

It was found that a 50% inhibition of growth of *E. coli* B by 5-azauracil is achieved at a concentration of 1.25×10^{-4} M. The relationship of growth inhibition to the concentration of the inhibitor has a different character with 5-azauracil than with 6-azauracil. It was further found that, in the presence of a subbacteriostatic concentration of 5-azauracil, no formation of elongated cellular forms of bacteria takes place, in contrast to what is encountered with 6-azauracil¹¹. This finding indicates the existence of a different mechanism of inhibition for 6- and 5-azauracil toward *E. coli*. The *E. coli* cells were found to acquire very rapidly a resistance toward 5-azauracil.

The ability of some pyrimidine derivatives to counteract the growth-inhibition effect of 5-azauracil follows from the data of the Table. Thus it may be seen that 5-azauracil represents for *E. coli* an antimetabolite of ribonucleic acid pyrimidine bases, or rather of their ribosides. Orotic acid, which is known to be a precursor of pyrimidine bases of nucleic acids in numerous biological systems, does not counteract the inhibitory effect of 5-azauracil. This observation can be explained by the inability of *E. coli* cells to utilize exogenous orotic acid for synthesis of pyrimidine bases of nucleic acids, as was shown¹² for the *E. coli* strain 63-86.

The effect of metabolites of nucleic acids on the growth inhibition of *E. coli* B caused by 5-azauracil. 5-Azauracil concentration was 5×10^{-4} M, that of the metabolites also 5×10^{-4} M. The values represent the growth of the culture expressed in % culture density as obtained in the absence of inhibitor

Metabolite added to the medium along with the inhibitor	Growth % control
Adenine	0
Guanine	1
Uracil	114
Cytosine	111
Thymine	2
Orotic acid	0
Adenosine	1
Guanosine	0
Uridine	98
Cytidine	104
Deoxyuridine	85
Deoxycytidine	84
Thymidine	60

The antagonistic effect of deoxyuridine and deoxycytidine can be explained by an utilization of their bases. It is of interest, however, to note the antagonistic effect of thymidine. *E. coli* cells apparently transform thymidine to pyrimidine precursors of ribonucleic acids while thymine cannot be utilized for this purpose.

This work and further experiments will be described in detail in the Collection of Czechoslovak Chemical Communications.

F. ŠORM, J. ŠKODA, and J. KÁRA

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czechoslovak Academy of Science, Prague, December 31, 1959.

Zusammenfassung

Es wurde ein inhibierender Effekt von 5-Azauracil auf Kulturen von *Escherichia coli* B festgestellt, der durch die Anwesenheit von Uracil, Cytosin und ihren Ribosiden aufgehoben wird. Desoxyuridin, Desoxycytidin und Thymidin beseitigen teilweise die hemmende Wirkung von 5-Azauracil.

Adsorption and Active Transport

In a number of ion transport studies it has been found that the kinetic data obtained conform to the Michaelis-Menten treatment of enzyme action¹. This proved especially valuable in relation to the type of competition exhibited by ions not normally involved in active transport. Thus EPSTEIN and HAGEN were able to conclude that in barley roots one type of binding site is specific for K, Rb, and Cs ions since these ions exhibit a competitive type of inhibition, the three as a group differing from Na or Li ions in being bound preferentially. The high degree of specificity found in their study is reflected in the differential uptake of K ions from a medium in which Na ions are preponderant.

Current transport hypotheses localizing the active processes in the cell membrane often seem to imply that the applicability of the Michaelis-Menten treatment indicates the presence of carrier mechanisms. Since the success of this treatment is due solely to the fact that the ion uptake follows a saturation-type kinetics, the same data can be taken as indicating the binding of K or other competing ions onto labile, poison sensitive intracellular adsorption sites. This view is supported below by showing the Michaelis-Menten equation to be formally identical with the Langmuir adsorption formula, thus extending the demonstration of the identity of the latter with the law of mass action².

Given a reaction $A + B \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} C$ where *A*, *B*, and *C* represent molecular species and *k*₁ and *k*₋₁ the forward and backward reaction rate constants, one obtains the following expression for the rate of formation of *C*, the concentrations of *A*, *B*, and *C* being represented by small case letters: $dc/dt = k_1(a - c)(b - c) - k_{-1}c$.

At equilibrium $dc/dt = 0$ and $(a - c)(b - c)/c = k_{-1}/k_1 = K$. *K* represents the dissociation constant of the molecular species *C*, its reciprocal being the equilibrium constant, a measure of the affinity between *A* and *B*.

If $a \ll b$, then $(b - c)$ can be taken as approximately equal to *b* and constant, the formula reducing to $b(a - c)/c = K$, or $c = ab/Kb$, or in the linear form $1/c = 1/b K/a + 1/a$.

If in this simple kinetic system one regards *A* as the enzyme, *B* its substrate, *C* denoting the enzyme-substrate complex, the expression represents the Michaelis-Menten treatment applicable to the limiting case when the enzyme-substrate complex does not react with a second substrate to yield the free enzyme and the products, as in the case when the enzyme reacts with an inhibitor.

If on the other hand one regards *c* as the amount of adsorbed substance in moles per unit volume (i. e. bound to adsorption sites) and *a* as the total concentration of adsorption sites, also in moles per unit volume, *b* retaining its original meaning of substrate concentration, then the formula represents a linear transformation of Langmuir's adsorption isotherm.

¹ E. EPSTEIN and C. H. HAGEN, *Plant Physiol.* **27**, 457 (1952). – E. EPSTEIN and J. E. LEGGETT, *Amer. J. Bot.* **47**, 785 (1954). – E. EPSTEIN, *Plant Physiol.* **30**, 529 (1955). – A. ROTHSTEIN, in *Electrolytes in Biological Systems* (A. M. SHANES Edit., Amer. Physiol. Soc., Washington, D. C. 1955), p. 65. – E. J. CONWAY and F. DUGGAN, *Biochem. J.* **69**, 265 (1958). – A. ROTHSTEIN and M. BRUCE, *J. cell. comp. Physiol.* **51**, 145 (1958).
² D. I. HITCHCOCK, *J. Amer. chem. Soc.* **48**, 2870 (1926).
³ W. F. WIDDAS, *J. Physiol., London* **118**, 23 (1952). – W. F. WIDDAS, *J. Physiol., London* **125**, 163 (1954). – HISASHI SANUI and N. PACE, *J. gen. Physiol.* **42**, 1325 (1959). – A. S. TROTSCHIN, *Das Problem der Zellpermeabilität* (Gustav Fischer Verlag, Jena 1958).

This simple derivation is intended to point out adsorption as the essential feature of intracellular ion accumulation studies in which the Michaelis-Menten treatment was used. These studies are thus brought in line with other investigations in which the Langmuir's adsorption formula was found to apply both in the case of living and non living systems³.

I wish to thank Drs. G. UNGAR and B. W. ZWEIFACH for their kind interest and encouragement.

E. ASCHHEIM

Department of Pathology, New York University, Bellevue Medical Center, New York, February 5, 1960.

Résumé

On démontre l'identité formelle de l'équation de Langmuir (pour l'adsorption) et de celle de Michaelis-Menten, toutes deux fondées sur la loi de «mass action». Cette démonstration justifie la vue d'après laquelle l'accumulation des ions par les cellules vivantes selon la loi de Michaelis-Menten représente une liaison d'adsorption au niveau intracellulaire. Les centres d'adsorption, qui peuvent être inactivés par divers poisons chimiques, dépendraient du métabolisme de la cellule. Cette conception offre une alternative à l'hypothèse du «carrier» qui a été souvent postulée.

Über die Beeinträchtigung der Wirkung von Spindelgiften in der Zellkultur durch menschliches Serum sowie durch Seren verschiedener Tierspezies

Über die Beeinflussung der Wirksamkeit von Pharmaka durch Serumproteine liegen in der Literatur zahlreiche Beobachtungen vor. In den meisten Fällen handelt es sich dabei nicht um eine Wirkung der Proteine auf das biologische Testobjekt, sondern um eine Bindung der betreffenden Wirkstoffe an Proteine, wodurch ihre Wirkung abgeschwächt oder der Wirkungseintritt verzögert wird. Noch relativ wenig sind aber die Unterschiede, die hinsichtlich dieser Bindungsfähigkeit zwischen den Seren verschiedener Tierarten bestehen, untersucht worden. Im folgenden soll kurz über eine Beobachtung auf diesem Gebiet berichtet werden.

Bei der Prüfung der zytostatischen Wirkung von Podophyllinabkömmlingen in der Gewebekultur verwendeten wir Fibroblasten von Hühnerembryonen und ein Nährmedium, das neben Rinderamnionflüssigkeit und Rinderembryoextrakt auch 5% Serum enthält¹. Podophyllin bewirkt, wie Colchicin, eine Arretierung der Mitosen in der Metaphase, wodurch es zu einer Anhäufung der frühen und zu einer Abnahme der späten Mitosephasen kommt. Diese Wirkung ist in der Gewebekultur leicht zu beobachten und auch quantitativ zu erfassen, da das vollständige Verschwinden der Ana- und Telophasen einen gut definierten Endpunkt darstellt. Wir machten nun die Beobachtung, dass bei Verwendung von 5% Menschenserum andere Werte als mit pferdeserumhaltigem Medium erhalten wurden. Die meisten Untersuchungen wurden mit N-Dodecylpodophyllsäurehydrazid durchgeführt, und es ergab sich als Durchschnitt von 11 Versuchen, dass von diesem Präparat beim Arbeiten in menschenserumhaltigem Medium 3,05(± 0,30)mal höhere Konzentrationen nötig sind als mit pferdeserumhaltigem Medium, um den

gleichen Effekt, nämlich die Arretierung aller Mitosen, zu erzielen. Der Unterschied ist nach dem *t*-Test statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$). Die voll antimitotisch wirksame Konzentration dieser Substanz liegt in unserer Versuchsanordnung bei $10^{-6,6}$ (Menschenserum), bzw. bei $10^{-7,1}$ (Pferdeserum). Beim von uns verwendeten Menschenserum handelt es sich um eine Mischung vieler Seren (Standardserum des Schweiz. Roten Kreuzes), die sowohl in getrockneter als auch in flüssiger Form identische Resultate ergab. Das Pferdeserum stammte von einzelnen Tieren und wurde von zwei verschiedenen Quellen bezogen. Ein Vergleich zwischen pferdeserumhaltigem und serumfreiem Medium zeigte, dass auch Pferdeserum die Wirkung der Podophyllinderivate abschwächt. In unserer Versuchsanordnung war mit Pferdeserum die doppelte Menge Dodecylpodophyllsäurehydrazid nötig, um eine gleiche Wirkung wie im serumfreien Medium zu erzielen.

Mit derselben Substanz wurden dann noch andere Seren in gleicher Weise, aber in einer geringeren Zahl von Experimenten untersucht. Menschliches Nabelschnurmischserum² ergab gleiche Resultate wie das von Erwachsenen stammende Standardserum. Die andern geprüften Seren (von Rind, Meerschweinchen, Ratte, Maus, Hahn) hingegen verhielten sich ungefähr gleich wie Pferdeserum, schwächten also die Podophyllinwirkung bedeutend weniger stark ab als Menschenserum. Seren von verschiedenen Kaninchen ergaben stark unterschiedliche Resultate. Alle Seren wurden in nichtinaktiviertem Zustand verwendet. Ein Vergleich beim Pferde- und Menschenserum zeigte jedoch, dass Inaktivierung (30 min 56°C) auf die hier untersuchte Serumeigenschaft keinen Einfluss hat.

Eine Reihe anderer Podophyllinderivate zeigte denselben, durch die Verwendung von Menschen- bzw. Pferdeserum verursachten Wirkungsunterschied wie das oben erwähnte Dodecylhydrazid. Hingegen konnte kein solcher Unterschied festgestellt werden beim Colchicinderivat Demecolcin³. Im Mittel von 7 Versuchen war hier mit menschenserumhaltigem Medium 1,016mal mehr Demecolcin nötig als im Medium mit Pferdeserum, ein Wert, dessen Abweichen von 1,00 natürlich noch weit innerhalb der Fehlergrenzen der Methode liegt. Da Fibroblasten von Hühnerembryonen in Medium mit Menschen- oder Pferdeserum etwa gleich gut wandern und sich vermehren, liegt der Gedanke nahe, für die unterschiedliche Wirkung der Podophyllinderivate in menschen- bzw. pferdeserumhaltigen Medien eine verschieden starke Bindung dieser Stoffe an die Proteine des Menschen- bzw. Pferdeserums verantwortlich zu machen. Diese Vermutung konnte durch Dialyseversuche bestätigt werden.

Ein bekanntes Beispiel für die Wirkstoffbeeinflussung durch Serumproteine sind die Herzglykoside. In dieser Stoffgruppe wurde gezeigt, dass kleine Verschiebungen

¹ A. CERLETTI, H. EMMENEGGER und H. STÄHELIN, *Actualités pharmacol.* 12, 103 (1959).

² Freundlicherweise vom Frauenspital Basel zur Verfügung gestellt.

³ Verwendet wurde das Präparat Colcemid, CIBA.

⁴ E. SUTER, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* 2, 211 (1944).

⁵ E. ROTHLIN und R. BIRCHER, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 5, 457 (1954).

⁶ R. A. HOEKSTRA, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 162, 649 (1931).

⁷ A. FARAH, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 83, 143 (1945).

⁸ E. K. OYAKAWA und B. H. LEVEDAHL, *Arch. Biochem.* 74, 17 (1958).

⁹ J. AVIGAN, *Cancer Res.* 19, 831 (1959).

¹⁰ J. V. TAGGART, *Amer. J. Physiol.* 167, 248 (1951).

¹¹ E. ROTHLIN, *Vjschr. naturforsch. Ges. Zürich* 40, 195 (1945).

¹² A. GOLDSTEIN, *Pharmacol. Rev.* 1, 102 (1949).