

3-HYDROXY-4-OXO-5-METHYLPROLIN ALS BAUSTEIN VON  
ACTINOMYCIN Z<sub>1</sub>

Hans Brockmann und Ernst A. Stähler

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 8 June 1973; received in UK for publication 6 August 1973)

Von den zehn Aminosäuren des Actinomycins Z<sub>1</sub><sup>1,2)</sup> findet man im 6 N HCl-Totalhydrolysat nur sieben. Ihrer Menge nach enthält Actinomycin Z<sub>1</sub> : 1 Mol Threonin, N-Methylalanin und N-Methylvalin sowie 2 Mol Valin und Sarkosin<sup>2,3)</sup>. Die dem Threonin analoge zweite  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxysäure und ebenso die beiden Aminosäuren mit der Sequenzzahl 3 werden bei der HCl-Totalhydrolyse zerstört. Die Struktur der beiden letztgenannten Peptidkomponenten ergab sich aus folgenden Befunden.

Actinomycin Z<sub>1</sub> (500 mg) lieferte mit überschüssigem Aluminiumisopropylat (Benzol/absol. Isopropanol 2 : 1, 12 h Rückfluß) zwei neue, gegen *Bac. subtilis* (Plattentest) antibiotisch unwirksame, durch Chromatographie (Aluminiumoxid IV/Äthylacetat, dann Cellulosepulver, Butylacetat/Butanol/Dibutyläther/5 proz. wäsr. Natrium-m-kresotinat, 6 : 1 : 1 : 8) getrennte, aus Benzol/Cyclohexan in gelbroten Nadeln kristallisierende Actinomycine<sup>4)</sup>.

Actinomycin Z<sub>1</sub>-I (190 mg) mit Schmp. 250°C (Zers.) ;  $\lambda_{\max}$  442 nm,  $\log E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  : 2.28 (Methanol). C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>N<sub>12</sub>O<sub>19</sub> (1317.5) Ber. C 57.44 H 6.73 N 12.76 ; Gef. C 57.14 H 6.75 N 12.40. Bei quantitativer Aminosäurebestimmung<sup>5)</sup>, Papierchromatogramm absteigend, Trennung von Thr, Val, Sar, MeAla, MeVal : Phenol/Butanol/Eisessig/0.05 M Citratpuffer pH 6.4 (8 : 20 : 1 : 20) ; Trennung von 4-Hydroxy-5-methylprolin (MeHyp) und allo-4-Hydroxy-5-methylprolin (aMeHyp) von den anderen Aminosäuren : Phenol/0.05 M Citratpuffer pH 6.4. Im Hochspannungschromatogramm wandert aMeHyp schneller als MeHyp. Aminosäuren, Gef. Mol : Thr 0.7, Val 1.9, MeHyp 0.9, Sar 1.8, MeVal 1.0, MeAla 0.9.

Actinomycin Z<sub>1</sub>-II (178 mg) mit größerem R<sub>F</sub>-Wert als Z<sub>1</sub>-I und Schmp. 249°C (Zers.) ;  $\lambda_{\max}$  442 nm,  $\log E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  : 2.28 (Methanol). C<sub>63</sub>H<sub>88</sub>N<sub>12</sub>O<sub>19</sub> (1317.5) Ber. C 57.44 H 6.73 N 12.76 ; Gef. C 56.90 H 6.70 N 12.43. Aminosäuren, Gef. Mol : Thr 0.7, Val 1.8, aMeHyp 0.8, Sar 1.9, MeVal 1.0, MeAla 0.9.

Im Jodwasserstoffsäure-Totalhydrolysat beider Actinomycine fanden wir 1.6 Moläquiv. 5-Methylprolin ; identifiziert durch Vergleich mit einem aus 1.2-Dicarbäthoxy-5-methylpyrrolidin und Jodwasserstoffsäure gewonnenen 5-Methylprolin<sup>4,6)</sup>. Papierchromatogramm

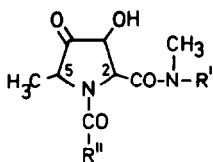
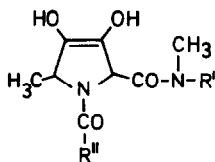
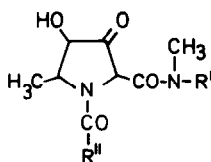
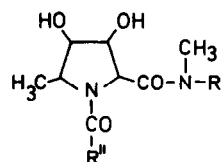
absteigend, Butanol/Phenol/Eisessig/Citratpuffer pH 6.4 (10 : 16 : 1 : 20) ;  $R_F$ -Werte : 4-Methylprolin > 5-Methylprolin > 3-Methylprolin ; Hochspannungsspherogramm, pH 1.9, 2200 V/60-65 mA, Laufzeit 90 min ; Wanderungsgeschwindigkeit : 3-Methylprolin > 5-Methylprolin > 4-Methylprolin.

Das Actinomycin  $Z_1$ -I/ $Z_1$ -II-Gemisch (450 mg) gab mit Acetanhydrid/Pyridin (2 : 1, Raumtemp.) zwei an Cellulosepulver (Butylacetat/Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat, 3 : 1 : 4) trennbare, aus Benzol/Cyclohexan kristallisierende Triacetate.

Actinomycin  $Z_1$ -I-triacetat (228 mg), Schmp. 252°C (Zers.) ;  $\lambda_{\max}$  442 nm,  $\log E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  2.25 (Methanol) ;  $[\alpha]_{578}^{20}$  : - 27  $\pm$  3° (c = 0.2, Methanol).  $C_{69}H_{90}N_{12}O_{23}$  (1439.6)  
Ber. C 57.57 H 6.30 N 11.68 O 24.45 3  $CH_3CO$  9.0 ; Gef. C 57.10 H 6.40 N 11.58 O 24.30.  $CH_3CO$  9.0. Aminosäuren, Gef. Mol. : Thr 0.7, Val 1.8, MeHyp 0.9, Sar 1.9 MeVal 0.9, MeAla 0.8.

Actinomycin  $Z_1$ -II-triacetat (178 mg) mit größerem  $R_F$ -Wert als  $Z_1$ -I-triacetat, Schmp. 253°C (Zers.) ;  $\lambda_{\max}$  442 nm,  $\log E_{1\text{ cm}}^{1\%}$  : 2.25 (Methanol) ;  $[\alpha]_{578}^{20}$  : - 41  $\pm$  3° (c = 0.2, Methanol).  $C_{69}H_{90}N_{12}O_{23}$  (1439.6) Ber. C 57.57 H 6.30 N 11.68 O 24.45 3  $CH_3CO$  9.0 ; Gef. C 57.15 H 6.70 N 11.38 O 24.85  $CH_3CO$  9.4. Aminosäuren Gef. Mol : Thr 0.7, Val 1.9, aMeHyp 0.9, Sar 1.8, MeVal 1.0, MeAla 0.9.

Daß man im HCl-Totalhydrolysat von Actinomycin  $Z_1$ -I bzw.  $Z_1$ -II 0.9 Moläquiv. 4-Hydroxy-5-methylprolin bzw. 0.8 Moläquiv. 4-allo-Hydroxy-5-methylprolin findet, beweist, daß Actinomycin  $Z_1$  ebenso wie Actinomycin  $Z_5$ <sup>6)</sup> einen 4-Oxo-5-methylprolinrest (**1b**) enthält<sup>4)</sup>. Und die Entstehung eines Triacetates aus Actinomycin  $Z_1$ -I und  $Z_2$ -II zeigt, daß der zweite mit Jodwasserstoffsäure zu 5-Methylprolin reduzierbare Baustein von Actinomycin  $Z_1$ -I und  $Z_1$ -II ein 3.4-Dihydroxy-5-methylprolinrest (**4**) ist.

1ab : H statt OHc :  $CH_3CO_2$   
statt OH2ab :  $CH_3CO_2$  statt  
OH an C-3c :  $CH_3CO_2$  statt  
OH an C-4d :  $CH_3CO_2$  statt  
OH an C-3 und C-43ab :  $CH_3CO_2$  statt  
OH4

Actinomycin  $Z_1$  liefert mit Acetanhydrid/Pyridin (2 : 1, Raumtemp.) innerhalb 2 h ein kristallisiertes Monoacetat <sup>2)</sup>, das sich unter den gleichen Bedingungen erst nach 96 h vollständig in ein kristallisiertes Diacetat verwandelt hatte. Im Gegensatz dazu war die Triacetylierung von Actinomycin  $Z_1$ -I und  $Z_1$ -II bereits nach 9 h beendet.

Aus diesen Befunden ließ sich schließen, daß Actinomycin  $Z_1$  einen Hydroxy-oxo-5-methylprolinrest 1a oder 3a enthält und das zunächst entstehende Monoacetat 1c bzw. 3b über ein sich langsam bildendes Enol 2b bzw. 2c zum Diacetat 2d wird.

Das 100 MHz NMR-Spektrum ( $CDCl_3$ ) von Actinomycin  $Z_1$  <sup>7)</sup> zeigt ein Singulett bei  $\delta = 5.87$  ppm, wie es für das 2-H von 1a zu erwarten ist, nicht aber für das 2-H von 2a oder 3a; d. h., wenn ein Tautomeriegleichgewicht 1a  $\rightleftharpoons$  2a  $\rightleftharpoons$  3a existiert, dominiert darin ganz überwiegend 1a.

Mit der Annahme, daß im Actinomycin  $Z_1$ -diacetat die Struktur 2d vorliegt, stehen folgende Befunde in Einklang: 1. Bei katalytischer Hydrierung (Eisessig/Pt) nimmt Actinomycin  $Z_1$  wie alle anderen Actinomycine unter Reduktion des chinoiden Chromophor-ringes schnell 1 Moläquiv. Wasserstoff auf, Actinomycin  $Z_1$ -diacetat dagegen 2 Moläquiv. 2. Bei der Redox titration in 90 proz. Essigsäure mit 0.01 N  $TiCl_3$  verbraucht Actinomycin  $Z_1$  wie alle anderen Actinomycine <sup>8)</sup> 2 Moläquiv.  $TiCl_3$ , das Diacetat dagegen in zwei Stufen je 2 Moläquiv.

1a und 1b liegen entsprechend der für alle nativen Actinomycine charakteristischen Konfigurationssequenz LDL-L bzw. LD- - L <sup>9, 10)</sup> zweifellos in der L-Konfiguration vor. Da im 5-Methylprolin des Actinomycins  $Z_5$  die Methyl- und Carboxylgruppe cis-konfiguriert sind <sup>11)</sup>, darf man annehmen, daß gleiches auch für den 4-Oxo-5-methylprolinrest (1b) und den 3-Hydroxy-4-oxo-5-methylprolinrest (1a) von Actinomycin  $Z_1$  gilt.

Konz. Salzsäure spaltet bei 80° (25 min) die Actinomycinpeptidlactonringe bevorzugt zwischen Sarkosin und der lactonisierten N-Methylaminosäure <sup>12)</sup>; und Actinomycinsäuren dementsprechend unter selektiver Ablösung der beiden C-terminalen N-Methylaminosäuren. Lactonspaltung von Actinomycin  $Z_1$  (500 mg) mit 5 n Natriumethylat <sup>13)</sup> gab Actinomycin  $Z_1$ -säure (390 mg) mit  $E_1^{1\%}$ : 178 (Methanol) und  $[\alpha]_D^{20}$ :  $-68 \pm 3^\circ$  (c = 0.2, Methanol). Gef. C 55.08, H 6.55, N 11.94, O 24.67; Aminosäuren, Gef. Mol: Thr 0.7, Val 1.8, Sar 1.6, MeVal 1.0, MeAla 0.8.

Erhitzen mit konz. Salzsäure (80°/25 min), Chromatographie des Verdampfungsrückstandes aus Wasser an saurem Aluminiumoxid, Verdampfen des Eluates und Chromatographie des Rückstandes (Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 7) sowie Elektrophorese bei pH 1.9 gab neben wenig Sar nur MeVal und MeAla in annähernd gleichen Mengen. MeAla hat demnach im Actinomycin  $Z_1$ , wie erwartet, die Sequenzzahl 5.

Über Befunde, nach denen der  $\beta$ -Peptidlactonring 1 Mol N-Methylthreonin enthält und für Actinomycin Z<sub>1</sub> demnach die mit den Analysenzahlen gut in Einklang stehende, den Formeln der oben beschriebenen Derivate zugrundeliegende Summenformel  $C_{63}H_{84}N_{12}O_{19}$  gilt, berichtet eine folgende Mitteilung.

## REFERENCES

1. R. Bossi, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp und H. Zähler, Helv. Chim. Acta 41, 1645 (1958).
2. H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343, 86 (1965).
3. E. A. Stähler, Dissertat. Univ. Göttingen 1966.
4. H. Brockmann und E. A. Stähler, Naturwissenschaften 52, 391 (1965).
5. Aminosäurebestimmung nach H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 343, 90 (1965); ein Teil des Threonins wird bei der Totalhydrolyse zerstört.
6. H. Brockmann und E. A. Stähler, Tetrahedron Lett. 1973, 2567.
7. Das NMR-Spektrum verdanken wir Herrn Doz. Dr. H. Lackner.
8. H. Brockmann und K. Vohwinkel, Angew. Chem. 67, 618 (1955).
9. H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).
10. H. Lackner, Tetrahedron Lett. 1970, 2807.
11. E. Katz, K. T. Mason und A. B. Mauger, Biochem. Biophysical Research Communications 52, 819 (1973).
12. H. Brockmann und W. Sunderkötter, Naturwissenschaften 47, 229 (1960).
13. H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).