

nung der Substituenten R und R-CO in den Verbindungen (5) können wir noch keine Aussagen machen. (5a): Ausbeute 60 %, Fp = 157 °C, Massenspektrum: M⁺ bei m/e = 372. Protonenresonanz: Singulett für die beiden Protonen am Cyclopropanring bei τ = 6,08; Multiplets für die aromatischen Protonen bei τ = 3,34, 2,71 und 2,39. UV-Spektrum (in Cyclohexan): λ_{\max} : 217 nm, 236 (Schulter), 245 (Schulter), 270, 278 (Schulter), 301, 313. IR-Spektrum: λ_{\max} = 6,1 μ .

(5b): Ausbeute 25 %, Fp = 129 °C, Massenspektrum: M⁺ bei m/e = 248. Protonenresonanz: Je ein Singulett für die Methylenprotonen bei τ = 9,32 und 7,72; Singulett für die Cyclopropanprotonen bei τ = 6,77; Multiplets für die aromatischen Protonen bei τ = 2,72 und 2,09. UV-Spektrum: λ_{\max} : 223 nm, 241, 272, 280 (Schulter), 299, 312. IR-Spektrum: λ_{\max} : 5,97 μ . Die Elementaranalyse ergibt für die Verbindungen (5) die richtigen Werte.

Darstellung von (5):

Zu einer Lösung von (1) [das Bisphosphoniumsalz, aus dem man (1) gewinnt, sorgfältig im Hochvakuum über P₂O₅ trocknen!] in wasserfreiem Benzol oder Dioxan gibt man (2) und kocht so lange unter Rückfluß, bis die rote Ylidfarbe verschwunden ist. Anschließend wird ein Überschuß an Methyljodid zugegeben, erneut 1 Stunde gekocht und das abgeschiedene Triphenyl-methylphosphoniumjodid abgesaugt. Man destilliert das Lösungsmittel ab und nimmt den Rückstand in wenig heißem Äthanol auf. Beim Abkühlen kristallisiert (5) aus.

Eingegangen am 4. April und 5. Mai 1967 [Z 510]

[*] Prof. Dr. H. J. Bestmann und Dipl.-Chem. H. Morper
Institut für Organische Chemie der Universität
852 Erlangen, Henkestraße 42

[1] D. M. Hall, M. S. Lesslie u. E. E. Turner, J. chem. Soc. (London) 1950, 711.

[2] H. J. Bestmann, H. Häberlein, H. Wagner u. O. Kratzer, Chem. Ber. 99, 2848 (1966).

[3] R. Mechoulam u. F. Sondheimer, J. Amer. chem. Soc. 80, 4386 (1958); J. P. Freemann, Chem. and Ind. 1959, 1254; J. org. Chemistry 31, 538 (1966); H. J. Bestmann u. F. Seng, Angew. Chem. 74, 154 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. I, 116 (1962).

Testosteron als Abwehrstoff des Schlammschwimmers *Ilybius*^[1]

Von H. Schildknecht, H. Birninger und U. Maschwitz [*]

Herrn Professor G. Wittig zum 70. Geburtstag gewidmet

In der Randzone süddeutscher Seen und Tümpel konnten wir neben anderen Dytisciden (Schwimmkäfern) zwei Arten der Gattung *Ilybius*, *I. senestratus* und *I. fuliginosus*, fangen. Es gelang uns durch Präparieren unter einer Insekten-Ringerlösung, die im Körperende liegenden Pygidial- und die im Brustabschnitt liegenden Prothorakal-Wehrblasen freizule-

gen (vgl. Abb. 1). Die in den Drüsen produzierten Substanzen dienen den Käfern als Wehrstoffe gegen Mikroorganismen und wechselwarme Wirbeltiere.

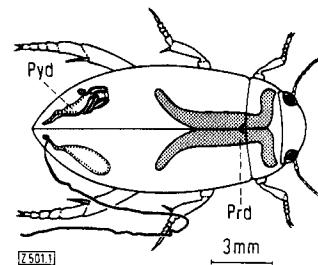


Abb. 1. *Ilybius* mit Prothorakal- (Prd) und Pygidial-Wehrblasen (Pyd); links oben: Drüsenschlauch in natürlicher Lage; links unten: Drüsenschlauch herauspräpariert.

Zerdrückt man die Prothorakal-Wehrblasen in Methanol, so erhält man eine gelbe Lösung, die dünnsschicht-chromatographisch (Kieselgel GF₂₅₄ (Merck); Cyclohexan/Äthylacetat (1:1)) getrennt werden kann. Durch mehrfache Chromatographie gelang es, die Hauptkomponente als zähflüssiges Öl zu isolieren, das nach einigen Tagen kristallin erstarrte. Unmittelbar nach der Isolierung haben wir die Analyse aller Wirkstoffe des *Ilybius* begonnen.

Die Hauptkomponente: Durch ein UV-Absorptionsmaximum bei 241 μm wurde ein Enon-Chromophor angezeigt, das sich auch im IR-Spektrum durch Banden bei 1660 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) und 1610 cm^{-1} ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) zu erkennen gab. Eine durch ihre Bande bei 3360 cm^{-1} nachgewiesene OH-Gruppe konnte durch eine $\nu\text{-C-OH}$ -Schwingung bei 1055 cm^{-1} näher charakterisiert werden, da diese im Erwartungsbereich für alicyclische sekundäre Alkohole mit Fünf- oder Sechsringgerüst liegt. Eine Bande bei 3020 cm^{-1} deutete auf ein oder mehrere Wasserstoffatome an der C=C-Doppelbindung hin. Das massenspektrometrisch ermittelte Molekulargewicht beträgt 288. Aufgrund der Erfahrungen, die wir bei der Analyse der Wehrsekrete anderer Schwimmkäfer gemacht haben^[2, 3], war es mit diesen Daten möglich, die Hauptkomponente des Wehrsekretes als Testosteron (Δ^4 -Androsten-17 β -ol-3-on) zu identifizieren. Zur weiteren Charakterisierung wurde aus der nativen Substanz mit Acetanhydrid/Pyridin ein Acetat hergestellt, dessen Schmelzpunkt nach dünnsschicht-chromatographischer Reinigung bei 134,5–136 °C lag (Lit.: 135–138 °C). Die IR-Spektren dieses Acetats und einer Vergleichssubstanz waren identisch.

Die Tatsache, daß *Ilybius* wie andere Dytisciden beim Anfassen das milchige Prothorakaldrüsensekret absondert, weist darauf hin, daß es sich auch in diesem Fall um Abwehrstoffe handelt. Um dies zu beweisen, verfütterten wir *I. senestratus* an Erdkröten, Knoblauchkröten und Grasfrösche. Die Wirkung war eindrucksvoll. So erbrach eine hungrige Erdkröte, die innerhalb 5 min vier Käfer gefressen hatte, nach 20 min unter Schreien zwei lebende Käfer, die in blutigen Schleim gehüllt waren. Auch die Knoblauchkröten und Frösche erkrankten nach der Fütterung schwer und erbrachen zum Teil die lebenden Schwimmkäfer. Nach einer- bis zweimaliger Fütterung mit *Ilybius* nahmen diese Tiere trotz Hungers keine Käfer mehr an. Damit dürfte dieser Dytiscide gegen Amphibien, die in der Uferregion leben, hervorragend geschützt sein.

Um Testosteron als Sekretbestandteil auf seine Wirksamkeit zu prüfen, setzten wir Goldfische in eine wäßrige Testosteron-Lösung (10 mg/ml). Bereits nach wenigen Minuten trat Erregung und Muskelschwäche auf. Nach 25 min verloren die Fische das Gleichgewicht und lagen schließlich regungslos am Boden, erholten sich in frischem Wasser aber wieder vollständig. Damit ist gezeigt, daß Testosteron wie andere von uns geprüfte Steroide^[2–4] auf Fische betäubend wirkt. Es ist erstaunlich, daß Testosteron die gleichen Erscheinungen wie Cortexon hervorruft, obwohl ersteres bei Wirbeltieren als männliches Sexualhormon, letzteres als Corticosteroid fungiert.

Von Ochs^[5] wird berichtet, daß Wasserkäfer, insbesondere *Gyrinus*, in den Alpen als Aphrodisiakum für Rinder und Pferde verwendet werden. *Gyrinus*, ein zu einer anderen Familie gehörender Käfer, erzeugt nach unseren bisherigen Untersuchungen keine Steroide. Wahrscheinlich wird von der Landbevölkerung der im gleichen Biotop lebende und ähnlich aussehende *Gyrinus* mit *Ilybius* verwechselt.

Eingegangen am 28. April 1967 [Z 501]

[*] Prof. Dr. H. Schildknecht, Dipl.-Chem. H. Birringer und Dr. U. Maschwitz
Organisch-Chemisches Institut der Universität
69 Heidelberg, Tiergartenstraße

[1] 26. Mittl. über Arthropoden-Abwehrstoffe; 25. Mittl.: H. Schildknecht u. W. F. Wenneis, Tetrahedron Letters 1967, 1815. — Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für vielseitige Unterstützung dieser Arbeiten, Herrn H. Schaelein für die Bestimmung der Käfer.

[2] H. Schildknecht, R. Siewert u. U. Maschwitz, Angew. Chem. 78, 392 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 421 (1966).

[3] H. Schildknecht, R. Siewert u. U. Maschwitz, Liebigs Ann. Chem. 703, 182 (1967).

[4] H. Schildknecht, D. Hotz u. U. Maschwitz, Z. Naturforsch., im Druck.

[5] G. Ochs, Entomol. Blätter 62, 14 (1966).

die Ausbeute an reinem 5'-O-Phosphorylthymidylyl-(3' → 5')-N-anisoyl-desoxycytidin 38 bis 40 %^[3]. Die Acetylierung der freien 3'-Hydroxygruppe des Dinucleotids mit Essigsäureanhydrid schloß sich an. (1) wurde dann mit der doppelten molaren Menge der Mononucleotide (2) umgesetzt. Sowohl zur Darstellung der β-Cyanäthylester der Mononucleotide als auch der Di- und Trinucleotide wurden die betreffenden Pyridiniumsalze in wasserfreiem Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) umgesetzt; die Reaktionszeit bei der Kondensation von β-Cyanäthanol mit den Mononucleotiden betrug 24 Std. bei Raumtemperatur, während bei der Synthese der Di- und Trinucleotide eine Reaktionszeit von drei Tagen die günstigsten Ergebnisse brachte. Nach Abspalten der β-Cyanäthyl- und Acetyl-Schutzgruppen wurden die Reaktionsgemische an DEAE-Cellulosesäulen (Carbonatform) getrennt. Eluiert wurde mit einem Triäthylammonium-hydrogencarbonat-Gradienten bei 3 °C. Die Ausbeuten an nur noch N-geschützten Trinucleotiden betrugen: 49,9 % (3a), 44,5 % (3b) und 45,2 % (3c).

Je 0,05 μmol (3a)–(3c) wurden als Pyridiniumsalze mit einem dreifachen Überschuß 2,4,6-Triisopropylbenzol-sulfonsäurechlorid^[4] in wasserfreiem Pyridin während 12 Std. bei Raumtemperatur zu Hexa-, Nona-, Dodeca- und zum Teil höheren Polynucleotiden kondensiert. Tabelle 1 zeigt die Ausbeuten nach Abspalten der Schutzgruppen und papierchromatographischer Trennung in n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (55:10:35).

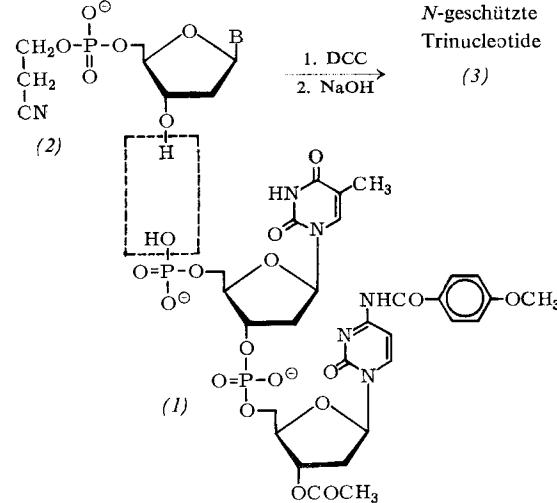
Tabelle 1. Produktverteilung (%) bei der Block-Kondensation der Trinucleotide (3).

Eingesetztes Trinucleotid	Cycl. Tri- nucleotid	Verteilung der Produkte [a]			
		n = 1	n = 2	n = 3	n ≥ 4
(3a)	24,4	22,2	17,9	16,3	19,7
(3b)	23,2	24,6	22,2	12,4	17,5
(3c)	23,5	18,7	18,2	13,2	26,4

[a] n = Zahl der Trinucleotideinheiten pro Oligonucleotidkette.

Bei der Synthese von höheren Oligonucleotiden ist es notwendig, die bisher geübten Verfahren des schrittweisen Aufbaus durch Anfügen von je einem Nucleotid durch Methoden zu ersetzen, mit denen kürzere Oligonucleotide zu größeren Einheiten zusammengefügt werden können (Block-Kondensation). Wir kondensierten Trinucleotide des Typs pXpTpC^[2] zu Oligonucleotiden (pXpTpC)_n. Das geschützte Dinucleotid pTpC (1)^[3] wurde mit den β-Cyanäthyl-nucleotiden (2) umgesetzt. Die Synthese erfolgte also im Gegensatz zu bisherigen Verfahren so, daß eine freie OH-Gruppe an C-3' des Mononucleotids mit einem Phosphat-Rest an C-5' des Dinucleotids reagiert.

Zur Darstellung der Dinucleotid-Komponente (1) wurde Thymidyl-5'-β-cyanäthylphosphat mit N-Anisoyl-3'-O-acetyl-desoxycytidyl-5'-phosphat im Molverhältnis 1:1 umgesetzt. Nach partieller Verseifung mit 1 N NaOH betrug



(a), B = Thymyl

(b), B = N-Anisoyl-cytosyl

(c), B = N-Benzoyl-adenyl

Die Oligomeren ab Dodecanucleotid wurden als einsträngige Matrizen für RNS-Polymerase (E.C. 2.7.7.6)^[5] verwendet. Der Einbau von Nucleosidtriphosphaten, von denen in Parallelversuchen jeweils eines ¹⁴C-markiert war, in RNS wurde bis zur Dauer von 2 Std. verfolgt und entsprach dem Basenverhältnis in der DNS-Matrise (Tabelle 2). Versuchsansatz: 0,25 ml bei 20 °C. 0,03 M Tris-Acetat-Puffer

Tabelle 2. Einbau von Nucleotiden in RNS mit synthetischen Matrizen.

Matrize	Einbau (nMol) nach 90 min		
	A	U	G
(CTC) _n ≥ 4	4,65	—	9,50
(ATC) n ≥ 4	4,20	4,10	3,90
(TTC) n ≥ 4 [a]	24,30	—	12,20

[a] In diesem Versuch wurde die 2,5-fache Enzymmenge eingesetzt.

(pH = 7,9), 0,13 M NH₄Cl, 0,03 M Mg-Acetat. — 10⁻³ M GTP und 0,5·10⁻³ M ATP oder je 10⁻³ M ATP, GTP und UTP oder 10⁻³ M ATP und 0,5·10⁻³ M GTP. — 0,01 M Phosphoenol-pyruvat, 20 μg/ml Pyruvakinase, 1,0 O.D.-Einheiten Matrize, 100 μg Protein (Enzymaktivität 200 E/mg Protein).

Eingegangen am 21. April und 5. Mai 1967 [Z 514]

[*] Prof. Dr. F. Cramer, Dipl.-Ing. W. Frölke und Dr. H. Matzura Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie

34 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

[1] Synthese von Oligo- und Polynucleotiden; 10. Mitteilung. — 9. Mitteilung: F. Eckstein, Chem. Ber., im Druck.