

Chromosomale Struktur von *Pseudomona testosteroni*

IV. Wirkung von Testosteron auf die RNA-Synthese

Chromosomal Structures of *Pseudomonas testosteroni*

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. testosteroni* 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. testosteroni 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.

synthetisiert^{1–3}. Durch die Abhängigkeit der Neusynthese dieser im Genom monocistronisch codierten, koordiniert induzierbaren Enzyme von intakter Translation und Transkription, stellt *P. testosteroni* 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. testosteroni* in drei verschiedene Formen darzustellen, die sich ähnlich wie die aus *E. coli* isolierbaren, chromosomalen Strukturen verhalten^{5,6}. Nach Methode I lysierte *P. testosteroni* 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

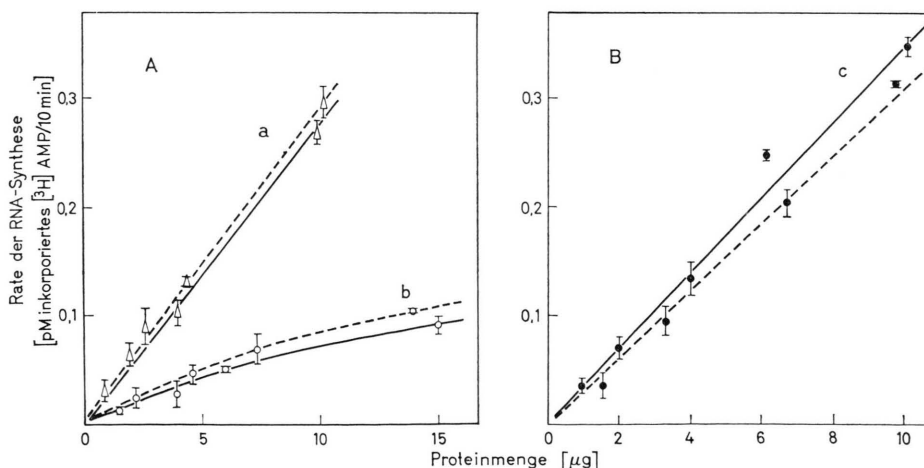


Abb. 1. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Proteinmenge. *P. testosteroni* werden in Hefemedium bzw. in Hefemedium mit 200 μg/ml Testosteron³ kultiviert. Aus logarithmisch wachsenden Bakterien werden nach Methode I (A) die membrangebundenen DNA-Protein-Komplexe 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. testosteroni* 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.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

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.

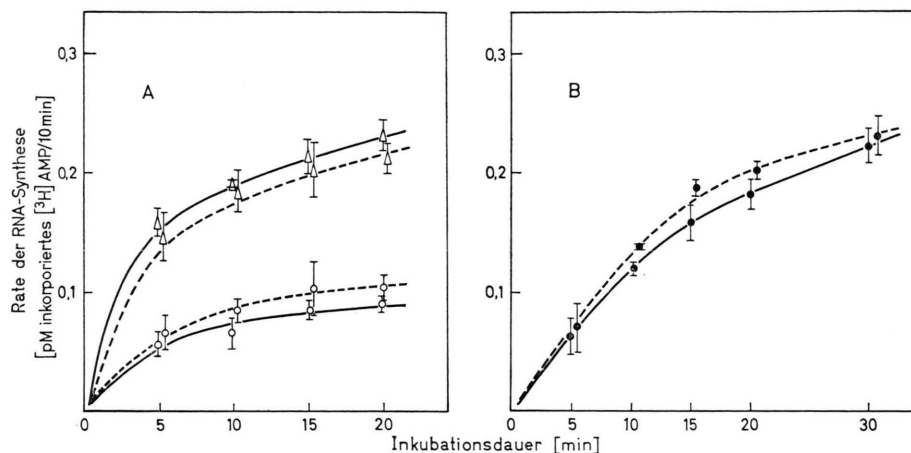


Abb. 2. Endogene RNA-Polymerase-Aktivität chromosomaler Komplexe in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. In Hefemedium bzw. in Hefemedium mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Testosteron kultivierte *P. testosteronei* werden in der log. Wachstumsphase geerntet und nach Methode I (A) die membrangebundenen DNA-Protein-Komplexe 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).