

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 due 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.

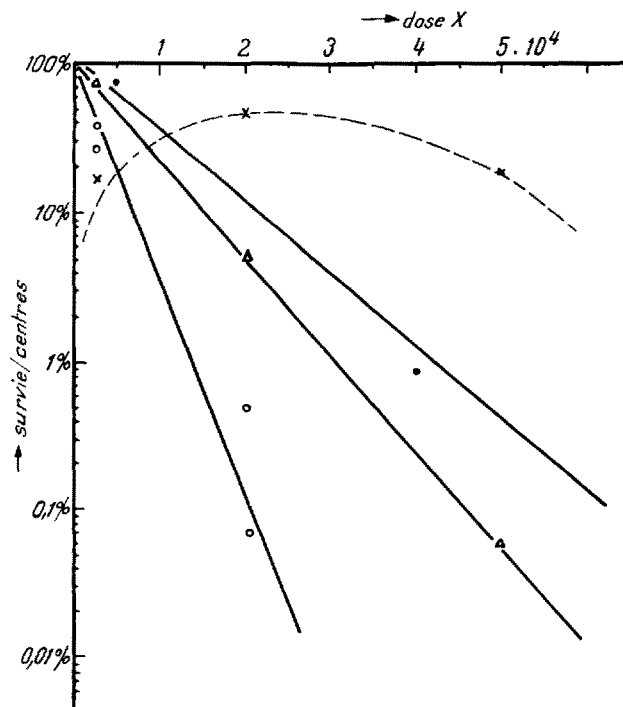


Fig. 7.

Quant à l'induction, nous avons montré<sup>2</sup> que la fragmentation n'est pas produite par le phage induit. Mais tous les inducteurs connus pour K12( $\lambda$ ) – 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,

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 D<sup>r</sup> 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 D<sup>r</sup> 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.

### Histochemischer 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>, LINDEGREN<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 letztthin 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. LINDEGREN, *Nature* 159, 63 (1947).

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

<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.

blau und Trypaflavin nebst zweifacher Säuredifferenzierung beruht. Aus der gepaarten Reaktion der beiden Anilinpigmente am freien Phosphatkomplex leitet sich der spezifische Effekt ab, welcher der M-T-Methode ihre indikative Bedeutung verleiht. Durch zahlreiche Tinktionsversuche, ausgeführt an adäquaten P-Substanzen und verschiedenartigen Mikroorganismen (Hefen, Bakterien), konnten wir nachweisen, dass sich die Zellphosphate – infolge der dem M-T-Prinzip inhärenten Eliminationswirkung – von den unspezifischen Faktoren der Plasmafärbung exakt abgrenzen und auf diese Weise chromatisch lokalisieren lassen. Verfahrenstechnisch gelangten wir dahin, dass wir völlig intakte Zellen, ohne destruiierende und denaturierende Fixierung, dem M-T-Test zugänglich machen konnten, was gegenüber der Manipulation mit Artefakten zweifellos eine biometodische Verbesserung bedeutet.

Im Rahmen unserer laufenden Untersuchungen über den Phosphat- und Nuklealstoffwechsel wurde gelegentlich von uns die M-T-Methode analytisch einbezogen, um auch, wenn möglich, von der histochemischen Seite her, das heisst *in den Zellen selbst* dem Mechanismus des Phosphatwechsels zwischen Substrat und Plasma näherzukommen. Bei dieser Gelegenheit machten wir die sinnfällige Beobachtung, dass ein mit gleicher Intensität bisher noch nicht erreichter M-T-Effekt (säureresistente Grünfärbung) im Hefeplasma auftritt, wenn die Testorganismen zunächst einer über mehrere Passagen sich erstreckenden P-Mangelzüchtung ausgesetzt und darauffolgend einer regenerierenden Behandlung mit primärer Kaliumphosphatlösung bzw. Malzwürze unterworfen werden.

Die P-Hungerhefe zeichnet sich, wie wir in einer grossen Reihe von Versuchen reproduzierbar bestätigt fanden, durch die signifikante Eigenschaft aus, dass sie im initialen Stadium der Regenerierung begierig Phosphat in sich aufnimmt und dabei eine *phosphatische Überkompensation* erfährt, die nach relativ kurzer Reaktionsdauer kulminiert und dann allmählich wieder bis auf das normale Niveau abklingt. Dieses äusserst markante Stoffwechsel-Phänomen, das uns zuerst plasmochromatisch entgegentrat, ist aber nicht nur auf zytologische Art nachweisbar, sondern lässt sich auch chemisch durch Bestimmung des Gesamt-P-Gehaltes erfassen. In letzterer Hinsicht liegt bereits ein nicht ganz einheitliches Zahlenmaterial von WIAME<sup>1</sup> sowie von RAUTANEN und MJIKKULAINEN<sup>2</sup> vor. Soweit sich jedenfalls aus unseren eigenen analytischen Ermittlungen ersuchen lässt, steht der M-T-Befund, der sich auf stark kontrastierende Tinktionseffekte stützt, in proportionalem Einklang mit der zellularen Phosphataufnahme.

Gestützt auf das histochemische Kriterium der phosphatischen Überkompensation, gelang es uns in weiteren Untersuchungen, die in Gemeinschaft mit HERFURT und RÜHLE an anderer Stelle<sup>3</sup> veröffentlicht werden, gewissen Einblick in den bisher noch ungeklärten Mechanismus des Phosphatwechsels zwischen Substrat und Plasma zu gewinnen. Mit grosser Deutlichkeit trat hierbei zutage, dass das Eindringen von Phosphat durch die Zellmembran nicht ausschliesslich auf Grund eines einfachen Diffusionsprozesses erklärt werden kann, sondern irgendwie mit den Phosphorylierungsreaktionen verknüpft sein muss, was bereits von LANG<sup>4</sup> in Erwägung

gezogen und von HOLZER<sup>1</sup> aus experimentellen Feststellungen gefolgert wurde.

Als zytologischen Beleg der von uns festgestellten phosphatischen Überkompensation nach vorheriger P-Hungerzüchtung bringen wir nachstehend vier Mikrobilder, die auf Farbfilm hergestellt sind, aber vorerst schwarz-weiss zur Reproduktion gelangen (eine spätere Veröffentlichung im Originalfarbdruck ist vorgesehen).

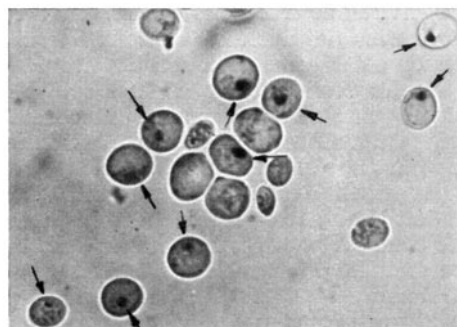


Abb. 1. Normale Unterhefe U, M-T-Färbung. 600fache Vergrösserung

Abbildung 1 zeigt die normale Ausgangshefe (Unterhefe, Rasse U), welche aus einer üblichen Würzgezuchtung stammt und bei der M-T-Reaktion, wie durch

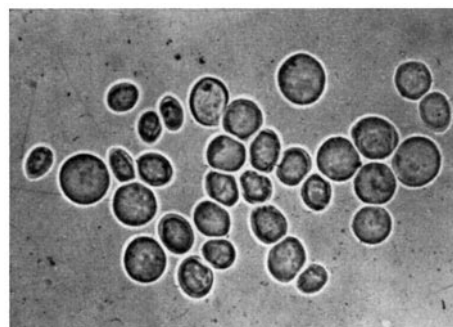


Abb. 2. P-Mangelhefe, Methylenblaufärbung. 600fache Vergrösserung

Pfeile angedeutet, scharf abgegrenzte Granula (im Original sattgrün) auf farblosem Plasmagrund hervortreten lässt, deren Anzahl und Grösse jedoch relativ gering ist.

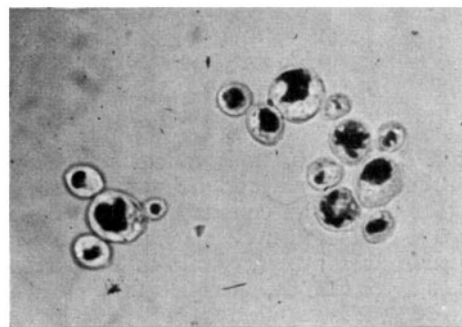


Abb. 3. Regenerierte P-Mangelhefe, Methylenblaufärbung. 600fache Vergrösserung.

Mit Hilfe der alleinigen Methylenblaufärbung (ausdifferenziert) treten zunächst ausgeprägtere Konturen in

<sup>1</sup> J. M. WIAME, J. Biol. Chem. 178, 919 (1949).

<sup>2</sup> N. RAUTANEN und P. MJIKKULAINEN, Acta Chem. Scand. 5, 89 (1951).

<sup>3</sup> F. WINDISCH, E. HERFURT und G. RÜHLE, Z. Naturf. 10b, 254 (1955).

<sup>4</sup> K. LANG, Der intermediäre Stoffwechsel (Springer-Verlag Berlin, 1952), S. 47.

<sup>1</sup> H. HOLZER, Biochem. Z. 324, 144 (1953).

Erscheinung, die sich bei der zweiten Säurebehandlung wieder erheblich reduzieren. Wird nun dieselbe Hefe über mehrere Passagen phosphatarm gezüchtet und

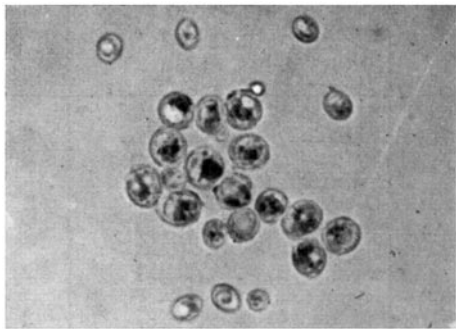


Abb. 4. Regenerierte P-Mangelhefe, M-T-Färbung. 600fache Vergrößerung.

danach, im P-verarmten Zustand, mit Methylenblau gefärbt, so entsteht nur eine blasse, schieferblaue Tönung, die bei anschliessender Säuredifferenzierung schnell und restlos gelöscht wird (Abb. 2). Im stärksten Gegensatz hierzu kommt indessen – massig und farbsatt (im Original tiefblau) – der Tinktionseffekt mit Methylenblau zur kontrastreichen Geltung (Abb. 3), wenn sich die Hungerhefe – während einer etwa zweistündigen Regenerierung in Würze – bis weit über die Grenze der normalen Sättigung mit Phosphat gemästet hat. Auch bei vollständiger M-T-Färbung mit zweifacher Säuredifferenzierung ist die plasmochromatische Indikation noch äusserst charakteristisch (Abb. 4). Beim Vergleich der Abbildungen 1 und 4 wird die markante Zellreaktion der phosphatischen Überkompensation in ihrer bioanalytischen Bedeutung überzeugend erkennbar.

Dem dargelegten zytochromatischen Befund lassen wir, in tabellarischer Zusammenfassung, einige vergleichende Messwerte folgen, welche in engster Beziehung zu den mittels M-T-Test manifestierten Plasma-reaktionen stehen. Die quantitative Aufschlüsselung des umfangreichen Untersuchungsmaterials soll einer besonderen Arbeit vorbehalten bleiben. Zum besseren Verständnis der angeführten Vergleichsdaten schicken wir eine kurze methodische Beschreibung voraus.

Für die P-Mangelzüchtung wurde eine synthetische Nährlösung aus Dextropur, Pepton «Witte» und mineralischen Bestandteilen verwendet. Das Pepton war schwach phosphathaltig, so dass die angesetzte Kultivierungsflüssigkeit 5 mg P im Liter enthielt. Beimpft wurde mit normal in Würze hergeführter Unterhefe Rasse U; die Aussaatmenge betrug 0,2 g Hefe-Trs. je Liter. Die P-Mangelzüchtung erstreckte sich über 3 Passagen von jeweils 7 Tagen. Der Phosphatgehalt der auf diese Weise gewonnenen P-Hungerhefe lag stets unter 5 mg je g Hefe-Trs. Die Regenerierung wurde in 10- bis 11prozentiger Vorderwürze bei einer Einwirkungsdauer von 2 Stunden vorgenommen (Thermostaten-temperatur 20°). Parallel liefen Versuche mit der unter üblichen Bedingungen, das heisst ohne Phosphatmangel gezüchteten Normalhefe. Analytisch bestimmt wurden der Gesamt-P-Gehalt und einzelne P-Fractionen (kalter TES-Auszug, Alkohol-Äther-Extrakt, Hydrolyse mit 1-n-KOH, «7-Minuten-P»).

Aus der nachstehenden Tabelle ist zu entnehmen, dass der Gesamt-P-Gehalt der regenerierten P-Hungerhefe weitaus höher liegt als bei der Normalhefe. Die prozentuale Verteilung des Gesamt-P auf die einzelnen Fraktionen (A bis D) ist bei den beiden biologischen

Testobjekten ziemlich gleichlaufend. Scheinbar besteht, wenn man nur die prozentualen Anteile zum Vergleich heranzieht, bei der Differenzierung der Fraktion C (alkalische Hydrolyse) ein Unterschied; denn die «Nuklein-

Vergleich des Gesamt-P-Gehaltes sowie der prozentualen Anteile einzelner P-Fractionen von Normalhefe und regenerierter P-Hungerhefe

Regenerierungsansatz	
Normalhefe:	2,7 mg Trs./ml = 55,10 <sup>6</sup> Zellen Gesamt-P = 14,3 mg je g Hefe-Trs.
P-Hungerhefe:	1,7 mg Trs./ml = 35,10 <sup>6</sup> Zellen Gesamt-P = 3,1 mg je g Hefe-Trs.

	Normalhefe	Regenerierte P-Hungerhefe
mg P je g Hefe-Trs. . . . .	20,0	53,9
	% vom Gesamt-P	
A Kalter TES-Extrakt . . . . .	48,9	46,3
B Alkohol-Äther-Extrakt . . . . .	2,6	4,9
C Hydrolyse mit 1-n-KOH . . . . .	42,7	41,5
a) «7-Minuten-P» . . . . .	17,9	31,4
b) «Nukleinsäure»-P . . . . .	24,8	10,1
D Rückstand . . . . .	5,9	3,0

säuren» machen bei der Normalhefe 24,8%, bei der regenerierten P-Hungerhefe nur 10,1% des Gesamt-P-Gehaltes der Hefe-Trs. aus. Berechnet man aber hieraus die absoluten P-Mengen, so ergibt sich für

Normalhefe 4,96 mg «Nukleinsäure»-P  
regenerierte P-Hungerhefe 5,44 mg «Nukleinsäure»-P

Dagegen zeigt bereits das «7-Minuten-P» der regenerierten P-Hungerhefe in Prozent des Gesamt-P einen erheblichen Anstieg gegenüber der Normalhefe, welcher noch deutlicher hervortritt, wenn man die auf absoluten P-Gehalt umgerechneten prozentualen Anteile miteinander in Vergleich stellt:

Normalhefe 3,58 mg «7-Minuten-P»  
regenerierte P-Hungerhefe 16,92 mg «7-Minuten-P».

Wird die alkalische Hydrolyse, wie sie SCHMIDT und THANNHAUSER<sup>1</sup> angewendet haben, durch die Extraktion mit heisser TES nach WIAME<sup>2</sup> ersetzt, so resultieren annähernd übereinstimmende Analysenwerte, worüber später noch näher berichtet wird.

F. WINDISCH, ST. HINKELMANN  
und D. STIERAND

Institut für Medizin und Biologie, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Berlin, den 28. Dezember 1954.

Summary

It was established by histochemical method that the regeneration of phosphorus-starved yeast, in comparison with normal yeast, is accompanied by a phosphatic overcompensation. This also provides a striking criterion for the evaluation of the cellular phosphate metabolism.

Inspite of the considerably higher total-P-contents, if regenerated phosphorus-starved yeast, it contains almost the same quantity of "nucleic acids" as normal yeast.

<sup>1</sup> G. SCHMIDT und J. THANNHAUSER, J. Biol. Chem. 161, 83 (1945).  
<sup>2</sup> J. M. WIAME, J. Biol. Chem. 178, 919 (1949).