

ZUR SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR DER ACTINOMYCINE, II <sup>1)</sup>.  
KONFORMATION UND NMR-SPEKTREN DER PENTAPEPTID-LACTONE <sup>\*)</sup>

Helmut Lackner

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

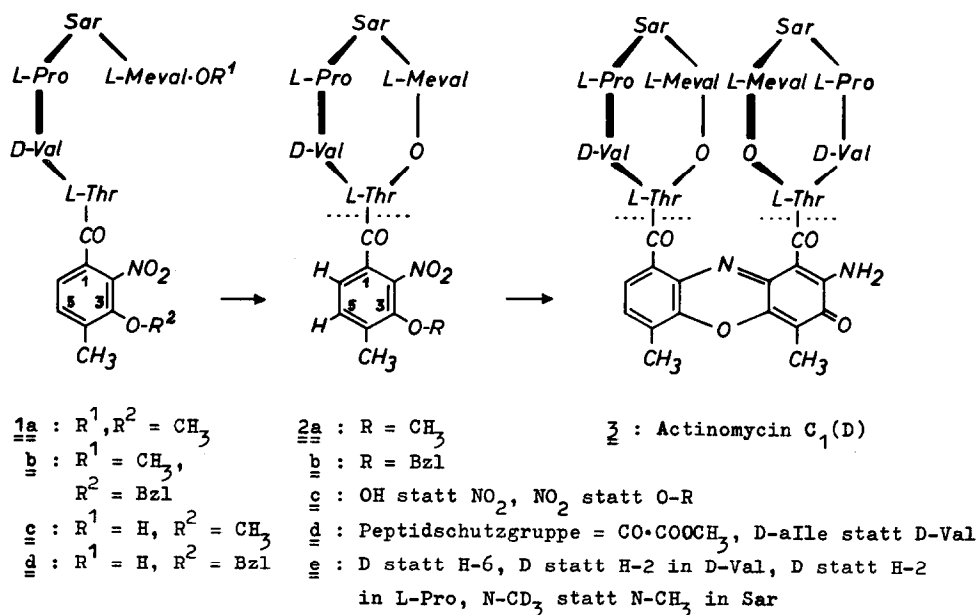
(Received in Germany 17 June 1970; received in UK for publication 3 July 1970)

Die Konformation der Pentapeptidlactongruppen eines Actinomycins (3) ist sowohl zum Verständnis der von einer günstigen Peptidkettenpräformierung abhängigen Lactonisierungsreaktion (1c → 2a <sup>2,3)</sup>) als auch für die Untersuchung der Assoziat- und Komplexbildung solcher Cyclopeptide von Interesse. Weiterhin bestimmt sie die Sekundärstruktur <sup>1)</sup> des Actinomycins, deren Kenntnis wiederum Aussagen über die Tertiärstruktur <sup>1)</sup> und damit auch über die Actinomycin-DNS-Wechselwirkungen <sup>4)</sup> und das Verhalten von Actinomycinen in Lösung gestattet.

Modellbetrachtungen und die weitgehende Aminosäuresequenz- und Stereospezifität der Lactonisierungsreaktion <sup>3)</sup> ließen für die 16-gliedrigen Lactonringe eine bevorzugte Konformation erwarten. Infolge der guten Löslichkeit synth. Peptidlacton-Derivate (2) <sup>5)</sup> in Chloroform und Benzol sowie der Schärfe ihrer Spektren schienen NMR-spektrometrische Untersuchungen erfolgversprechend. Als Solvens eignete sich CDCl<sub>3</sub> zunächst <sup>6)</sup> am besten, da es 1. für Vergleichsspektren sowohl Peptide wie 1a - 1d und deren Vorstufen (z.T. Hydrochloride) als auch die verschiedensten Actinomycine bei 20° gut löst und 2. die Assoziatbildung der Peptide weniger begünstigt als z.B. Benzol <sup>7)</sup>.

Da die N-terminalen Schutzgruppen am Cyclo-[L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-Me-val-O<sub>Thr</sub>], dem Peptidlacton von Actinomycin C<sub>1</sub>(D) (3), das Peptidspektrum praktisch nicht beeinflussen (Tab., Spalten 1-5), wurde für die Messungen neben 2b vorwiegend das einfachere, über 1a, 1c analog 2b <sup>5)</sup> synthetisierte 2a benutzt.

Im Spektrum von 2a (Abb.1 u. Tab., Sp.1) sind die C-CH<sub>3</sub>-Dubletts (o.77 - 1.00 ppm) von Val bzw. Meval durch Spinentkopplung [(NH) → H-2 → H-3 → CH<sub>3</sub>] und über ein 2e-Spektrum (vgl. unten) gut zuzuordnen; ähnliches gilt für CH<sub>3</sub>(Thr) (d 1.27), das mit H-3<sub>Thr</sub> (q 5.81) koppelt. Unter dem H-3, H-4<sub>Pro</sub>-Multiplett



(1.8 - 2.4) lassen sich die  $H-3_{Val}$ - und  $H-3_{Meval}$ -Signale durch Doppelresonanz lokalisieren.  $CH_3(ar.)$  (2.37) koppelt schwach mit  $H-5_{ar.}$  (7.39) und  $H-2a_{Sar}$  (d 3.05) geminal mit  $H-2b_{Sar}$  (d 4.75). Die für Tertiärstruktur-Analysen wichtigen  $N-CH_3$ -Signale von Meval (3.22) und Sar (3.39) wurden ebenso wie  $H-2_{Val}$  (4.39),  $H-2_{Pro}$  (4.85) und  $H-6_{ar.}$  (7.47) über das gezielt deuterierte  $\underline{2e}$  einwandfrei zugeordnet;  $NH_{Val}$  gibt hier ein Singulett (6.49). Die beiden  $H-5_{Pro}$  zeigen Multipletts bei 3.55 und 4.10 ( $CH_3O$ : 3.88), während die Signale von  $H-2_{Thr}$  [4.90; Kopplung mit  $NH_{Thr}$  (9.70) sowie H-3] und  $H-2_{Meval}$  (4.74) durch Doppel- und Trippelresonanz im Bandenkomplex der Aminosäure- $\alpha$ -protonen identifizierbar sind.

Die 0.09m  $\underline{2a}$ -Lösung wurde vor dem Messen 1 Min. mit 2-3 Tropfen  $D_2O$  geschüttelt und zentrifugiert; die Signalschärfe nimmt dadurch bei gleicher Lage (Tab., Sp.2) zu und zahlreiche Nebenbanden [Sp.2 ( )] verschwinden. Deren Intensität erreicht in trockenem Benzol (0.1m Lösung) - gemessen im  $N-CH_3$ -Bereich - maximal die der Hauptbanden, osmometrische Mol.-Gew.-Bestimmungen geben dann für  $\underline{2a}$  Werte um 1400 (ber. 675). Bei Verdünnung (0.018, 0.009, 0.0045 m) fallen Mol.-Gew. (1035, 925, 830) und Nebenbandenintensitäten im erwarteten Verhältnis ab. Somit liegen in trockenen Lösungen ( in  $CDCl_3$  etwas weniger ausgeprägt) offensichtlich  $\underline{2a}$ -Assoziate - wahrscheinlich Dimere - vor, die beim Schütteln

mit  $D_2O$  weitgehend zerlegt werden. Ähnlich verhalten sich  $2b$  -  $2e$ .

Ein Austausch der NH-Protonen erfolgt dabei noch nicht. Die Austauschgeschwindigkeit des vermutlich intramolekular gebrückt vorliegenden  $NH_{Thr}$ -Protons ( $\delta = 9.7$ , bei  $+60^\circ$  9.4 ppm; konzentrationsunabhängig) hängt im Gegensatz zu der von  $NH_{Val}$  stark von der Art der Schutzgruppe ab:  $2c, 2d$  5-10 Min.,  $2a, 2b$  1-2 Tage (50-proz. Austausch;  $CDCl_3/D_2O$ , im Röhrchen 1 Min. geschüttelt, zentrifugiert,  $20^\circ$ ). Das  $NH_{Val}$ -Proton zeigt bei Konzentrations- und Temperaturänderungen praktisch keine Signalverschiebung und ist gegen Austausch sehr stabil:  $CDCl_3/D_2O$  ca. 10-12 Monate ( $4^\circ$ );  $CDCl_3/CD_3OD(2:1)/Spur D_2O$  ca. 20 Stdn. ( $25^\circ$ );  $CDCl_3/CD_3COOD/D_2O(6:3:1)$  ca. 15 Min. ( $30^\circ$ ).  $NH_{Val}$  bildet demnach eine besonders feste intramolekulare Wasserstoffbrücke.

Mit DREIDING- (vgl. Abb.2) und COREY-PAULING(CPK)-Modellen aufgebaute  $2a$ -Molekülmodelle zeigen - planare trans-Amidbindungen (b,e,h,k) vorausgesetzt -, daß die sterischen Verhältnisse für eine gestreckte  $NH_{Val} \cdots OC_{Sar}$ -Wasserstoffbrücke prädestiniert sind (vgl.<sup>3</sup>); andere intramolekulare Acceptoren entfallen praktisch. Mit dieser transularen Brücke und dem stabilisierenden Prolinring

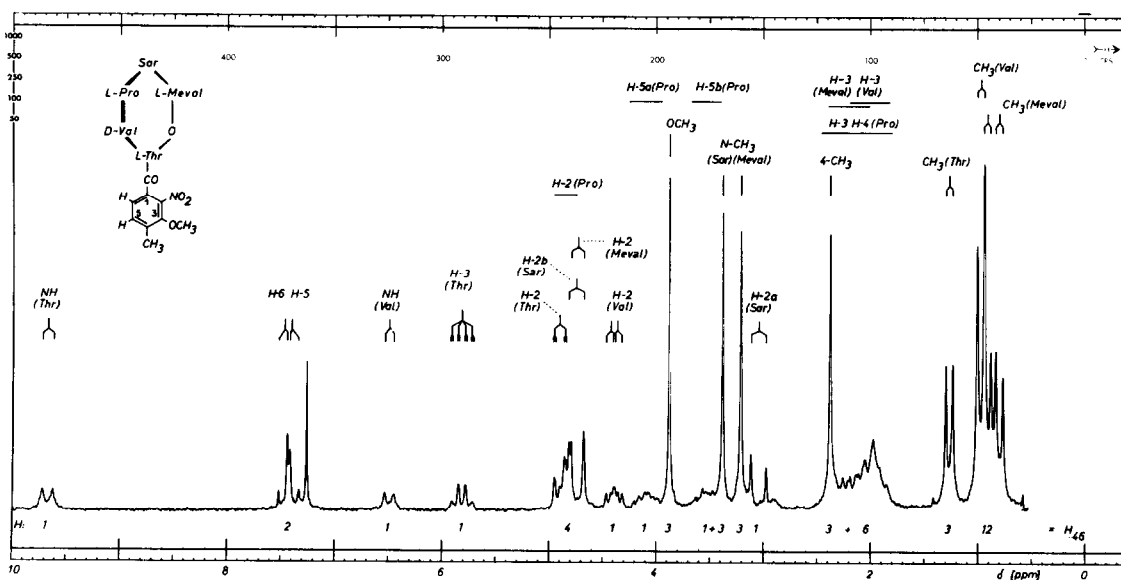


Abb.1. NMR-Spektrum <sup>8</sup>) von N-[2-Nitro-3-methoxy-4-methyl-benzoyl]-[cyclo-(L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O<sub>Thr</sub>)] in  $CDCl_3/D_2O$  (0.1m).

sowie unter Berücksichtigung der VAN-DER-WAALS-Radien liegt aber die Konformation des Peptidlactonringes bereits weitgehend fest (Abb. 2); lediglich der untere 9-gliedrige Teilring erlaubt kleinere Variationen. So kann  $\text{CO}_{\text{Meval}}$  zur Ringrückseite ( $b^{11}$ ) zeigen, was aber zu einer sterisch ungünstigen, quasi-axialen Stellung der Meval-isopropylgruppe führt. Weiterhin könnte  $\text{C-3}_{\text{Thr}}$  nach vorn durchklappen, das quasi-axiale  $\text{CH}_3(\text{Thr})$  würde dann zwar quasi-äquatorial, dafür stünden jedoch Peptidring- und Chromophorebene fast senkrecht aufeinander

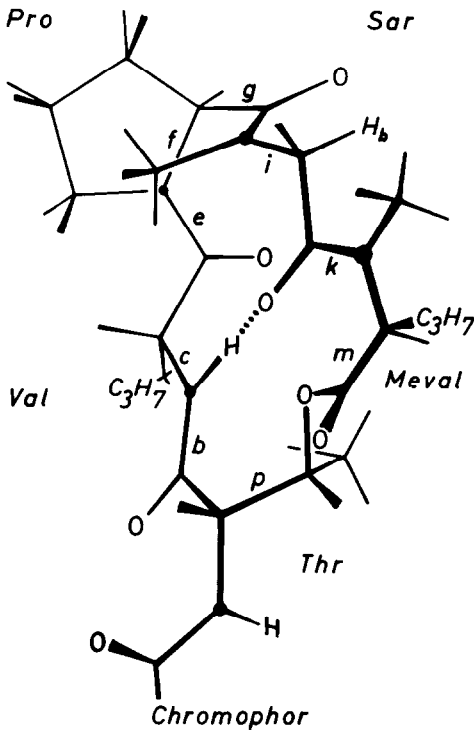


Abb.2. R-[cyclo-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-Meval-O<sub>Thr</sub>)], schemat.

(erschwerte Dimerenbildung, vgl. unten). Außerdem gibt das Actinomycin-NMR-Spektrum Hinweise, daß  $\text{CH}_3(\text{Thr})$  und  $\text{CH}_3(\text{Sar})$  nicht auf der gleichen Ringseite stehen. Die NMR-Spektren von 2a, b, c<sup>9)</sup>, d<sup>10)</sup> sind mit der in Abb.2 skizzierten Konformation in Einklang. Der  $\text{NH-CH}_{\text{Val}}$ -Torsionswinkel (Bindung c) weicht mit ca.  $120^\circ$  nur wenig von dem aus einem der KARPLUS-Funktion<sup>11)</sup> ähnlichen Diagramm (BYSTROW et al.<sup>12)</sup>) für  $J = 8.2$  Hz ermittelten Wert (0 oder  $150^\circ$ ) ab;  $\text{NH}$  und  $\text{H-2}_{\text{Thr}}$  sollten hiernach antiperiplanar stehen. Der Winkel  $\text{CH-CH}_{\text{Thr}}(p)$  muß bei  $J = 1$  Hz, dem Modell entsprechend, um  $90^\circ$  liegen; eine long-range-Kopplung  $\text{H-2}/\text{CH}_3(\text{Thr})$  zeigt sich nicht. Die Kopplungskonstanten von  $\text{H-2, H-3}$  in Meval (11.6) und Val (7.0 Hz) würden ebenfalls etwa der antiperiplanaren bzw. synclinalen Anordnung im CPK-Modell entsprechen. Der große  $\delta$ -Wert-Unterschied von  $\text{H-2a}/\text{H-2b}_{\text{Sar}}$  (1.71 ppm) rührt offenbar von einem "deshielding" des Protons  $\text{H}_b$  durch  $\text{C=O}_{\text{Pro}}$  her;  $\text{H}_b$  stünde dann - in Übereinstimmung mit dem Modell - zur Bindung h und damit zu  $\text{C=O}$  synperiplanar.

Für die Pentapeptidlactone 2a - c ergibt sich so eine vorläufige, jedoch recht wahrscheinliche Konformation (Abb.2), die durch laufende weitere Unter-

100 MHz-NMR-Spektren von Cyclo-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-N-Meval-O<sub>Thr</sub>)-Derivaten<sup>a)</sup>

Verbindung		<u>2a</u>	<u>2a</u>	<u>2b</u>	<u>2c</u>	<u>2d</u>	<u>1a</u>
Solvens		CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O <sup>b)</sup>	CDCl <sub>3</sub> <sup>c)</sup>	CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O <sup>b)</sup>	CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O <sup>d)</sup>	CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O <sup>d)</sup>	CDCl <sub>3</sub> <sup>b)</sup>
NH	Thr	9.70 (9.5)	9.55 (6.30)	9.70 (9.5)	9.90	9.80	7.26 (9.0)
NH	Val	6.49 (8.2)	6.48 (7.80)	6.50 (8.2)	6.36	6.53 <sup>e)</sup>	6.78 (9.5)
H-6		7.47 (8.0)	7.48 (7.22)	}	8.28	-	}
H-5		7.39 (8.0)	7.40 (7.14)		7.38/5.00	6.85	
BZL		-	-	}	-	-	}
H-3	Thr	5.81 (6.3/1.0)	5.81 (5.24)	5.82 (6.3/1.0)	5.85	5.75	4.56 (6.3)
H-2	Thr	4.90 (9.5/1.0)	4.90	4.90 (9.5/1.0)	5.03	4.76	4.43 (9/1)
H-2a	Sar	3.05 (14.0)	3.05	3.04 (14.0)	3.09	3.06	3.38 (16)
H-2b	Sar	4.75 (14.0)	4.75	4.73 (14.0)	4.75	4.77	4.66 (16)
H-2	Pro	4.80 - 4.90	4.80-4.90	4.80-4.90	4.9	4.85	4.9
H-2	Meval	4.74 (11.6)	4.76	4.74 (11.5)	4.74	4.78	4.83 (10)
H-2	Val	4.39 (8.2/7.0)	4.40	4.39 (8.2/7.0)	4.41	4.62 <sup>e)</sup>	4.58 (9/7)
H-5a	Pro	4.10	3.9 - 4.2	4.08	4.10	4.03	4.12
H-5b	Pro	3.55	3.4 - 3.7	3.52	3.5	3.5	3.65
CH <sub>3</sub> O		3.88	3.88 (3.82)	-	-	3.95	3.66
N-CH <sub>3</sub>	Sar	3.39	3.39 (2.91)	3.37	3.42	3.41	3.14
N-CH <sub>3</sub>	Meval	3.22	3.21 (3.28)	3.21	3.22	3.20	2.94
4-CH <sub>3</sub>		2.37 (<0.3)	2.38 (2.32)	2.36 (<0.3)	2.33	-	2.37
H-3	Meval	2.0 - 2.4	2.0 - 2.4	2.0 - 2.4	2.3	2.2	2.15
H-3	Val	1.8 - 2.2	1.8 - 2.2	1.8 - 2.2	2.1	1.75 <sup>e)</sup>	2.1
H-3/4	Pro	1.8 - 2.4	1.8 - 2.4	1.8 - 2.4	2.0	1.9	1.7 - 2.4
CH <sub>3</sub>	Thr	1.27 (6.3)	1.27 (1.18)	1.27 (6.3)	1.20	1.22	1.22 (6.3)
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Val	0.97 (6.3)	0.98 (1.07)	0.97 (6.4)	0.94	0.88 <sup>e)</sup>	} 0.96 (6) 0.96 (6)
		0.97 (6.3)	0.98	0.97 (6.4)	0.88	0.91	
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Meval	0.91 (6.6)	0.91	0.90 (6.5)	0.88	0.91	} 1.00 (6) 0.85 (6)
		0.80 (6.6)	0.80 (0.84)	0.80 (6.5)	0.80	0.81	

a) Interner Standard Tetramethylsilan; T = 32° C ; δ-Werte [ppm]; ca. 0.09M Lösungen.

b) In Klammern: J [Hz]. - c) In Klammern: δ-Werte von einigen Assoziatbanden. -

d) Auf nur 0.1 ppm genau angegebene δ-Werte bezeichnen breitere Multipletts (vgl. Spalten 1 und 3). - e) D-Ile statt D-Val; H-4 ca. 1.25; CH<sub>3</sub>: d 0.88, t 0.91.

suchungen (IR; NMR-Messungen an Vergleichssubstanzen etc.) noch verfeinert und bestätigt werden muß. Ändert sie sich beim Übergang von z.B. 2b in Actinomycin C<sub>1</sub>(D)<sup>3)</sup>(3) nicht, so ist dessen Sekundärstruktur<sup>1)</sup> damit bereits vorgezeichnet. Das durch Abbau von Actinomycin C<sub>3</sub> bzw. C<sub>2</sub><sup>10)</sup> erhaltene Peptidlacton 2d (D-Ile anstatt D-Val) hat sicherlich die gleiche Grundkonformation wie 2a - c (vgl. Tab.

Sp.5); auch für Peptidlactone anderer Actinomycine dürfte dies zutreffen.

Die 2a-Dimeren liegen, da die Intensität der NMR-Nebenbanden die der Hauptbanden nicht überschreitet und Peptid- und Chromophorsignale sich ähnlich verhalten, wahrscheinlich in der "face to back"(fb=bf)-Grundstruktur<sup>1)</sup> mit parallel ausgerichteten Partnern vor. Bei einer ff- oder bb-Tertiärstruktur sollten die Hauptbanden von Gruppen, die wie N-CH<sub>3</sub>(Sar) aus der Ringebene ragen, entweder ganz zu Nebenbanden werden (beide N-CH<sub>3</sub> innen; ff) oder wenig verändert (1 da außen; bb), jedoch nicht 1:1 aufgeteilt sein (je 1 N-CH<sub>3</sub> innen und außen).

Die sehr charakteristischen NMR-Spektren (vgl. dazu das des linearen 1b in Sp.6 der Tab.) erlauben sowohl eine sichere Identifizierung der Peptidlactone z.B. nach einem Actinomycinabbau oder in Extrakten von Kulturlösungen als auch die einfache Bestimmung von Cyclisierungsausbeuten bei Synthesen<sup>5)</sup>.

----

Herrn Professor Dr. Dr.e.h. H. Brockmann danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

#### REFERENCES

- \* ) Auszugsweise vorgetragen auf dem "V. BGZ-Symposium über Naturstoffchemie" vom 16.-18.9.1968 in Zürich (Schweiz).
- 1) I. Mitteil.: H.Lackner, Tetrahedron Letters (London) 1970.
  - 2) H.Brockmann und J.H.Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).
  - 3) H.Brockmann und H.Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).
  - 4) W.Kersten, H.Kersten und H.M.Rauen, Nature (London) 187, 60 (1960); W.Müller und D.M.Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251 (1968).
  - 5) H.Brockmann und H.Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968).
  - 6) Da hervorragende Eigenschaften der Actinomycine wie ihre Wechselwirkung mit DNS<sup>4)</sup> in wäßrigen Systemen beobachtet werden, wären Messungen in Wasser besonders interessant. Sie sind aber infolge geringer Löslichkeit der Cyclopeptid-Derivate sehr schwierig und werden an anderer Stelle diskutiert.
  - 7) In Benzol sind die C-Methyl-Signale besonders gut aufgelöst. Vgl. auch T. Victor, F.E.Hruska, C.L.Bell und S.S.Danyluk, Tetrahedron Letters (London) 1969, 4721.
  - 8) NMR-Spektrometer: HA-100, Fa. VARIAN Ass., Palo Alto (Calif.), U.S.A.
  - 9) Dissert. E.Schulze, Univ. Göttingen 1970.
  - 10) H.Brockmann und P.Boldt, Chem. Ber. 101, 1940 (1968).
  - 11) M.Karplus, J. Chem. Phys. 30, 11 (1959).
  - 12) V.F.Bystrow, S.L.Portnova, V.I.Tsetlin, V.T.Ivanov und Yu.A.Ovchinnikov, Tetrahedron 25, 493 (1969).