

# Einfluß von Steroiden auf die Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase

Von Prof. Dr. A. Wacker, Dr. J. Drews, Dr. W. B. Pratt und P. Chandra

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt/Main

Professor Gustav Ehrhart zum 70. Geburtstag gewidmet

Wir haben *Pseudomonas testosteroni* 4 bis 5 Std. in Gegenwart von [<sup>3</sup>H]-Testosteron wachsen lassen und aus den Zellen diejenige Fraktion isoliert, welche die Radioaktivität enthielt. Nach dem gleichen Verfahren wurden nicht mit Testosteron gewachsene Zellen aufgearbeitet: Feuchte Zellen (0,7 – 0,8 g) wurden mit Glasperlen homogenisiert und die Suspension 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Der zellfreie Extrakt wurde 45 min bei 105 000 g zentrifugiert und der Überstand an einer mit Sephadex G-100 gefüllten Säule (2 cm Durchmesser, 45 cm Länge) mit 0,06 M Phosphatpuffer (pH = 7,4) fraktioniert. Die erste bei 280 m $\mu$  absorbierende Fraktion wurde verwendet.

Sowohl die Fraktion aus testosteron-haltigen als auch die aus testosteron-freien Zellen hemmen in einem zellfreien m-RNS synthetisierenden System die DNS-abhängige RNS-Polymerase. Die Hemmwirkung der Fraktion aus testosteron-freien Zellen ist jedoch größer (Tabelle 1). Setzt man dieser Fraktion nachträglich Testosteron zu, so sinkt die Hemmwirkung auf den Wert, den man mit der Fraktion aus testosteron-haltigen Zellen erhält. Cortison ist wirkungslos [1].

Tabelle 1. Einfluß einer Fraktion aus Zellen, die mit (IF) oder ohne (NIF) Testosteron gewachsen sind, auf die Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase. Das Reaktionsgemisch (0,38 ml, pH = 7,5) enthielt: je 100 m $\mu$  Mol GTP, CTP, UTP und [<sup>3</sup>H]-ATP; 10  $\mu$ Mol Tris; 0,25  $\mu$ Mol MnCl<sub>2</sub>; 1,0 m $\mu$  Mol MgCl<sub>2</sub>; 1,0  $\mu$ Mol  $\beta$ -Mercaptoäthanol; 2 optische Einheiten DNS (Lachssperma); 20  $\mu$ g RNS-Polymerase aus *E. coli* [2].

System	Eingebautes [ <sup>3</sup> H]-ATP [m $\mu$ Mol]
komplett	0,455
– Polymerase	0,004
+ NIF	0,192
+ IF	0,245
+ NIF + Testosteron	0,255
+ NIF + Cortison	0,145

Die unterschiedliche Wirkung von Testosteron und Cortison zeigte sich auch *in vivo* (Tabelle 2): während Testosteron in wachsenden Zellen von *P. testosteroni* eine maximale Menge von  $\Delta^5$ -3-Ketosteroid-Isomerase (sowie von 3 $\alpha$ - und 3 $\beta$ .17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) induziert, ist Cortison

Tabelle 2. Wirkung verschiedener Steroide auf die Aktivität der DNS-abhängigen RNS-Polymerase *in vitro* (vgl. Tabelle 1) und der  $\Delta^5$ -3-Ketosteroid-Isomerase *in vivo*.

System (vgl. Tabelle 1)	Eingebautes [ <sup>3</sup> H]-ATP [m $\mu$ Mol]	$\Delta^5$ -3-Ketosteroid-Isomerase [Einheiten/ml Bakteriensuspension] [a]
komplett + NIF	0,080	0,3 [b]
+ Testosteron	0,125	15,6
+ Methenolon [c]	0,108	11,6
+ Substanz S [d]	0,100	11,2
+ Progesteron	0,090	
+ Cortison	0,065	0,55

[a] Eine Enzymeinheit isomerisiert in 1 min 1  $\mu$ Mol  $\Delta^5$ -Androsten-3,17-dion zu  $\Delta^4$ -Androsten-3,17-dion.

[b] Kontrolle ohne Steroid.

[c] 1-Methyl- $\Delta^1$ -androsten-17 $\beta$ -ol-3-on (®Primobolan).

[d] 11-Desoxycortison.

nahezu wirkungslos. Auch für andere Steroide gehen die Wirkungen *in vivo* und *in vitro* parallel (Tabelle 2). Besonders bemerkenswert erscheint, daß die m-RNS-Synthese durch das antianabol und katabol wirkende Cortison gehemmt, durch das anabol wirkende Methenolon dagegen stimuliert wird.

Erste Ergebnisse (Inkubation mit Enzymen, Hitzeaktivierung) sprechen dafür, daß die aus *P. testosteroni* isolierte Fraktion ein Protein enthält, das mit den Steroiden reagiert und bei dem es sich möglicherweise um den Repressor der m-RNS-Polymerase im Sinne von Jacob und Monod [3] handelt.

Eingegangen am 23. Dezember 1964 [Z 890]

[1] Über ähnliche Ergebnisse mit Fraktionen aus dem Uterus ovariectomierter Ratten berichteten G. P. Talwar, S. J. Segal, A. Evans u. O. W. Davidson, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1059 (1964).

[2] M. Chamberlin u. P. Berg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 81 (1962).

[3] F. Jacob u. J. Monod, J. molecul. Biol. 3, 318 (1961).

## Synthese von $\beta$ -Thioxoketonen durch Kondensation von Ketonen mit Thiosäureestern

Von Doz. Dr. E. Uhlemann und Dipl.-Chem. H. Müller

Institut für Anorganische Chemie der Universität Leipzig

Thioderivate von  $\beta$ -Dicarbonyl-Verbindungen sind durch säure- oder basekatalysierte Umsetzung der Sauerstoffverbindungen mit Schwefelwasserstoff [1, 2] zugänglich. Bei sehr unsymmetrisch gebauten  $\beta$ -Dicarbonyl-Verbindungen ist dabei der Angriff des Schwefelwasserstoffs durch die Konstitution des Ausgangsmaterials weitgehend festgelegt, während für  $\beta$ -Diketone mit nur wenig verschiedenen Substituenten die Bildung zweier isomerer Thioderivate zu erwarten ist. Wir fanden, daß man  $\beta$ -Thioxoketone einheitlicher Zusammensetzung glatt durch eine der Claisen-Kondensation analogen Kondensation von Ketonen mit Dithiosäureestern oder Thionsäureestern erhält. Ausbeuten von mehr als 50 % sind leicht zu erreichen.

### Monothiodibenzoylmethan:

40 g Acetophenon (0,33 Mol) werden unter Rühren langsam zu einer Suspension von 13 g Natriumamid (0,33 Mol) in 200 ml Äther gegeben. Nach 15 Minuten tropft man eine Lösung von 24 g Thiobenzoesäure-O-methylester (0,16 Mol) in 50 ml Äther zu. Man röhrt 3 Stunden bei Zimmertemperatur, läßt über Nacht stehen und zersetzt den in reichlicher Menge gebildeten Niederschlag mit Eiswasser. Aus der mit Äther durchgeschüttelten wässrigen Phase wird das Monothiodibenzoylmethan durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in Form roter glänzender Kristalle gewonnen. Ausbeute: 26 g (68 %).

Eingegangen am 21. Dezember 1964 [Z 885]

[1] S. K. Mitra, J. Indian chem. Soc. 10, 11 (1933).

[2] R. Mayer et al., Angew. Chem. 75, 1011 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 370 (1963).

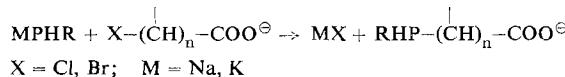
## Phosphino-carbonsäuren [1]

Von Prof. Dr. K. Issleib, Dipl.-Chem. R. Kümmel und Dipl.-Chem. H. Zimmermann

Institut für Anorganische Chemie der Universität Halle/Saale

Das Verfahren zur Synthese tertärer Carboxyalkylphosphine aus Alkaliphosphiden MPR<sub>2</sub> und Halogencarbonsäureestern [2] in Tetrahydrofuran oder Äther läßt sich nicht unmittelbar zur Synthese primärer und sekundärer Carboxyalkylphosphine verwenden, da hier in beträchtlichem Umfang Nebenreaktionen wie Metall-Halogen- und Metall-Wasserstoff-Austausch sowie nucleophiler Angriff des Phosphid-Anions an der Estergruppe eintreten. Verwendet man aber

statt der Ester die wasserfreien Natriumsalze der Halogen-carbonsäuren, so entstehen in glatter Reaktion und guten Ausbeuten die Salze der prim. und sek. Carboxyalkylphosphine, aus denen mit verd.  $H_2SO_4$  die freien Phosphino-carbonsäuren (1)–(8) leicht zugänglich sind, die man als Phosphoranaloga der Aminosäuren auffassen kann.



	$K_p$ [°C/Torr] oder $F_p$ [°C]	Ausb. [%]	Derivate	$K_p$ [°C/Torr]
(1), $H_2P-CH_2-COOH$	70–72/6	82	$H_2P-CH_2-COOCH_3$	27–28/10
(2), $H_2P-CH(CH_3)-COOH$	73–74/5	85	$H_2P-CH(CH_3)-COOCH_3$	33–34/13
(3), $H_2P-CH(C_2H_5)-COOH$	87–89/6	76	$H_2P-CH(C_2H_5)-COOCH_3$	39–41/10
(4), $H_2P-CH_2-CH_2-COOH$	86–87/6	69	$H_2P-CH_2-CH_2-COOCH_3$ [5]	37–38/10
(5), $C_6H_5HP-CH_2-COOH$	35–37	70	$[H_3P^\oplus-CH_2-COOH]^\ominus$	$F_p = 112$ °C aus $C_2H_5OH$
(6), $c-C_6H_11HP-CH_2-COOH$	Öl	70	—	
(7), $C_2H_5HP-CH_2-COOH$	Öl	75	—	
(8), $C_6H_5HP-CH(CH_3)-COOH$	29–31	57	—	

Die Reaktionen werden in flüssigem Ammoniak durchgeführt, in dem die Mehrzahl der Alkaliphosphide  $MPH_2$  und  $MPHR$  wegen der  $pK_a$ -Differenz Phosphin-Ammoniak unzersetzt löslich ist [3]. Die Alkaliphosphide werden aus Natrium oder Kalium in flüssigem Ammoniak und Phosphorwasserstoff [4] oder prim. Phosphin bereitet (Farbumschlag nach Gelb) und unmittelbar mit den Natriumsalzen der Halogen-carbonsäuren umgesetzt.

Die Säuren (1)–(4) sind farblose, luftröhrige, im Vakuum unzersetzt destillierbare Flüssigkeiten von charakteristischem Geruch, die kurz unterhalb Raumtemperatur zu farblosen Kristallen erstarrten. Für (5)–(8) ist eine Destillation im Vakuum nicht vorteilhaft. Im Vergleich zu den in Äther und in Wasser mit saurer Reaktion löslichen Säuren (1)–(4) lösen sich (5)–(8) nur in organischen Lösungsmitteln. Polarographische Untersuchungen erwiesen für (1)–(8) teilweise Zwitterionenstruktur. Aus (1)–(4) und ätherischer Diazomethanlösung erhält man in nahezu quantitativer Ausbeute die Methylester (siehe Tabelle) als farblose, niedrig siedende Flüssigkeiten, die sich, fein verteilt, an der Luft entzünden. Die Säuren (5)–(8) liefern analoge Derivate. Mit Jodwasserstoff reagieren (1)–(8) unter Quartärsalzbildung.

Eingegangen am 4. Januar 1965 [Z 889]

[1] 34. Mitteilung über Alkalimetall-Phosphor-Verbindungen und ihr reaktives Verhalten. – 33. Mitteilung: K. Issleib u. L. Brüsehaber, Z. Naturforsch., im Druck.

[2] K. Issleib u. G. Thomas, Chem. Ber. 93, 803 (1960).

[3] K. Issleib u. R. Kümmel, J. organomet. Chemistry, im Druck.

[4] R. J. Wagner u. A. B. Burg, J. Amer. chem. Soc. 75, 3869 (1953).

[5] A. R. Stiles, F. F. Rust u. M. E. Vaughan, US.-Pat. 2803597 (1957); Chem. Abstr. 52, 2049 b (1958).

### Ein optisch aktives Methylen-tribenzo-cycloheptatrien-Derivat

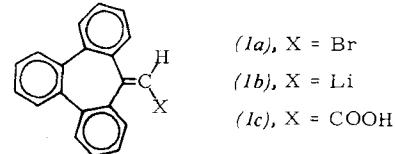
Von Dr. W. Tochtermann und Dr. H. Küppers

Organisch-Chemisches Institut der Universität Heidelberg

Die Inversion des in der nicht ebenen Wannen-Konformation vorliegenden Siebenringes ist bei Di- und Tribenzo-cycloheptatrienon-acetalen im Vergleich zum Cycloheptatrien erschwert [1]. Geeignete substituierte Tribenzo-cycloheptatrien-

Derivate sollten daher in optische Antipoden zerlegbar sein. Zur Prüfung dieser Voraussage haben wir die aus Tribenzo-cycloheptatrienon durch Brommethylenierung [2] leicht erhältliche Bromverbindung (1a) ( $F_p = 127$ –129 °C; 75 % Ausb.) mit Lithium in Dimethoxymethan [3] bei –20 bis –25 °C zur Lithiumverbindung (1b) umgesetzt. Carboxylierung und anschließende Hydrolyse ergaben mit 60-proz. Ausbeute 1-Carboxymethylen-tribenzo-cycloheptatrien (1c),  $F_p = 249$ –251 °C.

Die Konstitution von (1c) wurde durch Analyse, Molekulargewichtsbestimmung, NMR-, UV- und IR-Spektren sowie durch Oxydation mit Kaliumpermanganat zum Tribenzo-cycloheptatrienon gesichert.



Die Carbonsäure (1c) konnte über das Brucin-Salz in die recht beständigen optischen Antipoden getrennt werden, deren spezifische Drehungen  $[\alpha]_{D}^{25} = +31,7^\circ$  und  $[\alpha]_{D}^{25} = -30,9^\circ$ ;  $c = 0,026$  g/cm<sup>3</sup> in Aceton) stark vom Lösungsmittel abhängen. Ließ man Lösungen der Antipoden bei Raumtemperatur stehen, so war auch nach längerer Zeit kein Verlust an optischer Aktivität nachzuweisen [\*].

Racemisierungsversuche in Diäthylenglykoldimethyläther bei 139 °C zeigten, daß die Drehwerte nach erster Ordnung abnehmen;  $k_{exp}$  betrug im Mittel  $1,1 \cdot 10^{-4}$  sec<sup>-1</sup>. Daraus ergibt sich mit  $k_{inversion} = 0,5 k_{exp}$  [4] für den Umklappvorgang bei 139 °C eine Freie Energie der Aktivierung  $\Delta F^\ddagger$  von 31 kcal/Mol. Die durch Inversion des Siebenringes bewirkte Racemisierung scheint also noch etwas langsamer zu verlaufen als die Racemisierung der 2-Brom-dibenzo[a,e]-cyclooctatetraen-6,11-dicarbonsäure [5].

Eingegangen am 4. Januar 1965 [Z 888]

[1] W. Tochtermann, U. Walter u. A. Mannschreck, Tetrahedron Letters 1964, 2981.

[2] G. Köbrich, Angew. Chem. 74, 33 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 51 (1962); wir danken Dr. Köbrich für die Überlassung von Triphenyl-brommethyl-phosphoniumbromid.

[3] U. Schölkopf u. H. Küppers, Tetrahedron Letters 1964, 1503.

[\*] Anmerkung bei der Korrektur: Inzwischen wurden zwei optisch aktive Methylen-dibenzo-cycloheptatrien-Derivate von A. Ebner, E. Jucker u. A. Stoll, Chimia 18, 404 (1964), beschrieben.

[4] R. Huisgen in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie. Thieme, Stuttgart 1955, Bd. III/1, S. 99; A. A. Frost u. R. G. Pearson: Kinetics and Mechanism. Wiley, New York 1961, S. 99, 186 und 373.

[5] K. Mislow u. H. D. Perlmutter, J. Amer. chem. Soc. 84, 3591 (1962).