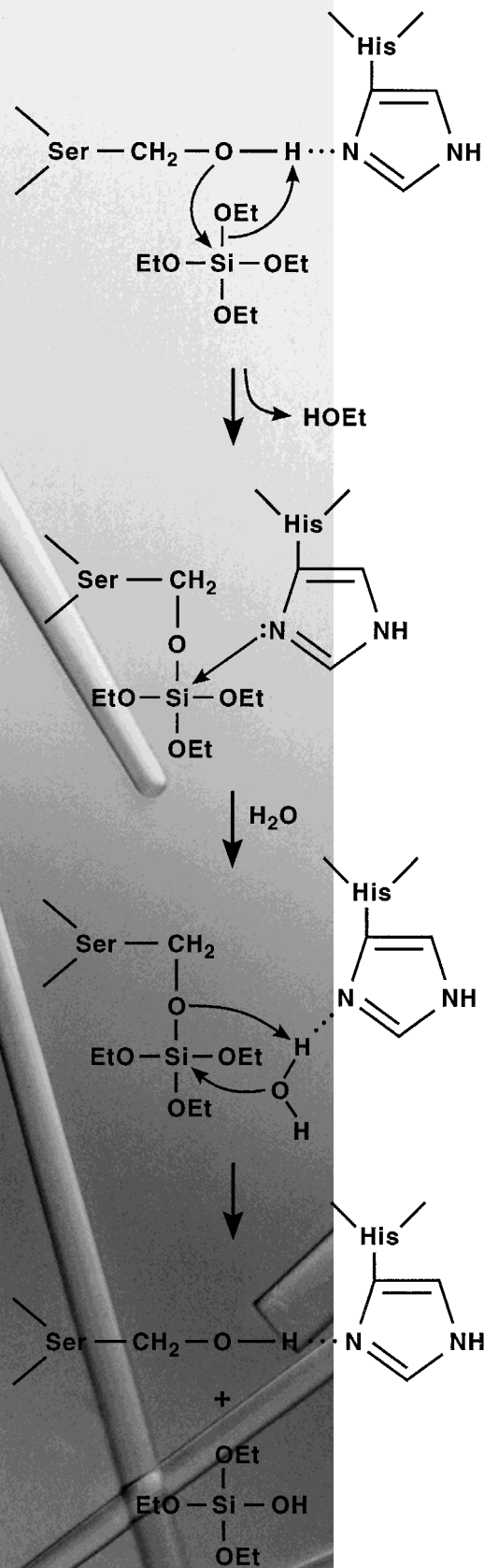


Kieselsäure-Nadeln
 (Ø 2 mm × 30 µm) ma-
 chen 75% der Trocken-
 masse eines Meeres-
 schwamms aus. Protein-
 fasern, die in diese
 Nadeln eingeschlossen
 (und in der Photographie
 ← sichtbar) sind, katalysie-
 ren die Synthese von
 Kieselsäure und Polysil-
 sesquioxanen aus den
 entsprechenden Sili-
 ciumalkoxiden bei
 neutralem pH-
 Wert und 20 °C.
 (Mikrophoto-
 graphie von
 L. J. Friesen)



Näheres hierzu
 auf den folgenden
 Seiten.

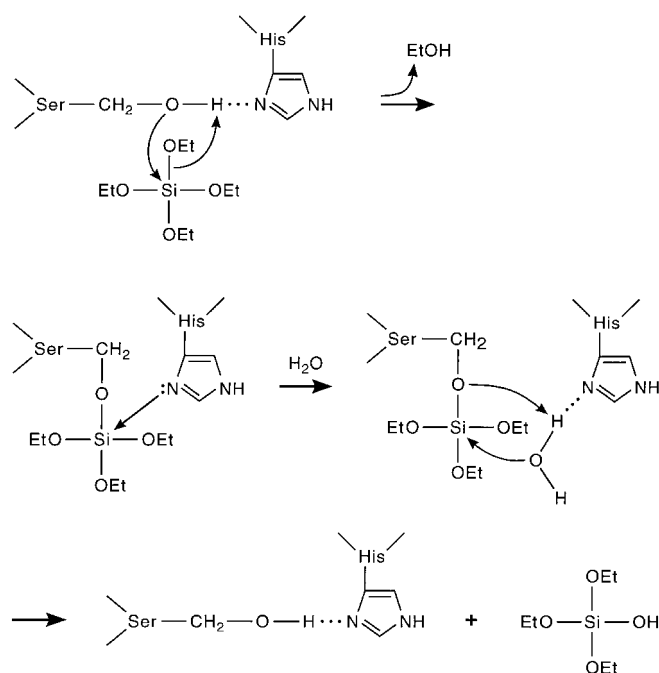
Die effiziente Katalyse der Polysiloxan-Synthese durch Silicatein α erfordert spezifisch positionierte Hydroxy- und Imidazolgruppen**

Yan Zhou, Katsuhiko Shimizu, Jennifer N. Cha, Galen D. Stucky und Daniel E. Morse*

Viele Meeresorganismen synthetisieren große Mengen formkontrollierter Kieselsäure unter milden, physiologischen Bedingungen und bei Temperaturen nahe 0 °C.^[1] In deutlichem Gegensatz dazu stehen die Bedingungen der industriellen und geochemischen Synthese von Kieselsäure und anderen Polysiloxanen, die üblicherweise extreme pH-Werte, hohe Temperaturen oder beides erfordern. Wir stellten kürzlich fest, daß die Proteine, die in den von einem Meeresschwamm erzeugten makroskopischen Kieselsäure-Nadeln eingeschlossen sind, die Synthese von Kieselsäure und organisch modifizierten Silsesquioxanen aus den entsprechenden Siliciummethoxiden bei neutralem pH-Wert und niedriger Temperatur katalysieren können.^[2, 3] Wenn man die Proteine, die wir „Silicateine“ nannten (*Silicatproteine*), zu einem makroskopischen Filament zusammenfügt (2 mm \times ca. 2 μ m Durchmesser), können sie als Gerüste dienen, die die Synthese von Polysiloxanen an der Oberfläche der Faser räumlich steuern. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß der biochemische Mechanismus der Silicatein-vermittelten Katalyse der Polysiloxan-Synthese ein nützliches Modell für neue Synthesewege zu Polymeren und Materialien auf Siliciumbasis unter umweltschonenden Bedingungen sein könnte.

Bei Silicatein α , der wesentlichen Untereinheit, die etwa 70 % der Masse der Silicateinfilamente ausmacht, besteht eine deutliche, zuvor unerwartete strukturelle Übereinstimmung mit dem bekannten hydrolytischen Enzym Cathepsin L (einer Protease), was auf einen möglichen Mechanismus für seine Katalyse der Polysiloxan-Synthese hinweist.^[2, 3] Die anderen beiden Silicatein-Untereinheiten, aus denen die Proteinfilamente zusammengesetzt sind, ähneln sich eben-

falls.^[2] Die enge Verwandtschaft zwischen Silicatein α und Cathepsin L äußert sich in der großen Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen, ihren dreidimensionalen Strukturen und dem Auftreten in denselben Zellkompartimenten. Da die Geschwindigkeit der Kondensation der Siliciumalkoxide durch die Alkoxidhydrolyse (in der Regel säure- oder basenkatalysiert) begrenzt wird,^[4] schlugen wir vor, daß Silicatein α diese Reaktion bei neutralem pH-Wert durch die Aktivität der Serin- und Histidin-Seitenketten katalysiert, die entsprechende Positionen besetzen wie die katalytisch aktiven und funktional verwandten Seitenketten in proteolytischen Enzymen sowohl vom Cathepsin-L-Typ (Cystein-Histidin) als auch vom Trypsin/Chymotrypsin (Serin/Histidin)-Typ.^[3] Der Vorschlag für den Katalysemechanismus (Schema 1), in dem die Seitenketten von Serin-26 und Histidin-165, das mutmaßliche aktive Zentrum, über die substratbindende Falte hinweg wechselwirken und einen allgemeinen Säure/



Schema 1. Schlüsselrolle der Hydroxygruppe von Serin-26 und der Imidazolyl-Seitenkette von Histidin-165 beim vorgeschlagenen Mechanismus der Silicatein-vermittelten Katalyse. Für die Katalyse des umsatzbestimmenden Schritts der Alkoxysilan-Polykondensation bei neutralem pH-Wert wird ein Mechanismus vorgeschlagen, der dem der Hydrolyse von Peptidbindungen durch eine homologe Protease analog ist.^[3] Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hydroxymethyl- und Imidazolyl-Seitenketten von Serin-26 und Histidin-165 steigern die Nucleophilie des Serin-Sauerstoffatoms. Es wird vorgeschlagen, daß ein Angriff auf das Silicium-Atom des Tetraethoxysilans ein vorübergehendes Protein-Substrat-Intermediat bildet, das möglicherweise durch eine Donorbindung vom Imidazol-Stickstoffatom als pentavalente Siliciumverbindung stabilisiert wird. Die Hydrolyse dieses Intermediats setzt das Silanol-Produkt frei und erzeugt das Serin-Histidin-Paar.

Base-Katalysator bilden, beruht auf der großen strukturellen Übereinstimmung des Silicateins und der entsprechenden Proteasen, auf dem bekannten Mechanismus der Peptidhydrolyse durch die entsprechenden Seitenketten der proteolytischen Enzyme (die ebenfalls als Säure/Base-Katalysatoren wirken)^[5] und der Notwendigkeit, daß die Silicium-Alkoxid-Hydrolyse die Polysiloxan-Kondensation initiiert. Wir stellen

[*] Prof. D. E. Morse

Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology and Marine Biotechnology Center
University of California
Santa Barbara, CA 93106-9610 (USA)
Fax: (+1) 805-89-8062
E-mail: d_morse@lifesci.ucsb.edu

Dr. Y. Zhou, Dr. K. Shimizu
Marine Biotechnology Center
University of California, Santa Barbara (USA)

J. N. Cha
Department of Chemistry
University of California, Santa Barbara (USA)

Prof. G. D. Stucky
Departments of Chemistry and Materials
University of California, Santa Barbara (USA)

[**] Wir danken M. Brzezinski und B. Chmelka für hilfreiche Vorschläge. Diese Arbeit wurde unterstützt durch das U.S. Office of Naval Research, die U.S. Army Research Office Multidisciplinary University Research Initiative, das U.S. Dept. of Commerce/NOAA California Sea Grant Program, durch MRSEC-Mittel der U.S. National Science Foundation an das UCSB Materials Research Laboratory und durch eine großzügige Spende der Dow Corning Corporation.

hier den direkten experimentellen Beweis für die vorgeschlagene Rolle der spezifischen Serin- und Histidin-Seitenketten bei der Katalyse der Polysiloxan-Synthese durch Silicatein α vor.

Wir stellten strukturelle Varianten von Silicatein α her, in denen a) der Serin-Rest (mit einer Hydroxymethyl-Seitenkette) in Position 26 und b) der Histidin-Rest (mit einer Imidazolyl-Seitenkette) in Position 165 spezifisch durch einen Alanin-Rest (mit einer Methyl-Seitenkette) ersetzt wurden. Diese Varianten wurden nach der als ortsspezifische Mutagenese bekannten Methode modifiziert, bei der die klonierte rekombinante RNA, die Silicatein α kodiert, ortsspezifisch in vitro hergestellt und die mutierten DNAs dann als Template zum Steuern der Synthese des entsprechenden Proteins in Bakterien genutzt wurden. Der quantitative Vergleich der katalytischen Aktivitäten der daraus resultierenden substituierten Proteine mit der Aktivität des ursprünglichen Proteins stützt die These, daß sowohl Serin-26 als auch Histidin-165 von Silicatein α zur effizienten Katalyse der Kieselsäure-Synthese aus Siliciumtetraoxid bei neutralem pH-Wert benötigt werden (Abbildung 1). Weitere Daten aus diesen Experi-

menten belegen, daß Silicatein α unter den angewendeten Bedingungen die Kieselsäure-Synthese spezifisch katalysiert. Darum erniedrigt die thermische Denaturierung deutlich die Aktivität von Silicatein α (wobei nur eine spezifische katalytische Restaktivität von $6.3 \pm 1.4\%$ zurückbleibt), was beweist, daß die effektive katalytische Aktivität von der genauen dreidimensionalen Konformation des natürlichen Proteins abhängt. Außerdem hatte das Maltose-bindende Protein, dessen Gen als „Träger“ für das Silicatein- α -Gen bei der Klonierung und Proteinexpression verwendet worden war (siehe *Experimentelles*), nach der Reinigung vom Fusionsprotein eine signifikante Katalyseaktivität für die Kieselsäure-Synthese aus dem Alkoxid unter den verwendeten Bedingungen ($5.4 \pm 1.6\%$ spezifische Katalyseaktivität relativ zu der von nativem Silicatein α). Die katalytische Aktivität der mutierten Proteine ist um eine Zehnerpotenz auf einen Restwert erniedrigt, der geringfügig über dem des durch Hitze denaturierten Proteins liegt (Abbildung 1). In ähnlicher Weise führte bei Proteasen, die erwiesenermaßen bei der Säure/Base-Katalyse von den Serin- und Histidin-Einheiten abhängen, der Ersatz dieser Seitenketten am aktiven Zentrum durch ortsspezifische Mutagenese zu Restaktivitäten, die höher als bei den entsprechenden Kontrollverbindungen waren.^[6] Wie schon für die Proteasen gezeigt werden konnte, weist dies darauf hin, daß die katalytische Effizienz von der synergetischen Wechselwirkung zwischen den Seitenketten am aktiven Zentrum (und einer Asparagin-Seitenkette, die wir nicht verändert haben)^[6,7] abhängt und daß keine Substitution allein ausreicht, um alle Spuren von Aktivität zu beseitigen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die Hydroxy- und Imidazolyl-Seitenketten von Serin-26 und Histidin-165, die bei der Struktur von Silicatein α als dessen mutmaßliches aktives Zentrum identifiziert wurden, für die effektive und spezifische Katalyse der Alkoxysilan-Polykondensation des Proteins bei neutralem pH-Wert notwendig sind. Diese Beobachtungen und die weitere Ermittlung der strukturellen Determinanten zur Kontrolle des Polymerisationsproduktes durch das Silicatein-Molekül könnten sich als nützlich für das Design synthetischer Katalysatoren für umweltverträgliche Wege zur Synthese von Kieselsäure und organisch modifizierten Polysilsesquioxanen erweisen.

Experimentelles

Es wurden ausschließlich molekulargenetische Standardmethoden verwendet.^[8,9] Die DNA-Kodierung für das Silicatein- α -Protein wurde durch selektive enzymatische Replikation aus dem ursprünglichen Klonierungsvektor erhalten^[2] und in eine rekombinante bakterielle Plasmid-DNA integriert, wodurch ein Fusionsprotein entstand, in dem das Silicatein- α -Protein mit MBP (Maltose-bindendes Protein) verknüpft ist. Nach der Verifizierung der Sequenz des Fusionsproteins und der Fähigkeit der rekombinanten DNA, die Synthese großer Mengen des Fusionsproteins in Zellen des Bakteriums *Escherichia coli* zu steuern, wurden Varianten des Proteins durch ortsspezifische Mutagenese^[10] produziert, die veränderte Silicateine ergaben, in denen Serin-26 und das Histidin-165 spezifisch durch Alanin ersetzt wurden (Abbildung 1). Dieser spezifische Austausch gelang durch: a) die Synthese von Oligonucleotiden, die exakt mit der Sequenz in Nachbarschaft zu den zu ersetzenden Positionen übereinstimmen und die Alanin-kodierende Oligonucleotide anstelle der Sequenz für Serin oder Histidin enthielten; b) die molekulare Hybridisierung zwischen den Ersatz-Oligonucleotiden und der komplementären einsträn-

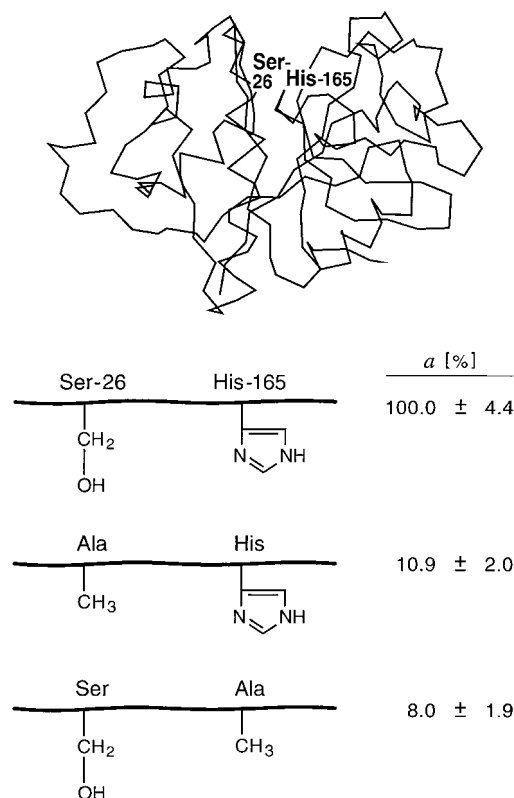


Abbildung 1. Relative spezifische Katalyseaktivitäten (a) des ursprünglichen und des substituierten Silicatein- α -Proteins. Oben ist die Topologie des Proteins abgebildet, basierend auf der dreidimensionalen Struktur der weitgehend homologen Protease Cathepsin L und in der Beweglichkeit durch drei intramolekulare Disulfidbrücken eingeschränkt, die in beiden Proteinen die gleichen Positionen einnehmen. Bemerkenswert ist die räumliche Nähe von Serin-26 und Histidin-165 über die Substrat-bindende Falte hinweg. Die drei Linien unten illustrieren schematisch die Protein-Rückgrate des ursprünglichen Proteins und der beiden Varianten, die durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt wurden, um die Seitenketten von Serin-26 (Ser-26) und Histidin-165 (His-165) durch die Methyl-Seitenkette des Alanin-Rests (Ala) zu ersetzen. Zur Bestimmung der relativen spezifischen Katalyseaktivitäten siehe *Experimentelles*.

gigen DNA des Fusionsprotein-Plasmids; c) die enzymatische In-vitro-Replikation des resultierenden doppelsträngigen Intermediats, wobei sowohl das mutierte als auch das native Gen des Fusionsproteins produziert wurden; und d) die Isolierung der mutierten DNA mit ersetzter Sequenz und Bestimmung seiner Identität und Struktur durch die direkte DNA-Sequenzanalyse. Die beiden mutierten DNAs und die ursprüngliche native DNA wurden dann separat in parallel gezüchtete Bakterienkulturen eingeführt, um durch Überexpression die natürlichen bzw. mutierten Silicatein-Proteine, die durch die rekombinanten DNAs kodiert sind, herzustellen. Kontrollversuche bestätigten, daß ohne die rekombinante DNA von den Bakterien kein Silicatein produziert wird (d.h. keine Kieselsäure-polymerisierende Aktivität hervorgerufen wird). Nach Lyse der Bakterien werden die Silicatein-MBP-Fusionsproteine durch Maltose-Affinitätschromatographie gereinigt;^[11] die Silicatein-Proteine wurden durch ortsspezifische Spaltung mit einem hochgradig gereinigten proteolytischen Enzym vom Träger MBP entfernt und die freien Silicateine und MBP einzeln mit konventionellen Methoden gereinigt. Durch Dialyse (bei 2 °C) aus gepuffertem Guanidinium-Hydrochlorid und Sulfanylethanol zur korrekten Faltung und Bildung intramolekularer Disulfidbrücken wurden die gereinigten Silicateine dann in ihre native Form gebracht. Die rekonstituierten Proteine wurden dann sofort auf die äquivalenten Proteinkonzentrationen eingestellt und dreifach unter den zuvor beschriebenen Bedingungen auf ihre Katalyse der Kieselsäure-Synthese aus Tetraethoxysilan bei neutralem pH-Wert (1 h, 20 °C) geprüft.^[3] Das Kieselsäure-Produkt wurde durch Zentrifugieren gewaschen, durch Verdampfen getrocknet und nach der alkalischen Hydrolyse colorimetrisch mit dem Molybdatreagens quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse werden als relative spezifische Aktivitäten der Alkoxysilan-Polykondensation nach Korrektur der Ausbeute für die nicht-katalysierte Reaktion ausgedrückt. Unter diesen Bedingungen betrug die durchschnittliche spezifische Aktivität des natürlichen rekonstituierten Silicatein- α -Proteins 140.0 ± 6.2 nmol Kieselsäure, die pro Stunde und pro 60 μ g Protein synthetisiert wurde; der in Abwesenheit von Proteinen erhaltene Kontrollwert war 6.7 ± 2.1 nmol synthetisierte Kieselsäure pro Stunde.

Eingegangen am 18. September 1998 [Z12429]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 780–782

Stichwörter: Enzymkatalyse • Kieselsäure • Polymerisationen • Polysiloxane • Proteine

- [1] T. L. Simpson, B. E. Volcani, *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*, Springer, New York, **1981**.
- [2] K. Shimizu, J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6234–6238.
- [3] J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 361–365.
- [4] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*, Wiley, New York, **1979**, S. 98–99.
- [5] A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Worth, New York, **1993**, S. 223–227.
- [6] P. Carter, J. A. Wells, *Nature* **1988**, 332, 564–568.
- [7] G. Dodson, A. Wlodawer, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 347–352.
- [8] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, **1987**.
- [9] D. E. Bollag, S. J. Edelstein, *Protein Methods*, Wiley-Liss, New York, **1991**.
- [10] W. P. Deng, J. A. Nickoloff, *Anal. Biochem.* **1992**, 200, 81–88.
- [11] „Recombinant Protein Protocols: Detection and Isolation“: P. Riggs in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 63 (Hrsg.: R. S. Tuan), Humana, Totowa, NJ, **1997**, S. 85–101.

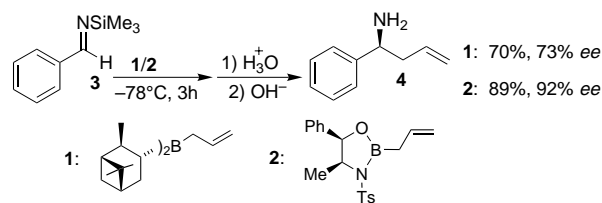
Wasser als kritische Größe in der asymmetrischen Allylborierung von *N*-Trimethylsilylbenzalminen mit *B*-Allyldiisopinocampheylboran

Guang-Ming Chen, P. Veeraraghavan Ramachandran und Herbert C. Brown*

Professor Heinrich Nöth zum 70. Geburtstag gewidmet

Von den Methoden zur asymmetrischen Synthese unter Verwendung von α -Pinen,^[1] die wir in den letzten zehn Jahren entwickelt haben, wurde die Allylborierung von Aldehyden mit *B*-Allyldiisopinocampheylboran (D-Ipc₂BAlI) **1**^[2] in vielen Synthesen als Schlüsselschritt eingesetzt.^[3] Vor kurzem haben wir über eine effiziente Synthese *C*₂-symmetrischer Diole berichtet, bei der Dicarboxaldehyde mit **1** allylboriert werden und die mit sehr hoher Diastereo- (*de*) und Enantioselektivität (*ee*) abläuft.^[4]

Die allylische Borierung von Aldiminen wurde demgegenüber bisher nur selten beschrieben, was wahrscheinlich an der Instabilität solcher Imine sowie an der geringen Reaktivität der stabileren *N*-substituierten Imine liegt.^[5] Itsuno et al. berichteten über die asymmetrische Allylborierung von *N*-geschützten Benzalminen (Schema 1), bei der eine Viel-



Schema 1. Asymmetrische Allylborierung von **3** mit **1** oder **2**.

zahl allylborierender Reagentien einschließlich **1** verwendet wurden.^[6] Sie kamen zu dem Ergebnis, daß *N*-Trimethylsilylaldimin die reaktivste Verbindung für diese Allylborierungen ist. Die Reaktion kann bei -78°C durchgeführt werden und liefert mit dem Norephedrin-Derivat **2** als chiraalem Auxiliar die entsprechenden Homoallylamine mit bis zu 92% *ee*. Villieras et al. haben Itsunos Methode zur Allylborierung von *N*-Trimethylsilylaldimin mit einem 2-Ethoxycarbonyl-substituierten Allylboronat verwendet.^[7]

Wie wir bereits beschrieben haben, verläuft die Allylborierung von Aldehyden mit **1** bei -78°C außerordentlich schnell und ist selbst bei -100°C immer noch recht rasch.^[8] Es schien uns wünschenswert, ähnliche Angaben über die Allylborierung von Iminen, besonders von Trimethylsilylaldimin, zu erhalten, die laut Itsuno sehr leicht verlaufen sollte. So haben wir *N*-Trimethylsilylbenzalimin **3** und **1** in THF bei -78°C zusammengegeben und die Reaktionsgeschwindigkeit ¹¹B-NMR-spektroskopisch verfolgt. Zu unserer großen Über-

[*] Prof. H. C. Brown, Dr. G.-M. Chen, Prof. P. V. Ramachandran
H. C. Brown and R. B. Wetherill Laboratories of Chemistry
Purdue University
West Lafayette, IN 47907-1393 (USA)
Fax: (+1) 765-494-0239
E-mail: hcbrown@chem.purdue.edu