

Table III. Formation of radioactive free cysteine from $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ and H_2^{35}S in light and darkness by *Lemna minor*^a

Composition of air	^{35}S -source	Moles ^{35}S -cysteine/mg dry weight after 15 min with tracer		
		Light	Darkness before labelling (min)	
			0	60
Atmospheric air with 0 ppm H_2S	$^{35}\text{SO}_4^{2-}$	30×10^{-16}	19×10^{-16}	13×10^{-16}
Atmospheric air with 6 ppm H_2S	H_2^{35}S	25×10^{-12}	26×10^{-12}	24×10^{-12}

^a Conditions as given in Table I. Before the experiment, the organisms were cultivated for 10 days with the indicated compositions of air.

H_2S were oxidized first to SO_4^{2-} , a similar difference between light and dark would be expected as was found when $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ was the ^{35}S source.

Enzymes which can play a part in sulfate reduction in green plants were described only very recently^{18,19}; future work with these enzymes might well discover that H_2S regulates SO_4^{2-} -reduction in a similar way as NH_4 regulates NO_3 -reduction¹⁴⁻¹⁷.

Zusammenfassung. Bei *Lemna minor* L. hemmt H_2S in subtoxischen Konzentrationen die Assimilation von SO_4^{2-} . Es wird bei der Bildung von Cystein direkt eingebaut ohne vorangehende Oxidation zu SO_4^{2-} mit anschliessender Reduktion.

CHR. BRUNOLD and K. H. ERISMANN^{26,27}

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern,
Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Switzerland),
30 December 1974.

¹⁴ A. NASON and H. J. EVANS, J. biol. Chem. 202, 655 (1955).

¹⁵ D. J. D. NICHOLAS, A. MEDINA and O. T. G. JONES, Biochim. biophys. Acta 37, 468 (1968).

¹⁶ F. W. SMITH and J. F. THOMPSON, Plant Physiol. 48, 219 (1971).

¹⁷ J. HERRERA, A. PANAGUE, J. MALDONA, J. L. BAREA and M. LOSADA, Biochim. biophys. Res. Commun. 48, 996 (1972).

¹⁸ J. A. SCHIFF and R. C. HUDSON, A. Rev. Plant Physiol. 24, 381 (1973).

¹⁹ A. SCHMIDT, W. R. ABRAMS and J. A. SCHIFF, Eur. J. Biochem. 47, 423 (1974).

²⁰ K. H. ERISMANN and A. FINGER, Ber. schweiz. bot. Ges. 78, 5 (1968).

²¹ C. M. JOHNSON and H. NISHITA, Analyt. Chem. 24, 736 (1952).

²² R. J. ELLIS, Nature, Lond. 211, 1266 (1966).

²³ K. H. ERISMANN and CHR. BRUNOLD, Experientia 23, 235 (1967).

²⁴ P. P. WARING and Z. Z. ZIPORIN, J. Chromat. 15, 168 (1963).

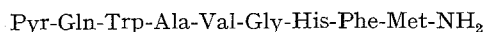
²⁵ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 193, 265 (1951).

²⁶ We thank Dr. TREVITHICK for helpful criticism of the draft of this manuscript.

²⁷ The study was supported by a grant from the Swiss National Foundation (Nr. 5122.3).

Aminoacid Composition and Sequence of Litorin, a Bombesin-Like Nonapeptide from the Skin of the Australian Leptodactylid Frog *Litoria aurea*¹

Methanol extracts of the skin of the Australian leptodactylid frog *Litoria (Hyla) aurea* contain a polypeptide, litorin, which possesses a bombesin-like activity. Litorin has been isolated in a pure form and recognized as a nonapeptide with the following sequence:



It may be seen that the C-terminal octapeptide of litorin is the same as that of ranatensin² and differs from that of bombesin or alytesin^{3,4} in that, at position 2 from the C-terminus, a phenylalanine residue has been substituted for the leucine residue.

Isolation procedure. The dried skins of 230 specimens of *L. aurea* collected near Melbourne, Victoria, Australia, in November and December 1973, and weighing a total of 230 g, were subjected to 2 successive extractions with 20 parts (w/v) of 80% methanol, each extraction lasting 1 week. The extracts were mixed and filtered.

An aliquot of extract corresponding to 180 g of dried skins was evaporated to dryness, the residue washed with petroleum ether and then taken up in water plus 99% ethanol to give a final ethanol concentration of 95%. After standing, the lipid supernatant was passed through 4 columns of alkaline alumina, each of 170 g, which were then eluted with ethanol-water mixtures of decreasing concentrations of ethanol, each of 200 ml.

Two peaks of bombesin-like activity appeared in the ethanol eluates, one in the second 95% eluate, the other in the second 90% ethanol eluate. The study of the peptide responsible for the first peak is in progress; litorin was responsible for the second peak of activity.

The purification of the second 90% ethanol eluate, which was contaminated by 5-hydroxytryptamine and by smaller amounts of histamine, was carried out by using gel filtration on Sephadex G-10. Preparative paper electrophoresis was used as a final purification step.

On high voltage electrophoresis on paper, the active spot had the mobility of a positively charged peptide in neutral and acidic medium ($E_{5.8} = 0.25$ His, $E_{1.2} = 0.35$ Glu). The spot was negative to ninhydrin, denoting the absence of lysine and of a free N-terminal amino group, whereas it was positive to the Pauly reagent for histidine and to the reagents for tryptophan (*p*-dimethylamino-benzaldehyd and NNCD⁵ reagents).

¹ Supported in part by grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

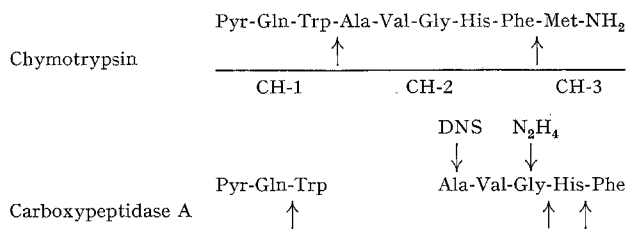
² T. NAKAJIMA, T. TANIMURA and J. J. PISANO, Fedn. Proc. 29, 282 (1970).

³ A. ANASTASI, V. ERSPAMER and M. BUCCI, Experientia 27, 166 (1971).

⁴ A. ANASTASI, V. ERSPAMER and M. BUCCI, Arch. Biochem. Biophys. 148, 443 (1972).

⁵ 2-Chloro-4-nitrobenzenediazoniumnaphthalene-2-sulphonate.

Structure. The structure of litorin was determined by sequential analysis of the fragments obtained by digestion with chymotrypsin as shown below:



Digestion of the tripeptide CH-1 with carboxypeptidase A liberated free tryptophan and a dipeptide easily identified with Pyr-Gln. The pentapeptide CH-2 could not be digested with leucinaminopeptidase or aminopeptidase M. Dansylation (DNS) demonstrated that alanine was the N-terminal residue. When CH-2 was submitted to digestion with carboxypeptidase A, phenylalanine and histidine were sequentially liberated. Hydrazinolysis (N₂H₄) demonstrated the position of glycine in the remaining tripeptide Ala-Val-Gly.

The results of sequential analysis of natural litorin were confirmed by synthesis⁶. The polypeptide is probably present in the skin of several other *Litoria* species. From a biological point of view, litorin closely mimicks bombesin. However, there are some important differences, which will be detailed elsewhere.

Riassunto. Gli estratti di pelle di *Litoria aurea*, un anfibio leptodactilide australiano, contengono 2 polipeptidi ad attività bombesinosimile. Uno di essi, la litorina, è stato identificato come un nonapeptide avente strette analogie strutturali con la bombesina, l'alitesina e la ranatensina.

A. ANASTASI, V. ERSPAMER and R. ENDEAN

Laboratori Ricerche Farmitalia S.p.A., I-20146 Milano (Italy); Istituto di Farmacologia medica I, Università di Roma (Italy); and Department of Zoology, University of Queensland, Brisbane (Australia), 21 January 1975.

⁶ F. ANGELUCCI and R. DE CASTIGLIONE, *Experientia* 31, 507 (1975).

Beeinflussung der Thymidinphosphorylierung und Inkorporation durch Schwefeldioxid und Sulfit bei der Wasserlinse (*Lemna minor* L.)

Inhibition of Phosphorylation and Incorporation of Thymidine in Duckweed (*Lemna minor* L.) by Sulfur Dioxide and Sulfite

Sichtbare Schädigungen von Pflanzen durch Schwefeldioxid sind in den vergangenen Jahren hinlänglich beschrieben worden. Neuerdings gewinnen die sogenannten «unsichtbaren» Schädigungen, welche oft durch minime SO₂-Immissionen hervorgerufen werden, zunehmend an Bedeutung¹. Sie wirken sich primär in Stoffwechselveränderungen aus, vielfach durch eine direkte Beeinflussung der Aktivität einzelner Enzyme². Diese Umstände und die Tatsache, dass SO₂-Wirkungen im Zusammenhang mit dem Nukleinsäurenstoffwechsel ungenügend untersucht wurden, veranlasste uns Aufnahme, Phosphorylierung und Einbau von exogenem Thymidin bei der Wasserlinse (*Lemna minor* L.) zu überprüfen.

Die Anzucht der Versuchspflanze *Lemna minor* L. erfolgte auf einer kontinuierlichen Kulturanlage in E-NO₃-Nährlösung, wahlweise mit oder ohne Thymidinzusatz³. Ein Teil der Organismen wurde mit 0,6 ppm (parts per million) über längere Zeit vorbegast. Die Dosierung und Messung des SO₂ geschah mittels eines Diffusionsverfahrens und einer spektralphotometrischen Gasanalyse⁴.

Die Umsetzung des Thymidins zum Monophosphat wurde bestimmt in Anlehnung an bestehende Methoden⁵⁻⁷ sowie nach eigenen Vorversuchen. Als Phosphatdonoren wurde erst ATP für die Thymidinkinase, dann AMP für die Phosphotransferase eingesetzt. Als Enzymquelle diente ein Rohextrakt. Je 50 dreigliedrige Lemnengruppen wurden während 2 h in kaltem Phosphatpuffer (0,02 M, pH 7,2) gewaschen, im vorgekühlten Handhomogenisator mit 1,3 ml Puffer aufgebrochen und anschliessend für 20 min bei 0°C und 3800 g zentrifugiert. Der klare, hellgrüne Überstand wurde in Portionen von 0,5 ml in flüssiger Luft eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -25°C gelagert.

Die Reaktionsgemische enthielten in 100 µl Gesamtvolumen folgende Endkonzentrationen:

Die Enzymreaktion wurde in verschraubbaren Probengläschen bei 30°C durchgeführt. Der Start erfolgte durch Zugabe des Rohextrakts zum Ansatz. Nach 30 min wurde die Reaktion durch dreiminütiges Eintauchen in kochendes Wasser abgebrochen. Zu jeder einzelnen Probe wurde ein Blindwert mitgeführt, der denaturiertes Enzym enthielt.

Die aktiven Reaktionsprodukte liessen sich hochspannungselektrophoretisch auftrennen (4000 V, 40 mA, 45 min, Lactatpuffer pH 3,6 und 0,02 M CAMAG, 2040 B-Papier). Das Thymidin verschiebt sich unter diesen Bedingungen nur wenig vom Start, währenddem die gebildeten Thymidinphosphate weit gegen die Kathode wandern. Die Elektrophoresebahnen wurden mitsamt dem UV-sichtbaren Thymidinfleck in gleich grosse Streifen aufgeteilt und direkt in Scintillationsflüssigkeit ausgemessen. Die effektiven Werte wurden durch Subtraktion der Blindwerte von den Messwerten ermittelt.

Zur Überprüfung von Aufnahme und Einbau des Thymidins in vivo wurden die Lemnen in rechteckige Warburggefässe übertragen. Die Fütterungsexperimente erfolgten unter vergleichbaren Bedingungen in einem Gilson-Respirometer. Über einen Gasverteiler wurden je 6 Gefässe mit gereinigter, respektive SO₂-angereicherter Luft begast. Zur Dosierung diente die erwähnte Diffusionsmethode. Vor der 1 h Fütterung mit ringmarkiertem

¹ S. BÖRTITZ, *Biol. Zbl.* 93, 341 (1974).

² I. ZIEGLER, *Envir. Quality Safety* 2, 182 (1973).

³ K. H. ERISMANN und CH. BRUNOLD, *Ber. Schweiz. bot. Ges.* 83, 213 (1974).

⁴ M. SCHÄRER, *Liz. Arbeit Universität Bern* (1974).

⁵ R. D. MACLEOD, *Ann. Bot.* 35, 237 (1971).

⁶ J. HARLAND, J. F. JACKSON and M. M. YEOMAN, *J. Cell Sci.* 13, 121 (1973).

⁷ O. J. SCHWARZ and A. H. HABER, *Plant Physiol.* 51, 984 (1973).