

Actinomin und 4,6-Didesmethyl-4,6-di-tert.-butyl-actinomin-Modellverbindungen zum Studium der Actinomycin/DNA-Wechselwirkung

Actinomine and 4,6-Didemethyl-di-tert-butyl-actinomine-Model Compounds for Studies of the Actinomycin-DNA Interaction

FRANK SEELA

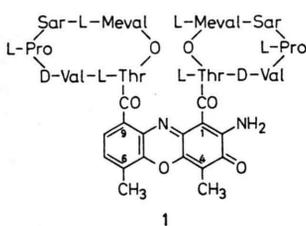
Department of Chemistry, Yale University, New Haven

(Z. Naturforsch. 26 b, 875–878 [1971]; received April 1, 1971)

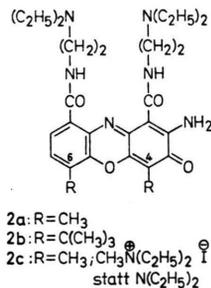
The synthesis of actinomine, a model compound for the investigation of the actinomycin-DNA interaction is described. In place of the pentapeptide lactone rings, actinomine has *N,N*-diethylenediamine groups; it binds to DNA as strongly as actinomycin C₁ (D) does. Additional replacement of the 4,6 methyl groups of the chromophore by tert-butyl residues strongly reduces the binding of actinomine to DNA. This result is consistent with intercalation of the actinomine chromophore between the DNA base-pairs, a reaction that is sterically blocked by the tert-butyl groups.

Actinomin (**2a**) enthält als Strukturelement den Chromophor des Actinomycins C₁ (**1**)^{1, 2}. Im Gegensatz zu **1** sind bei **2a** die 1,9-Carbonylgruppen des Chromophors statt mit Pentapeptidlactonringen mit *N,N*-Diäthyl-äthylendiaminresten verknüpft. Beim 4,6-Didesmethyl-4,6-di-tert.-butyl-actinomin (**2b**) wurden die sterisch anspruchslosen 4,6-Methylgruppen von **2a** durch sperrige tert. Butylgruppen ersetzt.

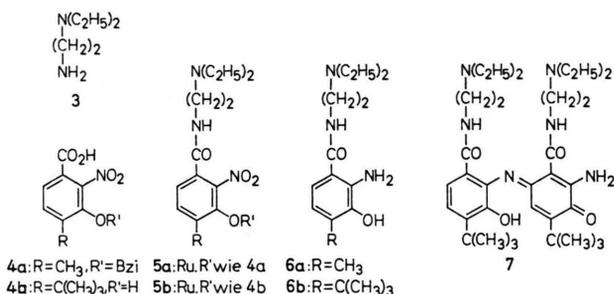
Mit **2a** sollte geprüft werden, ob die Pentapeptidlactonringe in **1** durch einfache Reste ersetzbar sind, ohne daß dabei spezifische Eigenschaften des Actinomycins C₁, z. B. seine Fähigkeit, mit der DNA einen Komplex zu bilden, seine in vivo Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Synthese und der damit verbundenen antibiotischen Wirksamkeit, verloren gehen. **2b** sollte zeigen, inwieweit räumliche Ver-



1



2a: R = CH₃
2b: R = C(CH₃)₃
2c: R = CH₃; CH₃N(C₂H₅)₂ I
statt N(C₂H₅)₂



4a: R = CH₃, R' = Bzi
4b: R = C(CH₃)₃, R' = H
5a: Ru, R' wie 4a
5b: Ru, R' wie 4b
6a: R = CH₃
6b: R = C(CH₃)₃

änderungen der 4,6-Substituenten diese Eigenschaften beeinflussen.

Durch Synthese sind **2a** und **2b** auf folgendem Weg zugänglich: 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methylbenzoesäure (**4a**)² kann man über das Säurechlorid direkt mit der primären Aminogruppe von **3** zu **5a** verknüpfen. Bei der 2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butylbenzoesäure (**4b**)³, deren 3-Hydroxylgruppe aus sterischen Gründen nicht benzylierbar war, eine Benzylierung sich aber für die erfolgreiche Darstellung eines Säurechlorids als notwendig erwies, konnte die Kupplung von **4b** mit **3** zu **5b** ohne Schutz der Hydroxylgruppe mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid durchgeführt werden. Nach katalytischer Hydrierung erhielt man aus **5a** das Amid **6a** und aus **5b** analog **6b**. Beide Aminophenolderivate wurden, da sie luftempfindlich waren, nicht isoliert, sondern

Sonderdruckanforderungen an Dr. F. SEELA, Dept. of Chemistry, Yale-University, 225 Prospect Street, New Haven, Connecticut 06520, USA.

¹ H. BROCKMANN, Fortschr. d. Chemie organ. Naturstoffe XVIII, S. 1, Springer-Verlag, Wien 1960.

² H. BROCKMANN u. H. MUXFELD, Chem. Ber. 91, 1242 [1958].

³ H. BROCKMANN u. F. SEELA, Chem. Ber. 104, in Vorbereitung.

⁴ L. HORNER u. K. STURM, Chem. Ber. 88, 329 [1955].

⁵ D. M. CROTHERS, S. L. SABOL, D. I. RATNER u. W. MÜLLER, Biochemistry 7, 1817 [1968].

sofort der oxydativen Kondensation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) unterworfen.

Gab **6 a** direkt Actinomin (**2 a**), so entstand aus **6 b** erst **7**, das durch seine Absorptionsmaxima bei 300 und 480 m μ (Methanol) als Benzochinon(1.4)-anil-(1)-derivat^{3,4} identifiziert wurde. Eisessig/Trifluoressigsäure wandelten **7** glatt in **2 b** um.

Sowohl **2 a** als auch **2 b** sind aufgrund von Salzbildung bei pH 7 in gepuffertem Wasser gut löslich, in ungepuffertem Wasser lösen sie sich nur schlecht. Abhilfe kann dadurch geschaffen werden, daß man die tertiären Aminogruppen mit Methyljodid quarterniert. Aus **2 a** wurde so in Wasser sehr leicht lösliches Actinomin-di-methojodid (**2 c**) erhalten, das das erste gut wasserlösliche Derivat des Actinomycinchromophors überhaupt darstellt.

2 a, b und **c** zeigen in BPES-Puffer eine merkliche Konzentrationsabhängigkeit ihrer Elektronenspektren, was auf Eigenassoziation zurückgeführt wird⁵.

Actinomin hat nun genauso wie Actinomycin C₁ die Fähigkeit mit der DNA einen Komplex zu bilden. W. MÜLLER, der für den Actinomycin C₁/DNA-Komplex in BPES-Puffer eine Stabilitätskonstante von $K_{ap.} = 2,3 \cdot 10^{-6} M^{-1}$ fand, bestimmte diese unter den gleichen Bedingungen für Actinomin mit $K_{ap.} = 1,1 \cdot 10^6 M^{-1}$ ⁶. Wenn, wie bis dahin angenommen, die Stabilitätskonstante ein zahlenmäßiger Ausdruck für die antibiotische Wirksamkeit der Actinomycine ist, hätte Actinomin etwa gleich wirksam wie Actinomycin C₁ sein sollen. Actinomin ist jedoch antibiotisch unwirksam und hemmt auch nicht die DNA-abhängige RNA-Synthese. Vergleichende kinetische Messungen der Lebensdauer vom Actinomycin C₁/und Actinomin/DNA-Komplex⁶ zeigten, daß Komplexbildung und -zerfall bei **2 a** ungleich schneller erfolgen als bei **1**, was zu dem Schluß führte, daß nicht nur eine ausreichend hohe Stabilitätskonstante, sondern auch eine bestimmte Lebensdauer des DNA-Komplexes für die antibiotische Wirksamkeit der Actinomycine notwendig ist.

Die Gründe für das unterschiedliche DNA-Komplexverhalten sind sicher nicht in der Bindung der chromophoren Teile von **1** bzw. **2 a** zu suchen, denn die Änderungen im Elektronenspektrum, die bei der Bindung von **1** an die DNA auftreten⁶, werden auch bei **2 a** (Abb. 1) beobachtet, was anzeigt, daß die Chromophore in ähnlicher Weise gebunden werden müssen. Unterschiedliche Wechselwirkungen sind jedoch für die nichtchromophoren Reste zu erwarten. Während für Actinomycin C₁ (**1**) hydrophobe Wech-

selwirkungen von den Peptidlactonringen zu den Desoxyriboserechten der DNA vorgeschlagen wurden⁶, werden die basischen Reste von Actinomin offenbar salzartig an die Phosphatreste der DNA angelagert. Mit Actinomin hatte man nun erstmals eine dem Actinomycin C₁ zumindest im Hinblick auf die DNA/Chromophorwechselwirkung sehr einfache Modellverbindung in der Hand, die leichter variierbar als das kompliziert gebaute Actinomycinmolekül war, und die außerdem aufgrund ihrer hohen Affinität zur DNA besonders gut für Studien der Chromophor/DNA-Wechselwirkung geeignet ist.

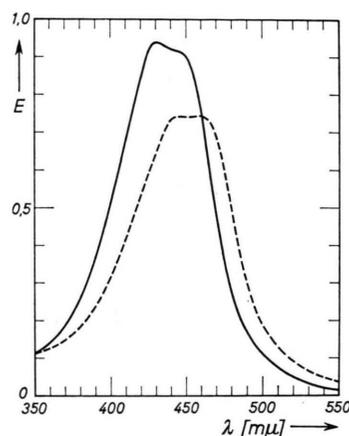


Abb. 1. Elektronenabsorptionsspektrum von Actinomin (**2 a**) (durchgezogene Kurve) und von **2 a** in Gegenwart von DNS (unterbrochene Kurve); beide in BPES-Puffer.

Sinnvoll erschien es deshalb, die räumlich anspruchslosen 4.6-Methylgruppen in **2 a** durch sperrige tert. Butylgruppen zu ersetzen, denn dadurch schien nachprüfbar, ob der Chromophor entsprechend dem alten Actinomycin/DNA-Komplexmodell nur angelagert⁷, oder wie neuerdings vorgeschlagen zwischen die Basenpaare der DNA eingeschoben wird⁶. Modellbetrachtungen des **2 b**/DNA-Komplexes zeigten nämlich, daß eine Anlagerung durch die sperrigen tert. Butylgruppen nicht wesentlich gestört, der Einschub aber unmöglich sein sollte.

Aus Gleichgewichtsdialysen von **2 a** bzw. **2 b** gegen DNA (BPES-Puffer) geht nun hervor, daß beide Verbindungen an die DNA gebunden werden, **2 b** jedoch, wie der Vergleich der ungebundenen Anteile von **2 a** und **2 b** (gleiche Ausgangskonzentration von **2 a** und **2 b**, hohe DNA-Konzentration) zeigt, etwa eine Größenordnung schwächer als **2 a**. Im Gegensatz zu **2 a**, dessen Elektronenspektrum sich in Gegenwart von DNA ganz beträchtlich ändert; die Ex-

tinktion sinkt um ca. 20% und das langwellige Absorptionsmaximum wird um ca. 15 m μ bathochrom verschoben (Abb. 1), ändert sich jedoch Extinktion und Bandenlage von freiem **2 b** gegenüber **2 b** in Gegenwart von DNA nur unwesentlich (Abb. 2).

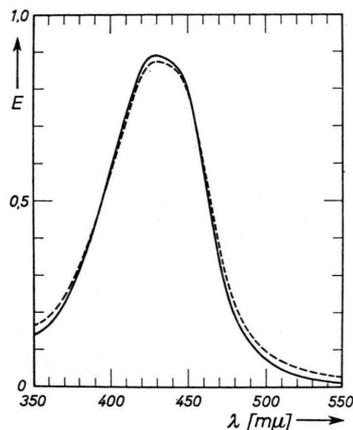


Abb. 2. Elektronenabsorptionsspektrum von 4,6-Dimesmethyl-4,6-di-tert-butyl-actinomycin (**2 b**) (durchgezogene Kurve) und von **2 b** in Gegenwart von DNS (unterbrochene Kurve); beide in BPES-Puffer.

Diese Befunde können so interpretiert werden, daß sowohl bei **2 a** als auch bei **2 b** eine lockere Außenanlagerung – wahrscheinlich vorwiegend über heteropolare Bindungen der Trialkylaminreste von **2 a/2 b** zu den Phosphatresten der DNA erfolgt, dann aber nur im Falle von **2 a** ein Einschub des Chromophors zwischen die Basenpaare der DNA stattfindet, der durch elektronische Wechselwirkungen der DNA-Basen mit dem Chromophor zu einer weitergehenden Stabilisierung des Komplexes führt, die aus räumlichen Gründen bei **2 b** unterbleibt.

Im Hinblick auf den Actinomycin/DNA-Komplex stehen diese Ergebnisse, was den Chromophor betrifft, im Einklang mit dem von MÜLLER und CROTHERS⁶ vorgeschlagenen Actinomycin/DNA-Einschubmodell und widersprechen dem Anlagerungsmodell von HAMILTON, FULLER und REICH⁷. Eine Anlagerung, wie sie für den **2 b**/DNA-Komplex gefordert werden muß, kann beim **2 a**/DNA-Komplex und wenn man den Peptidlactonringen von **1** ähnlich bindungsstabilisierende Funktion wie den basischen **2 a/2 b**-Resten zubilligt beim Actinomycin/DNA-Komplex nur als Zwischenform möglich sein.

⁶ W. MÜLLER u. D. M. CROTHERS, J. molecular Biol. **35**, 251 [1968].

⁷ L. D. HAMILTON, W. FULLER u. E. REICH, Nature [London] **198**, 538 [1963].

Beschreibung der Versuche

Für die Papierchromatographie wurden Papierbögen Nr. 2043 b der Fa. Schleicher u. Schüll benutzt. Der BPES-Puffer enthielt 0,01 M EDTA (Di-Natriumsalz), 0,179 M NaCl, 0,006 M Na₂HPO₄ und 0,002 M NaH₂PO₄. NMR-Spektren: Varian A 60, δ in ppm, TMS als innerer Standard; Elektronenspektren: Beckman DB-G6 bzw. Cary 14.

Actinomycin (**2 a**): 1,4 g 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methylbenzoesäure (**4 a**)² werden in 5 ml Thionylchlorid suspendiert, 10 Min. unter Rückfluß gekocht; überschüssiges Thionylchlorid wird im Vakuum abdestilliert und das Säurechlorid über Kaliumhydroxid getrocknet. Das in 30 ml wasserfreiem Dioxan gelöste kristallisierte Säurechlorid versetzt man mit einer Lösung von 2,5 g *N,N*-Diäthyl-äthylendiamin (**3**) in 30 ml Dioxan, gießt diese nach 10 Min. in 300 ml Eiswasser und extrahiert nach Zugabe von wäbr. Natriumhydrogencarbonat mit Äthylacetat. Der in 25 ml Methanol gelöste Abdampfrückstand wird in Gegenwart von Palladium-Aktivkohle (10% Pd) bei Normaldruck aushydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators setzt man unter Rühren erst 100 ml Phosphatpuffer pH 7,2, dann unter Nachregulieren des pH-Wertes durch Zugabe von 2 *n* Natronlauge portionsweise 5,0 g in wenig Puffer gelöstes Kaliumhexacyanoferrat (III) zu. Nach 1 Stde. wird der hellrote Niederschlag abzentrifugiert, mit wäbr. Natriumhydrogencarbonat versetzt und mit Chloroform extrahiert. Der mit Wasser geschüttelte, filtrierte Chloroformextrakt wird eingedampft und der Rückstand aus Benzol kristallisiert.

950 mg (74%) dunkelrote Nadeln vom Schmp. 208–209°. Einheitlich im Rundfilterchromatogramm (Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat*, 1 : 1).

UV: λ_{\max} (Methanol) 443, 423, 238 m μ ($\epsilon = 29100, 25700, 41800$), $c = 2,7 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter.

NMR (CDCl₃): *t* 1,02, *t* 1,09 (zusammen 12, beide mit $J = 7,5$ Hz), *s* 2,10 (3), *s* 2,45 (3), *m* 2,6 (12), *m* 3,5 (4), *d* 7,20 (1) ($J = 7,5$ Hz), *d* 7,41 (1) ($J = 7,5$ Hz), NH 7,00 und 10,40 ppm breit.

C₂₈H₄₀N₆O₄ (524,7)

Ber. C 64,10 H 7,69 N 16,02,

Gef. C 64,11 H 7,67 N 16,11.

Actinomycin-di-methojodid (**2 c**): 105 mg Actinomycin (**2 a**) werden in 10 ml Methanol gelöst und mit 1 ml Methyljodid versetzt. Nach einer halben Stde. beginnt sich **2 c** abzuscheiden. Zur Vervollständigung der Reaktion läßt man noch 20 Stdn. stehen. Nach Abfiltrieren kristallisiert man den Rückstand aus Methanol. 150 mg (93%) gelbrote Nadeln, die bei 265° unter Zersetzung schmelzen. Einheitliche gelbe Zone auf dem Rundfilter-

* Alle Natrium-*m*-Kresotinatlösungen waren mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

chromatogramm (Butanol/Dibutyläther/3-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, 1 : 1 : 2).

UV: λ_{\max} (Wasser) 446, 430 $m\mu$ ($\epsilon = 26400, 26400$),
 $c = 6 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter.

$C_{30}H_{40}N_6O_4J_2$ (808,5)

Ber. C 44,57 H 5,74 N 10,39 J 31,39,
Gef. C 44,32 H 5,91 N 10,47 J 30,85.

2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoesäure- β -(*N,N*-diäthyl-amino)-äthylamid (**5b**): 2,4 g 2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoesäure (**4b**)³ und 1,2 g *N,N*-Diäthyl-äthylendiamin (**3**), gelöst in 150 ml Methylenchlorid, werden bei 0° unter Rühren mit 2,4 g in wenig Methylenchlorid gelöstem Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 2 Stdn. entfernt man das Kühlbad, läßt noch 15 Stdn. weiterrühren, filtriert ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und verdampft das Lösungsmittel. Der erneut in Methylenchlorid gelöste Rückstand wird durch Filtration von weiterem Harnstoff befreit, das Filtrat nach Schütteln mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat und Wasser eingedampft, der Rückstand durch Ansäuern in 200 ml Wasser gelöst, filtriert, mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat alkalisiert und mit Methylenchlorid extrahiert. Nach Abdampfen und Kristallisation des Rückstandes aus Benzol erhält man 2,2 g (65%) gelbe Kristalle vom Schmp. 157°.

$C_{17}H_{27}N_3O_4$ (337,4)

Ber. C 60,51 H 8,07 N 12,45,
Gef. C 60,80 H 7,99 N 12,22.

4.6-Didesmethyl-4.6-di-tert.-butyl-actinomycin (**2b**): 1,01 g 2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoesäure-(*N,N*-diäthyl-amino)-äthylamid (**5b**) werden in 75 ml warmem Methanol gelöst und unter Normaldruck in Gegenwart von Palladium-Aktivkohle (10% Pd) aushydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators setzt man unter Rühren 120 ml Phosphatpuffer pH 7,2 und 3,0 g in wenig Puffer gelöstes Kaliumhexacyanoferrat (III) zu, wobei der pH-Wert mit verdünnter Natronlauge nachreguliert wird. Nach 1-stdg. Rühren extrahiert man die tiefrote Lösung mit Chloroform, schüttelt mit Wasser und dampft ab. Der getrocknete Abdampfrückstand 7 (800 mg) wird in 60 ml Eisessig gelöst, mit 6 ml Trifluoressigsäure versetzt und 4 Min. unter Rückfluß gekocht, wobei man Sauerstoff durch die Lösung perlen läßt. Nach zwanzigminütigem Aufbewahren kühlt man ab, versetzt mit Chloroform und gibt unter Rühren bis zur alkalischen Reaktion gesättigtes

wäßr. Natriumhydrogencarbonat zu. Nach zweimaligem Schütteln der Chloroformphase mit sehr verd. wäßr. Natriumazetat wird abgedampft, der glasige Rückstand in Methanol aufgenommen und beim Abdampfen aufgeschäumt. 700 mg (77%) gelbbraune amorphe Substanz. Einheitlich im Rundfilterchromatogramm (Butanol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, 1 : 4 : 5).

UV: λ_{\max} (Methanol) 422, 238 $m\mu$ ($\epsilon = 20500, 3400$, $c = 2.8 \cdot 10^{-5}$ Mol/Liter.

NMR ($CDCl_3$): t 1,00, t 1,08 (zusammen 12, beide mit $J = 7,5$ Hz), s 1,54, s 1,57 (zusammen 18), m 2,6 (12), m 3,5 (4), s 7,40 (2); NH 6,90 und 10,35 ppm breit.

$C_{34}H_{52}N_6O_4$ (608,8)

Ber. C 67,07 H 8,61 N 13,81,
Gef. C 66,73 H 8,60 N 13,78.

Elektronenspektroskopische Untersuchung der Wechselwirkung von Actinomycin (**2a**) und 4.6-Didesmethyl-4.6-di-tert.-actinomycin (**2b**) mit DNA: 1. Man löste soviel von **2a** bzw. **2b** im BPES-Puffer, daß die Lösungen in 1 cm Schichtdicke bei 445 $m\mu$ eine Extinktion von 1,8 haben. 2 ml dieser Lösungen werden mit 2 ml BPES-Puffer verdünnt und das Absorptionsspektrum aufgenommen (durchgezogene Kurven in Abb. 1 und 2). Weitere 2 ml der Stammlösungen werden mit der gleichen Menge Pufferlösung versetzt, die 0,8 mg DNA/ml (Kalbsthymus-DNA, Mol.-Gew. $\sim 4 \cdot 10^6$, Fa. Serva) enthielt und erneut spektroskopiert (unterbrochene Kurven in Abb. 1 u. 2). 2. Zur Gleichgewichtseinstellung werden Lösungen von **2a** bzw. **2b** in BPES-Puffer mit der Extinktion 1,8 (445 $m\mu$) 40 Stdn. bei 25° unter Rühren in Plexiglaszellen (Totalvolumen 7 ml, Dialysemembran der Union Carbide) gegen eine DNA-Lösung (1 mg DNA/ml BPES-Puffer) dialysiert. Danach wird die Extinktion der ungebundenen **2a/2b**-Anteile in den DNA freien Lösungen bestimmt. Bei **2b** war diese auf 0,3, bei **2a** auf 0,03 abgesunken.

Ein Teil der Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen durchgeführt. Herrn Dr. W. MÜLLER, Herrn Prof. Dr. H. BROCKMANN und Herrn Dr. D. M. CROTHERS danke ich für Anregungen, letzteren auch für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.