

HANS BROCKMANN, GOTTFRIED PAMPUS und JOST HENRICH MANEGOLD

Actinomycine, XXI¹⁾; Antibiotica aus Actinomyceten, XLIII²⁾

Actinomycin X_{0β}; zur Systematik und Nomenklatur der Actinomycine

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 17. Februar 1959)

Actinomycin X_{0β}, dessen Gewinnung und Eigenschaften beschrieben werden, enthält neben Prolin ein Mol. Hydroxy-prolin. Dank dessen Hydroxygruppe kann Actinomycin X_{0β} im Gegensatz zu den anderen bisher bekannten Actinomycinen verestert werden. Dargestellt wurde ein kristallisiertes Monoacetat und Monopalmitat. – Die strukturellen Variationsmöglichkeiten im Peptidteil von Hydroxy-prolin und γ -Oxo-prolin enthaltenden Actinomycinen werden diskutiert und Nomenklaturfragen erörtert.

Das von verschiedenen *Streptomyces*-Stämmen unserer Sammlung produzierte, mit dem Buchstaben X gekennzeichnete Actinomycin-Gemisch³⁾ enthält neben X₁ und X₂⁴⁾ in kleiner Menge eine von uns als X₀ bezeichnete Fraktion, aus der wir, wie bereits kurz mitgeteilt⁵⁾, ein neues, als X_{0β} gekennzeichnetes Actinomycin abtrennen konnten. Zum Unterschied von den bisher bekannten Actinomycinen enthält es Hydroxy-prolin und läßt sich verestern. Im folgenden berichten wir ausführlicher über seine Darstellung und Eigenschaften.

Ausgangsmaterial war das aus Mycel und Kulturlösung mit Butylacetat extrahierte Actinomycingemisch einer 200-l-Kultur vom Stamm „Ital 1131“. Sie mußte im Oberflächenverfahren bebrütet werden, weil die Submerskultur des Stammes bisher nur geringe Actinomycin-Ausbeuten lieferte.

Eine gute präparative Trennung der X₀-Fraktion von Actinomycin X₁ und X₂ gelang durch Adsorption des rohen Actinomycingemisches aus Benzol an Aluminiumoxyd und Nachwaschen mit Äthylacetat. Dabei wurden Actinomycin X₁ und X₂ eluiert, während die X₀-Fraktion haften blieb und erst mit dem stärker eluotropen Aceton vom Adsorbens abzulösen war. Die weitere Auftrennung der X₀-Fraktion gelang durch Verteilungschromatographie an Cellulosesäulen im System Butylacetat/10-proz. (mit *m*-Kresotinsäure gesätt.) Natrium-*m*-kresotinatlösung. Aus einer der dabei entstehenden Zonen isolierten wir kristallisiertes Actinomycin X_{0β} vom Schmp. 245–247° (Zers., KOFLER-Block).

1) XX. Mittel.: H. BROCKMANN, H. GRÖNE und G. PAMPUS, Chem. Ber. **91**, 1916 [1958].

2) XLII. Mittel.: H. BROCKMANN und R. CÖLLN, Chem. Ber. **92**, 114 [1959].

3) H. BROCKMANN, H. LINGE und H. GRÖNE, Naturwissenschaften **40**, 224 [1953].

4) H. BROCKMANN und H. GRÖNE, Chem. Ber. **87**, 1036 [1954].

5) H. BROCKMANN und G. PAMPUS, Angew. Chem. **67**, 519 [1955].

Seine spezif. Drehung fanden wir mit $[\alpha]_D^{20}$: $-260 \pm 10^\circ$ (Aceton, $c = 0.2$) etwas kleiner als die von Actinomycin C₁ und X₂; und geringer als bei diesen beiden war auch die antibiologische Wirksamkeit. Gegen einen *B. subtilis*-Stamm, dessen Wachstum durch Actinomycin C₁ bis zur Verdünnung $1:2 \times 10^7$ gehemmt wurde, war Actinomycin X₀₃ bis zur Verdünnung $1:10^6$ wirksam. Für einen *St. aureus*-Stamm unserer Sammlung lag die hemmende Grenzkonzentration bei $1:5 \times 10^6$. Vergleich mit Actinomycin C₂ im Plattentest gegen *B. subtilis* ergab für Actinomycin X₀₃ eine zwanzigmal geringere Wirkung. Bei Toxizitätsprüfungen war Actinomycin X₀₃ mindestens viermal weniger giftig als Actinomycin C₃.

Im Totalhydrolysat des neuen Actinomycins haben wir ringchromatographisch Threonin, Valin, Prolin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin nachgewiesen, d. h. die gleichen Aminosäuren wie im Actinomycin C₁; ferner ein Abbauprodukt, dessen Zone mit Ninhydrin braun wurde und das sich nach J. B. JEPSON und J. SMITH⁶⁾ sowie durch sein Hochspannungs-Pherogramm⁷⁾ als das bisher in Actinomycinen noch nicht aufgefundene *Hydroxy-prolin* identifizieren ließ.

Abbau des Actinomycins X₀₃ mit Bariumhydroxyd lieferte Despeptido-actinomycin⁸⁾, das durch Schmp. und Misch-Schmp. seines kristallisierten, gelben Diacetates identifiziert wurde. Actinomycin X₀₃ hat demnach den gleichen Chromophor wie die Actinomycine C₁ (I₁), C₂, C₃ und X₂⁹⁾.

Mol.-Gew.-Bestimmungen durch Redox titration¹⁰⁾ mit Titan(III)-chlorid in 50-proz. Essigsäure ergaben die Werte 1305 und 1290 ± 30 , die innerhalb der Fehlergrenze mit den für Actinomycin C₁ und X₂ gefundenen¹¹⁾ übereinstimmen.

Bei quantitativen Aminosäureanalysen fanden wir in einem Jodwasserstoffhydrolysat von Actinomycin X₀₃: 1.5 Moll. α -Aminobuttersäure¹²⁾, 1.8 Moll. Valin, 1.8 Moll. *N*-Methyl-valin und 1.5 Moll. Prolin; in einem Salzsäurehydrolysat: 1.4 Moll. Threonin, 2.2 Moll. Sarkosin und 1.2 Moll. Prolin (bestimmt nach F. P. CHINARD¹³⁾). Danach enthält Actinomycin X₀₃ je 2 Moll. Threonin, Valin, Sarkosin und *N*-Methyl-valin. Da bei Testanalysen die nach F. P. CHINARD bestimmten Prolinzahlen rund 10% zu hoch lagen, läßt sich aus dem Prolinwert des Salzsäurehydrolysates schließen, daß im Actinomycin X₀₃ 1 Mol. Prolin vorhanden ist. Der höhere Prolingehalt des Jodwasserstoffhydrolysates ist offenbar auf eine teilweise Reduktion des Hydroxy-prolins zu Prolin zurückzuführen.

Nimmt man an, daß Actinomycin X₀₃ ein Mol. Hydroxy-prolin enthält und seine zehn Amino- bzw. Iminosäurebausteine wie beim Actinomycin C₃¹⁴⁾ in Form von zwei Peptid-Lactonringen säureamidartig mit den Carboxygruppen des Chromophors verknüpft sind, so errechnet sich auf Grund der obigen Zusammenstellung das Mol.-Gew. 1271.4. Mit ihm stimmen die gefundenen Werte 1305, 1290 ± 30 befriedigend

6) Nature [London] 172, 1100 [1953].

7) Nach TH. WIELAND und U. UNTERMEYER, Chem. Ber. 90, 1721 [1957], durch Vergleich mit authent. Proben von Hydroxy-prolin und *allo*-Hydroxy-prolin.

8) H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, Chem. Ber. 89, 1379 [1956].

9) H. BROCKMANN und K. VOHWINKEL, Chem. Ber. 89, 1373 [1956].

10) H. BROCKMANN und K. VOHWINKEL, Angew. Chem. 67, 618 [1955].

11) Die Messungen wurden in unserem Institut von Herrn HOCKS durchgeführt.

12) H. BROCKMANN, H. GRÖNE und J. TIMM, Naturwissenschaften 42, 125 [1955].

13) J. biol. Chemistry 199, 91 [1952].

14) H. BROCKMANN, G. BOHNSACK, B. FRANCK, H. GRÖNE, H. MUXFELDT und C. SÜLING, Angew. Chem. 68, 70 [1956].

überein. Auch der Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoff-Gehalt paßt gut auf die Formel $C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$. Aus dieser Übereinstimmung sowie aus der Tatsache, daß die spezif. Extinktion von Actinomycin $X_{0\beta}$ ($\alpha_{442 m\mu} = 18.9$, Methanol) innerhalb der Fehlergrenze mit der von Actinomycin C_1 ($\alpha_{442 m\mu} = 18.7$, Methanol) übereinstimmt, darf man schließen, daß Actinomycin $X_{0\beta}$ der obigen Annahme entsprechend nicht mehr als ein Mol. Hydroxy-prolin enthält.

Berechnung des Mol.-Gew. von Actinomycin $X_{0\beta}$

3-Amino-1.8-dimethyl-phenoazon-(2)-dicarbonsäure-(4.5) (Chromophor des Actinomycins $X_{0\beta}$)	$C_{16} H_{12} N_2 O_6$
2 Moll. Threonin	$C_8 H_{18} N_2 O_6$
2 Moll. Sarkosin	$C_6 H_{14} N_2 O_4$
2 Moll. Valin	$C_{10} H_{22} N_2 O_4$
1 Mol. Prolin	$C_5 H_9 N O_2$
1 Mol. Hydroxy-prolin	$C_5 H_9 N O_3$
2 Moll. <i>N</i> -Methyl-valin	$C_{12} H_{26} N_2 O_4$
	$C_{62} H_{110} N_{12} O_{29}$
	$H_{24} O_{12}$
	$- 12H_2O$
Summenformel von Actinomycin $X_{0\beta}$	$C_{62} H_{86} N_{12} O_{17}$

Wie schon erwähnt, unterscheidet sich Actinomycin $X_{0\beta}$ von den anderen Actinomycinen dadurch, daß es verestert werden kann. Mit Acetanhydrid/Pyridin erhielten wir ein kristallisiertes, gelbrotes Derivat, dessen Analysenzahlen gut auf ein Monoacetat der Actinomycin- $X_{0\beta}$ -Formel $C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$ passen. Es löst sich in unpolaren Solvenzien, wie zu erwarten, besser als Actinomycin $X_{0\beta}$ und wandert im Papierchromatogramm (Butylacetat + Dibutyläther (3:1)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinatlösung) schneller als dieses. Gegen *B. subtilis* fanden wir das Acetat bis zur Verdünnung $1:5 \times 10^5$ antibiotisch wirksam.

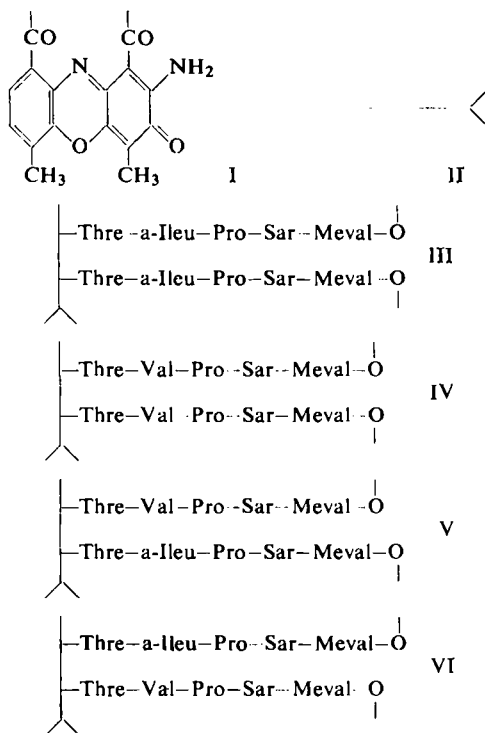
Das Monoacetat hat das gleiche Absorptionsspektrum wie unverestertes Actinomycin $X_{0\beta}$. Diese Übereinstimmung sowie der Befund, daß $X_{0\beta}$ beim Bariumhydroxydabbau Despeptido-actinomycin liefert, zeigte schon, bevor alle seine Amino- bzw. Iminosäurebausteine bekannt waren, daß die Veresterung von $X_{0\beta}$ nicht am Chromophor, sondern an einem Baustein des Peptidteils erfolgt. An welchem, hat die Auffindung des Hydroxy-prolins gezeigt. Daß bei der Veresterung nur *ein* Säurerest aufgenommen wird, bestätigt die oben angeführten Überlegungen, nach denen nicht mehr als ein Mol. Hydroxy-prolin vorliegen kann.

Als Beispiel eines Esters mit längerem Säurerest haben wir das Actinomycin $X_{0\beta}$ -monopalmitat dargestellt. Es kristallisiert in roten Nadeln vom Schmp. $194-196^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -219 \pm 10^\circ$; $\alpha_{442 m\mu} = 16.6$ in Methanol) und ist, wie zu erwarten, in Benzol erheblich leichter löslich als das Monoacetat.

Dank seiner großen Löslichkeit in unpolaren Solvenzien wandert das Palmitat in den zur Trennung der X-Actinomycine geeigneten Lösungsmittelsystemen mit der Lösungsmittelfront. Seine Wanderungsgeschwindigkeit läßt sich verringern, wenn man in Dibutyläther + Butanol (3:2)/15-proz. (mit *m*-Kresotinsäure gesättigter) Natrium-*m*-kresotinatlösung chromatographiert, einem System, in dem das Palmitat einen größeren R_F -Wert hat als Actinomycin C_2 und C_3 .

ZUR SYSTEMATIK UND NOMENKLATUR DER ACTINOMYCINE

Vor kurzem wurde für den Chromophor der Actinomycine C₁, C₂, C₃ und X₂ durch Abbau und Synthese¹⁵⁾ die Formel I bewiesen¹⁶⁾ und für den Peptidteil von Actinomycin C₃ eine Strukturformel¹⁴⁾ vorgeschlagen, deren Aminosäuresequenz inzwischen streng bewiesen werden konnte¹⁷⁾. Vereinfacht man die Chromophorformel I zum Symbol II (—NH₂ und C=O durch die rechts stehenden kürzeren Striche angedeutet) und dreht dieses im Uhrzeigersinn um 90°, so läßt sich die Aminosäuresequenz von Actinomycin C₃ durch die Formel III wiedergeben.



Die beiden C-terminalen *N*-Methyl-valin-Reste des Actinomycins C₃ sind mit den Hydroxygruppen der beiden Threonin-Reste verestert. Beobachtungen, die hier nicht erörtert werden sollen, führten vorläufig zu der Annahme^{14,16)}, daß jeder *N*-Methyl-valin-Rest mit dem Threonin der gleichen und nicht mit dem der anderen Kette verestert ist¹⁸⁾. Ob das eine oder andere der Fall ist, berührt die folgenden Überlegungen nicht und wurde in den Aminosäure-Sequenzformeln III–VI daher offengelassen.

¹⁵⁾ Und für Actinomycin X₀₃ in der vorliegenden Arbeit (s. oben).

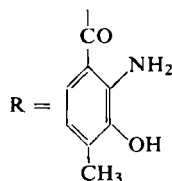
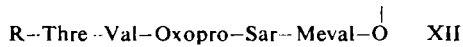
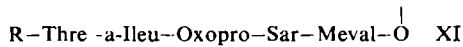
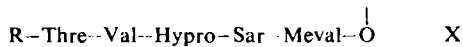
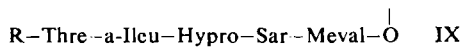
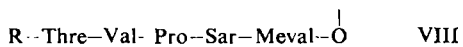
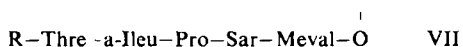
¹⁶⁾ H. BROCKMANN und H. MUXFELDT, *Angew. Chem.* **68**, 69 [1956]; *Chem. Ber.* **91**, 1242 [1958].

¹⁷⁾ H. BROCKMANN und P. BOLDT, *Naturwissenschaften* **46**, [1959], im Druck.

¹⁸⁾ Die endgültige Entscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten hoffen wir durch die Synthese des Actinomycins C₃ erbringen zu können, mit der unser Arbeitskreis beschäftigt ist.

Nachdem mit der Actinomycin-C₃-Formel III der allgemeine Bauplan der Actinomycine bekannt war, lag es nahe, Actinomycin C₁ nach IV und Actinomycin C₂ nach V oder VI¹⁹⁾ zu formulieren. Für Actinomycin C₁ wurde die Sequenz IV durch Abbaueversuche von E. BULLOCK und A. W. JOHNSON²⁰⁾ wahrscheinlich gemacht²¹⁾.

Die Beobachtung, daß die Actinomycin bildenden *Streptomyces*-Stämme neben den „Hauptactinomycinen“ C₁, C₂, C₃ und X₂ in geringer Menge eine Anzahl von „Nebenactinomycinen“ bilden⁴⁾, hat uns veranlaßt, in eingehenden Untersuchungen zu klären, innerhalb welcher Grenzen die *Streptomyces*-Stämme den Peptidteil der Actinomycine variieren können. Ein erstes Ergebnis bringt die vorliegende Arbeit mit der Feststellung, daß Prolin durch Hydroxy-prolin vertreten werden kann; ein zweites der kürzlich mitgeteilte Befund²²⁾, daß Actinomycin X₂ neben einem Mol. Prolin ein Mol. γ -Oxo-prolin enthält. Welche Konsequenzen sich daraus ergeben, zeigen folgende Überlegungen.



Thre = L-Threonin; Val = D-Valin; Pro = L-Prolin; Hypro = Hydroxy-prolin; Oxopro = γ -Oxo-prolin; Sar = Sarkosin; Meal = L-N-Methylvalin

Einer früher dargelegten Hypothese^{8,14)} nach entstehen die Actinomycine in der Zelle durch oxydative Kondensation von zwei *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methylbenzoyl]-peptiden, z. B. Actinomycin C₃ aus zwei Molekülen der Vorstufe VII, Actinomycin C₁ in entsprechender Weise aus VIII und Actinomycin C₂ aus VII und VIII²³⁾. Nimmt man an, daß die Zelle das Prolin in VII oder VIII zu Hydroxy-prolin oxydiert (oder dieses zuerst bildet und dann in die Peptidkette einbaut), so stehen neben VII und VIII zwei weitere Vorstufen für die Actinomycinsynthese zur Verfügung. Aus ihnen können, wenn die Zelle alle Kombinationsmöglichkeiten ausnutzt, zwölf Hydroxy-prolin-Actinomycine entstehen; acht mit *einem* und vier mit *zwei* Hydroxy-prolin-Resten. Bei allen diesen Actinomycinen werden wie beim Actinomycin X₀₃ die R_F-Werte in den bisher zur Chromatographie verwendeten Lösungsmittel-

¹⁹⁾ Vielleicht ist Actinomycin C₂ ein Gemisch aus V und VI, das sich mit den bisher bei der Verteilungschromatographie verwendeten Lösungsmittelsystemen nicht trennen läßt.

²⁰⁾ J. chem. Soc. [London] 1957, 3280; Actinomycin C₁ ist in dieser Arbeit mit dem Buchstaben D bezeichnet.

²¹⁾ Ein strenger Beweis, wie beim Actinomycin C₃¹⁷⁾ ist inzwischen gelungen; H. BROCKMANN, P. BOLDT und S. PETRAS, Naturwissenschaften 46, [1959], im Druck.

²²⁾ H. BROCKMANN und J. H. MANEGOLD, Naturwissenschaften 45, 310 [1958].

²³⁾ Der Weg, kompliziertere Verbindungen durch eine „Verdoppelungsreaktion“ aus gleichen oder sehr ähnlichen Vorstufen aufzubauen, wird auch bei der Biosynthese anderer Naturstoffe besprochen (z. B. Phoenicin, Hypericin, Actinorhodin, Penicilliolepin).

systemen klein sein. Man darf daher erwarten, daß sich aus den eingangs erwähnten Chromatogrammmzonen der X_0 -Fraktion weitere Hydroxy-prolin-Actinomycine gewinnen lassen werden, und das gleiche gilt für die Actinomycin-Fraktion C_0 , $C_{0\alpha}$ und $I_0^{4)}$.

Entsprechend den für Hydroxy-prolin angestellten Überlegungen lassen sich durch Kombination der beiden γ -Oxo-prolin enthaltenden Vorstufen XI und XII 1. untereinander und 2. mit den Vorstufen VII und VIII zwölf Oxo-prolin-Actinomycine aufbauen; acht mit *einem* Mol. und vier mit *zwei* Moll. γ -Oxo-prolin. Kombinationen schließlich, bei denen jeweils ein Molekül einer Hydroxy-prolin-Vorstufe (IX oder X) mit einem Molekül einer γ -Oxo-prolin-Vorstufe (XI oder XII) kondensiert, können zu insgesamt acht Hydroxy-prolin-Oxo-prolin-Actinomycinen führen.

Alles in allem hätte die Zelle allein dadurch, daß sie 1. D-Valin statt D-*allo*-Isoleucin und 2. Hydroxy-prolin bzw. γ -Oxo-prolin statt Prolin in die Peptidkette einbaut, die Möglichkeit, 32 verschiedene Actinomycine zu bilden; ein Ergebnis, das nicht nur fragen läßt, wie weit und mit welchen Mitteln die Zelle hier eine Auswahl trifft, sondern auch Zweifel aufkommen läßt, ob die bisherigen Trennungsverfahren ausreichen, um alle von der Zelle produzierten Actinomycine zu fassen.

Eine weitere Abwandlung des Peptidteils besteht darin, *N*-Methyl-alanin als Baustein zu verwenden, denn kürzlich beschrieben R. BOSSI, R. HÜTTER, W. KELLER-SCHIERLEIN und L. NEIPP²⁴⁾ ein Actinomycingemisch Z, dessen Komponenten Z_0 , Z_1 , Z_3 , Z_4 und Z_5 alle neben Threonin, Sarkosin, Valin und *N*-Methyl-valin auch noch *N*-Methyl-alanin enthielten, während Prolin fehlte.

Sehr bemerkenswert ist, daß man, wie G. SCHMIDT-KASTNER²⁵⁾ fand, Actinomycin bildende *Streptomyces*-Kulturen durch Verabreichung von Aminosäuren dazu bringen kann, den Peptidteil ihrer Actinomycine abzuändern. Durch Zusatz von DL-Isoleucin, Sarkosin und anderen Aminosäuren zur Kulturlösung ließ sich so eine größere Zahl neuer Actinomycine (z. B. E_1 , E_2 , F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5) gewinnen, deren Peptidstruktur wir gemeinsam mit G. SCHMIDT-KASTNER untersuchen.

Das eben Dargelegte führt notwendig zu der Frage, wie die Nomenklatur der Actinomycine am besten der weiteren Entwicklung auf diesem Gebiet angepaßt wird. Unsere jetzige Kennzeichnung durch Buchstaben und Indexzahlen ergab sich, als in unserem Institut aus den Actinomycingemischen C, X und I zum ersten Mal chromatographisch einheitliche Actinomycine gewonnen wurden⁴⁾. Nach dem Actinomycingemisch, dem sie entstammten, und nach der Reihenfolge ihrer R_F -Werte erhielten die Actinomycin-Fractionen die Bezeichnungen C_0 , C_1 , C_2 ; X_0 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ; I_0 , I_1 , I_2 , I_3 . Als sich dann C_0 , I_0 und X_0 weiter auftrennen ließen, wurden die Unterfraktionen durch zusätzliche kleine Buchstaben (z. B. $C_{0\alpha}$) gekennzeichnet. Da bei einem chromatographischen Vergleich in zwei Lösungsmittelsystemen [a) *n*-Dibutyläther + Butylacetat (1:3)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat; b) *n*-Dibutyläther + *n*-Butanol (3:2)/10-proz. Natrium-*m*-kresotinat] die Paare $C_{0\alpha}$ und $I_{0\alpha}$, C_1 und I_1 sowie C_2 und I_2 die gleichen R_F -Werte zeigten, wurden diese Paare vorläufig als identisch angesehen.

²⁴⁾ Helv. chim. Acta 41, 1645 [1958].

²⁵⁾ G. SCHMIDT-KASTNER, Naturwissenschaften 43, 132 [1956]; „Medizin und Chemie“, „Bayer“ Leverkusen, Verlag Chemie, Weinheim 1956, Bd. V, S. 463.

In größerer Menge als „Hauptactinomycine“ lagen in den Gemischen die Actinomycine C_1 ($=I_1$), C_2 , C_3 und X_2 vor, die bald darauf durch ihren Aminosäuregehalt genauer charakterisiert werden konnten²⁶⁾. Obgleich dadurch die Übersichtlichkeit verringert wird, hielten wir es für zweckmäßig, auch für die in kleiner Menge vorliegenden, für die Systematik der Actinomycine interessanten „Nebenactinomycine“ besondere Bezeichnungen einzuführen, was kürzlich von S. A. WAKSMAN, E. KATZ und L. C. VINING kritisiert wurde²⁷⁾.

Leider ist die Nomenklatur der Actinomycine dadurch unnötig kompliziert worden, daß G. G. ROUSSOS und L. C. VINING²⁸⁾ in einer Arbeit, in der sie nach unserem Verfahren verschiedene Actinomycingemische trennten, für das schon beschriebene Actinomycin $X_{0\beta}$ die Bezeichnungen A_1 und B_1 sowie für die noch länger bekannten und durch ihren Aminosäuregehalt bereits charakterisierten Actinomycine C_1 und X_2 die Bezeichnungen A_V und B_V bzw. A_{IV} und B_{IV} anwandten.

Eine weitere Komplikation würde es unseres Erachtens bedeuten, wenn man, wie S. A. WAKSMAN, E. KATZ und L. C. VINING²⁷⁾ neuerdings vorgeschlagen haben, die Actinomycine $X_{0\beta}$, C_1 , C_2 , C_3 und X_2 mit den Ziffern I, IV, V, VI und VII belegt. Wenn man schon eine neue Nomenklatur einführt, so sollte sie unserer Meinung nach die Struktur des Peptidteils zum Ausdruck bringen. Das könnte z. B. dadurch geschehen, daß Actinomycin C_3 als *iso*-Actinomycin-[Thre-a-Ileu-Pro-Sar-Meval] und Actinomycin C_2 als *aniso*-Actinomycin-[Thre- $[\frac{a}{\text{Val}}\text{Ileu}]\text{-Pro-Sar-Meval}]$ ²⁹⁾ bezeichnet wird. Sobald unsere Arbeiten über die Aminosäuresequenz einer Reihe zur Zeit untersuchter Actinomycine abgeschlossen sind, werden wir unsere Vorstellungen über die Systematik und Nomenklatur der Actinomycine ausführlicher darlegen.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, dem FONDS DER CHEMIE sowie den FARBENFABRIKEN BAYER, Werk Elberfeld, danken wir für großzügige Unterstützung unserer Arbeiten.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Gewinnung der Actinomycin- X_0 -Fraktion: 200 l Nährlösung, enthaltend 2 Vol.-Proz. Glycerin, 5 Vol.-Proz. Hefekochsaft (400 g Bäckerhefe in 2 l Wasser 20 Min. auf 120° erhitzt), 0,25 % Glykokoll, 0,1 % NaCl, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,01 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, wurden mit Phosphorsäure auf p_{H} 7,2 eingestellt, auf 200 P-Kolben verteilt, sterilisiert, mit einer Vorkultur des Stammes „Ital 1131“ beimpft und vier Wochen bei 30° gehalten.

Das von der Kulturlösung abfiltrierte, noch feuchte Mycel extrahierte man erschöpfend mit 10–15 l Aceton/Wasser (9:1), verdampfte die Hauptmenge des Acetons bei 60° Badtemperatur und geringem Unterdruck und extrahierte die restliche Lösung mit Butylacetat. Den Butylacetatauszug vereinigte man mit dem Butylacetatextrakt der Kulturlösung, verdampfte das Lösungsmittel bei geringem Unterdruck und extrahierte den Rückstand erschöpfend mit Benzol.

²⁶⁾ H. BROCKMANN, G. BOHNSACK und H. GRÖNE, *Naturwissenschaften* **40**, 223 [1953]; H. BROCKMANN, H. GRÖNE und J. TIMM, ebenda **42**, 125 [1953].

²⁷⁾ *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **44**, 606 [1957].

²⁸⁾ *J. chem. Soc. [London]* **1956**, 2469.

²⁹⁾ *iso*-Actinomycine haben zwei gleiche Peptid-Lactonringe, *aniso*-Actinomycine zwei verschiedene, vgl. l. c.⁸¹⁾.

Die Benzollösung filtrierte man durch eine Aluminiumoxydsäule (Akt.-Stufe II) und wusch mit Benzol nach, wobei die Actinomycine als gelbrote Zone im oberen Teil der Säule verblieben.

Nachdem Actinomycin X_1 und X_2 mit Äthylacetat eluiert waren, wusch man die X_0 -Fraktion mit Aceton ins Filtrat. Das Äthylacetateluat hinterließ beim Verdampfen 42 g eines Gemisches der Actinomycine X_1 und X_2 , während das Acetoneluat 5 g X_0 -Fraktion lieferte.

Abtrennung von Actinomycin $X_{0\beta}$: Die X_0 -Fraktion löste man in der oberen Phase des Systems Butylacetat/10-proz. Natrium-*m*-kresotinatlösung (durch Zugabe von *m*-Kresotinsäure auf p_H 5 eingestellt), verteilte die Lösung auf 6 Cellulosepulversäulen (40×3.6 cm; mit der unteren Phase des ebengenannten Systems befeuchtet) und wusch mit der oberen Phase nach. Dabei bildeten sich sieben Zonen aus, von denen die vierte von oben das Actinomycin $X_{0\beta}$ enthielt. Ihr Acetoneluat verdampfte man und nahm den Rückstand in Benzol/wäßr. Natriumhydrogencarbonat auf, wobei das Natrium-*m*-kresotinat sowie die *m*-Kresotinsäure in die wäßrige Phase gingen. Um die Löslichkeit des Actinomycin $X_{0\beta}$ in der wäßrigen Phase zu verringern, wurde diese mit Kochsalz gesättigt.

Das beim Verdampfen der Benzolphase hinterbleibende Actinomycin $X_{0\beta}$ kristallisierte aus Äthylacetat in gelbroten Rhomben vom Schmp. 245–247° (KOFLER-Block, kor.), Ausb. 1.1 g.

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{17}$ (1271.4) Ber. C 58.57 H 6.82 N 13.22 Gef. C 58.29 H 6.78 N 12.98

Actinomycin $X_{0\beta}$ -monoacetat: Eine Lösung von 70 mg Actinomycin $X_{0\beta}$ in 3 ccm Pyridin/Acetanhydrid (1:2) hielt man 24 Stdn. bei Raumtemperatur, verdampfte dann, ohne zu erwärmen, i. Hochvak., nahm den Rückstand in Benzol auf und gab die Lösung auf eine Säule von mit Salzsäure vorbehandeltem Aluminiumoxyd (Akt.-Stufe II). Nachdem mit Benzol nachgewaschen war, eluierte man mit Äthylacetat. Beim Einengen des Äthylacetateluates kristallisierte das Actinomycin $X_{0\beta}$ -monoacetat in gelbroten Rhomben vom Schmp. 240–242° (KOFLER-Block, kor.).

$C_{64}H_{88}N_{12}O_{18}$ (1313.4) Ber. $1 CH_3CO$ 3.28 Gef. *) CH_3CO 3.3

*) 2 Stdn. mit siedender wäßr. alkohol. *n* NaOH unter Stickstoff verseift. 0.9% Blindwert abgezogen.

Actinomycin $X_{0\beta}$ -monopalmitat: Zu einer Lösung von 100 mg Actinomycin $X_{0\beta}$ in 4 ccm Chloroform gab man unter Eiskühlung nacheinander 1.5 ccm wasserfreies Pyridin und 1.5 ccm *Palmitoylchlorid*, hielt 20 Min. bei Raumtemperatur und gab das mit 7 ccm Benzol verdünnte Reaktionsgemisch auf eine Aluminiumoxydsäule (Akt.-Stufe II). Mit Benzol/Äthylacetat ließ sich das *Monopalmitat* eluieren. Man erhielt es in roten Prismen, als der Verdampfungsrückstand des Eluates aus Benzol/Petroläther umkristallisiert wurde. Schmp. 194–196° (KOFLER-Block, kor.).

$C_{78}H_{116}N_{12}O_{18}$ (1509.8) Ber. C 62.05 H 7.75 N 11.13 Gef. *) C 61.72 H 7.71 N 11.05

*) Getrocknet 4 Stdn. bei 60° im Hochvak.

Abbau von Actinomycin $X_{0\beta}$ zu *Despeptido-actinomycin*: Zu einer Lösung von 100 mg Actinomycin $X_{0\beta}$ in 25 ccm Äthanol gab man 25 ccm siedendes, 6-proz. wäßr. $Ba(OH)_2$ und kochte noch 15 Min. unter Rückfluß. Dann verdünnte man mit 50 ccm Wasser, säuerte mit 2*n* HCl an, extrahierte mit Chloroform und gab den mehrmals mit Wasser gewaschenen, mit Natriumsulfat getrockneten Chloroformauszug auf eine Säule (3×25 cm) aus Kieselgel, das vorher mit 0.1*n* Essigsäure digeriert und dann 50 Min. auf 120° erhitzt worden war. Beim Eluieren mit Chloroform/Aceton (5:1) bildete sich eine breite, dunkelrote Zone und eine schwache, langsamer wandernde gelbe.

Das Eluat der roten Zone schüttelte man mit 5-proz. wäßr. Natriumhydrogencarbonatlösung durch, extrahierte die wäßr. Phase mehrmals mit Chloroform, säuerte sie an und

schüttelte mit Benzol durch. Die Benzollösung hinterließ beim Verdampfen *Despeptido-actinomycin*, von dem ein Teil zur Aufnahme des IR-Spektrums verwendet wurde. Den Rest löste man in 2 ccm *Acetanhydrid*, versetzte mit einem Tropfen 60-proz. Perchlorsäure, verdünnte nach 20 Min. mit Wasser, schüttelte mit Benzol aus und ließ den Verdampfungsrückstand der Benzollösung aus wenig Benzol kristallisieren. Gelbe, nadelförmige Kristalle, die allein sowie nach Zumischen von *Despeptido-actinomycin-diacetat* bei 189 bis 190° schmolzen.

HEINZ A. STAAB und GISELA SEEL

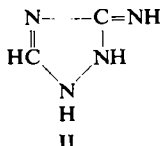
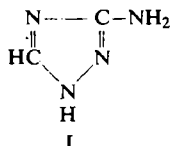
Transacylierungen, V¹⁾

Über *N*-Acyl-Derivate des 3-Amino-1.2.4-triazols

Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg
(Eingegangen am 20. Februar 1959)

Aus 3-Amino-1.2.4-triazol wird mit Acetylchlorid bei Raumtemperatur eine Monoacetylverbindung A erhalten, die nicht identisch ist mit dem Monoacetylderivat B, das bei der Neutralhydrolyse der Diacetylverbindung entsteht. Bei höherer Temperatur findet eine Acyl-Umlagerung $A \rightarrow B$ statt, die IR-spektroskopisch verfolgt wurde. Entsprechende Verhältnisse wurden bei den Benzoylderivaten beobachtet. Die Struktur der Mono- und Diacylderivate des 3-Amino-1.2.4-triazols wird auf Grund der IR-Spektren und der Reaktionseigenschaften dieser Verbindungen diskutiert.

Nach L. BIRKOFER²⁾ erhält man aus 3-Amino-1.2.4-triazol (I) beim Kochen mit Acetanhydrid ein Diacetylderivat, das schon durch reines Wasser bei Raumtemperatur unter Abspaltung einer Acetylgruppe zu einem Monoacetyl-3-amino-triazol hydrolysiert wird. Zur Erklärung der besonderen Reaktionsfähigkeit der einen Acetylgruppe wurde angenommen, daß es sich bei der Diacetylverbindung nicht um ein echtes Aminotriazol-Derivat, sondern um ein Derivat des tautomeren 1.2.4-Triazolon-(3)-imids (II) handle, für das in Analogie zu den Verhältnissen in der α -Aminopyridin-Reihe³⁾ eine besonders leichte Verseifbarkeit des ringständigen Acylrestes erwartet wurde.



¹⁾ IV. Mittel.: H. A. STAAB, Chem. Ber. **90**, 1326 [1957].

²⁾ Ber. dtsh. chem. Ges. **76**, 769 [1943].

³⁾ Vgl. E. TSCHITSCHIBABIN und J. G. BYLINKIN, Ber. dtsh. chem. Ges. **55**, 998 [1922].