

Am eviscerierten (und damit pankreatektomierten) Tier¹⁵ bewirken Sulfonharnstoffe im Gegensatz zu unseren Versuchen keine Steigerung der Glukose-Oxydation. Möglicherweise fehlen hier Faktoren, welche für die Sulfonharnstoffwirkung auf den Muskel nötig und am Zwerchfell von Normaltieren vorhanden sind. Untersuchungen, ob die Gegenwart von Insulin oder andere Faktoren Voraussetzung für die gefundene Wirkung der Sulfonharnstoffe am isolierten Rattenzwerchfell ist, sind im Gange.

A. PLETSCHER und K. F. GEY

Medizinische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 18. Juni 1957.

Summary

The action of blood sugar depressing sulfonyleureas on glucose and oxygen uptake, as well as on glycogen content and formation of $C^{14}O_2$ from uniformly labelled C^{14} -glucose was investigated in rat hemidiaphragms incubated in phosphate buffer. The following results were obtained: (1) Tolbutamide and Carbutamide increased the glucose uptake. (2) Tolbutamide decreased the glycogen-content. (3) Oxygen uptake as well as formation of $C^{14}O_2$ were increased by Tolbutamide. (4) The action of Tolbutamide and insuline was equal with respect to glucose uptake but different as regarding the glycogen content, oxygen uptake and CO_2 -formation.

It is concluded that sulfonyleureas increase glucose oxidation in the rat hemidiaphragm probably without increasing insulin sensitivity. To our knowledge this mechanism of action has hitherto not been described.

¹⁵ A. WICK, B. BRITTON und R. GRABOWSKI, *Metabolism* 5, 739 (1956).

Photolyse ultraviolette et photoréactivation des bactéries – aspects de dépolymérisation et repolymérisation des acides nucléiques bactériens

Causes physicochimiques du défaut de photoréactivation différée

L'irradiation ultraviolette réalisée notamment par des longueurs d'onde de 2537 Å correspondant à la bande d'absorption des acides nucléiques, provoque l'inhibition de la croissance des bactéries. Cette inhibition est susceptible d'être annulée par photoréactivation due à l'irradiation des mêmes bacilles par des rayons du spectre visible à longueur d'onde comprise entre 3600 et 4900 Å¹.

Le processus d'inhibition de la croissance bactérienne sous l'action des rayons UV. s'accompagne d'une diminution de la teneur² en acide désoxyribonucléique par mg de bactérie, tandis qu'il y a augmentation de la teneur en fraction acidosoluble, c'est-à-dire des constituants de nature purique, pyrimidique, du P organique

acidosoluble, de ribose et désoxyribose³. Cette réduction de la teneur en acide nucléique a été interprétée comme correspondant à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques dans les microorganismes irradiés². L'accumulation des constituants de poids moléculaire peu élevé dans la substance des bactéries irradiées a, pour sa part, été interprétée comme l'expression d'un arrêt d'intégration des précurseurs dans la structure de la macromolécule de l'acide désoxyribonucléique³.

La photoréactivation par action sur les bactéries soumises à l'effet des radiations UV., de la lumière visible va de pair avec le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique, ce qui a été interprété comme un retour à la synthèse de l'acide désoxyribonucléique². La photoréactivation après irradiation par UV. des microorganismes peut être complète si elle est tentée immédiatement après les UV. Cependant les microorganismes perdent complètement l'aptitude à la photoréactivation lorsqu'ils sont conservés à l'abri de la lumière pendant une durée de 2 à 3 h⁴. Ce phénomène n'a pas trouvé d'explication et nous avons abordé son étude.

Les phénomènes étudiés semble-t-il peuvent être expliqués d'une façon différente. On peut en effet supposer que la dissipation de l'énergie radiante UV. acquise peut conduire à une dépolymérisation des acides nucléiques⁵ et à une accumulation des fragments issus de cette structure. La photoréactivation résultant de l'action des rayons à longueur d'onde supérieure et à énergie par quantum moindre, pourrait causer la repolymérisation de ces fragments et par conséquent le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique bactérien. En effet, dans ces molécules complexes, les constituants des liaisons chimiques rompues par suite de l'irradiation peuvent, du fait de leur poids moléculaire encore considérable, être maintenus suffisamment rapprochés pour rendre possible des recombinaisons⁶ sous l'influence d'un apport énergétique modéré venant par exemple de la photoréactivation. Nous avons été amenés à supposer que le défaut de la photoréactivation, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, pourrait être imputable au départ des fragments de l'acide nucléique de la substance bactérienne, et à leur diffusion vers la phase aqueuse du milieu ambiant. En ce cas, le retour au taux initial de l'acide désoxyribonucléique n'aurait plus été possible.

La dépolymérisation de l'acide désoxyribonucléique de la substance bactérienne doit conduire à une accumulation des fragments à poids moléculaire peu élevé, porteurs des groupements fonctionnels. Ainsi la densité des groupements fonctionnels et par conséquent de la charge par unité de surface de la substance bactérienne doit augmenter aussi longtemps que les fragments provenant de la dépolymérisation des acides désoxyribonucléiques bactériens sont présents dans la substance du microorganisme irradié par les UV. Si, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées par les UV. dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, une diffusion de ces fragments, comme nous l'avons supposé, a lieu – la densité de charge par unité de surface devrait nécessairement se trouver réduite. On devrait en ce cas pouvoir retrouver dans le

¹ A. KELNER, *Proc. nat. Acad. Sci.* 35, 73 (1949). – A. KELNER, W. D. BELLAMY, G. E. STAPLETON et M. R. ZELLE, *Bact.* 19, 22 (1955). – A. KELNER, *J. Bacteriol.* 58, 511 (1949); *J. gen. Physiol.* 34, 835 (1951).

² A. KELNER, *J. Bact.* 65, 252 (1953).

³ D. KNAZIR et M. ERRERA, *Biochim. biophys. Acta* 14, 62 (1954).

⁴ A. KELNER, *Bull. N. Y. Acad. Med.* 26, 189 (1950).

⁵ A. HOLLAENDER, J. P. GREENSTEIN et W. V. JENNETTE, *J. nat. Cancer Inst.* 2, 23 (1941).

⁶ Mc. D. LAREN, *Advanc. Enzymol.* 9, 76 (1949).

milieu ambiant ces fragments de l'acide désoxyribonucléique grâce à leur spectre caractéristique dans l'ultra-violet et cela à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans le milieu dans lequel ont séjourné les bactéries, milieu analysé immédiatement après l'irradiation.

Nous avons eu recours à des mesures de mobilité électrophorétique des bactéries en vue de déterminer la charge par unité de surface de celles-ci⁷. Des mesures ont été effectuées soit immédiatement après l'irradiation soit après 24 h de conservation des bactéries irradiées à l'abri de la lumière. D'autre part les milieux dans lesquels ont séjourné les bactéries ont été soumis à l'analyse spectrophotométrique tendant à déceler la présence des fragments provenant de la structure de l'acide désoxyribonucléique. Ces mesures ont été effectuées sur les milieux provenant des suspensions bactériennes immédiatement après l'irradiation par UV. et également après 24 h de séjour des bactéries irradiées à l'abri de la lumière.

Technique expérimentale: Les mesures ont été effectuées sur des bacilles *Escherichia coli* cultivés sur agar puis dans l'eau peptonée à 1% durant 24 h à 37°. Les bactéries ont été décantées par centrifugation puis lavées et décantées par centrifugation trois fois dans le milieu tampon acétique ($\mu = 0,01$; pH = 5,5). Des fractions de 20 ml de la suspension bactérienne à $4 \cdot 10^9$ cellules/ml ont été irradiées par des doses variables de rayons UV. d'une lampe germicide G.E. Chaque fraction de la suspension bactérienne ainsi irradiée a été partagée en deux portions à 10 ml chacune dont l'une est analysée immédiatement, l'autre après 24 h de séjour à l'abri de la lumière. Ces suspensions bactériennes sont chaque fois filtrées sur un filtre de Seitz; le filtrat est soumis à l'analyse spectrophotométrique entre 2300-2700 Å, tandis que les bactéries sont soumises à des mesures de mobilité électrophorétique dans le milieu tampon acétique ($\mu = 0,01$; pH = 5,5). La densité de charge par unité de surface σ pour ce milieu à ions monovalents est évaluée d'après

$$\sigma = 2 \sqrt{\frac{NDkT}{2000}} \mu \sin h \frac{\zeta e}{2kT} \tau.$$

Les courbes de la densité de charge par unité de surface en fonction de l'énergie radiante UV. mise en jeu, déterminées immédiatement après l'irradiation et également après 24 h de conservation à l'abri de la lumière montrent:

a) Une augmentation de la charge par unité de surface de la substance des bactéries immédiatement après leur irradiation par rayons UV., par action des faibles énergies mises en jeu; aux énergies UV. supérieures absorbées il y a compétition entre l'effet des radiations UV. déterminant des dissociations électrolytiques et conduisant à un accroissement de la densité de la charge par unité de surface (ouverture des liaisons peptides etc.) d'une part, et l'effet conduisant au cisaillement des groupements fonctionnels et réduisant par conséquent

la densité de charge par unité de surface (par désamination, décarboxylation etc.) d'autre part⁸.

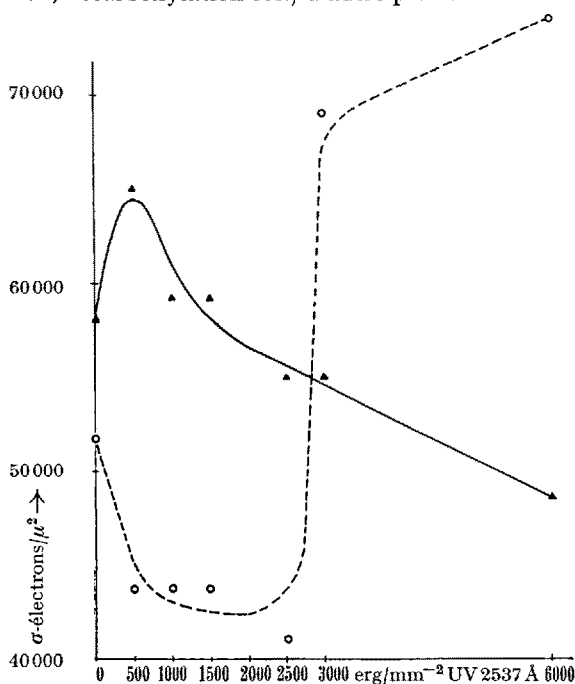


Fig. 1. Etude électrophorétique des bactéries (*Escherichia coli*) irradiées par des rayons UV. à 2537 Å, en fonction de l'énergie radiante mise en jeu (abscisse), sur l'axe des ordonnées 0 densité de charge par unité de surface (erreur moyenne 1%).

— bactéries examinées immédiatement après l'irradiation.
- - - bactéries irradiées examinées passé 24 h de séjour à l'abri de la lumière.

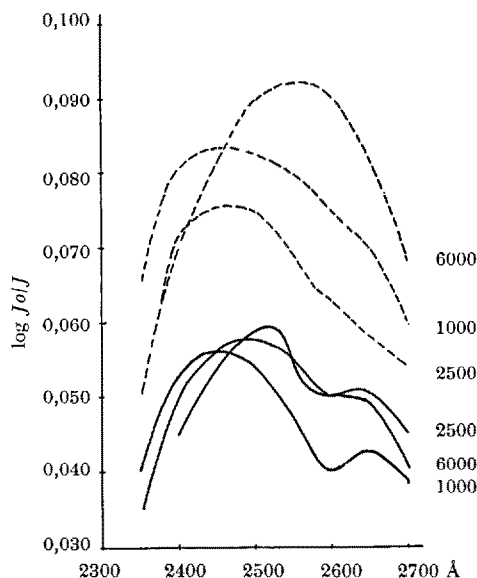


Fig. 2. Etude spectrophotométrique des liquides dans lesquels ont séjourné des bactéries (*Escherichia coli*) irradiées par doses différentes (1000, 2500, 6000 erg./mm²) des rayons UV. à 2537 Å.

— liquides examinés immédiatement après l'irradiation.
- - - liquides dans lesquels les bactéries irradiées par des rayons UV. ont séjourné 24 h étant à l'abri de la lumière.

⁷ H. A. ABRAMSON, L. S. MOYER et M. H. GORIN, *Electrophoresis of Proteins* (Reinhold publ. N.Y. 1942). - L. S. MOYER, J. Bacteriol. 31, 531 (1936); 32, 433 (1936).

⁸ M. W. LISSE et R. P. TITSLER, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. 28, 811 (1931), ont observé une mobilité électrophorétique accrue des bactéries irradiées par la lumière UV. immédiatement après l'irradiation, suivie d'une chute de la mobilité électrophorétique précédant l'effet léthal.

b) Une diminution nette de la charge par unité de surface des mêmes bactéries irradiées, mais conservées dans leur milieu à l'abri de la lumière durant 24 h.

L'analyse spectrophotométrique des milieux tampons acétiques dans lesquels les bactéries, *Escherichia coli*, ont été soumises à l'action des rayons ultra-violetes montre:

a) Un même niveau de substances absorbant la lumière dans la région du spectre correspondant à l'absorption des acides nucléiques, pour les liquides provenant des bacilles immédiatement après l'irradiation.

b) un enrichissement de ces milieux tampons en substances absorbant la lumière dans la région du spectre correspondant à l'absorption des acides nucléiques, des liquides dans lesquels les bacilles irradiés par les rayons UV. ont séjourné 24 h à l'abri de la lumière (Courbe 2).

L'analyse électrophorétique de la substance bactérienne met en relief le départ, après un certain temps de séjour à l'abri de la lumière, des substances qui étaient responsables de l'accroissement de la densité de charge par unité de surface dans les premiers moments qui suivent l'irradiation par rayons UV. L'analyse spectrophotométrique des liquides ayant contenus ces bacilles prouve en même temps la diffusion de ces substances de la cellule bactérienne vers la phase aqueuse et révèle leur nature. La photoréactivation possible dans les premiers moments qui suivent l'irradiation UV. des bacilles du fait de la présence dans la substance bactérienne des fragments de dépolymérisation de la macromolécule de l'acide nucléique, est rendu impossible lors du départ (diffusion) de ces fragments vers la phase aqueuse. Ces observations semblent indiquer que le phénomène de la photoréactivation serait lié à la répolymérisation de la macromolécule de l'acide désoxyribonucléique primitivement scindée.

I. GRUNDLAND,
H. KRZYWICKA et
M. CHOJNACKI

Institut de Biochimie et Biophysique P.A.N., Université de Varsovie, le 24 avril 1957.

Summary

Electrophoretic analysis of bacterial substance proves the departure, from UV irradiated microbes screened from light for a certain time, of substances which were responsible for increasing the charge density by surface unit during the first moments which follow the irradiation by UV rays. Spectrophotometric analysis of liquids having contained these bacilli proves concomitantly the diffusion of those substances from the bacterial substance to the aqueous phase and reveals their nature. The photoreactivity which is possible during the first moments following the UV irradiation of bacilli, due to the presence of the fragments of depolymerisation of nucleic acid macromolecule in the bacterial substance, becomes impossible after the departure (diffusion) of those fragments to the aqueous phase. These observations seem to show that the phenomenon of photoreactivity is connected with the repolymerisation of the macromolecule primitively divided of desoxyribonucleic acid.

Pro Memoria Carl Neuberg

Editorial Note. The Nestor of biochemistry, 14 days before his death, had worked out the following lecture experiments on the chemism of certain fundamental biochemical processes of intermediary metabolism. We publish this original idea, which is of general and didactic interest, in memory of the great research worker and teacher, CARL NEUBERG.

Lecture-Demonstration

by

CARL NEUBERG*

Experimental Demonstration of some fundamental biochemical reactions**.

- (1) Phosphorylation;
- (2) Enzymatic dephosphorylation; simultaneous formation of insoluble bone salts;
- (3) New form of trapping method for fixation of metabolic intermediates;
- (4) Solubilization of the inorganic portion of bones and teeth in a neutral medium;
- (5) Hydrotropic solubilization of insoluble matter;
- (6) Instantaneous formation of free mineral acid by interaction of two neutral substances;
- (7) Instantaneous occurrence of the carbamate reaction.

Ladies and Gentlemen,

You all know well the facts about which I will speak to you, but not all of you may have seen the corroborating experiments.

(1) Phosphorylation was discovered in 1905 by the famous Russian plant physiologist LEONID IWANOFF and described by him in French and German journals¹. IWANOFF already showed that in many cases especially the biosynthetically famed phosphoorganic compounds consist of phosphoric acid esters of carbohydrates. Further work on this problem was done by HARDEN². IWANOFF never received due credit for his important discovery since he did the worst thing that a researcher can do in such a situation: he died.

I want to show you the fundamental principle of the discovery in an extremely simple experiment as we can demonstrate it to-day based on the experience of 5 decades.

We start with a 20% solution of glucose, fructose or sucrose. To 100 ml of this sugar solution we add a freshly prepared, therefore well buffered solution of 4.2 g sodium dihydrogen phosphate dihydrate and 1.1 g of sodium bicarbonate in 25 ml water. The resulting 125 ml of liquid are shaken at 37° with 10 g of one of the dried yeasts now commercially available plus 20 ml carbon-

* Two weeks before he died Prof. NEUBERG gave this lecture-demonstration at the New York Medical College. He spoke the introductory and the closing remarks, his daughter I. S. FORREST read the lecture, his co-worker A. L. GRAUER carried out the experiments which she had adapted for lecture demonstration. After the lecture, tributes to Dr. NEUBERG were made by Dr. F. F. NORD of Fordham University and Dr. SEVERO OCHOA of New York University.

** Supported by a contract of the US Atomic Energy Commission with the New York Medical College.

¹ I. IWANOFF, Trav. Soc. Nat. St.-Petersb. (Leningr.) 34 (1905); Ber. dtsh. bot. Ges. 20, 366 (1902); Z. physiol. Chem. 39, 31 (1903); 42, 464 (1904).

² A. HARDEN, *Alcoholic fermentation* (Longmans, Green & Co., London-New York 1932).