

Synthese von Blepharismen, dem niedermolekularen Konjugationshormon von *Blepharisma japonicum*

Synthesis of Blepharismone, the Low-Molecular Conjugation Hormone of *Blepharisma japonicum*

Michael Entzeroth und Lothar Jaenicke

Institut für Biochemie der Universität zu Köln,
An der Bottmühle 2, D-5000 Köln 1

Z. Naturforsch. **36 c**, 180–182 (1981);
eingegangen am 20. Oktober 1980

Blepharisma japonicum, Blepharismone, Conjugation, Gamones, Hormones

An effective and versatile synthesis of 5-hydroxytryptophane derivatives offers good access to the conjugation inducing hormone blepharismone of the ciliate *Blepharisma japonicum* and to derivatives and analogues of this biologically active compound. 5'-Fluoroblepharismone and 2'-des-formamidoblepharismone induce conjugation at 500 and 1200 times, respectively, the concentration of the true effector. At high concentration, however, the 2'-des-formamido derivative desensitizes the receptor system for the natural gamone.

Differenzierung, Reifung und Konjugation der Geschlechtszellen werden durch chemische Signale ausgelöst [1]. Auch im Generationszyklus der Protozoen konjugieren zwei Individuen gegensätzlichen Kopulationstyps und tauschen ihr Genmaterial aus [2]. Durch die eleganten Untersuchungen von A. Miyake [3] an dem Ciliaten *Blepharisma japonicum* sind die grundlegenden Schritte eines solchen gegenseitigen Sexualinduktionssystems aufgeklärt worden.

Zellen vom Typ I geben ein hochmolekulares Glykoprotein, Blepharmon, ab, das Zellen vom Typ II konjugationsreif werden läßt. Gleichzeitig bilden und sezernieren diese das niedermolekulare Gamon II, Blepharismen (**4a**), das nun Typ I-Zellen zur Konjugationsreife transformiert.

Blepharismen (**4a**) ist der Tryptophanabkömmling 3-(5'-Hydroxy-2'-formamidobenzoyl)-milchsäure. Es wurde als Calcium-Salz isoliert und erstmals von T. Tokoroyama *et al.* [4] durch Addition von Glyoxylat an 5-Hydroxy-2-formamidoacetophenon synthetisiert. Letzteres konnte von den Autoren, bedingt durch erforderliche Isomerentrennung, nur in geringer Ausbeute durch Nitrierung von 3-Hydroxyacetophenon, gefolgt von der Umwandlung in das Formylanilin, erhalten werden.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. L. Jaenicke.
0341-0382/81/0100-0180 \$ 01.00/0

Wir haben nun diesen Wirkstoff nach einem Verfahren dargestellt, das gegenüber dem genannten folgende Vorteile besitzt:

(i) Es führt unmittelbar zum richtigen stellungs-isomeren Zwischenprodukt, gibt daher bessere Gesamtausbeute;

(ii) es ist nach verschiedenen Seiten abwandlungsfähig, kann deshalb zur Darstellung von Analogen und Homologen des Naturstoffs für biochemische und biologische Untersuchungen verwendet werden.

Tab. I. Einige physikalische Daten der Verbindungen (**2**) bis (**4**).

- 2a:** ockerfarbene Kristalle, $F = 78^\circ\text{C}$; $m/e = 331$ (M^+ , 18%), 240 (13), 149 (23), 134 (37), 91 (100); $^1\text{H-NMR}$ (CCl_4): $\delta = 7,52$ ppm (d, $J = 3$ Hz, 1H), 7,30 (m, 5H), 6,72 (dd, $J = 3$ Hz, 9 Hz, 1H), 6,48 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,35 (s, 2H), 2,60 (m, 4H), 1,82 (m, s, 8H); IR (NaCl): 3400 s, 3290 s, 3040 w, 3010 w, 2990 s, 1610 vs, 1050 vs.
- 2b:** gelbes Öl, $K_{p0,01} = 131^\circ\text{C}$, $n = 1,68$; $m/e = 243$ (M^+ , 8%), 169 (28), 168 (29), 134 (67), 119 (49), 111 (58), 45 (100); $^1\text{H-NMR}$ (CCl_4): $\delta = 7,63$ (dd, $J = 11$ Hz, 3 Hz, 1H), 6,70 (m, 1H), 6,53 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 4,63 (s, 2H), 2,73 (m, 4H), 1,90 (m, 2H), 1,83 (s, 3H); IR (KBr): 3400 s, 3290 s, 3050 w, 2900 s, 1620 vs.
- 3a:** gelbe Kristalle, $F = 97^\circ\text{C}$; $m/e = 269$ (M^+ , 4%), 150 (9), 149 (10), 91 (100); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 8,77$ (d, $J = 3$ Hz, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,36 (m, s, 8H), 5,11 (s, 2H), 2,58 (s, 3H); IR (KBr): 3200 s, 3020 w, 2880 w, 1680 vs, 1630 vs, 1510 vs; UV (Ethanol): 348 nm (3500), 235 (20000).
- 3b:** gelbliche Kristalle, $F = 124^\circ\text{C}$; $m/e = 181$ (M^+ , 18%), 152 (59), 138 (100), 110 (41), 83 (30), 43 (75); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 11,3$ (s, 1H), 8,75 (dd, $J = 12$ Hz, 4 Hz, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,58 (dd, $J = 9$ Hz, 3 Hz, 1H), 7,23 (m, 1H), 2,65 (s, 3H); IR (KBr): 3220 s, 3020 w, 2880 w, 1670 vs, 1620 vs, 1500 vs.
- 4a:** gelbliche Kristalle, $F > 250^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 8,25$ (s, 1H), 7,73 (d, $J = 9$ Hz), 7,03 (dd, $J = 9$ Hz, 3 Hz, 1H); IR (KBr): 1600 vs, 1595 vs; UV (H_2O): 343 (4400), 233 (22600), alkalisch: 243 (24700).
- 4b:** gelbliche Kristalle; $F > 250^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 8,75$ (s), 8,42 (s), 8,13 (dd, $J = 6$ Hz, 9 Hz), 7,78 (dd, $J = 9$ Hz, 3 Hz), 7,48 (dd, $J = 9$ Hz, 3 Hz), 7,35 (d, $J = 3$ Hz); IR (KBr): 3400 b, 2900 w, 1660 vs, 1590 vs, 1500 v, 1080 v, 1045 v.
- 4c:** gelbe Kristalle, $F > 250^\circ\text{C}$; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 6,97-7,33$ (m, 4H), 4,13 (m, 1H); (D_2O): $\delta = 3,50$ (m, 2H); IR (KBr): 1665 vs, 1600 vs.

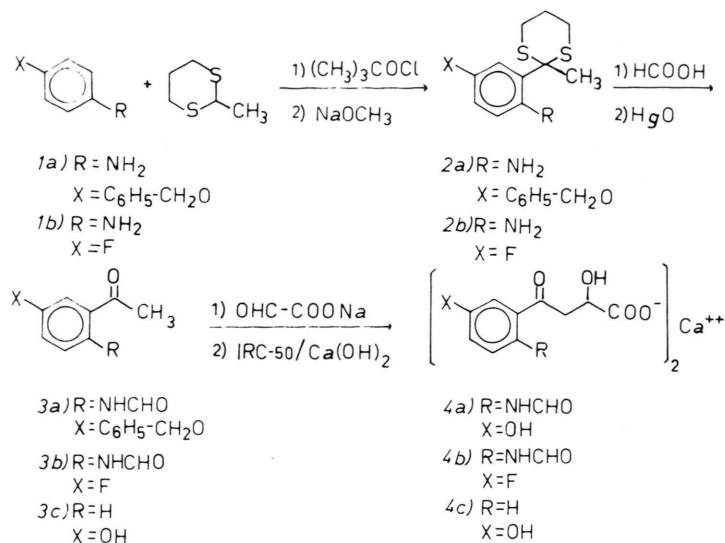


Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.



Schema

Ausgangsmaterial ist ein substituiertes Anilin [1], das in Anlehnung an die Methode von P. G. Gassman [5], die wir für unsere Zwecke modifiziert haben, in ein durch Thioacetal geschütztes 2-Aminoacetophenon (2) überführt wurde. Diese Substitution verläuft, bedingt durch den angeschlossenen (2,3)-sigmatropen Umlagerungsschritt, streng stellungsspezifisch. Man hat damit einen allgemein anwendbaren Zugang zu 2-Aminoacetophenon. 2 läßt sich durch N-Formylierung [6] und Hydrolyse des Thioacetals [7] in das gewünschte 2,5-disubstituierte Acetophenon-Derivat (3) überführen. Nach Optimierung der Umsetzung mit Natrium-glyoxylat

nach Tokoroyama *et al.* [4] konnten wir Gamon II erhalten.

Die Aktivitätstests [8] ergaben für das synthetisierte D,L-Blepharismon gute Übereinstimmung mit einer Vergleichsprobe von Gamon II. Die Grenzkonzentration betrug $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l.

Die Abwandlungsfähigkeit des Verfahrens sei am 5'-Fluor-Derivat (4b) des Gamons illustriert. Es wurde, ausgehend vom 4-Fluoranilin, in der gleichen Weise dargestellt und als Ca²⁺-Salz isoliert. 4b ist kein Antagonist von Blepharismon, sondern hat im biologischen Test 1/500 von dessen molarer spezifischer Aktivität. Für die Hormonwirkung und/

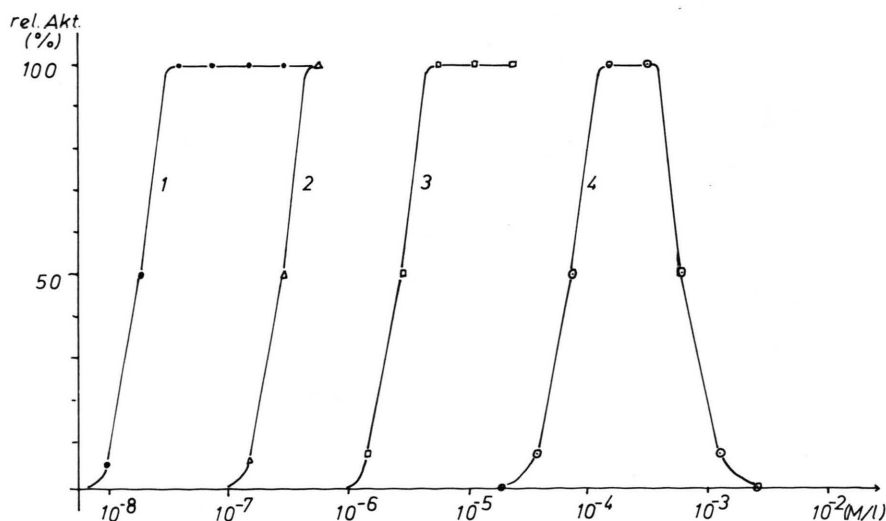


Abb. 1. Konjugationsauslösung bei *Blepharisma japonicum* durch (1) Blepharismon; (3) 5'-Fluorblepharismon; (4) 2'-Desformamidoblepharismon; (2) Blepharismon in Gegenwart von 5×10^{-3} M 2'-Desformamidoblepharismon.

oder die Rezeptorbindung ist demnach die Ladungsverteilung im aromatischen System essentiell, während die ionisierende phenolische Hydroxylgruppe eher ein weiteres Bindungsincrement darstellt. Um zu erfahren, ob die 2'-Formamido-Gruppe für die biologische Funktion wesentlich ist, wurde 2'-Desformamido-blepharison (**4c**) aus 3-Hydroxyacetophenon synthetisiert. Bei der Prüfung auf Konjugationsauslösung zeigt diese Substanz die in Abb. 1 wiedergegebene Dosis/Wirkungs-Abhängigkeit. Sie ist im aufsteigenden Ast der Kurve 1200mal weniger aktiv als der Naturstoff. Höhere Konzentrationen scheinen das Reizübertragungssystem zu paralysieren, so daß die Konjugation unterdrückt wird. Dabei wird ein einer Adaptation ähnlicher Vorgang ausgelöst: bestimmt man bei hemmender Konzentration (5×10^{-3} M) von **4c** die biologische Wirksamkeit von gestuften Mengen Ble-

pharison (**4a**), erhält man die parallel verschobene Kurve 2.

Die in dieser Arbeit dargestellten Blepharison-Derivate sind keine Inhibitoren des physiologischen Vorgangs, sondern schwache Analoga des Naturstoffs. Sie zeigen, daß die Substituenten am aromatischen Ring zwar für die Wirkung als Konjugations-induzierendes Hormon notwendig sind, aber die Ligand/Rezeptor-Wechselwirkung nicht ausschließlich auf sie zurückzuführen ist. Dies ist bemerkenswert, da Miyake [3] gefunden hat, daß Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan die Induktion der Zell-Vereinigung hemmen. Ein interessanter Aspekt ist die Dämpfung des Systems durch an sich blockierende Konzentrationen des 2'-Desformamido-Derivates; möglicherweise ist der Angriffsort nicht der unmittelbare Rezeptor, sondern ein Protein der Leitungs- oder Verarbeitungskette [9].

- [1] P. Karlson, *Mechanisms of Hormone Action*, Thieme, Stuttgart 1965.
- [2] T. M. Sonneborn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **23**, 378–385 (1937).
- [3] A. Miyake, *Curr. Top. Dev. Biol.* **12**, 37–82 (1978).
- [4] T. Tokoroyama, S. Hori u. T. Kobutu, *Proc. Jap. Acad.* **49**, 461–463 (1973).
- [5] P. G. Gassman u. H. R. Drewes, *J. Amer. Chem. Soc.* **100**, 7600–7610 (1978).
- [6] J. C. Sheehan u. D.-D. H. Yang, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 1154–1164 (1958).
- [7] D. Seebach, *Synthesis* **1969**, 17–36.
- [8] Für die Hilfe bei den Aktivitätsbestimmungen danken wir Herrn Dr. A. Miyake, Münster.
- [9] J. Adler, *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 341–356 (1975).
- [10] A. Ek u. B. Witkop, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5579–5588 (1954).
- [11] M. Entzeroth, Diplomarbeit, Köln 1980.