

Aktivitätsmessung der Adenosin 5'-phospho-sulfat-Sulfotransferase und ihre Anwendung bei der Untersuchung der de novo-Synthese des Enzyms

Autor(en): **Brunold, Chr. / Suter, M.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Botanica Helvetica**

Band (Jahr): **93 (1983)**

Heft 1

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-65240>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aktivitätsmessung der Adenosin 5'-phosphosulfat-Sulfotransferase und ihre Anwendung bei der Untersuchung der *de novo*-Synthese des Enzyms*

Chr. Brunold und M. Suter

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern

Manuskript eingegangen am 25. Februar 1983

Abstrakt

Brunold, Chr. and M. Suter, 1983. Method for the measurement of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase and its application for the detection of *de novo*-synthesis of the enzyme. Bot. Helv. 93: 105-114. A method for the measurement of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase is described with which a determination can be performed in about 2 min. This method was used for examining the increase in adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase activity of *Lemna minor* which was observed when these organisms were cultivated with NH_4^+ and NO_3^- instead of NO_3^- as a nitrogen source. ^{15}N -density labelling and subsequent density gradient centrifugation showed that this increase is at least initially due to an increased *de novo*-synthesis.

Einleitung

Die Adenosin 5'-phosphosulfat-Sulfotransferase ist ein Enzym der assimilatorischen Sulfatreduktion in Pflanzen und Algen (Schiff und Fankhauser 1981). Es katalysiert die Übertragung des in Adenosin 5'-phosphosulfat (APS) aktivierten Schwefels auf ein Carrier-Protein (Car-SH) unter Bildung von Car-S-SO₃⁻. Die anschließende Reduktion zu Car-S-SH erfolgt durch organische Thiosulfatreduktase. Der reduzierte Schwefel wird schließlich über O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase (E.C. 4.2.99.8) auf O-Acetyl-L-serin übertragen unter Bildung von Cystein.

Die APS-Sulfotransferase ist spezifisch für den Sulfonyldonor, APS, hingegen kann anstelle des Carrier-Proteins *in vitro* eine ganze Reihe von Mono- und Dithiolen als

* Diese Arbeit erscheint zum 60. Geburtstag von Prof. Dr. K.H. Erismann, Direktor des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Bern

Akzeptor fungieren (Tsang und Schiff 1976). bei der Verwendung von 1,4-Dithioerythritol (DTE) und radioaktivem AP³⁵S läuft folgende Reaktion ab:



Das radioaktive ${}^{35}\text{SO}_3^{2-}$ wird nach Zugabe von Trägersulfit durch Säure aus dem Reaktionsansatz als ${}^{35}\text{SO}_2$ ausgetrieben und in einer Base absorbiert. Die Radioaktivität in der Base stellt ein Maß dar für die Aktivität des Enzyms. Dabei lassen sich nur dann reproduzierbare hohe Aktivitäten erreichen, wenn unter inerter Atmosphäre inkubiert wird.

Eine ganze Reihe von Faktoren können die APS-Sulfotransferase regulieren (Brunold 1981). Besonders interessant scheint die Regulation durch reduzierte N-Verbindungen: Wenn *Lemna minor* anstelle von Nitrat mit Ammonium und Nitrat als Stickstoffquelle kultiviert wird, steigt die extrahierbare Aktivität des Enzyms innerhalb von 24 h um 50 bis 100% an. Feller und Erismann (1971) zeigten, dass *L. minor* bei gleichzeitigem Angebot von Ammonium und Nitrat nur ersteres aufnimmt. Dabei steigt der Proteingehalt im Pflanzenmaterial an (Dicht et al. 1976). Der Anstieg der Aktivität der APS-Sulfotransferase könnte damit folgendermaßen erklärt werden: Wegen erhöhter Proteinsynthese tritt ein vergrößerter Bedarf an Schwefelaminosäuren auf. Dieser wird gedeckt, indem der Durchsatz durch den Reaktionsweg der assimilatorischen Sulfatreduktion erhöht wird, u.a. durch Erhöhung der Aktivität der APS-Sulfotransferase.

Wir zeigen hier mit ${}^{15}\text{N}$ -Dichtemarkierung und anschließender Dichtegradientenzentrifugation, daß der durch NH_4^+ bewirkte Aktivierungsanstieg der APS-Sulfotransferase mindestens am Anfang auf einer erhöhten *de novo*-Synthese des Enzyms beruht. Für die große Zahl der dazu nötigen Bestimmungen der APS-Sulfotransferase-Aktivität wurde die im folgenden beschriebene Methode entwickelt.

Material und Methoden

Lemna minor L. (Stamm-Nr. 6580 der Lemnaceen-Sammlung von Landolt, Landolt 1957) wurde in Kulturgefäßen gezogen, welche eine kontinuierliche Erneuerung der Nährlösung erlauben (Erismann und Brunold 1973). Als Nährlösung wurde E- NO_3 (Erismann und Finger 1968) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C im Dauerlicht (Brunold und Schmidt 1976). Für die Dichtemarkierung wurde $\text{Ca}({}^{14}\text{NO}_3)_2$ ersetzt durch $\text{Ca}({}^{15}\text{NO}_3)_2$ (98,9 Atom% ${}^{15}\text{N}$). Sie dauerte mindestens 8 Verdoppelungszeiten. Bei Beginn der Experimente wurde die Stickstoffquelle gewechselt: $\text{Ca}({}^{14}\text{NO}_3)_2$ trat anstelle von $\text{Ca}({}^{15}\text{NO}_3)_2$. Die behandelte Kulturen erhielten zusätzlich 10 mM ${}^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$.

Herstellung der Extrakte. 200 bis 1000 mg Pflanzenmaterial wurde im eisgekühlten Glashomogenisatoren in 10-fachem Pufferüberschuß (100 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 und 10 mM DTE) homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Miracloth (Calbiochem, Luzern) filtriert und während 10 min bei 32 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Sättigung von 70 % versetzt. Das ausfallende Protein wurde bei 10 000 g und 4 °C während 10 min sedimentiert und in 5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 9,0 mit 2 mM DTE und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 % Sättigung) resuspendiert. Die Proteinsuspension wurde bei -20 °C aufbewahrt. APS-Sulfotransferase und O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase erwiesen sich bei dieser Lagerung als stabil.

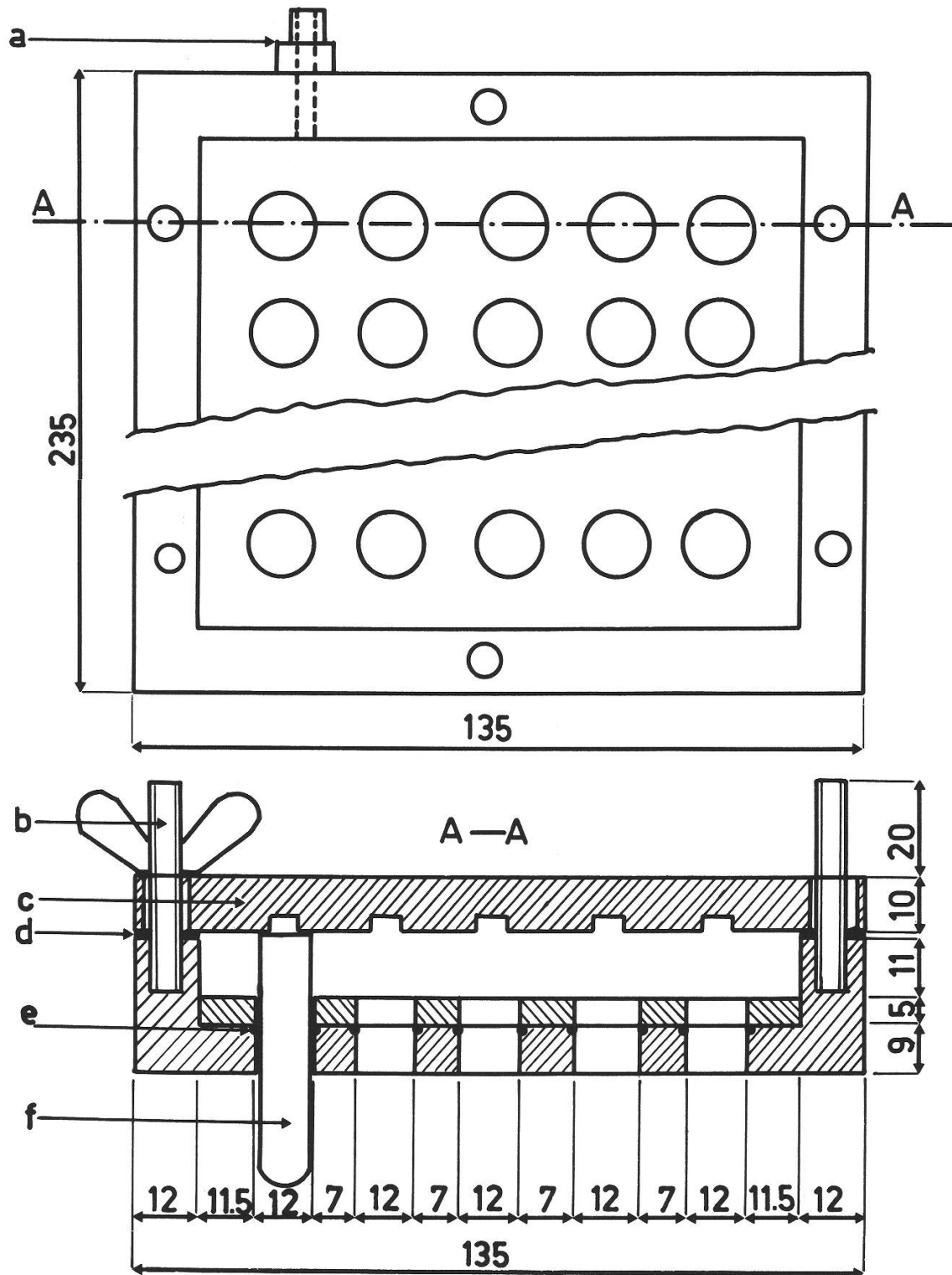


Abb.1: Einrichtung für die gleichzeitige Inkubation von 50 Ansätzen zur Messung der APS-Sulfo-transferase. Die außen gefetteten Polystyroltuben (f) mit den Inkubationsansätzen werden nach Entfernung des Deckels (c) in die Einrichtung aus PVC eingeführt und sind hier durch O-Ringe (e) fixiert. Nach der Befestigung des Deckels mit 8 Flügelmutter (b) läßt sich in der Einrichtung über den Begasungsstutzen (a) durch Evakuieren und Füllen mit Ar eine inerte Atmosphäre aufbauen. Einfräsungen im Deckel gestatten dabei den ungehinderten Zutritt des Ar zu den Ansätzen. Die Dichtigkeit der Einrichtung wird durch ein Gummiband (d) gewährleistet. Während der Inkubation ist die Einrichtung durch einen über den Belüftungsstutzen gestülpten Schlauch mit Schlauchklemme gegen außen abgeschlossen.

Dichtegradientenzentrifugation. Die Proteinsuspension wurde aufgetaut und bei 10000 g und 0 °C während 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde je nach der Menge des verwendeten Pflanzenmaterials in 1 bis 5 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 mit 10 mM DTE gelöst. Ein Aliquot dieser Lösung mit einem Proteingehalt von 1 mg wurde mit Tris-HCl, pH 8,5, welches 10 mM DTE enthielt, auf 4,5 ml ergänzt. Dieser Mischung wurden 1,95 g CsCl, 2 bis 5 μ l Katalase aus Rinderleber (160 bis 400 Einheiten, 0,05 bis 0,125 mg Protein) und 20 μ l 2 mM APS zugefügt. Die Zentrifugation dieses Gemisches erfolgte in 5 ml Polyallomer-Tuben mit einem Vertikalrotor (Sorvall TV 865) bei 40000 min^{-1} und 3 °C während 66 h. Die Zugabe von APS stabilisierte die APS-Sulfotransferase, so daß nach der Zentrifugation noch mindestens 25 % der ursprünglichen Aktivität gemessen werden konnte. Die Aktivität der O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase zeigte während der Zentrifugation keine Aktivitätsveränderung. Die Gradienten wurden in einzelne Tropfen fraktioniert.

Jede zehnte Fraktion diente zur Bestimmung des Refraktionsindex bei 20 °C. Daraus ließ sich mit einer Eichkurve die Dichte bestimmen. Diese Eichkurve wurde unter Verwendung eines DMA-Dichtemeßgerätes (Anton Paar, Graz, Österreich) erstellt.

Enzymmessungen. Als Maß für die Aktivität der APS-Sulfotransferase diente die Bildung von ^{35}S -Sulfit aus AP^{35}S in Gegenwart von DTE (Schiff und Levinthal 1968; Hodson und Schiff 1971). Der Inkubationsansatz umfaßte einen Tropfen der CsCl-Gradienten, 200 μ l 2 M MgSO_4 , 20 μ l 0,375 mM AP^{35}S , 20 μ l 200 mM DTE, 50 μ l 1 M Tris-HCl, pH 9,0 und 60 μ l H_2O . Als Inkubationsgefäße dienten Tuben aus Polystyrol (Außendurchmesser 11,6 mm, Innendurchmesser 9,6 mm, Höhe 47 mm; Fakola, Basel). Die Inkubationsansätze wurden in eine speziell konstruierte Einrichtung (Abb. 1) übertragen. Unter Kühlung der Ansätze mit Eiswasser wurde durch fünfmaliges Evakuieren und Füllen der Einrichtung mit Ar eine inerte Atmosphäre aufgebaut. Zum Starten der Enzymreaktion wurde die Inkubationseinrichtung so in ein Wasserbad gestellt, daß die Tuben mit den Ansätzen 1 bis 2 cm eintauchten. Die Inkubation dauerte 60 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde abgebrochen durch Übertragung der Inkubationseinrichtung in Eiswasser. Die Inkubationsansätze wurden mit 100 μ l 1 M Na_2SO_3 versetzt und in Szintillationsflaschen übertragen, welche zuvor mit 1 ml 1 M Triäthanolamin beschickt worden waren. Nach Zugabe von 200 μ l 1 M H_2SO_4 wurden die Flaschen verschlossen. Die Destillation des gebildeten $^{35}\text{SO}_2$ dauerte im typischen Falle 24 h. Die Inkubationsgefäße wurden bei der Entnahme aus den Szintillationsflaschen im untern Teil außen mit 500 μ l H_2O abgespült, um Radioaktivitätsverluste durch anhaftende Tropfen von Triäthanolamin zu vermeiden. Das Spülwasser und die Triäthanollösung wurden mit 10 ml Szintillator-Lösung (Toluol-Triton X-100 2:1 v/v mit 4 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ 2,5 Diphenyl-oxazol und 120 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol) versetzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte mit einem MR 300 Szintillationszähler (Kontron, Zürich).

Zum Vergleich wurde die APS-Sulfotransferase mit der üblichen Methode gemessen, bei der die Destillation des $^{35}\text{SO}_2$ mit Convayschalen erfolgt (Schiff und Levinthal 1968). Anstelle von NaOH als Absorptionslösung trat 1 M Triäthanolamin.

Die Aktivität der O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase wurde nach von Arb und Brunold (1980) gemessen, Katalase nach Aebi (1970). Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad-Reagenz (Bio-Rad, München, Bundesrepublik Deutschland) und mit Rinderserumalbumin als Referenz.

Reagentien. AP^{35}S wurde nach Tsang et al. (1976) hergestellt. Dabei wird mit einem *Chlorella*-Extrakt aus ATP und $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ zuerst Adenosin 3'-phosphat 5'-phosphosulfat (PAP^{35}S) synthetisiert. Dieses wird durch 3'-Nucleotidase zu AP^{35}S dephosphoryliert. Zur Isolation von PAP^{35}S und AP^{35}S diente eine DEAE-Sephacel-Säule (Durchmesser 50 mm, Betthöhe 190 mm). Die Elution der Sulfonukleotide erfolgte mit einem linearen Triäthylamin-Gradienten (pH 7,5, 0,25-0,8 M).

Die Kontrolle des AP^{35}S zeigte, daß es in der Elektrophorese (Hilz und Lipman 1955) identisches Wanderungsverhalten aufwies wie authentisches APS.

APS, 3'-Nucleotidase, Katalase und O-Acetyl-L-serin-HCl wurden von Sigma, Saint Louis, U.S.A. bezogen, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ beim Radiochemical Centre, Amersham, England, $\text{Ca}(^{15}\text{NO}_3)_2$ bei B.O.C., London, U.K. und DEAE-Sephacel bei Pharmacia, Uppsala, Schweden.

Tabelle 1: Vergleich der Messung der Aktivität der APS-Sulfotransferase aus *Lemna minor* mit Conway-Schalen und mit Szintillationsflaschen. Die Mittelwerte \pm S.D. von 6 Messungen sind angegeben.

Destillationsart	APS-Sulfotransferase $\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$
Conway-Schalen	1245 ± 60
Szintillationsflaschen	1234 ± 43

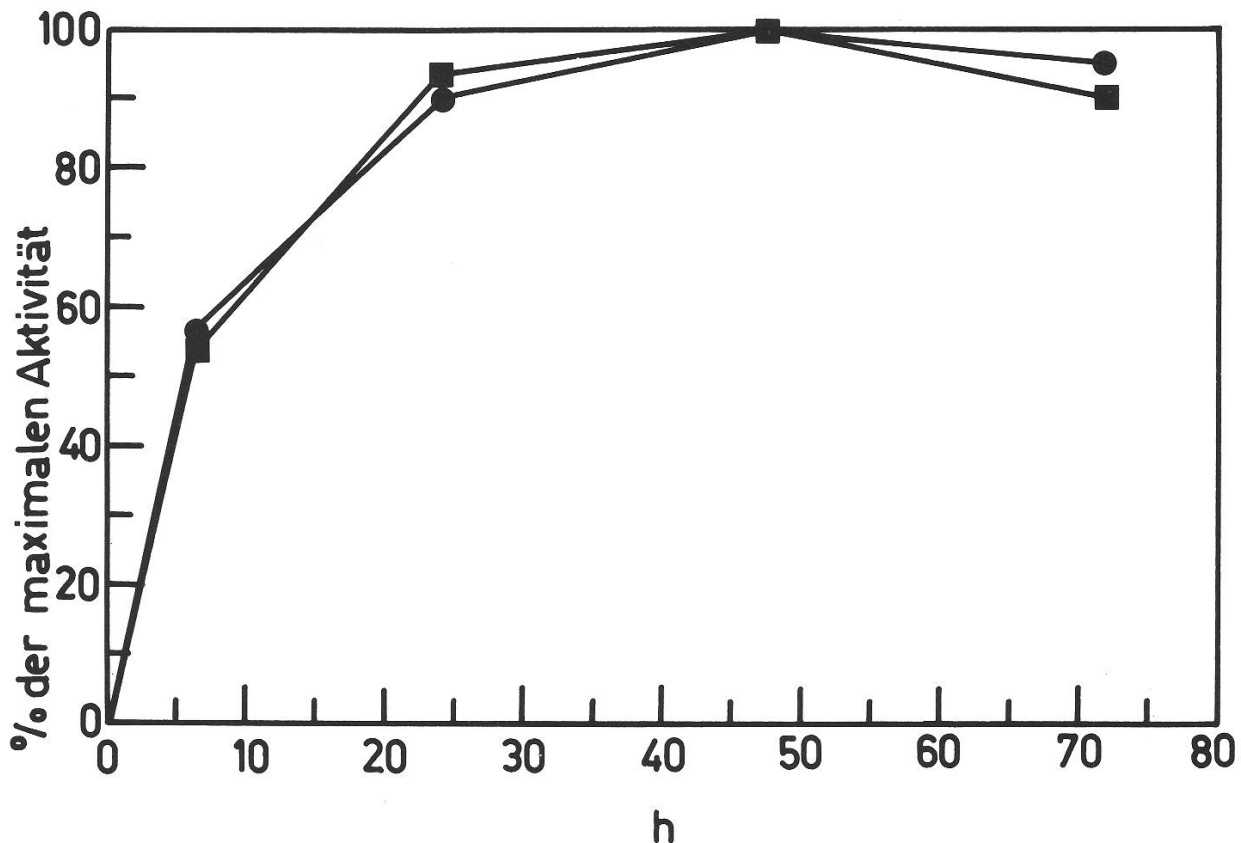


Abb. 2: Abhängigkeit der Messung der APS-Sulfotransferase-Aktivität von der Destillationszeit. Die Meßansätze enthielten in einem totalen Volumen von $400 \mu\text{l}$ $400 \mu\text{mol}$ MgSO_4 , $4 \mu\text{mol}$ DTE, 75 nmol AP^{35}S , $50 \mu\text{mol}$ Tris-HCl, pH 9,0 und $20 \mu\text{l}$ Extrakt aus *Lemna minor* mit $15,6 \mu\text{g}$ (100% Aktivität = $839 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ —●—●—) oder $13,5 \mu\text{g}$ Protein (100% Aktivität = $1426 \text{ nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ —■—■—). Die Inkubationszeit betrug 30 min. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Destillation abgebrochen und die Radioaktivität im Triäthanolamin bestimmt.

Resultate

Tabelle 1 zeigt, daß die Aktivität der APS-Sulfotransferase aus *L. minor* bei der Messung mit Conway-Schalen jener entspricht, wo in Szintillationsflaschen destilliert wurde. Aus den Resultaten geht außerdem die gute Reproduzierbarkeit der Messung hervor. In Abb. 2 ist die Abhängigkeit der Messung der APS-Sulfotransferase-Aktivität von der Destillationszeit dargestellt. Bereits nach $6\frac{1}{2}$ h waren mehr als 50% der maximalen Werte erreicht, welche nach 48 h gemessen wurden.

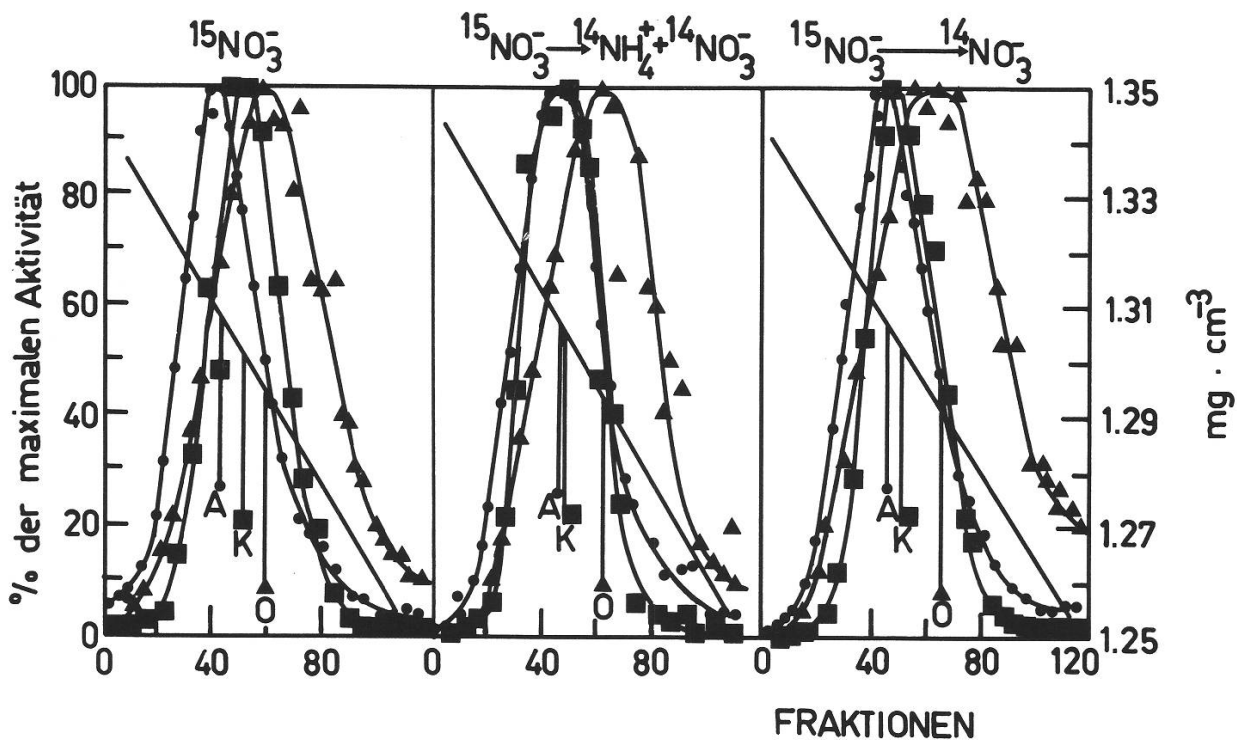


Abb. 3: Verteilung der Aktivität der APS-Sulfotransferase (—●—●—) und der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase (—▲—▲—) aus *Lemna minor* und von Katalase aus Rinderleber (—■—■—) auf CsCl-Gradienten. *Lemna minor* wurde extrahiert nach 8 Generationen mit $^{15}\text{NO}_3^-$ als Stickstoffquelle ($^{15}\text{NO}_3^-$) und 18 h nach Wechsel auf $^{14}\text{NO}_3^-$ und $^{14}\text{NO}_4^-$ ($^{15}\text{NO}_3^- \longrightarrow ^{14}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_3^-$) oder $^{14}\text{NO}_3^-$ ($^{15}\text{NO}_3^- \longrightarrow ^{14}\text{NO}_3^-$). Die Diagonale gibt die Dichteverteilung in den Gradienten an. Aus den Abständen der Zentren der Aktivitätskurven der APS-Sulfotransferase (A) und der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase (O) zur Katalase (K) lassen sich die Dichteunterschiede berechnen.

Abb. 3 zeigt die Aktivitätsverteilung der APS-Sulfotransferase und der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase von Extrakten aus *L. minor* in CsCl-Dichtegradienten. Wenn die beiden Enzyme aus Pflanzen extrahiert wurden, welche mit $^{15}\text{NO}_3^-$ kultiviert worden waren, war die APS-Sulfotransferase um $6,7 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ dichter, die O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase um $7,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ weniger dicht als Katalase aus Rinderleber, welche jedem Gradienten als Referenz zugesetzt wurde. Nach Übertragung der *Lemna* von $^{15}\text{NO}_3^-$ auf $^{14}\text{NO}_3^-$ oder $^{14}\text{NO}_3^-$ und $^{14}\text{NH}_4^+$ beginnt die Dichte der APS-Sulfotransferase und der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase abzunehmen, so daß auf den Dichtegradienten gegenüber Katalase aus Rinderleber Verschiebungen der Aktivitätskurven feststellbar werden. Aus Figur 3 steht hervor, daß die Stickstoffquelle auf die Dichteverschiebung der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase nach 18 h keinen wesentlichen Einfluß hatte. Hingegen wurde die APS-Sulfotransferase rascher weniger dicht, wenn *L. minor* NH_4^+ als Stickstoffquelle zur Verfügung stand. Dieser Unterschied zwischen den beiden Enzymen kommt auch in Abb. 4 zum Ausdruck, wo die Dichteabnahme der APS-Sulfotransferase und der O-Acetyl-L-serin-Sulphydrylase aus drei verschiedenen Experimenten in Abhängigkeit von der Zeit nach Umstellung der Stickstoffquelle von $^{15}\text{NO}_3^-$ auf $^{14}\text{NO}_3^-$ oder $^{14}\text{NO}_3^-$ und $^{14}\text{NH}_4^+$ dargestellt ist. Dabei wurden zum Zeitpunkt 0 bei jedem Experi-

ment 2 Dichtegradienten ausgemessen, und die gemittelten Dichteunterschiede von APS-Sulfotransferase und O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase zur Katalase dienten als Ausgangspunkt für die Berechnung der Dichteabnahme im weiteren Verlauf der Experimente: Die Dichteabnahme der O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase wurde durch die N-Quelle nicht wesentlich beeinflusst. Bei der APS-Sulfotransferase dagegen war sie rascher, wenn die Organismen auf Nährlösung mit $^{14}\text{NO}_4^-$ und $^{14}\text{NH}_4^+$ übertragen wurden.

Die Aktivität der O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase war während der Experimente konstant, die APS-Sulfotransferase-Aktivität blieb mit NO_3^- als Stickstoffquelle konstant, mit NO_3^- und NH_4^+ stieg sie in 6 h um 25, in 24 h um 80 % an. Bezogen auf das Frischgewicht ließ sich beim extrahierbaren Protein während der Versuchsdauer keine signifikante Erhöhung feststellen.

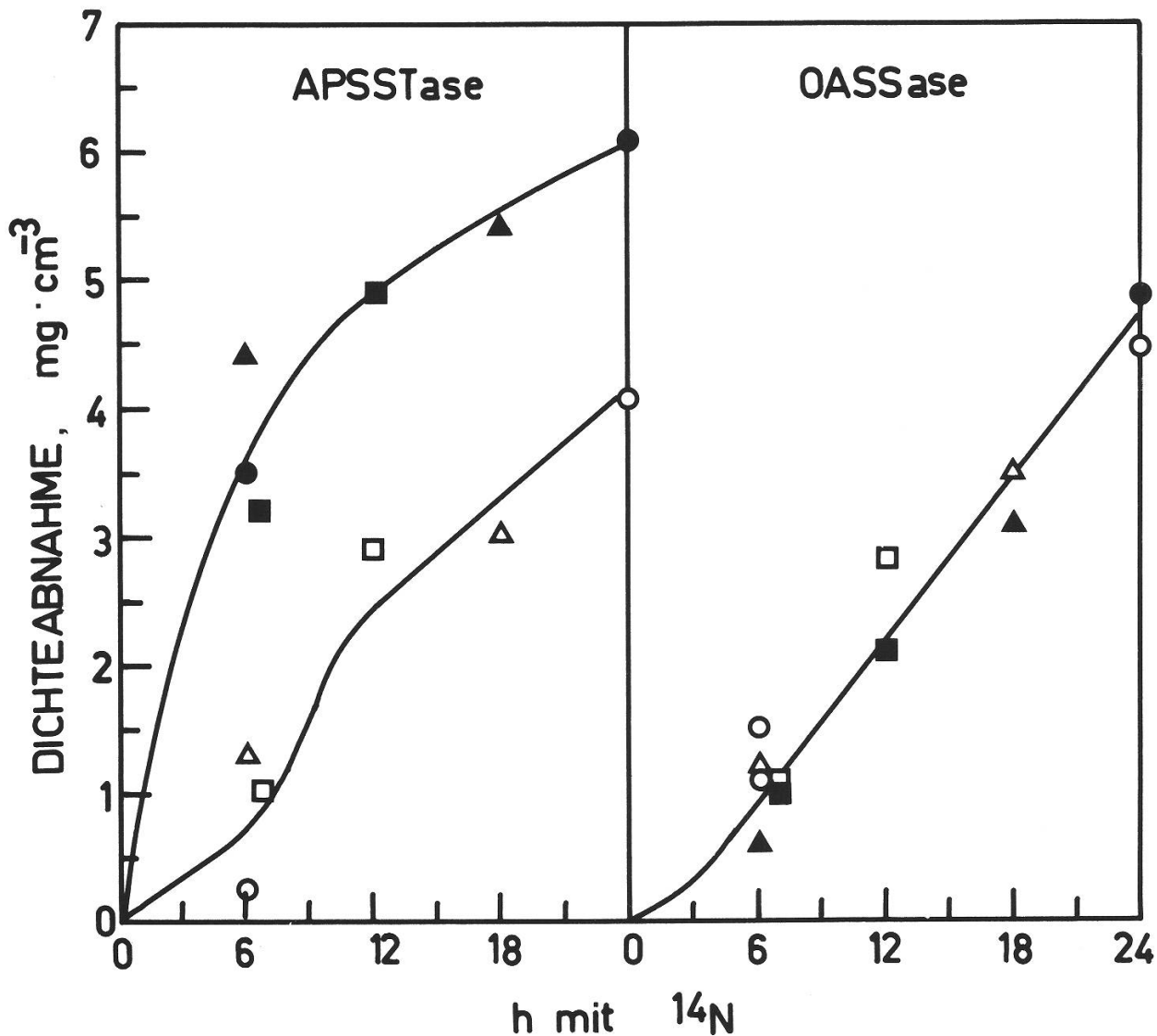


Abb. 4: Dichteabnahme der APS-Sulfotransferase (APSSTase) und der O-Acetyl-L-serin-Sulfhydrylase (OASSase) aus *Lemna minor* nach der Übertragung von $^{15}\text{NO}_3^-$ auf Nährlösung mit $^{14}\text{NO}_3^-$ (—△—□—○—) oder $^{14}\text{NO}_4^-$ und $^{14}\text{NH}_4^+$ (—▲—●—■—) als Stickstoffquelle. Für die Berechnung der Dichteabnahme diente Katalase aus Rinderleber als Referenz.

Diskussion

1. Messung der APS-Sulfotransferase

Mit Hilfe der hier dargestellten Methode läßt sich eine Messung in 2 bis 3 min durchführen. Gegenüber der Methode mit Inkubation in Reagenzgläsern mit Silikonstopfen und Destillation mit Conway-Schalen stellt dies eine etwa 2- bis 3-fache Verkürzung der Arbeitszeit dar. Die optimale Destillationszeit liegt bei 48 h; eine Verkürzung erscheint möglich, weil bereits nach $6^{1/2}$ h mehr als 50 % des maximal meßbaren $^{35}\text{SO}_2$ in der Auffangbase nachzuweisen ist. Eine Kontamination der Laborluft bei frühzeitigem Abbruch der Destillation läßt sich vermeiden, wenn der Meßansatz vor der Entnahme aus der Szintillationsflasche mit H_2O_2 versetzt wird.

2. Untersuchung der *de novo*-Synthese der APS-Sulfotransferase mit ^{15}N -Dichtemarkierung

Der Anstieg der Aktivität der APS-Sulfotransferase beim Wechsel der Stickstoffquelle von NO_3^- auf NO_3^- und NH_4^+ (Brunold 1981) kann auf einer Erhöhung der Syntheserate des Enzyms beruhen oder auf Aktivierung (Johnson 1977). Bei erhöhter Syntheserate ist nach der Umstellung von ^{15}N auf ^{14}N gegenüber Kontrollen mit einer rascheren Dichteabnahme zu rechnen, weil hier ^{14}N schneller in Proteine eingebaut wird. Liegt dagegen Aktivierung vor, kann die Dichteabnahme sogar langsamer erfolgen, weil präformierte ^{15}N -Enzymmoleküle der durch neusynthetisierte ^{14}N -Enzymmoleküle verursachten Verringerung der Dichte entgegenwirken.

Im vorliegenden Falle könnte eine raschere Dichteabnahme allerdings so zustande kommen, daß $^{14}\text{NH}_4^+$ schneller in die Proteine gelangt als $^{14}\text{NO}_3^-$. Deshalb wurde die O-Acetyl-L-serin-Sulfohydrolase als interne Kontrolle herangezogen. Dieses Enzym weist ein ähnliches Dichtemarkierungsverhalten auf wie APS-Sulfotransferase (von Arb und Brunold 1980), es wird in seiner extrahierbaren Aktivität durch die eingesetzten Stickstoffquellen nicht beeinflußt und gehört ebenfalls zur Reaktionssequenz der assimilatorischen Sulfatreduktion. Die vorliegenden Resultate zeigen, daß die Dichteabnahme der O-Acetyl-L-serin-Sulfohydrolase im wesentlichen unabhängig von der Stickstoffquelle ist, was darauf hindeutet, daß NH_4^+ nicht rascher als NO_3^- in die Proteine gelangt. Damit dürfte die raschere Dichteabnahme der APS-Sulfotransferase aus *L. minor* mit NH_4^+ in der Nährlösung mindestens teilweise auf einer erhöhten *de novo*-Synthese beruhen. Nach 6 h mit NH_4^+ und NO_3^- war die Dichte des Enzyms 2 bis $3 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ kleiner als aus *L. minor* mit NO_3^- als einziger Stickstoffquelle. In dieser Zeit nahm die APS-Sulfotransferase-Aktivität gegenüber Kontrollen im Mittel um 25 % zu. Der Unterschied in der Dichte zwischen ^{15}N - und ^{14}N - APS-Sulfotransferase beträgt $12 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ (von Arb und Brunold 1980). Wenn die zusätzliche APS-Sulfotransferase-Aktivität auf Enzymmolekülen beruht, welche neu aus ^{14}N synthetisiert wurden, würde theoretisch eine Dichteabnahme von etwa $2,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ resultieren. Unser Meßresultat von 2 bis $3 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ zeigt, daß die Erhöhung der Enzymaktivität mindestens am Anfang auf Neusynthese beruht. Für den spätern Kurvenverlauf ist nicht klar, wie weit zusätzlich eine Erniedrigung der Abbaurate oder eine Aktivierung auftritt. Gesamthaft zeigen die vorliegenden Resultate, daß NH_4^+ die Syntheserate der APS-Sulfotransferase reguliert. Damit würde sich das Enzym gut in das von Reuveny et al. (1980) vorgeschlagene Modell einfügen, bei welchem Endprodukte der Nitratassimilation sich positiv auf die Aktivität der Enzyme der assimilatorischen Sulfatreduktion auswirken. Wir haben früher gezeigt,

daß Cystein und H₂S als Endprodukte der Sulfatassimilation die extrahierbare Aktivität der APS-Sulfotransferase herabsetzen (Brunold und Schmidt 1976, 1978). Dies entspricht ebenfalls dem Modell von Reveuny et al. (1980), nach welchem sich Endprodukte sowohl bei der Sulfatassimilation als auch bei der Nitratassimilation auf Enzymaktivitäten des eigenen Biosyntheseweges erniedrigend auswirken. Ziel der Regulation wäre, beide Reduktionswege so zu koordinieren, daß Cystein und Methionin in dem Maße gebildet werden, wie sie für die Proteinsynthese benötigt werden.

Diese Untersuchung wurde durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt (Nr. 3.371-0.78 und 3.109.081). Wir danken Dr. J.A. Schiff für die *Chlorella*-Kultur und Herrn Läufer für die Herstellung der Einrichtung für die Inkubation der APS-Sulfotransferase. Die verwendete Ultrazentrifuge (TGA 65; Kontron, Zürich) konnte mit Mitteln der Borell-Stiftung angeschafft werden.

- Aebi H. 1970. Katalase. In: Methoden der enzymatischen Analyse, Vol. 1, Bergmayer, H.-U., ed., Chemie, Weinheim, pp. 636-640.
- Arb C. von and Chr. Brunold 1980. Analysis of the regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase activity in *Lemna minor* L. using ¹⁵N-density labeling. *Planta* 149: 355-360.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- Brunold Chr. 1981. Regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase in higher plants. In: Biology of inorganic nitrogen and sulfur, Bothe, H. und Trebst, A., eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 352-358.
- Brunold Chr. and A. Schmidt 1976. Regulation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase activity by H₂S in *Lemna minor* L. *Planta* 133: 85-88.
- Brunold Chr. and A. Schmidt 1978. Regulation of sulfate assimilation in plants. 7. Cysteine inactivation of adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase in *Lemna minor* L. *Plant Physiol.* 61: 342-347.
- Dicht M., A. Kopp, U. Feller und K.H. Erismann 1976. Einfluß von Ammonium und Nitrat auf den Proteingehalt von *Lemna minor* L. unter Photosynthesebedingungen. *Biochem. Physiol. Pfl.* 170: 531-534.
- Erismann K.H. und Chr. Brunold 1973. Die Verwendung einer neuen *Lemna*-Kulturanlage in Wachstums- und Stoffwechseluntersuchungen mit gelösten und gasförmigen Schwefelverbindungen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 83: 213-222.
- Erismann K.H. und A. Finger 1968. Lemnaceen in kontinuierlicher Kultur. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 78: 5-15.
- Feller U. und K.H. Erismann 1971. Einfluß der Beleuchtungsstärke auf die Ammonium- und Nitrataufnahme bei *Lemna minor*. *Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges.* 71: 96-99.
- Hilz H. and F. Lipman 1955. The enzymatic activation of sulfate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 41: 880-890.

- Hodson R. and J.A. Schiff 1971. Studies of sulfate utilization by algae. 9. Fractionation of a cell-free system from *Chlorella* into two activities necessary for the reduction of adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate to acid-volatile radioactivity. *Plant Physiol.* 47: 300-305.
- Johnson C.B. 1977. Use of density labelling techniques. In: regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants, Smith, H., ed., Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 225-243.
- Landolt E. 1957. Physiologische und ökologische Untersuchungen an Lemnaceen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 67: 271-410.
- Reuveny Z., D.K. Dougall and P.M. Trinity 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6670-6672.
- Schiff J.A. and H. Fankhauser 1981. Assimilatory sulfate reduction. In: *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*, Bothe, H. und Trebst, A., eds., Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 153-168.
- Schiff J.A. and M. Levinthal 1968. Studies of sulfate utilization by algae. 4. Properties of a cell-free sulfate-reducing system from *Chlorella*. *Plant Physiol.* 43: 547-554.
- Tsang M.L.-S. and J.A. Schiff 1976. Studies of sulfate assimilation by algae. 17. Reactions of the adenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase from *Chlorella* and studies of model reactions which explain the diversity of side products with thiols. *Plant Cell Physiol.* 17: 1209-1220.
- Tsang M.L.-S., J. Lemieux, J.A. Schiff and T.B. Bojarski 1976. Preparation of adenosine 5'-phosphosulfate (APS) from adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS) prepared by an improved procedure. *Analyt. Biochem.* 74: 623-626.

Chr. Brunold
Pflanzenphysiologisches Institut
der Universität Bern
Altenbergrain 21
CH-3013 Bern