

<sup>13</sup>C-NMR-SPEKTREN DER PENTAPEPTIDLACTONRINGE VON ACTINOMYCINEN

Helmut Lackner

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Received in Germany 8 April 1975; received in UK for publication 25 April 1975)

Die roten, bakteriostatisch und antineoplastisch hochwirksamen Actinomycine enthalten zwei Pentapeptidlactongruppen (Abb.1), die - eng benachbart - über Amidbrücken mit einem 2-Amino-phenoxazinon-Chromophor verknüpft sind. In der Zelle bilden Actinomycine Komplexe mit

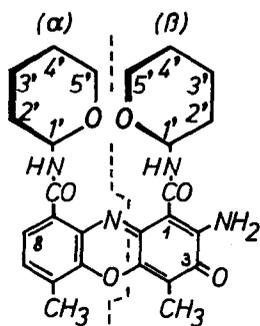


Abb.1. Struktur der Actinomycine. 1'-5': Aminosäurereste wie L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal (=Actinomycin C<sub>1</sub>) (1)

der DNA, was zu einer Behinderung der DNA-abhängigen Proteinbiosynthese führt. Über die Raumstruktur solcher Komplexe und damit auch des komplexierten Actinomycin-Moleküls gaben u. a. röntgenstrukturanalytische Modelluntersuchungen Auskunft <sup>1)</sup>.

Ausgedehnte <sup>1</sup>H-NMR-Messungen <sup>2)</sup> haben gezeigt, daß die Konformationen der beiden (α)- und (β)-Peptidlactongruppen eines gelösten iso-Actinomycins wie 1 praktisch gleich und ganz überraschend stabil sind.

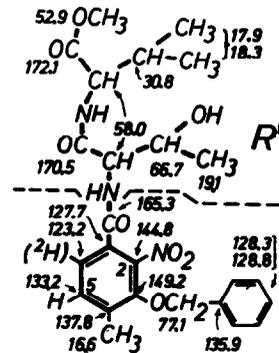
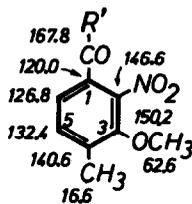
Letzteres ist u. a. durch die Klammerwirkung des Chromophors und eine gegenseitige Abstützung der Peptidringe über zwei feste (α,β)-interannulare Wasserstoffbrücken bedingt. Verhindert man deren Ausbil-

dung <sup>3)</sup> oder löst man den Peptidlactonring aus dem Molekülverband ("halbirtetes" Actinomycin vgl. Abb.1), so wird die Peptidringkonformation solvensabhängig. <sup>1</sup>H-NMR-Messungen an deuterium-markierten, synth. Pentapeptidlactonen <sup>4,5)</sup> (Abb.2) ließen darauf schließen, daß dann zwei definierte Konformere auftreten: der "C"-Typ und der "A"-Typ <sup>3)</sup>.

Unsere <sup>13</sup>C-NMR-Messungen <sup>6,7)</sup> an freien Pentapeptidlacton-Derivaten wie 2c und 3d, 3e sowie einigen Vorstufen davon bestätigten die <sup>1</sup>H-NMR-Befunde. Da die Acylschutzgruppe der Peptide 2,3 zugleich eine Vorstufe des Actinomycin-Chromophors ist, wurden auch deren Signale - vor allem im Hinblick auf Einflüsse der Peptidkettenlänge und des Solvens - genauer vermessen (Tab.2). Die Zuordnung für C-5 und C-6 ergab sich aus "off-resonance"-Daten und der

Deuterierung an C-6<sup>8)</sup>. Die  $\delta_C$ -Werte der freien (2a) und der peptidverknüpften Säure (2b, c; Tab. 2) sind - u. a. durch eine Verdrehung der 1-CO-Gruppe in 2b, c aus der Ringebene mitbedingt - stärker verschieden.

Da der Konformationswechsel des Pentapeptidlactons - ähnlich wie im <sup>1</sup>H-Spektrum<sup>3)</sup> - ungewöhnlich starke Bandenverschiebungen (Abb. 3) zur Folge hat, ist für detailliertere Studien der Konformer eine absolut sichere Zuordnung der Signale Vorbedingung. Rückschlüsse von kürzer- auf länger-kettige Peptide, vor allem aber von linearen auf cyclische Peptide erwiesen sich als viel zu ungenau oder gar unmöglich. Die Signale der Pentapeptid-Derivate wie 2b und 2c/2d mußten, ebenso wie die der verschiedenen Konformer, stets wieder neu identifiziert werden (Tab. 1). Dies geschah durch a) partielle Protonenentkopplung ("off-resonance"), b) selektive <sup>1</sup>H-Entkopplung, deren Grundlagen die über selektiv deuterierte Peptide (vgl. Abb. 2) zugeordneten <sup>1</sup>H-Spektren waren, und c) direkte <sup>13</sup>C-Messungen an spezifisch markierten Pentapeptidlactonen wie z. B. 3e. - Abb. 3 und Tab. 1 zeigen die Lage aller <sup>13</sup>C-Signale vom "C"- und vom "A"-Konformer des isolierten Pentapeptidlactons 3d, welches die für Actinomycin C<sub>4</sub> (D) typische Aminosäuresequenz enthält (Abb. 2). Die durch den Konformationswechsel verursachten, bemerkenswert starken Signalverschiebungen sind denen der <sup>1</sup>H-Signale<sup>3)</sup> analog, lassen sich aber z. Zt. erst teilweise deuten. So geht beispielsweise aus den C-3- und C-4-Signalen des Prolinringes - verglichen mit anderen an Prolinpeptiden gewonnenen Daten<sup>9)</sup> - hervor, daß die Val→Pro-Bindung im "C"-Konformer trans-, im "A"-Typ dagegen cis-ständig sein sollte. Die schon früher aus den <sup>1</sup>H-Daten abgeleitete Vermutung<sup>3)</sup>, daß die "A"-Konformation der freien Peptidlactone der im Actinomycin-Molekül vorliegenden Peptidringkonformation mit wahrscheinlich zwei cis-Amidbindungen (→ in Abb. 2) entspricht, bestätigte sich damit auch in den <sup>13</sup>C-Daten (s. folg. Mitteil.). Für das "C"-Konformere muß, wie



2a: R' = OH ( $\delta$ -Werte in CDCl<sub>3</sub>)  
b: R' = L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OCH<sub>3</sub>  
c: R' = cyclo-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-O<sub>Thr</sub>)

3a: R' = L-Thr-OCH<sub>3</sub>  
b: R' = L-Thr-D-Val-OCH<sub>3</sub> (vgl. Formel)  
c: R' = L-Thr-D-Val-OBzl  
d: R' = wie in 2c (Abb. 2)  
e: R' = cyclo-[L-Thr-D-(2-D)Val-L-Pro-(N-CD<sub>3</sub>)Sar-L-(N-CD<sub>3</sub>)MeVal-O<sub>Thr</sub>]

Abb. 3 und Tab. 1 zeigen die Lage aller <sup>13</sup>C-Signale vom "C"- und vom "A"-Konformer des isolierten Pentapeptidlactons 3d, welches die für Actinomycin C<sub>4</sub> (D) typische Aminosäuresequenz enthält (Abb. 2). Die durch den Konformationswechsel verursachten, bemerkenswert starken Signalverschiebungen sind denen der <sup>1</sup>H-Signale<sup>3)</sup> analog, lassen sich aber z. Zt. erst teilweise deuten. So geht beispielsweise aus den C-3- und C-4-Signalen des Prolinringes - verglichen mit anderen an Prolinpeptiden gewonnenen Daten<sup>9)</sup> - hervor, daß die Val→Pro-Bindung im "C"-Konformer trans-, im "A"-Typ dagegen cis-ständig sein sollte. Die schon früher aus den <sup>1</sup>H-Daten abgeleitete Vermutung<sup>3)</sup>, daß die "A"-Konformation der freien Peptidlactone der im Actinomycin-Molekül vorliegenden Peptidringkonformation mit wahrscheinlich zwei cis-Amidbindungen (→ in Abb. 2) entspricht, bestätigte sich damit auch in den <sup>13</sup>C-Daten (s. folg. Mitteil.). Für das "C"-Konformere muß, wie

No. 24  
 schon früher erörtert <sup>4)</sup>, eine all-trans-Amidanordnung und die Stabilisierung der Gesamtstruktur durch eine transannulare Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff des Valins und dem Carbonyl des Sarkosins diskutiert werden. Weitere Informationen über die Struktur beider Konformeren, vor allem die des "C"-Typs, sind aus der Analyse der Carbonylkohlenstoff-Signale zu erwarten, die zur Zeit mit Hilfe von selektiv <sup>13</sup>C-carbonyl-markierten Pentapeptidlactonen erfolgt.

-----

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Förderung dieser Untersuchungen.

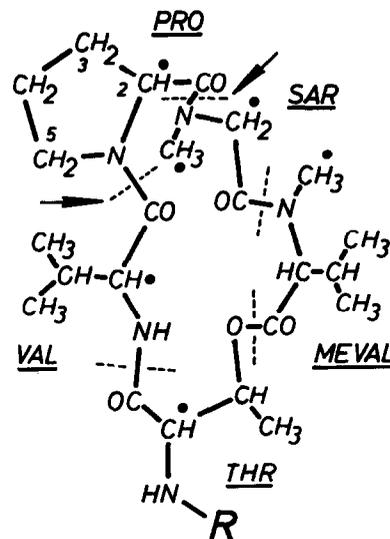


Abb.2. Peptidlactonring vom Actinomycin C<sub>1</sub>(D) - •: synthetisch gegen Deuterium ausgetauschte H-Atome, R: Acyl- (2,3) bzw. Actinocinylrest (1)

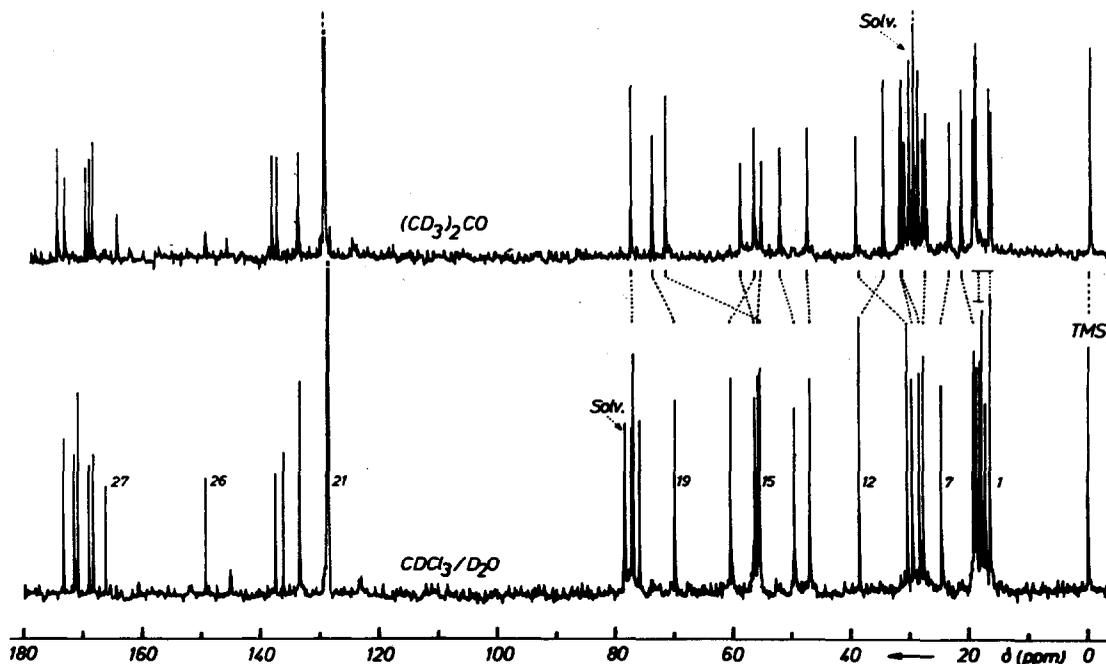


Abb. 3. 25 MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren des Pentapeptidlactons 3d in der "A"- (oben) und in der "C"-Konformation. - Signale 2-19 u. 28-32 vom Peptidring (vgl. Abb.2); Signale 1, 20 u. 21-27 vom Acylrest (vgl. 3d); genaue Zuordnung: s. Tab.1 u. 2.

Tab. 1. Die  $\delta_C$ -Werte des Pentapeptidlactons **3d** (s. Abb. 2 u. 3) in der "C"- und in der "A"-Konformation (T-Thr V-Val P-Pro S-Sar M-MeVal - Ziffern: Signalnummer in Abb. 3)

Solvens		CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO			CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O	(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO		
1	CH <sub>2</sub> (ac.)	16.6	16.8	15	C-2(M)	55.7	71.8		
	CH <sub>3</sub> (T)	17.4	17.1	16	(T)	56.0	55.6		
	(V)	18.0	19.3	17	(V)	56.6	59.2		
2-6	(M)	18.3	19.4	18	(P)	60.6	56.8		
		18.9	19.8	19	C-3(T)	70.1	74.0		
		19.3	21.8	20	CH <sub>2</sub> (ac.)	77.1	77.6		
7		C-4(P)	24.9	23.7	21-27	C (acyl)	Tab. 2		
8	C-3(M)	27.9	27.7	28	CO (T)	168.4	168.5		
9	(P)	28.5	32.0	29	(V)			169.2	169.1
10	(V)	29.8	32.0	30	(P)			171.0	169.8
11	N-C(M)	30.6	39.6	31	(S)			171.6	173.3
12	(S)	38.8	34.9	32	(M)			173.3	174.5
13	C-5(P)	47.2	47.8						
14	C-2(S)	49.8	52.4						

Tab. 2. Die  $\delta_C$ -Werte der Acylschutzgruppen von **2** und **3** (bezogen auf Tetramethylsilan)

Solvens	CDCl <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> O				(CD <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO		
	Thr-OCH <sub>3</sub> ( <b>3a</b> )	Thr-Val- OBzl ( <b>3c</b> )	lin. Penta- peptid ( <b>2b</b> )	cycl. Pentapeptid ( <b>2c</b> ) bzw. ( <b>3d</b> )	cycl. Pentapeptid ( <b>2c</b> ) bzw. ( <b>3d</b> )		
1-CO	164.9	165.2	164.7	166.1	166.3	164.3	164.4
C-1	127.5	127.6	127.7	128.0	128.5	127.9	128.2
C-2	144.8	144.8	144.3	144.8	145.3	145.4	146.0
C-3	148.9	149.0	150.1	150.7	149.5	150.8	149.6
C-4	137.6	137.6	136.8	137.3	137.6	137.8	138.3
C-5	133.0	133.1	133.0	133.5	133.4	133.7	133.9
C-6	123.2	123.2	122.9	123.4	123.2	124.0	124.2
4-CH <sub>3</sub>	16.5	16.5	16.2	16.3	16.6	16.4	16.7
3-OCH <sub>3</sub> /OBzl	62.3 - 62.9 /		77.1 - 77.6	128.2 - 129.6		135.9 - 137.5	

## REFERENCES

- 1) H.M.Sobell, S.C.Jain u. T.D.Sakore, Nature (London), New Biology **231**, 200 (1971).
- 2) B.H.Arison u. K.Hoogsteen, Biochemistry **9**, 3976 (1970); H.Lackner, Tetrahedron Lett. **1971**, 2221; N.S.Angerman, T.A.Victor, C.L.Bell u. S.S.Danyluk, Biochemistry **11**, 2402 (1972).
- 3) H.Lackner, in "Chemistry and Biology of Peptides, Proc. 3rd Amer. Peptide Symposium" (J.Meienhofer, ed.), S.147, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Michigan, 1972.
- 4) H.Lackner, Tetrahedron Lett. **1970**, 3189.
- 5) H.Lackner, Chem. Ber. **104**, 3653 (1971).
- 6) H.Lackner, Angew. Chemie 1975, im Druck.
- 7) Für die Aufnahme zahlreicher <sup>13</sup>C-NMR-Spektren danke ich Herrn Dr.S.Braun, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität, Darmstadt, sowie der Firma VARIAN AG., Zug (Schweiz).
- 8) H.Lackner, Chem. Ber. **103**, 2476 (1970).
- 9) F.A.Bovey, in "Chemistry and Biology of Peptides, Proc. 3rd. Amer. Peptide Symposium" (J.Meienhofer, ed.), S.3, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Michigan, 1972. - K.Wüthrich, A.Thun-Kyi u. R.Schwyzler, FEBS-Letters **25**, 104 (1972).