

Enzym-Aktivität dürfte davon herrühren, daß auch weniger stark denaturierte Moleküle, die noch enzymatische Aktivität besitzen, zur Aggregation befähigt sind. Bei Bestrahlung in Luft tritt eine weitere Reaktion auf, die eine Aggregation der teilweise denaturierten Moleküle verhindert, wodurch in Luft monomere inaktive und aufgefaltete RNase-Moleküle entstehen (Maximum II), während unter anaeroben Bestrahlungsbedingungen die inaktivierte Ribonuclease zum überwiegenden Teil als Aggregate vorliegt. Eine ähnliche Beobachtung wurde von GLEW und HANSEN³⁹ an β -Lactoglobulin gemacht: Beim Bestrahlen unter Stickstoffatmosphäre nimmt die Viskosität der bestrahlten Lösung mit steigender Dosis wesentlich stärker zu als in Sauerstoffatmosphäre, woraus die Autoren schließen, daß unter

anaeroben Versuchsbedingungen Aggregation in stärkerem Maße eintritt als bei Anwesenheit von Sauerstoff.

Unsere Versuche zeigen, daß beim Bestrahlen in wäßriger Lösung die Veränderungen in der Primärstruktur der Ribonuclease einen wesentlich geringeren Beitrag zur Inaktivierung leisten als Veränderungen der Konformation. Darüber hinaus beweisen sie, daß das Aufbrechen von Disulfidbrücken nicht das wesentliche Ereignis bei der Strahleninaktivierung von RNase darstellt, wie das bisher in zahlreichen Publikationen postuliert wurde.

Herrn Professor Dr. K. G. ZIMMER danken wir für sein förderndes Interesse an dieser Arbeit, Herrn Priv.-Doz. Dr. U. HAGEN und Frau U. BÄUERLE für die Ausführung der Mol.-Gew.-Bestimmungen an der Ultrazentrifuge, Fräulein I. LANGNER für die Aufstellung des Fortran-Programms, Fräulein K. BRAUER, Fräulein R. MODEST und Fräulein E. KUSSING für sorgfältige technische Assistenz bei den Experimenten.

³⁹ G. GLEW u. P. I. HANSEN, in: Biological Effects of Ionizing Radiation at the Molecular Level, S. 211. Internat. Atomic Energy Agency, Vienna 1962.

Hemmung der steroidabhängigen Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni* mit Alkaloiden

M. MATUROVÁ *, H. BECKMANN und A. WACKER

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main

(Z. Naturforschg. 22 b, 621—626 [1967]; eingegangen am 16. Dezember 1966)

Induction of the enzyme Δ^5 -3-ketosteroid isomerase in *Pseudomonas testosteroni* was found to be strongly inhibited by reserpine and by the alkaloids of Vinca and Ergot. Morphine, colchicine and papaverine caused weaker inhibition whilst a series of other alkaloids were almost ineffective. Ergot alkaloids were inhibitory towards all steroids tested, androgens, oestrogens and progestagens, and a similar effect was shown with the other inducible enzymes, 3α - and 3β -17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase.

Experiments with cell-free protein synthesis indicate that reserpine inhibits the induction of messenger RNA.

Abkürzungen: FSH, Follikel-stimulierendes Hormon; α -HSDG, 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase; β -HSDG, 3β -17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase; KSI, Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase; LH, interstitiell-zell-stimulierendes Hormon; LTH, luteotropes Hormon; m-RNS, messenger Ribonucleinsäure; RNS, Ribonucleinsäure; Poly U, Polyuridylsäure.

Bei *Pseudomonas testosteroni* kann man mit Steroiden verschiedener Struktur die Synthese dreier Enzyme, nämlich der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase, der 3α - und der 3β -17 β -Hydroxysteroid-Dehydro-

genase, induzieren¹. Im Laufe unserer Untersuchungen zum Mechanismus der Enzyminduktion studierten wir bei diesem Bakterienstamm den Einfluß verschiedener Antimetaboliten und Antibiotika auf die Enzyminduktion². Nachdem einerseits bekannt war, daß die Vinca-Alkaloide und das Colchicin die RNS-Synthese hemmen³, andererseits die Mutterkornalkaloide⁴ und das Reserpin⁵ den Steroidhormonspiegel beim Säugetier in starkem Maße beeinflus-

* Stipendiatin der Alexander v. Humboldt-Stiftung.

¹ P. TALALAY, Physiol. Rev. 37, 362 [1957]; Annu. Rev. Biochem. 34, 347 [1965].

² A. WACKER, J. DREWS, W. B. PRATT, H. LAURENT u. K. PETZOLDT, Z. Naturforschg. 20 b, 547 [1965].

³ W. A. CREASEY u. M. E. MARKIW, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 87, 601 [1964].

⁴ P. F. KRAICER u. M. C. SHELESNYAK, Acta endocrinol. [Copenhagen] 49, 299 [1965].

⁵ R. GAUNT, J. J. CHART u. A. A. RENZI, Ann. Rev. Pharmacol. 3, 109 [1963].

sen, war es von Interesse, die Wirkung verschiedener Alkaloide auf die steroidabhängige Enzyminduktion bei *Pseudomonas testosteroni* näher zu untersuchen.

Material und Methoden

Kultivierung: *Pseudomonas testosteroni* (ATCC 11996) wurde auf Schrägagar gehalten. Zu Versuchszwecken wurde eine Vorkultur in 50 ml Hefemedium² 12–16 Stdn. bei 30 °C bebrütet. Mit dieser Vorkultur wurde im Verhältnis 1:10 das Glucosemedium² beimpft. Bei diesem Beimpfen wurden sowohl die Induktoren als auch die Alkaloide dem Medium zugesetzt. Nach 5 Stdn., nachdem eine optimale Enzyminduktion erreicht war, wurden die Bakterien abzentrifugiert und wie beschrieben, die einzelnen Enzymaktivitäten bestimmt. Das Wachstum der Bakterien wurde im lichtelektrischen Kolorimeter (Modell J nach Dr. B. LANGE) verfolgt.

Alkaloide: Die Mutterkornalkaloide wurden uns freundlicherweise von der Fa. Sandoz AG, Basel, überlassen, die Vinca-Alkaloide von Eli Lilly & Comp., Indianapolis, und das Reserpin von der Fa. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim. Bulbocapnin, Ajmalicin, Yohimbon, Spartein und Conessin stellte uns die Fa. E. Merck AG, Darmstadt, zur Verfügung. Colchicin, Chinin, Papaverin, Narcotin, Codein, Morphin haben wir von Herrn Prof. Fr. ŠANTAVÝ, Olomouc, erhalten.

Bestimmung der Enzymaktivität: 30 ml Bakterienkultur wurden bei 0–4 °C bei 15 000 Upm abzentrifugiert und zweimal mit N/15 Phosphatpuffer pH 7 gewaschen. Die Zellen wurden dann in 3 ml desselben Puffers aufgenommen und 2 Min. lang mit Ultraschall (Branson Sonic Power, Modell Nr. S 75) aufgeschlossen, danach 20 Min. bei 15 000 Upm abzentrifugiert und der zellfreie Überstand zur Bestimmung der KSI verwendet. — In dem Versuch (Tab. 3), in dem die drei Enzyme KSI, α -HSDG und β -HSDG gleichzeitig bestimmt wurden, wurden die Zellen mit Aceton² aufgeschlossen. Die Durchführung der enzymatischen Bestimmungen wurde früher ausführlich beschrieben^{2, 6, 7}.

Zellfreie Proteinsynthese: Die Bakterien wurden in 5-l-Erlenmeyer-Kolben in je 1600 ml Glucosemedium in einem Schüttelapparat bei 30 °C kultiviert. Die Zugabe von Testosteron und Reserpin erfolgte am Anfang der log-Phase. Die Bakterien wurden in der Mitte der log-Phase geerntet und bei 0–4 °C abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit Tris-Puffer pH 7,8 (0,01 M Tris, 0,01 M Magnesiumacetat, 0,01 M Kaliumchlorid, 0,2 M Saccharose, 0,006 M β -Mercapto-

äthanol) wurden die Bakterien mit Glasperlen (ϕ 0,11 bis 0,12 mm) unter Kühlung 2 Min. homogenisiert (Zellhomogenisator, Modell MSK, B. Braun, Melsungen). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und die Ribosomen und die S₁₀₀-Fraktion, wie beschrieben⁸, isoliert. Die t-RNS wurde nach der Methode von ZUBAY et al.⁹ isoliert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach FOLIN und CIOCALTEU¹⁰.

Der Einbau der Aminosäure Phenylalanin erfolgte in Anlehnung an NIRENBERG und MATTHAEI¹¹. Das Reaktionsgemisch enthielt in μ Mol/ml: Tris 100 (pH 7,8), Magnesiumacetat 6, Kaliumchlorid 26, β -Mercaptoäthanol 3,2, Phosphoenolpyruvat 5,0, Pyruvatkinase 20 μ g, ATP 1,0, GTP 0,3, Phenylalanin-³H 0,096 (3,5 μ C/ μ Mol), Aminosäuremischung aus 18 Aminosäuren je 0,1, t-RNS 0,8 mg, Pol U 80 μ g. Die S₁₀₀-Fraktion und die Ribosomen wurden in einer Konzentration (2 mg Protein/ml) der Einbaulösung zugegeben. Die Proben wurden 30 Min. bei 30 °C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach der Methode von MANS und NOVELLI¹². Die Radioaktivität wurde mit einem Tri-carb Scintillation Spectrometer, Modell 314 EX Packard Instrument Co., Inc., in einem Toluol-Scintillator bestimmt.

Ergebnisse

Läßt man *Pseudomonas testosteroni* 5 Stdn. in Gegenwart von Testosteron wachsen und bestimmt anschließend die Menge induzierter Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase, so findet man durchschnittlich einen Anstieg von 0,2 auf 10–15 Einheiten/ml Bakterien-suspension. Gibt man zu der so induzierten Kultur gleichzeitig mit dem Induktor eines der in Tab. 1 aufgeführten Alkaloide in einer Konzentration von 50 μ g/ml, so erhält man ohne wesentliche Beeinflussung des Wachstums eine unterschiedliche Hemmung der Enzyminduktion. Die bestwirksamsten Alkaloide mit einer Hemmwirkung von mehr als 60% sind das Ergocornin und Ergocryptin. Gut wirksam sind die restlichen Alkaloide der Mutterkorn-Gruppe, die Vinca-Alkaloide (Vinblastin und Leurosin) und das Reserpin. Weniger wirksam sind Morphin, Colchicin und das Papaverin, eine mäßige, bzw. innerhalb der Fehlergrenze liegende Hemmwirkung zeigen die restlichen, in der Tab. 1 aufgeführten Alkaloide.

Wie schon TALALAY¹ und auch wir² früher zeigen konnten, besitzen die Steroide eine unterschied-

⁶ F. S. KAWAHARA, S. F. WANG u. P. TALALAY, J. biol. Chemistry **237**, 1500 [1962].

⁷ P. I. MARCUS u. P. TALALAY, J. biol. Chemistry **218**, 661 [1956].

⁸ A. WACKER, P. CHANDRA u. E. HEYL, Arzneimittel-Forsch. **16**, 825 [1966].

⁹ G. J. ZUBAY, J. molecular Biol. **4**, 347 [1962].

¹⁰ C. FOLIN u. V. CIOCALTEU, J. biol. Chemistry **73**, 627 [1927].

¹¹ M. W. NIRENBERG u. J. H. MATTHAEI, Proc. nat. Acad. Sci. USA **47**, 1588 [1961].

¹² R. J. MANS u. G. D. NOVELLI, Biochem. biophysic. Res. Commun. **3**, 540 [1960].

Alkaloid-Gruppe	Alkaloide	Hemmung der Induktion der KSI	
		Mittelwerte [%]	Anzahl der Versuche
Colchicin-Alk.	Colchicin	15–30	3
Chinolin-Alk.	Chinin	< 15	3
Isochinolin-Alk.	Papaverin	15–30	3
	Bulbocapnin	< 15	4
	Narcotin	< 15	4
	Morphin	30–45	3
	Codein	< 15	3
Chinolizidin-Alk.	Sparteïn	< 15	4
Indol-Alk.	Ajmalicin	< 15	4
	Yohimbin	< 15	4
	Reserpin	45–60	7
	Vinblastin	30–40	3
	Leurosin	45–60	3
	Ergobasin	45–60	7
	Ergotamin	45–60	7
	Ergocristin	45–60	7
	Ergocryptin	> 60	7
	Ergocornin	> 60	7
	Conessin	< 15	3

Tab. 1. Hemmung der Induktion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase bei *Pseudomonas testosteroni* durch verschiedene Alkaloide. Konzentration pro ml Medium: Testosteron 100 μ g, Alkaloide 50 μ g.

liche Induktionswirkung. Wir haben deshalb die Hemmwirkung von Ergocornin und Ergocryptin in Anwesenheit verschiedener Induktoren ausgetestet (s. Tab. 2). Dabei ergab sich einmal, daß die beiden Mutterkornalkaloide bei allen getesteten Induktoren

	KSI *
Kontrolle	0,02
Testosteron	15,2
Testosteron + Ergocornin	3,0
Testosteron + Ergocryptin	2,6
Progesteron	16,2
Progesteron + Ergocornin	4,5
Progesteron + Ergocryptin	2,6
Desoxycorticosteron	14,2
Desoxycorticosteron + Ergocornin	2,6
Desoxycorticosteron + Ergocryptin	1,8
Östron	3,8
Östron + Ergocornin	0,6
Östron + Ergocryptin	1,7
Cortison	2,6
Cortison + Ergocornin	1,9
Cortison + Ergocryptin	1,4

Tab. 2. Einfluß von Ergocornin und Ergocryptin auf die Induktion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase bei *Pseudomonas testosteroni* bei Verwendung verschiedener Induktoren. Konzentration pro ml Medium: Steride 100 μ g, Alkaloide 50 μ g. * Einheiten Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase pro ml Bakterien-suspension.

– Testosteron, Progesteron, Desoxycorticosteron, Östron und Cortison – die Induktion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase hemmen, zum anderen in fast allen Experimenten Ergocryptin der bessere Hemmstoff war.

Untersucht man die Hemmung der Enzyminduktion bei verschiedenen Mengen des Induktors Testosteron und bei verschiedenen Konzentrationen des Hemmstoffes Ergocornin, so ergibt sich das in Abb. 1

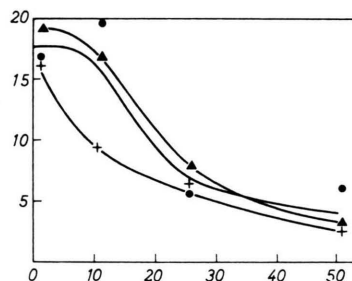


Abb. 1. Einfluß verschiedener Mengen von Ergocornin auf die Induktion der KSI bei *Pseudomonas testosteroni* in Anwesenheit verschiedener Mengen von Testosteron. Ordinate: Einheiten KSI pro ml Bakteriensuspension. Abszisse: μ g Ergocornin pro ml Medium. Konzentration: Testosteron pro ml Medium: + – + 50 μ g, ● – ● 100 μ g, ▲ – ▲ 200 μ g.

dargestellte Bild. Daraus kann man entnehmen, daß eine kompetitive Hemmung der Enzyminduktion nicht vorliegt. Betrachtet man die Werte von 25 μ g und 50 μ g Ergocornin, so findet man innerhalb der Fehlergrenze die gleiche Enzymaktivität. Es sei hier erwähnt, daß man mit dem Antiandrogen Cyproteron (1.2 α -Methylen-6-chlor- Δ^6 -17 α -hydroxyprogesteron) unter den gleichen Bedingungen ein Kurvenbild erhält, das auf eine kompetitive Hemmung deutlich schließen läßt¹³.

Bei *E. coli* K 12 kann man mit einer Reihe von Zuckerderivaten wie z. B. Methylthio- β -D-Galactosid die Synthese von drei Enzymen induzieren. Durch eine Reihe von Transduktionsexperimenten haben JACOB und MONOD¹⁴ gezeigt, daß die Gene dieser drei Enzyme benachbart sind und ihre Steuerung durch ein Repressor-Gen und einen Operator erfolgt. Es ist im Lac-Operon bisher noch nicht gelungen, durch eine Störung im Regulationsmechanismus (Regulator, Operator, Promotor) die Synthese dieser drei Enzyme in unterschiedlicher Weise zu beeinflussen. Es war deshalb für unsere Versuche, nachdem wir die Hemmwirkung der Alkaloide auf die Induk-

¹³ A. WACKER, P. CHANDRA u. H. FELLER, Z. Naturforschg., in Vorbereitung.

¹⁴ F. JACOB u. J. MONOD, Biochem. biophysic. Res. Commun. 18, 693 [1965].

tion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase gefunden hatten, von besonderem Interesse, zu sehen, in welchem Ausmaß die Synthese der beiden übrigen induzierbaren Enzyme durch die Alkaloide beeinflusst wird. In Tab. 3 sind die Ergebnisse niedergelegt, die wir bei der Hemmung der Induktion der Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase, der 3α - und der 3β .17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase mit 10, 50 und 100 μg Reserpin, Ergotamin und Ergocristin gefunden haben. Die Induktion erfolgte in diesem Falle mit Testosteron. Wie die Werte deutlich zeigen, wird die Induktion der drei Enzyme, prozentmäßig gesehen, von den drei Alkaloiden etwa in dem gleichen Ausmaß gehemmt.

	[μg]	KSI		α -HSDG		β -HSDG	
		E/ml*	H** [%]	E/ml	H [%]	E/ml	H [%]
Ohne Testosteron		0,02		0		0	
Mit Testosteron		15,2		310		120	
Mit Testosteron							
+ Reserpin	10	8,0	49	180	42	65	46
+ Reserpin	50	3,7	76	150	52	50	58
+ Ergotamin	10	10,1	36	160	48	40	67
+ Ergotamin	50	1,9	88	80	74	19	84
+ Ergotamin	100	1,9	88	60	81	15	87
+ Ergocristin	10	9,2	41	190	39	45	62
+ Ergocristin	50	8,0	49	50	84	20	73
+ Ergocristin	100	1,9	88	30	98	15	87

Tab. 3. Hemmung der Induktion der drei Enzyme (Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase, 3α - und 3β .17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) bei *Pseudomonas testosteroni* durch verschiedene Alkaloide. Konzentration pro ml Medium: Testosteron 100 μg . * Enzymeinheiten pro ml Bakteriensuspension. ** % Hemmung.

Wie wir kürzlich fanden¹⁵, sind die Ribosomen aus induzierten und nicht induzierten Bakterienzellen von *Pseudomonas testosteroni* in unterschiedlicher Weise für die zellfreie Proteinsynthese geeignet. So bauen z. B. die Ribosomen aus induzierten Zellen, bezogen auf ribosomales Protein, nur etwa zwei Drittel des Phenylalanins mit Hilfe einer synthetischen m-RNS in ein Homopolypeptid ein. Die Erklärung für diesen signifikanten Unterschied ist die, daß die induzierten Ribosomen durch die in der Zelle induzierte m-RNS als Polysomen vorliegen und der synthetischen m-RNS keine Möglichkeit zur vollen Entfaltung ihrer Wirkung bieten. Inkubiert man nämlich die induzierten Ribosomen (Polysomen), so ergibt sich das Bild der freien Ribosomen und damit ein Anstieg in der Proteinsynthese. Wie wir weiter-

¹⁵ A. WACKER, E. HOFFMAN U. H. FELLER, Biochem. Z. **342**, 236 [1965].

hin fanden, wird bei der Hemmung der Testosteron-abhängigen Enzyminduktion mit dem Antiinduktor Cyproteron keine m-RNS gebildet¹³, die Ribosomen aus den mit Testosteron und Cyproteron behandelten Zellen gleichen denen der Kontrolle, oder sind sogar noch besser für die Proteinsynthese geeignet. Es war deshalb von besonderem Interesse, die Wirkung eines als Hemmstoff gut wirksamen Alkaloids auf die zellfreie Proteinsynthese näher zu untersuchen, um aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus ziehen zu können.

Eines der Alkaloide, das für diesen Zweck in ausreichender Menge zur Verfügung stand, war das Reserpin, dessen Hemmwirkung auf die Induktion mit Testosteron in Abhängigkeit von seiner Konzentration in Abb. 2 dargestellt ist. Da bei einer höhe-

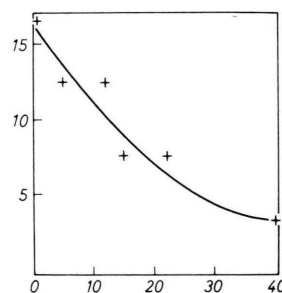


Abb. 2. Hemmung der Induktion der KSI bei *Pseudomonas testosteroni* mit verschiedenen Mengen Reserpin. Ordinate: Einheiten KSI pro ml Bakteriensuspension. Abszisse: μg Reserpin pro ml Medium. Konzentration: Testosteron 100 μg pro ml Medium.

ren Reserpin-Konzentration (größer als 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Medium) auch das Bakterienwachstum zunehmend beeinflusst wird, haben wir bei der Kultivierung der Bakterien für die zellfreie Proteinsynthese eine Hemmstoffkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gewählt.

Bakterien kultiviert	KSI*	Phenylalanin-Einbau [Ipm]
Ohne Testosteron	0,24	2970
Ohne Testosteron + Reserpin	0,21	3168
Mit Testosteron	5,30	2175
Mit Testosteron + Reserpin	4,10	3381

Tab. 4. Einfluß von Reserpin auf die Enzyminduktion und die zellfreie Proteinsynthese bei *Pseudomonas testosteroni*. Konzentration pro ml Medium: Testosteron 100 μg , Reserpin 10 μg . Bei der zellfreien Proteinsynthese wurde Phenylalanin mit Poly U in ein Homopolypeptid eingebaut. Phenylalanin-Einbau ohne Poly U = 30 Ipm. Experimentelle Bedingungen s. Material und Methoden. * Einheiten Δ^5 -3-Ketosteroid-Isomerase pro ml Bakteriensuspension.

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, bauen die Ribosomen aus nicht induzierten Zellen von *Pseudomonas testosteroni* Phenylalanin mit einer Aktivität von 2900 Ipm in ein Polypeptid ein. Die Ribosomen aus induzierten Zellen sind wesentlich weniger aktiv. Hier beträgt die Einbaurate 2100 Ipm. Läßt man die nicht induzierten Zellen in der Anwesenheit von Reserpin wachsen, so zeigen die Ribosomen gegenüber der Kontrolle eine kleine Steigerung der Aktivität von 2900 auf 3100 Ipm. Interessant ist nun, daß die Ribosomen aus mit Testosteron und Reserpin behandelten Zellen, wobei die Enzyminduktion signifikant gehemmt ist, für den Einbau des Phenylalanins die höchste Aktivität besitzen. In dem in der Tabelle niedergelegten Versuch beträgt die Hemmwirkung des Reserpins 22 Prozent. Trotzdem gleicht das ribosomale Bild dem einer nicht induzierten, oder – was das gleiche bedeutet – vollständig gehemmten Kultur.

Diskussion

Die überraschende Tatsache, daß Steroidhormone in einer Bakterienzelle Enzyme induzieren – die im übrigen auch im Säugetierorganismus vorkommen – wird noch verständlich, wenn man weiß, daß *Pseudomonas testosteroni* mit Testosteron als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen vermag. Unter diesen Bedingungen müssen nämlich entweder die für den Abbau des Testosterons notwendigen Enzyme konstitutiv vorhanden sein oder durch Testosteron induziert werden. Vermutlich wird bei *Pseudomonas testosteroni* mit Testosteron nicht nur die Synthese dreier Enzyme induziert, nämlich der KSI, α - und β -HSDG, sondern noch mehrere Enzyme, die für den vollständigen Abbau des Testosterons bis zur Stufe des Kohlenstoffdioxids notwendig sind¹⁶. Tatsächlich verändern die drei durch Testosteron induzierten Enzyme, die KSI, α - und β -HSDG, das Steroidmolekül.

Überraschend und auf den ersten Blick nicht erklärbar ist jedoch der Befund, daß verschiedene Alkaloide die Enzyminduktion bei *Pseudomonas test-*

steroni hemmen (die gleichen Alkaloide beeinflussen die Induktion der β -Galactosidase bei *E. coli* K 12 nicht). Wenn jedoch die Alkaloide hemmend in den Stoffwechsel der Nucleinsäure eingreifen, wie dies z. B. für die Vinca-Alkaloide zutrifft^{3, 17, 18}, die nach CREASEY und MARKIW spezifisch die Synthese der t-RNS hemmen, so wäre es auch möglich, daß sie die Induktion der drei Enzyme verhindern. Daß jedoch eine Reihe von Alkaloiden der Indol-Gruppe, wie die Mutterkornalkaloide und das Reserpin, aber auch Morphin in starkem Ausmaß die induzierende Wirkung aller geprüften Steroide beeinflussen, ist für ein Bakteriensystem neu. Eine Erklärung hierfür bietet sich auf der Grundlage des Bakterienstoffwechsels und der Regulationsvorgänge in einer Bakterienzelle nicht. Wenn man jedoch die Beeinflussung des Sexualhormonspiegels bei männlichen und weiblichen Tieren näher betrachtet, so trifft man auf eine große Zahl von Befunden, aus denen deutlich hervorgeht, daß verschiedene Alkaloide, insbesondere die Mutterkornalkaloide und das Reserpin, den Hormonspiegel verändern. Interessant ist nun, daß die gleichen Alkaloide auch bei *Pseudomonas testosteroni* – und auch bei *Streptomyces hydrogenans*¹⁹ – die Enzyminduktion mit Steroiden hemmen.

Es ist bekannt, daß exogenes Progesteron die Wirkung des Ergocornins auf die reproduktiven Organe²⁰ und auch auf die RNS- und Proteinsynthese²¹ bei einem Versuchstier aufheben kann. Es ist aber nicht gelungen, einen direkten Antagonismus zwischen dem Ergocornin und dem Progesteron nachzuweisen²⁰. In einer anderen Arbeit vermutet SHELESNYAK²², daß durch Ergocornin das im Ovarium vorhandene Progesteron „immobilisiert“ wird, wobei aber die Fähigkeit des Ovariums zur Neusynthese des Progesterons nach Pro-laktin-Applikation weiter besteht. Aus einer Veränderung des Steroidhormonspiegels, der nach Ergocornin-Applikation in der Postovulationsphase bei gesunden Frauen auftritt, schließt z. B. SHELESNYAK²³, daß Ergocornin vermutlich die Isomerase oder β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase blockiert, die für die Umwandlung von Pregnenolon in Progesteron und von Dehydroepiandrosteron in Androsteron notwendig sind. Weiterhin vermutet SHELESNYAK und BARNEA²⁴, daß die Alkaloide

¹⁶ D. A. SHAW, L. F. BORKENHAGEN u. P. TALALAY, Proc. nat. Acad. Sci. USA **54**, 837 [1965].

¹⁷ J. F. RICHARDS, R. G. W. JONES u. C. T. BEER, Cancer Res. **26**, 876 [1966].

¹⁸ R. G. W. JONES, J. F. RICHARDS u. C. T. BEER, Cancer Res. **26**, 882 [1966].

¹⁹ L. TRÄGER u. A. WACKER, Veröffentlichung in Vorbereitung.

²⁰ M. C. SHELESNYAK, Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) **87**, 377 [1954].

²¹ P. VARAVUDHI u. B. L. LOBEL, J. Reprod. Fertil. **10**, 451 [1965].

²² M. C. SHELESNYAK, Acta endocrinol. [Copenhagen] **27**, 99 [1958].

²³ M. C. SHELESNYAK, B. LUNENFELD u. B. HONIG, Life Sci. **2**, 73 [1963].

²⁴ M. C. SHELESNYAK u. A. BARNEA, Acta endocrinol. [Copenhagen] **43**, 469 [1963].

nicht als solche für die Wirkung verantwortlich sind. Die aktive Form könnte entweder ein Abbauprodukt oder ein Komplex mit einer metabolischen Komponente sein. ZEILMAKER und CARLSEN²⁵ schreiben dem Ergocornin eine zentrale Wirkung zu, derart, daß es zu einer Hemmung der LTH-Sekretion in der Adenohypophyse kommt. Aus Versuchen mit der transplantierten Hypophyse schließt SHELELNYAK²⁶, daß Ergocornin direkt auf die Hypophyse und nicht über den Hypothalamus wirkt. Interessant ist auch der Befund, daß Reserpin die Wirkung von Ergocornin bei trächtigen Ratten blockiert.

Die Wirkung des Reserpins auf den Geschlechtshormonspiegel erfolgt ebenfalls über die Hypophyse. KHASAN²⁷ und GRÖNROOS²⁸ beschreiben z. B. eine Hemmung der Gonadotropinabgabe in der Adenohypophyse. Es wäre aber auch denkbar, daß Reserpin im Hypothalamus seine Wirkung entfaltet, indem es sich dort mit einem Prolaktin-inhibierenden Faktor verbindet (RATNER²⁹), wodurch es zu keiner Hemmung der Gonadotropinabgabe in der Hypophyse kommt. Auch Morphin hemmt die Sekretion des LH in der Adenohypophyse³⁰. Die FSH sezernierenden Zellen sind durch Morphin vermehrt³¹.

Von den in der Literatur vorliegenden Ergebnissen haben für unser Bakteriensystem nur diejenigen eine gewisse Bedeutung, die auf eine direkte Wechselwirkung zwischen den Steroiden und Alkaloiden hinweisen und die Befunde, aus denen hervorgeht, daß die Alkaloide die RNS- und Proteinsynthese beeinflussen.

Aus unseren Experimenten ergibt sich einmal, daß bei *Pseudomonas testosteroni* die Alkaloide am wirksamsten sind, die auch beim Säugetier den Steroidhormonspiegel beeinflussen wie die Mutterkornalkaloide und das Reserpin. Weiterhin zeigen die Versuche, daß alle Sexualhormone (s. Tab. 2), die eine induktive Wirkung besitzen, durch die Alkaloide gehemmt werden. Auch dieses stimmt mit den Befunden beim Säugetier und beim Menschen überein. Was nun den Mechanismus der Alkaloidwir-

kung betrifft, so konnten wir, wie aus Abb. 1 hervorgeht, einen kompetitiven Hemmungsmechanismus nicht nachweisen. Die gleichmäßige Hemmung der drei Enzyme und das Bild der zellfreien Proteinsynthese lassen aber darauf schließen, daß die Alkaloide schon zu einem frühen Zeitpunkt in den Mechanismus der Enzyminduktion eingreifen. Das ribosomale Bild des Versuches, in dem die Zellen mit Testosteron und Reserpin gewachsen waren, läßt sich am einfachsten so deuten, daß in Gegenwart von Testosteron und Reserpin die induktive Bildung der m-RNS ausbleibt und somit keine Polysomen gebildet werden. Dies gibt zwar nicht genau das Bild in Tab. 4 wieder, da die Enzymsynthese nur unvollkommen gehemmt ist, dürfte aber im Prinzip dem Sachverhalt am nächsten kommen, wie wir dies in früheren Arbeiten mit einem echten Antiinduktor, nämlich dem Cyproteron, zeigen konnten. Danach müßte also Reserpin mit dem Steroid um den gleichen Akzeptor (Repressor) konkurrieren, oder in irgendeiner anderen Form die Bildung der m-RNS verhindern.

Zusammenfassend ergeben unsere Resultate, daß das Bakteriensystem der steroidabhängigen Enzyminduktion und seine Hemmung durch Alkaloide Parallelen zu Befunden im Säugetier aufweist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, auf relativ einfachem Wege Hemmstoffe und Antiinduktoren der Steroidhormone mit Hilfe von *Pseudomonas testosteroni* nachzuweisen. Inwieweit die dabei erzielten Ergebnisse sich jedoch verallgemeinern lassen, müssen noch weitere Versuche ergeben.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie für eine Sachbeihilfe. H. B. dankt der Schering AG, Berlin, für ein Post-Doktor-Stipendium.

²⁵ G. H. ZEILMAKER u. R. A. CARLSEN, Acta endocrinol. [Copenhagen] **41**, 328 [1962].

²⁶ M. C. SHELESNYAK, Bull. Soc. roy. belge Gynecol. Obstet. **31**, 375 [1961].

²⁷ N. KHAZAN, F. G. SULMA u. H. Z. WINNIK, Proc. Soc. exp. Biol. **105**, 201 [1960].

²⁸ M. GRÖNROOS, E. MÄKINEN, K. LATHINEN u. R. TIRRI, Acta endocrinol. [Copenhagen] **49**, 28 [1965].

²⁹ A. RATNER, P. K. TALWALKER u. J. MEITES, Endocrinol. [Copenhagen] **77**, 315 [1965].

³⁰ CH. A. BARRACLOUGH u. CH. H. SAWYER, Endocrinol. [Copenhagen] **57**, 329 [1955].

³¹ E. G. RENNELS, Texas Rep. Biol. Med. **19**, 646 [1961].