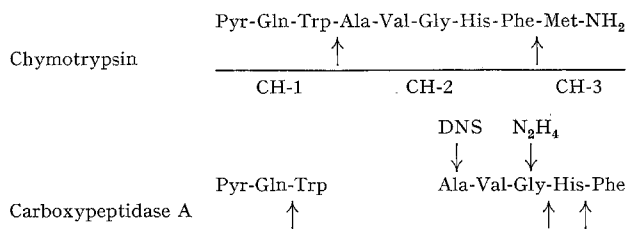


Structure. The structure of litorin was determined by sequential analysis of the fragments obtained by digestion with chymotrypsin as shown below:



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).

	Thymidinkinaseansatz	Nukleosidphosphotransferaseansatz
Enzymrohextrakt	50 μ l (= 35 γ Protein)	50 μ l (= 35 γ Protein)
Phosphatpuffer	0,2 m (pH 7,5)	0,2 M (pH 7,1)
ATP (Adenosintri-phosphat)	2,5 10^{-3} M	—
AMP (Adenosinmonophosphat)	—	6,6 10^{-3} M
TdR (14 C-Thymidin, ringmarkiert)	6,4 10^{-5} M	6,4 10^{-5} M
Rinderserumalbumin	22,5 γ	22,5 γ
NaHSO ₃	— / 2,7 10^{-3} M	— / 2,7 10^{-3} M
MgCl ₂	2,5 10^{-4} M	2,5 10^{-4} M
PEP (Phosphoenolpyruvat)	5,2 10^{-3} M	—
Hexokinase	10 γ	—

14 C-Thymidin wurden die Organismen während 4 h in den entsprechenden Gasgemischen akklimatisiert (1 nM 14 C-Thymidin/ml Nährlösung, spezifische Aktivität 50 mCi/mM). Ein Teil der Lemnen erhielt bereits während der Vorkultur die gleiche Menge inaktiven Thymidins in der Nährlösung angeboten, welches vor dem Experiment durch viermaliges Wechseln der Nährlösung innerhalb von 6 h entfernt wurde.

Nach Ablauf der Fütterungszeit wurden die Lemnen aus den Warburggefäßen gekippt, mit etwa $\frac{1}{2}$ eiskaltem Wasser pro Ansatz gespült und zum Entleeren des freien Raums während 1 h in eiskalter Nährlösung gewaschen. Je 50 Lemnenglieder wurden anschliessend wie früher beschrieben weiterverarbeitet, wobei zusätzlich nach der Extraktion der löslichen Anteile die Pigmente mittels Aceton entfernt wurden⁸.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass im ATP-haltigen System keine Thymidinphosphorylierung zustande kommt, die ausserhalb der geschätzten Streuung der Methode liegt. Im AMP-haltigen System hingegen sind erhebliche Phosphorylierungsraten messbar. Diese Fest-

stellung lässt die Vermutung zu, dass *Lemna minor* L. zu jenen Pflanzen gehört, die keine Thymidinkinase enthalten⁹. Diese Annahme wird insofern gestützt, als eine Thymidinvorkultur, wie sie mehrfach vorgeschlagen wurde^{5,10}, bei unseren Organismen keine Steigerung der Enzymaktivität bewirkte, obwohl die Thymidinkinase als substratinduzierbar gilt. Wir nehmen an, dass bei *Lemna minor* L. eine unspezifische Nukleosidphosphotransferase wirksam ist⁹. Die Michaeliskonstanten für die beiden Substrate TdR und AMP passen zu den Angaben anderer Autoren^{9,11} und zu WANKA¹², falls man der Argumentation anderer Autoren⁹ folgt und jene Thymidinkinase als Phosphotransferase versteht.

⁸ R. BRÄNDLE und K. H. ERISMANN, *Experientia* 29, 586 (1973).

⁹ Q.-I. DENG and D. H. IVES, *Biochim. biophys. Acta* 277, 235 (1972).

¹⁰ Y. HOTTA and H. STERN, *J. Cell Biol.* 25, 99 (1965).

¹¹ T. SHIOSAKA, H. OKUDA and S. FUJII, *Biochim. biophys. Acta* 246, 171 (1971).

¹² F. WANKA, *Z. Naturforsch.* 22b, 91 (1967).

Tabelle I. Thymidinphosphorylierung in Rohextrakten von *Lemna minor* L.

P-Donor	NaHSO ₃ (M)	Organismen ohne Vorbehandlung	Mit Vorbehandlung während der Anzucht		
			0,6 ppm SO ₂	10 ⁻⁶ M TdR	10 ⁻⁴ M TdR
ATP	0	< 2	< 2	< 2	< 2
	2,7 $\times 10^{-3}$	< 2	< 2	< 2	< 2
AMP	(1) 0	33	30	33	33
	2,7 $\times 10^{-4}$	30	—	—	—
	(2) 2,7 $\times 10^{-3}$	30	30	31	30
	2,7 $\times 10^{-2}$	21	—	—	—

(1) $K_m = 2 \times 10^{-3}$ M für TdR / 9×10^{-5} M für AMP, $V_{max} = 6 \times 10^{-5}$ M für TdR / 2×10^{-6} M für AMP

(2) $K_m = 1 \times 10^{-3}$ M für TdR / 2×10^{-5} M für AMP, $V_{max} = 4 \times 10^{-5}$ M für TdR / 2×10^{-6} M für AMP

Angaben in μ M/Glied \times 30 min, 1 Glied enthält 6 γ Protein.

Tabelle II. Thymidininkorporation in intakte Kolonien von *Lemna minor* L.

	Kontrolle	0,6 ppm SO ₂ bei Anzucht, 0,8 ppm während Experiment	1 nM TdR/ml Nährlösung während der Anzucht
Aufnahme total	1,37 \pm 0,04	1,21 \pm 0,04	2,45 \pm 0,04
Davon löslich	0,91 \pm 0,02	0,89 \pm 0,03	2,02 \pm 0,03
Davon fixiert	0,46 \pm 0,03	0,32 \pm 0,03	0,43 \pm 0,02

Angaben in μ M/Glied \times 60 min \pm mittlerer Fehler.

Die Schwefeldioxydbegasung während der Anzucht und/oder die Zugabe von Sulfid scheinen die Phosphorylierung etwas herabzusetzen. Die Erniedrigung der K_m -Werte für die beiden Substrate deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung durch eine unkompetitive Hemmung der Phosphotransferase leicht verringert wird (Tabelle I). Die Experimente über Aufnahme und Einbau des Thymidins in intakte Kolonien von *Lemna minor* L. unterstützen die vorgängig beschriebenen Befunde (Tabelle II). Die Zugabe von Thymidin zur Nährlösung während der Anzucht erhöht wohl die Aufnahme, nicht aber den Einbau. Die Begasung mit Schwefeldioxyd verringert die Aufnahme auf Kosten des Einbaus. Diese Resultate bestätigen zumindest indirekt die Vermutung, dass den Wasserlinsen eine Thymidinkinase fehlt. Durch die SO_2 -Begasung wird der Einbau von Thymidin signifikant gehemmt, was teilweise auf eine Hemmung der Nukleosidphosphotransferase zurückgeführt werden könnte. Höhere Konzentrationen als 0,6–0,8 ppm Schwefeldioxyd vermögen die Aufnahme von Thymidin kurzfristig zu steigern, wobei die Werte in Kombination mit einer Thymidinvorbehandlung weit über die $2,45 \text{ } \mu\text{M}$ /Glieder $\times h$ (Tabelle II) zu liegen kommen. Es gilt aber zu bedenken, dass die Versuchsorganismen bei maximal 0,6 ppm SO_2 über Monate kultiviert werden können⁴.

Schon bei Schwefeldioxydkonzentrationen um 1 ppm sterben sie innert Tagesfrist ab, so dass die Angabe von Messwerten fragwürdig erscheint. Es wird deshalb darauf verzichtet. Immerhin verweisen sie auf die seit langem gehegte Vermutung, dass SO_2 vor allem die cytoplasmatischen Membranen schädigt^{2, 13}.

Summary. As there appears to be no thymidine kinase in duckweed (*Lemna minor* L.), thymidine seems to be phosphorylated by a nucleoside phosphotransferase. Phosphorylation and incorporation are inhibited by sulfur compounds such as sulfur dioxide and sulfite. The data are discussed in relation to the physiological effect of the air pollutant (SO_2) on plant life.

R. BRÄNDLE, B. STÖCKLI und
K. H. ERISMANN¹⁴

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern,
Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Schweiz),
28. Januar 1975.*

¹³ R. THÜMLER, *Protoplasma* 36, 254 (1942).

¹⁴ Wir danken dem Schweiz. Nationalfonds für die Unterstützung.

Concerning the Extraction of Enzymatically Active Organic Matter from Soil

The most difficult problem in humus studies is to avoid chemical alterations during the extraction of the organic matter from the soil. Though humic substances have been isolated from soils by many procedures^{1–3}, there are no perfect extractants for such materials. Recently McLAREN et al.⁴, by analogy with biochemical studies, have postulated that any method for extracting humic material leads to artifacts if enzyme activity is not retained into the extract.

Previous investigations performed in this Laboratory⁵ have demonstrated that a 0.1 M pyrophosphate solution at pH 7, a typical humic matter extractant, extracts a significant fraction of soil urease without apparently damaging the ureolytic microorganisms.

After incubation in a Dubnoff water bath at 37°C for 18 h, we have, with a single pyrophosphate treatment, the

highest extraction of urease (20% of the total extracellular activity present in the soil) and the highest extraction of humic matter (31.2% of the total).

In order to investigate the differences among the effect of several procedures, in particular on the yield of

¹ S. A. WAKSMAN, in *Humus, Origin, Chemical Composition and Importance in Nature* (Balliere, Tindall and Cox, London 1936).

² M. M. KONONOVA, in *Soil Organic Matter* 2nd edn. (Pergamon Press, Oxford 1966).

³ M. SCHNITZER and S. U. KHAN, in *Humic Substances in the Environment* (Marcel Dekker, Inc. New York 1972).

⁴ A. D. McLAREN, A. M. PUKITE and I. BARSHAD, *Soil Sci.*, in press.

⁵ P. NANNIPIERI, B. CECCANTI, S. CERVELLI and P. SEGUI, *Soil Biol. Biochem.* 6, 359 (1974).

Table I. Organic matter, total amino acid-N and urease extracted

Extracting solution	Total amino acid-N ($\mu\text{g/g}$ soil) ^a	Urease activity (% of the total content in soil) ^d	Organic matter (mg/g soil) ^b
Sol. A	218	N.d.	9.28
Sol. A + USV ^c	202	1.30	8.60
Sol. A (double phase)	231	2.77	10.84
Sol. B	299	N.d.	12.73
Sol. B + USV	311	N.d.	13.23
Sol. B (double phase)	275	N.d.	14.70
Sol. C	351	N.d.	14.94
Sol. C + USV	329	N.d.	14.01
Sol. C (double phase)	331	N.d.	15.09
Sol. D	414	20.00	20.20
Sol. D + USV	403	18.00	17.41
Sol. D (double phase)	350	18.00	16.50

^aThe total amino acid-N content was determined adding up the single values. ^bThe organic matter was determined by bichromate oxidation.

^cUSV, ultrasonic vibration. ^dN.d., not detectable.