

## Heats of Neutralization of Fructose-1,-6,-diphosphate

The heats of neutralization of fructose-1,-6,-diphosphate were determined in two experiments. The apparatus was a simple "students assembly" consisting of a  $\frac{1}{2}$  liter Dewar flask and BECKMANN thermometer. The sodium hydroxyde solution was admitted suddenly into the fructose diphosphate solution in the Dewar flask. The temperature trends were noted before and after neutralization and extrapolated in the usual manner. Control determinations on phosphoric acid were all within 4% of the data in LANDOLT-BÖRNSTEIN. The results on fructose diphosphate were 14.7 resp. 14.9 Cal/Mole for the primary and 14.0 resp. 13.5 Cal/Mole for the secondary hydrogen ions. The free acid was prepared from freshly purified Ba-salt by reaction with the calculated amount of sulfuric acid. The solution was roughly 0.02 molar and it was neutralized with sodium hydroxide.

The experiments were originally designed to compare the heats of neutralization with the corresponding ones of phosphoric acid: 14.8 Cal/Mole for the primary and 12.2 Cal/Mole for the secondary hydrogen ion. It was thought possible that electrostatic repulsion between the two ionized phosphoric acid groups on the same molecule might cause an appreciable decrease in heat of neutralization, but actually a slight but significant increase was observed for the secondary hydrogen ions. Irrespective of speculations, however, the approximate determination of these heats of neutralization may be interesting enough to warrant their publication.

F. KÖRÖSY

Délíbab út. 28, Budapest, August 2, 1954.

### Zusammenfassung

Es wurde geprüft, ob die Neutralisationswärmen der beiden ionisierten Phosphatgruppen von Fructose-diphosphat durch deren elektrostatische Wechselwirkung beeinflusst werden. Dabei ergab sich für die primären H<sup>+</sup>-ionen kein Unterschied gegenüber Phosphorsäure, für die sekundären H<sup>+</sup>-ionen dagegen eine geringe Erhöhung der Neutralisationswärme.

### Les transformations des nucléoides de *Escherichia coli* déclenchées par les rayons X

Nous avons décrit précédemment les transformations subies par la cellule bactérienne, en particulier par son appareil nucléaire (nucléoides) après irradiation ultraviolette<sup>1</sup>: Les cellules s'allongent, les nucléoides deviennent polychromosomiques et ensuite fragmentés; 30 min déjà après l'irradiation, toutes les cellules présentent, d'une façon très homogène, des nucléoides fragmentés. La différence entre les bactéries survivantes et les mortes ne devient visible que 60 à 90 min (selon la dose d'UV.) après l'irradiation. Des doses d'UV. très faibles, tuant moins de 10% de la population, ont toujours cette même action sur les nucléoides pendant les

20 min qui suivent l'irradiation: les cellules s'allongent et le noyau est polychromosomique. Les fortes doses (survie de moins d'1%) retardent ou empêchent la transformation caractéristique; les nucléoides sont alors simplement mal définis («diffus»).

Nous nous sommes proposé d'étudier l'action des rayons X sur les nucléoides bactériens pour savoir si ce rayonnement ionisant provoque les mêmes transformations que les UV. qui ne peuvent qu'exciter les molécules. Il était intéressant en particulier de comparer l'action des deux rayonnements sur les cellules lysogènes, car les rayons X n'induisent la production de phages que sur 50% au plus des cellules lysogènes (LATARJET<sup>1</sup>), alors que les rayons UV. induisent plus de 99% de la population (WEIGLE et DELBRÜCK<sup>2</sup>).

Les nucléoides ont été observés au microscope électronique selon la méthode décrite ailleurs<sup>3</sup>. Les souches *E. coli* B non lysogène, K12 ( $\lambda$ ), lysogène pour le phage  $\lambda$ , et K12 S non lysogène et sensible au phage  $\lambda$ , ont été étudiées. Les bactéries sont cultivées à 37°C jusqu'à une densité de 3 à 5,10<sup>8</sup> cellules par millilitre; après avoir été centrifugées, elles sont resuspendues dans du milieu frais à 4°C et exposées aux rayons X d'une longueur d'onde moyenne de 0,9 Å (Anticathode Molybdène, 33 kV, filtre Al). Elles sont ensuite diluées dans du milieu frais à 37°C et cultivées. Le graphique montre les courbes de survie en fonction de la dose de rayons X en röntgen (r) pour les trois souches. Nous y avons indiqué, en pointillé, le pourcentage de cellules K12 ( $\lambda$ ) induites, c.-à-d. productrices de bactériophages.

Les résultats de l'examen morphologique sont les suivants:

- a) les trois souches se comportent – grossièrement – de façon identique;
- b) les nucléoides polychromosomiques respectivement fragmentés se retrouvent toujours sur une partie au moins de la population;
- c) deux nouvelles transformations apparaissent pour les doses relativement fortes, transformations qui sont spécifiques pour les rayons X.

*Doses faibles*: 800–2500 r, survie 90% à 100%. La figure 1 montre les nucléoides de *E. coli* B a) en croissance normale, b) 30 min après irradiation aux rayons X avec 800 r. On voit que cette faible dose a suffi pour provoquer une transformation vers la polychromosomie dans la plupart des cellules.

La figure 2 montre des cellules 60 min après une irradiation avec 2500 r. On voit un allongement et une polychromosomie très marquée aussi bien sur K12 S (fig. 2a) que sur B (fig. 2b). Si l'on continue à cultiver, les nucléoides se regroupent et les cellules allongées se divisent en cellules à appareil nucléaire normal.

*Doses moyennes*: 2–4,10<sup>4</sup> r, survie entre 10 et 1%. La figure 3 montre l'évolution de K12 ( $\lambda$ ) après une irradiation de 2,10<sup>4</sup> r. 15 min après l'irradiation (fig. 3a), nous trouvons des cellules polychromosomiques et des cellules aux nucléoides fragmentés, mais aussi d'autres dans lesquelles les fragments sont très rapprochés et forment une vésicule centrale (ou polaire, dans le cas d'une division amorçée). 30 min après l'irradiation, la fragmentation du noyau est particulièrement bien visible dans les cellules allongées qui se différencient nettement des cellules plus courtes à noyau vésiculaire (fig. 3b). 60 min après l'irradiation,

<sup>1</sup> R. LATARJET, Ann. Inst. Pasteur 81, 389 (1952); communications personnelles.

<sup>2</sup> J. WEIGLE et M. DELBRÜCK, J. Bact. 62, 301 (1951).

<sup>3</sup> E. KELLENBERGER, Exper. 8, 99 (1952); Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

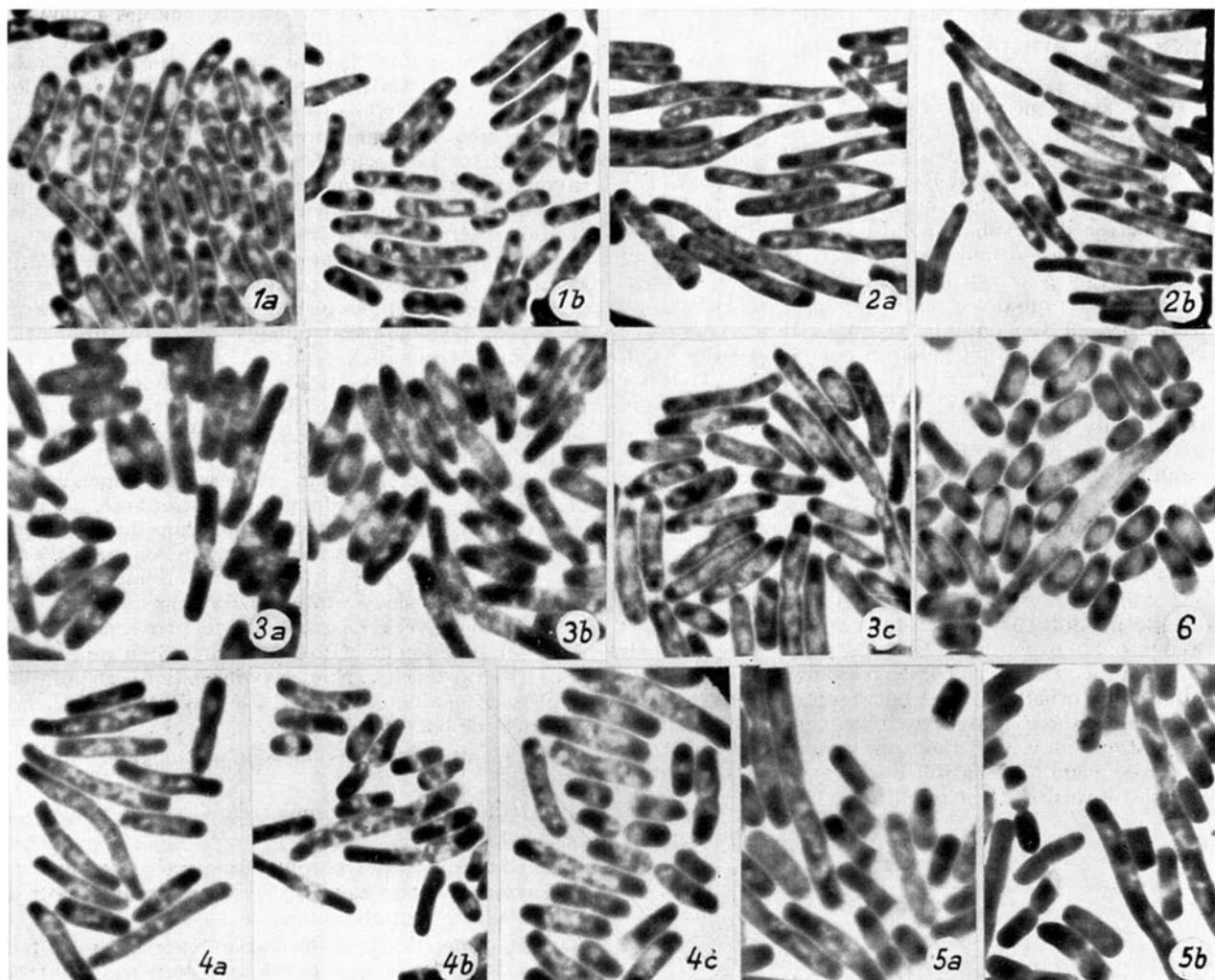


Fig. 1. Les nucléoides de *E. coli* B: a) sans irradiation; b) après irradiation de 800 r.

Fig. 2. Irradiation faible de 2500 r: a) sur *E. coli* B, observé après 60 min de culture; b) *E. coli* S, observé après 30 min de culture.

Fig. 3. *E. coli* K12 irradié avec  $2 \cdot 10^4$  r, observé: a) après 15 min; b) après 30 min; c) après 60 min de culture.

Fig. 4. *E. coli* S irradié avec  $2 \cdot 10^4$  r, observé: a) après 30 min; b) après 60 min de culture; c) après 90 min de culture.

Fig. 5. *E. coli* B irradié avec  $10^5$  r, observé: a) après 30 min; b) après 60 min.

Fig. 6. *E. coli* B irradié avec  $10^6$  r, observé après 60 min de culture.

radiation, les fragments paraissent déjà se réarranger et on retrouve des cellules d'apparence normale, tandis que les cellules à noyau vésiculaire ne changent pas d'aspect. Cette évolution est essentiellement la même pour K12 S et B, à part de petites différences de proportion entre les deux sortes de transformations décrites. La figure 4 a montre des cellules K12 S, 4 b des cellules B 30 min après l'irradiation avec  $2 \cdot 10^4$  r. On remarquera dans cette dernière figure l'abondance des petites cellules à noyau vésiculaire.

**Doses fortes:**  $10^5$  et  $10^6$  r, survie moins que 1%. Les fortes doses ont été étudiées sur les cellules B uniquement. La figure 5 montre l'évolution des cellules après une irradiation de  $10^5$  r. Une certaine proportion des cellules sont allongées et portent des noyaux fragmentés. Dans d'autres cellules nous retrouvons la contraction des fragments en vésicules centrales. Une troisième sorte de transformation enfin fait son apparition avec ces doses: nous trouvons des vacuoles polaires, desquelles nous ne pouvons pas dire si elles contiennent le matériel nucléaire. 60 et 90 min après l'irradiation (fig. 5 b et c), l'image s'accentue: on voit quelques cellules très longues dans

lesquelles les fragments nucléaires commencent à se regrouper en noyaux normaux. L'irradiation de  $10^6$  r enfin (fig. 6) ne produit plus que de rares cellules allongées, par contre il y a ici abondance de cellules à noyaux vésiculaires et de nombreuses cellules avec vacuoles.

De ces observations il ressort clairement, que les rayons X peuvent déclencher trois transformations distinctes. Une première action, visible surtout après les faibles doses et sur des cellules survivantes, s'apparente fortement à celle produite par les rayons ultraviolets: la cellule s'allonge jusqu'à 2-4 fois sa longueur normale et les noyaux deviennent polychromosomiques et même fragmentés. Une deuxième action, qui semble se superposer à ce premier effet tend à concentrer le matériel nucléaire en un seul noyau vésiculaire. Elle est visible à des doses plus fortes et n'apparaît clairement qu'après un temps de culture prolongé. Contrairement à la fragmentation, qui peut être réversible puisqu'elle se trouve aussi sur des bactéries qui vont survivre, cette lésion qui provoque la forme vésiculaire du noyau est très probablement létale. Une troisième action enfin,

sur des bactéries très fortement irradiées, provoque la formation de vacuoles polaires.

Si l'on calcule<sup>1</sup> le nombre de traces de ionisations formées par les rayons X qui se trouvent entièrement ou en partie dans la cellule, on obtient 160 traces par cellule pour la dose  $6,10^3$  r. A cette dose nous trouvons une survie de 37% des bactéries, ce qui veut dire – d'après la théorie du coup efficace – que sur les 160 traces par cellule il y a en moyenne une seule qui est létale. A 800 r, donc avec environ 20 traces par cellule, on observe déjà la transformation des nucléoides vers la fragmentation. L'étendue de cette transformation dépend de la dose : pour de faibles doses, elle ne dépasse souvent pas le stade de la polychromosomie pour retourner ensuite au regroupement de nucléoides normaux. A des doses plus fortes, ce retour ne s'effectue plus ou seulement après un long développement à nucléoides fragmentés. Par conséquent on doit admettre que cette fragmentation ne soit pas l'effet d'un seul coup efficace, mais soit dûe à une substance produite ou détruite en plus ou moins grande quantité selon la dose. Cette substance serait responsable du désordre au niveau des divisions nucléaires, dont l'expression visible est la polychromosomie et la fragmentation.

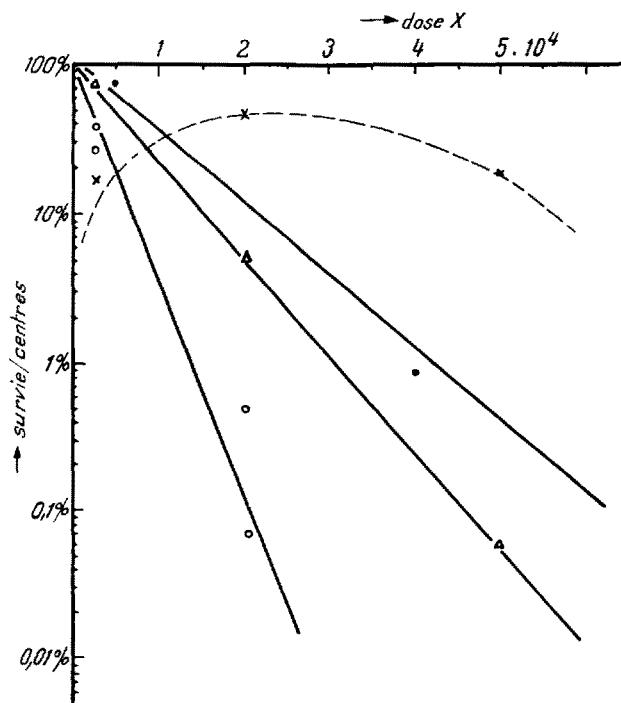


Fig. 7.

Quant à l'induction, nous avions montré<sup>2</sup> que la fragmentation n'est pas produite par le phage induit. Mais tous les inducteurs connus pour Kl2(λ) – Dichlorène<sup>3</sup>,  $H_2O_2$ <sup>3</sup>, rayons ultraviolets et X – provoquent la fragmentation des noyaux, que la cellule soit lysogène ou pas. Les rayons X, avec lesquels on peut induire au maximum 50 % de la population, ne produisent en même temps la fragmentation que sur la moitié des cellules,

<sup>1</sup> D. A. LEA, *Actions of Radiations on living cells* (Cambridge University Press, 1947).

<sup>2</sup> E. KELLENBERGER, Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

<sup>3</sup> F. JACOB, C. r. Acad. Sci. 234, 2238 (1952). – E. KELLENBERGER, Symposium on bacterial Cytology, Rome 1953, 45.

l'autre moitié montrant des noyaux vésiculaires. Tout se passe comme si la fragmentation du noyau était une condition nécessaire, si non la cause de l'induction : le désordre nucléaire augmenterait la probabilité d'induction. Néanmoins, sur la base des expériences mentionnées, on ne peut pas exclure la possibilité que la fragmentation soit un phénomène totalement étranger à l'induction, accompagnant fortuitement cette dernière.

Nous exprimons toute notre gratitude au Dr R. LATARJET qui nous a proposé cette étude et qui nous a offert la possibilité de faire les irradiations dans son laboratoire de l'Institut du Radium à Paris. Nous remercions également le Dr MARCOVICH pour ses indications précieuses et M. MORENNE pour avoir effectué les irradiations.

E. KELLENBERGER

*Département de Biophysique, Institut de Physique de l'Université de Genève, le 29 avril 1955.*

#### Summary

In order to obtain further knowledge on the action of radiation on living cells we studied the nuclear transformations of *E. coli* after exposure to X-rays. Three different phenomena could be observed: One is producing the polychromosomal form of nucleoids, and is reversible. The second, which is probably a rapid lethal effect, expresses himself by the vesicular form of the nucleoids. The third is only concerned with very high doses. The hypothesis, that the fragmentation of nucleoids may be directly related to induction of lysogenic cells is postulated.

#### Histochemicaler Nachweis der im Zytoplasma regenerativ nach P-Mangelzüchtung auftretenden phosphatischen Überkompensation

Durch chemische Modellversuche, die in einer systematischen Entwicklungsreihe von uns dargestellt wurden, konnten wir auf Grund eindeutiger Reaktionen nachweisen<sup>1</sup>, dass mit den gebräuchlichen histochemischen Methoden (MEYER<sup>2</sup>, UNNA-PAPPENHEIM<sup>3</sup>, LINDEGREEN<sup>4</sup>, SCHUMACHER<sup>5</sup>), welche bis dahin allgemein in der Zellphysiologie zur Lokalisation der freien Nukleotide im Zytoplasma dienten, entweder lediglich eine diffuse Färbung oder bestenfalls eine Indikation der Basophilie bestimmter Zell- und Gewebsorte erreicht wird. Nicht einmal die Zellphosphate lassen sich auf diese Weise spezifisch erfassen, um so weniger noch die freien Nukleinsäuren, deren zytochromatische Identifizierung hiernach in früheren Arbeiten zweifelhaft erscheinen muss.

Der spezifische Nachweis der Zellphosphate, sofern sie mindestens zwei freie Valenzen besitzen, ist erst durch die Anwendung des letzthin von uns ausgearbeiteten M-T-Verfahrens<sup>1</sup> ermöglicht worden, dessen Selektivität auf dem Prinzip der Doppelfärbung mit Methylen-

<sup>1</sup> Gemeinschaftsarbeit von F. WINDISCH und D. STIERAND sowie von H. HAEHN, Protoplasma 42, 346 (1953).

<sup>2</sup> A. MEYER, *Die Zelle der Bakterien* (Verlag Gustav Fischer, Jena 1912).

<sup>3</sup> B. ROMEIS, *Mikroskopische Technik* (Leibnitz-Verlag, München 1948), S. 170. – A. PAPPENHEIM, Fol. haem. 6, 51 (1924).

<sup>4</sup> C. C. LINDEGREEN, Nature 159, 63 (1947).

<sup>5</sup> J. SCHUMACHER, Zbl. Bakteriol. 73, 337 (1922); 77, 191 (1924); Chemie der Zelle und Gewebe 12, 175 (1926).