 1107–1112.
- [245] T. Deguchi, J. Barchas, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 3175–3181.
- [246] V. A. Risso, A. Romero-Rivera, L. I. Gutierrez-Rus, M. Ortega-Muñoz, F. Santoyo-Gonzalez, J. A. Gavira, J. M. Sanchez-Ruiz, S. C. L. Kamerlin, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6134–6148.
- [247] D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 526–531.
- [248] M. Musil, H. Konegger, J. Hon, D. Bednar, J. Damborsky, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1033–1054.
- [249] M. Musil, J. Stourac, J. Bendl, J. Brezovsky, Z. Prokop, J. Zendulka, T. Martinek, D. Bednar, J. Damborsky, *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W393–W399.
- [250] E. M. J. Gillam, J. N. Copp, D. F. Ackerley, *Directed Evolution Library Creation*, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, **2014**.
- [251] S. C. Hammer, G. Kubik, E. Watkins, S. Huang, H. Minges, F. H. Arnold, *Science* **2017**, *358*, 215–218.
- [252] C. K. Prier, R. K. Zhang, A. R. Buller, S. Brinkmann-Chen, F. H. Arnold, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 629–634.
- [253] R. K. Zhang, K. Chen, X. Huang, L. Wohlschlagler, H. Renata, F. H. Arnold, *Nature* **2019**, *565*, 67–72.
- [254] Z. Sun, Y. Wikmark, J.-E. Bäckvall, M. T. Reetz, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 5046–5054.
- [255] B. F. Cress, Q. D. Leitz, D. C. Kim, T. D. Amore, J. Y. Suzuki, R. J. Linhardt, M. A. G. Koffas, *Microb Cell Fact Cress al. Microb Cell Fact* **2017**, *16*, DOI 10.1186/s12934-016-0623-3.
- [256] M. Mori, E. Marinari, A. De Martino, *npj Syst. Biol. Appl.* **2019**, *5*, DOI 10.1038/s41540-019-0093-4.

- [257] A. Varma, B. W. Boesch, B. O. Palsson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 2465–2473.
- [258] M. A. Beliaeva, R. Burn, D. Lim, F. P. Seebeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *60*, 5209–5212
- [259] 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.
- [260] W. M. Atkins, *FEBS J.* **2020**, *287*, 1306–1322.
- [261] N. S. Punekar, *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*, Springer, Singapur, **2018**
- [262] V. Grignard, *V. C. R. Acad. Sci.* **1900**, *130*, 1322–1324.
- [263] L. G. Wade, J. W. Simek *Organic Chemistry 9<sup>th</sup> Edition*, Pearson, **2016**.
- [264] A. Morana, I. Di Lernia, M. C. Cartemà, R. De Rosa, M. De Rosa, *Int. J. Pharm.* **2000**, *194*, 61–68
- [265] J. R. Matos, C. H. Wong, *Bioorg. Chem.* **1987**, *15*, 71–80
- [266] C. Desiderio, R. A. Cavallaro, A. De Rossi, F. D’Anselmi, A. Fuso, S. Scarpa, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 449–456.
- [267] L. W. Parks, F. Schlenk, *J. Biol. Chem.* **1958**, *230*, 295–305.
- [268] C. Liao, F. P. Seebeck, *Nat. Catal.* **2019**, *2*, 644–645
- [269] V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, *106*, 946–957.
- [270] W. Liu, P. Wang, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369–384.
- [271] S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517–1529.
- [272] A. M. Jordan, S. D. Roughley, *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 731–744.
- [273] M. A. Barmade, R. B. Ghuge, *Vicinal Diaryl Heterocyclic System: A Privileged Scaffold in the Discovery of Potential Therapeutic Agents*, Vicinal Diaryl Substituted Heterocycles, Elsevier Ltd., **2018**, 1–20

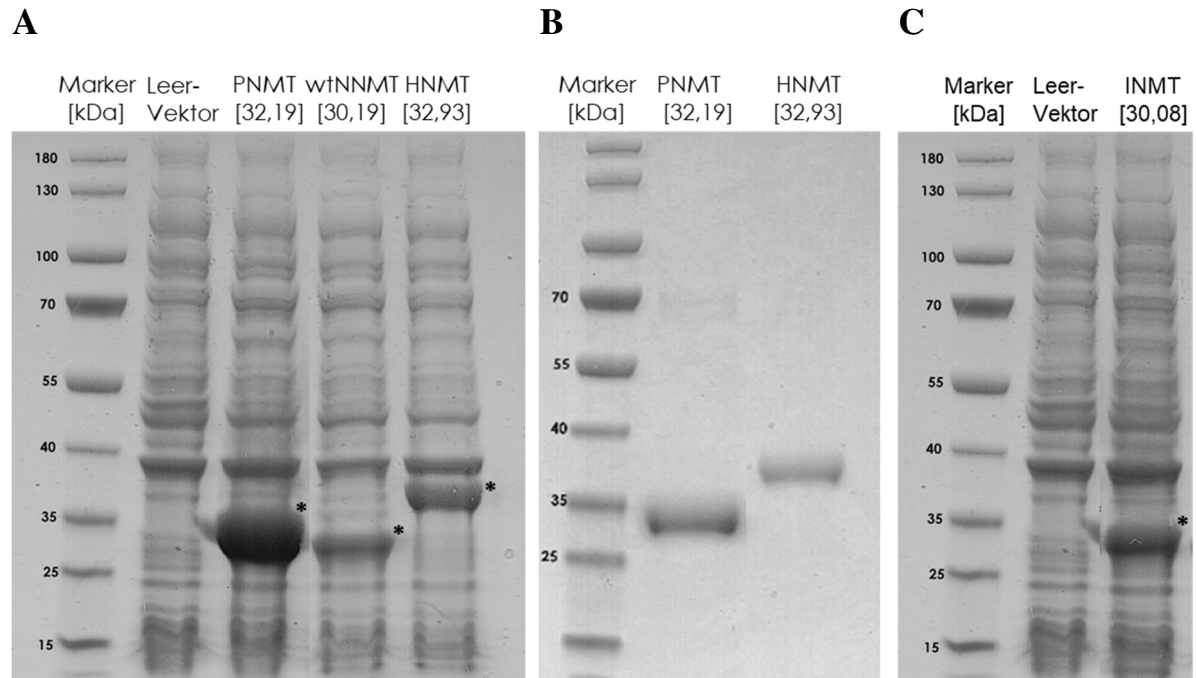
- [274] A. S. El Hawrani, K. M. Moreton, R. B. Sessions, A. R. Clarke, J. J. Holbrook, *Trends Biotechnol.* **1994**, *12*, 207–211.
- [275] F. Cheng, J. Yang, M. Bocola, U. Schwaneberg, L. Zhu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *499*, 233–238.
- [276] B. Liu, G. Qu, J. K. Li, W. Fan, J. A. Ma, Y. Xu, Y. Nie, Z. Sun, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 3182–3190.
- [277] P. M. Heinemann, D. Armbruster, B. Hauer, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 1–12.
- [278] D. D. Boehr, R. N. D’Amico, K. F. O’Rourke, *Protein Sci.* **2018**, *27*, 825–838.
- [279] H. Yu, Y. Yan, C. Zhang, P. A. Dalby, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–15.
- [280] B. M. Nestl, B. Hauer, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3201–3211.
- [281] P. M. Murphy, J. M. Bolduc, J. L. Gallaher, B. L. Stoddard, D. Baker, *PNAS USA* **2009**, *106*, 9215–9220.
- [282] Y. Gao, C. C. Roberts, J. Zhu, J. L. Lin, C. E. A. Chang, I. Wheeldon, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2149–2153.
- [283] S. S. Han, H. H. Kyeong, J. M. Choi, Y. K. Sohn, J. H. Lee, H. S. Kim, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 8440–8445.
- [284] M. E. Atreya, K. L. Strobel, D. S. Clark, *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113*, 330–338.
- [285] M. Chen, L. Bu, M. Alahuhta, R. Brunecky, Q. Xu, V. V. Lunin, J. W. Brady, M. F. Crowley, M. E. Himmel, Y. J. Bomble, *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2016**, *84*, 295–304.
- [286] T. S. Kim, G. Hui, J. Li, V. C. Kalia, K. Muthusamy, J. K. Sohng, I. W. Kim, J. K. Lee, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–9.
- [287] 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.
- [288] L. M. Guzman, D. Belin, M. J. Carson, J. Beckwith, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 4121–4130.
- [289] D. G. Gibson, L. Young, R.-Y. Chuang, J. C. Venter, C. A. Hutchison, H. O. Smith, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 343–345.

- [290] A. Froger, J. E. Hall, *J. Vis. Exp.* **2007**, 6, 253.
- [291] C. Mulhardt, *Molecular Biology and Genomics*, Elsevier Inc., Amsterdam, **2007**.
- [292] A. Aiyar, Y. Xiang, J. Leis, *Methods Mol. Biol.* **1996**, 57, 177–191.
- [293] J. A. Gerlt, J. T. Bouvier, D. B. Davidson, H. J. Imker, B. Sadkhin, D. R. Slater, K. L. Whalen, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2015**, 1854, 1019–1037.
- [294] D. Kowalczyk, Enzymatische Methylierung von Terpenen unter Verwendung von Sterolmethyltransferasen, Masterthesis, Universität Stuttgart, **2019**.
- [295] S. P. Ivonin, B. B. Kurpil', E. B. Rusanov, O. O. Grygorenko, D. M. Volochnyuk, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 2187–2189.
- [296] W. Li, D. Yuan, G. Wang, Y. Zhao, J. Xie, S. Li, C. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 3187–3197.

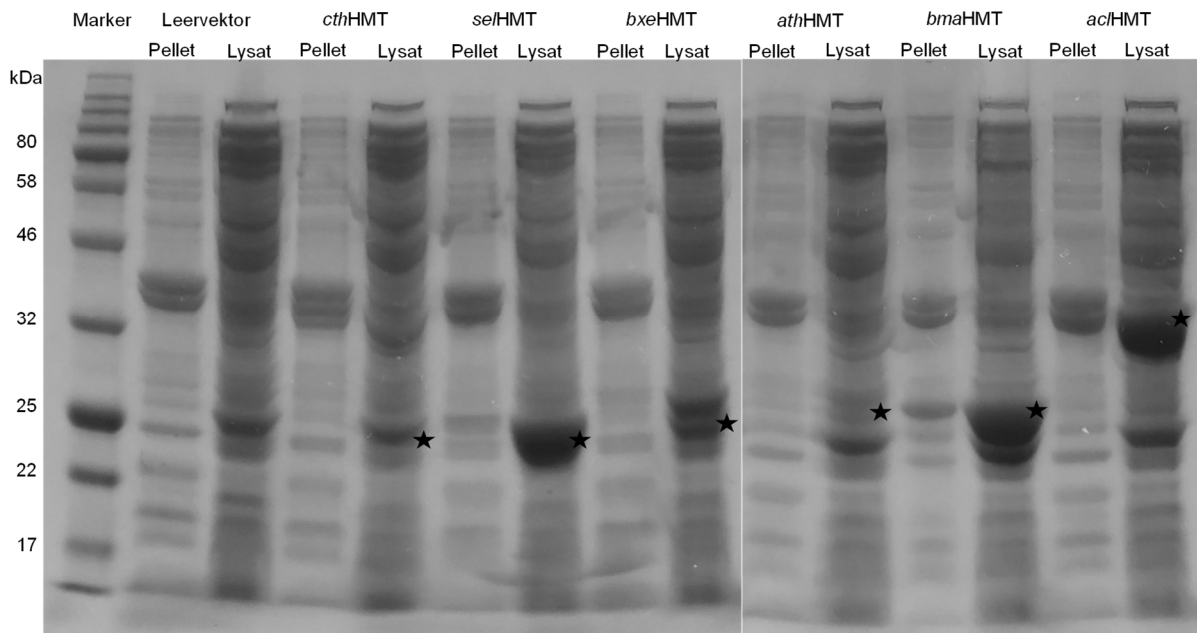


## 8 ANHANG

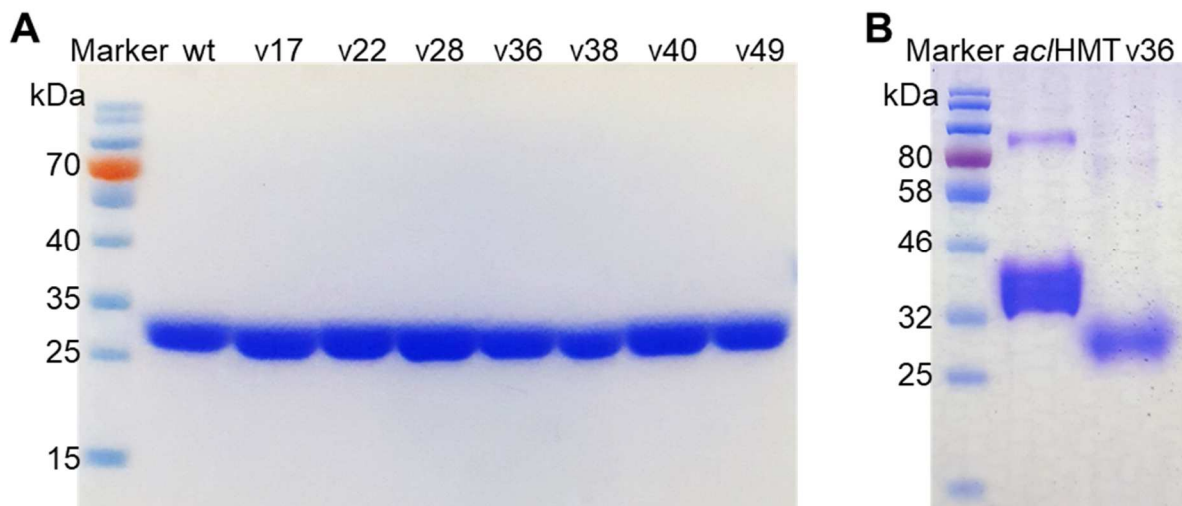
### 8.1 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen



**Abb. 43: SDS-PAGEs von *N*-Methyltransferasen.** **A)** Lösliche Fraktionen der Expression von Phenylethanolamin-*N*-Methyltransferase (PNMT), Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT) und Histamin-*N*-Methyltransferase für das Screening nach promiskuitiver Aktivität. **B)** Gereinigte *N*-Methyltransferasen für die Bestätigung der natürlichen Aktivität. **C)** SDS-PAGE der löslichen Fraktion der Expression der Indolethylamin-*N*-Methyltransferase aus *Oryctolagus cuniculus* (INMT) in *E.coli*<sup>®</sup> EXPRESS BL21(DE3) im Vergleich zum pET28a(+)-Leervektor.

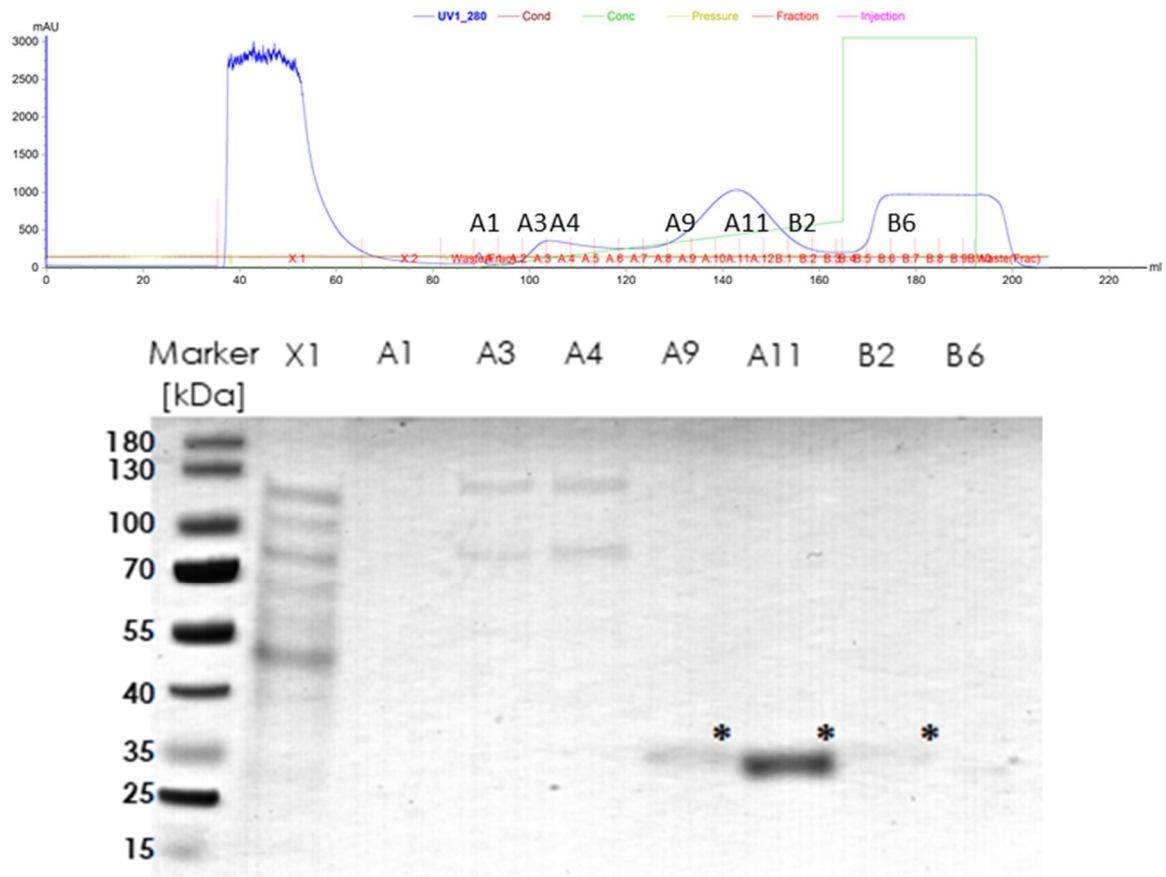


**Abb. 44: SDS-PAGE der Expression von Halogenid-Methyltransferasen (HMT).** Im Vergleich des Zelldebris (Pellet) und des löslichen Überstandes (Lysat). Die kalkulierten Molekulargewichte (MW) der HMTs betragen für *cthHMT* aus *Chloracidobacterium thermophilum* 23,1 kDa, für *selHMT* aus *Synechococcus elongatus* 23,1 kDa, für *bxeHMT* aus *Burkholderia xenovrans* 24 kDa, für *athHMT* aus *Arabidopsis thaliana* 26,2 kDa; *bmaHMT* aus *Batis maritima* 26,5 kDa) und für die NSA-Synthase *ac/HMT* aus *Aspergillus clavatus* 33 kDa. Aufgetragen wurden je 20  $\mu$ L des resuspendierten Pellets und des Lysats mit 40  $\mu$ L 4 $\times$  SDS-Propenpuffer, bei einer Laufzeit von 55 min bei 150 V und gefärbt mit Coomassie Brilliant Blau. Abbildung verändert nach S. Kienzle (2020).<sup>[227]</sup>



**Abb. 45: Die SDS-PAGEs zeigen die gereinigte wtNNMT, ausgewählte FuncLib-Varianten und NSA-Synthase (ac/HMT).** **A)** SDS-PAGE von wtNNMT und ausgewählten FuncLib-Varianten. 20  $\mu$ g des gereinigten Enzyms wurden mit 6 $\times$  SDS-Ladepuffer auf eine 12%ige SDS-PAGE geladen und bei 140 V für 1 h betrieben. **B)** SDS-PAGE der NSA-Synthase und der in der zyklischen Kaskade verwendeten v36. 20  $\mu$ g des gereinigten Enzyms wurden mit 4 $\times$  SDS-Ladepuffer auf eine 12%ige SDS-PAGE geladen und lief für 1 h bei 120 V. Abbildung B verändert nach A. Egler-Kemmerer (2020)<sup>[223]</sup>.

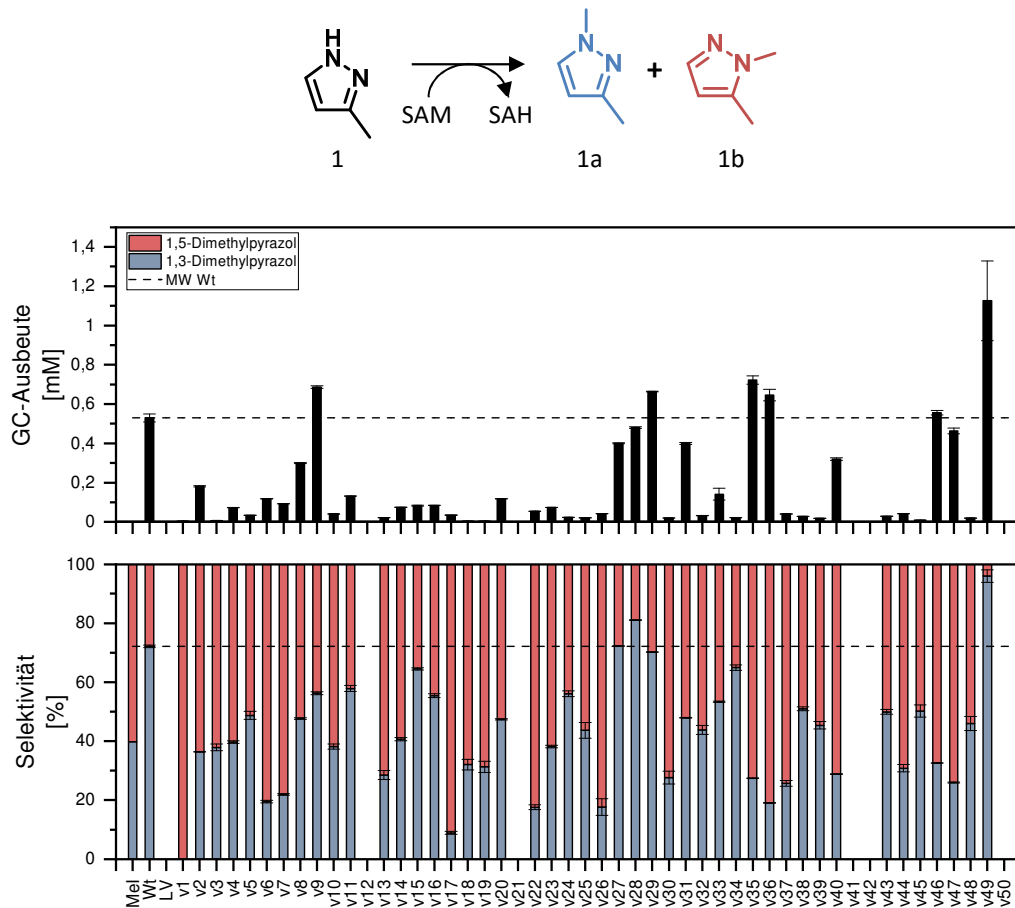




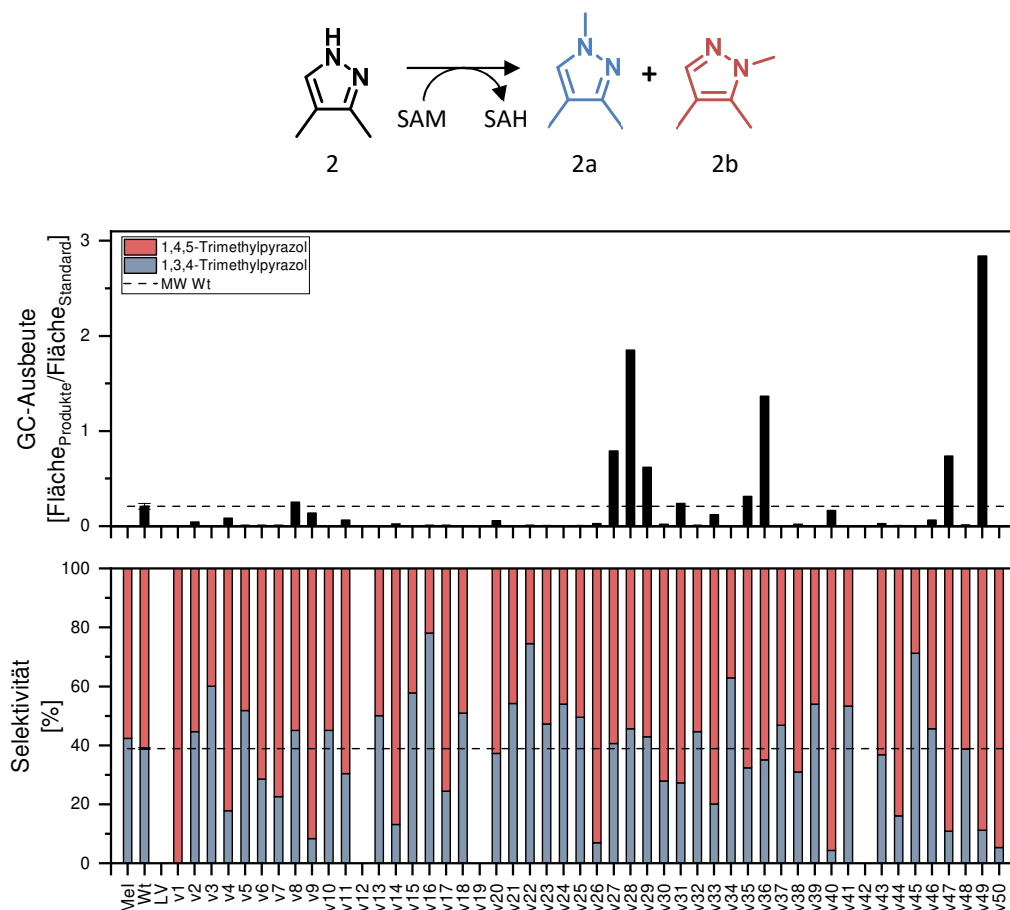
**Abb. 46: Proteinreinigung von Indolethylamin-*N*-Methyltransferase aus *Oryctolagus cuniculus* (INMT) mittels Metallionenaustauschromatographie (oben) und SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen (unten). Für die SDS-PAGE wurden 10  $\mu$ L pro Fraktion auf einem 12 %igen Gel für 35 min getrennt. Die Bande in A11 (\*) entspricht dem Molekulgewicht von 30,08 kDa der INMT.**

**Tabelle 9: Top 50 der FuncLib-Varianten (v1-v50) und die Aminosäuren ihrer aktiven Zentren im Vergleich zur Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT). Die eingefügten Mutationen sind in Rot hervorgehoben. Die Varianten sind nach ihrer Faltungsenthalpie geordnet und laut Berechnung energetisch stabiler als die wtNNMT.**

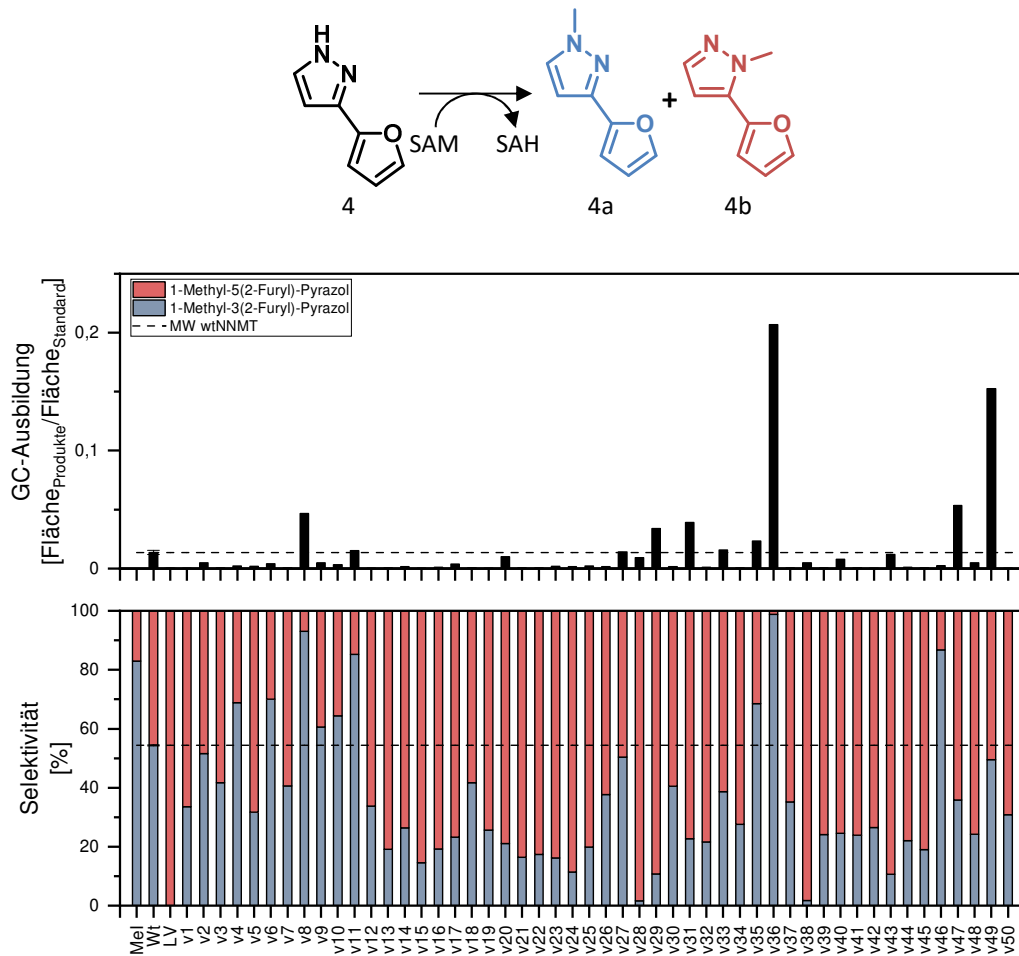
#	Aminosäurepositionen des aktiven Zentrums											
	20	24	164	167	197	198	201	204	213	242	247	249
wtNNMT	Y	Y	L	D	D	A	S	Y	S	Y	A	N
v1	H	Y	L	C	D	M	A	Y	A	Y	A	N
v2	Y	Y	L	H	D	M	C	Y	A	Y	A	C
v3	Y	Y	L	H	D	S	R	Y	S	W	A	S
v4	F	Y	L	H	D	M	C	Y	C	Y	A	N
v5	Y	Y	L	H	D	M	A	Y	A	F	A	N
v6	Y	Y	L	H	D	T	C	Y	A	Y	M	N
v7	Y	Y	L	H	D	A	Q	Y	A	W	A	A
v8	Y	Y	L	D	G	M	C	Y	A	Y	A	N
v9	Y	Y	L	C	D	T	N	Y	A	F	A	N
v10	Y	Y	L	H	D	M	A	Y	H	Y	A	A
v11	Y	Y	L	C	D	L	C	Y	A	Y	A	A
v12	F	Y	L	D	G	T	R	Y	S	Y	A	N
v13	F	Y	L	H	D	A	Q	Y	S	Y	A	S
v14	F	Y	L	H	D	L	A	Y	A	Y	A	N
v15	Y	Y	L	H	D	A	T	Y	H	F	A	S
v16	Y	Y	L	H	D	A	N	Y	A	Y	M	A
v17	Y	Y	L	C	D	T	Q	Y	A	Y	S	N
v18	Y	F	L	C	D	A	R	Y	S	W	A	A
v19	H	Y	L	H	D	A	Q	Y	S	W	A	C
v20	Y	Y	L	D	G	M	A	Y	S	F	A	A
v21	Y	F	L	H	D	A	E	Y	A	Y	A	A
v22	Y	Y	L	H	D	A	A	Y	H	Y	M	C
v23	Y	Y	L	D	G	T	S	Y	A	W	A	A
v24	Y	F	L	H	D	A	Q	Y	A	F	A	N
v25	Y	F	L	H	D	M	S	Y	A	Y	A	N
v26	Y	Y	L	H	D	T	Q	Y	S	Y	A	N
v27	Y	Y	L	C	D	S	S	Y	A	W	A	A
v28	Y	Y	L	H	D	A	C	Y	M	Y	A	A
v29	Y	Y	L	C	D	A	T	Y	A	F	A	A
v30	Y	Y	L	C	D	A	Q	Y	S	W	A	S
v31	Y	Y	L	H	D	M	C	Y	S	F	A	S
v32	Y	F	L	H	D	A	Q	Y	S	Y	A	C
v33	Y	Y	L	C	D	M	C	Y	C	F	A	N
v34	Y	Y	L	H	D	A	E	Y	A	F	A	C
v35	Y	Y	L	D	G	L	A	Y	A	F	A	N
v36	Y	F	L	C	D	T	C	Y	A	Y	A	N
v37	Y	Y	L	H	D	T	E	Y	A	W	A	N
v38	F	Y	L	C	D	A	M	Y	S	F	A	A
v39	F	Y	L	H	D	M	S	Y	A	Y	A	A
v40	Y	Y	L	H	D	L	A	Y	C	Y	A	C
v41	F	Y	L	H	D	A	R	Y	S	W	A	A
v42	H	Y	L	H	D	M	A	Y	S	Y	A	C
v43	Y	Y	L	C	D	M	T	Y	T	Y	A	N
v44	Y	Y	L	H	D	M	C	F	H	Y	A	N
v45	F	Y	L	H	D	M	S	Y	S	F	A	C
v46	Y	Y	L	D	G	M	S	Y	A	F	C	N
v47	Y	Y	L	E	G	A	N	Y	A	F	A	N
v48	F	Y	L	C	D	M	C	Y	S	Y	A	C
v49	Y	Y	L	C	D	A	C	Y	H	W	A	A
v50	H	F	L	H	D	A	R	Y	S	Y	A	N



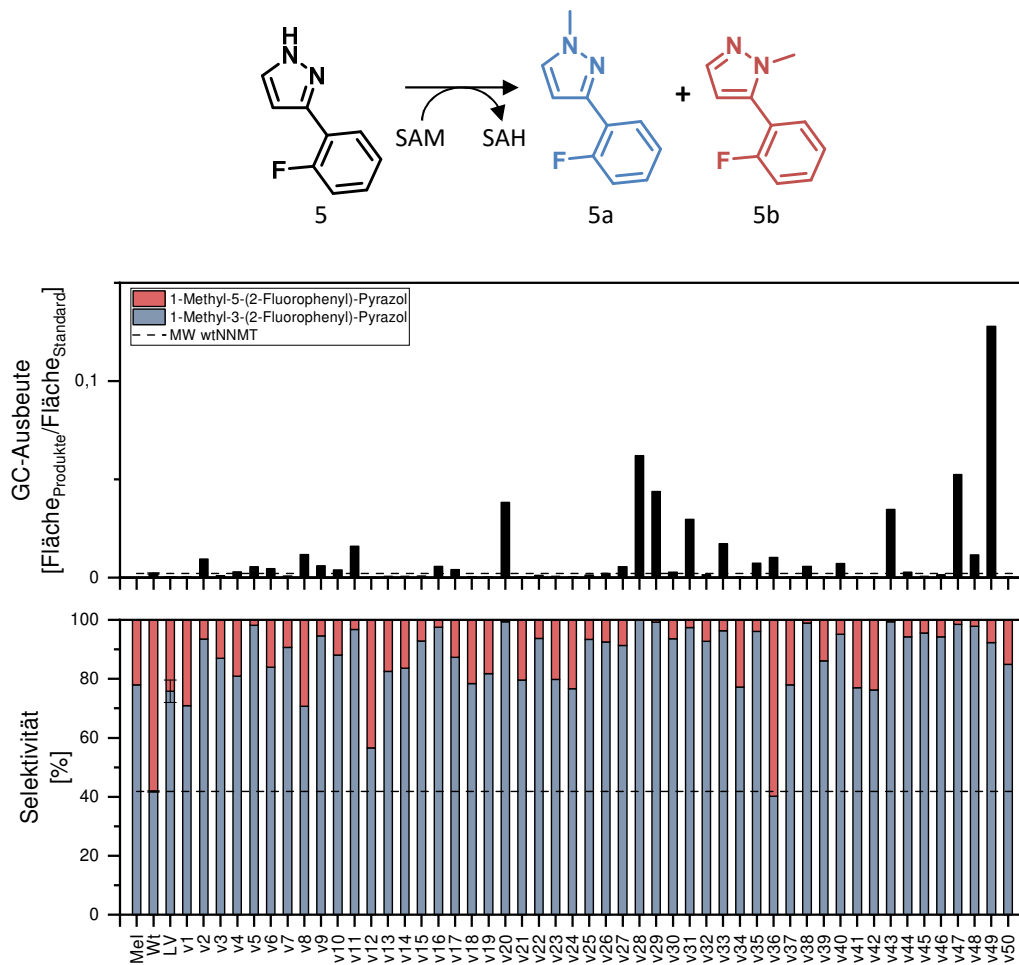
**Abb. 47: Screening der enzymatischen Methylierung von 3-Methylpyrazol (1).** Die mittlere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Selektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung von Triplikaten.



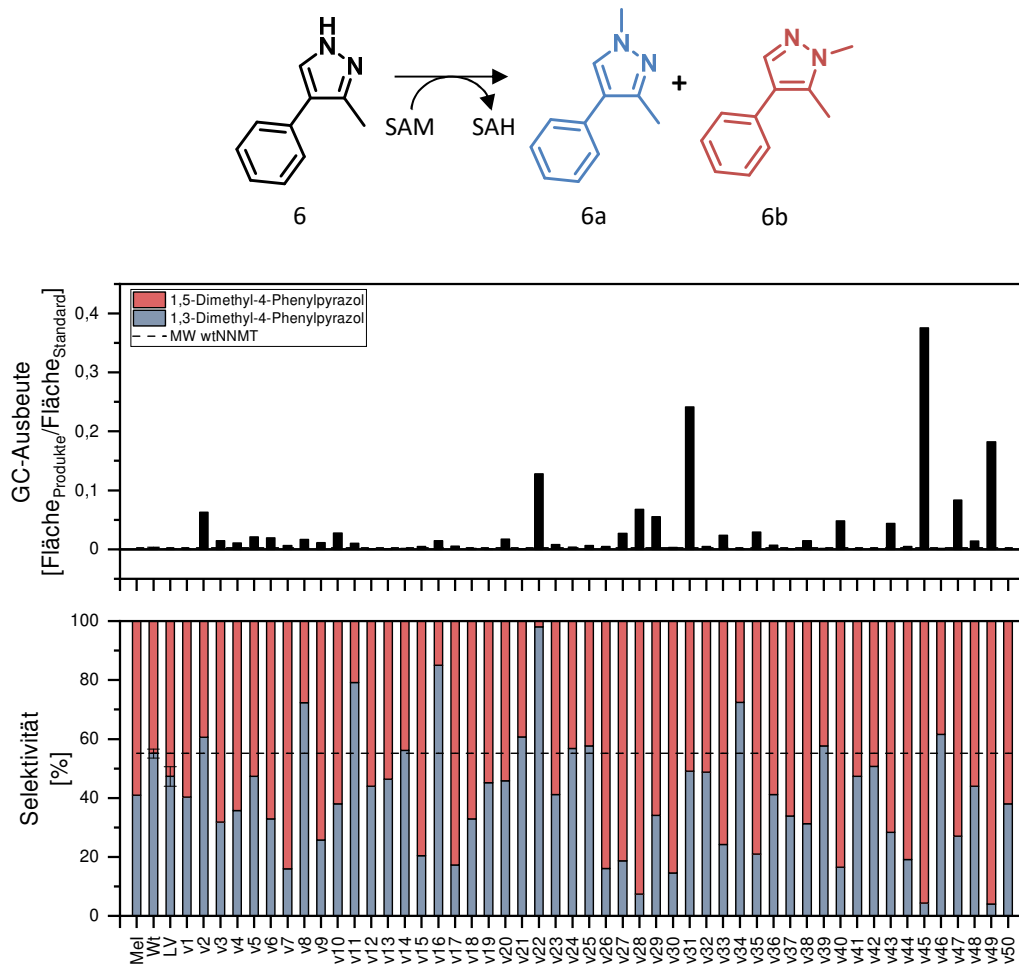
**Abb. 48: Screening der enzymatischen Methylierung von 3,4-Dimethylpyrazol (2).** Die mittlere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Selektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken der wtNNMT beschreiben die Standardabweichung von Hexaplikaten.



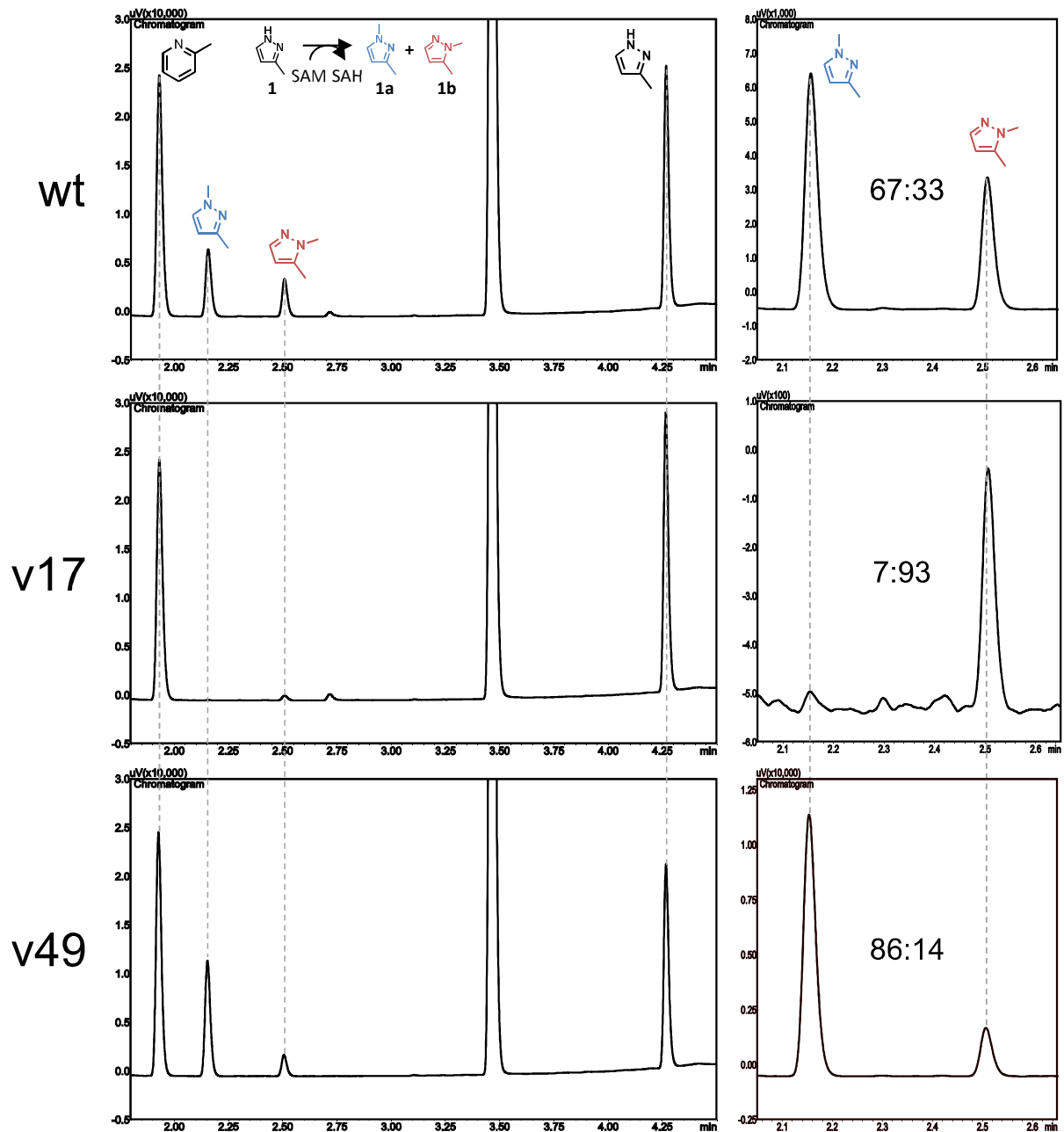
**Abb. 49: Screening der enzymatischen Methylierung von 3(2-Furyl)-Pyrazol (4).** Die mittlere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Selektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken der wtNNMT beschreiben die Standardabweichung von Hexaplikaten.



**Abb. 50: Screening der enzymatischen Methylierung von 3-(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (5).** Die mittlere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Selektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken der wtNNMT beschreiben die Standardabweichung von Hexaplikaten.

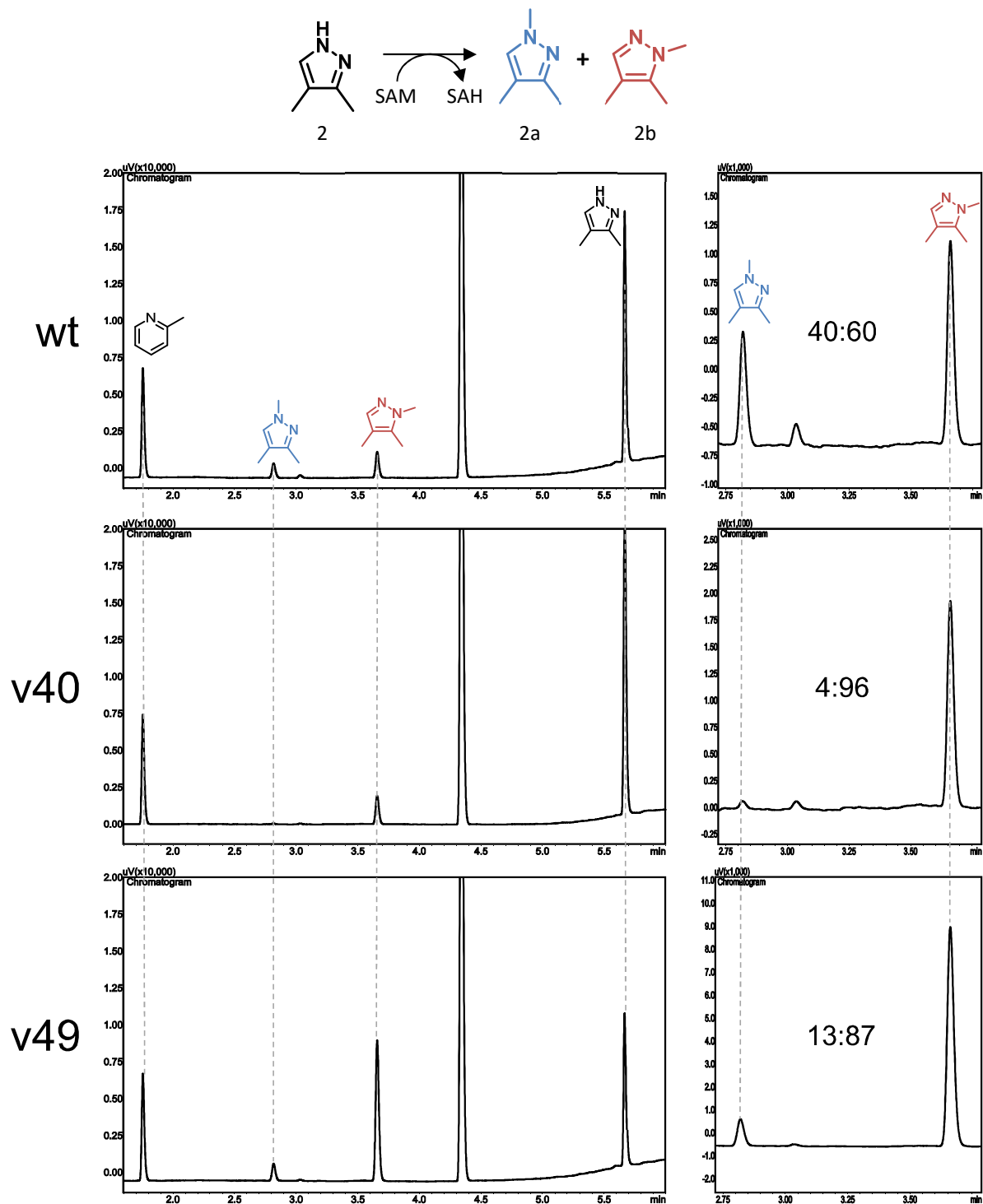


**Abb. 51: Screening der enzymatischen Methylierung von 3-Methyl-4-Phenyl-Pyrazol (6).** Die mittlere Grafik zeigt die Gesamtproduktbildung (schwarze Balken) und den Mittelwert (MW) der Produktbildung der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (Wt). Die hohe Produktbildung und Selektivität von v45 konnte in weiteren Experimenten nicht reproduziert werden. Die mittlere Produktbildung der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die untere Grafik beschreibt die Selektivität der Varianten im Vergleich zur Selektivität der wtNNMT und der chemischen Methylierung mittels Iodmethan (MeI). Der Leervektor (LV) pET28a (+) diente als Kontrolle. Die mittlere Selektivität der wtNNMT ist als gestrichelte Linie dargestellt. Die Fehlerbalken der wtNNMT beschreiben die Standardabweichung von Hexaplikaten.

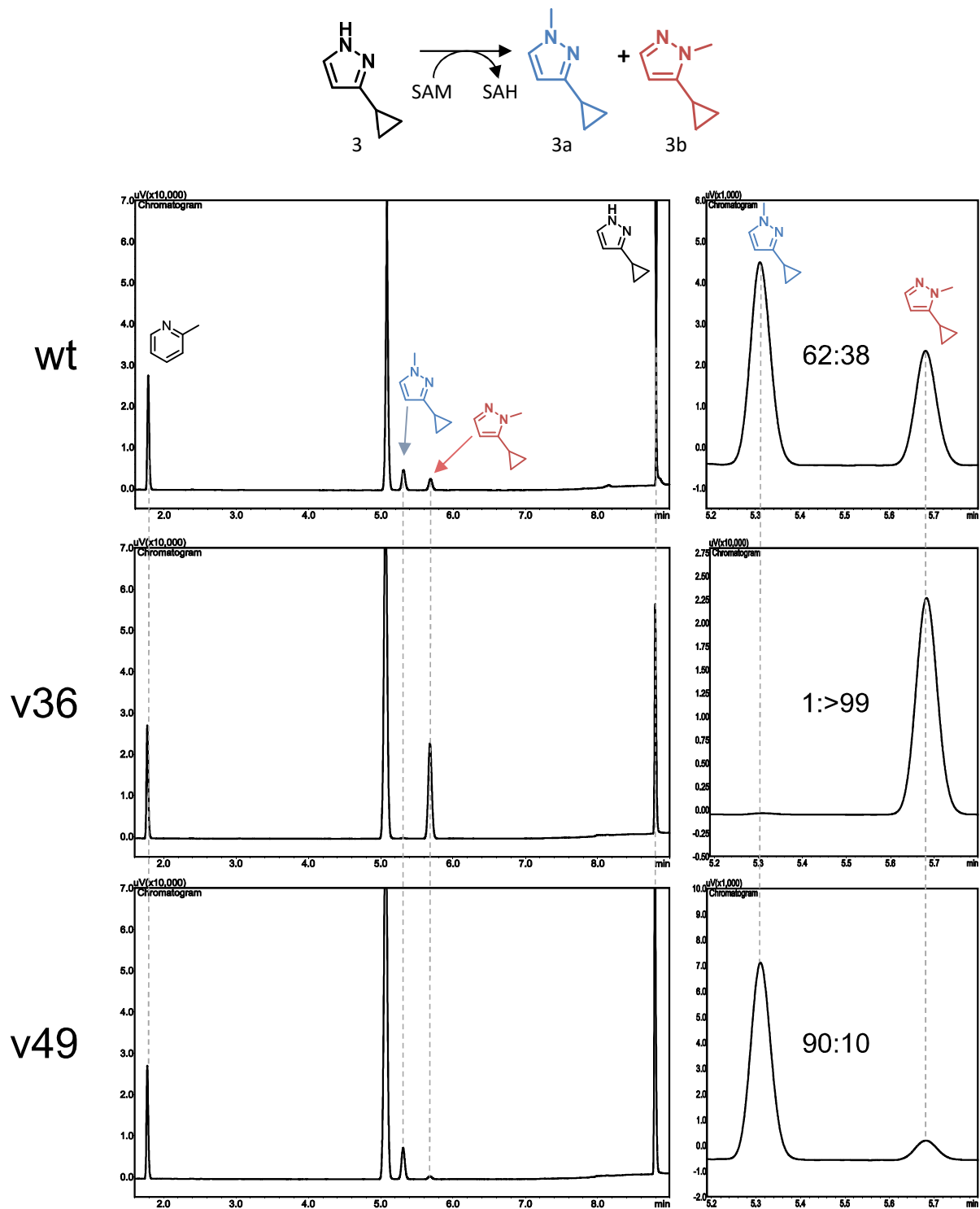


**Abb. 52:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3-Methylpyrazol (1) mit wtNNMT (oben) und den FuncLib Varianten v17 (mitte) und v49 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50 μM Enzym bei 37 °C und 20 h durchgeführt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierte Produkte, DMSO (Retentionszeit 3,455 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.

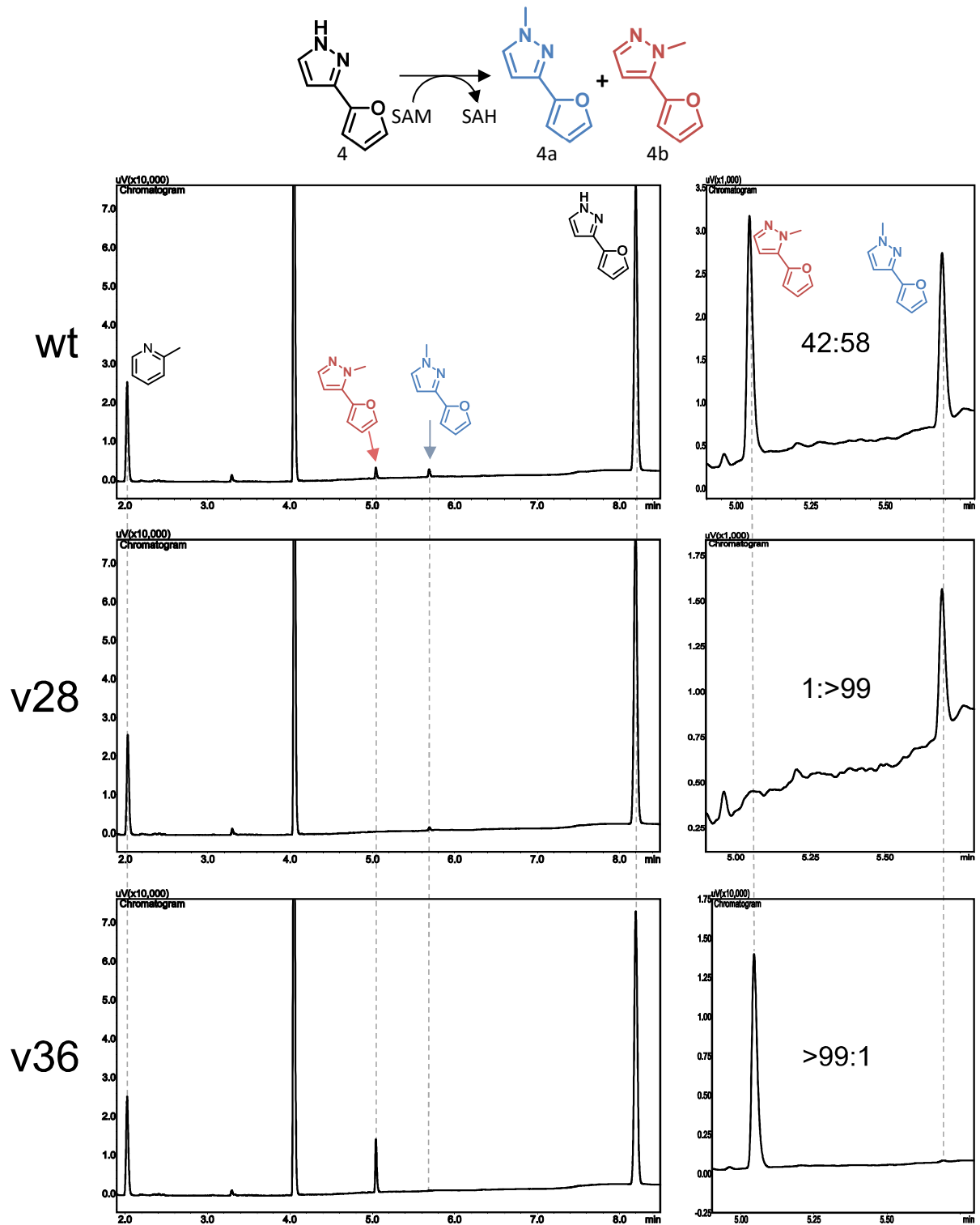




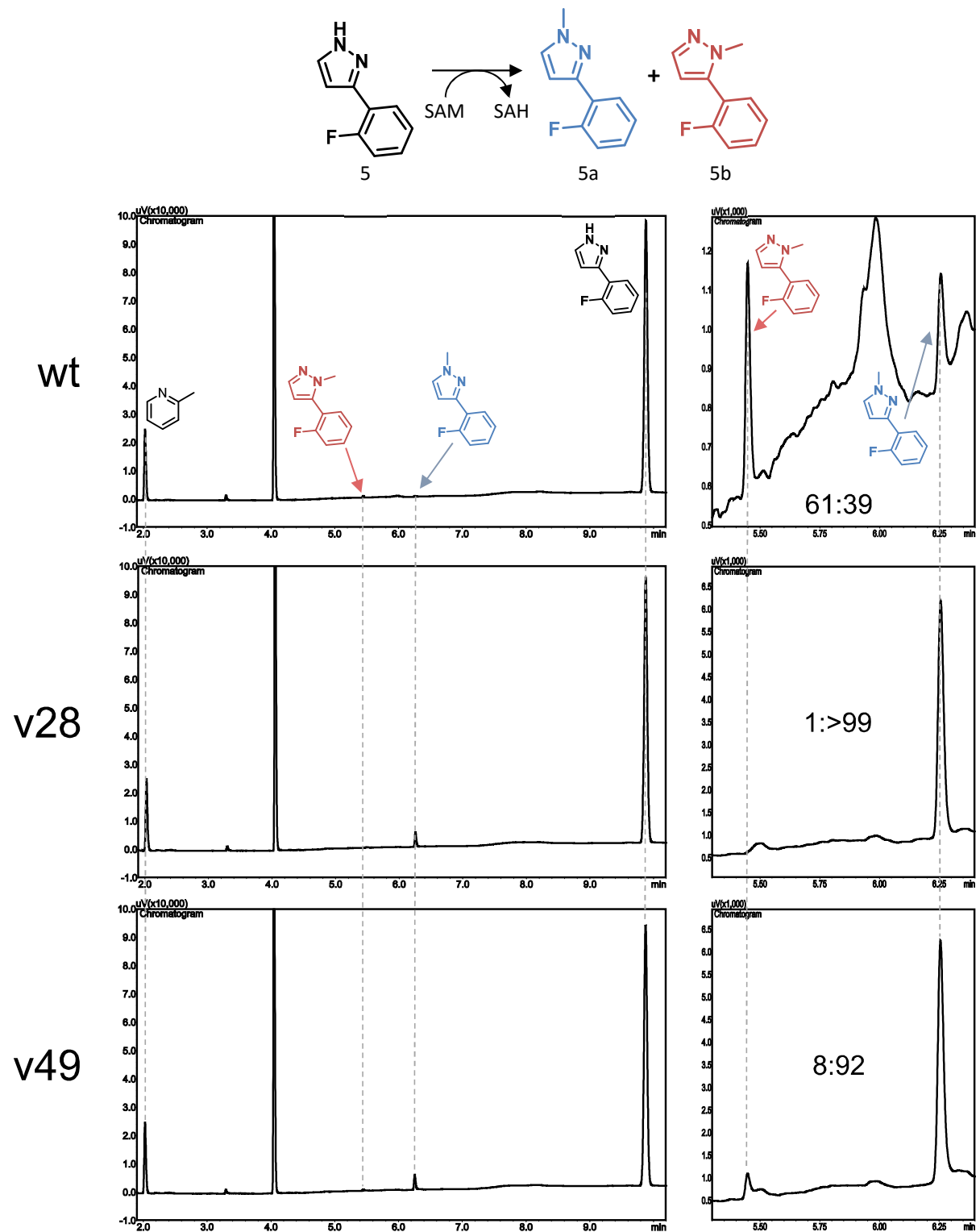
**Abb. 53:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3,4-Dimethylpyrazol (2) mit wtNNMT (oben) und den FuncLib Varianten v40 (mitte) und v49 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50  $\mu$ M Enzym bei 37 °C und 20 h durchgeführt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierten Produkte, DMSO (Retentionszeit 4,35 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.



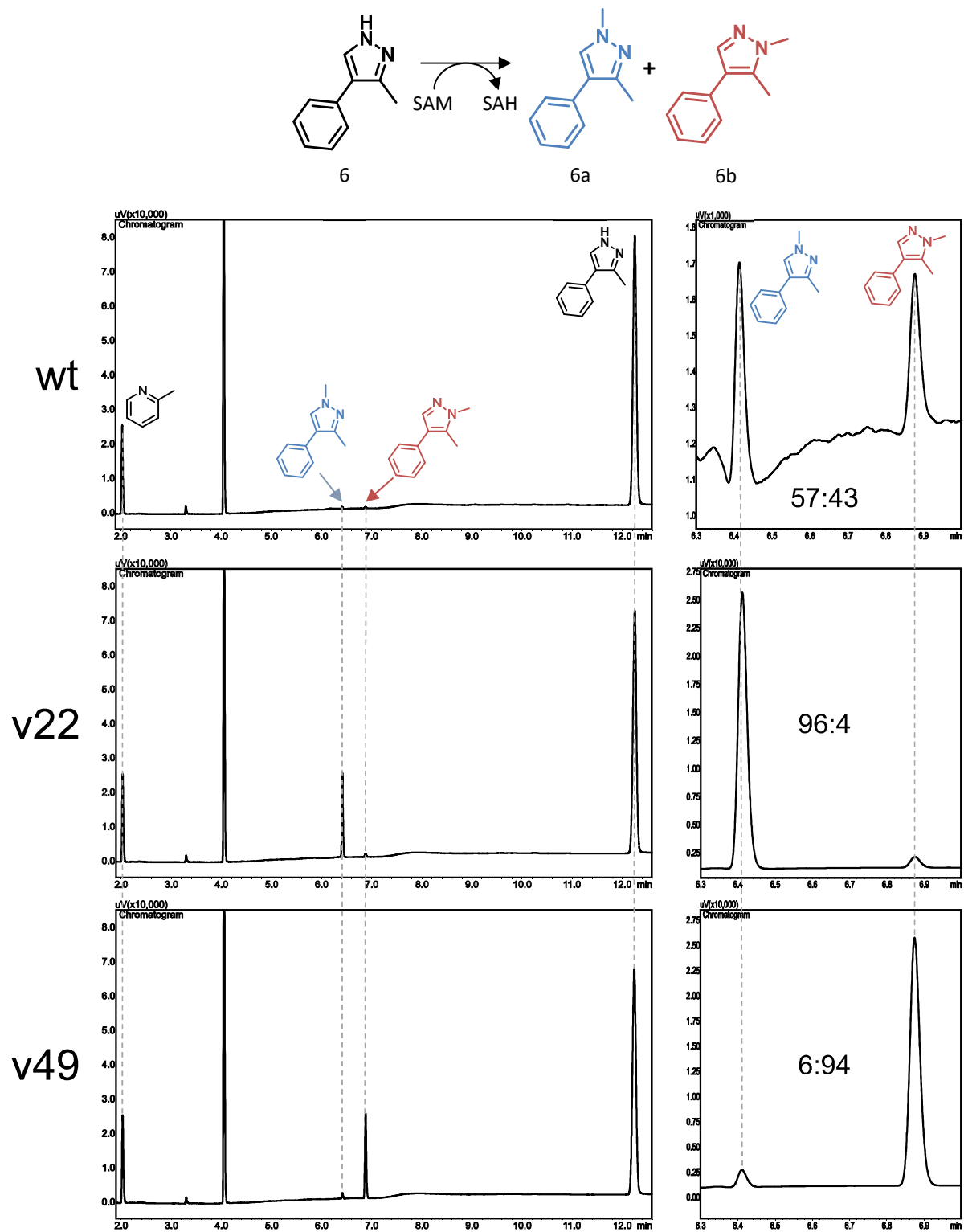
**Abb. 54:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) mit wtNNMT (oben) und den FuncLib Varianten v36 (mitte) und v49 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50  $\mu$ M Enzym bei 37 °C und 20 h durchgeführt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierten Produkte, DMSO (Retentionszeit 5,1 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.



**Abb. 55:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3-(2-Furyl)-Pyrazol (4) mit wtNNMT (oben) und den FuncLib Varianten v28 (mitte) und v36 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50  $\mu$ M Enzym bei 37  $^{\circ}$ C und 20 h durchgeführt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierten Produkte, DMSO (Retentionszeit 4,05 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.

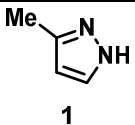
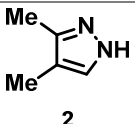
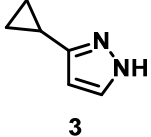
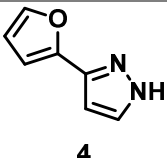
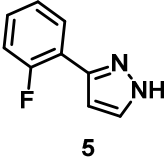
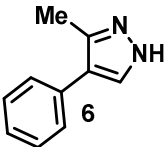


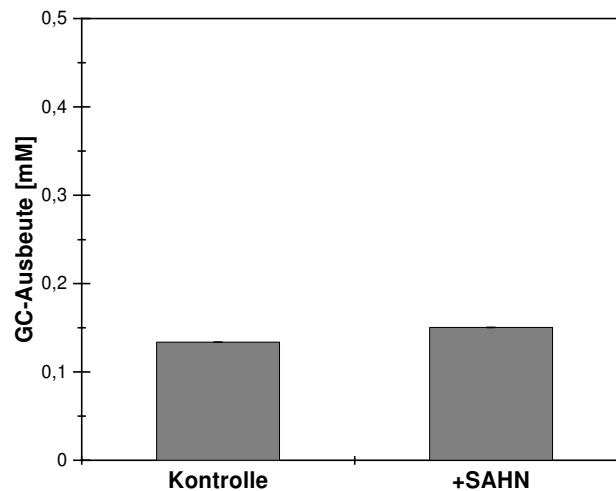
**Abb. 56:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (5) mit wtNNMT (oben) und den FuncLib Varianten v28 (mitte) und v49 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50  $\mu$ M Enzym bei 37  $^{\circ}$ C und 20 h durchgeföhrt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierten Produkte, DMSO (Retentionszeit 4,05 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.



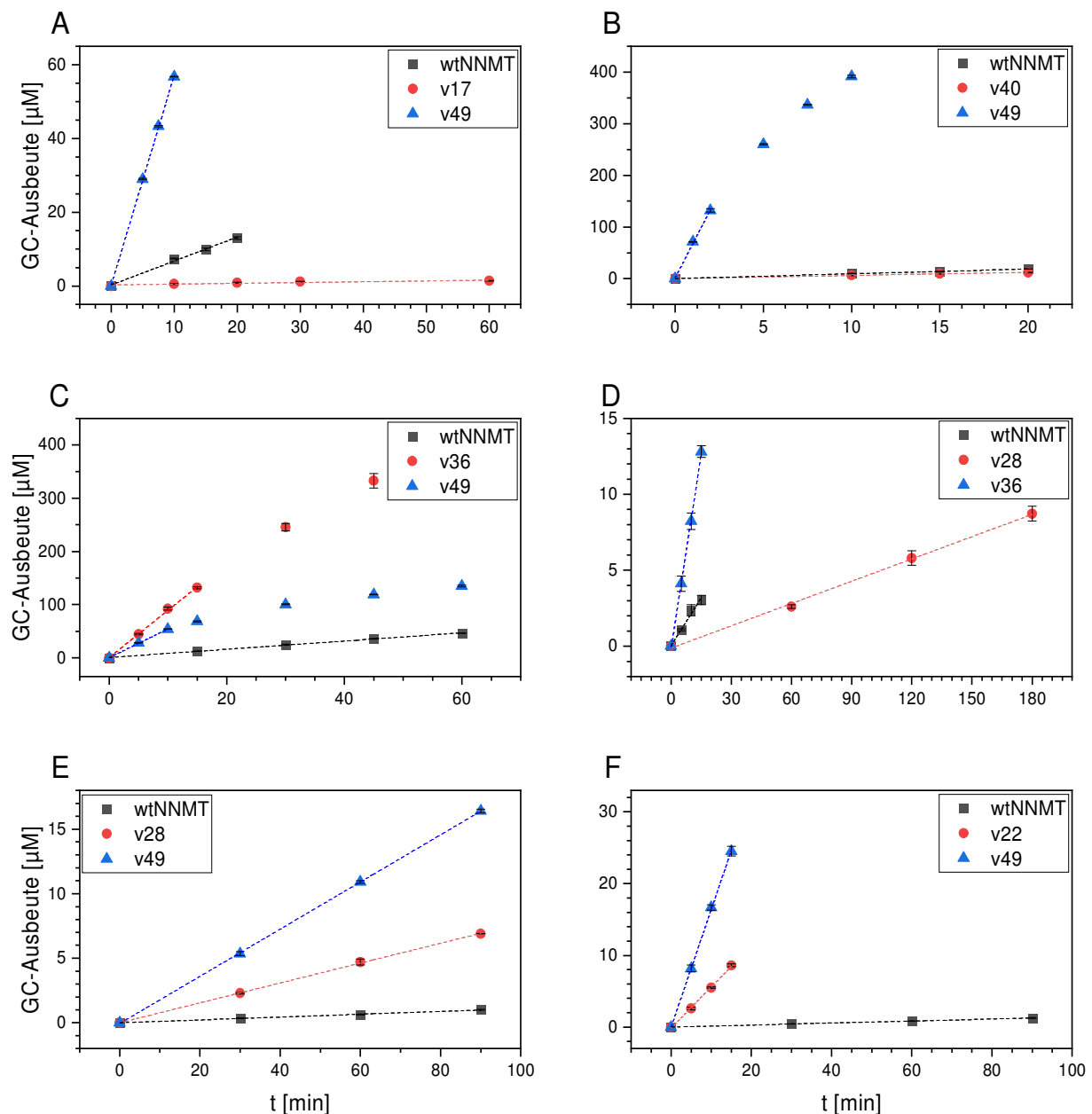
**Abb. 57:** Die GC-Chromatogramme zeigen die enzymatische Methylierung von 3-Methyl-4-Phenylpyrazol (6) mit wtNNMT (oben) und den Funclib Varianten v22 (mitte) und v49 (unten). Die Reaktionen wurden mit 2 mM Substrat, 4 mM SAM und 50  $\mu$ M Enzym bei 37  $^{\circ}$ C und 20 h durchgeföhrt. Die Chromatogramme in der linken Reihe zeigen den internen Standard 2-Methylpyridin, die methylierten Produkte, DMSO (Retentionszeit 4,05 min) und das Substrat. Die Chromatogramme in der rechten Reihe zeigen die Vergrößerung der Produktpeaks zu besserer Visualisierung der Produktselektivitäten.

**Tabelle 10: Produktbildung und Selektivitäten der Endpunktbestimmungen zur Charakterisierung der enzymatischen Methylierung von Pyrazolen mit Standardabweichungen aus Triplikaten.** In einigen Fällen konnte die Produktbildung eines Isomers nicht detektiert werden und resultierend die Standardabweichung der Selektivität nicht ermittelt werden (nd).

Substrat	Variante	Produktbildung [%]	Selektivität [%] (a:b)	Aktivitätssteigerung <sup>a)</sup>
 1	wtNNMT	14 ± 0,2	67 : 33 ± 0,04	
	v17	0,65 ± 0,03	7 : <b>93</b> ± 0,72	0,05
	v49	19 ± 0,6	<b>86</b> : 14 ± 0,16	1,4
 2	wtNNMT	13 ± 0,07	40 : 60 ± 0,5	
	v40	9,1 ± 0,05	4 : <b>96</b> ± 0,08	0,7
	v49	<b>49</b> ± 0,7	13 : <b>87</b> ± 0,3	3,8
 3	wtNNMT	10 ± 0,2	62 : 38 ± 0,08	
	v36	<b>35</b> ± 0,7	1 : <b>&gt;99</b> ± 0,04	3,4
	v38	1,8 ± 0,02	<b>84</b> : 16 ± 0,8	0,2
	v49	11 ± 0,05	<b>90</b> : 10 ± 0,05	1,1
 4	wtNNMT	6,6 ± 0,2	42 : 58 ± 0,3	
	v28	1,1 ± 0,03	<b>&gt;99</b> : 1 ± nd	0,16
	v36	18 ± 0,07	1 : <b>&gt;99</b> ± 0,08	2,8
	v38	0,25 ± 0,01	<b>&gt;99</b> : 1 ± nd	0,04
 5	wtNNMT	0,38 ± 0,004	41 : 59 ± 0,9	
	v28	2,4 ± 0,04	<b>&gt;99</b> : 1 ± nd	6,3
	v31	2,1 ± 0,04	<b>97</b> : 3 ± 0,18	5,5
	v38	0,25 ± 0,03	<b>&gt;99</b> : 1 ± nd	0,7
	v49	2,7 ± 0,09	<b>92</b> : 8 ± 0,5	7,1
 6	wtNNMT	0,49 ± 0,009	57 : 43 ± 1,7	
	v22	11 ± 0,4	<b>96</b> : 4 ± 0,02	<b>23</b>
	v28	3,3 ± 0,2	8 : <b>92</b> ± 0,06	6,7
	v49	11 ± 0,4	6 : <b>94</b> ± 0,1	<b>23</b>

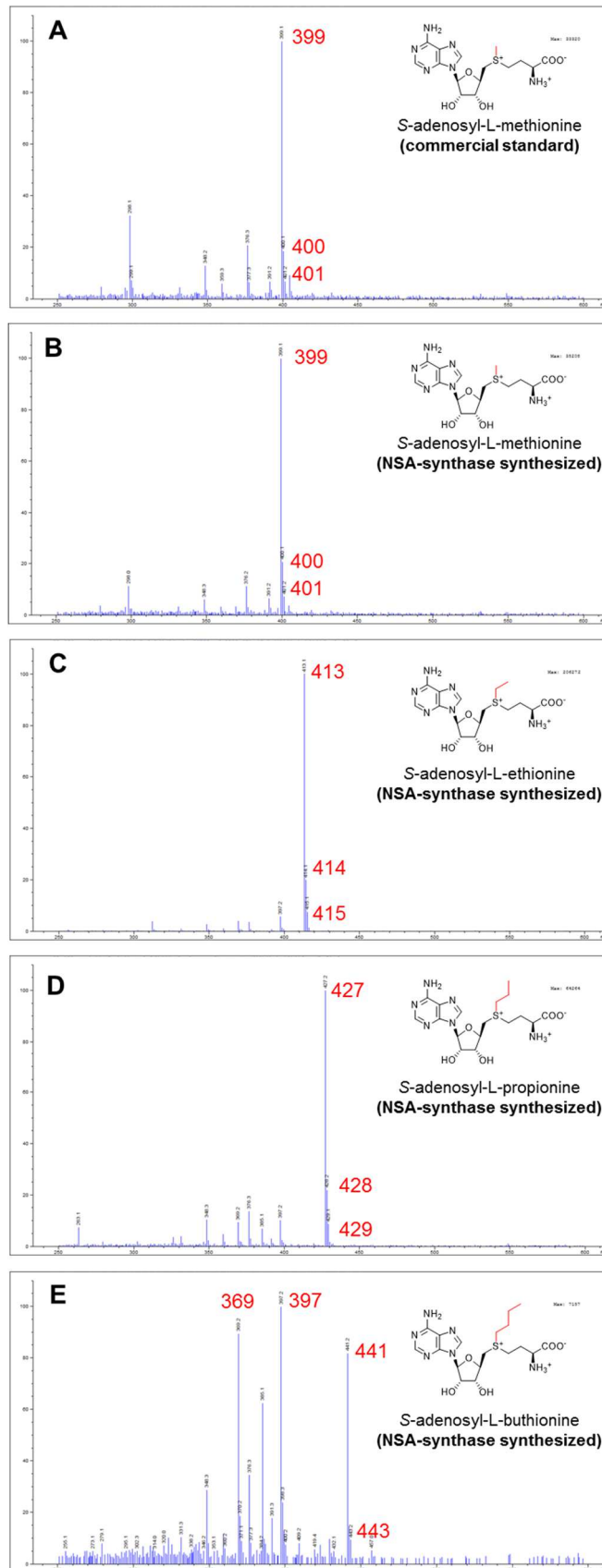


**Abb. 58:** Zugabe von *S*-Adenosyl-*L*-Homocystein-Nukleosidase (SAHN, 2,6  $\mu$ g) zu der Reaktion der Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (10  $\mu$ M) mit 2 mM 3-Methylpyrazol (1) und 2 mM *S*-Adenosyl-*L*-Methionin für 20 h bei 37 °C. Als Kontrolle diente die Reaktion ohne Zugabe von SAHN, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von Triplikaten, die so klein sein können, dass sie vom Rahmen der Säulen überlagert werden können. Das natürlicherweise in *E. coli* vorkommende Enzym SAH-Nukleosidase (SAHN, ITB-Nr. pITB1825<sup>[139]</sup>, Vektor: pET28a(+) mit C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag) spaltet SAH in Homocystein und Adenosin. Die SAHN wurde in *E. coli* transformiert und als Kryostock konserviert. Aus diesem Kryostock wurde die SAHN im Rahmen der von Benjamin Aberle begleiteten Masterarbeit von Daniel Kowalczyk<sup>[294]</sup> exprimiert, über IMAC gereinigt und freundlicherweise zu Verfügung gestellt.

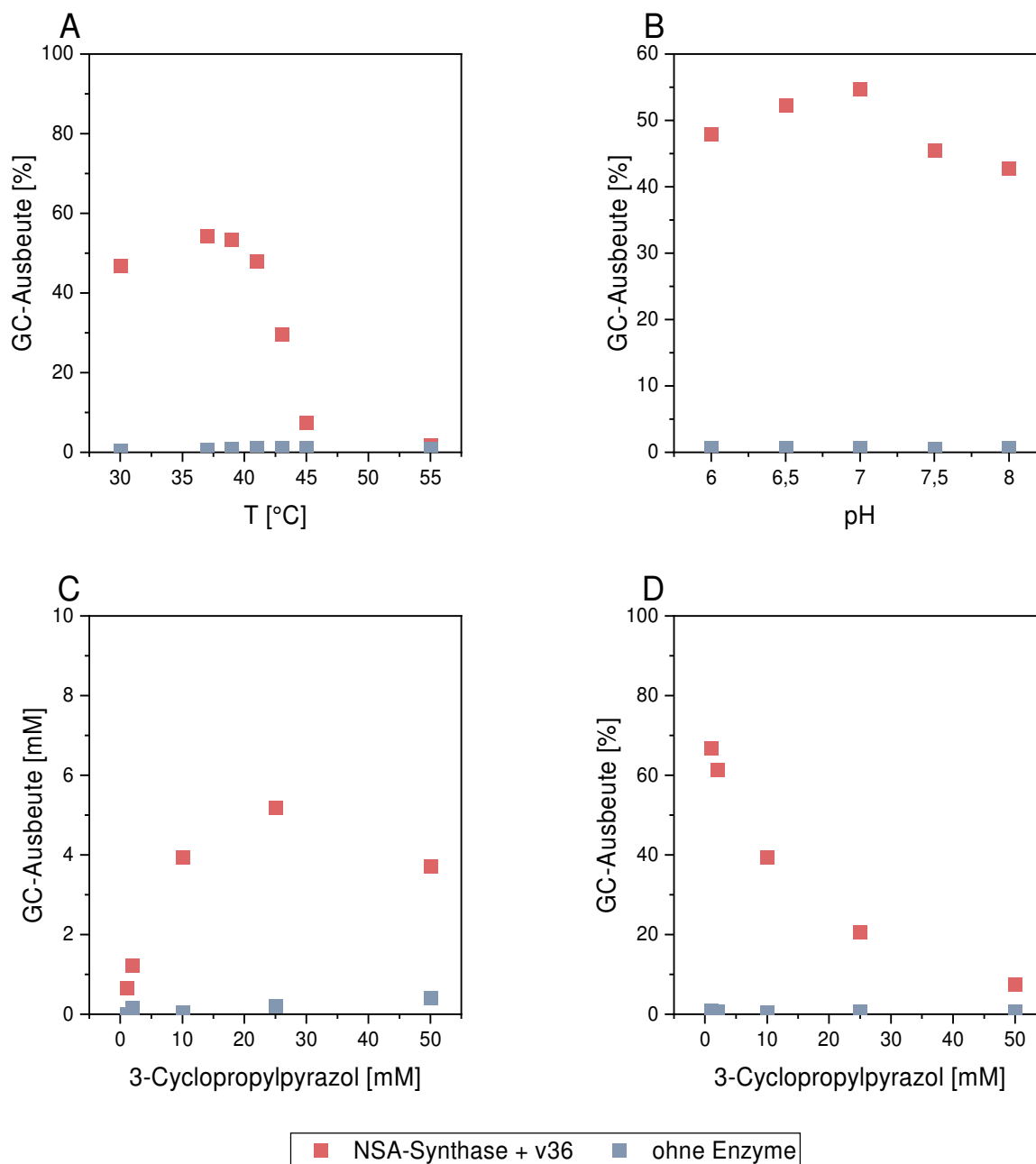


**Abb. 59: Anfangsgeschwindigkeiten ( $V_0$ ) für die enzymatische Methylierung von Pyrazolen mit ausgewählten Varianten im Vergleich zur Wildtyp Nicotinamid-*N*-Methyltransferase (wtNNMT). A)  $V_0$  mit 3-Methylpyrazol (1) der wtNNMT ( $0,65 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2 = 0,994$ ), v17 ( $0,039 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2 = 0,98$ ) und v49 ( $5,69 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2 = 0,999$ ). B)  $V_0$  mit 3,4-Dimethylpyrazol (2) der wtNNMT ( $0,92 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,998$ ), v40 ( $0,599 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,993$ ) und v49 ( $66,2 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,998$ ). C)  $V_0$  mit 3-Cyclopropylpyrazol (3) der wtNNMT ( $0,77 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ), v36 ( $8,87 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ) und v49 ( $5,39 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ). D)  $V_0$  mit 3(2-Furyl)-Pyrazol (4) der wtNNMT ( $0,21 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,987$ ), v28 ( $0,049 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ) und v36 ( $0,85 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ). E)  $V_0$  mit 3(2-Fluorophenyl)-Pyrazol (5) der wtNNMT ( $0,011 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,996$ ), v28 ( $0,077 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ) und v49 ( $0,18 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ). F)  $V_0$  mit 3-Methyl-4-Phenylpyrazol (6) der wtNNMT ( $0,014 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ), v22 ( $0,57 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ) und v49 ( $1,64 \mu\text{M}/\text{min}$ ,  $R^2=0,999$ ). Die Messungen von  $V_0$  wurden mit jeweils 2 mM des Pyrazols und SAM und 50  $\mu\text{M}$  Enzym bei 37 °C durchgeführt, die Steigung der Anfangsgeschwindigkeit wurde in Microsoft Excel als linearer Fit bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von Triplikaten.**

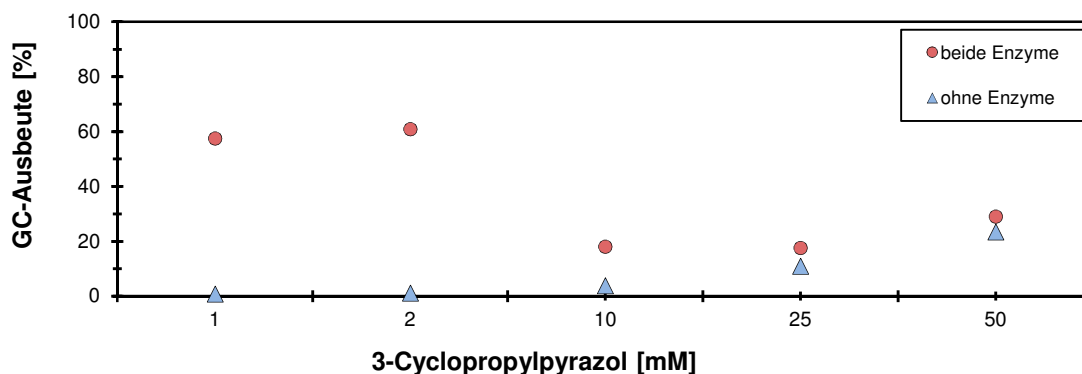




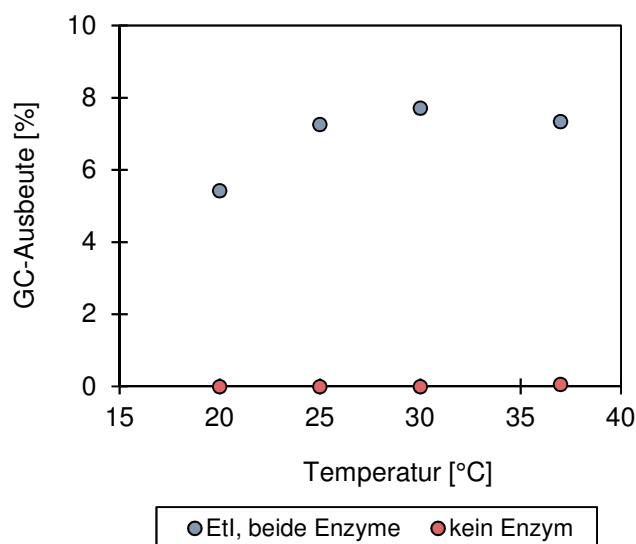
**Abb. 1: Bestätigung der enzymatischen Katalyse von NSAs über Massenspektrometrie.** Die Synthese von NSAs durch NSA-Synthase (50  $\mu$ M NSA-Synthase, 1 mM SAH, 10 Äquivalente Halogenalkan, 25°C, 20 h) wurde durch LC-MS-Messungen mit ESI-Ionisierung im positiven Modus bestätigt. **A)** Massenspektrum eines kommerziell erhältlichen *S*-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Standards. Die gemessene Hauptmasse ist identisch mit der theoretischen Masse von 399,14. **B)** Massenspektrum von durch NSA-Synthase synthetisiertem SAM. Das Massenspektrum ist nahezu identisch mit dem des authentischen Standards. **C)** Massenspektrum von NSA-Synthase-synthetisiertem *S*-Adenosyl-L-Ethionin. Die Hauptmasse ist identisch mit der theoretischen Masse von 413,16. **D)** Massenspektrum von NSA-Synthase-synthetisiertem *S*-Adenosyl-L-Propionin. Die Hauptmasse ist identisch mit der theoretischen Masse von 427,18. **E)** Das Massenspektrum von NSA-Synthase-synthetisiertem *S*-Adenosyl-L-Buthionin ergab einen Massentreffer bei m/z 441, der mit der theoretischen Masse von 441,19 identisch ist. Abbildung verändert nach S Kienzle (2020).<sup>[227]</sup>



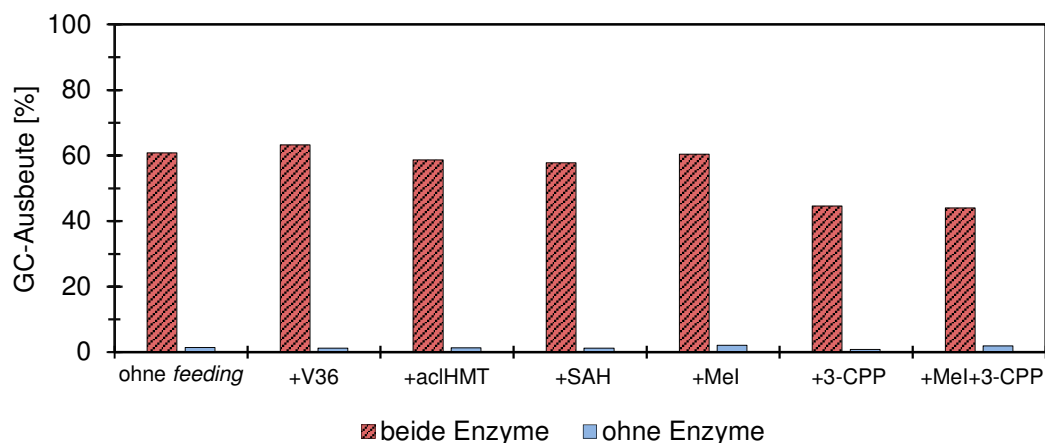
**Abb. 61: Charakterisierung der enzymatischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) mittels der bienzymatischen Kaskade mit v36 und NSA-Synthase.** A) Enzymatische Methylierung von 3 bei pH 7,0 und variierenden Temperaturen und B) Produktbildung bei 37 °C und unterschiedlichen pH-Werten. In allen Experimenten wurden 50  $\mu$ M jedes Enzyms, 2 mM 3 und 10 Äquivalente Methylidiod eingesetzt. C,D) Substratabhängigkeit der bienzymatischen Kaskade bei konstant 20 mM MeI, gezeigt in molarer (C) und prozentualer Produktbildung (D). Abbildungen verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020).<sup>[223]</sup>



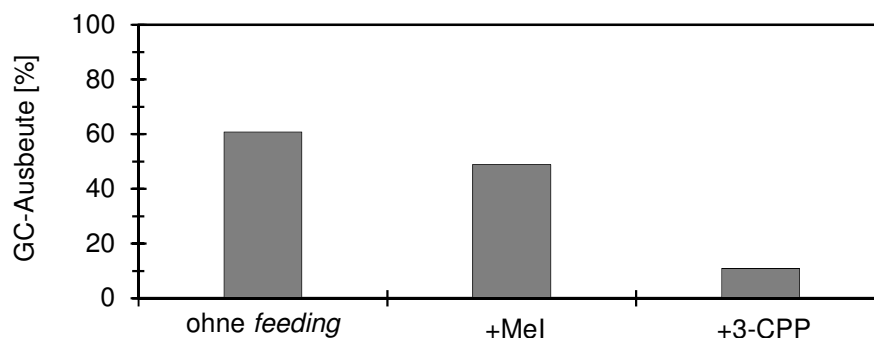
**Abb. 62: Einfluss der Methylodid (MeI)-Konzentration auf Produktbildung der enzymatischen Methylierung mittels der bienzymatischen Kaskade aus NSA-Synthase und v36.** Eingesetzt wurden 50  $\mu$ M NSA-Synthase, 50  $\mu$ M v36 10 Äquivalente MeI bei 37 °C und pH 7,0 für 30 h. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020)<sup>[223]</sup>.



**Abb. 63: Temperaturabhängigkeit der bienzymatischen Kaskade zur Ethylierung von 3-Cyclopropylpyrazol (3) mittels Iodethan (EtI).** Eingesetzt wurden je 50  $\mu$ M NSA-Synthase und v36, sowie 2 mM 3 für 30 h. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer (2020)<sup>[223]</sup>.



**Abb. 64: Feeding-Experimente zur Steigerung der Produktbildung in der enzymatischen Methylierungs-Kaskade.** Nach 20 h Reaktionszeit bei pH 7,0 und 37 °C wurden die Komponenten (von links nach rechts: ohne *feeding*, Zugaben von je 25 µM v36, 25 µM NSA-Synthase, 100 µM SAH, 20 mM MeI, 2 mM 3-CPP, 20 mM MeI und 2 mM 3-CPP) den entsprechenden Reaktionsmischungen zugeführt und für weitere 72 h inkubiert. Die Kaskadenreaktion ohne *feeding* diene als Referenz. Die Kontrollexperimente wurden ohne Zugabe der beiden Enzyme durchgeführt. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer.<sup>[223]</sup>



**Abb 65: Kontinuierliche Zugabe von Methylodid und 3-Cyclopropylpyrazol (3) zur enzymatischen Methylierungs-Kaskade.** Die *feeding*-Experimente unter kontinuierlicher Zugabe von MeI zu einer finalen Konzentration von 24 mM bzw. **3** zu einer finalen Konzentration von 13 mM wurden bei 37 °C für 92 h mit einer konstanten *feeding*-Geschwindigkeit von 0,73 µL/h durchgeführt. Die Kaskadenreaktion ohne *feeding* diene dabei als Referenz. Abbildung verändert nach A.N. Egler-Kemmerer.<sup>[223]</sup>

## 8.2 Enzymsequenzen

**Tabelle 11: Enzymsequenzen der untersuchten Wildtyp-N-Methyltransferasen.** Die DNA-Sequenzen der Enzyme sind im FASTA-Format dargestellt. Das Startcodon (ATG) ist in grün hervorgehoben, der LE-Linker mit anschließendem His<sub>6</sub>-tag in grau dargestellt und das Stoppcodon (TGA) in rot markiert.

Enzym/ ITB-#	DNA-Sequenz
<b>PNMT/ pITB5663</b>	<p>ATG TCTGGCGCGGATCGTAGTCCTAATGCAGGAGCAGCCCCGACTCAGCACCCGGTCAGGCG  GCTGTGCCAGCGCATACCAGCGTTTTGAGCCACGCGCGTATTTGCGTAACAACATATGCACCC  CCCCGTGGCGATTTATGTAACCCCAATGGTGTGGGTCCGTGGAAACTTCGCTGTCTGGCGCAA  ACTTTCGCTACCGGCGAGGTGTCTGGACGCACGTTGATTGACATCGGCAGTGGCCCTACAGTC  TACCAGTTGCTGAGCGCGTGTCTCCCACTTCGAAGACATTACGATGACGGATTTTCTTGAAGTG  AACCGCCAAGAGCTTGGCCGCTGGTTGCAGGAGGAACCCGGCGCCTTTAACTGGTCAATGTAC  AGTCAACATGCTTGCTTGATCGAGGGCAAGGTGAGTGTGGCAGGACAAAGAACGCCAACTG  CGCGCCCGCTCAAACGCGTACTGCCTATTGATGTCCATCAACCTCAGCCCTTGGGTGCTGGG  TCACCTGCCCTTTACCAGCTGATGCATTGGTGTCTGCCTTTTGCCTGGAAGCGGTGAGTCCA  GACCTTGCTAGCTTTCAACGTGCATTAGACCACATCACGACCCTGCTTCGCCCAGGAGGGCAC  TTGTTACTGATCGGGGCATTAGAAGAGTCATGGTATCTGGCCGGAGAAGCCCGCCTTACCCTC  GTTCCCGTTTTCTGAAGAGGAAGTTCGCGAAGCATTGGTACGCTCAGGATATAAAGTGCCTGAT  CTTCGCACTTACATTATGCCTGCCCACTTACAAACAGGCGTGGACGACGTGAAGGGAGTTTTCT  TTTGCTTGGGCACAGAAAGTGGGATTA C TCGAGCACCACCACCACCACCAC TGA</p>
<b>HNMT/ pITB5666</b>	<p>ATGGCGAGCTCTATGCGCAGCCTGTTTTTCGGATCATGGGAAGTATGTAGAAAGCTTCCGCCG  TTCTTGAACCACAGTACCAGCATCAATGTATGCAGGAATTCATGGACAAAAAGCTTCCGGGA  ATTATCGGCCCGCATCGGTGATACTAAGTCGGAAATCAAAATTCTTTCTATCGGGGGCGGCGCT  GGGGAGATTGACCTTCAGATCCTGTCTAAGGTACAGGCACAATATCCTGGAGTATGTATCAAT  AATGAAGTGGTCGAGCCTAGTGCAGGAAATCGCGAAGTATAAAGAATTAGTAGCGAAAAC  AGCAATCTGGAGAATGTCAAATTTGCGTGGCATAAAGAAACGTCGTCTGAATATCAATCCCGC  ATGCTTGAAAAAAGGAGTTACAGAAATGGGACTTCATCCACATGATTCAAATGCTTTATTAC  GTCAAGGACATCCCTGCTACACTGAAATTTCTTTCATTCTCTGTTGGGGACTAATGCTAAGATG  CTTATCATTGTTGTTTTCTGGTAGTTTCCAGGCTGGGACAAACTGTGGAAGAAATATGGAAGTCGC  TTTCTCAGGATGATTTATGCCAGTATATCACATCGGACGACCTTACCCAGATGCTGGATAAT  TTGGGATTAAGTATGAGTGCTATGACTTGCTGTCAACCATGGACATTTCCGATTGCTTTATT  GATGGCAATGAGAATGGTGAATTTATGTTGGGACTTTTTAACGGAGACCTGTAATTTAATGCA  ACTGCCCCACCCGATTTACGCGCGGAATTTGGGAAAAGATTTGCAGGAGCCGGAATTTCTCCGCG  AAGAAAAGAGGGCAAGGTTCTTTTTAATAACACATTATCTTTTATCGTGATCGAAGCTCTCGAG  CACCACCACCACCACCAC TGA</p>
<b>INMT/ pITB5664</b>	<p>ATGGAAGGGGGCTTACGGGGGGTGATGAATACCAAAAACACTTTCTGCCTCGCGACTATCTT  AATACATACTATAGTTTTTCAGAGCGGTCCGTCTCCCAGGCCGAAATGCTGAAATTTCAACCTT  GAATGCCCTCACAAAACCTTTGGGCCGGGAGGCTTACAAGGCGATACATTGATTGATATCGGT  TCCGGCCCCGACAATCTACCAAGTCTTAGCCGCGTGTGAATCTTTCAAAGACATTACCCTTTCCG  GATTTCACTGACCGTAACCGGAGGAGCTTGCCAAGTGGTTAAAAAAGGAGCCTGGAGCCTAT  GACTGGACCCCTGCATTGAAGTTCGCTTGTGAACCTGAAGGAAATTCAGGCCGTTGGCAAGAA  AAGGCCGAGAAACTTCGCGCCACCGTGAAACGTGTTCTGAAATGCGATGCGAACTTGAGTAAT  CCACTTACGCCCCTGGTCTTGCCCTCCAGCAGATTGTGTGCTGACATTGCTGGCAATGGAATGT  GCATGTTGTTCACTGGATGCCTACCGCGCAGCTCTTCGTAACCTAGCGAGTTTGTGGAAGCCA  GGAGGACATTTGGTAACGACGGTAACCTTGCAATTATCTAGCTATATGGTTGGGGAGCGCGAA  TTTTCTGCGTAGCCCTGGAAAAAGAGGAAGTTGAACAGGCGGTGCTGGACGCGGGGTTTCGAC  ATCGAACAGTTGCTTTACTCGCCACAGTCTTATAGTGCAGCACTGCGCCAAACCGCGGCGTC  TGTTTCTGGTGGCCCGCAAGAAGCCTGGATCTCTCGAGCACCACCACCACCACCAC TGA</p>

<b>NNMT/ pITB5665</b>	<b>ATG</b> GGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAA GAAAAATACTACAAGTTTGGAAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAA AAGAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGA TCAGGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCTGTGACG GACTATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGGCGTTC GATTGGAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCCGCTAAAGGGTCTGTAA AAGGAGGAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAA CCATTAGGAGCCGTCCTGACTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCA GCTTGTCTGACTTGCCTACATATTGTCTGTCGATTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTTAAACCA GGAGGGTTTTCTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGTCATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAG TTCTCATCTTTACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACC ATTGAATGGTTTCGAGGTTATTTACAGTCCACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTA TTTTCGCTGGTTGCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCT <b>TGA</b>
---------------------------	--

**Tabelle 12: Enzymsequenzen der untersuchten FuncLib-Varianten.** Die DNA-Sequenzen der Enzyme sind im FASTA-Format dargestellt. Das Startcodon (ATG) ist in grün hervorgehoben, der LE-Linker mit anschließendem His<sub>6</sub>-tag in grau dargestellt und das Stoppcodon (TGA) in rot markiert.

<b>Enzym/ ITB-#</b>	<b>DNA-Sequenz</b>
<b>v1/ pITB5667</b>	<b>ATG</b> GGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACcACTTAG AAAAATACTACAAGTTTGGAAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCTGTGACGGACT ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGGCGTTCGATTG GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCCGCTAAAGGGTCTGAAAAGGAG GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCGCAGCTTGTCC TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTCGATTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTTAAACCAGGAGGGTTT CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT CGAGGTTATTTACAGTCCACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCT <b>TGA</b>
<b>v2/ pITB5668</b>	<b>ATG</b> GGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG AAAAATACTACAAGTTTGGAAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCTGTGACGGACT ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGGCGTTCGATTG GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCCGCTAAAGGGTCTGAAAAGGAG GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTCGATTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTTAAACCAGGAGGGTTT CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT CGAGGTTATTTACAGTCCACAGCTCCACAATGGCAAATgCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCT <b>TGA</b>
<b>v3/ pITB5669</b>	<b>ATG</b> GGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG AAAAATACTACAAGTTTGGAAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCTGTGACGGACT ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGGCGTTCGATTG GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCCGCTAAAGGGTCTGAAAAGGAG GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTCGATTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTTAAACCAGGAGGGTTT CTGGTCATCATGGATtCCTTGAAGcgtTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT CGAGGTTATTTACAGTCCAGCTCCACAATGGCAAATtCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCT <b>TGA</b>

v4/ pITB5670	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATgTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
v5/ pITB5671	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGgCgTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
v6/ pITB5672	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATaCCTTGAAGTgcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGatgAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
v7/ pITB5673	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTgAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>

**v8/  
pITB5674**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAACTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTTCGATTG  
GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTTCATCATGGGgTatgTTGAAGTgcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**v9/  
pITB5675**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAACTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTTCGATTG  
GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGTgCGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTTCATCATGGGATaCCTTGAAGaaCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCCTcCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**v10/  
pITB5676**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAACTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTTCGATTG  
GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGTcACGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTTCATCATGGGATatgTTGAAGGcCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAcaTT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**v11/  
pITB5677**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTAAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAACTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTTCGATTG  
GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGTgCGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTTCATCATGGGATetgTTGAAGTgcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA



<b>v12/ pITB5678</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTaCCTTGAAGcgtTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
<b>v13/ pITB5679</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcagTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATtCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
<b>v14/ pITB5680</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATctgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>
<b>v15/ pITB5681</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGaCcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAcaTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATtCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA</p>

<b>v16/ pITB5682</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGaCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGatgAATgCAGGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v17/ pITB5683</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtCGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATaCCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGagcAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v18/ pITB5684</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAAtCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtCGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcgtTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTgAGCTCCACAATGGCAAATgCAGGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v19/ pITB5685</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACcACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTgAGCTCCACAATGGCAAATgCAGGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

v20/ pITB5686	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTatgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v21/ pITB5687	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAAtCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGgaATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v22/ pITB5688	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAcaTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGatgAATtgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v23/ pITB5689	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTaCCTTGAAGTCATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTgAgCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

v24/ pITB5690	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATtCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGcCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v25/ pITB5691	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATtCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTCATCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v26/ pITB5692	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATaCCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v27/ pITB5693	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATtCCTTGAAGTCATCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTgAGCTCCACAATGGCAAATgCAGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

v28/ pITB5694	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGTgcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAatgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v29/ pITB5695	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGaCcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v30/ pITB5696	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcagTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTgAGCTCCACAATGGCAAATtCAGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v31/ pITB5697	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATtCAGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

<b>v32/ pITB5698</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAAttCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCTTGAAGcagTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATtGCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v33/ pITB5699</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATgTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v34/ pITB5700</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCAGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCTTGAAGgaATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATtGCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v35/ pITB5701</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTetgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

<b>v36/ pITB5702</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATtCTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATaCCTTGAAGTgcTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v37/ pITB5703</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATaCCTTGAAGgaATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTgAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v38/ pITB5704</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGatgTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
<b>v39/ pITB5705</b>	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTGTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgcACGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGTCTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTATCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCagCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCCTACAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

v40/ pITB5706	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCACGAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCGTGCATTACGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATctgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATgtT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATtqCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v41/ pITB5707	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCACGAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCGTGCATTACGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcgtTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTgAgCTCCACAATGGCAAATgCAGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v42/ pITB5708	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACcACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgCACGAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCGTGCATTACGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGgCgTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATtqCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v43/ pITB5709	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTAATAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtCGCAGCTTGTCC  TGACTTGCCTACATATTGTCGTGCATTACGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGaCcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAaCcT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>



v44/ pITB5710	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgcTCTACTtCATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCaTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v45/ pITB5711	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGcACGCAGCTTGTCC  TACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTcATCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAAtgCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v46/ pITB5712	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGACGCAGCTTGTCC  TACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTatgTTGAAGTcATCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGtgcAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>
v47/ pITB5713	<p>ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  AAAAATACTACAAGTTTGGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  GAGCCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTGGAAgGCAGCTTGTCC  TACTTGCCCTACATATTGTCTGTGATTTACGCAACTTAGGAAGTTTGGTTAAACCAGGAGGGTTT  CTGGTCATCATGGgTGCCTTGAAGaacTCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCAgCgT  TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  CGAGGTTATTTACAGTCCTtCAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA</p>

**v48/  
pITB5714**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTtCTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  
GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTCATCATGGATatgTTGAAGTgcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATtgcGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**v49/  
pITB5715**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATACTACAAGTTTGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  
GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgtgCGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGTgcTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCaTT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCTggAGCTCCACAATGGCAAATgcCGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**v50/  
pITB5716**

ATGGAGAGTGGATTTACGAGTAAGGACACTTATTTGAGTCATTTTAACCCGCGCGACTACTTAG  
AAAAATtCTACAAGTTTGGAAGCCGCCATTTCAGCAGAATCACAAATTCTGAAACACCTTTTAAA  
GAACCTGTTTTAAATCTTCTGTTTAGATGGGGTCAAAGGAGATTTGTTGATTGACATCGGATCA  
GGTCCCACAATTTACCAACTTCTGTCCGCTTGTGAGAGTTTTAAGGAGATCGTCGTGACGGACT  
ATTCAGATCAAAATCTGCAAGAAGTGGAGAAATGGTTAAAGAAAGAACCAGAGGCGTTCGATTG  
GAGCCAGTTGTGACCTATGTCTGTGATCTTGAAGGAAACCGCGTAAAGGGTCTGAAAAGGAG  
GAAAAGCTGCGCCAAGCCGTAAAGCAAGTATTTAAATGTGATGTTACTCAAAGCCAACCATTAG  
GAGCCGTCCCCTGCCCCGGCGGATTGTGTATTGTCAACCCTTTGCTTgcACGCAGCTTGTCC  
TGACTTGCCTACATATTGTCTGTGATTCAGCAACTTAGGAAGTTTGCTTAAACCAGGAGGGTTT  
CTGGTCATCATGGATGCCTTGAAGcgtTCCTACTACATGATTGGGGAACAGAAGTTCTCATCTT  
TACCTTTGGGCCGTGAAGCCGTAGAAGCGGCCGTAAAGGAGGCGGGGTACACCATTGAATGGTT  
CGAGGTTATTTACAGTCCTACAGCTCCACAATGGCAAATAACGAGGGCTTATTTTCGCTGGTT  
GCTCGCAAACCTGAGTCGTCTCTTCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA

**Tabelle 13: Enzymsequenzen der untersuchten Halogenid-Methyltransferasen.** Die DNA-Sequenzen der Enzyme sind im FASTA-Format dargestellt. Das Startcodon (ATG) ist in grün hervorgehoben, der LE-Linker mit anschließendem His<sub>6</sub>-tag in grau dargestellt und das Stoppcodon (TGA) in rot markiert.

Enzym/ ITB-#	DNA-Sequenz
<b>cthHMT/ pITB5717</b>	<p>ATGCTTGGTATGGACGCTGATACGGCAAGTTTTTGGGAGGAGAAATATCGTGCAGATTT  GACTGCCTGGGACCGTGGCGGCGTATCACCGGCTTTGGAACATTGGCTTGCAGAAGGCG  CACTGAAGCCCGGCCGTATCTTAATTCAGGTTGCGGATACGGGCATGAGGTCCTTGCC  TTGGCACGCCGTGGATTCTGAAGTTTGGGGCTTGGACATCGCCCTTACTCCCCTTCCGCG  TTTGAAGAGAACTGGCTCAGGCAGGTTTAAACAGCCACGTAGTCTGAAGGAGACGTTT  GCACCTGGCAGCCGGAACAACCTTTTATGCGGTGTATGAACAACTTGTGTTGTCGCT  TTGAGTCCAGAAGACTGGCTCGTTATGAGGCACAATTATGCCGTTGGTTACGTCCC  CGGTCGTCCTTTTCGCGCTGTGGATGCAGACCGACCGTCTGGAGGACCACCATATCATT  GTGGACTTGAAGCCATGCGGCTACTGTTTGTCTTTAGAAGCTTGGCGTTGGGTGCAACCC  CCACAACGCACTGTACCCATCCTACTGGTTTTTTTTGAGTATGCTGCCATTTTAGAGCG  TCTTGTCTGGAACATCATCACCACCATCATTAA</p>
<b>athHMT/ pITB5720</b>	<p>ATGGCGGAGGAGCAACAAAATTCGATCAGTCCAATGGTGGTAATGTGATCCCAACCC  CGAGGAAGTAGCAACCTTCTTGACAAGACAGTCGAGGAGGGCGGCTGGGAGAAGTGTCT  GGGAGGAGGAAATACACCATGGGACCAGGGTCGCGCCACGCCGTTAATCGTGCATTTA  GTGGATACATCAAGTCTTCCCCTTGGCCGCGCATTTGGTGCAGGGTGTGGTGGCGGACA  CGATGTCGTAGCCATGGCCTCGCCAGAGCGTTTCGTTGTGCGCCTGGATATCTCGGAAA  GTGCGCTTGCGAAGGCAAAATGAAACATATGGCAGCTCACCTAAAGCTGAATATTTCTCG  TTTTGTCAAAGAGGATGTCTTTACCTGGCGTCCCACCGAATTGTTTGACTTGATTTTTGA  CTATGTTTTTTTTTGTGCAATTGAGCCGGAAAATGCGTCTTGCCTGGGCTAAGTCCATGT  ATGAGCTTCTGAAACCAGACGGCGAGTTAATCACCCGTATGTACCCCATCACCGATCAT  GTAGGTGGCCCCCATAACAAGGTAGATGTTAGCACATTCGAGGAAGTGTAGTGCCTAT  CGGGTTCAAAGCAGTGAGCGTTGAGGAGAACCCCTCACGCAATCCCCACACGCAAGGGAA  AAGAGAAACTTGGTCGCTGGAATAAATCAATCTGGAACATCATCACCACCATCATTAA</p>
<b>aciHMT (NSA- Synthase)/ pITB5722</b>	<p>ATGTCAACGCCAGTTTAATTCATCCGGTGTGCACGAAGTATTAGCAAAATACAAAGA  CGGTAACATATGTCGACGGGTGGGCCGAAGTGTGGGATAAATCTAAGGGTGACCGTCTTC  CATGGGATCGTGGTTTTCCGAACCCTGCGTTGGAAGATAACCCTGATTCAGAAACGTGCC  ATCATCGGAGGTCCCTTGGGCCAAGACGCTCAGGGCAAGACATACCGCAAAAAGCTCT  GGTCCCAGGCTGCGGTCGTGGAGTAGATGTGTTGTTATTGGCATCGTTCGGTTATGACG  CTTATGGTTTAGAATACTCTGCAACGGCGTTCGATGTATGCCAAGAGGAGCAAGCCAAG  AACGGGGATCAATATCCTGTACGCGATGCAGAAATCGGCCAGGGCAAGATTACGTTTCGT  TCAAGGTGATTTCTTTGAGGACACGTGGCTTGAAAAGCTTAACCTTACCCGCAATTGTT  TCGACGTTATCTACGACTACACGTTCTTCTGTGCATTGAACCCGAGCATGCGCCCTCAG  TGGGCTTTGCGCCATACCCAACCTTCTTGCCGACTCTCCGCGCGGACATTTAATCTGTTT  GGAGTTTCCCCGCCATAAAGACCCTTCTGTACAGGGGCCACCATGGGGCTCGGCGTCAG  AAGCCTACCGCGCCATCTGTACATCCAGGGGAGGAAATTCCTTACGATGCGTACAGT  CAATGCCAGTTTGACAGCAGCAAAGCACCCAGTGCAGGGCTTGAACGTGTAGCATA  TTGGCAACCAGAGCGCACGCATGAAGTAGGGAAAAACGAGAAAGGTGAGGTTCAAGATC  GCGTATCCATCTGGCAGCGTCTCCCCAAAAGTTCCCTGCTGGAACATCATCACCACCAT  CATTAA</p>

**bmaHMT/  
pITB5721**

ATGTC TACTGTAGCTAATATCGCTCCCGTATTCACGGGCGACTGCAAAACTATCCCAAC  
 GCCCGAAGAGTGCCTACCTTCTTATAACAAGGTCGTCAATTCGGGTGGGTGGGAGAAGT  
 GTTGGGTGGAGGAAGTGATCCCGTGGGATCTTGGAGTGCCTACTCCGTTAGTATTACAT  
 CTTGTAAAGAATAACGCCCTGCCAAACGGTAAAGGTCTTGTACCAGGATGTGGCGGGGG  
 CTATGATGTAGTGGCGATGGCAAACCCGGAGCGTTTCATGGTCGGGCTGGATATTAGTG  
 AGAATGCTCTTAAGAAGGCCCGTGAAACTTTCTCGACCATGCCTAATAGTAGCTGCTTC  
 AGCTTCGTCAAGGAGGATGTCTTTACCTGGCGTCCAGAGCAACCGTTTGATTTTATTTT  
 CGACTACGTTTTCTTTGCGCTATCGACCCAAAAATGCGTCCGGCATGGGGTAAAGCCA  
 TGTATGAATTACTGAAGCCTGACGGAGAGTTAATCACGTTGATGTATCCAATTACAAAC  
 CATGAGGGAGGACCTCCATTCTCTGTACGCGAATCCGAGTACGAAAAGGTCTGGTGCC  
 CTTGGGGTTTTAAACAGCTGTCTTTAGAACTACAGTGATCTTGCCGTGCAACCTCGTA  
 AGGGCAAGGAGAAGTTGGCCCGTTGGAAGAAAATGAACAACCTGGAACATCATCACCAC  
 CATCATTA

**bxeHMT/  
pITB5719**

ATGTCCGACCCGACCCAACCTGCCGTTCCAGATTTTCGAAACCCGTGATCCCAATTCACC  
 TGCTTCTGGGATGAGCGTTTCGAGCGTCGCTTTACACCTTGGGACCAGGCCGGAGTTC  
 CTGCGGCTTTTCAGTCTTTTGCAGCGCGCCATTCAGGCGCTGCTGTATTGATCCCTGGT  
 TGTGGTTCTGCCTATGAGGCCGTGTGGTTAGCCGGGCAGGAAACCCGTTCGCGCTAT  
 CGATTTTTCACCTGCTGCTGTAGCGGCAGCACATGAACAGTTAGGGGCGCAGCACGCGC  
 AGTTAGTGGAGCAAGCTGATTTTTTACGTATGAACCGCCGTTTACACCTGCTTGATT  
 TATGAGCGCGCATTTCTGTGTGCATTGCCCTTAGCGCGTCGCGCCGACTATGCCACCG  
 CATGGCAGATCTTCTGCCGGGCGGTGCTTTATTAGCCGGCTTTTTCTTCCTTGGTGCAA  
 CTCCCAAAGGACCACCGTTTGGAAATCGAGCGTGCAGAGCTGGACGCATTGTTAACTCCA  
 TACTTCGACCTTATTGAAGACGAGGCAGTCCACGACTCCATCGCGTTTTTGTGGACG  
 TGAGCGCTGGTTGACATGGCGCCGCCGCGCCCTGGAACATCATCACCACCATCATTA

**selHMT/  
pITB5718**

ATGACTAATGCCGTTAACCAAGCTCAATTTTGGGAGCAGCGTTATCAAGAAGGGTCCGA  
 TCGTTGGGACCTTGGGCAGGCGGCGCCTGTCTGGCGTTCACTTTTGGCGGGGACTAATG  
 CCCCAGCACCTGGTCGATTGCAGTATTAGGCTGTGGACGCGGTCACGATGCTCGCTTA  
 TTTGCCGAGCAAGGCTTCGAGGTTGTCGGCTTTGACTTTGCGCCATCCGCCATTGCCGC  
 AGCACAAGCGTTGGCCAGGGAACTACAGCGCAGTTTCTTCAGCGTGATATTTTTGCGT  
 TGCTCAAGAATTTCGCGGGTTCAGTTCGACACTGTTCTGGAGCATAACATGCTTTTGCGCC  
 ATTGATCCTGACCGCCGTGCCGAGTATGTTGAGGTTGTGCGCCAAATTTGAAACCTAA  
 GGGGTGCCTTCTGGCTTGTTTTGGTGTGATGATCGTCCGTCGGCCCTCCCTATGGAT  
 GTTCTTTAACAGAACTGCGCGATCGTTTCGCTCAGGGCTGGCAAGAAGAGCAGTTAGAA  
 TCTGTACAGAATCCGTGGAGGGTCGCCGTGGTGAGGAATACTTGGGACGTTGGCGTCCG  
 TCTGGATCTGGAACATCATCACCACCATCATTA

### 8.3 Chemische Synthese von Produktstandards

Alle Chemischen Produktstandards wurden entsprechend dem allgemeinen Protokoll (siehe Kapitel 8.7) synthetisiert.

#### 1,3-Dimethylpyrazol (1a):

Die Reaktion wurde im 0,12 mmol-Maßstab durchgeführt und das Rohprodukt wurde mit kommerziellen Standards verglichen und für Selektivitätsmessungen verwendet. NMR-Daten wurden vom kommerziellen Standard abgeleitet. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.21 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 5.99 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  148.66, 130.71, 105.12, 38.63, 13.59. HRESIMS  $m/z$  97.0765 (berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2$  97.0760).

#### 1,5-Dimethylpyrazol (1b):

Die Reaktion wurde im 0,12 mmol-Maßstab durchgeführt und das Rohprodukt wurde mit kommerziellen Standards verglichen und für Selektivitätsmessungen verwendet. NMR-Daten wurden vom kommerziellen Standard abgeleitet. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 6.00 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.27 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  138.28, 138.12, 105.24, 36.13, 11.23. HRESIMS  $m/z$  97.0768 (berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_8\text{N}_2$  97.0760).

#### 1,3,4-Trimethylpyrazole (2a), 1,4,5-Trimethylpyrazole (2b):

Die Reaktion wurde im 1,6 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produktgemisch wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (3:1 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 39,99 mg. Der Produktstandard ist eine Mischung aus 1,3,4- und 1,4,5-Trimethylpyrazol (molares Verhältnis: 25,5 : 74,5). **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.20 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.96 (s, 3H + 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  147.23, 138.30, 135.53, 129.36, 113.96, 113.36, 38.41, 36.36, 11.56, 9.28, 8.82, 8.37. Das NMR-Spektrum von 1,3,4-Trimethyl-Pyrazol entspricht der Literatur.<sup>[295]</sup> HRESIMS  $m/z$  111.0936 (berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_2$  111.0917).

**1-Methyl-3-Cyclopropylpyrazol (3a):**

Die Reaktion erfolgte im 0,1 mmol-Maßstab und das Rohprodukt wurde mit kommerziellen Standards verglichen und für Selektivitätsmessungen verwendet. Die NMR-Daten wurden vom kommerziellen Standard abgeleitet. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,19 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 5,86 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 3,81 (s, 3H), 1,96 – 1,87 (m, 1H), 0,92 – 0,85 (m, 2H), 0,72 – 0,66 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.34, 130.64, 101.77, 38.71, 9.22, 7.96 (2C). HRESIMS  $m/z$  123.0920 (berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$  123.0917).

**1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol (3b):**

Die Reaktion wurde im 0,1 mmol-Maßstab durchgeführt und das Rohprodukt wurde mit kommerziellen Standards verglichen und für Selektivitätsmessungen verwendet. Die NMR-Daten wurden vom kommerziellen Standard abgeleitet. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,33 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 5,82 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 3,89 (s, 3H), 1,75 – 1,66 (m, 1H), 1,00 – 0,92 (m, 2H), 0,68 – 0,61 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  145.08, 137.97, 102.54, 36.33, 6.84 (2C), 6.23. HRESIMS  $m/z$  123.0920 (berechnet für  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2$  123.0917).

**1-Ethyl-3-Cyclopropylpyrazol (7a):**

Die Reaktion wurde im 4,5 mmol-Maßstab durchgeführt.<sup>[223]</sup> Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:1 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 7,53 mg **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$   $J = 2,2$  Hz, 1H), 5,85 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 4,09 (q,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,99 – 1,89 (m, 1H), 1,46 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H), 0,92 – 0,88 (m, 2H), 0,71 – 0,68 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  155.04, 128.86, 101.23, 46.77, 15.74, 9.30, 8.04 (2C). HRESIMS  $m/z$  137.1079 (berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2$  137.1073).

**1-Ethyl-5-Cyclopropylpyrazol (7b):**

Die Reaktion wurde im 4,5 mmol-Maßstab durchgeführt.<sup>[223]</sup> Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:1 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 20,05 mg. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,34 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H), 5,80 (d,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 4,23 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 1,76 – 1,67 (m, 1H), 1,44 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H), 0,98 – 0,92 (m, 2H), 0,67 – 0,63 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  144.28, 138.02, 102.32, 44.08, 15.52, 6.96 (2C), 6.14. HRESIMS  $m/z$  137.1073 (berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2$  137.1073). Reinheit 56%:36%:9% 1-Ethyl-5-Cyclopropylpyrazol:Ethylacetat:Cyclohexan.

**1-Propyl-3-Cyclopropylpyrazol (8a):**

Die Reaktion wurde im 4,5 mmol-Maßstab durchgeführt. <sup>[223]</sup> Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:3 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 270,1 mg. **NMR-Daten:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,22 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,84 (d, *J* = 1). 9, 1H), 3,98 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,92 – 1,88 (m, 1H), 1,87 – 1,81 (m, 2H), 0,95 – 0,86 (m, 2H und t, 3H), 0. 70 – 0,68 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 155,05, 129,62, 101,01, 53,74, 23,92, 11,31, 9,33, 8,03 (2C). HRESIMS *m/z* 151.1232 (berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> 151.1230). 1-Propyl-3-Cyclopropylpyrazol ist mit dem Regioisomer 5-Cyclopropyl-1-Propylpyrazol im Molverhältnis 73:27 kontaminiert.

**1-Propyl-5-Cyclopropylpyrazol:**

Die Reaktion wurde im 4,5 mmol-Maßstab durchgeführt. <sup>[223]</sup> Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:3 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 28,2 mg **NMR-Daten:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ *J* = 1,9 Hz, 1H), 5,80 (d, *J* = 1,7, 1H), 4,17 – 4,11 (t, *J* = 7,1, 2H), 1,93 – 1,86 (m, 2H), 1,72 (m, 1H), 0,98 – 0,85 (m, 2H und t, 3H), 0,67 – 0,64 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.78, 138.01, 102.04, 50.79, 23.70, 11.41, 7.17 (2C), 6.27. HRESIMS *m/z* 151.1231 (berechnet für C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> 151.1230)

**1-Methyl-3(2-Furyl)Pyrazol (5a):**

Die Reaktion wurde im 0,72 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 13,63 mg **NMR-Daten:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,43 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,34 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,62 (d, *J* = 3,3 Hz, 1H), 6,45 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 6,44 (dd, *J* = 3,3, 1,9 Hz, 1H), 3,93 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.08, 144.13, 141.73, 131.18, 111.32, 105.39, 102.86, 39.16. HRESIMS *m/z* 149.0719 (berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O 149.0709).

**1-Methyl-5(2-Furyl)Pyrazol (5b):**

Die Reaktion wurde im 0,72 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 85,5 mg. **NMR-Daten:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,51 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 7,45 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 6,55 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 6,50 (dd, *J* = 3,1, 1,8 Hz, 1H), 6,47 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 4,05 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 145.13, 142.70, 138.55, 134.15, 111.53, 108.44, 105.12, 38.72. Die NMR-Daten entsprechen der Literatur.<sup>[296]</sup> HRESIMS *m/z* 149.0715 (berechnet für C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O 149.0709).

**1-Methyl-3(2-Fluorphenyl)pyrazol (5a):**

Die Reaktion wurde im 0,6 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produktgemisch wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 19,95 mg. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,97 (td,  $J = 7,7, 1,9$  Hz, 1H), 7,40 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 7,30 – 7,21 (m, 1H), 7,17 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H), 7,11 (dd,  $J = 11,5, 8,2$  Hz, 1H), 6,69 (dd,  $J = 4,0, 2,2$  Hz, 1H), 3,96 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.14, 159.15, 146.20, 131.20, 128.95, 128.42, 124.31, 121.55, 121.45, 116.05, 106.58, 39.21. HRESIMS  $m/z$  177.0823 (berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_1\text{N}_2$  177.0823).

**1-Methyl-5(2-Fluorphenyl)pyrazol (5b):**

Die Reaktion wurde im 0,6 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produktgemisch wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 70,92 mg. Produktstandard ist eine Mischung aus 1-Methyl-3- und 1-Methyl-5(Fluorphenyl)-Pyrazol (Molarverhältnis 76 : 24). HRESIMS  $m/z$  177.0826 (berechnet für  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{F}_1\text{N}_2$  177.0823).

**1,5-Dimethyl-4-phenylpyrazol (6b):**

Die Reaktion wurde im 0,63 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produkt wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 6,34 mg. **NMR-Daten:**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,56 (s, 1H), 7,44 – 7,33 (m, 4H), 7,30 – 7,22 (m, 1H), 3,85 (s, 3H), 2,38 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  137.37, 135.19, 134.13, 128.77, 127.85, 126.23, 120.95, 36.65, 10.51. HRESIMS  $m/z$  173.1073 (berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2$  173.1073). Reinheit: Die Probe enthält 90,8% 1,5-Dimethyl-4-Phenylpyrazol und 9,2% 1,3-Dimethyl-4-Phenylpyrazol.

**1,3-Dimethyl-4-phenylpyrazol (6a):**

Die Reaktion wurde auf 0,63 mmol-Maßstab durchgeführt. Das Produktgemisch wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (1:9 Ethylacetat/Cyclohexan). Isolierte Ausbeute: 65,37 mg. Produktstandard ist eine Mischung aus 1,3-Dimethyl- und 1,5-Dimethyl-4-Phenylpyrazol (molares Verhältnis 42 : 58). HRESIMS  $m/z$  173.1077 (berechnet für  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2$  173.1073).



## 8.4 NMR-Analyse der enzymatischen Methylierung von 3-Cyclopropylpyrazol mit Iodmethan im präparativen Maßstab (1,0 mmol)

### 1-Methyl-5-Cyclopropylpyrazol (3b):<sup>[223]</sup>

**NMR-Daten:** <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.33 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.82 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.71 (m, 1H), 0.96 (m, 2H), 0.65 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 144.96, 137.84, 102.41, 36.18, 6.71 (2C), 6.10. Die NMR-Daten entsprechen dem kommerziellen Standard. Isolierte Ausbeute: 44.0 mg (37.3%).