

- [11] Y. Rubin, P. S. Ganapathi, A. Franz, Y.-Z. An, W. Qian, R. Neier, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, Heft 11.
- [12] a) W. Oppolzer, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 10–24; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 10–23; b) G. Brieger, J. N. Bennett, *Chem. Rev.* **1980**, 80, 63–97; c) A. G. Fallis, *Can. J. Chem.* **1984**, 62, 183–234; d) D. Craig, *Chem. Soc. Rev.* **1987**, 16, 187–238.
- [13] Zur Chemie von 1,4-Diaminobutadienen siehe: a) R. Sustmann, K. Lücking, G. Kopp, M. Rese, *Angew. Chem.* **1989**, 101, 1701–1704; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, 28, 1713–1715; b) D. H. R. Barton, C. C. Dawes, G. Franceschi, M. Foglio, S. V. Ley, P. D. Magnus, W. L. Mitchell, A. Temperelli, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 643–647; c) R. R. Schmidt, A. Wagner, *Synthesis* **1981**, 273–275.
- [14] Reaktion mit Triplett-O₂ während der Aufarbeitung kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Jedoch wird Singulett-Sauerstoff in nahezu quantitativer Ausbeute durch Anregung der meisten Fullerenderivate durch sichtbares Licht erzeugt: J. L. Anderson, Y. Z. An, Y. Rubin, C. S. Foote, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9763–9764; Lit. [5c].
- [15] a) C. S. Foote, S. Wexler, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 3879–3880; b) C. S. Foote, S. Wexler, W. Ando, R. Higgins, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 975–981; c) T. Sato, I. Moritani, M. Matsuyama, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 5113–5116; d) Y. Nakaraido, T. Nomura, S. Kanouchi, R. Sato, C. Kabuto, H. Sakurai, *Chem. Lett.* **1983**, 209–212; e) G. Rio, J. Berthelot, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1970**, 1509–1511; f) G. Rio, J. Berthelot, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 2938–2942.

Selbstorganisation eines tetraedrischen Lectins zu einem vorab entworfenen, diamantähnlichen Proteinkristall**

Nir Dotan, Dorit Arad, Felix Frolov und Amihay Freeman*

Die Anwendung von chemischen Gesetzmäßigkeiten und Strukturprinzipien zum Aufbau supramolekularer ein-, zwei- und dreidimensionaler Anordnungen wurde bei der Selbstorganisation synthetischer organischer Moleküle gezeigt.^[1–8] Man ist allerdings noch weit davon entfernt, Nucleinsäuren oder Proteine, die einheitliche Molekülklassen mit größeren Strukturen und spezifischer zwischenmolekularer Erkennung wären, ausgiebig für ähnliche Zwecke zu nutzen. Verzweigte DNA-Moleküle konnten bis jetzt erfolgreich zu einem Würfel^[9] und einem Oktaederstumpf zusammengefügt werden^[10] oder bildeten durch Selbstorganisation eine zweidimensionale Anordnung.^[11] Zweidimensionale Proteinkristalle ließen sich leicht erhalten, indem Schichten aus Bakterienzelloberflächen auf einem festen Träger rekonstru-

iert wurden,^[12] zwei und drei eindeutig unidirektional ausgerichtete Proteinschichten wurden auf metallischen Oberflächen oder Liposomen angeordnet,^[13, 14] und dispezifische Antikörper hat man dazu verwendet, eine ausgerichtete Monoschicht von Bacteriorhodopsin auf einer Metalloberfläche aufzubauen.^[15]

Nach unserer Kenntnis ist dagegen eine Selbstorganisation von Proteinen zu einem vorab entworfenen, dreidimensionalen Proteingitter noch nicht beschrieben worden. Die Entwicklung von Methoden zur Bildung solcher Proteingitter birgt auch die Möglichkeit zum Aufbau von Proteingerüsten in sich, an denen andere Proteine durch Proteinfusion oder organische Moleküle durch spezifische Bindung in definierter Weise ausgerichtet werden können.

Wir stellen hier ein in seiner Struktur genau bekanntes Bindeprotein vor, das als Baustein dient, um ein solches dreidimensionale Proteingitter mit vorab entworfener Struktur durch gezielte Vernetzung zu erhalten. Über den gewählten Liganden mit zwei Bindungsstellen kann den vernetzten Proteinmolekülen eine relative Orientierung aufgezwungen werden, die zur geplanten Gitterkonfiguration führt. Diese Orientierung wird durch die räumliche Nähe der Oberflächen der vernetzten Proteinmoleküle, die eine Folge ligandenspezifischer Bindung und zwischenmolekularer Wechselwirkungen ist, beeinflusst.

Als Demonstrationsobjekt wählten wir das nahezu tetraedrische Lectin Concanavalin A (**1**, Abbildung 1 a) als Baustein. Dieses Lectin ist ein Tetramer, und seine Struktur ist genau

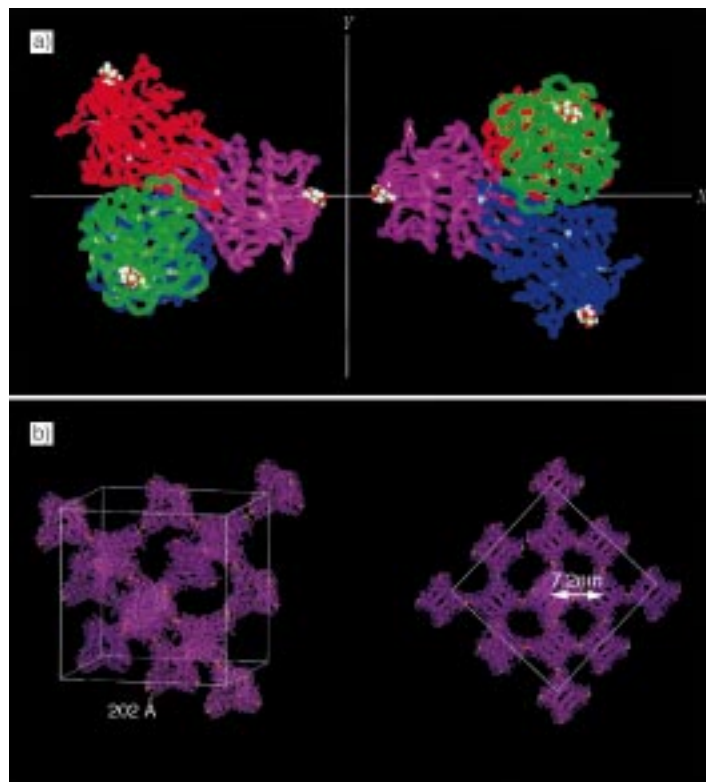


Abbildung 1. a) Modell zweier Moleküle **1**, die sich in einer gestaffelten Konformation (Diederwinkel -60°) nähern. Der Abstand zwischen den anomeren Sauerstoffatomen der gebundenen Mannose-Moleküle ist 10 Å. b) Zwei Ansichten der Elementarzelle des vorausgesagten diamantartigen supramolekularen Gitters aus Molekülen **1**, die mit **2** vernetzt wurden.

[*] Prof. A. Freeman, N. Dotan, Dr. D. Arad, Prof. F. Frolov
Department of Molecular Microbiology and Biotechnology
Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University
Tel Aviv 69978 (Israel)
Fax: (+972) 3-6409407
E-mail: amihayf@post.tau.ac.il

[**] Die Autoren danken Prof. Y. Kashman, School of Chemistry, Tel Aviv University, für die NMR/MS-Messungen und Talmon Arad, Department of Structural Biology, Weizmann Institute, für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

bekannt.^[16] Es verfügt über vier Bindungsstellen für α -D-Mannopyranosid oder α -D-Glucopyranosid, die zueinander wie um ein sp^3 -hybridisiertes C-Atom angeordnet sind. Eine Vernetzung von **1** mit einem Bismannosid, das einen Spacer enthält, der eine gestaffelte Konformation (Abbildung 1a) erzwingt, sollte zu einem diamantartigen, dreidimensionalen Proteingitter führen, wie man es im Computermodell in Abbildung 1b sieht.

Der geeignete Bismannosid-Spacer ergibt sich aus Berechnungen der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Komplexen aus **1** und Mannose, die sich auf der Linie nähern, die die beiden Schwerpunkte verbindet, als Funktion des Abstands zwischen den beiden anomeren Sauerstoffatomen der komplexierten Mannosen und den Diederwinkeln. Diese Berechnungen ergaben ein Minimum für die Wechselwirkungsenergie bei einem C_2 -Spacer mit gestaffelter Konformation (Abbildung 2, schwarzer Pfeil). Aufgrund dieser Befunde

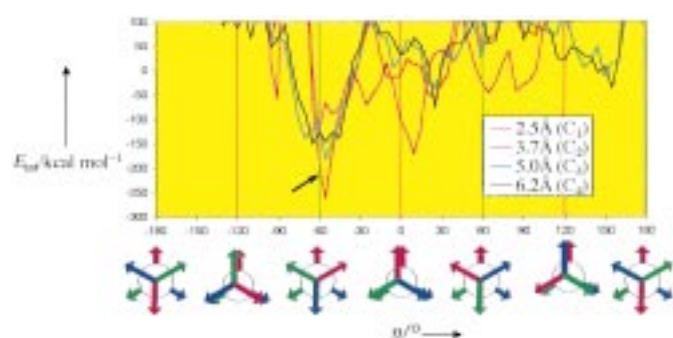
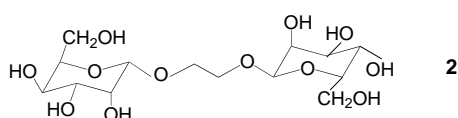


Abbildung 2. Der Einfluß von Spacerlänge und Diederwinkel auf die berechneten Wechselwirkungsenergien zwischen vernetzten Molekülen **1**. Die roten, blauen und grünen Pfeile in den Newman-Projektionen stehen für die entsprechend farblich kodierten monomeren Bausteine von **1** in Abbildung 1a.

wurde das Bismannopyranosid **2** als Bismannosid-Einheit mit einem C_2 -Spacer synthetisiert, gereinigt und charakterisiert (siehe Experimentelles).



Gibt man bei pH 7.0 zwei Moläquivalente **2** zu **1** (5 mg mL^{-1}), kommt es zu einer quantitativen Ausfällung von vernetztem **1** und einer raschen Bildung von Proteinkristallen. Die chemische Bestimmung des Bismannosidgehalts im gewaschenen Niederschlag ergab ein Molverhältnis von 2.04:1 (Mittel aus drei Versuchen), was die Arbeitshypothese stützt, daß jedes Molekül **1** über vier Moleküle **2** mit seinen Nachbarn vernetzt ist. Dies ist in Einklang mit dem diamantartigen Modell in Abbildung 1b. Der Anteil an ausgefälltem **1** hängt vom Molverhältnis **2**:**1** ab, erreicht das Optimum bei 2 und fällt oberhalb 10 ab (Abbildung 3).

Wie schnell sich der Niederschlag bildet und wie groß die Kristalle aus der Vernetzung von **1** mit **2** werden, hängt vom pH-Wert ab. Die Vernetzung geschieht am schnellsten im pH-Bereich 6.5–8.5 und läßt sich mühelos durch die Einstellung

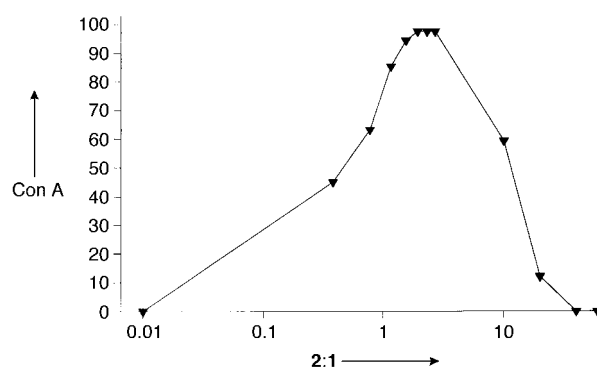


Abbildung 3. Der Einfluß des Molverhältnisses **2**:**1** auf das Ausmaß des Ausfällens von vernetztem Con A **1**. Der prozentuale Anteil an ausgefälltem **1** wurde spektrophotometrisch bestimmt (siehe Experimentelles).

niedrigerer (z. B. 3.5–4.5) oder höherer pH-Werte (z. B. 9.5) verzögern, so daß man auch die Kristallgröße von 50–100 μm bei pH 3.5 bis etwa 100 nm bei pH 7 steuern konnte. Auch durch Zugabe eines kompetitiven Liganden (α -D-Methylmannopyranosid) im Überschuß ließ sich die Geschwindigkeit der Vernetzung verringern. Die vernetzten Kristalle selbst waren stabil, auch wenn man das Medium gegen doppelt destilliertes Wasser austauschte, den pH-Wert im Bereich 4.5–8.0 änderte oder die Konzentration eines kompetitiven Liganden sehr stark erhöhte (α -D-Methylmannopyranosid bei pH 7.0 bis auf 1.5 M).

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von kristallinen Niederschlägen, die mit einem Negativkontrastmittel behandelt waren (Abbildung 4), ergaben eine hochgeordnete dreidimensionale kristalline Anordnung mit einem

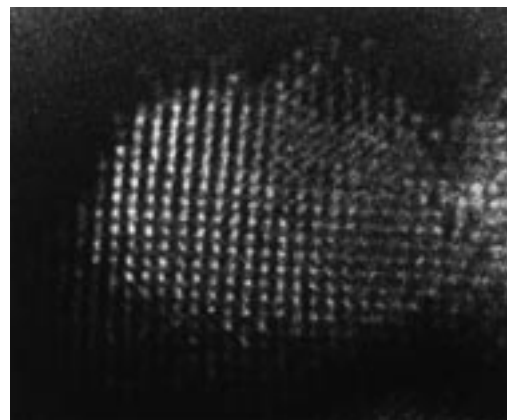


Abbildung 4. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Negativkontrastmittel behandelten Kristalls, den man aus einer Umsetzung von **1** mit **2** im Molverhältnis 1:2 erhalten hatte (336 000fache Vergrößerung).

Abstand von $(6.9 \pm 0.3) \text{ nm}$ zwischen benachbarten Molekülen **1** (Mittel aus 105 Messungen aus mehreren Aufnahmen), was mit dem berechneten Abstand von 7.2 nm für das diamantartige Modell (Abbildung 1b) gut übereinstimmt.

Röntgenbeugungsmessungen an kleinen ($0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}$) Einkristallen lieferten schwache Beugungsmuster mit einer 6-Å-Auflösung. Die Analyse der Daten ergab eine pseudokubische, orthorombische Elementarzelle (Raum-

gruppe F_{222}) mit den Abmessungen $a = 200$, $b = 204$, $c = 208$ Å (die Matrix-Tensorabweichung von der orthorhombischen Symmetrie beträgt, bevor man Symmetrie-Constraints auf die Zellparameter anwendet, etwa 0.99 %), wobei der Mittelwert von 204 Å dem Wert ähnelt, der für eine kubisch flächenzentrierte Anordnung der diamantartigen Struktur erhalten wurde (Abbildung 1b, $a = 202$ Å). Die Abweichung von der exakten kubischen Symmetrie ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Monomere in **1** keine echte Rotationsachse aufweisen.

Die Daten aus der Vernetzung, die chemische Zusammensetzung des Niederschlags und die Ergebnisse der Strukturanalyse mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Röntgenbeugung zusammengekommen zeigen, daß unser Ansatz zur Erzeugung eines Proteinkristalls mit vorab entworfener Struktur geeignet ist: Wir konnten einen diamantartigen Proteinkristall erhalten, indem wir **1** mit **2** vernetzten, und seine Struktur stimmt mit der des Simulationsmodells gut überein.

Die Vernetzung von Lectinen mit natürlichen und synthetischen Di- und Oligosacchariden zu Proteinkristallen wurde bereits für Agglutinin aus Weizenkeimen,^[17] für das Calcium-abhängige Mannose-Bindeprotein,^[18] für Galectin aus dem Herzmuskel,^[19] für Agglutinin aus Sojabohnen,^[20, 21] für Isolectine^[22, 23] und für Concanavalin A beschrieben.^[24, 25] Unseres Wissens wurden diese gesamten Daten und die Kenntnis über die Vernetzung von Lectinen mit Hilfe von natürlichen verzweigten Oligosacchariden und ihren synthetischen Analoga auf die Selbstorganisation von Lectinen als Bausteinen zu einem im voraus entworfenen Proteingitter nicht angewendet. Wir glauben, daß sich dieses gebündelte Wissen über die Synthese von Di- und Oligosacchariden zusammen mit der wachsenden Zahl an bekannten Lectinstrukturen mit unserem hier vorgestellten Ansatz verbinden läßt, um so neue, im voraus entworfene dreidimensionale Proteingitter und -gerüste gezielt herzustellen.

Experimentelles

Das Molecular Modeling und die Berechnung von Wechselwirkungsenergien wurden an einer Silicon-Graphics-IRIS-4D-Workstation ausgeführt; dazu wurden die Software Insight II 2.3.5 (Biosym Technologies, San Diego, CA, USA) und Strukturdaten aus der Protein Data Base (PDB), Datei 5CNA, verwendet. Die Wechselwirkungsenergien wurden mit Hilfe eines Insight-II-Dockingmoduls mit *cfu*-Kraftfeldparametern berechnet. Der vorgegebene pH-Wert betrug 4.5. Das C1-Sauerstoffatom der Mannose, die in Abbildung 1a an das linke Molekül **1** gebunden ist, diente als Rotationszentrum. Der Abstand zwischen den beiden anomeren Sauerstoffatomen wurde passend zur getesteten Spacerlänge vorgegeben. Die Wechselwirkungsenergie wurde dadurch berechnet, daß man das Molekül rechts im Bild in Schritten von 5° um die Achse durch die Schwerpunkte der beiden Moleküle und die anomeren Sauerstoffatome der Mannosen an den Bindungsstellen drehte. Nach einer vollen Umdrehung wurde der Abstand zwischen den beiden anomeren Sauerstoffatomen vergrößert und die Rechnung wiederholt.

Zur Synthese von **2** wurde die von Mowery^[26] beschriebene Methode modifiziert. Ethylenglycol (50 mL, Merck), α -D-Mannose (10 g, Sigma) und voräquilibriertes Dowex 50WX80-200 (5 g, Aldrich) wurden 48 h bei 65 °C unter Rühren inkubiert. Danach wurde das Kunstharz abfiltriert und das Filtrat in Aceton (500 mL) gegossen. Der auf diese Weise erhaltene Niederschlag wurde in DMSO (40 mL) aufgelöst. Nach der Zugabe von Mannose (10 g) und Dowex 50WX80-200 (5 g), das zuvor in DMSO äquilibriert worden war, wurde die Reaktionsmischung bei 65 °C 100 h

unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde das Kunstharz abfiltriert und ein Aliquot (4 mL) des Filtrats in Aceton (40 mL) gegossen. Der Niederschlag wurde in doppelt destilliertem Wasser wieder aufgelöst und durch HPLC an einer Supelcosil-LC-NH₂-Säule (250 × 10 mm, 5 µm) mit Acetonitril/Wasser als mobiler Phase gereinigt (75/25, erster Lauf; 83/17, zweiter Lauf). Das gereinigte Produkt erhielt man durch Lyophilisierung. ¹H-NMR (500 MHz, [D₆]DMSO): $\delta = 4.70$ (t, $J = 6$ Hz, 2H), 4.57 (d, $J = 7$ Hz, 1H), 4.45 (t, $J = 6$ Hz, 1H), 3.69 (br d, $J = 6$ Hz, 2H), 3.63 (ddd, $J = 10$, 4, 2 Hz, 1H), 3.60 (br d, 1H), 3.53 (br d, $J = 6$ Hz, 2H), 3.40 (4H); FAB-MS: m/z (%) ber.: 386; gef.: 409 (386+Na⁺, 25), 387 (386+H⁺, 28), 329 (29), 225 (386 – 163+2H, 50), 177 (C₆H₉O₆, 74), 163 (C₆H₁₁O₅, 100).

Vernetzung: Der prozentuale Anteil an **1** (Sigma), der durch Vernetzung mit **2** ausgefällt wird, wurde spektrophotometrisch (280 nm) bestimmt, nachdem eine Lösung von **1** (5 mg mL⁻¹) in 0.1 M HEPES bei pH 7.0 mit 0.15 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ und 0.008 % NaN₃ 24 h bei 4 °C inkubiert worden war. Der Kristall für die röntgenographische Untersuchung wurde mit der Schwebetropfentechnik erhalten. Hierzu wurde **1** (5.2 mg mL⁻¹) in 0.01 M MES, pH 6.0, das 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ und 0.1 M NaCl (4 µL) enthielt, mit 0.045 M Citrat (5 µL), pH 3.5, das 4.5 % (w/v) PEG 3300 und 0.2 % NaN₃ enthielt (eine Lösung gleicher Zusammensetzung diente als Vorratsquelle (700 µL)), und **2** (0.08 mg mL⁻¹, 2 µL, der pH-Wert des Tropfens war schließlich 4.5) gemischt und eine Woche bei 20 °C inkubiert. Kleinere Kristalle des vernetzten Proteins für elektronenmikroskopische Aufnahmen wurden auf ähnliche Weise durch Zugabe von 4 µL einer wäßrigen Lösung von **2** (0.1 mg mL⁻¹) zu 100 µL einer Lösung von **1** (0.5 mg mL⁻¹) in 0.05 M HEPES, pH 7.0, das 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂ und 0.1 M NaCl enthielt, nach 24 h Inkubation bei 4 °C erhalten.

Zur chemischen Analyse wurden die Kristalle in 30 mM HCl, pH 1.5, gelöst und der Anteil an **1** spektrophotometrisch bestimmt. Ein Teil der Lösung wurde sofort mit dem neunfachen Volumen Acetonitril gemischt und das ausgefallene Protein abzentrifugiert. Der in der Lösung verbliebene Anteil an **2** wurde durch HPLC bestimmt.

Elektronenmikroskopie: Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 4 stammt von einer Probe, die auf ein frisch entladenes, mit Kohlenstoff beschichtetes Parlodion-Gitter (300 mesh) aufgebracht wurde; Kontrastmittel 1 % Phosphorwolframat bei pH 7; Messung bei 100 kV mit einem Philips-CM-12-Elektronenmikroskop.

Röntgenstrukturanalyse: Es wurde der Flächendetektor Rigaku-Raxis-II mit hochauflösenden Bildplatten (zur Auswertung mit einer blauen Lumineszenz) und mit einer rotierenden Rigaku-FRC-Anode und fokussierenden Spiegeln verwendet. Wegen der geringen Beugungsstärke der Kristalle wurde eine Kombination aus einem Röntgenstrahlgenerator mit hoher Intensität und fokussierenden Spiegeln eingesetzt. Die Detektorparameter und der genaue Abstand zwischen Kristall und Detektor wurden kurz vor Beginn der Messung mit Hilfe eines homogenen Kristalls von **1** bestimmt, der sehr gut orthorhombisch war. Alle Beugungsmessungen wurden an mit einem Oxford-Cryostream-Gerät gekühlten Proben ausgeführt. Die Kristalle wurden in Schleifen eines einzelnen Nylonfadens montiert, der selbst die Röntgen-Strahlen nicht beugte. Ein Kohlenwasserstofföl wurde als Kälteschutz verwendet. Beugungsbilder bei kleinen Oszillationswinkeln (0.5°) wurden von mehreren Kristallen aufgenommen, die in der größten der drei Abmessungen ungefähr 0.1 mm lang waren; die Aufnahmen dauerten jeweils eine Stunde an verschiedenen Stellen des reziproken Raums. Die Aufnahmen wurden mit dem HKL-Paket der Programme zur Bearbeitung von Beugungsmustern indiziert.^[27]

Eingegangen am 8. Dezember 1998,
veränderte Fassung am 23. April 1999 [Z12757]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2363–2366

Stichwörter: Kristall-Engineering • Lectine • Molecular Modeling • Proteine • Supramolekulare Chemie

- [1] *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 9 (Hrsg.: J.-M. Lehn), Pergamon, Oxford, **1996**.
- [2] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, 254, 1312–1319.
- [3] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, G. R. Baker, R. K. Behera, G. H. Escamilla, M. J. Saunders, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 901–903; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 917–919.

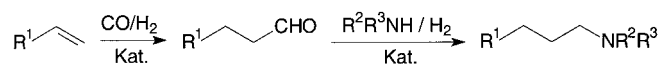
- [4] N. Kimizuka, T. Kawasaki, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4387–4388.
- [5] R. Kramer, J.-M. Lehn, A. deCian, J. Fischer, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 764–766; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 703–705.
- [6] S. I. Stupp, S. Son, H. C. Lin, L. S. Li, *Science* **1993**, *259*, 59–63.
- [7] S. I. Stupp, V. LeBonheur, K. Walker, L. S. Li, K. E. Huggins, M. Kesser, A. Amstutz, *Science* **1997**, *276*, 384–389.
- [8] M. Fujita, S. Y. Yu, T. Kusakawa, H. Funaki, K. Ogura, K. Yamaguchi, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2192–2196; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2082–2085.
- [9] K. Chen, N. C. Seeman, *Nature* **1991**, *350*, 631–633.
- [10] Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1661–1669.
- [11] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, N. C. Seeman, *Nature* **1998**, *394*, 539–544.
- [12] C. Weiner, M. Sara, U. B. Sleytr, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43*, 321–330.
- [13] M. Ahlers, W. Müller, A. Reichert, H. Ringsdorf, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1310–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 1269–1285.
- [14] W. Müller, H. Ringsdorf, E. Rump, G. Wildburg, X. Zhang, L. Angermaier, W. Knoll, M. Liley, J. Spinke, *Science* **1993**, *262*, 1706–1708.
- [15] K. Koyama, N. Yamaguchi, T. Miyasaka, *Science* **1994**, *265*, 762–765.
- [16] I. J. Goldstein, R. P. Poretz in *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (Hrsg.: I. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein), Oxford University Press, Oxford, **1986**, S. 33–247.
- [17] C. S. Wright, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14345–14352.
- [18] W. I. Weis, K. Drickamer, W. A. Hendrickson, *Nature* **1992**, *360*, 127–133.
- [19] Y. Bourne, B. Bolgiano, D. I. Liao, G. Strecker, P. Cantau, O. Herzberg, T. Feizi, C. Cambillau, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 863–870.
- [20] A. Dessen, D. Gupta, S. Sabesan, C. F. Brewer, J. C. Sacchettini, *Biochemistry* **1995**, *34*, 4933–4942.
- [21] D. Gupta, L. Bhattacharyya, J. Fant, F. Macaluso, S. Sabesan, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5614–5622, zit. Lit.
- [22] L. Bhattacharyya, M. I. Khan, J. Fant, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 11543–11545, zit. Lit.
- [23] L. Bhattacharyya, J. Fant, H. Lonn, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7523–7530.
- [24] L. Bhattacharyya, M. I. Khan, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1988**, *27*, 8762–8767.
- [25] D. K. Mandal, C. F. Brewer, *Biochemistry* **1992**, *31*, 12602–12609.
- [26] D. F. Mowery in *Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. II* (Hrsg.: R. I. Whistler, M. I. Wolfrom), Academic Press, New York, **1963**, S. 328–331.
- [27] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.* **1996**, *276*, 307–326.

Erste effiziente Hydroaminomethylierung mit Ammoniak: mit dualen Metallkatalysatoren und Zweiphasenkatalyse zu primären Aminen**

Burkhard Zimmermann, Jürgen Herwig* und Matthias Beller*

Herrn Professor Rüdiger Selke zum 65. Geburtstag gewidmet

Aliphatische Amine gehören zu den wichtigsten Grund- und Feinchemikalien der chemischen und pharmazeutischen Industrie.^[1] Zu den atomökonomisch effizienten und synthetisch elegantesten Synthesen dieser Verbindungsklasse zählt neben der Hydroaminierung^[2] auch die Hydroaminomethylierung von Olefinen zu Aminen. Bei der Hydroaminomethylierung wird in einer Dominoreaktion eine Reaktionssequenz von Hydroformylierung des Olefins zum Aldehyd mit anschließender reduktiver Aminierung durchlaufen (Schema 1).^[3] Trotz der Vorteile der Hydroaminomethylierung, z. B. Verfügbarkeit der Edukte und Atomeffizienz, sind



Schema 1. Hydroaminomethylierung von Olefinen (R¹–R³=H, Alkyl).

vergleichsweise wenige präparative Anwendungen bekannt. Erst in jüngster Zeit konnten insbesondere Eilbracht und Mitarbeiter das Synthesepotential der Hydroaminomethylierung aufzeigen.^[4] Als Aminkomponente wurden fast ausschließlich primäre sowie sekundäre Amine verwendet. Die Synthese der technisch bedeutenderen primären Amine aus Ammoniak und Olefinen ist nur von Knifton et al. untersucht worden,^[5] wobei mit einem Cobalt-System Selektivitäten von nur 32 % bezüglich des gewünschten primärenamins (bezogen auf 85 % Umsatz) bei außerordentlich geringen Aktivitäten (TOF = 9 h^{–1}) und drastischen Reaktionsbedingungen (200 °C, 140 bar) erhalten wurden. Die bis dato ungelösten Probleme der Hydroaminomethylierung mit Ammoniak sind die unzureichende *n*/*iso*-Selektivität des Hydroformylierungsschrittes und zahlreiche Nebenreaktionen. Neben der Isomerisierung und der Hydrierung der Olefine

[*] Dr. J. Herwig
Celanese GmbH – Werk Ruhrchemie
D-46128 Oberhausen
Prof. Dr. M. Beller
Institut für Organische Katalyseforschung
an der Universität Rostock e.V.
Buchbinderstraße 5–6, D-18055 Rostock
Fax: (+49) 381-466-9324
E-mail: Matthias.Beller@ifok.uni-rostock.de
Dipl.-Chem. B. Zimmermann
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching

[**] Wir danken der Firma Celanese GmbH für die Bereitstellung von TPPTS und NAPHOS, den Herren Dr. R. Fischer (Celanese GmbH), Dr. H. Geißler (Clariant AG) und Prof. Dr. K. Kühlein (Hoechst AG) für die Unterstützung des Projektes und dem BMBF für finanzielle Förderung. Wir danken weiterhin Prof. Dr. O. Nuyken (TU München) für die Bereitstellung von Arbeitsplatz und weiterer Infrastruktur.