

- [32] Unter etwas anderen Bedingungen wurde  $\log X = 1.4$  [33], 1.3 [34], 1.1 [25] und 1.0 [24] gefunden.
- [33] J. I. Watters, J. Amer. Chem. Soc. 81, 1560 (1959).
- [34] W. B. Schaap u. D. L. McMasters, J. Amer. Chem. Soc. 83, 4699 (1961).
- [35] J. I. Watters u. E. D. Loughran, J. Amer. Chem. Soc. 75, 4819 (1953).
- [36] G. A. L'Heureux u. A. E. Martell, J. Inorg. Nucl. Chem. 28, 481 (1966).
- [37] R. Näsänen u. M. Koskinen, Suom. Kemistilehti B 40, 108 (1967).
- [38] W. E. Bennett, J. Amer. Chem. Soc. 79, 1290 (1957).
- [39] H. Sigel, P. R. Huber u. R. F. Pusternack, Inorg. Chem. 10, 2226 (1971).
- [40] P. R. Huber, R. Griesser u. H. Sigel, Inorg. Chem. 10, 945 (1971).
- [41] P. R. Huber u. H. Sigel, Z. Naturforsch. 27b, 1319 (1972).
- [42] R. Griesser, B. Priejs u. H. Sigel, Inorg. Nucl. Chem. Lett. 4, 443 (1968).
- [43] H. Sigel, P. R. Huber, R. Griesser u. B. Priejs, Inorg. Chem. 12, 1198 (1973).
- [44] S. G. Schulman, W. P. Kilroy u. H. Gershon, J. Phys. Chem. 72, 3372 (1968); S. G. Schulman u. H. Gershon, J. Inorg. Nucl. Chem. 31, 2467 (1969).
- [45] R. Griesser, B. Priejs, H. Sigel u. D. B. McCormick, Inorg. Nucl. Chem. Lett. 5, 951 (1969).
- [46] H. Sigel, D. B. McCormick, R. Griesser, B. Priejs u. L. D. Wright, Biochemistry 8, 2687 (1969).
- [47] H. Sigel, R. Griesser u. D. B. McCormick, Inorg. Chim. Acta 6, 559 (1972).
- [48] a) H. Sigel u. B. Priejs, Chimia 29, 134 (1975); b) H. Sigel, Inorg. Chem. 14 (1975), im Druck.
- [49] H. Sigel u. B. Priejs, Helv. Chim. Acta 50, 2357 (1967).
- [50] H. Sigel, Angew. Chem. 80, 124 (1968); Angew. Chem. internat. Edit. 7, 137 (1968).
- [51] M. Noack u. G. Gordon, J. Chem. Phys. 48, 2689 (1968); F. A. Walker u. H. Sigel, Inorg. Chem. 11, 1162 (1972).
- [52] Die *cis*-Konfiguration sollte eher von elektronischen Effekten herrühren als von einer sterischen Abstoßung der 6,6'-H-Atome in der *trans*-Anordnung; H. Sigel, Inorg. Chim. Acta 6, 195 (1972).
- [53] D. L. Leussing u. D. C. Shultz, J. Amer. Chem. Soc. 86, 4847 (1964); D. L. Leussing u. E. M. Hanna, *ibid.* 88, 693, 696 (1966); D. L. Leussing u. K. S. Bai, Anal. Chem. 40, 575 (1968).
- [54] M. Calvin u. K. W. Wilson, J. Amer. Chem. Soc. 67, 2003 (1945); J. Bjerrum, Chem. Rev. 46, 381 (1950); A. E. Martell u. M. Calvin: Chemistry of the Metal Chelate Compounds. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. 1952; H. Irving u. H. Rossotti, Acta Chem. Scand. 10, 72 (1956).
- [55] H. Sigel u. Th. Kaden, Helv. Chim. Acta 49, 1617 (1966).
- [56] R. Griesser, B. Priejs, H. Sigel, W. Förty, L. D. Wright u. D. B. McCormick, Biochemistry 9, 3285 (1970).
- [57] H. Sigel, J. Inorg. Nucl. Chem. 37, 507 (1975).
- [58] R. Griesser u. H. Sigel, Inorg. Chem. 10, 2229 (1971).
- [59] R. B. Martin, M. M. Petit-Rameil u. J. P. Scharff: Mixed-Ligand Metal Ion Complexes of Amino Acids and Peptides, in [6], Bd. 2 (1973), S. 1.
- [60] Vgl. Abb. 3 in [8] und Abb. 5 in [56].
- [61] E. W. Wilson, Jr., M. H. Kasperian u. R. B. Martin, J. Amer. Chem. Soc. 92, 5365 (1970); H. Sigel u. D. B. McCormick, *ibid.* 93, 2041 (1971).
- [62] D. B. McCormick, H. Sigel u. L. D. Wright, Biochim. Biophys. Acta 184, 318 (1969); G. Rotilio u. L. Calabrese, Arch. Biochem. Biophys. 143, 218 (1971).
- [63] R. F. Pasternack, P. R. Huber, U. M. Huber u. H. Sigel, Inorg. Chem. 11, 276 (1972).
- [64] Die kinetischen Untersuchungen über die Bildung ternärer Komplexe wurden kürzlich zusammengefaßt [13].
- [65] R. F. Pasternack, L. Gipp u. H. Sigel, J. Amer. Chem. Soc. 94, 8031 (1972).
- [66] M. Cohn u. T. R. Hughes, J. Biol. Chem. 237, 176 (1962).
- [67] P. W. Schneider, H. Brintzinger u. H. Erlenmeyer, Helv. Chim. Acta 47, 992 (1964).
- [68] Ch. F. Naumann, B. Priejs u. H. Sigel, Eur. J. Biochem. 41, 209 (1974).
- [69] H. Sigel, Eur. J. Biochem. 3, 530 (1968); H. Sigel, J. Amer. Chem. Soc. 97 (1975), im Druck.
- [70] Ch. F. Naumann u. H. Sigel, J. Amer. Chem. Soc. 96, 2750 (1974).
- [71] H. Sigel, Ch. F. Naumann u. B. Priejs, Eur. J. Biochem. 46, 589 (1974).
- [72] Ch. F. Naumann u. H. Sigel, FEBS Lett. 47, 122 (1974).
- [73] A. M. Fiskin u. M. Beer, Biochemistry 4, 1289 (1965).
- [74] A. E. Martell, Proc. 3rd Symp. Coord. Chem., Bd. II (1971), S. 125.
- [75] D. H. Buisson u. H. Sigel, Biochim. Biophys. Acta 343, 45 (1974); Angew. Chem. 84, 1103 (1972); Angew. Chem. internat. Edit. 11, 1025 (1972).
- [76] P. W. Schneider u. H. Brintzinger, Helv. Chim. Acta 47, 1717 (1964).
- [77] H. Sigel, D. H. Buisson u. B. Priejs, Bioinorg. Chem. (1975), im Druck.
- [78] M. M. Taqui Khan u. A. E. Martell, J. Amer. Chem. Soc. 89, 4176, 7104 (1967); 90, 6011 (1968).
- [79] B. E. Leach u. R. J. Angelici, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6296 (1969); vgl. auch J. R. Blackburn u. M. M. Jones, J. Inorg. Nucl. Chem. 35, 1597, 1605 (1973).
- [80] R. W. Hay u. K. N. Leong, Chem. Commun. 1967, 800; J. Chem. Soc. A 1971, 3639.
- [81] J. V. Rund u. K. G. Claus, Inorg. Chem. 7, 860 (1968).
- [82] J. V. Rund u. R. A. Plane, J. Amer. Chem. Soc. 86, 367 (1964).
- [83] J. E. Prue, J. Chem. Soc. 1952, 2331; R. J. P. Williams, Endeavour 26, 96 (1967).
- [84] E. Gelles u. A. Salama, J. Chem. Soc. 1958, 3689.
- [85] T. Wagner-Jauregg, B. E. Hackley, Jr., T. A. Lies, O. O. Owens u. R. Proper, J. Amer. Chem. Soc. 77, 922 (1955); R. L. Gustafson u. A. E. Martell, *ibid.* 84, 2309 (1962).
- [86] H. Sigel u. K. Wyss, noch unveröffentlicht.

## Die Raumstruktur der Actinomycine

Von Helmut Lackner<sup>[\*]</sup>

Für Actinomycine, rote Chromopeptid-Antibiotica mit ausgeprägter antineoplastischer Wirkung, lassen sich aufgrund ihrer einzigartigen Konstitution zahlreiche komplizierte Raumstrukturen formulieren. Da diese die spezifische Aktivität der Actinomycinmoleküle in der Wirtszelle weitgehend bestimmen, ist die Kenntnis der natürlichen, in Lösung vorliegenden Strukturformen eine entscheidende Voraussetzung für die Gewinnung detaillierter Vorstellungen über die biologische Wirkungsweise der Actinomycine. Untersuchungen nach mehreren Methoden ergaben, daß alle Actinomycine trotz unterschiedlicher Primärstruktur dem gleichen, sehr charakteristischen, pseudo-C<sub>2</sub>-symmetrischen und bemerkenswert stabilen Raumstrukturtyp angehören.

### 1. Einführung

Zahlreiche aus Erdproben isolierte Streptomycetenstämme produzieren orange-rote, antibiotisch und cytostatisch hoch-

wirksame, jedoch sehr toxische Chromopeptide, die Actinomycine. Sie sind bereits seit 1940 bekannt, als Waksman und Woodruff<sup>[1]</sup> Actinomycin A – das erste kristalline Antibioticum überhaupt – isolierten. Inzwischen wurden über dreißig native und eine Reihe synthetischer Actinomycine zugänglich<sup>[2–4]</sup>, die alle die gleiche typische Grundstruktur besitzen: zwei Pentapeptidlactonringe (siehe Abb. 1b) sind mit einem Amino-

[\*] Priv.-Doz. Dr. H. Lackner  
Organisch-Chemisches Institut der Universität  
34 Göttingen, Tammannstraße 2

phenoxazinon-Chromophor verknüpft (Abb. 1). Variiert wird diese Struktur durch die Abwandlung von Aminosäuren in den beiden Peptideinheiten (vgl. Abb. 16). Über Gewinnung, Trennung und Konstitutionsaufklärung von Actinomycinen sowie die erste Totalsynthese<sup>[5]</sup> hat Brockmann<sup>[2]</sup> zusammenfassend berichtet.

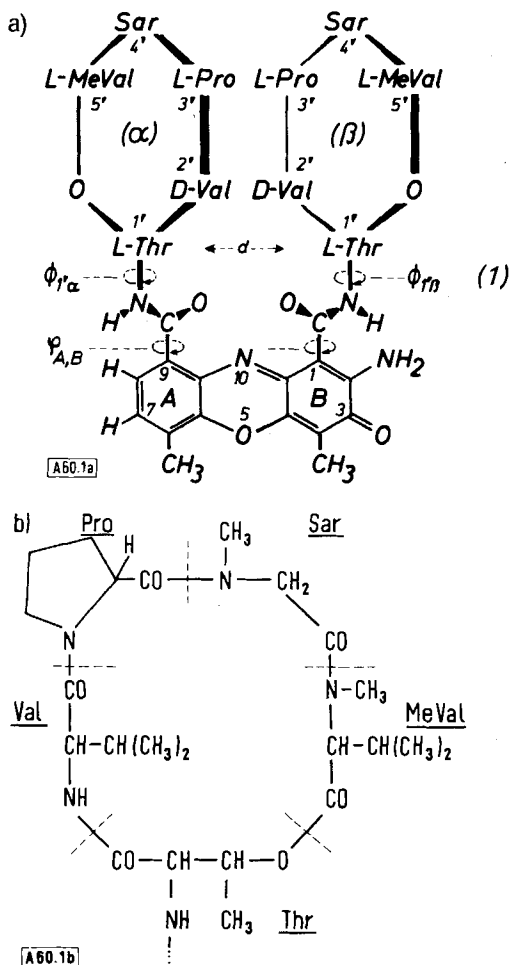


Abb. 1. a) Primärstruktur des Actinomycins  $C_1$  (1). – Dieses in der englischsprachigen Literatur mit „D“ bezeichnete Actinomycin ist das am besten untersuchte und meist verwendete. Nach neueren Vorschlägen [6] wird es auch [Di-(2'-D-valin)]actinomycin (kurz: Val<sub>2</sub>-AM) genannt. b) Pentapeptid-lactonring, schematisch. Val: Valin, Pro: Prolin, Sar: Sarkosin, MeVal: N-Methylvalin, Thr: Threonin. Man beachte, daß die NH-Gruppen in (1) noch zu den Threoninresten gehören. – Zur Definition der Torsionswinkel  $\phi$  und  $\phi'$  vgl. Abb. 3 und 13.

Actinomycine unterdrücken das Wachstum gram-positiver Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis* noch in Konzentrationen von  $<0.1 \mu\text{g/ml}$ ; dies entspricht etwa der Wirksamkeit von Penicillinen. Ihre ungewöhnliche Toxizität verhindert jedoch eine breitere chemotherapeutische Anwendung. So beträgt die letale Dosis ( $\text{LD}_{50}$ ) für Mäuse bei Actinomycin  $C_1$   $0.5\text{--}1 \text{ mg/kg}$  (Phalloidin, das Gift des grünen Knollenblätterpilzes:  $\approx 2 \text{ mg/kg}$ ) und die maximale, über mehrere Tage verteilte Toleranzdosis um  $0.1 \text{ mg/kg}$ .

Die ausgeprägten *cytostatischen* Eigenschaften des Antibiotikums wurden zunächst im Tierversuch (Ehrlich-Carcinom, Ascites-Tumore) und später auch bei selteneren Tumorarten des Menschen (Lymphogranulomatose, Wilms-Tumor, Chorioncarcinom) nachgewiesen. Vor allem bei Wilms-Tumor führte die kombinierte Behandlung durch Chirurgie, Radiotherapie und Actinomycingaben zu eindrucksvollen Erfolgen. Kinder erhielten dabei 8–10 Tage lang  $10 \mu\text{g}$  Actinomycin  $C_1$

(1) pro kg Körpergewicht und Tag. Die Toleranzschwelle für Erwachsene liegt noch tiefer. Dieser äußerst enge Spielraum zwischen effektiver und gefährlicher Dosis – bei Penicillinen ist er um das  $10^4$ -fache größer – konnte bislang, etwa mit Hilfe von strukturell modifizierten Actinomycinen oder Derivaten, nicht wesentlich verbreitert werden. Näheres über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und die Anwendung von Actinomycinen findet sich in einer ausführlichen Zusammenstellung von Meienhofer und Atherton<sup>[6]</sup>.

Die biologische Wirkung der Actinomycine beruht auf ihrer Komplexbildung mit den doppelsträngig-helicalen Desoxyribonucleinsäuren (DNA) der Zelle (Abb. 2). Schon ein gebundenes Actinomycinmolekül auf ca. 1000 Basenpaare<sup>[7]</sup> bewirkt eine selektive, 50proz. Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese und damit des Proteinaufbaus. Höhere Actinomycin-Konzentrationen behindern auch die DNA-Replikation. Dieser sehr zentrale Eingriff in den Zellstoffwechsel, bei dem das Actinomycin z. B. Bakterienzellen und Zellen eines damit infizierten Wirtsorganismus nicht prinzipiell unterscheidet – wie es bei Penicillinen der Fall ist –, macht die hohe Toxizität der Actinomycine sowie auch die unter ihrem Einfluß entstehenden pathologischen Zellveränderungen verständlich. Actinomycine nutzt man daher zunehmend für zellbiologische Untersuchungen (Virusreplikation, Biosynthesen etc.).

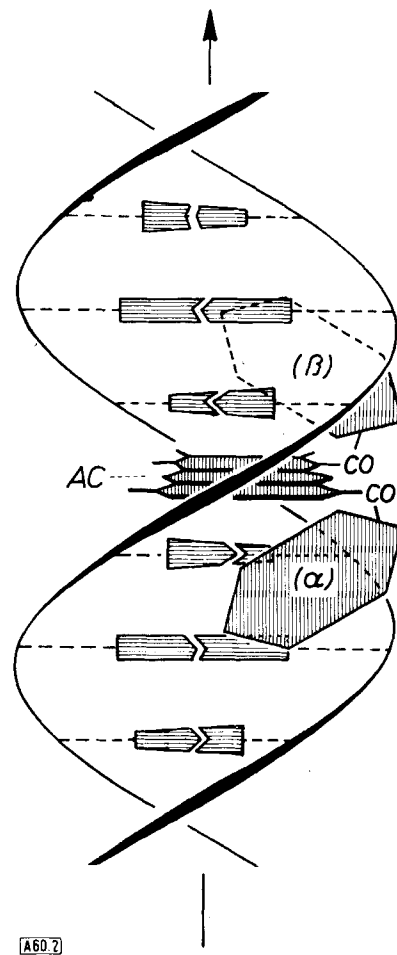


Abb. 2. Der Chromophor (AC) eines Actinomycinmoleküls schiebt sich zwischen Guanin-Cytosin-Paare der DNA-Doppelhelix (vgl. auch Abb. 18 und 20). – (α) und (β): Pentapeptidlactongruppen.

Für die Komplexbildung mit der DNA wurden vor allem zwei Möglichkeiten diskutiert: a) eine Anlagerung des Actino-

mycins an die DNA über drei Chromophor-Desoxyguanosin-Wasserstoffbrücken<sup>[8]</sup> sowie b) ein Einschub-Modell<sup>[7]</sup>. Nach b) schiebt sich das Actinomycinmolekül mit dem Chromophor selektiv zwischen zwei benachbarte Guanin-Cytosin-Basenpaare der DNA-Doppelhelix (Abb. 2), wobei es durch Wasserstoffbrücken (vgl. Abb. 20), hydrophobe Kräfte und  $\pi$ -Komplexe reversibel gebunden wird. Neben der räumlichen Blockierung führt dies zu lokalen Verzerrungen der DNA-Helix und damit zur Behinderung der Informationsübertragung (Transkription) und der oben erwähnten Folgeschritte.

Mit b) im Einklang sind u. a. hydrodynamische Messungen, die eine Verlängerung der Helixstränge nach der Komplexbildung anzeigen, gleichgewichtsdialytische und kinetische Befunde (z. B. über die Lebensdauer des Komplexes<sup>[17]</sup>) sowie neuerdings NMR-<sup>[9–13]</sup> und röntgen-analytische Daten<sup>[14–16]</sup>.

Für das Verständnis der Wirkungsweise der Actinomycine und die Suche nach Varianten mit größerer therapeutischer Breite sowie den gezielten Einsatz von Actinomycinen bei molekular- und zellbiologischen Arbeiten sind möglichst detaillierte Kenntnisse über die Bildungsweise und den Aufbau der Actinomycin-DNA-Komplexe wichtig. Art und Ausmaß dieser Wechselwirkungen hängen entscheidend von der in Lösung vorliegenden Raumstruktur der Actinomycinmoleküle ab.

## 2. Das Actinomycinmolekül

Die durch Synthesen<sup>[15, 17–21]</sup> bestätigte Primärstruktur von Actinomycin C<sub>1</sub> zeigt Abb. 1: der Chromophor, die 2-Amino-4,6-dimethyl-3-oxo-phenoxazin-1,9-dicarbonsäure („Actinocin“), ist über Säureamidbrücken mit zwei Pentapeptidlactongruppen [( $\alpha$ ) und ( $\beta$ )] verknüpft. Deren Aminosäuresequenzen 1' $\alpha$ -5' $\alpha$  und 1' $\beta$ -5' $\beta$  können – wie im Actinomycin C<sub>1</sub> (1) – gleich oder aber verschieden sein: man spricht demgemäß von *iso*- bzw. *aniso*-Actinomycinen (vgl. Abb. 16). Infolge der Unsymmetrie des Chromophors sind jedoch auch strukturell übereinstimmende ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidlactoneinheiten nicht äquivalent.

Nimmt man für beide Peptidringe zunächst gleichartige, stabile und ebene Gerüstkonformationen (Abb. 3) an, so kann sich jeder Peptidring unabhängig um seine N–C<sub>tr</sub>- und die C<sup>1</sup>–CO- bzw. C<sup>9</sup>–CO-Bindung (Abb. 1) drehen. Die Amidbindung zwischen Chromophor und Peptidring sollte in der energetisch und sterisch begünstigten *trans*-Form verbleiben. Damit bestimmen die Torsionswinkel  $\phi_{1\alpha}$  und  $\phi_{1\beta}$  sowie  $\phi_A$  und  $\phi_B$  (Abb. 1 und 3) die Einstellung der Peptidebenen zueinander und in bezug auf die Chromophorebene. Eine Variation

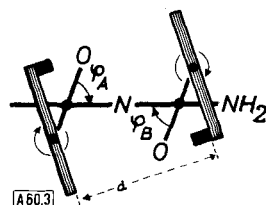


Abb. 3. Das Actinomycin-C<sub>1</sub>-Molekül (Abb. 1) schematisch von oben skizziert (—N—NH<sub>2</sub> Chromophorebene; ≡ Peptidringebene; ■ Seitenkette, ● Drehpunkte in den Chromophor-Peptid-Brücken).

der Winkel  $\phi_A$ ,  $\phi_B$  (Abb. 3) beispielsweise ändert sowohl den Abstand der Peptidringe (d) als auch ihre Lage hinsichtlich der funktionellen Gruppen des Chromophors. Beides sind

wichtige Parameter für die Ausbildung der Actinomycin-Nucleotid-Komplexe.

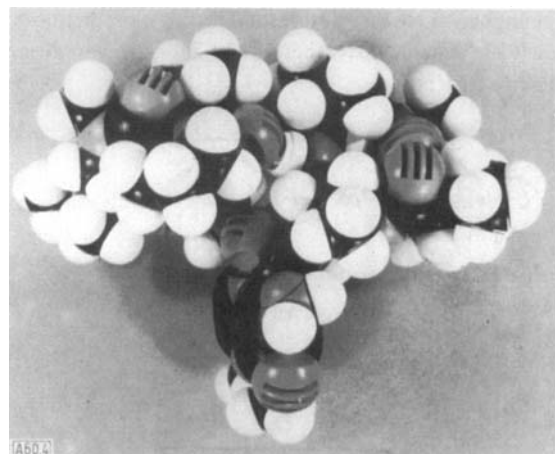


Abb. 4. CPK-Modell eines Actinomycin-C<sub>1</sub>-Moleküls in der röntgen-analytisch am Actinomycin-Desoxyguanosin-Komplex [14–16] ermittelten Raumstruktur. – Unten der Chromophor mit der Aminogruppe vorn; links der ( $\alpha$ )-, rechts der ( $\beta$ )-Peptidring; in der Chromophorebene eine der strukturstabilisierenden CO...HN<sub>VA</sub>-Wasserstoffbrücken.

Molekülmodelle (Abb. 4) zeigen nun, daß aus sterischen Gründen ein Durchdrehen oder eine quasi-koplanare Anordnung der Peptidringe unwahrscheinlich ist. Vielmehr ergeben sich vier rotationsisomere Grundstrukturen (Abb. 5a–5d)<sup>[22]</sup>. Eine Konformationsänderung, etwa das Abknicken der Peptidebenen (Abb. 5e), stört diese Einteilung nicht.

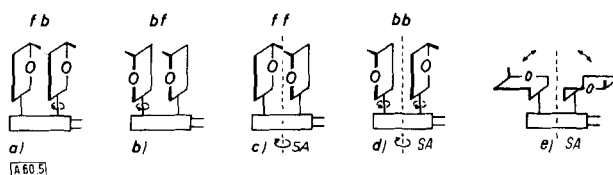


Abb. 5. Rotationsisomere Grundstrukturen eines Actinomycinmoleküls (SA: Pseudo-C<sub>2</sub>-Symmetrieachse). a) fb-, b) bf-, c) ff-, d) bb-Struktur, e) ff-Struktur mit abgeknickten Peptidebenen („Konformationswechsel“).

Nächstliegende Ziele der Untersuchungen waren demnach: a) die Ermittlung der – auch in den *iso*-Actinomycinen wie (1) – nicht zwangsläufig gleichen Gerüstkonformationen der ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidlactongruppen sowie b) die Klärung der auf den Chromophor bezogenen räumlichen Anordnung beider Peptideinheiten. Daneben interessierten mögliche Wechselbeziehungen zwischen den am Chromophor in so enger Nachbarschaft fixierten ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidringen [( $\alpha,\beta$ )-interanulare Wechselwirkungen]. Da vor allem die in Lösung vorliegenden Raumstrukturen und deren Stabilität untersucht werden sollten und frühere Kristallstrukturanalysen<sup>[23]</sup> überdies wenig befriedigend verlaufen waren, bot sich als bei weitem aussichtsreichste Untersuchungsmethode die NMR-Spektroskopie an.

## 3. Konformationen der freien Pentapeptidlactongruppen

Für die Konformationsstudien an den Peptidlactongruppen wurden anstelle des komplizierten Actinomycinmoleküls (1) NMR-spektrometrisch leichter analysierbare, synthetische Derivate des einfachen Pentapeptidlactons<sup>[19]</sup> (Abb. 6), also praktisch „halbierte“ Actinomycine, eingesetzt. Diese im folgenden

als *freie* (nicht paarweise am Actinocinrest fixierte) Peptidlactone bezeichneten Verbindungen (2) haben ebenfalls die Aminosäuresequenz des Actinomycins C<sub>1</sub> (1) – es wurden auch andere untersucht –; die Acylreste sind Vorstufen des Chromophors.

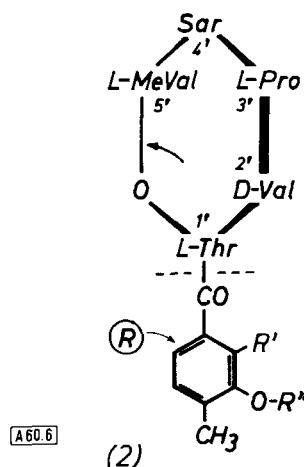


Abb. 6. „Freie“ Pentapeptidlactone: (2a), R' = NO<sub>2</sub>, R'' = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; (2b), R' = NO<sub>2</sub>, R'' = CH<sub>3</sub>; (2c), R' = NH<sub>2</sub>, R'' = H; (2d), R' = NO<sub>2</sub>, R'' = CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, Lactonbindung geöffnet (Pfeil); (2e), R' = NO<sub>2</sub>, R'' = CH<sub>3</sub>, Lactonbindung geöffnet (Pfeil) (siehe dazu auch Abb. 1b).

Modellbetrachtungen, <sup>1</sup>H-NMR-Daten<sup>[24]</sup> und die bemerkenswerte Stereospezifität der Lactonringschluß-Reaktion (2d) → (2a) und (2e) → (2b)<sup>[18, 24]</sup> ließen für das 16gliedrige Cyclopeptid *eine* stark bevorzugte Gerüstkonformation erwarten. Ausführliche <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Messungen zeigten aber bald, daß das freie Peptidlacton (2) in Deuteriochloroform<sup>[25]</sup> zwar eine einheitliche Konformation annimmt, diese jedoch keineswegs mit der im Actinomycin C<sub>1</sub> vorliegenden übereinstimmt. Einflüsse des Chromophors und mögliche Wechselbeziehungen zwischen den eng benachbarten Peptidgruppen mußten im Actinomycin einen weiteren Konformationstyp stabilisieren. Ob auch das freie Peptidlacton diesen Typ oder noch andere Formen, etwa in Abhängigkeit vom Solvens, ausbilden konnte, war – neben der Struktur dieser Konformere – als nächstes zu klären.

Solche Untersuchungen setzen eine besonders zuverlässige Identifizierung zahlreicher <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Signale (NCH<sub>3</sub>, C<sup>α</sup>-H, NH etc.) voraus. Diese gelang vor allem mit synthetischen Peptiden und Actinomycinen, die an ausgewählten Stellen des Moleküls – u. a. auch spezifisch in der (α)- oder (β)-Peptidkette – mit bis zu 15 Deuteriumatomen markiert worden waren<sup>[26]</sup>.

### 3.1. Abhängigkeit der Konformationen vom Lösungsmittel

Das in unterschiedlich polaren Solventien von Benzol bis Wasser studierte Verhalten des freien Pentapeptidlactons (2) zeigte interessante Besonderheiten, die weder beim Actinomycin (Abschnitt 4) noch bei den linearen Pentapeptiden (2d) und (2e) oder deren Vorstufen auftreten.

Der praktisch stereospezifisch ablaufende Lactonringschluß (2d) → (2a) und (2e) → (2b) – er gelang nur bei Peptidketten mit der für die Actinomycine typischen Konfigurationssequenz LDL-L<sup>[18]</sup> –, hat signifikante Verschiebungen der <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-Resonanzen zur Folge. Die resultierenden NMR-Spektren (vgl. Abb. 8, Spektrum C, und Abb. 11d) sind für das cyclische Peptid (2) sehr charakteristisch (NCH<sub>3</sub>, 3-H<sub>Thr</sub>, 2-H<sub>Sar</sub>) und

erlauben beispielsweise dessen sichere Identifizierung – etwa bei biosynthetischen Studien – oder eine rasche Bestimmung von Cyclisierungsausbeuten. Sie zeigen außerdem, daß das freie Pentapeptidlacton (2) in feuchtem Chloroform als günstigstem Lösungsmittel<sup>[25]</sup> nur *eine*, sehr temperaturstabile Konformation ausbildet. Diese haben wir als „C“-Konformation (vgl. Abschnitt 3.2) bezeichnet.

In Benzol liegt ebenfalls der „C“-Typ vor. Zum Unterschied von Chloroformlösungen bewirkt hier jedoch ein Anstieg der Peptidlacton-Konzentrationen (0.001 → 0.1 mol/l) eine rasch fortschreitende Dimerisierung des Cyclopeptids (2). Das äußert sich u. a. in einer Verdoppelung des osmometrisch ermittelten Molekulargewichtes und zahlreicher Protonensignale<sup>[27]</sup>. Genauere <sup>1</sup>H-NMR-Studien<sup>[24, 28]</sup> lassen auf das Entstehen einer unsymmetrischen fb- oder bf-Anordnung schließen (vgl. Abb. 5).

Verglichen mit den Daten in Chloroform zeigen die Spektren des freien Pentapeptidlactons (2) in Aceton überraschend starke Verschiebungen zahlreicher <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Signale (Abb. 8, C → A, und Abb. 11d → 11c), die normale Solvenseffekte bei weitem übertreffen. Charakteristische Kopplungskonstanten, u. a. Indikatoren für die Größe des Torsionswinkels einer Bindung, sind ebenso verändert wie die Temperaturabhängigkeiten der δ(NH)-Werte und die NH → ND-Austauschgeschwindigkeiten, die wiederum Rückschlüsse auf die Art der Wasserstoffbrücken erlauben. Die Befunde lassen sich nur mit durchgreifenden konformativen Umwandlungen im Peptidgerüst erklären<sup>[28, 29]</sup>. Auch in Aceton entsteht lediglich *eine* temperaturstabile Struktur, die „A“-Konformation. – Dieser „A“-Typ bildet sich ebenso in Dimethylsulfoxid, Tetrahydrofuran, Methanol und ähnlichen Lösungsmitteln.

Aceton/Chloroform-Gemische enthalten das „A“- und das „C“-Konformere nebeneinander. Das Mengenverhältnis hängt von der Solvenszusammensetzung ab und kann direkt dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum entnommen werden, das aus den sich anteilmäßig überlagernden Spektren der beiden Einzelkonformere (Abb. 8, A + C) resultiert. In Aceton oder Methanol mit 5 bis >95 % Wasser liegen ebenfalls beide Strukturen vor, hier aber zu stets etwa gleichen Anteilen. – Für das Auftreten eines dritten Konformerentyps ergaben sich unter den üblichen Meßbedingungen keine Anhaltspunkte.

### 3.2. Die „C“-Konformation

Nach allen charakteristischen <sup>1</sup>H-NMR-Daten wird das „C“-Konformere des freien Pentapeptidlactons (2) durch eine feste intramolekulare Wasserstoffbrücke mit NH<sub>Val</sub> als Donor stabilisiert<sup>[24]</sup>. Nimmt man für sämtliche Amidbindungen des Peptidringes (b, e, h, k in Abb. 7) zunächst die energieärmere *trans*-Form an, dann zeigen Dreiding- und ebenso die raumfüllenden CPK-Molekülmodelle, daß die sterischen Verhältnisse für eine gestreckte NH<sub>Val</sub>...OC<sub>Sar</sub>-Brücke ideal sind. Alle anderen H-Brückenacceptoren entfallen praktisch aus räumlichen Gründen, auch wenn man einzelne Amidgruppen (Abschnitt 3.3) *cis*-orientiert. Mit dieser transanularen H-Brücke (Abb. 7), dem strukturstützenden Prolinring sowie unter Berücksichtigung der van-der-Waals-Radien der Atome liegt aber die Gerüstkonformation des recht kompakten (Abb. 4) Peptidlactonringes bereits weitgehend fest.

Zwei begrenzte Abwandlungen erlaubt noch der untere Ringteil m bis p<sup>[24]</sup>. Die-sterisch günstigste, in Abb. 7 skizzierte

Struktur steht im Einklang mit allen bislang erhaltenen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten. Diese betreffen u. a. die Ringbindungen c mit dem  $\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}_{\text{Val}}$ -Torsionswinkel  $\phi_2^* \approx 150^\circ$  [30, 31], p ( $\text{HC}^\alpha-\text{C}^\beta\text{H}_{\text{Thr}} \approx 90^\circ$ ) und h, i ( $\text{CO}_{\text{Pro}}$  und  $\text{H}_{\text{Sar}}^*$  „peri“-ständig) sowie auch den Torsionswinkel  $\phi_1^* (\approx 180^\circ)$  und die  $\text{C}^\alpha-\text{C}^\beta$ -Bindungen der Valin- und Methylvalinreste.

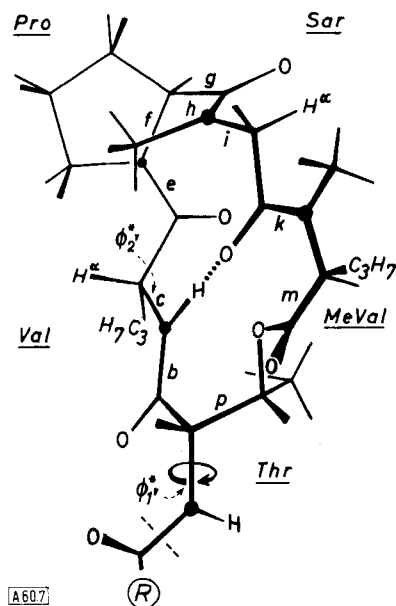


Abb. 7. Die „C“-Konformation des freien Pentapeptidolactons (2). ® vgl. Abb. 6. Definition von  $\phi^*$  siehe Abb. 13; ● N-Atome.

mativen Umwandlung des Pentapeptidolactons vom „C“- in den „A“-Typ und umgekehrt ergeben (Abschnitt 3.3). Neuere Konformationsenergie-Rechnungen von *De Santis et al.* [32] bestätigen die Möglichkeit zur Bildung der vorgeschlagenen  $\text{NH}_{\text{Val}}\cdots\text{OC}_{\text{Sar}}$ -Brücke, begünstigen aber gleichzeitig – und dies ist mit NMR- und Modelldaten nicht vereinbar – für die Val $\rightarrow$ Pro- und die Pro $\rightarrow$ Sar-Bindungen die *cis*-Form [33].

### 3.3. Die „A“-Konformation

Der Solvenswechsel Chloroform $\rightarrow$ Aceton verursacht, wie schon erwähnt, eine Umwandlung der Gerüstkonformation des freien Pentapeptidolactons (2) und als Folge davon markante Veränderungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. In den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (Abb. 8, C $\rightarrow$ A) zeigt sich beispielsweise am gesamten Verhalten des  $\text{NH}_{\text{Val}}$ -Protons, daß die transanulare H-Brücke des „C“-Konformers in Aceton gelöst und – bei jetzt räumlich exponiert liegendem NH – intermolekular zum Solvens hin ausgebildet wird (Abb. 10) [28]. Die durch gezielte Deuteriummarkierungen einwandfrei zugeordneten 2-H-Signale von Sarkosin, Methylvalin und Prolin sind zu z. T. ganz ungewöhnlichen  $\delta$ -Werten verschoben, und die  $\text{NCH}_3$ -Signale von Methylvalin und Sarkosin haben ihre Lage vertauscht. Aus dem 2-H-Triplett des Prolins wird in Aceton ein Pseudodoublett; dies ist typisch für einen Wechsel der Val $\rightarrow$ Pro-Amidbindung von *trans* nach *cis* [34, 35]. Daß sich auch die Pro $\rightarrow$ Sar-Bindung offenbar nach *cis* verdreht hat, deutet in Analogie zu Modellverbindungen [26, 38] die verkleinerte ge-

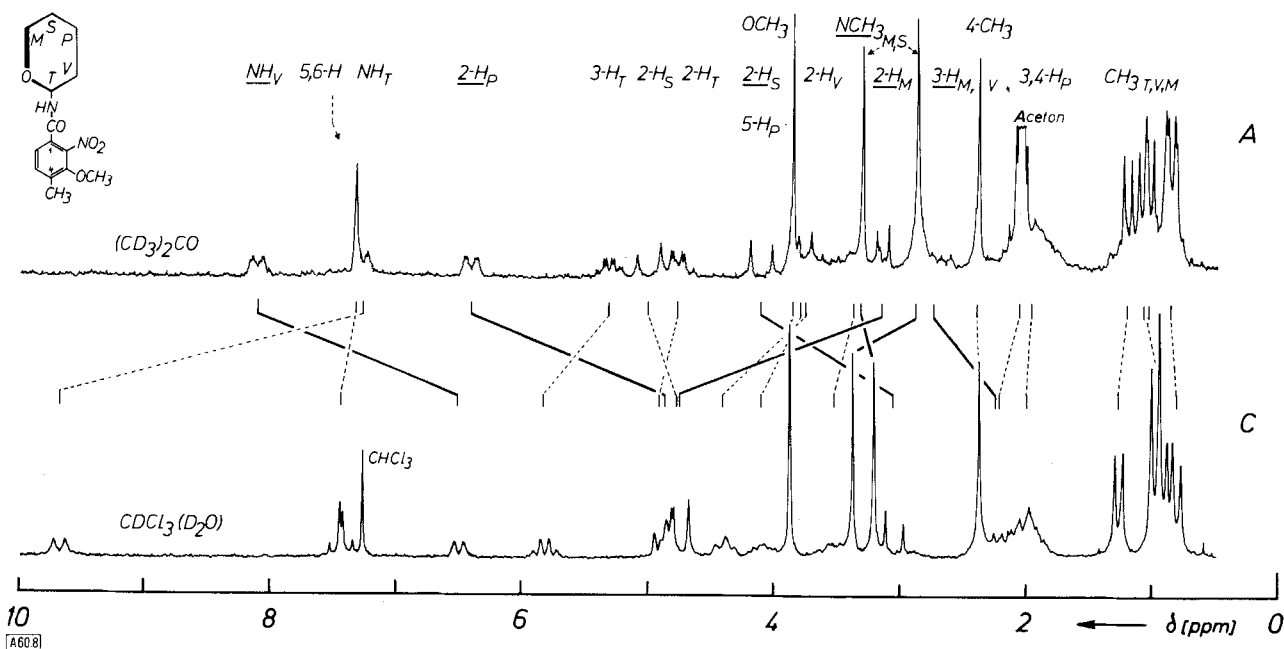


Abb. 8. Vergleich der 100-MHz- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren des freien Pentapeptidolactons (2d) in  $[\text{D}_6]$ -Aceton („A“-Konformation) und  $[\text{D}]$ -Chloroform („C“-Konformation). – T, V, P, S, M = Threonin, Valin, Prolin, Sarkosin, N-Methylvalin (genauere Zuordnung vgl. [26]). Interner Standard: Tetramethylsilan; Gerät: Varian HA-100.

Da die *trans/cis*-Energieunterschiede für Peptidbindungen, die zu N-Alkylaminosäuren wie Prolin, Sarkosin oder Methylvalin führen (e, h, k in Abb. 7), erheblich zurückgehen, ist die Annahme der all-*trans*-Amidanordnung allerdings problematisch. Sie gestattet aber die plausibelste Deutung sowohl der sehr stabilen intramolekularen H-Brücke als auch aller übrigen Befunde, vor allem derjenigen, die sich aus der konfor-

minale 2-H $_2$ -Kopplungskonstante des Sarkosins (18 $\rightarrow$ 14 Hz) an [39].

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Pentapeptidolactons (vgl. Abb. 11d $\rightarrow$ 11c) stützen diese Befunde. So geht auch aus der Lage der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des Prolins ( $\text{C}_\text{P}^\alpha$ ,  $\text{C}_\text{P}^\beta$ ) in Übereinstimmung mit Modelluntersuchungen [35–37] hervor, daß die Val $\rightarrow$ Pro-Amidbindung von (2) in Chloroform *trans*-, in Aceton

dagegen *cis*-ständig sein sollte. Die  $\text{NCH}_3$ -Signale von Sarkosin und Methylvalin werden gleichfalls über Kreuz verschoben, und das  $\text{C}_{\text{MeVal}}^{13}\text{C}$ -NMR-Signal ( $\text{C}_M^a$ ) erreicht den ungewöhnlichen Wert von  $\delta = 72$  (vgl. Abb. 11c).

Die NMR-spektrometrischen Befunde insgesamt erlaubten zwar noch keinen detaillierten Strukturvorschlag für das infolge der fehlenden transularen H-Brücke viel labilere „A“-Konformere des Pentapeptidlactons (2), zeigten aber u.a. folgendes: 1. Die „A“-Form enthält offensichtlich eine *cis,cis*-verknüpfte Val→Pro→Sar-Sequenz – ein gewichtiges Argument für die all-*trans*-Amidstruktur des „C“-Konformeren (Abb. 7); 2. die charakteristischen  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des „A“-Konformeren von (2) stimmen überraschend gut mit denen der Peptidlactoneinheiten des Actinomycins  $\text{C}_1$  (1) überein (vgl. Abb. 11c→11b). Das heißt, die „A“-Konformation des freien Pentapeptidlactons (2) liegt auch in den fixierten ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidlactonringen des gelösten Actinomycinmoleküls vor (Abschnitt 4).

Inzwischen war durch Röntgen-Strukturanalysen<sup>[14–16]</sup> die Konformation der Peptidlactonringe in einem kristallinen Actinomycin- $\text{C}_1$ /Desoxyguanosin-Komplex bekannt geworden (vgl. Abschnitt 7 und Abb. 20). Da sich auch hier die Val→Pro→Sar-Sequenzen als *cis,cis*-verknüpft erwiesen, lag es nahe, die im Kristall vorliegende Peptidlactonstruktur versuchsweise auf das „A“-Konformere des gelösten Cyclopeptids (2) zu übertragen.

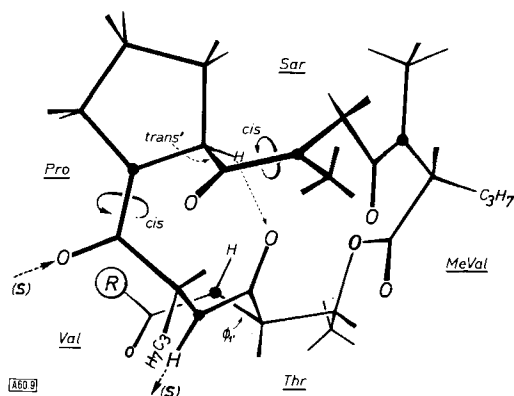


Abb. 9. Die „A“-Konformation des freien Pentapeptidlactons (2), skizziert nach der röntgen-analytisch ermittelten Struktur des Actinomycin- $\text{C}_1$ -Desoxyguanosin-Komplexes [14–16]. –  $\odot$  vgl. Abb. 6; (S): Solvens;  $\bullet$  N-Atome.

Diese in Abb. 9 skizzierte Struktur weicht von der des „C“-Konformeren (Abb. 7) erheblich ab. So sind infolge der *cis*-Amidbindung zwischen Valin und Prolin die CO- und NH-Gruppen des Valins aus dem Peptidring gedreht und können nun – im Einklang mit den  $\text{NH}_{\text{Val}}$ -NMR-Daten – strukturstabilisierende H-Brücken zum Solvens ausbilden. Die *trans*'-Prolincarboxyl- und die *cis*-Pro→Sar-Bindung verändern die Peptidringgeometrie zusätzlich, so daß beispielsweise 2-H des Prolins direkt neben den Carbonylsauerstoff des Threonins gelangt, was die ungewöhnliche Lage des  $^1\text{H}$ -NMR-Signals ( $\delta = 6.4$ ) erklären könnte. Interessanterweise steht die  $\text{C}^2\text{---N}_{\text{Thr}}$ -Bindung ( $\phi_1$ ) und damit auch die Ebene des Chromophors R jetzt nicht mehr wie beim „C“-Konformeren in der Peptidringebene, sondern fast senkrecht dazu (vgl. Abb. 10). Insgesamt sind die bisher für (2) in Aceton erhaltenen NMR-Befunde (Bindungswinkel etc.) mit dieser Struktur konsistent, so daß Abb. 9 die Gerüstkonformation „A“ des freien Pentapeptidlactons (2) offenbar recht gut wiedergibt.

#### 4. Die Konformation der Peptidlactongruppen im Actinomycin

Die Frage, was mit den „A“- und „C“-Konformeren des freien Pentapeptidlactons bei dessen Überführung in ein Actinomycinmolekül geschieht, war – wie oben bereits angedeutet – klar zu beantworten. Actinomycin  $\text{C}_1$  (1) entsteht durch oxidative Kondensation von zwei Molekülen des Peptidlacton-Derivates (2c) in Methanol/Wasser. Hierbei liegt (2c) dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum nach (Abschnitt 3.1) zu etwa gleichen Teilen in der „A“- und in der „C“-Form vor (Abb. 10). Ins Actinomycin wird *nur* die „A“-Konformation übernommen. Dies zeigt sich eindeutig beim Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Daten<sup>[28, 29, 40]</sup> und besonders anschaulich in den  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren<sup>[41]</sup>.

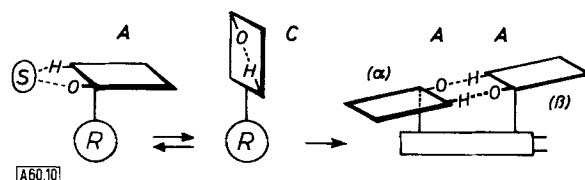


Abb. 10. Übergang des freien Pentapeptidlactons (2c) in ein Actinomycinmolekül (1) unter Stabilisierung der Peptidgerüstkonformation „A“. – (S): Solvens.

Die in Abb. 11d und 11c (Chloroform→Aceton) skizzierten Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale des freien Pentapeptidlactons (2a), die denen der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale von (2b) (Abb. 8) entsprechen, spiegeln den Konformationswechsel des freien Cyclopeptids (2) vom „C“- zum „A“-Typ wider. Im „A“-Konformeren und im Actinomycin  $\text{C}_1$  (Abb. 11c→Abb. 11b) stimmt die Lage der Peptid- $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale dagegen praktisch überein. Somit haben auch im Actinomycinmolekül die Peptidlactongruppen die Gerüstkonformation „A“, welche aber jetzt, wie Abb. 11a zeigt, durch einen umgekehrten Solvenswechsel Aceton→Chloroform nicht mehr wie beim freien Peptidlacton in den „C“-Typ umgewandelt werden kann.

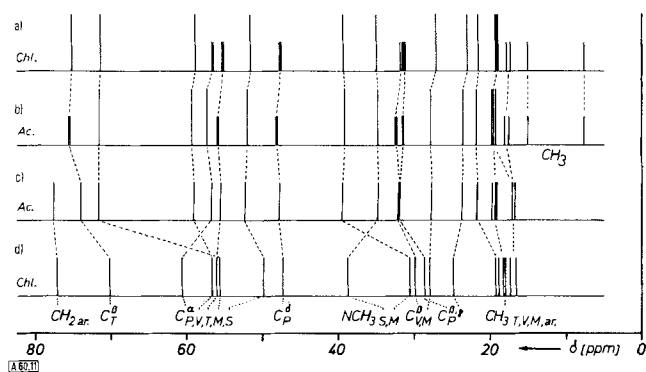


Abb. 11.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Peptidlactoneinheiten des Actinomycins  $\text{C}_1$  a) in  $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ , b) in  $[\text{D}_6]$ -Aceton; c)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des freien Pentapeptidlactons (2a) in  $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ , d) in  $[\text{D}_6]$ -Aceton. – T, V, P, S, M: Threonin, Valin, Prolin, Sarkosin, N-Methylvalin. Vgl. dazu das Gesamtspektrum von (1) in Abb. 17.

Die damit im Gesamtmolekül quasi eingerastete „A“-Konformation der Actinomycinpeptidringe bleibt nach zahlreichen weiteren  $^1\text{H}$ -NMR-Studien<sup>[9, 10, 42, 43]</sup> auch in Benzol, Pyridin, Dimethylformamid bis hin zu Methanol und Wasser sowie auch bei Temperatur- und Konzentrationsänderungen erhalten. Als Ursache für diese sehr überraschende Strukturstabil-

sierung muß man neben der Verklammerung und Ausrichtung durch den Chromophor eine wechselseitige Abstützung der beiden ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidlactonringe durch zwei feste interanulare H-Brücken (Abb. 10) ansehen. Deren Donor ist nach den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten<sup>[9, 40, 42, 43]</sup> in beiden Ringen wiederum die  $\text{NH}_{\text{Val}}$ -Gruppe. Als Acceptor dient nicht mehr wie beim freien „A“-Konformer das Solvens, sondern der durch den gemeinsamen Actinocin-Chromophor bereits in günstiger Lage fixierte Nachbarpeptidring (Abb. 10; vgl. Abschnitt 5)<sup>[44]</sup>.

Die in Abb. 11 a, 11 b und 17 skizzierten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren des Actinomycins  $\text{C}_1$  zeigen weiterhin, daß die Signale der Kohlenstoffatome, die in der ( $\alpha$ )- und in der ( $\beta$ )-Peptidkette an gleicher Stelle liegen (*homologe* C-Atome), praktisch zusammenfallen. Minimale Abweichungen (kurze Doppelstriche in Abb. 11) resultieren aus der Unsymmetrie des Chromophors. Analoges gilt, unabhängig vom Solvens und der Temperatur, auch für die NMR-Signale der Protonen<sup>[9, 26, 28]</sup>. Dies bedeutet, daß beide Peptidlactongruppen eines gelösten *iso*-Actinomycins wie  $\text{C}_1$  nicht nur im Gerüstkonformationstyp („A“), sondern auch in der gesamten Raumstruktur praktisch übereinstimmen und daß sie, wie in Abschnitt 5 erläutert, zueinander axialsymmetrisch angeordnet sein müssen (Abb. 10).

## 5. Die räumliche Anordnung der Peptidlactongruppen im Actinomycin $\text{C}_1$

Die auf den Chromophor bezogene Lage der beiden Actinomycinpeptidringe wird, wie in Abschnitt 2 erörtert, durch die drei Bindungen der Chromophor-Peptid-Brücken (Abb. 1) sowie deren Torsionswinkel (Abb. 13) definiert. Dabei sollten die Amidbindungen aufgrund der sterischen Verhältnisse bereits in der *trans*-Form festliegen.

Die Einstellung der  $\text{C}^9\text{--CO-}$  und  $\text{C}^1\text{--CO-}$  Bindungen des Chromophors ( $\varphi_A$ ,  $\varphi_B$  in Abb. 12 und 13) läßt sich nur in wenigen Fällen NMR-spektrometrisch kontrollieren. So liegen in Modellverbindungen mit nur *einem* Aminosäure- oder Peptidrest wie (3a) und (4a) bzw. (3b) und (4b)<sup>[45]</sup> höchstwahrscheinlich beide Carbonylsauerstoffatome in der Chromophorebene ( $\varphi_A$ ,  $\varphi_B \approx 0^\circ$ ,  $180^\circ$  bzw.  $180^\circ$ ,  $0^\circ$ ). Das geht vor allem aus den  $^1\text{H}$ -NMR-Werten (Abb. 12) hervor, wobei (3a) eine seltene geminale  $\text{H--N--H}$ -Kopplung<sup>[46]</sup> zeigt.

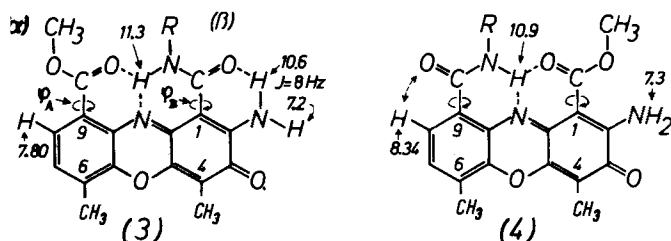


Abb. 12. Zur Einstellung der Carbonylgruppen des Chromophors (Torsionswinkel  $\varphi_A$ ,  $\varphi_B$ ): – (3a), (4a):  $\text{R--NH=Thr(OCH}_3\text{)}$ ; (3b), (4b):  $\text{R--NH=}$  Pentapeptidlacton [45]; (3c), (4c): wie (a), jedoch 2-OH anstatt 2-NH<sub>2</sub>; (3d): wie (a), jedoch in ( $\alpha$ ) Thr(OCH<sub>3</sub>) anstatt OCH<sub>3</sub>. – Die eingezeichneten  $^1\text{H}$ -NMR-Werte ( $\delta$ ) gelten für (3a) und (4a) (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Eine Hydroxy- anstatt der 2-Aminogruppe [(3c), (4c)]<sup>[45]</sup> begünstigt die koplanare, durch H-Brücken fixierte Ausrichtung der Carbonylgruppen des Chromophors ( $\delta(2\text{-OH}) = 15.95$  bzw.  $14.6$ ). Diese wird jedoch in der Regel verhindert, wenn anstelle der ( $\alpha$ )- oder ( $\beta$ )-Methoxygruppe ein zweiter, voluminöserer Aminosäure- oder Peptidrest steht [(3d), (1)].

In Actinomycinen wie  $\text{C}_1$  sind daher die Carbonylgruppen stets aus der Chromophorebene gedreht<sup>[47]</sup>. Sie müssen entsprechend Abb. 13 *transoid* eingestellt sein (vgl. unten).

Auskunft über die  $\text{N--C}^{\alpha}$ -Bindungen der beiden Threoninreste (Torsionswinkel  $\phi_{1\alpha}$ ,  $\phi_{1\beta}$ ) geben die  $\text{HN--C}^{\alpha}\text{H}$ -Kopplungskonstanten, die wiederum von den  $\text{HN--C}^{\alpha}\text{H}$ -Winkeln  $\phi_{1\alpha}^*$ ,  $\phi_{1\beta}^*$  (Abb. 13) abhängen<sup>[30]</sup>. Für das freie Peptidlacton (2) findet man  $\phi^* \approx 180^\circ$ , also eine sterisch vorteilhafte *anti*-Einstellung der Wasserstoffatome. Im Actinomycin  $\text{C}_1$  betragen – wie in Abb. 13 gezeichnet –  $\phi_{1\alpha}^*$  und  $\phi_{1\beta}^*$  etwa  $150^\circ$  ( $J_{\text{CH,NH}} = 7.0 \text{ Hz}$ ;  $\text{CDCl}_3$ ) und sind damit *gleich* groß<sup>[40]</sup>. Auch hier ist laut Modell die antiperiplanare Protonenanordnung räumlich sehr begünstigt.  $^1\text{H}$ -NMR-Studien in anderen Solventen<sup>[9, 42]</sup> führen zu ähnlichen Ergebnissen. Werden beide Peptidgruppen des Actinomycins  $\text{C}_1$  oder der Chromophor strukturell abgewandelt (Abb. 16), so verändern sich  $\phi_{1\alpha}^*$  und  $\phi_{1\beta}^*$  im Bereich von  $120\text{--}180^\circ$  ( $J_{\text{CH,NH}} = 2\text{--}9 \text{ Hz}$ ), bleiben aber untereinander stets gleich.

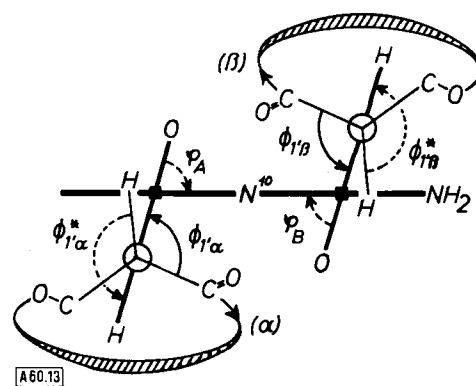


Abb. 13. Anordnung der Peptidlactongruppen im Actinomycinmolekül und Torsionswinkel der Bindungen in den beiden Chromophor-Peptid-Brücken (Molekül von der Peptidseite her gesehen; Abb. 1 von oben). –  $\text{N--NH}_2$  Chromophorebene; ■ Carbonylkohlenstoffatome an C-1 und C-9; (Differenz zwischen  $\phi$  und  $\phi^*$ :  $60^\circ$ ). Abgebildet ist die natürliche *transoid*,  $\text{C}_2$ -axialsymmetrische Einstellung der Peptidgruppen.

Nun können, ganz abgesehen von sterischen Behinderungen, die Torsionswinkelpaare  $\varphi_A$ ,  $\varphi_B$  und  $\phi_{1\alpha}$ ,  $\phi_{1\beta}$  nicht beliebige Werte annehmen. Vielmehr müssen die Bindungen in den Chromophor-Peptid-Brücken stets so eingestellt sein, daß die räumliche Lage der ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidringe die Ausbildung von zwei wesentlichen Merkmalen der Actinomycinstruktur (Abschnitt 4) gestattet: a) die axialsymmetrische Anordnung der Peptidlactongruppen und b) ihre konformative Stabilisierung durch die beiden wechselseitigen, den Peptidringabstand bestimmenden Wasserstoffbrücken (Abb. 10 und 14).

Der allgemeine Befund, daß die  $^1\text{H}$ -NMR-Signale von homologen Kernen des ( $\alpha$ )- und des ( $\beta$ )-Peptidringes – auch wenn diese exponiert liegen (Seitenkettenprotonen) – praktisch zusammenfallen, zeigt, daß jeder der beiden Peptidringe sowohl vom direkt angrenzenden Nachbarpeptid als auch (mit Einschränkungen) vom Chromophor her gleichartig magnetisch abgeschirmt wird. Das heißt, *homologe* Atomgruppen „sehen“ das jeweilige Nachbarpeptid aus der gleichen Perspektive (vgl. Abb. 20). Schon hieraus ergibt sich die  $\text{C}_2$ -axialsymmetrische Anordnung der Peptidringe, die zwangsläufig den Chromophor mit einschließt (Abb. 13 und 14). Aufgrund des unsymmetrischen Actinocin-Chromophors resultiert dann für das gesamte Actinomycinmolekül eine pseudo- $\text{C}_2$ -Symmetrie, wobei die Symmetrieachse durch  $\text{N}^{10}$  und  $\text{O}^5$  (Abb. 1) oder in Abb. 13 und 14 senkrecht zur Bildebene durch  $\text{N}^{10}$  geht (s. auch Abb. 5c und 5d). Diese Peptidanordnung bedeutet

in Anbetracht der für *iso*-Actinomycine stets gleich groß gefundenen Torsionswinkel  $\phi_{1\alpha}$ ,  $\phi_{1\beta}$  (s. oben), daß auch  $\phi_A$  und  $\phi_B$  annähernd übereinstimmen (Abb. 13).

Die beiden ( $\alpha,\beta$ )-interanularen, von den  $\text{NH}_{\text{val}}$ -Gruppen ausgehenden und strukturell gleichen Wasserstoffbrücken (Abb. 10 und 14) erfordern ebenfalls, daß sich die Peptidringe mit dem „Gesicht“ zueinandergekehrt (vgl. die ff-Form in Abb. 5c) ausrichten. Als Acceptoren der H-Brücken muß man – die in Abb. 9 skizzierte Peptidkonformation „A“ zugrunde gelegt – auch in Lösung die gegenüberliegenden Valincarboxylgruppen des Nachbarpeptids ansehen (Konformationsenergie-Rechnungen und IR-Befunde<sup>[32]</sup>, Modellbetrachtungen). Aus mehreren  $^1\text{H}$ -NMR-Studien<sup>[9, 27, 41, 42]</sup> sowie ORD-Daten<sup>[49]</sup> und Untersuchungen von Actinomycin- $\text{C}_1$ -Varianten<sup>[28]</sup> geht übereinstimmend hervor, daß die beiden H-Brücken nicht nur stets gleichartig, sondern in üblichen Solventien, einschließlich Wasser, auch überraschend stabil sind.

Alle oben erörterten, charakteristischen Strukturelemente des Actinomycinmoleküls – die festen Abmessungen des Chromophors, die exzentrisch beweglichen Chromophor-Peptid-Brücken, die konformativ festlegbaren und axialsymmetrisch auszurichtenden Peptidringe, die beiden H-Brücken, die deren Abstand bestimmen etc. – legen insgesamt den Raumstrukturtyp der Actinomycine eindeutig fest (Abb. 14 und 20). Die beiden Wasserstoffbrücken haben dabei eine Schlüsselfunktion, da sie durch ihr „Einrasten“ im fertigen Molekül sowohl die Gerüstkonformation als auch die Lage der Peptidlactonringe und damit die gesamte Raumstruktur praktisch verriegeln (vgl. hierzu Abschnitt 6).

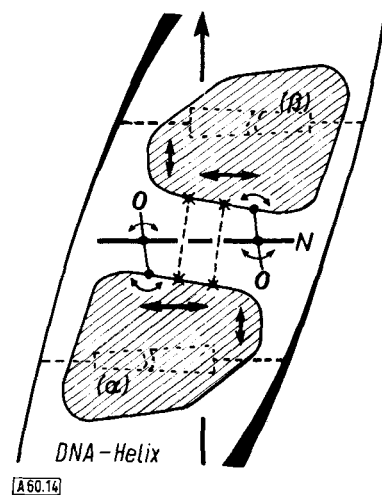


Abb. 14. Umrißskizze eines in die DNA-Helix eingeschobenen Actinomycinmoleküls, von der Peptidseite her betrachtet (vgl. dazu auch Abb. 4). – \* --- \* ( $\alpha,\beta$ )-interanulare Wasserstoffbrücken, • Drehpunkte.

Die Umrißskizze eines solchen Actinomycin- $\text{C}_1$ -Moleküls (Abb. 14) zeigt, daß die im Prinzip fixierte Struktur dennoch flexibel bleibt. Beispielsweise können begrenzte Verlagerungen der H-Brücken-Partner (\*), die infolge kleiner Abweichungen der Peptidringkonformationen in Actinomycinen mit abgewandelten Aminosäuren (Abb. 16) entstehen, durch gegenseitiges Verschieben der ( $\alpha$ )- und ( $\beta$ )-Peptidringe (gerade Doppelpfeile) leicht ausgeglichen werden. Dabei verdrehen sich – wie ja für einige Actinomycine auch beobachtet ( $\phi_{1\alpha}$ ,  $\phi_{1\beta} \approx 120\text{--}180^\circ$ ) – die Bindungen in den Chromophor-Peptid-Brücken (Abb. 14, gebogene Doppelpfeile), und zwar so, daß die Lage der Peptide für die Ausbildung der ( $\alpha,\beta$ )-interanularen

H-Brücken wieder optimal wird. Der Raumstrukturtyp bleibt dann erhalten.

Die in Abb. 14 von links unten nach rechts oben im Sinne einer P-Helix ausgerichteten Peptidlactongruppen passen ziemlich gut in die kleine Furche des gleichfalls rechts gedrehten DNA-Doppelstranges (Abb. 2). Räumliche Verschiebungen der Peptidringe sollten danach auch die Stabilität der reversiblen Actinomycin-DNA-Komplexe<sup>[7]</sup> beeinflussen – eine plausible Erklärung für die z. T. beachtlichen Unterschiede in der physiologischen Aktivität der Actinomycin- $\text{C}_1$ -Varianten<sup>[6, 7]</sup>. Stark verlagerte Peptidringe müßten die Einschiebung des Actinomycins in die DNA-Helix (Abb. 2) völlig unterbinden. In der Tat sind das zu (1) spiegelbildliche *enanti*-Actinomycin  $\text{C}_1$ <sup>[50]</sup> sowie die einen natürlichen und einen dazu enantiomeren Peptidring enthaltenden (*na,enanti*)-Actinomycine  $\text{C}_1$  (6a) (vgl. Abb. 15)<sup>[29, 51]</sup> inaktiv<sup>[52]</sup>. – Nach diesen Vorstellungen kann nur die in Abb. 13 skizzierte transoide Struktur des Actinomycins, in der allein auch die ( $\alpha,\beta$ )-interanularen Wasserstoffbrücken möglich sind, den DNA-Komplex bilden.

## 6. Die Stabilität der Raumstruktur

Der anhand des Actinomycin- $\text{C}_1$ -Moleküls erörterte pseudo- $\text{C}_2$ -symmetrische Raumstrukturtyp sollte nach Abb. 14 gegen kleine Änderungen der Primärstruktur in den Peptidlactongruppen wenig empfindlich sein. Inwieweit solche „Baufehler“ noch toleriert werden und wie feinfühlig NMR-Spektren auf Änderungen der Raumstruktur ansprechen, zeigten Arbeiten an einigen weiteren Actinocin-bispeptiden und Actinomycinen.

Daß bei Solvensänderungen (Benzol<sup>[42]</sup>, Chloroform, Aceton<sup>[9, 24]</sup> bis hin zu Methanol, Dimethylformamid und Wasser<sup>[9, 10]</sup> oder Salzlösungen<sup>[10]</sup>) sowie Variationen der Temperatur, der Konzentration<sup>[29, 42]</sup> und des pD-Wertes<sup>[10]</sup> die Raumstruktur des Actinomycins  $\text{C}_1$  intakt bleibt, war zahlreichen  $^1\text{H}$ -NMR-Studien übereinstimmend zu entnehmen. Nur unter extremen Bedingungen wie in Hexafluoracetone-sesquihydrat werden die ( $\alpha,\beta$ )-interanularen H-Brücken anscheinend gelöst. Dabei verdrehen sich laut CD-Messungen<sup>[49]</sup> vermutlich die Carbonylgruppen des Chromophors (Torsionswinkel  $\phi_A$ ,  $\phi_B$ ) mitsamt den Peptidringen um  $180^\circ$ , was dann zur zweiten transoiden Strukturform (Abb. 13 mit ( $\alpha$ )-ständigem Peptidring nach oben und ( $\beta$ )-ständigem Peptidring nach unten gerichtet) und deren Stabilisierung durch neue Peptid-Solvens-Wasserstoffbrücken führt. Die typische Raumstruktur geht dem NMR-Spektrum nach verloren.

Störungen der Grundstruktur des Actinomycins  $\text{C}_1$  beeinträchtigen die wechselseitige Konformationsstabilisierung der Peptidketten ganz erheblich. Bereits das Öffnen von nur einer Lactonbindung [(5a), (5b) und deren Methylester<sup>[45]</sup>; Abb. 15] hat zur Folge, daß beide Peptidgruppen uneinheitliche, erneut stark solvensabhängige Konformationen ausbilden<sup>[53]</sup>. Man erkennt dies am Auftreten von ca. 15 anstatt vier  $\text{NCH}_3$ - $^1\text{H}$ -NMR-Signalen ( $\text{CDCl}_3$ ) und Banden, die für das „C“-Konformere des freien Pentapeptidlactons (2) spezifisch sind (Abb. 8)<sup>[54]</sup>. Die cyclische Peptideinheit in (5a) oder (5b) ordnet aber das benachbarte Linearpeptid offenbar trotzdem konformativ vor, denn die Ausbeute bei der Relactonisierung zum Actinomycin  $\text{C}_1$  ist mit 55 bzw. 67% überraschend hoch [für das freie Pentapeptid (2d)  $\rightarrow$  (2a) und Actinomycin- $\text{C}_1$ -



säure (5c) → (1) findet man 25–30%<sup>[19]</sup>. Wird hingegen der Peptidlactonring in (5a) oder (5b) durch einen dazu enantiomeren ersetzt (6c), so cyclisiert das natürlich konfigurierte lineare Nachbarpeptid zu nur 5%. Die hierbei entstehenden kristallisierten (*na,enantio*)-Actinomycine (6a) bzw. (6b)<sup>[29, 51]</sup> liegen ähnlich den Actinomycinsäure-monolactonen (5a) und (5b) in wiederum sehr heterogenen, solvensabhängigen Strukturen vor. Zwischen den nun zueinander spiegelbildlichen (α)- und (β)-Peptidringen können sich die strukturstabilisierenden H-Brücken aus räumlichen Gründen nicht mehr bilden. Ob Rotationsisomere im Sinne von Abb. 5a–5d auftreten, bleibt zu klären.

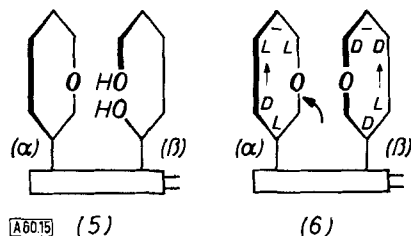


Abb. 15. Actinocin-bispeptide mit konformativ uneinheitlichen Peptidketten. (5a), Actinomycin-C<sub>1</sub>-säure-(α)-lacton; (5b), (α)- und (β)-Peptidgruppen von (5a) vertauscht; (5c), (α)-Peptidring von (5a) ebenfalls geöffnet (Actinomycin-C<sub>1</sub>-säure). (6a), (α-*na, β-enantio*)-Actinomycin C<sub>1</sub>; (6b), (α)- und (β)-Peptidringe von (6a) vertauscht; (6c), natürlich konfigurierten Peptidring in (6a) oder (6b) an der Lactonbindung geöffnet.

Eine Erweiterung der Peptidringe (Einschiebung von Glycin als sechste Aminosäure<sup>[2, 18]</sup>) verhindert ebenso die Bildung des charakteristischen Raumstrukturtyps wie der Einbau von konfigurativ „falschen“ oder strukturell stark abweichenden Aminosäuren. Ein Beispiel hierfür ist das Tetra-*N*-desmethylactinomycin C<sub>1</sub> (7f) (Abb. 16)<sup>[55]</sup>, das vier zusätzliche, mit NH<sub>Val</sub> bei der H-Brückenbildung konkurrierende NH-Funktionen und – infolge des Fehlens der *N*-Methylgruppen – erheblich beweglichere Peptidlactonringe enthält. Bei Änderungen der natürlichen Konfigurationssequenz LDL-L (Abb. 1) versagt in der Regel bereits die weitgehend stereospezifisch ablaufende Ringschlußreaktion<sup>[18]</sup>. All den Verbindungen vom Typ (5) und (6) ist gemeinsam, daß sie ihren NMR-Spektren nach nicht die für Actinomycin C<sub>1</sub> typische Raumstruktur annehmen und dementsprechend bakterio- statisch völlig unwirksam sind.

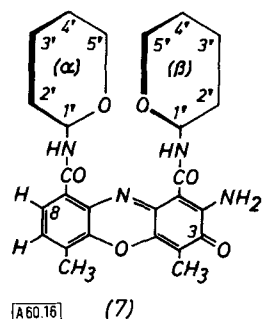


Abb. 16. Ausgewählte Strukturvarianten von Actinomycin C<sub>1</sub> (1) (Abb. 1). (7a), L-Serin statt L-Threonin in 1' und 1''; (7b), D-allo-Isoleucin statt D-Valin in 2' und 2''; (7c), D-allo-Isoleucin statt D-Valin in 2' und 2''; (7d), D-allo-Isoleucin statt D-Valin in 2' und 2''; (7e), L-4-Oxoprolin statt L-Prolin in 3' und 3''; (7f), Glycin statt Sarkosin in 4' und 4'' sowie L-Valin statt N-Methyl-L-valin in 5' und 5''; (7g), 2-Cl statt 2-NH<sub>2</sub> (2-Desamino-2-chlor-actinomycin C<sub>1</sub>); (7h), 4,6- und 1,9-Substituenten vertauscht (Pseudo-actinomycin C<sub>1</sub>).

Beschränken sich die Abweichungen der Primärstruktur im wesentlichen auf die Aminosäureseitenketten des Actino-

mycin-C<sub>1</sub>-Moleküls, so ist die Variationsbreite für Peptidlactoneinheiten, die die Gerüstkonformation „A“ bilden und durch die (α,β)-interanularen H-Brücken entsprechend Abb. 14 stabilisieren können, dennoch beachtlich. Dies zeigt sich in der großen Anzahl wirksamer nativer und synthetischer Peptidanaloga von Actinomycin C<sub>1</sub><sup>[2–4, 6, 18]</sup> (Abb. 16). Hierin sind vorwiegend die Aminosäuren 2' (Valin → *allo*-Isoleucin, Leucin, Alanin) sowie 3' (Prolin → Sarkosin, 4-Oxoprolin, 4-Hydroxyprolin etc.) und 5' (Methylvalin → Methylalanin, Methylisoleucin), aber auch 1' (Threonin → Serin, α,β-Diaminobuttersäure<sup>[56]</sup>) abgewandelt. Der Einbau von Aminosäuren mit weniger voluminösen Seitenketten oder der Austausch der Lacton- gegen Lactambindungen<sup>[56]</sup> führt dabei – offenbar infolge etwas beweglicherer Peptidgerüste und kleiner Lageverschiebungen der Peptidringe entsprechend Abb. 14 – zu einer teilweise stark verminderten physiologischen Aktivität. In allen Fällen bleibt aber, wie aus zahlreichen <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Messungen<sup>[26, 28, 57]</sup> einwandfrei hervorgeht, der charakteristische Raumstrukturtyp erhalten. Dies gilt auch für die *aniso*-Actinomycine (7e) mit stärker unterschiedlichen (α)- und (β)-Peptidgruppen sowie für Varianten mit abgewandeltem Chromophor wie (7g) und (7h)<sup>[58, 59]</sup>.

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren sprechen besonders empfindlich auf Veränderungen der Raumstruktur oder der Umgebung (Solvens, Nachbarpeptid etc.) eines Actinomycinmoleküls oder Peptidringes an. So lassen sich (α,β)-stellungs- isomere *aniso*-Actinomycine wie i-C<sub>2</sub> (7b) und C<sub>2</sub> (7c), deren Strukturen nur minimal differieren, anhand typischer Signalverschiebungen sicher unterscheiden<sup>[26, 28]</sup>. Dies gelingt sonst weder chromatographisch noch mit einer anderen physikalischen Methode. Sterisch etwas gelockerte [(7a)] oder chromophor-variierte [(7g), (7h)] *iso*-Actinomycine geben, verglichen mit (1), sowohl eine verbesserte Symmetrie der Peptidanordnung als auch eine offenbar erhöhte Festigkeit der (α,β)-interanularen H-Brücken (δNH<sub>Val</sub>: +0.5–0.8 ppm) zu erkennen. Da die Signale wichtiger Actinomycine wie C<sub>1</sub> getrennt für den (α)- und den (β)-Peptidring zugeordnet sind<sup>[28]</sup>, kann jeder Peptidring für sich auf Struktur- oder Umgebungsveränderungen untersucht werden. Im Prinzip läßt sich damit also entscheiden, ob Wechselwirkungen eines Actinomycins mit einem Komplexpartner (α)- oder (β)-seitig (die Umgebung der Peptide wird ungleich) oder, wie im Falle der Oligonucleotide (vgl. Abb. 18), axialsymmetrisch erfolgen.

Die Signale der allgemein stärker abgeschirmten Kohlenstoffatome erlauben vorzugsweise Rückschlüsse auf die Gerüstkonformationen (Abb. 11) und die Molekülsymmetrie. Falls sich diese verändern, kann man – wie beim freien Peptidlacton (2a) (Abb. 11c und 11d) gezeigt – in der Regel sämtliche C-Atome getrennt erfassen, wozu eine sichere Identifizierung der Signale natürlich Vorbedingung ist<sup>[61]</sup>. Auch im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum des Actinomycins C<sub>1</sub> (Abb. 17; vgl. Abb. 11a und 11b) sind alle 62 Kohlenstoffsignale erkennbar, soweit sie nicht für homologe Kerne des (α)- und des (β)-Peptidringes aus Symmetriegründen genau zusammenfallen (z. B. bei δ = 34 für die *N*-Methyl-C-Atome beider Sarkosinreste). Bei *aniso*-Actinomycinen wie (7e) werden die vorliegenden Symmetriestörungen deutlich registriert, der Typ des Spektrums (Abb. 17) bleibt jedoch erhalten.

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an mehr als zwanzig Actinomycin-C<sub>1</sub>-Varianten und zahlreichen anderen Actinocinpeptiden ergaben übereinstimmend, daß a) alle wichtigen Actinomycine – auch solche mit ungleichen Peptidringen

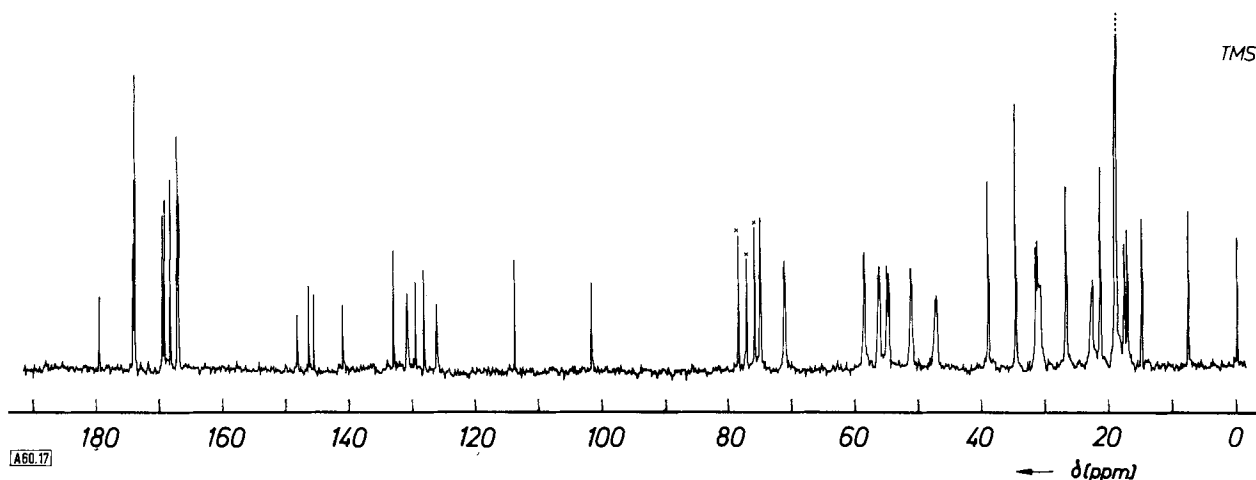


Abb. 17.  $^{13}\text{C}$ -FT-NMR-Spektrum von Actinomycin  $\text{C}_1$  (1) in Deuteriochloroform. – Zuordnung der Peptidkohlenstoffsignale (0–80 ppm): vgl. Abb. 11 a; bei 100–150 sowie 180 ppm liegen die Signale der zwölf Ring-C-Atome des Phenoxazinon-Systems und um 170 ppm die der zwölf Amid- und Lactoncarbonylgruppen. x: Solvenssignale. – Interner Standard: Tetramethylsilan; Gerät: Varian XL-100-15 [60].

wie (7e) – im gleichen charakteristischen pseudo- $\text{C}_2$ -symmetrischen Raumstrukturtyp (Abb. 14) vorliegen und daß b) die Bildung dieser Struktur zwei intakte, nicht allzu flexible und nur innerhalb bestimmter Grenzen abwandelbare Pentapeptidlactongruppen mit der natürlichen Konfigurationssequenz LDL-L<sup>[62]</sup> voraussetzt. Veränderungen am Chromophorsystem wie in (7g) und (7h) zerstören die Peptidstruktur normalerweise nicht, beeinflussen die Bindung des Gesamtmoleküls an die DNA allerdings ganz entscheidend<sup>[7]</sup>.

## 7. NMR- und Röntgen-Strukturanalysen am komplexierten Actinomycin $\text{C}_1$

Hinsichtlich der Wirkungsweise der Actinomycine interessiert besonders die Raumstruktur, die sie im Actinomycin-DNA-Komplex einnehmen. Da NMR-Untersuchungen am DNA-Komplex selbst zu schwierig sind (minimale Actinomycin-Konzentrationen pro Basenpaar (Abschnitt 2), störende NMR-Signale der DNA etc.), wurden für diese Studien kleine Nucleotide mit den komplexbildenden Basen Guanin und Cytosin – also DNA-Bruchstücke – herangezogen.

Erste  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen bei 220 MHz<sup>[9]</sup> hatten ergeben, daß bereits 2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat mit Actinomycin  $\text{C}_1$  in Wasser ( $\text{D}_2\text{O}$ ) einen 2:1-Komplex bildet. Charakteristische Verschiebungen der Chromophor- und  $\text{NH}_{\text{Thr}}$ -Signale bei praktisch unveränderter Lage der Peptidgruppensignale führten zur Annahme, daß a) sich auf beiden Seiten des Actinocinrestes je ein Komplexpartner mit dem Basenteil planparallel anlagert, b) der Komplex wie das Actinomycin-

molekül pseudo- $\text{C}_2$ -symmetrisch ist (Abb. 18a) und c) Konformation und Anordnung der Peptidringe praktisch ungestört bleiben.

Eingehendere Hochfeld- $^1\text{H}$ - sowie  $^{31}\text{P}$ -NMR-Studien über die Bindung von Actinomycin  $\text{C}_1$  an unterschiedliche Desoxydinucleotide<sup>[11, 12]</sup> bestätigten und erweiterten diese Vorstellungen. So fand man, daß auch hier pseudo- $\text{C}_2$ -symmetrische 1:2-Komplexe gebildet werden (Abb. 18b) und Guanin-Cytosin-Basenpaare – wie von der DNA bekannt – die stark bevorzugten Komplexpartner sind. Die Einflüsse des Chromophor-Ringstromes und der magnetisch anisotropen Gruppen auf die NMR-Signale bestimmter Nucleotidkerne („Komplexierungsverschiebungen“) gaben Hinweise auf die genauere Ausrichtung der Nucleotide. Das bereits in Form einer Doppelhelix vorliegende Desoxy-hexanucleotid mit der – zu sich selbst komplementären – Basensequenz ATGCAT<sup>[13, 63]</sup> bindet Actinomycin  $\text{C}_1$  im Sinne von Abb. 18b erwartungsgemäß zwischen den GC- und CG-Paaren, wobei sich der Schmelzpunkt der Doppelhelix, also ihr Zerfall in die beiden Einzelstränge, infolge der zusätzlichen Verklammerung signifikant erhöht. Das insgesamt resultierende Stereomodell des Actinomycin-Oligonucleotid-Komplexes in Lösung (Abb. 18b) entspricht dem aus Röntgen-Analysen<sup>[14–16]</sup> (s. unten) abgeleiteten, in Abb. 20 skizzierten Strukturvorschlag für den DNA-Komplex.

Actinomycinmoleküle ohne Komplexpartner assoziieren in kaltem Wasser, wobei sich jedoch Konformation und Anordnung der Peptidlactongruppen gleichfalls nicht ändern<sup>[9, 10]</sup>. Das Verhalten der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale des Chromophors deutet auf die Bildung von Dimeren im Sinne von Abb. 19 hin, deren Gleichgewichtskonstanten<sup>[10]</sup> mit denen aus Zentrifugmessungen<sup>[64]</sup> korrelieren. Solche Dimere treten in organischen Solventien nicht auf (vgl. dagegen die Dimerisierung des freien Peptidlactons (2) in Benzol; Abschnitt 3.1) und erklären die überraschend gute Löslichkeit von Actinomycinen in kaltem (4°C) Wasser<sup>[65]</sup>.

Für Röntgen-Strukturanalysen sind, wie sich schon bald zeigte<sup>[23]</sup>, normale Actinomycinkristalle zu instabil. Erst die gemeinsame Kristallisation von Actinomycin oder 7-Brom-actinomycin  $\text{C}_1$ <sup>[66]</sup> mit 2'-Desoxyguanosin im Verhältnis 1:2 führte zu gut analysierbaren Kristallformen und damit zu entscheidenden Fortschritten in der Kenntnis der Raumstruktur des Actinomycins  $\text{C}_1$ <sup>[14–16]</sup>. Die untersuchten 1:2-Kom-

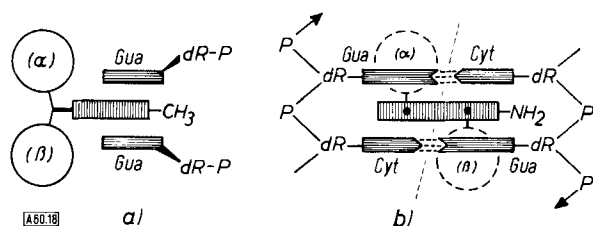


Abb. 18. Bildung von pseudo- $\text{C}_2$ -symmetrischen (1:2)-Actinomycin-Nucleotid-Komplexen a) mit 2'-Desoxyguanosin-5'-phosphat [9], b) mit zwei Guanin (Gua)-Cytosin (Cyt)-Basenpaaren von Di- oder Hexanucleotiden (nach [12, 13]). – Der Actinomycinchromophor ist in a) von C-7, C-8 und in b) von den 4- und 6-Methylgruppen her gesehen; ( $\alpha$ ), ( $\beta$ ): Peptidringe; dR: 2-Desoxyribose, P: Phosphatrest.



Abb. 19. Dimerisierung eines Actinomycins in Wasser (nach [10]).

plexe erwiesen sich wie die NMR-spektrometrisch studierten Nucleotidkomplexe als pseudo- $C_2$ -symmetrisch. Die beiden im Sinne von Abb. 13 und 14 *transoid* angeordneten Peptidringe enthalten die bereits in Abschnitt 3 erörterte *cis,cis*-verknüpfte Val $\rightarrow$ Pro $\rightarrow$ Sar-Sequenz. Sie stabilisieren ihre charakteristische Konformation (Abb. 9 und 20) mit Hilfe der gleichfalls schon diskutierten, zwischen  $(\alpha)$ -NH $_{Val}$  und  $(\beta)$ -CO $_{Val}$  sowie  $(\beta)$ -NH $_{Val}$  und  $(\alpha)$ -CO $_{Val}$  liegenden Wasserstoffbindungen. Zur Stabilisierung des Gesamtkomplexes tragen zwei weitere H-Brücken-Paare vom Actinomycin zu beiden Desoxyguanosin(G)-Molekülen, nämlich 2-NH $_{2G}$ ---OC $_{Thr}$  und NH $_{Thr}$ ---N-3 $_G$  (Abb. 20), sowie hydrophobe Bindungen und H-Brücken zu angelagerten Wassermolekülen bei. Die aufgrund dieser Röntgen-Analysen abgeleitete Raumstruktur eines Actinomycin- $C_1$ -Moleküls, das zwischen zwei Guanin-Cytosin-Basenpaare einer DNA-Doppelhelix eingeschoben ist, zeigt Abb. 20.

## 8. Schlußbemerkungen

Das röntgenographisch ermittelte und Abb. 20 zugrundeliegende Raumstrukturmodell des kristallinen Actinomycin- $C_1$ -Desoxyguanosin(1:2)-Komplexes ist mit allen NMR-Befunden, die für die in Wasser gelösten Actinomycin-Desoxynucleotid-Komplexe erhalten wurden<sup>[9, 11–13]</sup>, konsistent. Die NMR-Daten der Actinomycinpartner lassen dabei erkennen, daß auch in den Komplexen der gegen Umgebungsänderungen ohnehin recht widerstandsfähige Raumstrukturtyp des *ungebundenen* Actinomycins stabil bleibt. Da außerdem – neben den Konformationsenergie-Rechnungen<sup>[32]</sup> – zahlreiche strukturspezifische NMR-Daten des Actinomycins  $C_1$  und des freien Pentapeptidlactons („A“-Typ) mit dem obigen Modell im Einklang sind, kann man insgesamt annehmen, daß die Raumstruktur des Actinomycins  $C_1$  in Lösung sehr weitgehend

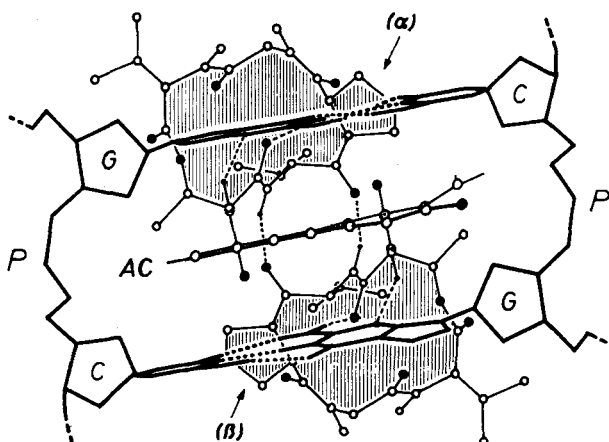


Abb. 20. Räumliche Anordnung eines Actinomycin- $C_1$ -Moleküls zwischen den Guanin-Cytosin-Basenpaaren einer DNA-Doppelhelix (gezeichnet nach dem Strukturvorschlag von Sobell und Jain [14–16]. – G: Desoxyguanosyl-, C: Desoxycytidyl-, P: Phosphatgruppen. AC: Actinocinrest (Chromophor) (Abb. 1, 2) von den 4- und 6-Methylgruppen her gesehen (vgl. auch Abb. 4 von unten); schraffierte Flächen:  $(\alpha)$ - und  $(\beta)$ -Peptidlactonringe, ● Sauerstoffatome des Actinomycins.

der im kristallinen Komplex vorliegenden (Abb. 20) entspricht. Sie ist auf die wichtigsten anderen nativen und synthetischen Actinomycine übertragbar<sup>[67]</sup>.

Ein der Struktur in Abb. 20 nachgebildetes Kalottenmodell vom Actinomycin  $C_1$  (1) zeigt Abb. 4 (Abschnitt 2). Die Peptidringe sind beiderseits der Chromophorebene axialsymmetrisch und „liegend“ angeordnet (vgl. dazu die ff-Form in Abb. 5e sowie Abb. 10). Das konformativ so kunstvoll stabilisierte Molekül (in der Mitte eine der interanularen H-Brücken) ist strukturell sehr ausgewogen und kompakt. So können sich den NMR-Daten zufolge lokale konformative Verzerrungen – etwa des  $(\beta)$ -Prolinringes, der in (7e) zum 4-Oxoprolin wird – in weit entfernte Molekülteile (Chromophor, Nachbarpeptid) fortpflanzen. Dort stattfindende molekulare Wechselwirkungen, z. B. das Einschieben des Chromophors zwischen die DNA-Basenpaare, werden dadurch indirekt beeinflusst. Ob und inwieweit die Raumstruktur des mit der vollständigen DNA komplexierten Actinomycin-Moleküls noch verändert wird, bleibt zu überprüfen, denn die bisherigen Daten basieren auf der Analyse von kurzkettigen Modellkomplexen, in denen sich die Partner relativ zwanglos ordnen können. Die NMR-Studien an dem bereits als Doppelhelix vorliegenden Desoxy-hexanucleotid<sup>[13]</sup> zielten u. a. in diese Richtung, bestätigten jedoch die bekannten Strukturen (Abb. 20).

Vergleiche mit anderen die DNA spezifisch blockierenden Agentien beschränken sich infolge des einzigartigen Strukturtyps der Actinomycine im wesentlichen auf die Chromophore. Die hier – neben einigen Acridinderivaten – zu nennenden Antibiotica der Mitomycin- und der Anthracyclin-Gruppe (Daunomycin, Rhodomycine) sind gleichfalls cytostatisch sehr wirksam und werden trotz ihrer hohen Toxizität teilweise zur Behandlung der Leukämie angewendet. Sie schieben sich wie (1) zwischen die Basenpaare der DNA-Doppelhelix, tragen am Chromophor (Benzo- oder Anthrachinonderivate) aber keine Peptidgruppen, sondern wie im Falle der Anthracycline, seltene Zucker. Die Mitomycine verklammern die DNA-Stränge im Gegensatz zu Actinomycinen (Abb. 18b) irreversibel<sup>[68]</sup>.

Für die über einhundert bekannten Actinomycine und Actinomycinderivate liegt damit ein einheitliches, stabiles Raumstrukturmodell vor. Dieses bringt die von Brockmann mit der Konstitutionsaufklärung des Actinomycins  $C_3$  (7d) eingeleiteten Untersuchungen über die Struktur der Actinomycine zu einem gewissen Abschluß. Inwieweit sich die vor über 20 Jahren erstmals beschriebenen Antitumoreigenschaften<sup>[69]</sup> mit Hilfe der detaillierten Raumstrukturkenntnisse weiterentwickeln und besser nutzbar machen lassen, müssen neue Arbeiten zeigen.

Die in diesem Bericht zitierten eigenen Arbeiten entstanden unter experimenteller Mitwirkung von Frau M. Köppler und Frau E. Salkowski. Für das rege Interesse und die sehr großzügige finanzielle Unterstützung danke ich Herrn Professor H. Brockmann.

Eingegangen am 3. Oktober 1974 [A 60]

- [1] S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 45, 609 (1940).
- [2] H. Brockmann, Fortschr. Chem. Org. Naturst. 18, 1 (1960); Angew. Chem. 72, 939 (1960).
- [3] S. A. Waksman: Actinomycin; Nature, Formation, and Activities. Interscience, New York 1968.

- [4] E. Katz in D. Gottlieb u. P. D. Shaw: Antibiotics, Biosynthesis. Springer, New York 1967, Bd. 2, S. 276.
- [5] H. Brockmann u. H. Lackner, Naturwissenschaften 47, 230 (1960); 51, 384 (1964); Chem. Ber. 100, 353 (1967).
- [6] J. Meienhofer u. E. Atherton, Advan. Appl. Mikrobiol. 16, 203 (1973).
- [7] W. Müller u. D. M. Crothers, J. Mol. Biol. 35, 251 (1968).
- [8] L. Hamilton, W. Fuller u. E. Reich, Nature 198, 538 (1963).
- [9] B. H. Arison u. K. Hoogsteen, Biochemistry 9, 3976 (1970).
- [10] N. S. Angerman, T. A. Victor, C. L. Bell u. S. S. Danyluk, Biochemistry 11, 2402 (1972).
- [11] T. R. Krugh u. J. W. Neely, Biochemistry 12, 1775, 4418 (1973).
- [12] D. J. Patel, Biochemistry 13, 1476, 2388 (1974).
- [13] D. J. Patel, Biochemistry 13, 2396 (1974).
- [14] H. M. Sobell, S. C. Jain u. T. D. Sakore, Nature New Biol. 231, 200 (1971).
- [15] S. C. Jain u. H. M. Sobell, J. Mol. Biol. 68, 1 (1972).
- [16] H. M. Sobell u. S. C. Jain, J. Mol. Biol. 68, 21 (1972).
- [17] H. Brockmann u. J. H. Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).
- [18] H. Brockmann u. H. Lackner, Chem. Ber. 101, 1312 (1968).
- [19] H. Brockmann u. H. Lackner, Chem. Ber. 101, 2231 (1968).
- [20] J. Meienhofer, J. Amer. Chem. Soc. 92, 3771 (1970).
- [21] J. Meienhofer, Y. Sano u. R. Patel in B. Weinstein u. S. Lande: Peptides: Chemistry and Biochemistry. Marcel Dekker, New York 1970, S. 419.
- [22] H. Lackner, Tetrahedron Lett. 1970, 2807.
- [23] H. G. Bachmann u. W. Müller, Nature 201, 261 (1964); M. F. Perutz, ibid. 201, 814 (1964).
- [24] H. Lackner, Tetrahedron Lett. 1970, 3189.
- [25] Chloroform löst alle Actinomycine, Peptidilactone und deren Vorstufen gleichmäßig gut und eignete sich für vergleichende Untersuchungen zunächst am besten. „Feuchtes“ Deuteriochloroform: die Meßlösung wurde kurz mit einigen Tropfen Deuteriumoxid durchgeschüttelt und zentrifugiert.
- [26] H. Lackner, Chem. Ber. 104, 3653 (1971).
- [27] Bei zunehmender Konzentration von (2) überlagert sich dem ursprünglichen Monomerspektrum ein schließlich damit intensitätsgleiches Nebenspektrum. Dessen Signale liegen zumeist bei höherem Feld und sollten den zwischen beiden Peptidringen angeordneten und somit zusätzlich abgeschirmten Innenprotonen des Dimeren entstammen.
- [28] H. Lackner, Habilitationsschrift, Universität Göttingen 1972.
- [29] H. Lackner in J. Meienhofer: Chemistry and Biology of Peptides. Proc. 3rd Amer. Peptide Symp. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Michigan 1972, S. 147.
- [30] V. F. Bystrov, S. L. Portnova, V. I. Tsetlin, V. T. Ivanov u. Yu. A. Ovchinnikov, Tetrahedron 25, 493 (1969).
- [31] Die aus  $J_{\text{CH}_3\text{NH}} = 8.2 \text{ Hz}$  ebenfalls ableitbare synperiplanare Anordnung ( $\phi \approx 0^\circ$ ) ist nach den Modellen – auch für die „A“-Konformation – äußerst unwahrscheinlich. Zur Definition von  $\phi^*$  vgl. Abb. 13.
- [32] P. De Santis, R. Rizzo u. G. Ughetto, Tetrahedron Lett. 1971, 4309; Biopolymers 11, 279 (1972).
- [33] Anstatt der *cis*-C $\alpha$ -CO-Anordnung (Bindung g) in Abb. 7 müßte man für den Prolinrest noch die *trans*-Form diskutieren, die – im Gegensatz zu den Modellen und einigen NMR-Daten – nach der Konformationsenergierechnung [32] offenbar ebenfalls begünstigt ist. Dies wird z. Zt. durch  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen überprüft.
- [34] C. M. Deber, D. A. Torchia u. E. R. Blout, J. Amer. Chem. Soc. 93, 4893 (1971); D. A. Torchia, S. C. K. Wong, C. M. Deber u. E. R. Blout, ibid. 94, 616 (1972).
- [35] F. A. Bovey in J. Meienhofer: Chemistry and Biology of Peptides. Proc. 3rd Amer. Peptide Symp. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Michigan 1972, S. 3.
- [36] R. Schwyzer in J. Meienhofer: Chemistry and Biology of Peptides. Proc. 3rd Amer. Peptide Symp. Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, Michigan 1972, S. 141.
- [37] R. Schwyzer, Ch. Grathwohl, J. P. Meraldi, A. Tun-Kyi, R. Vogel u. K. Wüthrich, Helv. Chim. Acta 55, 2545 (1972); K. Wüthrich, A. Thun-Kyi u. R. Schwyzer, FEBS Lett. 25, 104 (1972). Das hier erörterte Cyclopentapeptid Gly-L-Ala-Gly-Gly-L-Pro nimmt ebenfalls zwei Konformationen an.
- [38] J. Dale u. K. Titlestad, Chem. Commun. 1970, 1403; J. C. S. Chem. Comm. 1972, 225.
- [39] IR-Messungen waren zur Beurteilung der *cis/trans*-Anordnung wenig ergiebig; die optische Drehung der „A“- und „C“-Konformeren ist erheblich verschieden.
- [40] H. Lackner, Tetrahedron Lett. 1971, 2221.
- [41] H. Lackner, noch unveröffentlicht.
- [42] T. A. Victor, F. E. Hruska, C. L. Bell u. S. S. Danyluk, Tetrahedron Lett. 1969, 4721; T. A. Victor, F. E. Hruska, K. Hikichi, S. S. Danyluk u. C. L. Bell, Nature 223, 302 (1969).
- [43] F. Conti u. P. De Santis, Nature 227, 1239 (1970).
- [44] Der NH $\rightarrow$ ND-Austausch z. B. ist wieder fast so langsam wie im C-Konformeren von (2).
- [45] H. Lackner, Chem. Ber. 103, 2476 (1970).
- [46] H. Kamei, Bull. Chem. Soc. Jap. 38, 1212 (1965).
- [47] Auch für Actinocin-bis[(O-methyl)threonin] (3d) wurde eine Struktur im Sinne von (3a) vorgeschlagen [48]. Der Befund, daß (3d) einen normalen  $\delta(\text{NH}_2)$ -Wert von 7.1 und sein 2-Desamino-2-hydroxy-Derivat einen  $\delta(2\text{-OH})$ -Wert von 10.8 zeigt [(3a):  $\delta(\text{NH}_2) = 10.6/7.2$ ; (3c):  $\delta(\text{OH}) = 15.95$ ], spricht jedoch bereits für eine erhebliche Störung der koplanaren Carbonylgruppenanordnung in (3d). – Die Annahme einer 9-CO $\cdots$ HN $_{\text{Thr}}$ - oder 1-CO $\cdots$ H $_2$ N-Wasserstoffbrücke (Abb. 12) im gelösten Actinomycin C $_1$  (1) [32, 42] erklärt zwar einige Befunde, ist jedoch mit anderen NMR-Daten, vor allem von Actinomycin-Derivaten wie (7g), nicht im Einklang.
- [48] B. Anastasi, F. Ascoli, P. Costantino, P. De Santis, R. Rizzo u. M. Savino, Biochemistry 12, 1834 (1973).
- [49] F. Ascoli, P. De Santis, M. Lever u. M. Savino, Biopolymers 11, 1173 (1972).
- [50] H. Brockmann u. W. Schramm, Tetrahedron Lett. 1966, 2331.
- [51] H. Lackner u. E. Schäfer, noch unveröffentlicht.
- [52] Die sterische Hinderung ist natürlich nur einer der Gründe für die Inaktivität dieser Actinomycine. Hinzu kommt beispielsweise, daß die räumlichen Verhältnisse die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Guaninresten der DNA und dem Threoninrest der jetzt enantiomeren Peptidketten [14–16] (Abschnitt 7) nicht mehr zulassen; vgl. dazu Abschnitt 7.
- [53] Für Seco-actinomycine (ein Peptidring zwischen Sarkosin und Methylvalin geöffnet) gilt ähnliches. Actinomycinsäuren (5c) werden konformativ völlig unübersichtlich.
- [54] Die Zuordnung der NCH $_3$ -Signale zur ( $\alpha$ )- oder ( $\beta$ )-Peptidkette ergibt sich aus den Spektren von ( $\alpha$ )-spezifisch N-methyl-deutierten Actinomycinsäure-lactonen [26].
- [55] C. W. Mosher u. L. Goodman, J. Org. Chem. 37, 2928 (1972).
- [56] E. Atherton u. J. Meienhofer, J. Amer. Chem. Soc. 94, 4759 (1972).
- [57] H. Lackner, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [58] H. Brockmann, H. Gröne u. G. Pampus, Chem. Ber. 91, 1916 (1958).
- [59] H. Brockmann u. E. Schulze, Tetrahedron Lett. 1971, 1489.
- [60] Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der Pentapeptidilactone, Actinomycine und Deuterio-actinomycine verdanken wir überwiegend Herrn Dr. F. Wehrli und Herrn K. Hiltbrunner (Varian AG, Zug).
- [61] Für die Aufnahme zahlreicher selektiv protonen-entkoppelter  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren danke ich Herrn Dr. S. Braun, Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt.
- [62] Einige Actinomycine enthalten als Aminosäure 3'-Sarkosin anstatt L-Prolin. Sie haben die Konfigurationssequenz LD $\rightarrow$ L und bilden ebenfalls den charakteristischen Raumstrukturtyp aus, wenn auch in offenbar etwas labilerer Form.
- [63] A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin.
- [64] D. M. Crothers, S. L. Sabol, D. I. Ratner u. W. Müller, Biochemistry 5, 1817 (1968).
- [65] Beim Abkühlen des Wassers von 25 auf 0–4°C erhöht sich die Löslichkeit von Actinomycinen um 2–3 Zehnerpotenzen: K. H. Schultze, Diplomarbeit, Universität Göttingen 1961.
- [66] H. Brockmann, J. Ammann u. W. Müller, Tetrahedron Lett. 1966, 3595.
- [67] Daß Actinomycin C $_1$  und dessen Varianten gleichartige Raumstrukturen haben, zeigte sich auch an der Bildung des DNA-Komplexes von Actinomycin C $_3$  (7d), die analog zu der des Actinomycin-C $_1$ -Komplexes erfolgt: R. Schara u. W. Müller, Eur. J. Biochem. 29, 210 (1972).
- [68] D. Gottlieb u. P. D. Shaw: Antibiotics. Mechanism of Action. Springer, New York 1967, Bd. 1, S. 211.
- [69] G. Schulte, Z. Krebsforsch. 58, 500 (1952); Ch. Hackmann, ibid. 58, 607 (1952).