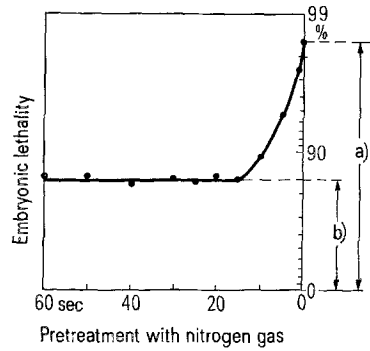


collected, using a simplified modification of the method described by WÜRGLER, ULRICH and SPRING⁵. In these egg samples we find predominantly pronuclear (= zygote) stages and stages of the first cleavage division. From the embryological point of view these are early embryonic stages. The samples were pretreated with purified nitrogen (Sauerstoff- und Wasserstoff-Werke Luzern) for variable periods of time ranging from 0 to 60 sec in a plexiglas



Embryonic lethality (ordinate) observed after irradiation of *Drosophila* embryos pretreated with nitrogen gas during pretreatment periods of variable duration (abszissa). The arrows a) and b) represent the values used for the calculation of the oxygen enhancement ratio.

Effect of nitrogen pretreatment on the rate of embryonic lethality after X-irradiation of 15 ± 5 min old *Drosophila* embryos with 2000 R

Duration of pretreatment (sec)	No. of embryos		Embryonic lethality (%)
	Tested	Dead	
0 (= air)	635	625	98.40
1	439	429	97.72
5	747	708	94.78
10	625	557	89.12
15	832	701	84.25
20	976	829	84.94
25	580	486	83.79
30	835	702	84.07
40	384	318	82.81
50	366	311	84.97
60	517	439	84.91
average 15 to 60	4490	3786	84.32

chamber of 48 cm³ with a humidified gas stream of 3 l/min. A 2000 R dose of 50 keV X-rays was applied within 1 sec. The Table gives the actual data. The percentages of embryonic lethality (= 100 × number of eggs from which no larva hatched/number of eggs irradiated) are plotted semilogarithmically in the Figure. For the mathematical rationale to use semilogarithmic plots see ELKIND and WHITMORE⁶. Since each point in the Figure represents one point of an exponential dose response curve (WÜRGLER²) and since oxygen was shown to be a dose modifying agent (READ⁷) we find an OER of: $OER = a/b = -\ln(1-0.9840)/-\ln(1-0.8432) = 2.2$. For the meaning of a) and b) see the Figure. This value is in good agreement with corresponding values published earlier (WÜRGLER², FINSINGER³, MATTER⁴).

The results indicate that, with our technique, a pretreatment period of only 15 sec is sufficient to achieve complete anoxia. It is interesting that BELL and ROACH⁸ found a pretreatment period of the same order of magnitude (20 sec) for cultured mammalian cells. In contrast, if cells in adult flies are to be irradiated in anoxic condition, pretreatment periods up to 30 min must be used (SOBELS⁹).

Two phenomena might contribute to the fact that such an extremely short pretreatment period is sufficient to achieve anoxia in individual cells: 1. Quick diffusion of oxygen out of the cell due to the gradient of oxygen concentration achieved by the nitrogen gas surrounding the cells and 2. rapid consumption of the available oxygen by cellular respiration¹⁰.

Zusammenfassung. Zur vollständigen Ausschaltung des Sauerstoff-Effektes bei der Bestrahlung von *Drosophila*-Embryonen genügt eine 15 Sekunden dauernde Vorbehandlung mit Stickstoff.

F. E. WÜRGLER and H. ULRICH

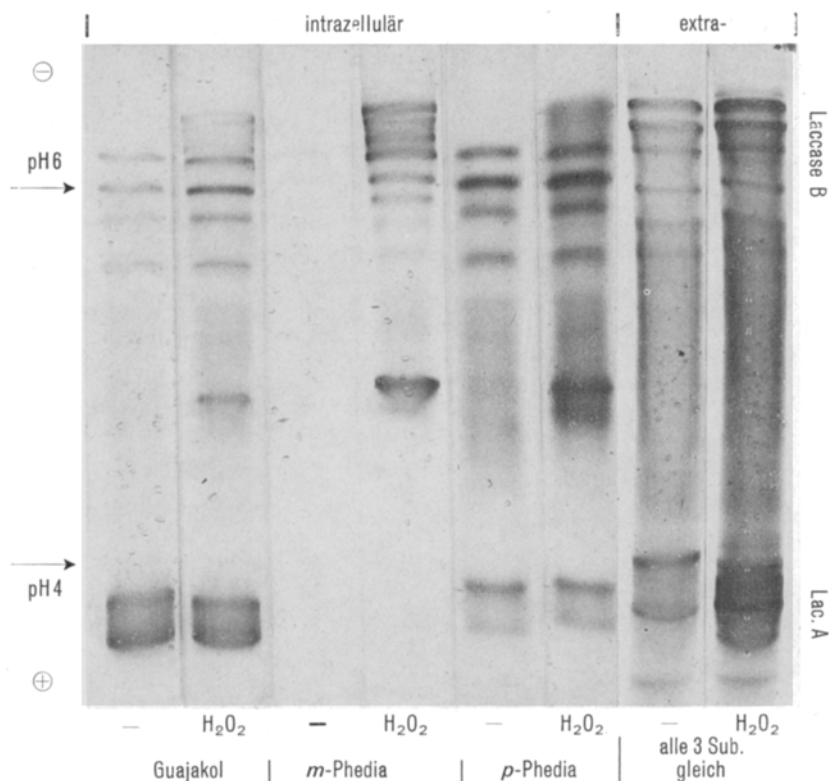
Department of Zoology, Swiss Federal Institute of Technology, Universitätstrasse 2, CH-8006 Zürich (Switzerland), 10 March 1972.

⁵ F. E. WÜRGLER, H. ULRICH and H. W. SPRING, *Experientia* 24, 1082 (1968).
⁶ M. M. ELKIND and G. F. WHITMORE, *The Radiobiology of Cultured Mammalian Cells* (Gordon and Breach, New York 1967).
⁷ J. READ, *Br. J. Radiol.* 25, 89 (1952).
⁸ J. A. BELL and A. ROACH, *Br. J. Radiol.* 41, 390 (1968).
⁹ F. H. SOBELS, *Int. J. Radiat. Biol.* 2, 68 (1960).
¹⁰ Work supported by the Schweizerischer Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung.

Beziehungen zwischen laccase- und peroxidaseartigen Isoenzymen von Basidiomyceten

Untersuchungen von LYR¹, KOENIGS² und neuerdings HOLUBOVÁ-JECHOVÁ³ ergaben den Hinweis, dass bei Basidiomyceten neben Laccasen und Tyrosinasen auch Peroxidasen vorkommen. Diese Ergebnisse beruhen auf Beobachtungen an Agarkulturen oder Myzelhomogenaten (Peroxidaseaktivität = Steigerung der Phenoloxidasenaktivität nach Zusatz von H₂O₂). Wir versuchten nun für diese Effekte verantwortliche Isoenzyme mittels Elektro-

fokussierung (IEF)^{4,5} aufzutrennen. Unsere Resultate zeigten, dass eine Steigerung der Phenoloxidasenaktivität in Rohextrakten, Kulturfiltraten oder Agarkulturen durch Zusatz von H₂O₂ meist nicht auf besondere Peroxidasen, sondern auf die Eigentümlichkeiten der vorhandenen Laccasen zurückgeht. Dies ergaben Untersuchungen an Myzelextrakten und Kulturfiltraten von über 30 Pilzen. Ein detaillierter



IEF-Spektrum der intra- und extrazellulären Laccasen von *Trametes versicolor*. Nachweis-substrate: *o*-Guajakol, *m*-Phenylendiamin, *p*-Phenylendiamin, jeweils 0,05 M in 0,15 M Citrat-Phosphatpuffer, pH 4,5. Jeder Test wurde ohne und mit Beigabe von 0,4% H₂O₂ durchgeführt.

Bericht über die untersuchten Arten und eine Diskussion der Gründe für die hier beschriebenen Phänomene soll an anderer Stelle folgen.

Zur Illustration diene hier das Spektrum von *Trametes (Polystictus) versicolor*, aus dessen Kulturmedium bereits früher zwei verschiedene Laccasen (A und B) gewonnen wurden, welche aber auch im Myzel enthalten sind (Figur). Da wir bei anderen Pilzen ähnliche Verhältnisse vorfanden, haben wir diese Nomenklatur⁶ übernommen.

Mit wenigen Ausnahmen bilden alle Arten: 1. Laccase A (IEP bei pH 3,5), die bevorzugt extrazellulär vorkommt und meistens 2–3 Banden bildet; 2. Laccase B (IEP von 4–6), die vorwiegend intrazellulär vorliegt und oft sehr viele Banden hat. Extrazelluläre Spektren weisen gegenüber den intrazellulären meist auch qualitative Unterschiede auf, was auf eine Modifikation der Enzymmoleküle während der Ausscheidung zurückgeführt werden könnte.

Ein Zusatz von H₂O₂ zu den Laccasesubstraten (Figur) kann auf verschiedene Banden unterschiedliche Wirkung haben: 1. kein Einfluss (Figur, intrazelluläre Laccase A); 2. die Intensität der Banden nimmt mehr oder weniger zu (Figur, extrazelluläre Laccase A); 3. es treten neue Banden an Stellen auf, an denen ohne Peroxid keine Phenoloxidation stattfand (Figur, intrazellulär, zwischen A und B); 4. bei einigen Pilzarten wird auch Schwächung oder Hemmung einzelner Banden beobachtet. Peroxidase-artige Banden fanden wir relativ oft (bei 13 von 30 Arten); es hat sich jedoch gezeigt, dass zumindest ein Teil von ihnen mit Laccasen identisch sind, weil a) die Peroxidabhängigkeit je nach Alter der Kultur verschieden sein kann (sozusagen eine Umwandlung von Peroxidase in Laccase und vice versa) und ausserdem vom Substrat abhängt (Figur, intrazelluläre Laccase B, die bei *m*-Phenylendiamin teilweise wie Peroxidase, bei den übrigen Substraten wie Laccase wirkt), und b) Enzyme, die nach ihrem IEP identisch sein dürften, unterschiedlich auf Peroxid

reagieren, je nachdem sie aus dem Myzel oder dem Kulturmedium stammen (Figur, Laccase A). Diese «Peroxidasen» tragen zudem meist nur wenig zur Gesamtaktivität der Rohenzymgemische bei, so dass eine wesentliche Aktivierung durch Peroxid, die bei 10 von 30 Arten festgestellt werden konnte (altersabhängig verschieden!), fast immer durch Laccasen bedingt sein dürfte.

Summary. Phenoloxidases of 30 wood-rotting fungi were separated by isoelectric focusing. It turned out that apparent peroxidasic activity of the crude extracts of certain species is not necessarily attributable to peroxidases but to the special properties of certain laccase isoenzymes, which may be uninfluenced, inhibited, or activated by H₂O₂. These interactions differ in certain species for intra- and extracellular forms of the same isoenzyme.

R. BLAICH⁷

Lehrstuhl für Allgemeine Botanik der Ruhr-Universität Bochum, Postfach 2148, D-463 Bochum (Deutschland), 24. Februar 1972.

¹ H. Lyr, *Planta* 50, 359 (1958).

² J. W. KOENIGS, *Arch. Mikrobiol.* 73, 121 (1970).

³ V. HOLUBOVÁ-JECHOVÁ, *Ceska Mycol.* 25, 23 (1971).

⁴ C. W. WRIGLEY, *Sci. Tools* 15, 17 (1968).

⁵ L. SCHÄNDEL, R. BLAICH und K. ESSER, *Arch. Mikrobiol.* 77, 140 (1971).

⁶ M. JONSSON, E. PETTERSON und B. REINHAMMAR, *Acta chem. scand.* 22, 2135 (1968).

⁷ Wir danken den technischen Mitarbeitern unseres Lehrstuhls, besonders Fräulein K. KUPRAT, für ihre Unterstützung und der DFG für Sachmittel.