

ZUR KONSTITUTION DES ACTINOMYCINS Z<sub>5</sub>

Hans Brockmann und Ernst A. Stähler

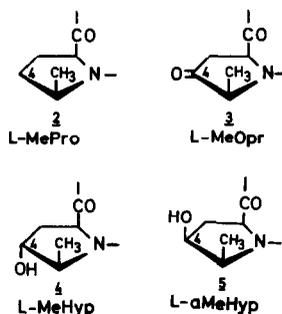
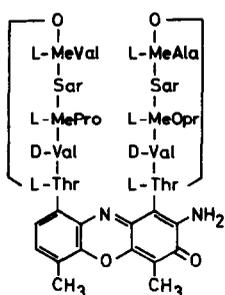
Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 25 May 1973; received in UK for publication 1 June 1973)

Aus dem Actinomycin Z-Gemisch<sup>1)</sup> eines Streptomyces fradiae Stammes ETH 20 675<sup>2)</sup>, das durch Chromatographie aus Äthylacetat an Aluminiumoxid IV weitgehend von Actinomycin Z<sub>1</sub><sup>1,3)</sup> befreit war, isolierten wir durch präparative Papierchromatographie (100 Bogen, Schleicher & Schüll 2043 b, Butylacetat/Diäthyläther/10 proz. wäbr. Natrium-m-kresotinat 3:1:4), und anschließende Säulenchromatographie der dabei erhaltenen Actinomycin Z<sub>5</sub>-Fraktion aus Benzol an Aluminiumoxid IV kristallisiertes Actinomycin Z<sub>5</sub><sup>1,4)</sup> mit Schmp. 257°,  $[\alpha]_D^{20}$ : - 298 ± 5° (c = 0.2, Methanol) und  $\lambda_{\max}$  442 nm (log  $\alpha$  1.24, Methanol). C<sub>62</sub>H<sub>84</sub>N<sub>12</sub>O<sub>17</sub> (1269.5) Ber. C 58.66 H 6.67 N 13.24 O 21.43; Gef. C 58.40 H 6.55 N 12.85 O 21.25. Gef. Mol Aminosäure<sup>3)</sup>: Thr 1.4<sup>5)</sup>, Val 1.9, Sar 1.8, MeVal 1.0, MeAla 0.9 sowie 0.9 Mol einer Aminosäure, deren Zone wie die von Prolin mit Ninhydrin gelb, mit Isatin blau wurde, jedoch schneller wanderte. Sie zeigte im Papierchromatogramm (absteigend Butanol/Phenol/Eisessig/Citratpuffer pH 6.4, 20:16:1:20, Laufzeit 12 h) den gleichen R<sub>F</sub>-Wert und im Hochspannungsspherogramm (pH 1.9, 2200 V/60-65 mA, Laufzeit 90 min) die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie ein aus 1.2-Dicarbäthoxy-5-methyl-pyrrolidin und Jodwasserstoffsäure gewonnenes 5-Methylprolin<sup>6)</sup>. R<sub>F</sub>-Werte im genannten System: 4-Methylprolin > 5-Methylprolin > 3-Methylprolin; Wanderungsgeschwindigkeit im Hochspannungsspherogramm: 3-Methylprolin > 5-Methylprolin > 4-Methylprolin. Damit war gezeigt, daß Actinomycin Z<sub>5</sub> ein Mol 5-Methylprolin enthält<sup>4)</sup>.

Im Totalhydrolysat des gleichen Actinomycin Z<sub>5</sub>-Präparates haben Katz und Mason<sup>7)</sup> neben Threonin, Valin, Sarkosin, Methylvalin und Methylalanin ebenfalls 5-Methylprolin nachgewiesen und zwar durch Vergleich (Aminosäure-Analysator, zweidimensionales Hochspannungsspherogramm, Gaschromatographie des Tri-

fluoracetyl-methylesters sowie dessen Massenspektrum) mit einem durch katalytische Hydrierung aus 2-Methyl- $\Delta^1$ -pyrrolin-5-carbonsäure dargestellten 5-Methylprolin<sup>8)</sup>. Da aus Analogiegründen anzunehmen war, daß die katalytische Hydrierung diastereoselektiv zum cis-5-Methylprolin führt, die Autoren zeigen konnten, daß sich die beiden Epimeren des 5-Methylprolins als N-Acetyl-methylester gaschromatographisch trennen lassen, und im Vergleichspräparat<sup>8)</sup> nur das eine der beiden Epimeren vorlag, kamen sie zu dem Schluß, daß im Totalhydrolysat des Actinomycins Z<sub>5</sub> cis-5-Methylprolin vorlag.

1a

b: MeVal und  
MeAla  
vertauscht

1c: MeVal statt MeAla, Pro statt MePro,  
Opr statt MeOpr

1d: MeVal statt MeAla, Pro statt MePro,  
Hyp statt MeHyp

Die Konstitution der zehnten Actinomycin Z<sub>5</sub>-Aminosäure ergab sich aus folgendem<sup>4)</sup>. 10 stdg. Erhitzen von Actinomycin Z<sub>5</sub> (50 mg) mit überschüssigem Aluminiumisopropylat in absol. Benzol/Isopropanol (1:3) lieferte ein Reduktionsprodukt mit unverändertem Actinomycinchromophor, das durch Ring-Papierchromatographie (Butylacetat/Dibutyläther/10 proz. wäbr. Natrium-m-kresotinat, 3:3:4) in zwei Fraktionen (Actinomycin Z<sub>5</sub>-I, 22 mg und schneller wanderndes Actinomycin Z<sub>5</sub>-II, 12 mg) aufgetrennt wurde.

Das Totalhydrolysat von Actinomycin Z<sub>5</sub>-I enthielt außer den Aminosäuren des Actinomycin Z<sub>5</sub>-Hydrolysates eine weitere, die im R<sub>F</sub>-Wert des Papierchromatogrammes (Butanol/Eisessig/Wasser, 4:1:7; Zone nach Vorbehandlung mit

Isatin und Besprühen mit Ehrlich's Reagenz rotviolett) sowie der Wanderungsgeschwindigkeit im Hochspannungspherogramm mit synthetischem 4-Hydroxy-5-methylprolin<sup>6)</sup> übereinstimmte. Und im Totalhydrolysat von Actinomycin Z<sub>5</sub>-II fanden wir neben den im Actinomycin Z<sub>5</sub> nachgewiesenen Aminosäuren eine weitere, die durch chromatographischen und pherographischen Vergleich mit einem synthetischen Präparat<sup>6)</sup> als 4-allo-Hydroxy-5-methylprolin identifiziert wurde. Danach ist die zehnte Aminosäure des Actinomycins Z<sub>5</sub> das bereits als Actinomycin Z<sub>1</sub>-Baustein nachgewiesene 4-Oxo-5-methylprolin<sup>6)</sup>, das im Actinomycin Z<sub>5</sub> wahrscheinlich ebenso wie dessen 5-Methylprolinrest 2 in der cis-Form vorliegt. Falls bei Umsetzung des Actinomycins Z<sub>5</sub> mit Aluminiumisopropylat keine Enolisierung und damit Epimerisierung an C-5 eintritt, wäre das 4-Hydroxy-5-methylprolin des Actinomycin Z<sub>5</sub>-I nach 4 zu formulieren und das 4-allo-Hydroxy-5-methylprolin des Actinomycin Z<sub>5</sub>-II nach 5.

Im Pherogramm der beiden 4-Hydroxy-proline wandert das allo-Epimere schneller. Gleiches gilt für ihre vergleichsweise langsamer wandernden 5-Methylderivate.

Bei der Reduktion mit Aluminiumisopropylat reagiert das 4-Oxo-prolin des Actinomycins X<sub>2</sub> (1c) stereoselektiver als das 4-Oxo-5-methylprolin des Actinomycins Z<sub>5</sub>. Denn während dieses das Actinomycin Z<sub>5</sub>-I und Actinomycin Z<sub>5</sub>-II liefert, gab Actinomycin X<sub>2</sub> nur das 4-Hydroxy-prolin enthaltende Actinomycin X<sub>0B</sub> (1d)<sup>9)</sup>.

Selektiver Abbau von Actinomycin Z<sub>1</sub>-säure mit konz. Salzsäure zeigte, daß N-Methylvalin und N-Methylalanin carboxyl-endständig sind<sup>4)</sup>. Steht Rest 3 des Actinomycins Z<sub>5</sub> ebenso wie der 4-Oxoprolinrest des Actinomycins X<sub>2</sub> (1c) im  $\beta$ -Peptidlactonring, so bliebe nur noch zwischen den Formeln 1a und 1b zu entscheiden, die mit den Analysenzahlen gut in Einklang stehen. Der in 1a und 1b angegebenen Konfiguration der Peptidlactonringe liegt die gut gestützte Annahme zugrunde, daß ein charakteristisches Merkmal aller nativen Actinomycine die Konfigurationssequenz LDL-L bzw. LD--L ist<sup>11,12)</sup>.

Antibiotisch wirksame Grenzkonzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) gegen B. subtilis: Actinomycin Z<sub>5</sub> 0.16, Actinomycin Z<sub>5</sub>-I 0,7, Actinomycin Z<sub>5</sub>-II 0.4, Actinomycin C<sub>3</sub> 0.08.

## REFERENCES

- 1) R.Bossi, R.Hütter, W.Keller-Schierlein, L.Neipp und H.Zähner, Helv. Chim. Acta 41, 1645 (1958).
- 2) Den Stamm verdanken wir den Herren W.Keller-Schierlein und H. Zähner, Zürich.
- 3) H.Brockmann und J.H.Manegold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343, 86 (1965).
- 4) E.A.Stähler, Dissertation Univ. Göttingen 1966.
- 5) Ein Teil des Threonins wird bei der zur Analyse erforderlichen Totalhydrolyse zerstört.
- 6) H.Brockmann und E.A.Stähler, Naturwissenschaften, 52, 391 (1965).
- 7) Die Herren E.Katz und K.T.Mason haben uns freundlicherweise das Manuskript ihrer Publikation übermittelt.
- 8) H.Gershon und A.Scala, J. Org. Chem. 26, 4517 (1961).
- 9) H.Brockmann und J.H.Manegold, Chem. Ber. 93, 2971 (1960).
- 10) H.Brockmann und H.Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).
- 11) H.Lackner, Tetrahedron Lett. 1970, 2807.