

ZUR SEKUNDÄR- UND TERTIÄRSTRUKTUR DER ACTINOMYCINE, III ¹⁾
SELEKTIV IM (α)- ODER (β)-PEPTIDLACTONRING DEUTERIERTE ACTINOMYCINE C₁(D)

Helmut Lackner

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

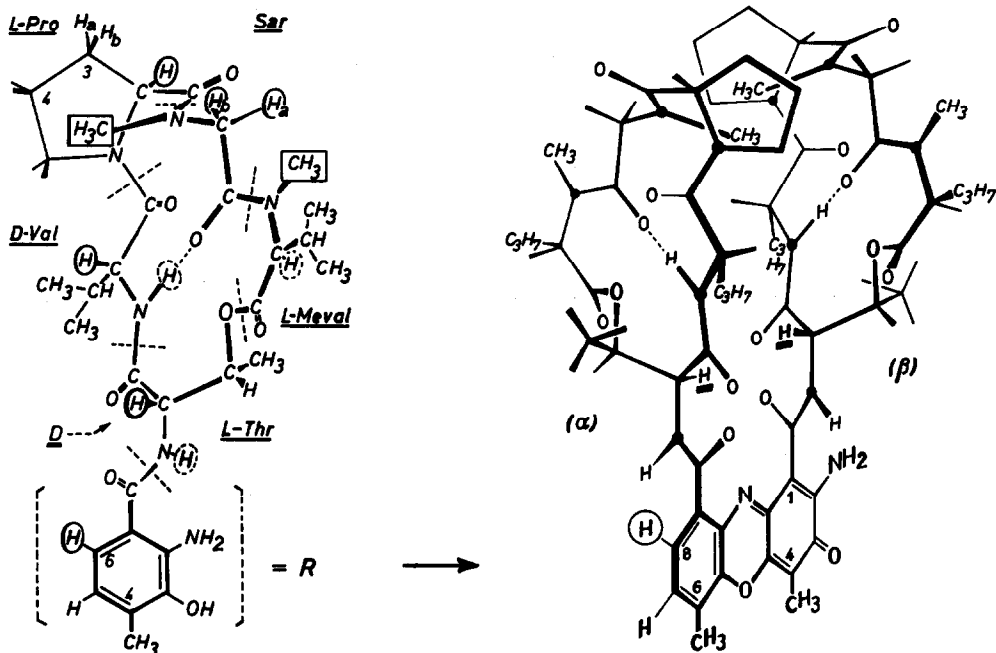
(Received in Germany 5 May 1971; received in UK for publication 17 May 1971)

Die unterschiedliche Stellung der beiden identischen Pentapeptidlactongruppen in α und β kompliziert das NMR-Spektrum von iso-Actinomycinen wie C₁ (2a) beträchtlich. Eine eindeutige, auch stellungsspezifische Zuordnung der Peptidsignale ist jedoch für die Identifizierung der Lactongruppen sowie zur Untersuchung ihrer Konformation, räumlichen Lage im Molekül und der intramolekularen Wechselwirkungen ebenso von Interesse wie für die Klärung der intermolekularen Komplexe (z.B. mit DNS ²⁾) oder Assoziatbildung von Actinomycinen. NMR-spektrometrische Vergleiche mit dem jeweiligen freien Peptidlacton (1a) und verwandten aniso-Actinocinyl-peptiden ³⁾ (2b, c) versprechen ebenfalls gute Ergebnisse.

Mit Hilfe üblicher NMR-Meßverfahren allein läßt sich die α- oder β-seitige Stellung eines Actinomycinprotons aus Spektren nicht ableiten, schon die Identifizierung der Signale nur eines Peptidringes wie in 1a ist oft schwierig (N-CH₃!). Solvens-, Temperatur- oder auch Peptidstrukturänderungen würden außerdem auf empfindliche Konformere, Assoziate und Komplexe unerwünscht einwirken. Als ideale Methode zur sicheren und detaillierten Spektrenanalyse erweist sich hier der Einsatz gezielt in α oder β deuterierter, synthetischer Actinomycine.

Für Untersuchungen von Wasserstoffbrücken eines Actinomycins ist zunächst die Zuordnung der vier NH-Dubletts (2a-Spektrum, Abb.) wichtig; Spinentkopplungen entscheiden nur zwischen N-H(Val) und N-H(Thr). Eine auch stellungsspezifische Identifizierung z.B. der beiden N-H(Thr)- und damit zugleich der 2-H-, 3-H- und CH₃(Thr)-Signale gelingt aber wie folgt:

L-Threonin wird durch vorsichtigen Austausch (D₂O/Acetanhydrid) an C-2 deuteriert und in den üblichen Synthesegang zu 1a ⁴⁾ gegeben. Das dann entstehende 1b führt bei oxydativer Mischkondensation mit an C-6 markiertem 1c - entsprechend dem kürzlich beschriebenen Verfahren zur Darstellung einheitlicher aniso-

1ab: D statt H an C-2(Thr)c: 6-D statt 6-H in R,

Lactongruppe geöffnet

d: NO₂ statt NH₂, OCH₃ statt OHe: Actinocin-(α oder β)-yl-(β oder α)-methylester statt R2a: Actinomycin C₁(D); Peptidlactonringe wie in 1ab: 8-D statt 8-H, (α)-Lactongruppe geöffnet,D statt H an C-2(Thr) in β c: (β)-Lactongruppe geöffnet, D statt H an C-2(Thr) _{α} d: D statt H an C-2(Thr) _{α} und C-2(Thr) _{β} e: Beide Lactongruppen geöffnet, 8-D statt 8-Hf: D statt H an C-8 und C-2(Thr) _{β} g: D statt H an C-2(Thr) _{α}

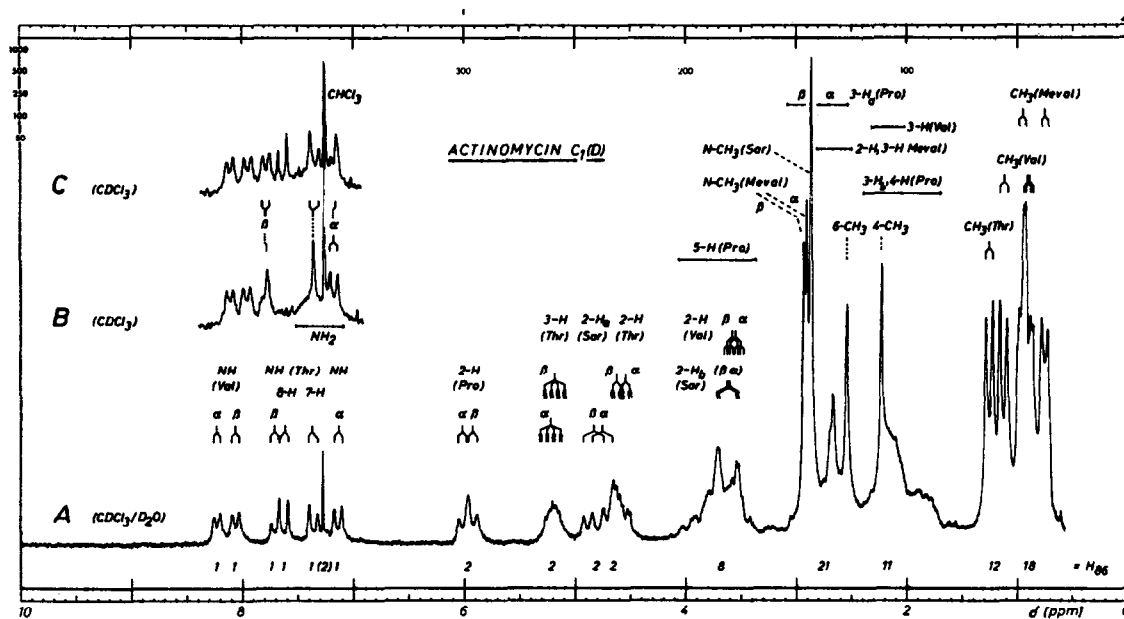
Actinomycine ³⁾ - zu vier an Cellulose trennbaren Produkten: Actinomycin C₁ mit 2-D(Thr) in α und β (2d), 8-Deutero-actinomycin C₁-säure (2e) sowie den Actinomycin C₁-säure-lactonen 2b [mit - laut NMR-Spektrum - D an C-8 des Actinocinyls, folglich dem Lactonring und somit 2-D(Thr) in β] und 2c [H an C-8, Lactonring und 2-D(Thr) in α]. Lactonisierung ⁵⁾ von 2b und 2c gibt die selektiv in β bzw. α an C-2(Thr) deuterierten Actinomycine 2f und 2g. Deren NMR-Spektren [Kurven B (2f) und C (2g); Abb.] erlauben nun, da im deuterierten Peptidring neben der 2-H(Thr)-Resonanz auch die Kopplungen 2-H/N-H und 2-H/3-H(\rightarrow CH₃) entfallen, eine einwandfreie α, β -Zuordnung der Threoninsignale (vgl. Tab.).

Mit Hilfe analog aufgebauter, mehrfach gezielt deuterierter Actinomycine C₁ (u.a. N-CD₃-Gruppen enthaltend, 1a) ließen sich auch die δ -Werte von N-H/2-H(Val),

2-H/3-H_a(Pro), 2-H₂(Sar), N-CH₃(Sar) und N-CH₃(Meval) stellungsspezifisch festlegen (Abb. u. Tab.)⁶⁾. Die Zuordnung für 8- bzw. 7-H(ar.) und damit für 6- und 4-CH₃ ergab sich zwanglos aus der C-8-Deuterierung (2f) und der 7-H/6-CH₃-Kopplung. Vergleiche mit Spektren von Actinomycin C₂, i-C₂ und C₃ (D-alle statt D-Val in β, α oder β u. α) bewiesen, daß jedem der CH₃(Val)-Signale bei 1.12 bzw. 0.91/0.89 ppm eine α- und eine β-ständige Methylgruppe zugrunde liegt. Dies gilt wahrscheinlich auch für die CH₃(Meval)-Dubletts.

Die so zunächst in CDCl₃ als für Vergleichsmessungen günstigstem Solvens⁷⁾ weitgehend und sicher zugeordneten Actinomycin C₁-signale (Abb.) werden bei Konzentrationsänderungen kaum verschoben (0.005 m Lösung: + 0 - 0.03 ppm), jedoch durch Schütteln der Probe mit D₂O (Tab.) merklich verschärft. Integrationen zufolge lagern sich dabei ca. 2 Moll. Wasser (δ = 2.1 ppm bei H₂O) ein, die wohl durch Brückenbildung die 2a-Sekundär- und Tertiärstruktur stabilisieren. Die NH→ND-Austauschgeschwindigkeiten (CDCl₃/CD₃OD, 2:1; 35°) fallen von NH₂ u. Thr_β zu Thr_α, Val_β u. Val_α (0.2, 0.2, 2, 4, 24 Std., 50proz. Aust.) stark ab.

Das detaillierte 2a-Spektrum gibt zusammen mit früheren Befunden¹⁾³⁾ und zahlreichen hier nur z.T. erwähnten Messungen an Vergleichssubstanzen gute Hinweise auf die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Actinomycins in Lösung:



100 MHz-NMR-Spektren von Actinomycin C₁(D) (A) sowie von 2f (B) und 2g (C) (Ausschnitte)

1. Die (α)- und (β)-Peptidlactonringe liegen wegen ihrer sehr weitgehenden Übereinstimmung in δ -Werten und Kopplungskonstanten - sogar peripherer Gruppen wie $\text{CH}_3(\text{Val}, \text{Meval})$ - offensichtlich in gleicher Konformation vor. Datenunterschiede, die z.B. bei Actinomycin-(Ser-val-Pro-Sar-Meval)⁸⁾ mit derselben Gerüstkonformation noch weiter abnehmen [u.a. nur ein $\text{NCH}_3(\text{Meval})$ -Signal], sind besonders für Protonen nahe dem Chromophor sicherlich durch dessen asymmetrische Struktur bedingt. Dies zeigt sich deutlich z.B. an 1e³⁾-Spektren.

2. Die Pentapeptid-Konformation in 2a dürfte nach Bandenlagen und Kopplungskonstanten im wesentlichen der in der II. Mitteil.¹⁾ für freie Peptidlactone (1d) erörterten entsprechen. Deren δ -Werte sind infolge gegenseitiger Abschirmung der Lactongruppen im Actinomycin (2a), aber auch schon in den Lactonsäuren 2b, c, über wiegend zu höherem Feld verschoben. Charakteristische 2a-Signale entsprechen bemerkenswert gut denen der abgeschirmten Innenprotonen von freien Pentapeptidlacton(1d)-Dimeren (CDCl_3)¹⁾, so z.B. die für $\text{NH}(\text{Val})$ [2a: 7.94, 8.10 / Dim. 7.80], $\text{H-3}(\text{Thr})$ [5.17, 5.21 / 5.24], $\text{NCH}_3(\text{Sar})$ [2.87 / 2.91] und $\text{CH}_3(\text{Val})$ [1.11 / 1.07 ppm]. Ähnliches gilt für Spektren in Benzol⁷⁾. Kleinere Veränderungen der Lactonringkonformation beim Übergang 1a \rightarrow 2a - etwa durch Ausbildung (α, β)-interanularer Wasserstoffbrücken seitens der NH -Protonen - oder in größerem Ausmaß bei der Komplexbildung von 2a mit DNS sind aber denkbar.

3. Die Peptidringe stellen sich zueinander wahrscheinlich in der "face to face"(ff)-Grundstruktur (vgl. I. Mitteil., Abb. 1, II⁹⁾) weitgehend fest ein, wobei die $\text{N-CH}_3(\text{Sar})$ -Gruppen innen liegen (2, 3). Die von II (1. Mitteil.) abgeleiteten Formen VI-VIII mit oberhalb des Chromophors liegend angeordneten Lactonringen erklären nicht deren wechselseitige Beziehungen (u.a. die δ -Wert-Verschiebungen gegenüber 1a). Auch läßt ein bereits vorhandener Ring (in 2b, c) die normale, bei freien Peptiden (wie in 1c) und Actinomycinsäuren (2e) gleiche Lactonisierungsausbeute auf das Doppelte (2b, c) ansteigen³⁾, während z.B. ein enantiomerer Lactonring die Reaktion hemmt. - Planparallele Einstellungen von Chromophor- und Peptidringebenen (V ⁹⁾) entfallen aus sterischen und NMR-spektroskopischen Gründen. Auch unsymmetrische fb- und bf-Formen (I, IV⁹⁾) scheiden infolge der für beide Peptidringe fast gleichen δ -Werte [vgl. dagegen die von 1d-Dimeren (fb/bf)¹⁾] aus. In diesem Fall würde man auch, dem Befund entgegen, für die seitlich aus der Ringebene ragenden Gruppen unterschiedliche

100 MHz-NMR-Spektren von Actinomycin C₁(D) (2a)^{a)}

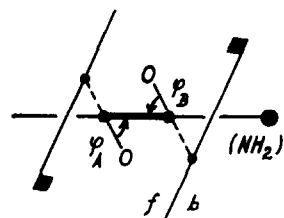
	CDCl ₃ /D ₂ O ^{b)}	CDCl ₃ ^{c)}		CDCl ₃ /D ₂ O	CDCl ₃
NH (Val _α)	8.22 (5.6) ^{d)}	8.10 (5.6)	5-H ₂ (Pro _{α,β})	4.1 - 3.4	4.2 - 3.4
NH (Val _β)	8.05 (5.6)	7.94 (5.6)	N-CH ₃ (Meval _α)	2.90	2.88
NH (Thr _α)	7.13 (7.0)	7.21 (6.8)	N-CH ₃ (Meval _β)	2.93	2.93
NH (Thr _β)	7.70 (7.0)	7.84 (6.6)	N-CH ₃ (Sar _{α,β})	2.86	2.87
8-H (ar.)	7.62 (8.0)	7.64 (8.0)	3-H _a (Pro _α)	2.70 (m)	2.70 (m)
7-H (ar.)	7.36 (8.0)	7.37 (8.0)	3-H _a (Pro _β)	2.90 (m)	2.90 (m)
NH ₂	-	7.0 - 7.5	3-H _a , 2-H (Meval _{α,β})	2.68 (m)	2.67 (m)
2-H (Pro _α)	6.00 (8.0)	6.03 (8.0)	3-H (Val _{α,β})	2.17 (m)	2.17 (m)
2-H (Pro _β)	5.92 (8.0)	5.98 (8.0)	3-H _b , 4-H ₂ (Pro _{α,β})	2.4 - 1.7	2.4 - 1.7
3-H (Thr _α)	5.22 (6.2/2)	5.21 (6.1/2)	6-CH ₃ (ar.)	2.54 (< 0.3)	2.55 (< 0.3)
3-H (Thr _β)	5.18 (6.2/2)	5.17 (6.1/2)	4-CH ₃ (chin.)	2.22	2.23
2-H _a (Sar _α)	4.74 (18)	4.73 (18)	CH ₃ (Thr _{α,β})	1.25 (6.2)	1.26 (6.2)
2-H _a (Sar _β)	4.82 (18)	4.79 (18)	CH ₃ a (Val _{α,β})	1.12 (6.5)	1.11 (6.4)
2-H (Thr _α)	4.54 (7.0/2)	4.50 (6.8/2)	CH ₃ b (Val _{α,β})	0.91 (6.6)	0.90 (6.5)
2-H (Thr _β)	4.63 (7.0/2)	4.60 (6.6/2)		0.89 (6.6)	0.89 (6.5)
2-H _b (Sar _α)	3.59 (18)	3.61 (18)	CH ₃ a (Meval _{α,β})	0.95 (5.3)	0.95 (5.3)
2-H _b (Sar _β)	3.61 (18)	3.62 (18)	CH ₃ b (Meval _{α,β})	0.75 (5.6)	0.74 (5.2)
2-H (Val _α)	3.55 (5.6/9)	3.53 (5.6/9)			
2-H (Val _β)	3.58 (5.6/9)	3.55 (5.6/9)			

- a) Interner Standard Tetramethylsilan; T = 32° C; δ-Werte (ppm); 0.05 - 0.06 m Lösungen.
 b) CDCl₃-Lösung 30 Sek. im Röhrchen mit einigen Tropfen D₂O geschüttelt und zentrifugiert.
 c) 2a fein zerrieben und 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet. - d) J (Hz).

Solvensshifts (CDCl₃ → Benzol) erwarten, die z.B. 1d-Dimere zeigen.

Für II⁹⁾ (=ff, vgl. 3) und damit gegen III(bb) sowie I und IV spricht, daß beim Übergang 1a → 2a die δ-Werte für beide N-CH₃(Sar) genau gleich und mit -0.53 ppm [1d-Dimeres: -0.48 für NCH₃(innen)] stärker verschoben werden als die von NCH₃(Meval) in der Ringebene (-0.29/0.32 ppm). Die CH₃(Thr)-Signale dagegen

bleiben unverändert (-0.02 ppm) und identisch (1d-Dim.: -0.1). Beide N-CH₃(Sar) sollten demnach innen (=ff; 2, 3) liegen und die ebenso magnetisch äquivalenten (α,β)-CH₃(Thr)-Gruppen auf den Ringaußenseiten (b). Entsprechend ist für NCH₃(Sar) der Solvensshift (CDCl₃ → C₆D₆) mit -0.06 ppm minimal [NCH₃(Meval): -0.65; CH₃(Thr): +0.35].



3: 2a von oben; ■ NCH₃-
(Sar)-Seite der Ebene

4. Die Partialkonformationen an den N-C2(Thr)-Bindungen ($\varphi_\alpha, \varphi_\beta$ ⁹⁾) dürften $J_{\text{CH-NH}_{\alpha,\beta}} = 7.0$ Hz entsprechend

gleich und aus räumlichen Gründen anticlinal sein, ändern sich aber mit der Aminosäure (Ser statt Thr _{α,β} : $J = 3 \text{ Hz}^{10}$). Wenn die Peptidringebenen, wie sterisch günstig, etwa parallel (IIa,b⁹) und $\varphi_\alpha, \varphi_\beta$ gleich sind, so müßten auch die Konformationen an φ_A, φ_B (3) ungefähr gleich sein. φ_A ist sicher nicht 180° [kein "deshielding" von 8-H durch 9-CO (Modellsubstanzen: +0.65 ppm)] und wie φ_B - sterisch bedingt - nicht 0° ; eine -synclinale Anordnung wäre denkbar(3).

Die kurz angeführten Befunde beweisen zwar eine wie in 2 skizzierte Sekundär- und Tertiärstruktur des Actinomycins in CDCl_3 noch nicht, geben aber gute Anhaltspunkte dafür. Spezielle Modellsubstanzen werden weitere Daten liefern.

Die selektive Deuterierung und die dadurch sehr sichere, vor allem stellungs-spezifische Zuordnung der NMR-Signale von 2a (und eng verwandten Actinomycinen wie C_2 , i- C_2 , C_3) erlauben es nun, die (α)- und (β)-Peptidlactongruppen bei Reaktionen eines Actinomycins getrennt zu beobachten und für Versuche gegebenenfalls unterschiedlich in α und β markierte Syntheseprodukte einzusetzen. Eine Untersuchung von Problemen wie die - besonders für aniso-Verbindungen wichtige - Stellung und gegenseitige Beeinflussung der beiden Peptidgruppen, die Vororientierung noch offener Peptidketten (in 2b,c z.B.) und das Verhalten freier Peptidlactone in Lösung (Dimerisierung) wird durch Verwendung gezielt deuterierter Substanzen sehr erleichtert und teilweise erst möglich.

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

REFERENCES

- 1) II. Mittel.: H.Lackner, Tetrahedron Letters (London) 1970, 3189.
- 2) Vgl. z.B. W.Müller und D.M.Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251 (1968).
- 3) H.Lackner, Chem. Ber. 103, 2476 (1970).
- 4) H.Brockmann und H.Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968).
- 5) H.Brockmann und J.H.Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).
- 6) Einzelheiten vgl. H.Lackner, Chem. Ber., in Vorbereitung.
- 7) Actinomycin C_1 (D)-Spektrum in Benzol: Vgl. auch T.A.Victor, F.E.Hruska, C.L.Bell und S.S.Danylyuk, Tetrahedron Letters (London) 1969, 4721.
- 8) H.Brockmann und H.Lackner, Tetrahedron Letters (London) 1964, 3517.
- 9) H.Lackner, Tetrahedron Letters (London) 1970, 2807.
- 10) Zur Abhängigkeit von $J_{\text{CH-NH}}$ /Torsionswinkel_{CH-NH} vgl. V.F.Bystrow, S.L.Portnova, V.I.Tsetlin, V.T.Ivanov u. Yu.A.Ovchinnikov, Tetrahedron 25, 493 (1969).