

Enzyminduktion mit Steroiden bei *Pseudomonas testosteroni*

ADOLF WACKER, JÜRGEN DREWS*, WILLIAM B. PRATT**, HENRY LAURENT
und KARL PETZOLDT

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt (Main)

(Z. Naturforschg. 20 b, 547—553 [1965]; eingegangen am 24. März 1965)

Steroid initiated enzyme induction (Δ^5 -Ketosteroid-Isomerase, 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, and 3β . 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) in *Pseudomonas testosteroni* was investigated with respect to the kinetics of induction, operon control of the induced enzymes, and the relative strengths of various inducers. The induction process was followed indirectly by selective inhibition of different stages in the protein synthetic pathway. Comparisons between bacterial and mammalian steroid induction are discussed.

Nachdem TALALAY et al.¹ die Bildung adaptiver Enzyme in Gegenwart von Steroiden bei *Pseudomonas testosteroni* beschrieben hatten, bot sich dieser Bakterienstamm neben *Streptomyces hydrogenans*² als geeignetes Modell zum Studium der durch Steroide verursachten Enzyminduktion an. Mit jeweils einem Steroid läßt sich bei *Pseudomonas testosteroni* die Synthese dreier Enzyme induzieren¹, nämlich der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase (KSI), der 3α - und der 3β . 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (α -HSDG; β HSDG).

Es war nun von Interesse, den Vorgang der Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni* näher zu untersuchen, insbesondere die Hemmung der Enzyymbildung in den verschiedenen Phasen der Proteinsynthese.

Methodik

Kultivierung: *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) wurde auf 2-proz. Schrägagar gehalten, der außer den auch im Nährmedium enthaltenen Salzen 2,5 mg fein suspendiertes Testosteron pro ml enthielt. Zu Versuchszwecken wurden die Zellen bei 30 °C in 50 ml Kulturmedium (250 ml Erlenneyer-Kolben) auf einem Schüttelinkubator (Schüttelfrequenz 190/Min.) 12 Stdn. lang vorkultiviert. Mit je 5 ml der ausgewachsenen Vorkulturen wurden dann die 50 ml Versuchsansätze beimpft.

Medien: 1000 ml Kulturmedium enthielten [g]: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,0, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,0, KH_2PO_4 2,0 und 10 ml einer Lösung von Spurenelementen folgender Zusammensetzung [g]: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20,0, NaCl 1,0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{MnSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,5, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,05, 0,1-n. H_2SO_4 10 ml, in 1 l H_2O .

Zur Bereitung von Hefemedium wurde zu dieser Salzlösung Bacto-Yeast Extract 10 g/l (Difco Lab.) gegeben. Das für die Versuche mit Hemmstoffen überwiegend verwendete Glucosemedium enthielt an Stelle des Hefeextraktes in 1000 ml H_2O 8,0 g Glucose, 5,0 g Bacto-Casamino-Acids (Difco Lab.) und 50 ml einer wie folgt zusammengesetzten Vitaminlösung [mg-%]: Thiamin 0,4, Nikotinsäure 1,2, Pyridoxin 2,4, Ca-Panthotenat 0,8, Biotin 0,8. Bei den Versuchen mit Aminosäureantagonisten enthielt das Kulturmedium an Stelle des Caseinhydrolysats ein Aminosäuregemisch (Lysin, Histidin, Arginin, Asparagin, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin, Methionin, Phenylalanin, Isoleucin, Alanin, Valin, Tyrosin (0,25 $\mu\text{Mol/ml}$)).

Steroide und Antibiotika: Die Steroide wurden in 0,5 ml Methanol gelöst zum Kulturmedium gegeben. Bei einem Versuch enthielten alle Gefäße, auch die nicht induzierten Kontrollen, die gleiche Menge Methanol. Mitomycin (Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Japan) Actinomycin D identisch mit Actinomycin C₁ (Farbenfabriken Bayer) Puromycin [Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland (USA)].

Bakterienwachstum: Das Wachstum der Bakterien wurde im lichtelektrischen Kolorimeter Modell J nach Dr. B. LANGE gemessen. Wir korrigierten sämtliche Enzymaktivitäten auf die Bakteriendichte und definierten sie als Einheiten/ml Bakteriensuspension (Einh./ml B. S.).

Zellaufschluß: Zur Freilegung der Enzyme wurden die Zellen aus 30 ml Bakteriensuspension bei 15 000 Upm in der Kühlzentrifuge (0–5 °C) abzentrifugiert, mit 10 ml n/15-Phosphatpuffer pH 7 gewaschen und bei gleicher Umdrehungszahl und Temperatur wieder abgeschleudert. Nach sorgfältiger Entfernung der Waschflüssigkeit wurden die Bakterienrückstände mit 30 ml Aceton von –40 °C übergossen, bis zum Auftauen der Masse etwa 5 Min. stehengelassen, aufgerührt und wieder abzentrifugiert. Nach restloser Entfernung des Acetons wurde das Zellmaterial mit 10 ml

* Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** National Science Foundation Postdoctoral Fellow.

¹ P. TALALAY, *Physiol. Rev.* **37**, 362 [1957].

² G. NESEMANN, H. J. HÜBENER, R. JUNK u. J. SCHMIDT-THOMÉ, *Biochem. Z.* **333**, 88 [1960].

n/15-Phosphatpuffer quantitativ in einen Erlenmeyer-Kolben überspült und 1 Stde. lang bei 30 °C auf der Schüttelmaschine bewegt. Danach wurde diese Suspension wieder 10 Min. bei 0 °C und 15 000 U_{pm} zentrifugiert. Aus dem Überstand (Originalenzymlösung) wurde die Enzymaktivität bestimmt.

Messungen der Enzymaktivität: Die Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase wurde nach der Methode von KAWAHARA³ et al. bestimmt. Δ^5 -Androsten-3.17-dion wurde nach SCHMIDT-THOMÉ und BUTENANDT⁴ hergestellt und durch umkristallisieren in Methanol gereinigt. Als eine Enzymeinheit wurde die Menge Enzym definiert, die pro Min. 1 μ Mol Δ^4 -Androstendion ($\epsilon = 16\ 300$) aus der isomeren Δ^5 -Verbindung bildet. Die Zahl der Enzymeinheiten ergibt sich aus der Gleichung: Einh./ml B. S. =

$$\frac{\text{ml Orig.-Enzymlg.} \cdot \text{Verd. Faktor} \cdot 0,184 \cdot \Delta \log_{10} \frac{I_0}{I}}{T} / \text{Min. (248 m}\mu\text{)}$$

ml aufgearbeitete Bakteriensuspension

Die beiden Hydroxysteroid-Dehydrogenasen wurden nach den Angaben von MARCUS und TALALAY⁵ gemessen. Als Substrat diente für die 3α -HSDG Androsten-3 α -ol-17-on, für die Messung der β -HSDG Testosteron. Jeder Meßansatz enthielt: 2,75 ml 0,1-m. Phosphatpuffer ($p_{\text{H}} = 9$); 0,5 μ Mol DPN(*) in 0,1 ml H₂O; 15 μ g Steroid in 0,05 ml Methanol; 0,1 ml Originalenzymlösung für die Messung der α - und 0,2 ml Originalenzymlösung für die Bestimmung der β -HSDH. Die Reaktion wurde durch Zusatz des Substrats gestartet. Zur Berechnung der Enzymeinheiten diente die Extinktionsänderung zwischen der 30. und der 90. Sekunde.

Radioaktivität: Testosteron-[7-³H] spez. Akt. 2,5 mC/mM. Die Radioaktivität wurde nach Suspension der Bakterien in 1 ml Wasser und Zusatz von 10 ml Dioxan-haltigem Scintillator durch Scintillationspektrometrie im Packard Modell 314 EX gemessen.

Ergebnisse

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß eine Induktion zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase (2–2,5 Stdn. nach Beimpfen) den steilsten Anstieg der Enzymaktivität und die beste Ausbeute an Enzym lieferte, wurde diese Methodik, bei der das Maximum der Enzymaktivitäten 4–5 Stdn. nach der Induktion bzw. 2 Stdn. nach Abschluß der logarithmischen Phase auftritt, für die weiteren Versuche beibehalten.

Die zeitlichen Beziehungen zwischen Bakterienwachstum, Induktion und dem Auftreten von Enzymaktivitäten sind in Abb. 1 dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, daß eine Vermehrung der

Enzymaktivität etwa 90 Min. nach der Induktion nachweisbar wird.

Die höchsten Wachstumswerte und Enzymaktivitäten wurden im Hefemedium erhalten. Dort lagen die Aktivitätswerte für die KSI 4 Stdn. nach der Induktion mit Testosteron zwischen 15 und 20 Einheiten/ml Bakteriensuspension. Obwohl die entsprechenden Werte im Glucosemedium nur 3–4,5 Einheiten/ml B.S. betragen, blieb das für unsere Untersuchungen wichtige Verhältnis zwischen konstitutiver Enzymmenge und der nach Induktion gemessenen Enzymaktivität in beiden Medien gleich.

Die stärksten Induktoren für *Pseudomonas testosteronei* sind Testosteron und Δ^4 -Androsten-3.17-dion. Die induzierenden Eigenschaften von Reichstein S (11-Desoxycortison) und Δ^4 -Androsten-3.17-dion verringern sich bei Substitution eines Sauerstoffmoleküls am C-Atom 11. Cortison induziert nur wenig, auch Androsten-3.11.17-trion ist ein sehr schwacher Induktor (Tab. 1).

Induktor	Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase (Einh./ml B.S.)
Testosteron	20
Δ^4 -Androsten-3.17-dion	20
1-Methyl- Δ^1 -Androsten-17 β -ol-3-on	15
17 α -Methyltestosteron	15
Androsten-3 β -ol-17-on	13
Reichstein S	12
17 α -Hydroxyprogesteron	12
Androsten-3.11.17-trion	5
Oestradiol	1,5
Cortison	1

Tab. 1. Relative Induktor-Wirkung verschiedener Steroide bei *Pseudomonas testosteronei*. Hefemedium; Konzentration der Steroide = 200 μ g/ml Medium. Die Werte sind bezogen auf die konstitutive Enzymmenge = 1.

Testosteron-Konzentration [μ g/ml Medium]	Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase [Einh./ml B.S.]	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase [Einh./ml B.S.]
0	0,81	14
2	0,72	16
5	1,20	32
10	2,70	36
20	7,50	44

Tab. 2. Beziehungen zwischen Testosteron-Konzentration im Medium und induzierter Menge Enzym. Hefemedium.

³ F. S. KAWAHARA, S. F. WANG u. P. TALALAY, J. biol. Chemistry **237**, 1500 [1962].

⁴ J. SCHMIDT-THOMÉ u. A. BUTENANDT, Chem. Ber. **69**, 882 [1963].

⁵ P. I. MARCUS u. P. TALALAY, J. biol. Chemistry **218**, 661 [1956].

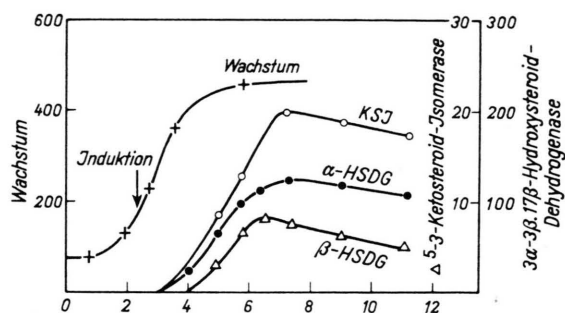


Abb. 1. Zeitlicher Ablauf von Wachstum und Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni*. Die Bakterien wurden in 55 ml Hefemedium kultiviert und 2 1/2 Stdn. nach der Überimpfung mit Testosteron (200 µg/ml Medium) induziert. Ordinate: Wachstum. Ablesung an der Extinktionsskala des lichtelektrischen Kolorimeters nach Dr. B. Lange. Skalenteile · 1000. KSI, α- und β-HSDG in Einheiten pro ml Bakterien suspension. Abszisse: Zeit in Stunden.

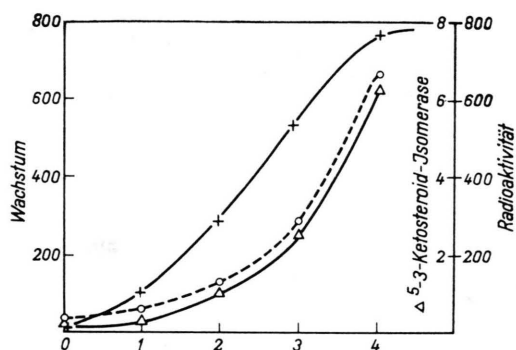


Abb. 2. Verhältnis zwischen Wachstum, induzierter Menge Enzym und Aufnahme von Testosteron-[³H] bei *Pseudomonas testosteroni* in Hefemedium. Zugabe von Testosteron-[³H] (Induktion) zur Zeit 0. Zeichenerklärung: Ordinate: Wachstum s. Abb. 1; Δ⁵-3-Ketosteroid-Isomerase-Einheiten pro ml Bakterien suspension; Radioaktivität Ipm pro ml Bakterien suspension. Abszisse: Zeit in Stunden.

Wie aus Tab. 2 und Abb. 2 deutlich hervorgeht, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des Induktors und der Menge induziertem Enzym. Wie die Versuche mit dem radioaktiv markierten Testosteron ergaben, wird nur ein Bruchteil der in dem Medium vorhandenen Menge Testosteron von den Zellen aufgenommen. Der größere Teil des in den Zellen vorliegenden Testosterons dürfte unspezifisch gebunden sein und mit einer spezifisch gebundenen Fraktion im Gleichgewicht stehen.

Das Verhältnis der Enzymaktivitäten zwischen KSI, α-HSDG und β-HSDG bleibt unter dem Einfluß dreier verschieden starker Induktoren konstant, wie aus Tab. 3 hervorgeht. Die nicht ganz gleich-

Induktor	Δ ⁵ -3-Ketosteroid-Isomerase	3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase	3β,17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
Testosteron	100	38	13,5
Δ ⁴ -Androsten-3,17-dion	100	37	15,5
Reichstein S	100	39	8,0

Tab. 3. Verhältnis der Enzymaktivitäten bei *Pseudomonas testosteroni* bei Induktion mit verschiedenen Steroiden bezogen auf Δ⁵-3-Ketosteroid-Isomerase. Zahlenwerte (Durchschnittswerte aus 6 Versuchen): Die Isomerase-Einheiten wurden mit 50 multipliziert und = 100% gesetzt. Die Dehydrogenase-Einheiten sind als Prozent der Isomerasewerte wiedergegeben.

mäßige Ausbeute an β-HSDG ist methodisch bedingt, da der Zellaufschluß mit kaltem Aceton zur Extraktion dieses Enzyms weniger gut geeignet ist.

Wachstum und Enzyminduktion lassen sich, wie Tab. 4 zeigt, durch bestimmte Purin- und Pyrimidin-

Hemmstoff [µg/ml Medium]	Wachstum [%]	Δ ⁵ -3-Ketosteroid-Isomerase [Einheiten in %]
+ Testosteron	100	100
- Hemmstoff		
- Testosteron	100	4,9
- Hemmstoff		
+ Testosteron		
+ 5-Fluoruracil		
10	42	4,7
20	43	4,9
40	37	5,4
60	37	4,5
+ Testosteron		
+ 6-Azauracil		
10	94	89
50	83	88
+ Testosteron		
+ 6-Mercaptopurin		
25	98	96
50	96	83

Tab. 4. Wirkung von pyrimidin- und purinanalogen Verbindungen auf das Bakterienwachstum und die Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni*. Testosteron (100 µg/ml Medium) und der Hemmstoff wurden zu Beginn des log. Wachstums zur Bakterienkultur gegeben. Glucose-Medium + Bactocasin-Acids (Difco Lab.).

analoge in niedrigen Konzentrationen hemmen. Besonders stark wirkt 5-Fluoruracil. 5-Jod- und 5-Bromuracil sind interessanterweise unwirksam. Eine geringe Hemmung von Wachstum und Induktion der KSI läßt sich durch 50 µg/ml 6-Azauracil erzielen. 6-Mercaptopurin zeigt in einer Konzentra-

tion von 50 $\mu\text{g/ml}$ eine geringe hemmende Wirkung auf die Enzyminduktion, ohne das Wachstum zu beeinflussen. 8-Azaguanin ist ohne Einfluß auf Wachstum und Enzyminduktion. Merkwürdigerweise hemmen 5-Fluordesoxyuridin und 6-Azauridin weder das Bakterienwachstum noch die Enzyminduktion. Mit Ausnahme von 6-Azauracil ist in allen Fällen, in denen purin- oder pyrimidinanaloge Verbindungen hemmend wirken, die Enzyymbildung stärker betroffen als das Wachstum.

Mitomycin, Actinomycin D und Puromycin hemmen sowohl das Wachstum als auch die Enzyminduktion. Dabei ist, wie Tab. 5 zeigt, die Enzyminduktion wesentlich stärker betroffen als das Wachstum. Penicillin weicht von diesem Verhalten ab; bei geringer Wachstumshemmung bewirkt diese Substanz sogar eine Steigerung der Enzyminduktion gegenüber den Kontrollwerten. Selbst für die hohe Konzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ ergibt sich, wenn man die Enzymproduktion auf die stark erniedrigten Wachstumswerte bezieht, noch ein relative Zunahme der Induktion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase.

Schließlich kann, wie aus Tab. 6 hervorgeht, die Enzymaktivität auch durch aminosäureanaloge Verbindungen gehemmt werden. Von der Wirkung des *p*-Fluorphenylalanins sind sowohl die KSI als auch die α -HSDG betroffen, und zwar in ungleich stärkerem Maße als das Wachstum. Das gleichzeitige An-

Antibiotikum [$\mu\text{g/ml}$ Medium]	Wachstum in % [Kontrolle = 100]	Δ^5 -3-Ketosteroid- Isomerase Induktion in %
+ Testosteron	100	100
- Hemmstoff		
- Testosteron	100	6,3
- Hemmstoff		
+ Testosteron		
+ Mitomycin		
30	61	4,5
50	58	3,6
60	58	2,8
+ Testosteron		
+ Actinomycin D		
5	99	78
10	85	46
20	80	32
40	76	12
+ Testosteron		
+ Puromycin		
50	76	32
100	50	0,2
+ Testosteron		
+ Penicillin G		
250	86	111
500	72	108
1000	64	86

Tab. 5. Wirkung einiger Antibiotika auf Enzyminduktion und Wachstum von *Pseudomonas testosteronei* nach 7 Std. Bebrütung. Testosteron (100 $\mu\text{g/ml}$ Medium) und Antibiotikum wurden zu Beginn des log. Wachstums zur Bakterienkultur gegeben. Glucose-Medium + Bacto-Casamino Acids (Difco Lab.).

Antimetabolit [100 $\mu\text{g/ml}$ Medium]	Metabolit [100 $\mu\text{g/ml}$ Medium]	Wachstum [%]	Δ^5 -3-Ketosteroid- Isomerase [Einheiten in %]	α -Hydroxysteroid- Dehydrogenase [Einheiten in %]
+ Testosteron				
- Antimetabolit	- Metabolit	100	100	100
+ Testosteron				
+ <i>p</i> -Fluorphenyl- alanin (F \varnothing -ala)	- Phenylalanin (\varnothing -ala)	87	2	0
+ F \varnothing -ala	+ \varnothing -ala gleichzeitig mit F \varnothing -ala	125	120	100
+ F \varnothing -ala	+ \varnothing -ala 1 Stde. später	100	80	79
+ F \varnothing -ala	+ \varnothing -ala 2 Stdn. später	80	38	53
+ F \varnothing -ala	+ \varnothing -ala 3 Stdn. später	72	8	0
+ Testosteron				
+ Äthionin	- Methionin	92	6	—
+ Äthionin	+ Methionin gleichzeitig mit Äthionin	95	153	—
+ Äthionin	+ Methionin 1 Stde. später	96	101	—
+ Äthionin	+ Methionin 2 Stdn. später	94	82	—
+ Äthionin	+ Methionin 3 Stdn. später	90	55	—
+ Äthionin	+ Methionin 4 Stdn. später	86	57	—

Tab. 6. Wirkung von *p*-Fluorphenylalanin-Phenylalanin und Äthionin-Methionin auf Wachstum und induzierte Enzymaktivität von *Pseudomonas testosteronei* in Abhängigkeit von der zeitlichen Zugabe. Testosteron (100 $\mu\text{g/ml}$ Medium) wurden zu Beginn des log. Wachstums zusammen mit dem Antimetaboliten bzw. Metaboliten in das Kulturmedium gegeben. Glucose-Medium + Aminosäuremischung ohne Phenylalanin bzw. Methionin. Zeitdauer der Bebrütung 2 Stunden.

gebot von Phenylalanin vermag die Hemmung voll aufzuheben. Je später nach Zugabe des Hemmstoffes die natürliche Aminosäure angeboten wird, desto geringer ist ihr Effekt. Wie aus Tab. 6 weiter hervorgeht, ergeben sich für Äthionin und Methionin die gleichen Befunde.

Diskussion

Viele der mitgeteilten Ergebnisse können auf Mechanismen zurückgeführt werden, die auf Grund der Überlegungen von JACOB und MONOD⁶ für den Ablauf der Enzyminduktion bei Mikroorganismen gelten. Ein unter verschiedenen Bedingungen konstantes Verhältnis der gemessenen Enzymaktivitäten zueinander – wie es in unserem Falle für die KSI, die α -HSDG und die β -HSDG unter dem Einfluß dreier verschiedener Induktoren gefunden wurde – spricht in Übereinstimmung mit den Vorstellungen über eine „koordinierte Induktion“⁷ für eine gemeinsame Regulation dieser Enzyme durch das Operatorgen. Diese Deutung trägt auch der Tatsache Rechnung, daß *Pseudomonas testosteroni* bestimmte Steroide zu CO₂ und Wasser abbauen kann, also über eine größere Gruppe steroidumwandelnder Enzyme verfügen muß¹, zu welcher die von uns gemessenen Enzyme gerechnet werden können.

Was das Studium der Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni* unter dem Aspekt des Wirkungsmechanismus der Steroide besonders anziehend macht, ist der Umstand, daß die Kinetik des Induktionsvorganges bei diesem Mikroorganismus dem zeitlichen Ablauf der RNS- und Proteinsynthese in tierischen Geweben unter dem Einfluß von Steroidhormonen durchaus entspricht. Wie Abb. 1 zeigt, erreicht die Enzymaktivität in unserem System 4 Stdn. nach der Induktion ihr Maximum. Die Verabreichung von β -Oestradiol mit gleichzeitiger intraperitonealer Gabe von Glycin-[2-¹⁴C] führt, wie HAMILTON⁸ am Rattenuterus beobachtete, ebenfalls innerhalb 4 Stdn. zur maximalen Anhäufung von Aktivität im Protein dieses Organs. Wurde mit dem Steroidhormon Uridin-[2-¹⁴C] verabreicht, so kam es – gegenüber nicht mit β -Oestradiol behandelten Kontrolltieren – zu einem raschen, linearen Anstieg der Radioaktivität in der RNS, der bereits nach 3 Stdn. sein Maximum erreicht hatte⁹.

⁶ F. JACOB u. J. MONOD, J. molecular Biol. 3, 318 [1961].

⁷ B. N. AMES u. R. C. MARTIN, Ann. Rev. Biochem 33, 235 [1964].

⁸ T. HAMILTON, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 373 [1963].

⁹ T. HAMILTON, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 83 [1964].

¹⁰ CH. HEIDELBERGER, in: Biological Approaches to Cancer Chemotherapy, S. 47, London und New York 1961.

Weitere Übereinstimmungen zwischen steroid-induzierter Proteinsynthese in bisher untersuchten tierischen Systemen und bei Bakterien betreffen die Hemmbarkeit der Eiweißneubildung auf ihren verschiedenen Stufen.

Das von HEIDELBERGER¹⁰ untersuchte 5-Fluoruracil verhindert die Einführung eines aktiven Formiatrestes in Uracildesoxyribosid-5-phosphat durch die Thymidilatsynthetase. Es liegt nahe anzunehmen, daß die starke Hemmung der Enzyminduktion durch diese Substanz ihre Hauptursache in der starken Wachstumshemmung hat.

Ebenfalls als Folge der Wachstumshemmung möchten wir die Beeinflussung der Enzyminduktion durch Mitomycin auffassen, welches die Replikation der DNS-Stränge verhindert¹¹. Die Unterdrückung der DNS-abhängigen RNS-Synthese durch Actinomycin D¹² sollte neben einer allgemeinen Wirkung auf die Eiweißneubildung, die sich auch in einer Verminderung des Wachstums ausdrückt, den Teil der m-RNS-abhängigen Proteinsynthese besonders betreffen, der unter den gegebenen Bedingungen bevorzugt abläuft, also die Neubildung induzierter Enzyme. Tab. 5 bestätigt diese Überlegung.

Die Untersuchungen von YARMOLINSKY und DE LA HABA¹³ führten zu der Ansicht, daß Puromycin die Proteinsynthese auf Grund seiner strukturellen Verwandtschaft mit einem Teil der Transfer-RNS hemmt. NATHANS¹⁴ konnte schließlich nachweisen, daß Puromycin durch seinen Einbau in das Polypeptid die Verlängerung der Peptidkette verhindert. Auch hier handelt es sich also um die spezifische Hemmung eines Schrittes der Proteinsynthese. Wenn Enzyminduktion gesteigerte und spezifische Proteinsynthese bedeutet, dann müßte sie durch Puromycin ebenfalls stärker beeinträchtigt werden als das Wachstum. Das ist, wie aus Tab. 5 hervorgeht, tatsächlich der Fall. Die Beobachtung, daß Penicillin das Wachstum von *Pseudomonas testosteroni* viel stärker hemmt als die Enzyminduktion, daß sogar bei geringer Wachstumshemmung noch eine Steigerung der Enzyminduktion resultiert, könnte mit einer durch dieses Antibiotikum bedingten Verände-

¹¹ V. N. IYER u. W. SZYBALSKI, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 355 [1963].

¹² E. REICH, R. M. FRANKLIN, A. J. SHATKIN u. E. L. TATUM, Science [Washington] 134, 556 [1961].

¹³ M. B. YARMOLINSKY u. G. L. DE LA HABA, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1721 [1959].

¹⁴ D. NATHANS, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 585 [1964].

zung der Permeabilität der Zellmembran¹⁵ und einer hierdurch ermöglichten Steigerung der Aufnahme von Steroidmolekülen in die Zelle zusammenhängt.

Daß die Aminosäureanaloga *p*-Fluorphenylalanin und Äthionin die Aktivität der KSI und α -HSDG in unterschiedlichem Maße beeinflussen und daß die hemmende Wirkung dieser Antimetaboliten durch die entsprechenden Metaboliten nur während des Zeitraumes aufgehoben werden kann, welcher der Latenz von der Induktion bis zum Auftreten von Enzym entspricht, möchten wir als Hinweis dafür werten, daß die falschen Aminosäuren in die induktiv gebildeten Enzyme eingebaut werden und durch ihre Anwesenheit im Enzymmolekül dessen biologische Aktivität herabsetzen. Auch hier wird eine induzierte Proteinsynthese stärker vom Hemmeffekt betroffen sein als die normale Eiweißbildung.

Aus den beschriebenen Hemmversuchen können wir schließen, daß es sich bei der durch Steroide ausgelösten Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni* tatsächlich um die Neusynthese von Eiweiß handelt und nicht um eine Änderung der Substratspezifität von schon in der Zelle vorhandenen Enzymen, wie sie für die Steroidaktivierung der Alanin-oxydation durch Untereinheiten kristalliner Glutamatdehydrogenase mitgeteilt wurde¹⁶.

Die Vorstellung, daß Steroidhormone ihre spezifischen Wirkungen auf dem Wege über die Synthese bestimmter Enzyme herbeiführen, hat durch die Arbeiten zahlreicher Forschergruppen in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.

Die wichtigsten Indizien, die sich im Hinblick auf einen derartigen Wirkungsmechanismus der Steroidhormone nennen lassen, sind:

- a) Der Nachweis einer vermehrten Bildung von kurzzeitig markierter RNS nach Applikation des Induktors^{17, 18}.
- b) Eine Erhöhung der Einbaurate markierter Aminosäuren in vivo unter dem Einfluß von Sexualhormonen¹⁹.
- c) Die stimulierende Wirkung „hormonell“ beein-

flußter Ribosomenfraktionen auf die zellfreie Proteinsynthese, welche mit der Anwesenheit von spezifischer m-RNS und der Formation aktiver Polysomen in Verbindung gebracht werden kann²⁰.

- d) Die Verminderung des Einflusses von Poly-Uridilsäure auf den Einbau von Phenylalanin in zellfreien Systemen, deren Komponenten aus hormonbehandelten Tieren²¹ bzw. Bakterien* gewonnen wurden.
- e) Die Hemmbarkeit definierter Hormonwirkungen durch spezifische Hemmstoffe der Proteinsynthese (Actinomycin D, Puromycin⁹).
- f) Die Erzeugung eines spezifischen Hormoneffektes am Rattenuterus durch Ribonucleinsäure, die aus den mit Oestradiol behandelten Uteri kastrierter Ratten gewonnen wurde²².
- g) Die Entdeckung, daß eine makromolekulare Fraktion aus Rattenuteri, die 2 Wochen nach Ovariectomie entnommen wurden, die DNS-abhängige RNS-Polymerase stark hemmt, und daß diese Hemmung durch Vorbehandlung der Tiere mit Oestradiol oder durch Zugabe dieses Steroids in vitro partiell und spezifisch wieder aufgehoben wird²³.
- h) Die Tatsache, daß sich die Induktor-Aktivität verschiedener Steroide bei *Pseudomonas testosteroni* quantitativ in der Depression der DNS-abhängigen m-RNS-Synthese widerspiegelt, die man nach Zugabe einer makromolekularen Fraktion aus *Pseudomonas*, die mit den entsprechenden Steroiden vorinkubiert worden war, beobachtet²⁴.

Die in den letzten beiden Abschnitten erwähnten Ergebnisse, die die Wirkung von Steroiden auf die DNS-abhängige m-RNS-Synthese bei Ratten und *Pseudomonas testosteroni* betreffen, werfen nicht nur Licht auf die steroidinduzierte m-RNS-Synthese, sondern bezeichnen möglicherweise auch die Phase des Induktionsvorganges, in der die Wirkungsspezifität eines Steroids (Androgenität, Oestrogenität, usw.) ihren frühesten Ausdruck findet.

¹⁵ B. D. DAVIS u. D. S. FEINGOLD, in: The Bacteria, IV, 343, ed. by I. C. GUNSALES and R. Y. STANIER, Academic Press, New York 1962.

¹⁶ G. M. TOMKINS, K. L. YIELDING u. J. CURRAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 270 [1961].

¹⁷ L. D. GARREN, R. HOWELL u. G. TOMKINS, J. molecular Biol. 9, 100 [1964].

¹⁸ C. E. SEKERIS u. N. LANG, Life Sci. 3, 169 [1964].

¹⁹ S. M. KALMAN u. P. M. OPSAHL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 49, 614 [1961].

²⁰ J. D. WILSON, Res. Comm. 8, 175 [1962].

²¹ S. LIAO u. H. G. WILLIAMS-ASHMAN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1956 [1962].

* Veröffentlichung in Vorbereitung.

²² S. J. SEGAL, O. W. DAVIDSON u. K. WASLA, 6. Internat. Kongreß für Biochemie, New York 1964.

²³ G. P. TALWAR, S. J. SEGAL, A. EVANS u. O. W. DAVIDSON, Proc. nat. Acad. Sci. USA 52, 1059 [1964].

²⁴ A. WACKER, J. DREWS, W. B. PRATT u. P. CHANDRA, Angew. Chem. 77, 172 [1965].

Während der erste Teil des Induktionsvorganges, die Reaktion des Induktors mit einem spezifischen Rezeptor noch unbekannt ist, konnte der zweite Teil des Weges, den die Enzyminduktion nimmt, der Informationsfluß von der DNS zur RNS und die Realisierung der Information durch die Proteinsynthese an den Ribosomen mit Hilfe spezifisch angreifender Hemmstoffe verfolgt werden. Die Tatsache, daß es sich bei *Pseudomonas testosteroni* um ein relativ einfaches bakterielles System handelt, dessen Kinetik mit den Verhältnissen bei Säugetierzellen ver-

gleichbar ist sowie der Umstand, daß die Induktoren Steroidhormone sind, machen diesen Bakterienstamm zum Studium der initialen Schritte der Enzyminduktion besonders geeignet.

Frau H. FELLER, Fräulein D. PFAHL und Fräulein K. SCHOLL unterstützten uns ausgezeichnet bei den Versuchen. H. L. und K. P. danken der Schering AG für ein Post-Doktor-Stipendium. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemie — danken wir für eine Sachbeihilfe.

Chemische Untersuchungen an Chondroitinschwefelsäure-Protein-Komplexen normaler und sklerotischer Aorten III

A. KLEMER und D. MEMPEL

(Experimentell mitbearbeitet von CH. LAUS)

Organisch-Chemisches Institut der Universität Münster/Westfalen

Herrn Professor Dr. F. MICHEEL zum 65. Geburtstage gewidmet

(Z. Naturforschg. **20 b**, 553—559 [1965]; eingegangen am 24. Februar 1965)

Aus den *wasserunlöslichen* Rückständen menschlicher normaler und sklerotischer Aorten werden auf chromatographischem Wege Chondroitinschwefelsäure-Protein-Komplexe isoliert. Die mit Papain abgebauten Komplexe besitzen ein charakteristisches identisches Aminosäurespektrum. Die Chondroitinschwefelsäuren liefern bei der sauren Hydrolyse neben D-Galaktosamin D-Talosamin. Die Herkunft des letzteren wird diskutiert.

Die sulfathaltigen Mucopolysaccharide des Aorten-Bindegewebes haben für die Erforschung der Arteriosklerose eine besondere Bedeutung, weil die Krankheit durch eine Erhöhung des Sulfatstoffwechsels des Gewebes eingeleitet wird¹. Vergleichende Untersuchungen an den sulfathaltigen Komponenten kranker und gesunder Aorten sind deshalb für die weitere Kenntnis der Arteriosklerose grundlegend.

Bisher sind in menschlichen Aorten die folgenden sulfathaltigen Mucopolysaccharide aufgefunden worden: Chondroitinschwefelsäuren (A, B, C), Heparitinsulfat, Keratinsulfat und Heparin (?). Unsere Untersuchungen befassen sich zunächst mit den Chondroitinschwefelsäuren, die über 50% der in diesem Bereich vorkommenden Mucopolysaccharide ausmachen.

Wie wir früher berichteten², enthält der *wasser-*

lösliche Anteil menschlicher normaler und sklerotischer Aorten Chondroitinschwefelsäure-Protein-Komplexe, (CS-Proteine), die sowohl im Mol.-Gew. als auch in der Zusammensetzung ihrer Protein- und Polysaccharid-Anteile identisch sind. Lediglich in den Mengenverhältnissen ist ein Unterschied festzustellen. Sklerotische Aorten enthalten etwa doppelt soviel dieses CS-Proteins wie die normalen.

Weiteres CS-Protein, zusammen mit anderen Mucopolysacchariden und Fremdeiweiß läßt sich aus den *wasserunlöslichen* Rückständen der Aorten mit CaCl₂-Lösung extrahieren (vgl. ³, vorläufige Mitt.).

Durch Zentrifugieren und Dialysieren wird daraus eine an Mucopolysacchariden angereicherte, nunmehr ebenfalls wasserlösliche Fraktion gewonnen, auf die wir das früher beschriebene Trennungs-

¹ W. H. HAUSS u. G. JUNGE-HÜLSING, Dtsch. med. Wschr. **86**, 763 [1961]; W. H. HAUSS, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 69. Kongreß 1963.

² A. KLEMER u. K. HOMBERG, Liebigs Ann. Chem. **678**, 160 [1964].

³ A. KLEMER, K. HOMBERG u. D. MEMPEL, Z. Naturforschg. **19 b**, 961 [1964].