

Struktur-Wirkungsbeziehungen von Analogen und Homologen von Blepharismone, dem niedermolekularem Konjugationshormon von *Blepharisma japonicum*

Structure-Activity-Relation of Analogues and Homologues 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. **37c**, 1136–1140 (1982); received August 2/September 20, 1982

Blepharisma japonicum, Blepharismone, Conjugation, Hormones, Receptors

Some functional derivatives of blepharismone, the low-molecular conjugation hormone of *Blepharisma japonicum*, were synthesised and tested for their biological activity. The lipophilicity constant of the substituent in 5-position of the aromatic system directly correlates with the conjugation-inducing effect of this substance. Any change in the N-formyl-position leads to compounds less active than blepharismone, non-active or even inhibitory. Blepharismone-related kynurenine derivatives are inhibitors of the gamone activity depending on structural relationship.

Einleitung

Im Lebenszyklus eukaryonten Organismen lösen molekulare Signale die Vorgänge der Differenzierung, Reifung und Konjugation ihrer Geschlechtszellen [1] aus. Die eleganten Untersuchungen von A. Miyake [2] an dem Ciliaten *Blepharisma japonicum* klärten das wechselseitig koordinierte Sexualinduktionssystem der beiden komplementären Kopulationstypen durch zwei derartige Substanzen auf:

Das hochmolekulare Glykoprotein, Gamon I = Blepharmon, welches von den Zellen des Typs I sezerniert wird, läßt die Zellen vom Typ II konjugationsreif werden. Diese bilden und geben nun das niedermolekulare Gamon II = Blepharismone (**1**) ab, das die Konjugationsreifung der Typ I-Zellen bewirkt.

In früheren Untersuchungen [3] zeigten wir, daß auch einige synthetische Blepharismone-Analoga in der Lage sind, die Zellen vom Typ I zur Konjugationsreife zu transformieren. Die Synthese weiterer derartiger Substanzen vergrößert nun das Spektrum der strukturverwandten Verbindungen und vermittelt einen präziseren Einblick in das Wechselspiel zwischen Blepharismone (**1**) und seinem mutmaßlichen Rezeptor.

Materialien und Methoden

Für unsere biologischen Untersuchungen verwendeten wir den Albinostamm A 5.3.2 von *Blepha-*

risma japonicum. Die in Tabelle I aufgeführten Verbindungen wurden wie folgt dargestellt: Die Synthesen von **1**, **2** und **11** sind in früheren Arbeiten [3, 4] beschrieben. Daran angelehnt konnten wir jetzt die Verbindungen **7**, **8**, **9** und **13** erhalten. Die Darstellung von **3–6**, **10**, **12**, **14** und **15** ging aus vom 2-Amino-acetophenon. Durch N-Acylierung [5] und anschließende Nitrierung [6] sowie Hydrierung mit H₂ und PtO₂ [7] erhielten wir 5-Amino-2-formamido-acetophenon und 2-Acetamido-5-amino-acetophenon. Durch Diazotierung und anschließendes Verkochen der Diazoniumsalze [8–10] konnten wir die entsprechenden 5-halogensubstituierten Acetophenone erhalten. Durch Aldolreaktion mit Natriumglyoxylat [11] gelangten wir zu den gewünschten Blepharismone-Derivaten. 5-Hydroxy-kynurenin war ein Geschenk von Dr. O. Hayaishi, Kyoto. Die Darstellung von N-Formyl-5-hydroxy-kynurenin erfolgte durch Ozonolyse von N- bzw. N,O-bis-Carbobenzoxymethoxy-hydroxy-tryptophan und Hydrierung mit H₂ und 5% Pd/C [12]. N-Formyl-kynurenin war ein Produkt der Firma Calbiochem, Gießen.

Für die Spektroskopie benutzten wir:

¹H-NMR-Spektren: Varian EM 390 NMR-Spektrometer;

Massenspektren: Finnigan 3200 GC/MS-Spektrometer;

IR-Spektren: Perkin-Elmer 337 Infrarotgitterspektrophotometer.

Alle angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der untersuchten Verbindungen ermittelten wir die je-

Reprint requests to Prof. Dr. L. Jaenicke.

0341-0382/82/1100-1136 \$01.30/0



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.

Tab. I. Physikalische Daten der Verbindungen (1) bis (15).

Verbindung	m.p. [°C]	IR (KBr) ν [cm ⁻¹]	¹ H-NMR (CD ₃ OD/TMS od. D ₂ O/TSP) δ [ppm]	MS <i>m/e</i>
1	> 250°	1600, 1595	7,03 (dd, 1 H); 7,73 (d, 1 H); 8,25 (s, 1 H)	—
2	> 250°	3400, 2900, 1660, 1590	7,35 (d); 7,48 (dd); 7,78 (dd); 8,13 (dd); 8,42 (s)	—
3	162°	3450, 3220, 2900, 1720, 1680, 1630, 1580, 1520	3,50 (d, 2 H); 4,73 (t, 1 H); 7,62 (dd, 1 H); 8,08 (d, 1 H); 8,50 (s, 1 H); 8,60 (d, 1 H)	271/273 (M ⁺ , 1%); 243/245 (3); 180/182 (35/25); 154/156 (100/20)
4	135°	3250, 3060, 2900, 1710, 1650, 1500	3,50 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 7,75 (dd, 1 H); 8,20 (d, 1 H); 8,50 (d/s, 2 H)	315/317 (M ⁺ , 2%); 287/289 (4); 251/253 (25)
5	164°	3440, 3210, 2890, 1710, 1680, 1630, 1510	3,47 (d, 2 H); 4,70 (t, 1 H); 7,95 (dd, 1 H); 8,36 (d, 1 H); 8,43 (d/s, 2 H)	363 (M ⁺ /4%); 345 (4); 335 (8); 317 (10); 277 (15); 246 (30); 218 (15)
6	171–172°	3490, 3200, 2910, 1720, 1660, 1640, 1580, 1520	3,50 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 7,27 (m, 1 H); 7,62 (m, 1 H); 8,10 (d, 1 H); 8,53 (m, 2 H)	237 (M ⁺ , 8%); 219 (12); 209 (8); 191 (15); 146 (62); 120 (100)
7	153°	3410, 3190, 2920, 2900, 1705, 1650, 1590, 1530	2,37 (s, 3 H); 3,50 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 7,41 (dd, 1 H); 7,90 (d, 1 H); 8,43 (s, 1 H); 8,48 (d, 1 H)	251 (M ⁺ , 13%); 233 (10); 223 (14); 205 (17); 160 (51); 134 (100)
8	138–140°	3440, 3220, 3010, 1710, 1660, 1630, 1510	3,43 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 5,17 (s, 2 H); 7,20–7,67 (m, 7 H); 8,43 (s, 1 H); 8,50 (d, 1 H)	343 (M ⁺ , 1%); 325 (1); 269 (1); 150 (1); 91 (100)
9	134–136°	3455, 3260, 2900, 2820, 1730, 1660, 1640, 1530	3,50 (d, 2 H); 3,87 (s, 3 H); 4,70 (t, 1 H); 7,23 (dd, 1 H); 7,57 (d, 1 H); 8,47 (s/d, 2 H)	267 (M ⁺ , 20%); 239 (20); 176 (55); 150 (100); 122 (40)
10	> 250°	3410, 1600	7,02 (dd, 1 H); 7,26 (d, 1 H); 7,76 (d, 1 H); 8,30 (s, 1 H)	—
11	> 250°	1665, 1600	6,97 (m, 4 H); 4,13 (m); 3,50 (d, 2 H)	—
12	157°	3490, 3200, 2910, 1725, 1670, 1580, 1530	2,17 (s, 3 H); 3,50 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 7,22 (t, 1 H); 7,58 (t, 1 H); 8,05 (dd, 1 H); 8,50 (d, 1 H)	251 (M ⁺ , 5%); 233 (3); 209 (10); 162 (25); 146 (40); 120 (100)
13	196–198°	3520, 3300, 2950, 2910, 2860, 1690, 1670, 1550, 1450	2,13 (s, 3 H); 3,43 (d, 2 H); 4,70 (t, 1 H); 7,05 (dd, 1 H); 7,38 (d, 1 H); 8,13 (d, 1 H)	267 (M ⁺ , 31%); 249 (16); 225 (41); 207 (48); 193 (48); 136 (35)
14	175°	3480, 3210, 3070, 2910, 1730, 1670, 1630, 1580, 1510	2,18 (s, 3 H); 3,46 (d, 2 H); 4,68 (t, 1 H); 7,60 (d, 1 H); 8,06 (d, 1 H); 8,50 (d, 1 H)	285/287 (M ⁺ , 4/2%); 243/245 (15/5); 180/182 (20/10); 154/156 (100/20)
15	> 250°	3400, 2900, 1600, 1530	2,16 (s, 3 H); 4,43 (t, 1 H); 7,06 (dd, 1 H); 7,27 (d, 1 H); 7,48 (d, 1 H)	—

weilige minimale Wirkkonzentration durch Verdünnungsreihen und korrelierten diese mit der für synthetisches D,L-Blepharismen (**1**) gefundenen [2].

Ergebnisse

5-Blepharismen-Derivate

Einige 5-Blepharismen-Derivate (**2–10**) wurden in Konzentrationen zwischen 10^{-2} und 10^{-8} M auf Konjugationsinduktion relativ zu Blepharismen (**1**) untersucht. Bis auf die Verbindung **4**, **5** und **8** waren alle synthetischen Analoga in der Lage, bei *Blepharisma japonicum* die Zellunion zu induzieren. Wir haben nun die erhaltenen relativen Aktivitäten mit verschiedenen physikochemischen Parametern verglichen und fanden einen Zusammenhang zwischen der Wirkung und der Lipophiliekonstanten π des Substituenten X (Tab. II).

Läßt man Desoxyblepharismen (**6**) unberücksichtigt, so ergibt sich eine sehr gute Korrelation zwischen dem negativen Logarithmus der Aktivität A (pA) und dem Strukturparameter der Lipophilie π (Abb. 1).

$$pA = 0,732 \pi + 2,783$$

r	n	s	F
0,996	6	0,133	430

2-Blepharismen-Derivate

In gleicher Weise wurde auch die biologische Aktivität einiger in 2 abgewandelter Blepharismen

Tab. II. Biologische Aktivität und Lipophiliekonstante π der untersuchten, in 5 substituierten Blepharismen.

X	π [13]	$-\log A$
-OH (1)	- 3,87	0,00
-NH ₂ (10)	- 1,23	1,78
-OCH ₃ (9)	0,11	3,00
-CH ₃ (7)	0,56	3,20
-F (2)	0,14	2,70
-Cl (3)	0,71	3,40
-H (6)	0,00	1,60
-Br (4)	0,86	∞
-I (5)	1,12	∞
-OCH ₂ C ₆ H ₅ (8)	1,66	∞

untersucht. In früheren Untersuchungen [3] hatten wir beobachtet, daß Desformamido-blepharismen (**11**) eine, wenn auch 3 Zehnerpotenzen geringere Aktivität besitzt. Jedoch lösen alle dargestellten 2-Acetamido-Derivate von Blepharismen (**12–15**) in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 10^{-2} M bis 10^{-8} M keine Paarbildung aus. N-Acetylblepharismen (**13**) inhibiert sogar die Induktion homotypischer Paare durch Gamon II proportional seinem Zusatzverhältnis, wie aus Abb. 2 entnommen werden kann.

Strukturverwandte Aminosäuren

Miyake [14] zeigte bereits, daß D- und L-Tryptophan, sowie 5-Hydroxy-D- und L-Tryptophan die konjugationsinduzierende Wirkung von Blepharismen (**1**) zu hemmen vermögen. Um ein genaueres

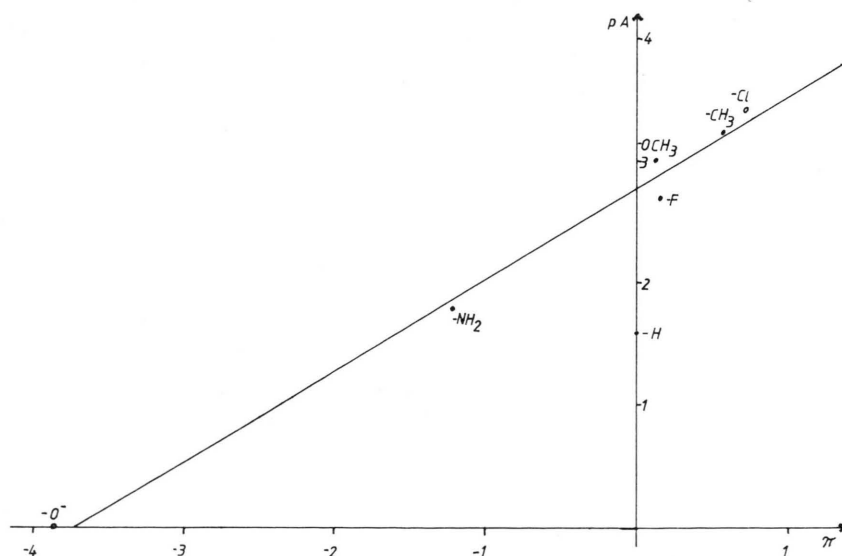


Abb. 1. Abhängigkeit der relativen Gamon-II-Aktivität (Abszisse) einiger Blepharismen-Derivate von Lipophilie π (Ordinate) des Substituenten in Stellung 5 des aromatischen Rings. Logarithmische Auftragung der Meßdaten aus Tab. II.

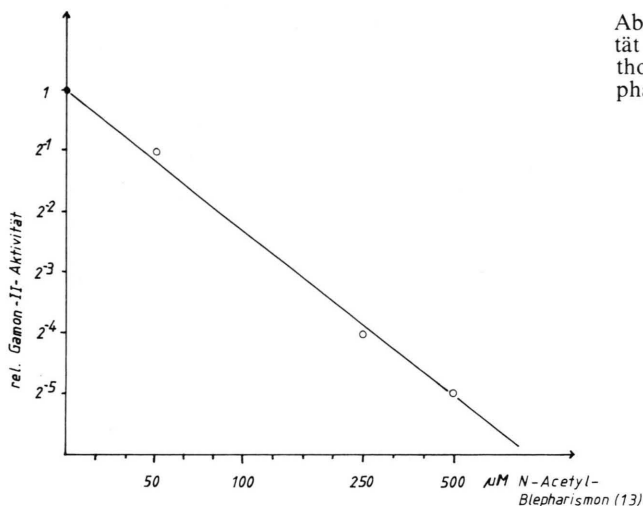


Abb. 2. Hemmung der Gamon-II-(Blepharismon-)Aktivität durch N-Acetyl-blepharismon (13). Bestimmungsmethode s. Exp. Teil. Die Aktivität ist bezogen auf D,L-Blepharismon (1).

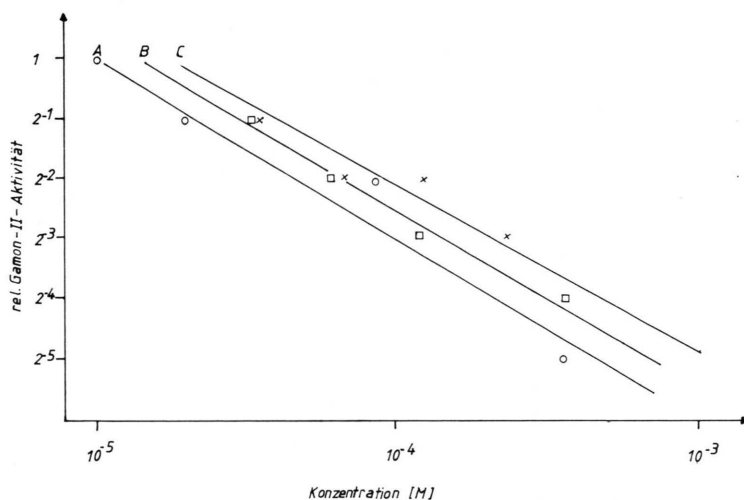


Abb. 3. Inhibierung der Gamon-II-(Blepharismon-)Aktivität durch N-Formyl-5-hydroxy-kynurenin (A), N-Formyl-kynurenin (B) und 5-Hydroxy-kynurenin (C). Methodik s. Exp. Teil. Die jeweilige Aktivität ist bezogen auf den D,L-Blepharismon-Standard = 100%.

Bild von der Spezifität des Blepharismon-Rezeptors zu erhalten, testeten wir die strukturverwandten Aminosäuren N-Formyl-5-hydroxy-kynurenin (A), N-Formyl-kynurenin (B) und 5-Hydroxy-kynurenin (C) auf Hemmung gegenüber Blepharismon in der beschriebenen Weise. Die in Abb. 3 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß diese Substanzen tatsächlich einen signifikanten, konzentrationsabhängigen Hemmeffekt auf die Gamon-II-Wirkung im 100 µM-Bereich haben.

Diskussion

Die Aktivität 5-substituierter Blepharismon-Derivate fällt mit steigender Lipophiliekonstante π des

entsprechenden Substituenten (Tab. II). Wir können daraus schließen, daß Blepharismon (1) mittels der 5-OH-Gruppe an einen hydrophilen Bereich des Rezeptors gebunden wird. Überschreitet die Größe des 5-Substituenten jedoch zusätzlich zu starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor einen von der Waals-Radius von etwa 2×10^{-8} cm [15], so führt dies zu einer deaktivierenden Deformation des Systems. Analoga mit stark lipophilen Gruppen wie $-\text{Br}$, $-\text{I}$, $-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ haben deshalb keine meßbare Hormonwirkung. Der entgegengesetzte Effekt erklärt die überproportional ausgeprägte Wirkung von Desoxy-blepharismon (6). Dieses besitzt eine höhere Hormonaktivität, als es von der Lipophiliekonstante π des Wasserstoffs her

zu erwarten gewesen wäre. Der geringe van der Waals-Radius des Wasserstoffatoms sowie sein aromatischer Charakter verhindern Wechselwirkungen mit der hydrophilen Rezeptorgruppe. Daraus ergibt sich eine bessere unpolare Assoziation des Liganden mit dem Rezeptor und somit eine relativ höhere konjugationsinduzierende Wirkung.

Berücksichtigt man die hier genannten Parameter, so erweist sich der Substituent in 5-Position als nicht essentiell für die Auslösung des biologischen Effekts; ihm kommen lediglich bindende Eigenschaften zu. Optimale Bindung ergibt die OH-Gruppe, wie sie im Blepharismon (**1**) ausgebildet ist, ohne jedoch spezifisch zu sein.

Weit empfindlicher erweist sich das Rezeptorsystem gegenüber Veränderungen in 2-Position des Wirkstoffs. Während Desformamido-blepharismon (**11**) noch eine, wenn auch sehr geringe Aktivität besitzt [3], waren alle dargestellten 2-N-Acetyl-homologen und -analoge von Blepharismon (**1**) unwirksam. Bemerkenswert ist die starke Desensibilisierung des Systems durch geringe Konzentrationen an N-Acetyl-blepharismon (**13**). Die vorliegenden Untersuchungen legen nahe, daß zwar auch die Substitution in 2-Position des Wirkstoffs mit einer Formamidogruppe einen wesentlichen Beitrag zur Ligand/Rezeptor-Bindung leistet, nicht aber die eigentlich effektauslösende Stelle ist.

Die wohl funktionell wichtigste Position des Wirkstoffmoleküls ist die 2-Hydroxygruppe der Seitenkette. Schon Miyakes Arbeiten [14] zeigten, daß D- und L-Tryptophan, sowie 5-Hydroxy-D- und L-Tryptophan keine Gamon-II-Wirkung besitzen und sogar schwache Inhibitoren des Wirkstoffs sind. Da die L-Isomere dabei stärker wirken, ist eine chirale Rezeptorposition anzunehmen.

Unsere Messungen mit N-Formyl-5-hydroxy-kynurenin (A), N-Formyl-kynurenin (B) und 5-Hydroxy-kynurenin (C) (Abb. 3) ergaben, daß diese Aminosäuren keine Stoffeigenschaften besitzen, sondern, im Gegenteil, mit steigender Strukturverwandtschaft zu Gamon II das Rezeptorsystem zunehmend zu desensibilisieren vermögen. Der Konzentrationsbereich liegt dabei allgemein um zwei Zehnerpotenzen niedriger als bei den von Miyake [14] untersuchten Tryptophanen. Die gegenüber N-Formyl-kynurenin (B) geringere Interferenz des 5-Hydroxy-kynurenin (C) mit der Blepharismon-Wirkung bestätigt die höhere Empfindlichkeit des Rezeptorsystems gegen Änderungen in 2-Position des Substrats.

Während somit die Positionen 5 und 2 des Ringsystems vor allem die Bindung des Hormons an den Rezeptor vermitteln, erweist sich die 2-Hydroxygruppe der Seitenkette als für die Wirkung des Hormons essentiell. Aus der Beobachtung, daß keine der mit Blepharismon (**1**) strukturverwandten Aminosäuren in der Lage ist, bei *Blepharisma japonicum* die Zellunion homotypischer Paare zu induzieren, schließen wir, daß bei der Entstehung des Hormons aus Tryptophan die Umwandlung der 2-Aminofunktion in die 2-Hydroxygruppierung der biosynthetische Endschritt ist, während die aromatische Hydroxylierung und die Pyrrolringspaltung vorausgehen.

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

- [1] P. Karlson, Mechanisms of Hormone Action, Thieme, Stuttgart 1965.
- [2] A. Miyake, Curr. Top. Dev. Biol. **12**, 37–82 (1978).
- [3] M. Entzeroth u. L. Jaenicke, Z. Naturforsch. **36 c**, 180–182 (1981).
- [4] M. Entzeroth, Diplomarbeit, Köln 1980.
- [5] J. C. Sheehan u. D.-D. H. Yang, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 1154–1164 (1958).
- [6] N. J. Leonhard u. S. N. Boyd, J. Org. Chem. **11**, 405–418 (1946).
- [7] P. Klinke u. H. Gibian, Chem. Ber. **94**, 26–38 (1953).
- [8] J. K. Kochi, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 5090–5099 (1955).
- [9] H. J. Lucas u. E. R. Kennedy, Org. Synth. Coll., Vol. II, 351–352 (1943).
- [10] J. L. Hartwell, Org. Synth. Coll. Vol. III, 185–187 (1955).
- [11] T. Tokoroyama, S. Hori u. T. Kobuta, Proc. Jap. Acad. **49**, 461–463 (1973).
- [12] T. Shimizu, S. Nomiya, F. Hirata u. O. Hayaishi, J. Biol. Chem. **253**, 4700–4706 (1978).
- [13] J. K. Seydel, K. J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, 266–288, Verlag Chemie, Weinheim 1979.
- [14] A. Miyake, in: Sexual Interaction in Eukaryotic Microbes, pp. 95–129, Academic Press, New York 1981.
- [15] A. Bondi, Physical Properties of Molecular Crystals, Liquids and Glasses, 453–468, Wiley, New York 1968.