

Chemie und Biologie der Actinomycine

Von Prof. Dr. HANS BROCKMANN

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen¹⁾

Die Actinomycine sind eine Gruppe von roten Antibiotica, deren Molekel aus einem Farbstoffteil und einer Reihe offenbar polypeptid-artig verknüpfter Aminosäuren aufgebaut ist. Sie sind durch cyto-statische und tumorhemmende Wirkung ausgezeichnet und zeigen Wirksamkeit gegen Lymphogranulomatose. Die bisher bei ihrer chemischen, biologischen und medizinischen Untersuchung erhaltenen Ergebnisse werden zusammenfassend dargestellt.

Die meisten aus Mikroorganismen isolierten Stoffwechselprodukte haben chemische Strukturen, wie man sie bei Verbindungen der höheren Pflanzen und Tiere nicht findet. Offenbar verfügen die Mikroben über andere, wahrscheinlich vielseitigere und wandlungsfähigere Synthesewege als die höher entwickelten Lebewesen. Jahrtausendelange Naturbeobachtung und eine mehr als hundertjährige Forschungsarbeit haben so gut wie alle medizinisch brauchbaren Inhaltsstoffe der Pflanzen und Tiere ausfindig gemacht. Bei den Mikroorganismen steht man in dieser Hinsicht erst am Anfang. Was bisher bei den Antibiotica erreicht ist, läßt erwarten, daß eine systematische Bearbeitung mikrobieller Stoffwechselprodukte auch andere, medizinisch verwendbare Verbindungen zutage fördern wird.

Der sicherste Weg, solche Verbindungen zu finden, ist eine breit angelegte pharmakologische Durchmusterung tausender Arten von Mikroorganismen. Ein anderer, mit weniger Aufwand verbundener Weg ist der, die antibiotische Wirksamkeit als Leitfaden zur Gewinnung neuer Stoffwechselprodukte zu benutzen und diese dann biologisch und pharmakologisch zu untersuchen. Dieses Verfahren, das auf jeden Fall die Naturstoffchemie bereichert, ermöglicht es, neben neuen, klinisch brauchbaren Antibiotica auch andere, pharmakologisch interessante Verbindungen zu finden. Es kann aber naturgemäß nicht zu medizinisch verwendbaren Stoffen führen, denen eine antibiotische Wirksamkeit fehlt.

Den zweiten Weg haben wir eingeschlagen, als wir 1946 in Zusammenarbeit mit dem Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer Aktiengesellschaft, insbesondere A. Bohne und H. Friedrich, auf breiter Grundlage mit Arbeiten über antibiotisch wirksame Verbindungen der Strahlenpilze (*Actinomyceten*) begannen. Nach mikrobiologischen Vorarbeiten — zeitweilig mit O. v. Plotho — wurden in unserem Institut ab 1947 gemeinsam mit W. Lindenbein²⁾ laufend *Actinomyceten*-Stämme aus Erdproben verschiedener Länder abgetrennt und auf antibiotische Wirksamkeit untersucht. Aus einer Reihe aktiver Stämme konnten die in Tabelle 1 zusammengestellten neuen Antibiotica isoliert werden, deren Konstitutionsaufklärung im Gange ist. Auch

zwei neue Vertreter der bisher wenig untersuchten *Actinomyceten*-Farbstoffe, das rote Actinorhodin³⁾ und das gelbe Limocrocin⁴⁾ wurden kristallisiert isoliert und näher untersucht.

Actinomycine	gelb	Resistomycin ⁶⁾ ...	gelb
Pikromycin ⁵⁾	farblos	Vallinomycin ⁶⁾ ...	farblos
Rhodomycin A ⁷⁾	rot	Rubromycin ¹⁰⁾ ...	rot
Rhodomycin B ⁸⁾	rot	Collinomycin ¹¹⁾ ..	gelb
Iso-rhodomycin A ⁷⁾ ...	rot	Geomycin ¹²⁾	farblos

Tabelle 1

Neue Antibiotica aus Actinomyceten

Im Rahmen dieser Arbeiten haben wir uns eingehend mit dem in unserem Institut gefundenen Actinomycin C¹³⁾ befaßt, dessen biologische Untersuchung (vgl. Abschnitt VI) die Actinomycine zu medizinisch interessanten Verbindungen gemacht hat. Die folgende Zusammenfassung unserer Actinomycin-Arbeiten ist durch die Ergebnisse anderer Autoren so weit ergänzt, daß sie als Sammelbericht über den augenblicklichen Stand der Actinomycin-Forschung gelten kann.

1) Actinomycin A

1940 isolierten S. A. Waksman und H. B. Woodruff¹⁴⁾ aus einer zur Gattung *Streptomyces* gehörenden, später als *Streptomyces antibioticus* bezeichneten *species*¹⁵⁾ ein Antibioticum, das sie Actinomycin A¹⁶⁾ nannten. Es wurde von S. A. Waksman und M. Tishler¹⁷⁾ chemisch näher untersucht. Actinomycin A kristallisiert in zinnroten Plättchen, Fp 250 °C, ist optisch aktiv ($[\alpha]_D^{25} + 320^\circ \pm 5^\circ$)

³⁾ H. Brockmann, H. Pini u. O. v. Plotho, Chem. Ber. 83, 161 [1950].

⁴⁾ H. Brockmann u. G. Grothe, ebenda 86, 1110 [1953].

⁵⁾ H. Brockmann u. W. Henkel, ebenda 84, 284 [1951]; H. Brockmann, H. Gentz u. R. Strufe, ebenda 85, 426 [1952]; H. Brockmann u. R. Strufe, ebenda 86, 876 [1953].

⁶⁾ H. Brockmann, K. Bauer u. I. Borchers, Chem. Ber. 84, 700 [1951]; H. Brockmann u. I. Borchers, ebenda 86, 261 [1953].

⁷⁾ H. Brockmann u. P. Patt, unveröffentlicht.

⁸⁾ H. Brockmann u. G. Schmidt-Kastner, Naturwiss. 38, 479 [1951].

⁹⁾ H. Brockmann u. G. Schmidt-Kastner, unveröffentlicht.

¹⁰⁾ H. Brockmann u. K. H. Renneberg, Naturwiss. 40, 59 [1953].

¹¹⁾ H. Brockmann u. K. H. Renneberg, ebenda 40, 166 [1953].

¹²⁾ H. Brockmann u. H. Musso, unveröffentlicht.

¹³⁾ H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwiss. 36, 376 [1949].

¹⁴⁾ S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 40, 581 [1940]; Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 45, 609 [1940].

¹⁵⁾ S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 42, 231 [1941].

¹⁶⁾ Als Actinomycin B wurde zunächst eine später als inaktiv erkannte Beimengung des Actinomycins A bezeichnet, die nicht zur Gruppe der Actinomycine gehört.

¹⁷⁾ S. A. Waksman u. M. Tishler, J. biol. Chemistry 142, 519 [1942].

¹⁾ Vorgetragen auf dem *Primer Congreso Internacional de Antibioticos y Quimioterapicos* in Buenos Aires am 11. Dez. 1952 und auf dem *Chemikertreffen* in Innsbruck am 30. März 1953.

²⁾ W. Lindenbein, Arch. Mikrobiol. 17, 361 [1952].

und zeigt schwach basische Eigenschaften. Es enthält C-Methyl- und N-Methyl-Gruppen und wird von Säuren und Alkali schnell zerstört. Als vorläufige Bruttoformel wurde $C_{41}H_{56}O_{11}N_6$ vorgeschlagen. Kochen mit Acetanhydrid lieferte ein rotes Acetat vom gleichen Schmelzpunkt wie das Ausgangsmaterial; reduzierende Acetylierung mit Acetanhydrid und Zinkstaub gab eine gelbe Verbindung, Fp 241°C. Auf Grund ihrer Untersuchung kamen Waksman und Tishler zu dem Schluß, daß Actinomycin A eine polycyclische, Stickstoff-haltige Verbindung mit einer oder mehreren chinoiden Gruppierungen ist.

Gegen eine Reihe grampositiver Bakterien zeigte Actinomycin A eine hohe antibiotische Wirksamkeit^{14, 17, 18}. So wurde das Wachstum von *Sarcina lutea* und *Bac. subtilis* noch in Verdünnungen von 1 : 100 Millionen deutlich gehemmt. Auch die fungistatischen Effekte waren beachtlich^{19, 20, 21}. Relativ unempfindlich dagegen waren gramnegative Bakterien; bei manchen lag die Grenze der Wirksamkeit bei Verdünnungen von 1 : 5000, bei anderen bei etwa 1 : 100000.

Actinomycin A ist ungewöhnlich toxisch; 10 γ reichen aus, um eine Maus innerhalb 24–48 h zu töten. Eine praktische Verwendung als Antibioticum kam daher nicht in Frage. Das 1949 erschienene Standardwerk „Antibiotics“²² faßt die Ergebnisse der pharmakologischen Prüfung von Actinomycin A in dem Satz zusammen: „In view of the great toxicity of this substance it is unlikely to have any therapeutic application“.

Aus verschiedenen zwischen 1942 und 1949 erschienenen Mitteilungen²³ geht hervor, daß außer *Str. antibioticus* auch andere *Actinomyceten*-Arten Actinomycin A oder dem Actinomycin A ähnliche Stoffe bilden können. In keinem Fall aber wurden die isolierten gelben bzw. gelbroten Verbindungen einwandfrei mit Actinomycin A identifiziert oder chemisch eingehender charakterisiert.

II) Actinomycin B und Actinomycin C

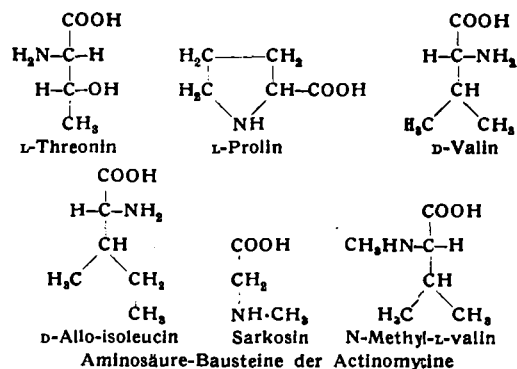
Im Laufe unserer Arbeiten wurde auch ein von O. v. Plötho gefundener Stamm untersucht, der später von W. Lindenbein²⁴ als neue *species* erkannt und mit dem Namen *Streptomyces chrysomallus* belegt worden ist. Aus seiner gelben Kulturlösung und seinem Mycel haben wir 1946 ein in alizarinroten Bipyramiden kristallisierendes, hochwirksames Antibioticum isoliert^{13, 24}, das in seinen Eigenschaften, besonders in seiner ausgesprochenen Toxizität dem Actinomycin A sehr ähnlich war. Es unterschied sich von ihm durch einen etwas niedrigeren Stickstoff-Gehalt, größere Löslichkeit in Aceton und dadurch, daß mit Acetanhydrid kein Acetyl-Derivat zu erhalten war. Diese Unterschiede schienen uns dafür zu sprechen, daß wir ein zweites Actinomycin in Händen hatten, das sich in seiner Konstitution von Actinomycin A unterscheidet. Als Bruttoformel wurde zunächst $C_{40}H_{54}O_{11}N_5$ ¹³ angenommen.

Als wir dieses Actinomycin isolierten, war seit vier Jahren keine Veröffentlichung mehr über die Chemie des Actinomycins A erschienen. Offenbar hatte man seine Untersuchung nicht weitergeführt, weil es seiner Giftigkeit

wegen als Antibioticum nicht verwendbar war. Uns schien nun gerade die ungewöhnlich große Toxizität von Interesse zu sein, denn eine Verbindung, die in Mengen von 10 γ eine Maus tötet, greift offenbar an einer zentralen Stelle des tierischen Organismus an. Deshalb haben wir 1947 mit Versuchen zur Konstitutionsermittlung unseres Actinomycins begonnen. Das dafür erforderliche Ausgangsmaterial wurde zunächst aus Oberflächenkulturen von *Streptomyces chrysomallus* gewonnen, bei denen die Actinomycin-Ausbeute durch Verwendung geeigneter Nährstoffe auf etwa 180 mg/l gebracht werden konnte. Später standen uns Präparate zur Verfügung, die von den Farbenfabriken Bayer aus Submers-Kulturen des gleichen Stammes hergestellt waren.

Der oxydative Abbau unseres Actinomycins lieferte keine definierten Spaltstücke, und ebensowenig konnte durch Zinkstaub-Destillation oder Zinkstaub-Schmelze etwas über das Grundgerüst in Erfahrung gebracht werden. Mehr Erfolg hatte der hydrolytische Abbau. Im Salzsäure-Hydrolysat waren papierchromatographisch fünf Aminosäuren nachzuweisen, von denen vier kristallisiert isoliert und als L-Threonin, L-Prolin, N-Methyl-L-valin und D-Allo-isoleucin identifiziert werden konnten^{25, 26, 27}. Der fünfte Fleck des Papierchromatogramms enthielt, wie sich bald darauf herausstellte²⁷, Sarkosin neben D-Valin.

Als diese Ergebnisse sowie einige andere über die vorsichtige Säurehydrolyse unseres Antibiotikums vorlagen²⁸, erschien eine kurze Mitteilung von C. E. Dalglish und A. R. Todd²⁹ über ein kristallisiertes, rotes Antibioticum vom Fp 252°C, das zuerst von H. Lehr und J. Berger²⁹ aus einem nicht identifizierten *Actinomyceten*-Stamm isoliert worden war. Da zunächst ungewiß blieb, ob diese Verbindung mit Actinomycin A identisch war, haben die englischen Autoren sie provisorisch als Actinomycin B bezeichnet. Als vorläufige Formel wurde $C_{41}H_{56}O_{12}N_6$ angenommen. Milde Säurebehandlung setzte aus Actinomycin B eine mit der Sakaguchi-Reaktion nachweisbare Guanidino-Gruppe frei, energische Säurehydrolyse lieferte L-Threonin,



L-Prolin, N-Methyl-L-valin, D-Valin und Sarkosin, die gleichen Aminosäuren also, die auch unser Actinomycin enthielt, nicht dagegen das in unserem Präparat nachgewiesene D-Allo-isoleucin. Durch das Fehlen dieser Aminosäure unterscheidet sich Actinomycin B eindeutig von unserem Antibioticum, das wir daraufhin als Actinomycin C¹³ bezeichnet haben. Auch in der spezifischen

¹⁹) H. J. Robinson u. S. A. Waksman, J. Pharmacol. exper. Therapeut. 74, 25 [1942].

²⁰) S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, J. Bacteriol. 42, 231 [1941].

²¹) S. A. Waksman u. E. Bugie, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 54, 79 [1943].

²²) H. C. Reilly, A. Schatz u. S. A. Waksman, J. Bacteriol. 49, 585 [1945].

²³) H. W. Flory, E. Chain u. Mitarb.: „Antibiotics“, Oxford University Press 1949, S. 384.

²⁴) M. Welsh, Bull. Soc. chim. Biol. 28, 557 [1946]; H. Umezawa u. Mitarb., J. Penicillin (Japan) 1, 27 [1948]; W. Kocholaty u. Mitarb., Arch. Biochem. 77, 191 [1948]; P. C. Trussel u. E. M. Richardson, Canadian J. Res. 26, 27 [1948].

²⁵) Zuerst beschrieben in Diplomarbeit von N. Grubhofer, Göttingen 1947.

²⁶) N. Grubhofer, Göttingen, Dissertat. 1948.

²⁷) H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwiss. 37, 494 [1950].

²⁸) H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass u. H. Käbe, Chem. Ber. 84, 260 [1951].

²⁹) Abstr. Communication Intern. Congress of Biochem., Cambridge, August 1949, S. 246; C. E. Dalglish u. A. R. Todd, Nature [London] 164, 830 [1949]. Ausführliche Arbeit: C. E. Dalglish, A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1950, 2946.

³⁰) H. Lehr u. J. Berger, Arch. Biochemistry 23, 503 [1949].

Drehung zeigen die beiden Actinomycine deutliche Unterschiede. Ob ein von *H. Sarlet*³⁰⁾ untersuchtes Actinomycin mit Actinomycin B identisch ist, muß noch geprüft werden.

Durch alkalische Hydrolyse mit Bariumhydroxyd haben wir aus Actinomycin C ein rotes, kristallisiertes Abbauprodukt, das Despeptido-actinomycin C³¹⁾ erhalten, das in Abschnitt V näher beschrieben ist. Es enthält keine Aminosäuren und entstammt offensichtlich dem chromophoren Teil der Molekel. Ein sehr ähnliches, wahrscheinlich mit Despeptido-actinomycin C identisches Abbauprodukt erhielten *A. R. Todd* und Mitarbeiter³¹⁾ durch Baryt-Abbau ihres Actinomycins B und nannten es Actinomycinol B.

Durch diese Arbeiten sind Actinomycin B und C und damit auch das ihnen sehr ähnliche Actinomycin A als Vertreter einer bisher unbekannten Gruppe von Naturstoffen erkannt worden, deren Molekel eine chromophore Komponente und eine Reihe offenbar Peptid-artig miteinander verknüpfter Aminosäuren enthält; eine Gruppe, die man in Analogie zu den Chromoproteiden als „Chromopeptide“ bezeichnen kann.

III) Darstellung einheitlicher Actinomycine

Von einem Verbindungstyp mehrere ähnliche Vertreter aufzubauen, d. h. ihn chemisch innerhalb gewisser Grenzen zu variieren, ist ein Prinzip, das von Mikroorganismen ebenso wie von höheren Pflanzen häufig befolgt wird. Die Feststellung, daß es analog zu den Penicillinen, Subtilinen, Polymyxinen u. a. Antibiotica auch mehrere Actinomycine gibt, war daher nicht ungewöhnlich. Sie hat uns aber veranlaßt, der Frage nachzugehen, wie das eben genannte Variationsprinzip im einzelnen bei den Actinomycin bildenden *Streptomyces*-Arten durchgeführt wird. Drei Möglichkeiten ließen sich voraussehen:

1.) Ein einheitlicher Stamm erzeugt nur ein einziges Actinomycin. Dann wären Actinomycin A, B und C deswegen verschieden, weil sie von verschiedenen Stämmen aufgebaut werden.

2.) Ein einheitlicher Stamm bildet mehrere Actinomycine nebeneinander.

3.) Ein zunächst einheitlicher Stamm wird durch Mutationen zu einer Population mehrerer Varianten oder Mutanten, die verschiedene Actinomycine synthetisieren.

Stämme, für die Fall 2 und 3 gilt, würden Actinomycin-Präparate liefern, die Gemische sind.



Bild 1
Actinomycin C aus Essigester

³⁰⁾ *H. Sarlet*, *Enzymologia* 14, 49 [1950]; *Nature* [London] 168, 469 [1951].

³¹⁾ *A. W. Johnson*, *A. R. Todd* u. *L. C. Vining*, *J. chem. Soc.* [London] 1952, 2672.

Actinomycin C kristallisiert vollkommen einheitlich (Bild 1) und läßt sich durch fraktionierte Kristallisation oder chromatographische Adsorption nicht in Komponenten zerlegen. Den klassischen Reinheitskriterien nach ist es eine einheitliche Substanz. Einen ersten Hinweis, daß diese Kriterien bei den Actinomycinen versagen, gaben Beobachtungen an Actinomycin C-Präparaten, die zu verschiedenen Zeiten aus verschiedenen Abimpfungen unseres Stammes gewonnen waren. Sie zeigten deutliche Unterschiede in der Löslichkeit und in den Analysenzahlen, was nur dadurch zu erklären war, daß hier Actinomycin-Gemische verschiedener Zusammensetzung vorlagen. In die gleiche Richtung wies der relativ niedrige Valin-Gehalt mancher Proben, der sich mit dem für Actinomycin C gefundenen Mol.-Gew. in keiner Weise vereinbaren ließ.

Den eindeutigen Beweis für die Uneinheitlichkeit des Actinomycins C brachte seine fraktionierte Gegenstromverteilung im System Äther/5,6proz. Salzsäure, bei der nach 40 Stufen eine Kurve (Bild 2) erhalten wurde,

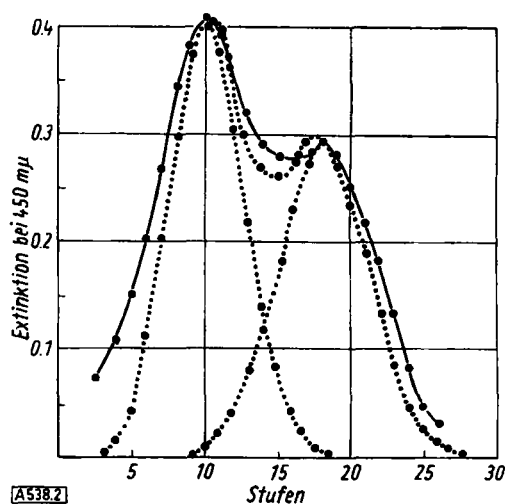


Bild 2
Verteilung von Actinomycin C in Äther/5,6proz. Salzsäure

aus der klar hervorging, daß unser Präparat aus mindestens zwei Komponenten bestand. Damit war bewiesen, daß die klassischen Reinheitskriterien bei den Actinomycinen versagen, und damit war gleichzeitig fraglich geworden, ob man bisher überhaupt einheitliche Actinomycine in Händen gehabt hatte; denn ebenso gut wie Actinomycin C konnten auch Actinomycin A und Actinomycin B Gemische sein.

Unsere nächste Aufgabe sahen wir deshalb darin, ein zuverlässiges Verfahren zur Gewinnung einheitlicher Actinomycine auszuarbeiten. Nur mit einem solchen Verfahren läßt sich entscheiden, wieviele verschiedene Actinomycine es gibt, und nur mit einheitlichen Actinomycinen kann die Struktur dieser Verbindungen aufgeklärt werden.

Für die Gewinnung einheitlicher Actinomycine kamen zwei prinzipiell verschiedene Verfahren in Betracht, ein chemisches und ein mikrobiologisches. Das chemische besteht darin, native Actinomycin-Gemische, wie z. B. Actinomycin C, in präparativem Maßstab durch Gegenstromverteilung zu trennen; das mikrobiologische darin, nach Stämmen zu suchen, die nur ein einziges Actinomycin erzeugen.

Wir haben beide Wege eingeschlagen. Der erstgenannte soll zunächst erörtert werden.

Präparative Gegenstromverteilung des Actinomycins C

Aus der Kurve des Bildes 2 läßt sich entnehmen, daß die Gegenstromverteilung des Actinomycins C über mindestens 150 Stufen geführt werden muß, wenn eine saubere Trennung der Komponenten erreicht werden soll. Das erfordert viel Zeit und ist im System Äther-Salzsäure nicht möglich, weil Actinomycin C bei längerer Säureeinwirkung zu einem erheblichen Teil abgebaut wird. Für die präparative Gegenstromverteilung mußte die Säure daher durch einen Stoff ersetzt werden, der Actinomycin in ausreichender Konzentration in die wäßrige Phase bringt und auch bei längerer Einwirkung nicht schädigt. Ein solcher Lösungsvermittler ist Harnstoff³³⁾. Seine 30proz. wäßrige Lösung, kombiniert mit einem Gemisch aus Methylbutyläther und n-Dibutyläther (7:3), ist ein System, in dem Actinomycin C einen für die Gegenstromverteilung günstigen Verteilungskoeffizienten hat und über 180 Stufen verteilt eine Kurve mit drei Maxima (Bild 3) lieferte³³⁾. Danach ist Actinomycin C ein Gemisch aus drei verschiedenen Actinomycinen. Sie wurden aus den schraffiert angedeuteten Stufen (Bild 3) kristallisiert isoliert und der Reihenfolge ihrer Maxima entsprechend als Actinomycin C₁, C₂ und C₃ bezeichnet³³⁾. Für das Gemisch hat man die Bezeichnung Actinomycin C beibehalten.

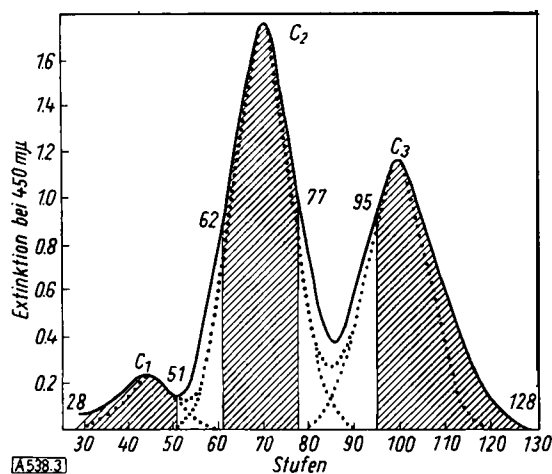


Bild 3
Verteilung von Actinomycin C im System: Methyl-butyläther + n-Dibutyläther (7:3)/30proz. Harnstoff-Lösung

Trotz seiner guten Trennwirkung hat das System Methyl-butyläther + n-Dibutyläther/30proz. Harnstoff-Lösung gewisse Nachteile; aus der wäßrigen Phase kristallisiert leicht Harnstoff aus und bei der Aufarbeitung der mobilen Phase kann sich der hohe Siedepunkt des n-Dibutyläthers störend auswirken. Diese Schwierigkeiten entfallen, wenn man die Harnstoff-Lösung durch eine 5proz. Lösung von Natrium-p-xylolsulfonat ersetzt³³⁾. Ihr Lösungsvermögen für Actinomycin C ist so groß, daß Methyl-butyläther allein als mobile Phase verwendet werden kann. Noch besser bewährte sich das billige und leicht zugängliche Natriumsalz der β -Naphthalin-sulfosäure. In seiner 1–2proz. wäßrigen Lösung ist Actinomycin C ebenso leicht löslich wie in Methyl-butyläther³⁴⁾.

Die präparativen Verteilungen wurden zunächst in einer 20stufigen Apparatur nach N. Grubhofer³⁵⁾ vorgenommen, bei der jedes Gefäß 800 cm³ faßt. In diesem Gerät über 180 Stufen zu verteilen, ist umständlich, weil man wieder-

holt umfüllen muß und wegen der großen Gefäßvolumina bis zur Gleichgewichtseinstellung jedesmal etwa 100 Schüttelbewegungen nötig sind. Bequemer und mit besserer Ausbeute gelang die Trennung mit der in unserem Institut von A. F. v. Metzsch³⁶⁾ entwickelten 200stufigen, vollautomatischen Verteilungsapparatur. Wie Bild 4 zeigt,

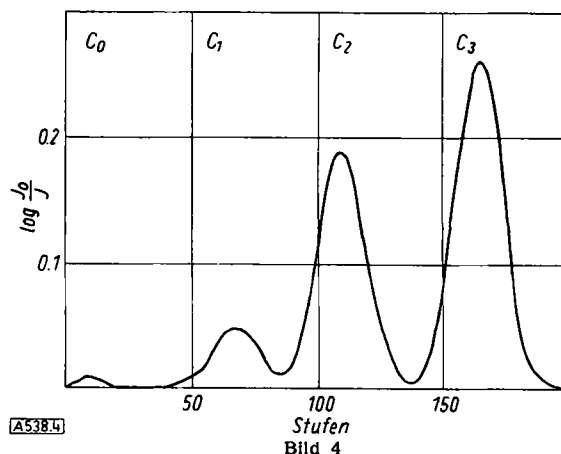


Bild 4
Verteilung von Actinomycin C im System: Methyl-butyläther/1,7proz.-Natrium- β -naphthalinsulfonat-Lösung

wurde hier bei einer 254stufigen Verteilung von 470 mg Actinomycin C im System Methylbutyläther/1,75proz. Natrium- β -naphthalin-sulfonat-Lösung³⁴⁾ eine völlige Trennung der Komponenten erreicht. Ihre physikalischen Daten sind in Tab. 2 zusammengestellt. Maximal ließ sich in der Apparatur etwa 1 g Actinomycin verarbeiten.

Daß die so erhaltenen Komponenten des Actinomycins C sich auch bei einer erheblich größeren Stufenzahl nicht weiter auftrennen lassen, zeigt Bild 5 am Beispiel des Actinomycins C₂. Bei einer 496stufigen Verteilung lieferte es eine Kurve, wie sie für eine einheitliche Substanz charakteristisch ist.

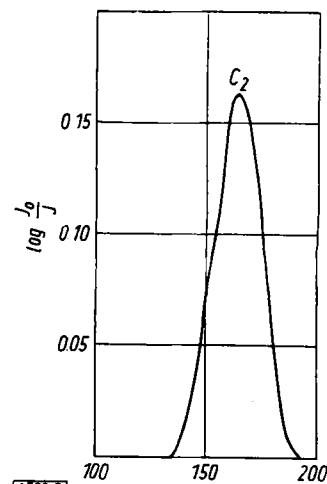


Bild 5
Verteilung von Actinomycin C₂ über 496 Stufen

Papierchromatographie der Actinomycine

Für die im nächsten Abschnitt beschriebenen mikrobiologischen Versuche brauchten wir ein Verfahren, mit dem man kleine Actinomycin-Proben auf Einheitlichkeit prüfen und miteinander vergleichen kann. Die übliche Form der Papierchromatographie, bei der das im Papier vorhandene Wasser als stationäre Phase fungiert, eignet sich dafür nicht, weil die Actinomycine in Wasser zu wenig löslich sind. Nachdem die Trennung der Actinomycine durch Gegenstromverteilung gelungen war, lag es nahe, die dabei bewährten Lösungsmittel-Systeme nach Goodall und Levy³⁷⁾ auf Filtrierpapier zu verwenden, d. h. als stationäre Phase die wäßrige Lösung des Lösungsvermittlers zu benutzen. Versuche mit Methyl-butyläther/Natrium- β -naphthalin-sulfonat-Lösung hatten jedoch keinen Erfolg. Erst als man die Löslichkeit in der mobilen Phase

³³⁾ H. Brockmann u. N. Pfennig, Naturwiss. 39, 429 [1952].

³⁴⁾ H. Brockmann u. N. Pfennig, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 292, 77 [1953].

³⁵⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber., im Druck; H. Gröne, Diplomarbeit Göttingen 1953.

³⁶⁾ N. Grubhofer, Chem.-Ing.-Technik 22, 209 [1950].

³⁷⁾ F. A. v. Metzsch, Chem.-Ing.-Technik 25, 66 [1953].

³⁸⁾ R. R. Goodall u. A. A. Levy, Analyst 72, 277 [1947].

verringerte, in der stationären aber erhöhte³⁸⁾, indem man n-Dibutyläther als mobile und eine 10proz. Lösung von Natrium-naphthalin-1,6-disulfonat als stationäre Phase verwendete, gelang im Ring-Papierchromatogramm eine glatte Trennung des Actinomycins C³⁹⁾. Seine drei Komponenten bildeten dabei drei gelbe, weit voneinander getrennte Ringe (Bild 6). Bei einigen Stämmen trat im Papierchromatogramm eine weitere schwache Zone (C₀) mit sehr kleinem R_F-Wert auf. Ob sie ein weiteres Actinomycin enthält, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

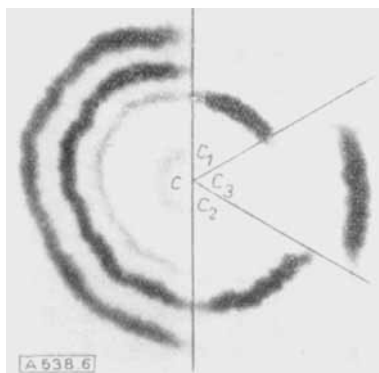


Bild 6

Ring-Papierchromatogramm von Actinomycin C
System: n-Dibutyläther/10proz. Lösung von Natrium-naphthalin-1,6-disulfonat-Lösung

Als Sektorenverfahren angewandt, erlaubt die Ringchromatographie einen bequemen Vergleich der verschiedenen Actinomycine. Bild 5 zeigt Actinomycin C neben seinen drei durch Gegenstromverteilung getrennten reinen Komponenten. Bringt man die getrockneten Chromatogramme in eine HCl-haltige Atmosphäre, so färben sich die gelben Actinomycin-Zonen infolge Salzbildung tiefrot. Sie werden dadurch deutlicher erkennbar, was für die photographische Wiedergabe von Vorteil ist.

Mit Hilfe der Ringchromatographie ist es nunmehr möglich, die von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen produzierten Actinomycine miteinander zu vergleichen, auf Einheitlichkeit zu prüfen und zu untersuchen, ob sich durch Mutationen Stämme bilden, die zur Bildung neuer Actinomycine befähigt sind. Auch die Haltbarkeit von Actinomycin-Lösungen bzw. Actinomycin-haltigen Zubereitungen kann papierchromatographisch leicht kontrolliert werden. Abbauprodukte, wie sie sich bei längerem Aufbewahren von Actinomycin in schwach sauren Lösungen bilden, geben im Papierchromatogramm Ringe, die im Gegensatz zu denen der Actinomycine rot sind und kleinere R_F-Werte zeigen.

IV) Aufbau verschiedener Actinomycine durch verschiedene *Streptomyces*-Arten

Im vorhergehenden Abschnitt wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, daß ein Stamm, der zunächst nur ein Actinomycin bildet, im Laufe der Zeit zu einer Population mehrerer Varianten oder Mutanten werden kann, deren jede ein bestimmtes, für sie charakteristisches Actinomycin erzeugt. Auf Grund dieser Überlegung erschien es zunächst nicht ausgeschlossen, daß die Uneinheitlichkeit unseres Actinomycins C durch biologische Uneinheitlichkeit

unseres *Streptomyces chrysomallus*-Stammes bedingt war. In diesem Fall war zu erwarten, daß die mikrobiologische Trennung der Varianten bzw. Mutanten zu Stämmen führen würde, die nur ein Actinomycin hervorbringen und damit auf eine bequemere Weise das gleiche leisten würde wie die präparative Trennung von Actinomycin-Gemischen.

Tatsächlich hat eine eingehende mikrobiologische Untersuchung gezeigt, daß unser bis dahin verwendeter Stamm uneinheitlich war⁴⁰⁾. Eine Anzahl von Kulturen, die jeweils aus einer einzigen Spore unseres Stammes aufgezogen worden waren (Einsporkulturen), wichen morphologisch deutlich voneinander ab und zeigten erhebliche Unterschiede in der Actinomycin-Ausbeute. Bei einigen war sie verschwindend gering, bei anderen höher als beim Ausgangsstamm. Das von diesen reinen Stämmen gebildete Actinomycin wurde isoliert und zunächst durch Gegenstromverteilung, später im Papierchromatogramm auf Einheitlichkeit untersucht. Alle Präparate lieferten Verteilungskurven, die der in Bild 2 gezeigten ähnlich waren; alle zeigten im Papierchromatogramm die drei Zonen des Actinomycins C₁, C₂ und C₃.

Damit war bewiesen, daß auch einheitliche, aus einer einzigen Spore hervorgegangene Stämme imstande sind, mehrere Actinomycine zu erzeugen; und damit war weiterhin gezeigt, daß nicht die biologische Uneinheitlichkeit unseres bisherigen Stammes für die Uneinheitlichkeit des aus ihm gewonnenen Actinomycins C verantwortlich war.

Dieses Ergebnis schloß selbstverständlich nicht aus, daß es andererseits doch auch *Streptomyces*-Arten gibt, die nur ein einziges Actinomycin aufbauen. In der Hoffnung, solche Arten zu finden, wurden von den 2140 Stämmen unserer *Actinomyceten*-Sammlung alle diejenigen näher untersucht, die gelbe Farbstoffe an das Nährmedium abgeben. Unter 130 solcher Stämme fanden sich 21 Actinomycin-Bildner und unter diesen wiederum 5, deren Actinomycin sich durch Schmelzpunkt, spezifische Drehung und Löslichkeit deutlich von unseren Actinomycin C-Präparaten unterschied. Dieses wurde daher vorläufig als Actinomycin X bezeichnet⁴¹⁾. Aus seiner Verteilungskurve (Bild 7) und seinem Papierchromatogramm (Bild 8) geht hervor, daß Actinomycin X ein Gemisch aus mindestens zwei Komponenten (Actinomycin X₁ und X₂) ist, von denen die eine (X₂) etwa 90% der Gesamtmenge ausmacht. Dem Idealfall eines Stammes, der nur ein einziges Actinomycin bildet, ist man hier also erheblich näher als beim Actinomycin C.

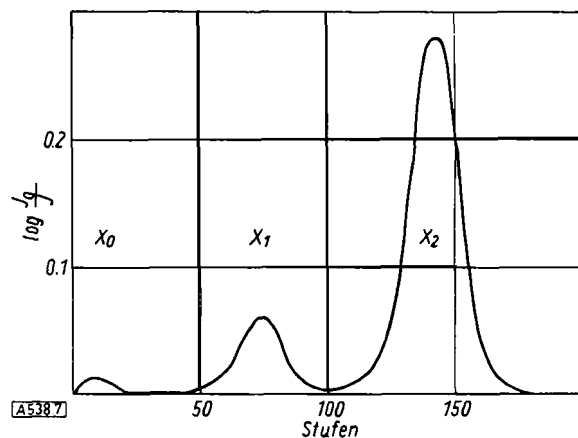


Bild 7

Verteilung von Actinomycin X über 242 Stufen. System: Methylbutyläther/1,7proz. Natrium-β-naphthalinsulfonat-Lösung

³⁸⁾ Diese Verkleinerung des Verteilungskoeffizienten ist notwendig, weil bei der Papierchromatographie das Volumenverhältnis mobile Phase zu stationärer Phase größer ist als in der Verteilungsapparatur.

³⁹⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Naturwiss. 40, 222 [1953].

⁴⁰⁾ N. Pfennig, Arch. Mikrobiol. 18, 327 [1953].

⁴¹⁾ H. Brockmann, H. Linge u. H. Gröne, Naturwiss. 40, 224 [1953]. H. Linge, Dissertat. Göttingen 1951.

Um festzustellen, ob Actinomycin X_1 und X_2 mit einer der Actinomycin C-Komponenten (C_1 , C_2 oder C_3) identisch ist, wurde ein Gemisch aus Actinomycin C und Actinomycin X im System Methylbutyläther/1,75proz. Natrium- β -naphthalin-sulfonat-Lösung über 242 Stufen verteilt⁸⁴⁾.

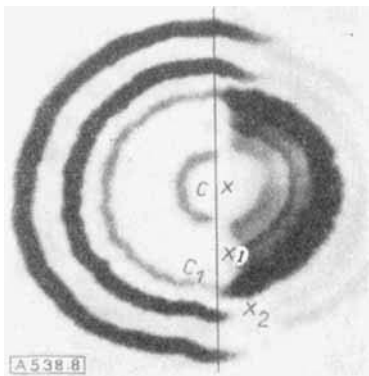


Bild 8
Ring-Papierchromatogramm von Actinomycin C und Actinomycin X.
System: n-Dibutyläther + Butanol (3 : 2)/10proz. Lösung von Natrium-kresotinat

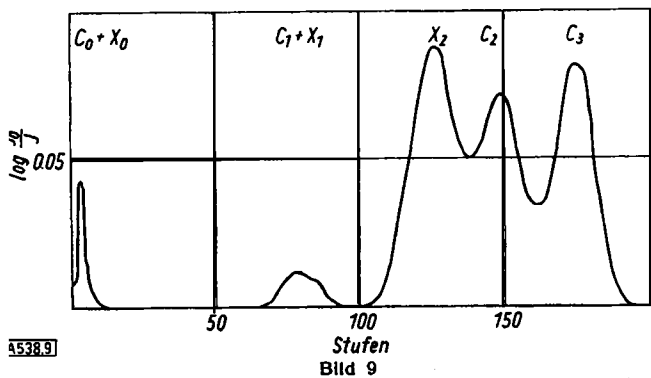


Bild 9
Gegenstromverteilung eines Gemisches aus Actinomycin C und Actinomycin X über 243 Stufen. System: Methyl-butyläther/1,7proz. Natrium- β -naphthalinsulfonat-Lösung

Die dabei erhaltene Kurve (Bild 9) beweist, daß Actinomycin X_2 von Actinomycin C_1 , C_2 und C_3 verschieden ist. Actinomycin C_1 und X_1 dagegen sind nicht deutlich voneinander getrennt.

Bild 8 zeigt das Ringchromatogramm von Actinomycin X und Actinomycin C im System n-Dibutyläther + Butanol (3 : 2) 10proz. Lösung von Natrium-m-kresotinat. Wie man sieht, unterscheidet sich hier Actinomycin X_1 deutlich von C_1 , ein Beweis, daß zwei verschiedene Verbindungen vorliegen. Im R_F -Wert von Actinomycin C_1 und X_2 dagegen ist kein Unterschied zu erkennen. Arbeitet man aber im System n-Dibutyläther/10proz. Lösung von Natrium-naphthalin-1,6-disulfonat⁸⁴⁾, so wird der in der Verteilungskurve (Bild 9) klar zum Ausdruck kommende Unterschied zwischen Actinomycin C_1 und X_2 auch im Ringchromatogramm (Bild 10) sichtbar. Damit ist die Existenz von fünf verschiedenen Actinomycinen (C_1 , C_2 , C_3 , X_1 und X_2) nachgewiesen.

Unter unseren Actinomycin-Bildnern fanden wir zwei Stämme (Nr. 794 und 797), deren Actinomycin seiner Verteilungskurve und seinem Papierchromatogramm nach praktisch einheitlich ist⁸⁴⁾. Zwei schwach angedeutete Ringe im Papierchromatogramm, von denen in Bild 10 nur einer sichtbar ist, deuten auf die Anwesenheit von zwei in geringer Menge vorhandenen Begleitstoffen hin. Es gibt also neben Stämmen, die mehrere Actinomycine erzeugen, tatsächlich auch solche, die praktisch nur ein einziges bilden. Wie Bild 10 zeigt, hat das Actinomycin aus Stamm 797 den gleichen R_F -Wert wie Actinomycin C_1 . Trotzdem

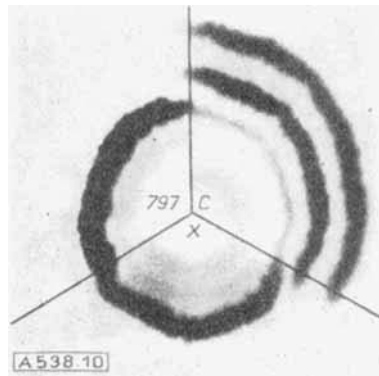


Bild 10
Ring-Papierchromatogramm von Actinomycin C, Actinomycin X und Actinomycin aus Stamm 797. System: n-Dibutyläther/10proz. Lösung von Natrium-naphthalin-1,6-disulfonat-Lösung

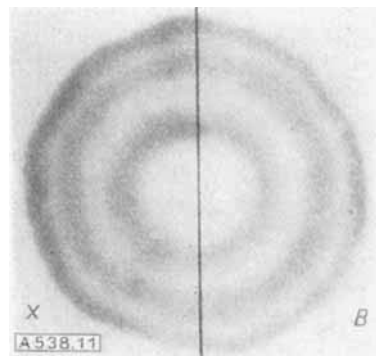


Bild 11
Ring-Papierchromatogramm von Actinomycin X und Actinomycin B. System: n-Dibutyläther/10proz. Lösung von Natrium-naphthalin-1,6-disulfonat

sind die beiden, soweit wir bisher sehen, nicht identisch, denn wie Tab. 2 zeigt, enthält nach unseren bisherigen Analysen Actinomycin C_1 2 Moll. D-Valin, das Actinomycin aus Stamm 797 dagegen nur 1 Mol.

	C_1	C_2	C_3	A (797)	B_2 (X_2)
Kristallform	Hexagonale Bipyramiden. Auch sechskantige Säulen o. Nadeln. (Aus Benzol, Essigester, Methanol oder Chloroform)				Rhombische Plättchen, meist undeutl. ausgebildet (aus Methanol)
Schmelzpunkt*)	241–243°	237–239°	232–235°	240,5–242°	244–246°
spez. Drehung (in Methanol)	$[\alpha]_D^{20} = -349^\circ \pm 10^\circ$ (0,26 %)	$[\alpha]_D^{20} = -325^\circ \pm 10^\circ$ (0,24 %)	$[\alpha]_D^{20} = -328^\circ \pm 10^\circ$ (0,24 %)	$[\alpha]_D^{20} = -353^\circ \pm 10^\circ$ (0,25 %)	$[\alpha]_D^{20} = -341^\circ \pm 10^\circ$ (0,26 %)
spez. Extinktion (in Methanol bei 443 m μ)	20,5	19,9	18,8	20,7	18,6

*) Bestimmt auf. d. Kofler-Block. Substanz aufgelegt bei 210 °C Temperatursteig. 3–4°/min.

Tabelle 2. Physikalische Daten der Actinomycine

Von großem Interesse war die Frage, welches der von uns aufgefundenen Actinomycine mit Actinomycin A bzw. Actinomycin B identisch ist. Sie ließ sich an Hand authentischer Proben von Actinomycin A und B⁴⁸⁾ beantworten. Im Papierchromatogramm verhielt sich unser aus Stamm 797 gewonnenes Actinomycin genau so wie Actinomycin A und unser Actinomycin X genau so wie Actinomycin B (Bild 11). Actinomycin A von *Waksman* ist nahezu einheitlich; Actinomycin B ist ein Gemisch, das neben der Hauptkomponente B₂ noch zwei weitere, in geringer Menge vorhandene Actinomycine (B₀ und B₁) enthält. Bei der Bewertung dieser Befunde ist zu berücksichtigen, daß das Ergebnis des papierchromatographischen Vergleiches nur bei verschiedenen R_F-Werten eindeutig ist. Zwei Actinomycine, die sich im Ringchromatogramm unterscheiden, sind sicher verschieden. Dagegen müssen zwei Actinomycine, die sich chromatographisch gleich verhalten, nicht unbedingt identisch sein, wie unsere Ergebnisse am Actinomycin C₁ und Actinomycin A zeigen. Die papierchromatographische Übereinstimmung unseres Actinomycins aus Stamm 797 mit Actinomycin A sowie die Übereinstimmung von Actinomycin X mit Actinomycin B ist demnach kein strenger Beweis für die Identität der betreffenden Verbindung. Da aber Actinomycin A und das Actinomycin aus Stamm 797 und ferner Actinomycin X₂ und Actinomycin B₂ auch in anderen Eigenschaften, wie Löslichkeit, Schmelzpunkt und Aminosäure-Gehalt (Tab.3) übereinstimmen, erscheint die Annahme berechtigt, daß einerseits Actinomycin A mit Actinomycin aus Stamm 797 und andererseits Actinomycin B mit Actinomycin X identisch ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch unsere Arbeiten die Existenz von mindestens sechs verschiedenen Actinomycinen nachgewiesen ist, die alle kristallisiert isoliert worden sind. Fünf von ihnen, die Actinomycine C₁, C₂, C₃, B₁ (X₁) und B₂ (X₂) zeigen im Papierchromatogramm verschiedene R_F-Werte; zwei, nämlich Actinomycin C₁ und Actinomycin A, geben im Papierchromatogramm in den bisher untersuchten Systemen gleiche R_F-Werte, unterscheiden sich aber durch ihren D-Valin-Gehalt.

Tabelle 2 zeigt, daß die Schmelzpunkte und die spezifischen Extinktionen der einzelnen Actinomycine einander sehr ähnlich sind. Die auf dem *Kofler*-Block bestimmten Schmelzpunkte liegen etwas niedriger als die im *Berl*-Block beobachteten. Deutliche, wenn auch nicht erhebliche Unterschiede finden sich in der spezifischen Drehung. Zwischen Actinomycin B₂ (X₂) und den übrigen Actinomycinen besteht ein charakteristischer Unterschied in der Kristallform.

Zwischen dem Actinomycin B von *Todd* und unseren Actinomycin X-Präparaten fanden sich zunächst quantitative Unterschiede im Anteil der Nebenkomponten. Durch Veränderung des Nährbodens gelang es jedoch, die Bildung der Nebenkomponten beim Actinomycin X so zu steigern, daß nunmehr die Papierchromatogramme der beiden Präparate auch quantitativ gleich wurden (Bild 11).

Unsere bisherigen Versuche haben gezeigt, daß man die Actinomycin-bildenden *Streptomyces*-Stämme in drei Gruppen einteilen kann:

- 1.) Actinomycin A produzierende Stämme.
- 2.) Stämme, die Actinomycin B (Gemisch aus Actinomycin B₀, B₁ und B₂) erzeugen.

3.) Stämme, die Actinomycin C (Gemisch aus Actinomycin C₁, C₂ und C₃) produzieren.

V) Versuche zur Konstitutionsermittlung der Actinomycine

Durch den Nachweis, daß die Actinomycine Chromopeptide sind, ergibt sich für die Konstitutionsermittlung folgendes Programm: 1.) Strukturermittlung des aus Aminosäuren aufgebauten Molekelteils (im folgenden als Peptid-Teil bezeichnet). 2.) Aufklärung des Aminosäure-freien, für die Farbe verantwortlichen Teiles (im folgenden kurz Chromophor genannt). 3.) Beantwortung der Frage, wie Peptidteil und Chromophor miteinander verknüpft sind. Es sollen zunächst die Versuche zur Aufklärung des Peptid-Teils erörtert werden.

Nachdem gezeigt war, daß es mindestens sechs verschiedene Actinomycine gibt⁴⁹⁾, bestand die nächste Aufgabe darin, durch quantitative Aminosäure-Analyse festzustellen, wieweit sich die verschiedenen Actinomycine durch Art und Zahl ihrer Aminosäure-Bausteine unterscheiden.

Schon qualitativ fanden sich gewisse Unterschiede⁴⁹⁾. Gemeinsam sind allen sechs Actinomycinen die Aminosäuren L-Threonin, Sarkosin, L-Prolin und N-Methyl-L-valin. Unterschiede bestehen hinsichtlich des D-Valins und D-Allo-isoleucins. Die Actinomycine A, B₁, B₂ und C₁ enthalten außer den vier eben genannten Aminosäuren noch D-Valin, sind also hinsichtlich ihrer Aminosäuren qualitativ gleich. Actinomycin C₂ enthält außer den vier genannten Aminosäuren noch D-Valin und D-Allo-isoleucin, Actinomycin C₃ außer den vier nur D-Allo-isoleucin; das D-Valin fehlt hier.

D-Allo-isoleucin und Sarkosin⁴⁹⁾ hatte man bis dahin noch nicht als Bestandteil von Peptid-Systemen angetroffen. D-Valin dagegen war bereits in den Gramicidinen nachgewiesen worden. N-Methyl-L-valin ist zuerst als Abbauprodukt der Enniatine aufgefunden worden⁴⁴⁾.

Um aus den Ergebnissen der quantitativen Aminosäure-Bestimmung die Zahl der in der Molekel vorhandenen Aminosäure-Bausteine zu ermitteln, muß man das Mol.-Gew. der Actinomycine kennen.

Die physikalischen Methoden zur Bestimmung des Molekulargewichtes geben bei den Actinomycinen keine gut reproduzierbaren Werte. *Waksman*¹⁷⁾ fand für Actinomycin A bei kryoskopischen Messungen in Cyclohexanol und in Phenol Werte zwischen 768 und 813 und in Kohlenstoff-tetrabromid nach *Rast* 1000. Unsere Werte für Actinomycin C²⁷⁾ lagen zwischen 750 und 900 (gemessen nach *Barger-Rast* in Tetrahydrofuran und kryoskopisch in Phenol und Campher).

Genauer läßt sich das Mol.-Gew. chemisch bestimmen. Dazu eignet sich, wie wir fanden²⁷⁾, die katalytische Hydrierung, bei der Actinomycin C ebenso wie Actinomycin A und B leicht in eine hellgelbe Leukoverbindung übergeht. Da die Wasserstoff-Aufnahme bis zur Sättigung schnell und gleichmäßig verläuft und die Leukoverbindung an der Luft nahezu quantitativ zu Actinomycin dehydriert wird, darf man annehmen, daß der Wasserstoff fast ausschließlich zur Reduktion eines chinoiden Systemes verbraucht wird. Nimmt man ferner an, daß die Actinomycine nur ein solches Chinon-System enthalten, so errechnet sich aus dem Wasserstoff-Verbrauch des Actinomycins C

⁴⁸⁾ Für die Überlassung der Proben sind wir Herrn Prof. S. A. *Waksman* und Herrn Prof. A. R. *Todd* zu großem Dank verpflichtet.

⁴⁹⁾ R. D. *Haworth* u. Mitarb. (Nature [London] 167, 1068 [1951]) haben Sarkosin inzwischen im *ground nut*-Protein nachgewiesen. *Townley* u. Mitarb. Abstr. XIth Intern. Congr. Chem., New York, 1951, S. 284, fanden es im Antibiotikum *Vinactin*.

⁴⁴⁾ Pl. A. *Plattner* u. U. *Nager*, Helv. chim. Acta 31, 665 [1948].

ein Mol.-Gew. von 1200 ± 25 . Diese Zahl müßte verdoppelt oder verdreifacht werden, wenn zwei bzw. drei chinoide Gruppen vorhanden sind. Für die Annahme eines größeren Mol.-Gew. besteht aber vorläufig kein Grund; im Gegenteil, die gute Löslichkeit der Actinomycine in Benzol, und die Tatsache, daß sie einen lediglich definierten Schmelzpunkt haben, sprechen dafür, daß 1200 der richtige Wert ist. Später haben *Todd* und Mitarbeiter⁴⁵⁾ nach unserem Vorgang Actinomycin B quantitativ hydriert und das Mol.-Gew. 1240 ± 20 gefunden.

Statt zu hydrieren, kann man die chinoide Gruppe der Actinomycine auch mit Zinn(II)-chlorid in salzsaurer Lösung scharf auf die hellgelbe Leukostufe titrieren. Für Actinomycin C fanden wir²⁷⁾ so in guter Übereinstimmung mit der Hydrierung den Wert 1200.

Eine dritte Möglichkeit zur chemischen Mol.-Gew.-Bestimmung bietet die potentiometrische Titration der Actinomycine in Eisessig mit Perchlorsäure⁴⁶⁾. Aus der verbrauchten Säuremenge berechnet sich als Äquivalentgewicht und damit als kleinstes Mol.-Gew. 1200 ± 50 . Diese Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Hydrierung zeigt, daß Actinomycin C auf eine chinoide Gruppe eine basische Gruppe enthält. Bezogen auf das Mol.-Gew. 1200, berechnet sich aus den Analysenzahlen für Actinomycin C die Näherungsformel $C_{82}H_{89}O_{16}N_{11}$.

Zur Konstitution des Peptid-Teils

Die quantitative Aminosäure-Bestimmung wird bei den Actinomycinen dadurch erschwert, daß unter den zur Abspaltung der Aminosäuren erforderlichen Bedingungen die chinoide Gruppe oxydierend wirken und dadurch die Aminosäuren, insbes. das empfindliche Threonin angreifen kann. Etwa 20% der Ausgangsmenge fallen bei der Hydrolyse (48 h bei 100 °C in 20proz. HCl) als brauner Niederschlag aus. Er besteht aus Abbau- und Zersetzungsprodukten des Chromophors. Die im Hydrolysat der verschiedenen Actinomycine befindlichen Aminosäuren wurden papierchromatographisch getrennt und kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt⁴⁷⁾. Die Fehlerbreite der Analysenmethode betrug etwa 10%. Neben diesem Fehler gehen in die Zahlen der Tabelle 3 noch die bei der Hydrolyse entstehende Aminosäure-Verluste ein. Die völlige Abspaltung des Threonins erwies sich als recht schwierig, so daß die Threonin-Werte sicher zu niedrig sind. Die in Tabelle 3 zusammengestellten und auf das Mol.-Gew. 1200 bezogenen Aminosäure-Werte, die noch eingehender Bestätigung bedürfen, zeigen, daß auch zwischen den Actinomycinen, die qualitativ die gleichen Aminosäuren enthalten, Unterschiede im Aminosäure-Gehalt bestehen.

	L-Threonin	Sarkosin	L-Prolin	D-Valin	L-N-Methylvalin	D-Allo-leucin
Actinomycin C ₁	0,9	1,5	1,7	1,9	1,7	—
Actinomycin C ₂	1,4	1,4	1,9	0,9	1,9	0,9
Actinomycin C ₃	1,2	1,4	2,1	—	2,0	2,0
Actinomycin X ₁	0,9	1,9	2,1	1,9	1,9	—
Actinomycin X ₂	0,7	2,1	1,1	2,1	2,1	—
Actinomycin aus Stamm 797 ...	0,4	2,0	1,9	1,0	1,9	—

Tabelle 3

Aminosäure-Gehalt verschiedener Actinomycine in Mol. bezogen auf das Mindest-Mol.-Gew. 1200

⁴⁵⁾ A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1952, 2672.

⁴⁶⁾ H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, i. Druck [1953].

⁴⁷⁾ H. Brockmann, G. Bohnsack u. H. Gröne, Naturwiss. 40, 223 [1953].

Wie die Peptid-artig verbundenen Aminosäuren mit dem Chromophor verknüpft sind, ist noch unbekannt. Freie Amino- und Carboxy-Gruppen haben sich bisher in den Actinomycinen nicht nachweisen lassen. Auch freie Methylamino-Gruppen scheinen nicht vorhanden zu sein. Demnach scheint eine cyclische Struktur, bei der eine Peptid-Kette an zwei Stellen mit dem Chromophor verknüpft ist, nicht ausgeschlossen. Auch die Möglichkeit, daß zwei Peptid-Ketten cyclisch mit dem Chromophor verbunden sind, darf nicht unbeachtet bleiben.

Zweifellos sind die Peptid-Ketten nicht ausschließlich mit Ester- oder Säureamid-Brücken an den Chromophor gebunden, denn dann müßte sich der Chromophor relativ leicht durch Säurehydrolyse von den Aminosäuren ablösen lassen. Das ist aber nicht der Fall. Auch nach längerem Kochen mit Säure entstehen rote, amorphe Abbauprodukte, aus denen sich durch energische Säurehydrolyse noch eine Aminosäure mit dem R_F -Wert des Threonins herauspalten läßt. Vielleicht ist ein Ende der Peptidkette über den Hydroxyl-Sauerstoff des Threonins Äther-artig mit dem Chromophor verknüpft. Auch eine Bindung über den Stickstoff einer Aminosäure erscheint nicht ausgeschlossen.

Schon sehr milde Säureeinwirkung verändert die Actinomycine unter Abspaltung von 1 Mol Ammoniak.

Zur Konstitution des Chromophors

Versuche, durch Säurehydrolyse der Actinomycine den chromophoren Teil der Molekel in Form eines kristallisierten Abbauproduktes zu gewinnen, waren bisher erfolglos.

Besser bewährt hat sich der hydrolytische Abbau mit Bariumhydroxyd. Dabei entsteht, wie schon erwähnt, aus Actinomycin C ein rotes, kristallisiertes Abbauprodukt $C_{16}H_{18}O_5N$, das Despeptido-actinomycin C²⁸⁾. Es enthält mindestens zwei acetylierbare Oxy-Gruppen, zwei C-Methyl-Gruppen und ein durch reduzierende Acetylierung nachweisbares Chinon-System. Ein mit unserem wahrscheinlich identisches Abbauprodukt wurde später von A. R. Todd und Mitarbeitern⁴⁸⁾ durch Baryt-Abbau des Actinomycins B erhalten und Actinomycinol B genannt.

Die Vermutung, daß Despeptido-actinomycin C ein Amino-oxy-anthrachinon ist²⁸⁾, hat sich nicht bestätigen lassen. Möglicherweise ist es ein Azanthrachinon- oder Aza-phenanthren-Derivat.

Zwischen den Actinomycinen und den Despeptido-actinomycinen bestehen charakteristische Unterschiede im spektroskopischen und chemischen Verhalten. Beim Bariumhydroxyd-Abbau wird demnach der Chromophor nicht nur von den Aminosäuren abgelöst, sondern auch selbst verändert. Trotzdem darf man annehmen, daß der Hauptteil des Chromophor-Gerüsts auch noch in den Despeptido-actinomycinen vorhanden ist. Wenn das der Fall ist, läßt sich durch Bariumhydroxyd-Abbau entscheiden, ob sich die einzelnen Actinomycine auch im Bau ihres Chromophors unterscheiden; sind die Despeptido-actinomycine verschieden, so sind sicher auch die Chromophore verschieden. Sind sie dagegen identisch, so sind sehr wahrscheinlich auch die Chromophore identisch^{47, 48)}.

Bisher liegen folgende Ergebnisse vor: Despeptido-actinomycin C hat sich bei der Ring-Papierchromatographie in den bislang untersuchten Lösungsmittel-Systemen als einheitlich erwiesen. Daraus läßt sich schließen, daß aus

Actinomycin C₂ und Actinomycin C₃, den Hauptkomponenten des Actinomycins C, ein und dasselbe Despeptidoactinomycin entsteht und die beiden Actinomycine demnach im Bau ihres chromophoren Teils übereinstimmen^{47a, 48}). Ferner wurde gefunden^{47a}), daß Despeptidoactinomycin C mit dem aus Actinomycin X erhaltenen Despeptidoactinomycin identisch ist. Daraus kann man folgern, daß zum mindesten Actinomycin X₂ (die mit Actinomycin B₂ identische Hauptkomponente des Actinomycins X) den gleichen chromophoren Molekelteil enthält wie Actinomycin C₂ und C₃.

Ob die Despeptidoactinomycine der verschiedenen Actinomycine identisch sind oder nicht, ist nicht nur für die Charakterisierung der einzelnen Actinomycine, sondern auch für die Konstitutionsaufklärung der Despeptidoactinomycine von Bedeutung. Liefern nämlich Actinomycin-Gemische, wie Actinomycin C, das gleiche Despeptidoactinomycin, so ist das für die Konstitutionsermittlung erforderliche Ausgangsmaterial leichter zu beschaffen, als wenn die Actinomycine vorher erst durch Gegenstromverteilung getrennt werden müssen.

Durch Säurehydrolyse der Actinomycine läßt sich kein Despeptidoactinomycin gewinnen. Offenbar setzt in Alkali die Hydrolyse an einer anderen Stelle der Molekel ein, als in saurem Milieu.

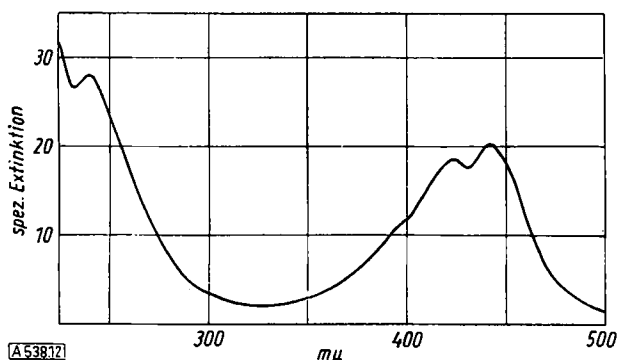


Bild 12
Absorptionskurve der Actinomycine in Cyclohexan

Die Actinomycine C₁, C₂, C₃, B₂ (X₂) und A zeigen in Cyclohexan zwei Absorptionsmaxima bei 415 und 440 mμ (Bild 12), deren Extinktionen innerhalb der Fehlergrenze der Messung übereinstimmen (Tabelle 2). In der Molekel der verschiedenen Actinomycine ist also der prozentuale Anteil des Chromophors und damit auch des Peptid-Teils gleich oder nahezu gleich. Auch in den Infrarot-Spektren (Bild 13) fanden sich keine Unterschiede.

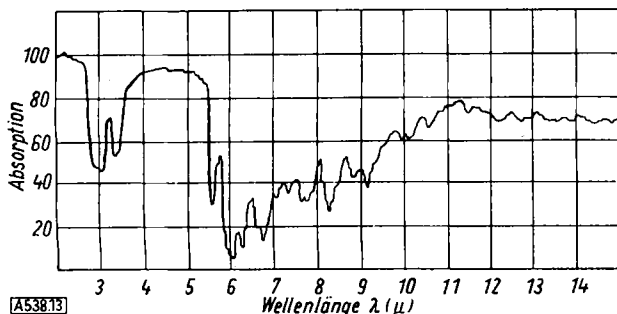


Bild 13
Infrarot-Spektrum von Actinomycin C₁ in Kaliumbromid

^{47a)} H. Brockmann u. G. Budde, Naturwiss. 40, 529 [1953].

⁴⁸⁾ H. Brockmann u. N. Grubhofer, Chem. Ber. 86, 1407 [1953].

Der Chromophor der Actinomycine ist eine schwache Base, deren Farbe in 10proz. Salzsäure von Gelb nach Rot umschlägt. Die nach sehr milder Säureeinwirkung erhaltenen Abbauprodukte zeigen diese Halochromie nicht mehr, ein Zeichen, daß der Chromophor bereits verändert ist. Noch charakteristischer wird diese Veränderung beim Umsatz mit Zinn(II)-chlorid erkennbar; die Säure-Abbauprodukte geben damit in schwach saurer Lösung eine intensive smaragdgrüne Färbung, die durch überschüssiges Reduktionsmittel nach Gelb umschlägt. Die nativen Actinomycine zeigen diese Reaktion nur sehr schwach.

Reduzierende Acetylierung verwandelt die Actinomycine in gelbe, kristallisierte Acetate. Zwischen den aus Actinomycin A, B und C erhaltenen bestehen nicht unerhebliche Differenzen im Acetyl-Gehalt. Auch bei der Acetylierung fanden sich Unterschiede zwischen Actinomycin A, B und C. Da diese Befunde an Actinomycin-Gemischen gemacht wurden und weiterer Überprüfung bedürfen, sollen sie hier nicht näher erörtert werden.

VI) Die biologische Wirksamkeit des Actinomycins C

Biologisch untersucht das Actinomycin C eingehend Chr. Hackmann⁴⁹). Er beobachtete an Versuchstieren mit bösartigen Geschwulsten eine deutliche cytostatische Wirkung. Sie kommt offenbar nicht auf dem Umweg über den Stoffwechsel, sondern durch direkten Angriff auf die proliferierende Zelle zustande; denn Versuche mit Impftumoren zeigten, daß Vorbehandlung des Impfmateri als mit sehr kleinen Actinomycin-Mengen das Angehen der Tumoren verhinderte. In Übereinstimmung damit konnte bei der Maus an den Zellen der Lieberkühnschen Krypten (schlauchartige Drüsen der Darmschleimhaut) ein hemmender Einfluß auf die Zellteilung festgestellt werden. Eine auffallende Wirkung zeigte das Actinomycin am lymphatischen System, besonders an der Milz, die sich verkleinerte. Nach Hackmann gehört Actinomycin zu den radiomimetischen Stoffen, d. h. es wirkt auf den Organismus ähnlich wie Röntgenstrahlen. Auf Grund dieser bemerkenswerten Befunde ist auf Vorschlag Hackmanns das Actinomycin C unter der Bezeichnung „HBF 386“⁵⁰) von G. Schulte⁵¹) klinisch erprobt worden.

Seine etwa dreijährigen Erfahrungen mit Actinomycin C hat Schulte⁵²) dahingehend zusammengefaßt, daß das Präparat „die Hodgkinsche Krankheit eindeutig auf dem Blutwege beeinflußt und in nicht zu fortgeschrittenen Fällen sämtliche Krankheitsherde beseitigen kann“. Er hat aber sehr nachdrücklich darauf hingewiesen, daß man in der Bewertung neuer cytostatischer Mittel nicht zurückhaltend genug sein kann und daß Anfangserfolge nicht zu vorzeitigem Optimismus verleiten dürfen. Nicht alle Lymphogranulomatose-Fälle sprechen auf Actinomycin C (HBF 386) an und nicht alle Fälle sind recidivfrei geblieben. Bemerkenswert ist aber, daß Recidive auf erneute Behandlung mit Actinomycin C wiederum günstig reagierten. Ein endgültiges Urteil über die Wirkung des Actinomycins C bei Lymphogranulomatose ist erst nach Vorliegen eines größeren Beobachtungsmaterials und längerer Beobachtungszeiten möglich.

⁴⁹⁾ Chr. Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 [1952]; Strahlentherapie 90, 296 [1953]. Diese Untersuchungen wurden im Werk Elberfeld der Farbenfabriken Bayer durchgeführt.

⁵⁰⁾ H. Brockmann, A. Bohne u. H. Friedrich, Dtsch. med. Wschr. im Druck.

⁵¹⁾ G. Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 [1952]; G. Schulte u. M. Lings, Strahlentherapie 90, 302 [1953].

⁵²⁾ G. Schulte, Röntgenologentagung, Stuttgart 9. 10. 1953.

Von großem Interesse ist die Frage, ob sich bei den einzelnen Actinomycinen Unterschiede im Verhältnis Heildosis: toxischer Dosis finden, die so beträchtlich sind, daß ein bestimmtes Actinomycin verdient, therapeutisch bevorzugt zu werden. Von Interesse ist ferner die Frage, ob sich durch chemische Umformungen der Actinomycine wirksame Derivate gewinnen lassen, deren Toxizität geringer ist als die der nativen Actinomycine. Mit Versuchen in dieser Richtung sind wir seit längerer Zeit beschäftigt.

Schluß

Die Actinomycine, entdeckt und isoliert an Hand ihrer antibiotischen Wirksamkeit und unbrauchbar als Antibiotica wegen ihrer Toxizität, haben sich dennoch schließlich

als bemerkenswerte Therapeutica entpuppt; ein Beispiel für die eingangs angeführte Überlegung, daß der bakterio-statische Test auch zu Verbindungen führen kann, deren medizinische Bedeutung auf anderen Gebieten liegt als dem der mikrobiellen Infektionen. Ein Beispiel aber auch dafür, daß die absolute Größe toxischer Dosen wenig oder gar nichts über den therapeutischen Wert einer Verbindung aussagt. Einer imponierend kleinen toxischen Dosis kann eine noch kleinere curative zugeordnet sein; entscheidend für die therapeutische Verwendbarkeit ist nur der Quotient $\frac{\text{dosis curativa}}{\text{dosis letalis}}$ und nicht die Kleinheit seines Nenners.

Eingeg. am 23. November 1953 [A 538]

Fortschritte auf dem Gebiet der organischen Aniono-Chemie

Von Prof. Dr. GEORG WITTIG

Chemisches Institut der Universität Tübingen

Nach einem Plenarvortrag auf der GDCh-Hauptversammlung in Hamburg am 17. September 1953

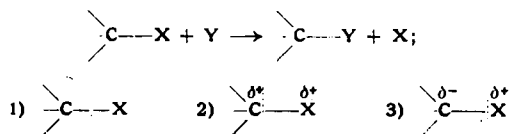
Die Methoden der Abspaltung eines Protons oder Halogen-Kations aus geeigneten organischen Verbindungen, die dabei in den metallierten bzw. anionisierten Zustand übergehen, werden an charakteristischen Beispielen dargelegt. Anschließend wird das reaktive Verhalten des anionischen Molekelrumpfes diskutiert, wobei die Erscheinungen der Isomerisation in den Vordergrund gerückt werden.

Mit der präparativen Auswertung der Vorgänge schließt der Bericht.

Einleitung

Bei einem Eingriff in die organische Molekel können davon berührte Atombindungen verschiedenartig aufgebrochen und wieder geknüpft werden. Entweder bilden sich dabei Radikale oder kationisierte bzw. anionisierte Formen, über die sich die ursprüngliche Verbindung zu einer neuen abwandelt. Ob diese Radikale bzw. Ionen als Träger der Umsetzung frei auftreten oder latent durch ein Reaktionsknäuel hindurchgehend ihre Wirksamkeit entfalten, bleibe ausdrücklich dahingestellt.

Am Beispiel der Substitution seien die drei Grundphänomene erläutert, die sinngemäß auch in die hier zu übergehenden Additionsprozesse¹⁾ hineinspielen. Bei der Verdrängung des Liganden X am Kohlenstoff durch das substituierende Y entsprechend dem Schema:



teilt sich entweder das bindende Elektronenpaar und bleibt mit einem Elektron am Kohlenstoff und mit dem anderen am austretenden X im Sinne einer radikalischen Substitution (Fall 1). Oder das Dublett löst sich zusammen mit dem austretenden Liganden X vom Kohlenstoff, wobei dieser intermediär positiv aufgeladen wird (Fall 2: nucleophile Substitution am kationisierten Molekelrumpf). Oder drittens das Dublett bleibt bei der Verdrängung von X am Kohlenstoff, der sich dabei vorübergehend negativ auflädt (Fall 3: elektrophile Substitution am anionisierten Molekelrumpf). Welche der drei Möglichkeiten zutrifft, hängt von der Natur des Liganden X und des Molekelrestes, ferner von der Art des substituierenden Y und

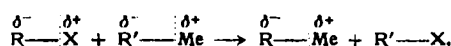
schließlich auch von den obwaltenden Bedingungen wie Lösungsmittel und Temperatur ab.

Während die Reaktionsweisen radikalischer und kationischer Formen umfassend bearbeitet sind und weiterhin auf breiter Grundlage untersucht werden, trifft das für die anionischen Zustände nur in begrenzten Bereichen zu. Hierher gehören metallorganisch geleitete Vorgänge der Addition bzw. Polymerisation und alkalisch ausgelöste Kondensationen etwa zu Aldolen oder β -Dicarbonyl-Verbindungen.

Hier soll nun ein Gebiet der Anionochemie abgesteckt werden, das bislang wenig beachtet wurde, und dessen präparative und theoretische Bedeutung sich erst abzeichnen beginnt. Es umschließt das Verhalten von Verbindungen, deren kationische Liganden X verhältnismäßig fest am Kohlenstoff haften, und die im Zustand der Anionisierung als besonders reaktionsfreudige Gebilde zu Umsetzungen mit neuen präparativen Perspektiven befähigt sind.

A. Methoden und Ablauf der Anionisierung

Voraussetzung zur Anionisierung derartiger Verbindungen ist natürlich die Kenntnis der Mittel und Bedingungen, die es gestatten, Protonen — um die es sich zumeist handelt — oder andere Kationen aus dem Molekelverband herauszuschlagen. Hierfür sind im grundsätzlichen Agenzien geeignet, deren anionischer Rest eine größere Affinität zum kationischen Liganden des Partners als dessen eigener Anionenrumpf besitzt. Besonders wirksame Anionisierer sind die alkalimetall-organischen Verbindungen ($\text{R}'\text{—Me}$), deren Metallsubstituenten ihr Elektron leicht abstoßen und daher die Anionisierung des ihnen zugeordneten Molekelrumpfes — namentlich im ätherischen Medium — begünstigen:



¹⁾ Vgl. K. Hamann, diese Ztschr. 63, 231 [1951].