

Chromosomale Struktur von *Pseudomona testosteronei*

IV. Wirkung von Testosteron auf die RNA-Synthese

Chromosomal Structures of *Pseudomonas testosteronei*

IV. Effect of Testosterone on RNA-Synthesis

G. Reimer und D. Drahovsky

Zentrum der Biologischen Chemie, Abteilung für
Therapeutische Biochemie, Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **32 c**, 654–655 [1977]; eingegangen
am 12. April 1977)

Bacterial Chromosome, Endogenous RNA-Polymerase
Activity, Enzyme Induction

Testosterone degrading enzymes are synthesized *de novo* by bacterium *P. testosteronei* to utilize testosterone-like steroids as the only source of carbon. RNA-synthesis of the whole lysate of testosterone-induced bacteria was found to be 15% reduced compared to the control, suggesting a cytoplasmatic factor which modulates chromatin associated RNA-polymerase activity.

P. testosteronei vermag mit Testosteron und Analoga als einzige Kohlenstoffquelle zu leben, indem das Bakterium steroidabbauende Enzyme *de novo*

Sonderdruckanforderungen an Dr. G. Reimer, Zentrum Dermatologie und Venerologie, Abteilung IV (Biochemie), Theodor-Stern-Kai 7, D-6000 Frankfurt.

synthetisiert¹⁻³. Durch die Abhängigkeit der Neusynthese dieser im Genom monocistronisch codierten, koordiniert induzierbaren Enzyme von intakter Translation und Transkription, stellt *P. testosteronei* ein geeignetes Modell der Regulation von Genaktivitäten dar³.

Für *in vitro*-Studien des Wirkungsmechanismus des Enzyminduktors Testosteron an einer nativ vorliegenden chromosomalen Struktur wurde die Lyse von Stonington und Pettijohn⁴ modifiziert. Mit zwei analogen Methoden ist es möglich, das Nukleoid von *P. testosteronei* in drei verschiedene Formen darzustellen, die sich ähnlich wie die aus *E. coli* isolierbaren, chromosomalen Strukturen verhalten^{5,6}. Nach Methode I lysierte *P. testosteronei* ergeben im 5–25% (w/v) Saccharose-Gradienten schnell sedimentierende, proteinreiche, membrangebundene DNA-Protein-Komplexe mit kompakt (Komplex a) und expandiert (Komplex b) angeordneter DNA. Bei Anwendung von Methode II hingegen resultieren kompakte, membranfreie und somit proteinarme chromosomale Strukturen (Komplex c)⁵.

Die kompakte, chromosomale DNA-Anordnung der isolierten Strukturen bleibt auch bei längerer Inkubation bei 30 °C und erniedrigter NaCl-Konzentration von 80 mM erhalten^{5,7}. Bei diesen Bedingungen ist die endogene, an den Komplexen assoziierte RNA-Polymerase aktiv und vermag *in vitro* RNA zu synthetisieren⁷. Diese RNA-Synthese ist abhängig von der Menge an DNA-Protein-Komplexen

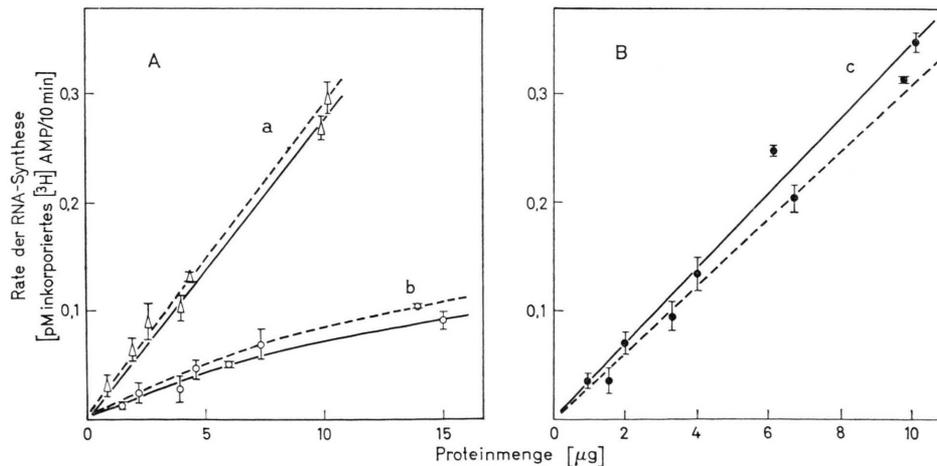


Abb. 1. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Proteinmenge. *P. testosteronei* werden in Hefemedium bzw. in Hefemedium mit 200 µg/ml Testosteron³ kultiviert. Aus logarithmisch wachsenden Bakterien werden nach Methode I (A) die membrangebundenen DNA-Protein-Komplexe mit kompakter (a, —△—△—) bzw. expandierter DNA (b, —○—○—) sowie nach Methode II (B) die membranfreien Strukturen (c, —●—●—) isoliert⁵. Im RNA-Polymerase-Test wird der Einbau an [³H]-AMP in TCA-präzipitierbare Nukleinsäure der chromosomalen Komplexe Testosteron-induzierter (---) und nicht induzierter (—) *P. testosteronei* in Abhängigkeit von der Anzahl an Komplexen (ausgedrückt durch Proteinmenge) gemessen. Die nach Methode I isolierten Komplexe besitzen 0,25 µg DNA/µg Protein, nach Methode II isolierten Komplexe 2 µg DNA/µg Protein⁵. Eingezeichnet sind die Standardabweichungen der Mittelwerte.

im Test-System und der Inkubationsdauer und -temperatur. Jeder der drei verschiedenen chromosomalen Komplexe zeigt eine eigene, charakteristische RNA-Syntheserate (Abbn. 1, 2); die kompakten Strukturen (a, c) besitzen hierbei einen wesentlich höheren Einbau von $[^3\text{H}]$ -AMP als der Komplex (b) mit expandierter DNA-Anordnung⁷.

Im Rahmen der Untersuchungen der enzyminduzierenden Wirkung von Testosteron ist von Interesse, ob die chromosomalen DNA-Protein-Komplexe Testosteron-induzierter Zellen eine veränderte endogene RNA-Syntheserate aufweisen. *P. testosteronei* wurde daher parallel mit und ohne Testosteron im Hefemedium³ kultiviert und jeweils die entsprechenden chromosomalen Strukturen isoliert. Die RNA-Syntheserate wurde in Abhängigkeit von der Proteinmenge und der Inkubationsdauer gemessen. Es ist jedoch keine signifikante Differenz zwischen induzierten (Abbn. 1, 2 ---) und nicht induzierten Zellen (Abbn. 1, 2 —) festzustellen.

Wird hingegen die Aktivität der RNA-Polymerase des gesamten Lysates, d. h. vor Abtrennung der chromosomalen Strukturen gemessen, so ist die RNA-Syntheserate im Lysat Testosteron-induzierter Zellen deutlich (ca. 15%) erniedrigt⁸. Diese Beobachtung weist auf einen möglichen Einfluß cytoplasmatischer Faktoren auf die RNA-Synthese des isolierten Nukleoids von *P. testosteronei* hin, die offenbar bei der Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt werden. So ist zu vermuten, daß Testosteron indirekt über einen Regulationsmechanismus die Aktivität der RNA-Polymerase beeinflusst oder am Genom als Regulator fungiert. Bekräftigt wird diese Annahme durch die Feststellung, daß der Induktor Testosteron bzw. sein Intermediat keine Affinität zu den chromosomalen Strukturen besitzt⁸.

Herrn Prof. Dr. A. Wacker möchten wir für sein Interesse an der Durchführung dieser Arbeit danken.

Ein Teil dieser Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Dr 104/4) unterstützt.

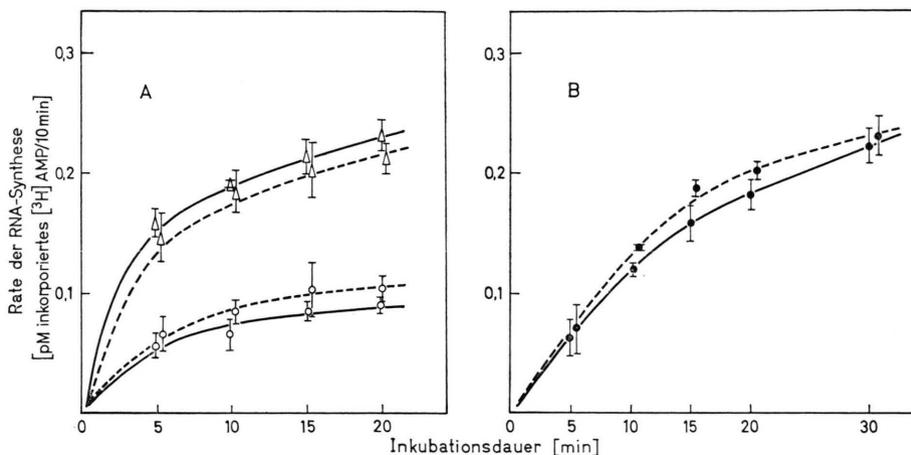


Abb. 2. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. In Hefemedium bzw. in Hefemedium mit 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Testosteron kultivierte *P. testosteronei* werden in der log. Wachstumsphase geerntet und nach Methode I (A) die membrangebundenen DNA-Protein-Komplexe mit kompakter (a, $-\triangle-\triangle-$) bzw. expandierter DNA (b, $-\circ-\circ-$) sowie nach Methode II (B) die membranfreien Strukturen (c, $-\bullet-\bullet-$) isoliert. Im RNA-Polymerase-Test wird der Einbau an $[^3\text{H}]$ -AMP in TCA-präzipitierbare Nukleinsäure isolierter Nukleotide Testosteron-induzierter (---) und nicht induzierter Bakterien (—) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer gemessen. Die RNA-Syntheserate der DNA-Protein-Komplexe ist auf 4 μg Protein je Ansatz berechnet, um die RNA-Polymerase-Aktivitäten vergleichen zu können. Eingezeichnet ist die Standardabweichung der Mittelwerte.

¹ M. Shikita u. P. Talalay, J. Biol. Chem. **242**, 5650 [1969].

² M. Watanabe, K. Philips u. T. Chen, J. Steroid Biochemistry **4**, 613 [1973].

³ A. Wacker, J. Drews, L. Pratt, K. Laurent u. K. Petzold, Z. Naturforsch. **20b**, 547 [1965].

⁴ O. G. Stonington u. D. E. Pettijohn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **68**, 6 [1971].

⁵ G. Reimer u. D. Drahovsky, Z. Naturforsch. **31c**, 91 [1976].

⁶ A. Worcel u. E. Burgi, J. Mol. Biol. **82**, 91 [1974].

⁷ G. Reimer u. D. Drahovsky, Z. Naturforsch. **31c**, 601 [1976].

⁸ G. Reimer u. D. Drahovsky (unveröffentlicht).

⁹ G. Reimer u. D. Drahovsky, Z. Naturforsch. (zur Publikation eingereicht).