

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.

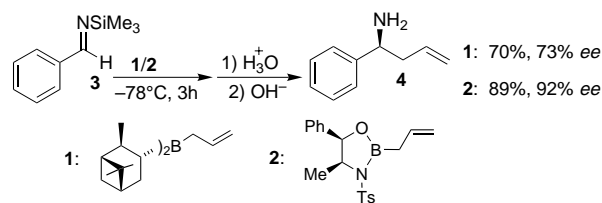
Wasser als kritische Größe in der asymmetrischen Allylborierung von *N*-Trimethylsilylbenzalminen mit *B*-Allyldiisopinocampheylboran

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-Ipc₂BAl) **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**.

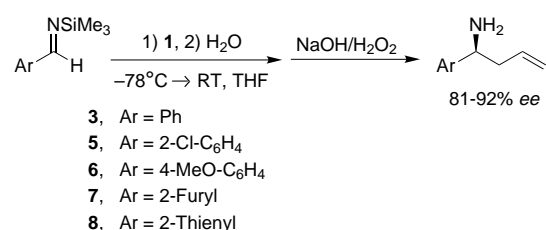
zahl allylborierender Reagentien einschließlich **1** verwendet wurden.^[6] Sie kamen zu dem Ergebnis, daß *N*-Trimethylsilylaldimin die reaktivste Verbindung für diese Allylborierungen ist. Die Reaktion kann bei –78 °C durchgeführt werden und liefert mit dem Norephedrin-Derivat **2** als chiraalem Auxiliar 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

raschung konnten wir keinerlei Reaktion beobachten – weder nach einigen Stunden noch nach einer Woche bei Raumtemperatur! Dieser Befund widerspricht offensichtlich der beschriebenen Reaktionszeit von 3 h bei -78°C im Falle von **1**.^[6] Auch das ^1H -NMR-Spektrum stützt diese Beobachtung: Es werden lediglich die nicht umgesetzten Ausgangsverbindungen detektiert. Interessanterweise führte die wäßrige Aufarbeitung des Reaktionsgemisches zu einer stark exothermen Reaktion, die das Amin-Produkt in 95% Ausbeute lieferte. Offensichtlich läuft die Reaktion während der wäßrigen Aufarbeitung ab, bei der möglicherweise durch die Wasserzugabe das Aldimin-Zwischenprodukt aus dem *N*-Trimethylsilylaldimin-Derivat rasch freigesetzt wird, woraufhin das Aldimin schnell mit **1** abreagiert.

Wir wiederholten die Reaktion durch tropfenweise Zugabe von einem Moläquivalent Wasser in THF zur Lösung von **3** und **1** bei -78°C (Tabelle 1). Tatsächlich erhielten wir als Produkt das Amin **4** mit 92% *ee* und in 90% Ausbeute (Schema 2). Dies ist erheblich besser als die bisher erzielte



Schema 2. Asymmetrische Allylboration von **3** sowie **5–8** mit **1**.

Ausbeute von 70% bei 73% *ee*.^[6] Eine Absenkung der Reaktionstemperatur auf -100°C verbesserte die chirale Induktion auf 94% *ee*. Möglicherweise hat bei Itsuno die exotherme Reaktion während der wäßrigen Aufarbeitung die Reaktionstemperatur schnell ansteigen lassen, was eine geringere Enantioselektivität zur Folge hatte.

Danach untersuchten wir die Allylborationen von 2-Chlor- (**5**) und 4-Methoxybenzalimin (**6**), die wir nicht wie beschrieben mit 46 bzw. 52% *ee*^[6] erhielten, sondern mit 82 bzw. 92% *ee* (Tabelle 1). Des weiteren lieferte die Reaktion von **1** mit 2-Furfuraldimin **7** und mit 2-Thiophenaldimin **8** die entsprechenden Homoallylamine mit 86 bzw. 81% *ee*. Wir haben somit zeigen können, daß **1** in Gegenwart von einem

Tabelle 1. Asymmetrische Allylborationen einiger aromatischer Aldimine mit *D*-Ipc₂BAl.

Imin ^[a]	<i>T</i> [$^{\circ}\text{C}$]	Ausb. [%] ^[b]	Homoallylamin-Produkt		
			<i>ee</i> [%] ^[b,c]	Konfig. ^[d]	$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ (<i>c</i> , CHCl ₃)
3	-78	90 (73)	92 (73)	<i>S</i>	-43.2 (1.9)
3	-100	87	94	<i>S</i>	-44.0 (1.3)
5	-78	69 (62)	82 (46)	<i>S</i>	-71.3 (1.5)
6	-78	74 (65)	92 (52)	<i>S</i>	-34.7 (1.2)
7	-78	86	86	<i>S</i>	-30.4 (1.5)
8	-78	72	81	<i>S</i>	-20.2 (1.5)

[a] Die *N*-Trimethylsilylaldimine wurden in 75–87% Ausbeute nach Lit. [9] hergestellt. [b] Die Angaben in Klammern stammen aus Lit. [6]. [c] Bestimmt durch HPLC-Analyse der Amin-Produkte auf einer Chiralcel-OD-H-Säule, Laufmittel: Hexan/*i*PrOH/Et₂NH (95/5/0.05). [d] Bestimmt durch Vergleich mit Literaturdrehwerten^[10] oder durch Analogie.

Moläquivalent H₂O ein erstklassiges Reagens für die Allylboration von Aldiminen ist.

N-Trimethylsilylimine weisen also keine Reaktivität gegenüber **1** auf. Allerdings deuten unsere Befunde darauf hin, daß durch Zugabe von einem Moläquivalent Wasser aus *N*-Trimethylsilyliminen in situ reaktive Aldimine kontrolliert hergestellt werden können, die dann vom Allylborationreagens abgefangen werden. Wir glauben, daß diese Beobachtung für die Imin-Chemie von Bedeutung ist und verbreitet Anwendung in der organischen Synthese finden und so die Anwendungsbreite der Allylboration erheblich erweitern wird.

Experimentelles

Repräsentative Vorschrift: die asymmetrische Allylboration von **3** mit **1**. Alle Operationen wurden unter Stickstoff durchgeführt: Zu einer gerührten Lösung von **3** (0.89 g, 5.0 mmol) und **1** (1.79 g, 5.5 mmol) in THF (5 mL) bei -78°C wurde tropfenweise eine Lösung von H₂O (0.100 g, 5.5 mmol) in THF (0.50 mL) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 0.5 h gerührt, auf Raumtemperatur erwärmt und mit NaOH (6.0 mmol), H₂O₂ (12 mmol) und Diethylether (20 mL) aufgearbeitet. Das Produkt wurde mit 3*N* HCl (3 × 10 mL) extrahiert. Die vereinigten wäßrigen Phasen wurden mit Diethylether gewaschen (2 × 10 mL), mit Na₂CO₃ neutralisiert und mit Diethylether extrahiert (3 × 10 mL). Die organische Phase wurde mit wäßriger Kochsalzlösung (2 × 10 mL) gewaschen und über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet. Abziehen des Lösungsmittels führte zum Rohprodukt, aus dem säulenchromatographisch (Hexan/*i*PrOH/Et₂NH 80/20/0.5) das Produkt 1-Phenyl-3-butenamin als farblose Flüssigkeit (0.66 g, 90%) erhalten wurde. Die HPLC-Analyse desamins auf einer Chiralcel-OD-H-Säule ergab, daß es sich um das (*S*)-Isomer handelt (92% *ee*); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -43.2^{\circ}$ (*c* = 1.9 in CHCl₃) ($[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -42.6^{\circ}$ (*c* = 0.5 in CH₂Cl₂)^[10a]).

Eingegangen am 19. Oktober 1998 [Z12540]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 825–826

Stichwörter: Aldehyde • Asymmetrische Synthesen • Borane • Homoallylamine • Imine

- a) H. C. Brown, P. V. Ramachandran, *Advances in Asymmetric Synthesis*, Vol. 1 (Hrsg.: A. Hassner), JAI, Greenwich, CT, **1995**, Kap. 5; b) H. C. Brown, P. V. Ramachandran, *J. Organomet. Chem.* **1995**, 500, 1–19.
- H. C. Brown, P. K. Jadhav, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 2092.
- Beispiele für solche Anwendungen: a) S. D. Rychnovsky, U. R. Khire, G. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2058–2059; b) A. B. Smith, S. S.-Y. Chen, F. C. Nelson, J. M. Reichert, B. A. Salvatore, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12013–12014; c) K. C. Nicolaou, M. E. Bunnage, K. Koide, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 8402–8403.
- P. V. Ramachandran, G.-M. Chen, H. C. Brown, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2417–2420.
- a) Y. Yamamoto, W. Ito, K. Maruyama, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 1131–1132; b) Y. Yamamoto, T. Koshiaki, K. Maruyama, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 3115–3121; c) Y. Yamamoto, S. Nishi, K. Maruyama, T. Komatsu, W. Ito, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 7778–7786.
- a) K. Watanabe, K. Ito, S. Itsuno, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1531–1534; b) S. Itsuno, K. Watanabe, K. Ito, A. A. El-Shehaw, A. A. Sarhan, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 105–107; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 109–110.
- I. Chataigner, F. Zammattio, J. Lebreton, J. Villieras, *Synlett* **1998**, 275–276.
- H. C. Brown, U. S. Racherla, P. J. Pellechia, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1868–1874.
- D. J. Hart, K. Kanai, D. G. Thomas, T.-K. Yang, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 289–294.
- a) T. Basile, A. Bocoum, D. Savoia, A. Umani-Ronchi, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7766–7773; b) S. Liu, A. Mi, L. Wu, Y. Jiang, *Synth. Commun.* **1993**, 23, 2485–2488.