

ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DER ASCORBINSÄURE

I. ISOLIERUNG EINER ASCORBINSÄUREABHÄNGIGEN
DPNH-OXYDASE AUS NEBENNIERENMIKROSOMEN

H. KERSTEN, W. KERSTEN UND H.J. STAUDINGER

Zentrallaboratorium der Städtischen Krankenanstalten, Mannheim (Deutschland)

EINLEITUNG

Um Aufschluss über die Wirkung der Ascorbinsäure im Zellstoffwechsel, insbesondere der Nebenniere zu erhalten, haben wir vor einiger Zeit den Einfluss von Ascorbinsäure auf die durch Nebennierenmitochondrien bewirkte DPNH*-Oxydation untersucht^{1,2}. Wir beobachteten eine beschleunigende Wirkung der Ascorbinsäure auf die DPNH-Oxydation durch Mitochondrien, die sich im optischen Test an der Abnahme der für DPNH charakteristischen Absorption bei 344 m μ und in der Warburg-Apparatur an einer Erhöhung des O₂-Verbrauches zeigte. Bei diesen Versuchen ergab sich, dass die Ascorbinsäure durch Mitochondrien allein oxydiert wird, jedoch in Gegenwart von DPNH und Mitochondrien quantitativ in der reduzierten Form erhalten bleibt². Der Wasserstoff vom DPNH muss demnach auf ein Oxydationsprodukt der Ascorbinsäure übertragen worden sein. Die Oxydation der Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure verläuft in zwei Stufen, wobei nach elektrochemischen Untersuchungen von KERN intermediär das Radikal "Monodehydroascorbinsäure" entsteht³. In Gegenwart von Dehydroascorbinsäure wird die DPNH-Dehydrierung nicht beschleunigt¹. Der eigentliche Wasserstoffacceptor kann demnach nur die "Monodehydroascorbinsäure" sein. Zu ähnlichen Ergebnissen und Folgerungen kamen BEEVERS⁴, KERN UND RACKER⁵, MATHEWS⁶, NASON, WOSSILAIT UND TERELL⁷, die eine beschleunigende Wirkung der Ascorbinsäure, nicht dagegen der Dehydroascorbinsäure auf die DPNH-Oxydation mit pflanzlichen Enzymsystemen zeigen konnten.

Die weiteren Versuche, das Enzymsystem, das den Wasserstoff vom DPNH auf "Monodehydroascorbinsäure" überträgt, zu isolieren, ergaben, dass der mitochondrienfreie Überstand, bezogen auf Proteingehalt, sehr viel aktiver war, als die Mitochondrien. Bei einer Fraktionierung des mitochondrienfreien Überstandes in Mikrosomen und Cytoplasma liess sich der beschriebene Ascorbinsäure-Effekt in der Mikrosomenfraktion lokalisieren⁸.

Im Folgenden beschreiben wir Isolierung und Eigenschaften der ascorbinsäure-abhängigen DPNH-Oxydase aus Nebennierenmikrosomen (I). In einer weiteren Publikation (II) unter gleichem Titel werden wir darüber berichten, welche Bedeutung diese Enzymreaktion für den Stoffwechsel der Nebenniere, insbesondere für die Biosynthese der Nebennierenrindenhormone, hat.

* DPNH = DPNH + H⁺ = reduziertes Diphosphopyridinucleotid.

Literatur S. 608.

EXPERIMENTELLES

(a) *Herstellung der ascorbinsäureabhängigen DPNH-Oxydase aus "mitochondrienfreiem Überstand"* Schweinenebennieren werden sofort nach dem Töten der Tiere auf dem Schlachthof entnommen und in einen Behälter, der Trockeneis enthält, gegeben. Im Laboratorium werden die Nebennieren vom Fettgewebe und den Kapseln befreit. Während der gesamten Aufarbeitung darf die Temperatur $+4^{\circ}\text{C}$ nicht übersteigen. Man wiegt 25 g Nebennieren ab und zerkleinert die noch leicht gefrorenen Nebennieren mit der Schere. Die zerkleinerten Nebennieren werden mit 100 ml S.V.T.-Lösung vom pH 8.0 versetzt [S.V.T.-Lösung: 1000 ml H_2O ; 300 g Saccharose (= 0.88 M); 2.00 g Versen (= Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure); 1.0 g Tris (= Trishydroxymethylaminomethan)] und homogenisiert (Homogenisator "Atomixmill", Fa. Werkstatt f. Apparatebau, Müllheim/Baden). Der pH-Wert des Homogenates beträgt nach dem Homogenisieren 7.5. Das Homogenat wird 60 Min. bei $2-4^{\circ}\text{C}$ und 20,000 g (g berechnet aus r max.) zentrifugiert. Der Überstand (I), den man auf diese Weise erhält, ist frei von Kernen und Mitochondrien. Er wird durch ein feines Mulltuch in einen Stutzen filtriert, den man auf einen Magnetrührer stellt. In einen Dialysierschlauch gibt man eine auf das Flüssigkeitsvolumen vom Überstand (I) berechnete Menge angefeuchtetes Ammoniumsulfat, so dass die Endkonzentration 40 % Sättigung beträgt. Man lässt die Dialyse gegen den Überstand (I) unter ständigem Rühren 12-15 Stunden in der Kälte vor sich gehen und entleert dann noch den Inhalt des Dialysierschlauchs in den Stutzen*.

Das auf diese Weise langsam gefällte Protein wird 20 Min. bei 10,000 g zentrifugiert. Die wirksame Proteinfraktion setzt sich am oberen Rand des Zentrifugenbechers ab und wird vorsichtig mit einem Spatel abgehoben und in einen Homogenisator gegeben. Das Rohprodukt von 25 g Nebennieren wird im Homogenisator mit 50 ml 40 % gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, vorsichtig homogenisiert (Homogenisator nach Potter u. Elvehjem) und erneut 20 Min. bei 10,000 g zentrifugiert. Das jetzt am Boden des Zentrifugenglases befindliche Sediment wird in 10 ml 5 % gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung aufgenommen und zur längeren Aufbewahrung eingefroren. Es ist dann über mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust haltbar. Bei höherer Temperatur nimmt die Aktivität schon innerhalb weniger Tage stark ab. 1 ml Proteinsuspension enthält ca. 10 mg Protein (Biuret-Methode).

(b) *Herstellung des Enzymsystems aus Nebennierenmikrosomen*

Der Überstand I wird 30 Min. bei $+2^{\circ}\text{C}$ und 110,000 g zentrifugiert (Spinco-Zentrifuge) und die Mikrosomen, die man aus 25 g Nebennierenfrischgewicht erhält, in 50 ml S.V.T.-Lösung (vergl. (a)) aufgenommen. Die Fällung mit Ammoniumsulfat und das Waschen der Proteinfraktion erfolgt in gleicher Weise wie bei der Aufarbeitung des Überstandes I.

(c) *Absorptionsspektren*

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren wird ein Teil der Proteinfraktion mit Natriumdesoxycholat* behandelt und ein anderer Teil der sauren Hydrolyse unterworfen.

1. *Behandlung mit Desoxycholsäure*. 1 ml Proteinsuspension, entsprechend ca. 10 mg Protein, wird mit 9 ml einer 10 %-igen Lösung von Desoxycholsäure in 1 N NaOH versetzt und 3 Std. bei 37°C aufbewahrt. Man erhält eine völlig klare Lösung. Zum Vergleich wird bei der Absorptionsmessung eine ebenso behandelte Lösung von 1 ml 5 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung + 9 ml Desoxycholatlösung verwendet.

2. *Saure Hydrolyse*. Die Proteinsuspension entsprechend 25 g frischen Nebennieren (ca. 100 mg Protein), wird in einen Dialysierschlauch gegeben und gegen 30 ml 0.5 N HCl im offenen Gefäß einen Tag bei 60°C dialysiert. Das Dialysat wird hierbei gleichzeitig auf ca. 15 ml eingeengt. Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums wird das Dialysat mit konzentrierter Natronlauge auf pH 9.0 eingestellt. Als Vergleichslösung dient in diesem Falle H_2O .

Zur Messung zwischen 380 $\text{m}\mu$ und 600 $\text{m}\mu$ wurde das unverdünnte Dialysat verwendet. Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums zwischen 250 $\text{m}\mu$ und 380 $\text{m}\mu$ haben wir das Dialysat 1:1000 verdünnt.

(d) *Optischer Test*

Die Konzentrationen der verwendeten Substanzen sind zu den entsprechenden Kurven jeweils angegeben. Ascorbinsäureoxydase (vergl. Versuchsergebnisse Fig. 8) wurde nicht isoliert, sondern in Form eines verdünnten Extraktes aus Gurken zum Versuchsansatz gegeben. Die Gurken werden ausgepresst, der erhaltene Saft filtriert und 1:10 mit Sörensenphosphatpuffer von pH 6.6 verdünnt.

Die Extinktion der durch Zugabe des Enzyms verursachten Trübung nimmt nur in den ersten drei Minuten um 0.01-0.02 ab und bleibt dann konstant. Dieser konstante Wert wird von der gemessenen Extinktion bei 366 $\text{m}\mu$ abgezogen. Mit der Auswertung der Messung, wie sie in den Kurven angegeben ist, beginnen wir 3 Min. nach Zugabe der Enzymlösung. Gestartet wird die Reaktion mit Ascorbinsäure (vergl. Abbildungen).

* Diese Methode verdanken wir einer persönlichen Mitteilung von Prof. Dr. H. M. RAUEN Münster.

VERSUCHSERGEBNISSE

Fig. 1 zeigt den typischen Verlauf der DPNH-Oxydation in Gegenwart von Ascorbinsäure, einmal mit Nebennierenmikrosomen und zum anderen mit dem aus den Mikrosomen isolierten Enzymsystem. Aus der Figur geht hervor, dass die Proteinfraktion, die wir durch Fällung mit Ammonsulfat (40% Sättigung) aus den Mikrosomen erhielten, um das Zehnfache aktiver ist, als die Mikrosomen selbst (berechnet auf mg Protein). Ohne Ascorbinsäure wird DPNH weder durch die Nebennierenmikrosomen noch durch das isolierte Enzym oxydiert.

Obgleich die Proteinfraktion noch nicht rein vorliegt, haben wir versucht, Aufschluss über mögliche Wirkungsgruppen zu gewinnen. Wenn man die Proteinfraktion aus Mikrosomen, wie im experimentellen Teil beschrieben, mit Desoxycholatlösung behandelt, erhält man die in Fig. 2 dargestellten Absorptionsspektren. Das Absorptionsmaximum liegt bei $411 \text{ m}\mu$. Nach Reduktion mit Dithionit ist das Maximum von $411 \text{ m}\mu$ nach $422 \text{ m}\mu$ verschoben. Außerdem treten weitere Maxima bei $526 \text{ m}\mu$ und $557 \text{ m}\mu$ auf. Die Absorptionsmaxima entsprechen denen des Cytochrom b_5 , das vor kurzem von STRITTMATTER¹⁰, GARFINKEL¹¹ und CHANCE¹² in Lebermikrosomen verschiedener Tiere nachgewiesen werden konnte.

Nach saurer Hydrolyse der Proteinfraktion (vergl. Experimentelles) zeigt die Lösung die für Flavine charakteristische grünliche Fluoreszenz im ultravioletten Licht, besonders deutlich dann, wenn man die Lösung durch Zusatz von NaOH auf

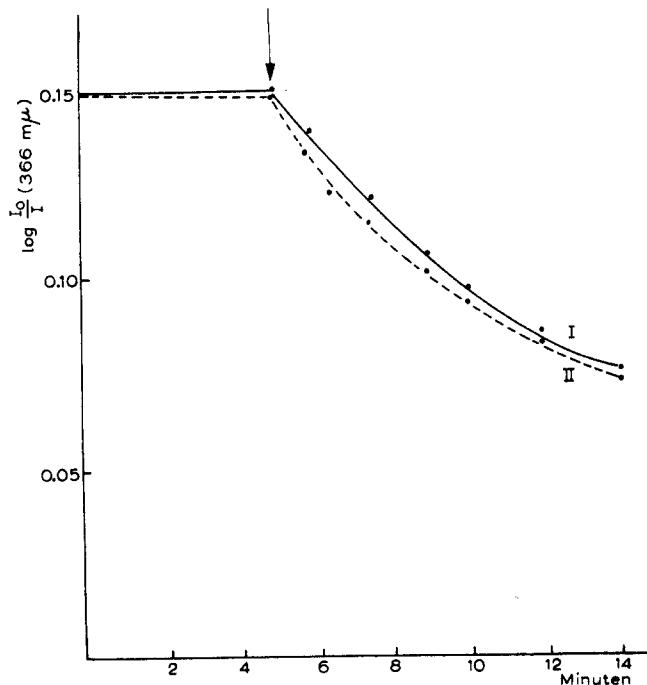


Fig. 1. DPNH-Oxydation mit Mikrosomen bzw. dem aus Mikrosomen isolierten Enzymsystem in Gegenwart von Ascorbinsäure. $M/15$ Phosphatpuffer, pH 7.4, $t = 37^\circ$. Kurve I: DPNH $4.5 \cdot 10^{-6} M$ + Mikrosomen (1 mg Protein); Kurve II: DPNH $4.5 \cdot 10^{-6} M$ + Proteinfraktion aus Mikrosomen (0.1 mg Protein). Nach 5 Minuten Zugabe von $2.3 \cdot 10^{-3} M$ Ascorbinsäure (Pfeil ↓).

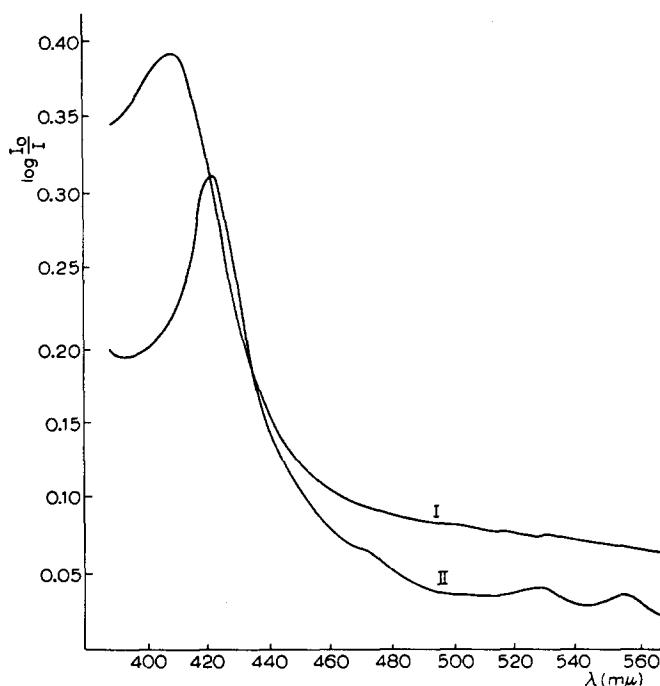


Fig. 2. Absorptionsspektrum der Proteinfraktion aus Nebennierenmikrosomen nach Behandlung mit Natriumdesoxycholat. Kurve I: Oxydierte Form; Kurve II: Reduziert mit Dithionit.

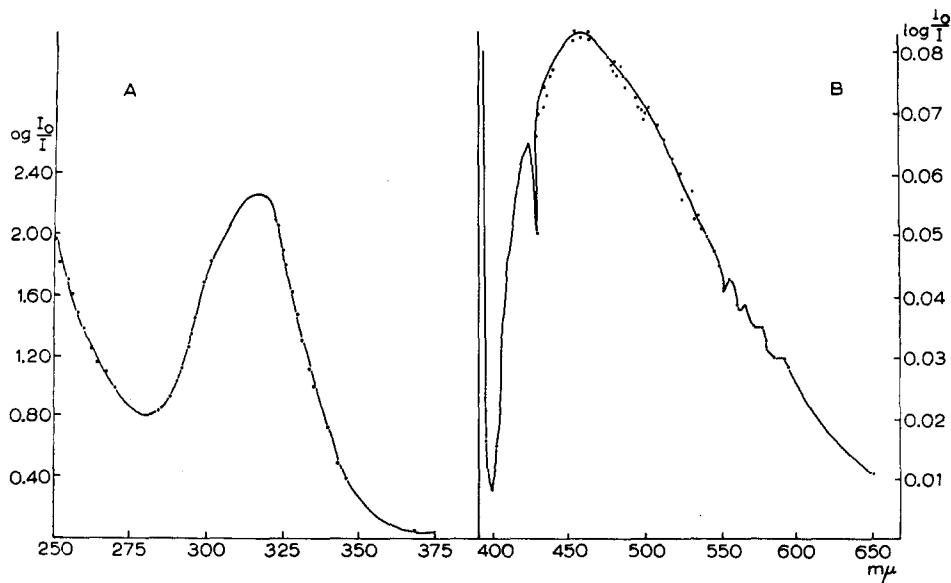


Fig. 3. Absorptionsspektrum der Proteinfraktion nach saurer Hydrolyse. A: Reduziert (250-380 mμ; verd. 1:1000); B: Differenzspektrum (ox.-red.; unverdünnt).

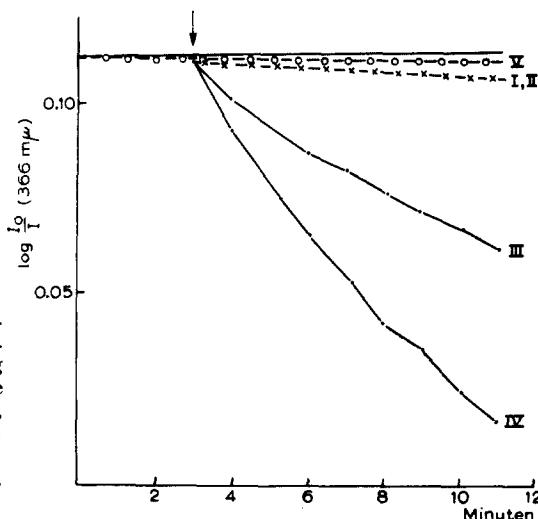


Fig. 4. Zur Spezifität des Enzymsystems. $M/15$ Phosphatpuffer, pH 7.4, $t = 37^\circ$. DPNH $3.2 \cdot 10^{-5} M$ + Enzym (~ 0.1 mg Protein [Biuret]). Nach 3 Minuten Zugabe (Pfeil ↓) von: I. Adrenalin, II. Glutathion, III. D-iso-Ascorbinsäure, IV. Ascorbinsäure; $2.3 \cdot 10^{-3} M$ Endkonz. V. TPNH $3.2 \cdot 10^{-5} M$ + Ascorbinsäure $2.3 \cdot 10^{-3} M$.

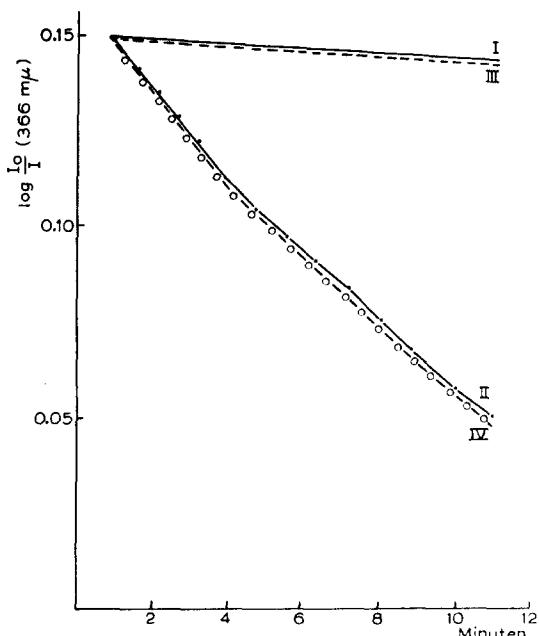


Fig. 5. Effekt bekannter Inhibitoren. $M/15$ Phosphatpuffer, pH 7.4, $t = 37^\circ$. DPNH $4.5 \cdot 10^{-5} M$; Enzym: 0.1 mg Protein (Biuret). I. $\times - \times$ DPNH + Enzym; II. $\times - \times$ DPNH + Enzym + Ascorbinsäure $10^{-3} M$; III. $\times - \times$ DPNH + Enzym + Ascorbinsäure + (a) $Mn^{++} 10^{-4} M$, (b) ρ -Chloromercuribenzoat $10^{-4} M$; IV. $\circ - \circ - \circ$ DPNH + Enzym + Ascorbinsäure + (a) $KCN 10^{-3} M$, (b) $NaN_3 10^{-4} M$, (c) Monojodessigsäure $10^{-3} M$, (d) Antimycin A $10^{-3} M$.

pH 8.0–9.0 einstellt. Die Absorptionsspektren sind in Fig. 3 (a und b) zusammengefasst. Das Differenzspektrum (ox-red) zwischen 380 m μ und 600 m μ ergab ein Maximum bei 452 m μ . Weiter erhält man nach Reduktion mit Dithionit ein scharfes Absorptionsmaximum bei 317 m μ . Sowohl die Fluoreszenz als auch das Absorptionsmaximum des Differenzspektrums sprechen für einen Flavinanteil im Enzymsystem.

Wir haben die Spezifität (vergl. Fig. 4) des Enzymsystems geprüft und gesehen, dass weder Dehydroascorbinsäure noch Adrenalin oder Glutathion die L-Ascorbinsäure ersetzen können, dagegen ist D-iso-Ascorbinsäure wirksam, wenn auch deutlich

schwächer als die Ascorbinsäure selbst. Das Enzymsystem vermittelt in Gegenwart von Ascorbinsäure nur die Oxydation von DPNH. TPNH wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht oxydiert, auch dann nicht, wenn im Versuchsansatz DPN vorhanden ist. Die isolierte Proteinfaktion enthält also keine TPNH-DPN-Transhydrase¹³.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzymsystems haben wir die DPNH-Oxydation in Gegenwart von bekannten Hemmstoffen wie ρ -Chlormercuribenzoat, KCN, Natriumazid, Monojodesigsäure, Antimycin A und zweiwertigen Metall-Ionen Mg^{++} und Mn^{++} gemessen. Von den genannten Stoffen und Metall-Ionen hemmen ρ -Chlormercuribenzoat und Mn^{++} die Reaktion völlig, während die anderen genannten Substanzen und Ionen keinen Einfluss auf den Reaktionsablauf haben (vergl. Fig. 5). Die durch Mn^{++} hervorgerufene Hemmung kann durch Zusatz von Ätylendiamintetraessigsäure als Komplexbildner wieder aufgehoben werden.

Wie sich zeigte, können auch Komplexverbindungen von Fe^{+++} mit der isolierten DPNH-Oxydase reagieren. So wird z.B. in Anwesenheit des Enzyms das Eisen im $K_3[Fe(CN)_6]$ und Cytochrom c [Fe^{+++}] stoechiometrisch vom DPNH zu Fe^{++} reduziert (vergl. Fig. 6). Die Reduktion von Cytochrom c [Fe^{+++}] zu Cytochrom c [Fe^{++}] haben wir im optischen Test direkt an der Zunahme der Absorption von reduziertem Cytochrom c bei $546 m\mu$ gemessen. Um die geringe Reoxydation von reduziertem Cytochrom c zu hemmen, haben wir die Versuche mit KCN durchgeführt. Aus den Kurven geht eindeutig hervor, dass [Fe^{+++}] als Elektronenacceptor und nicht als Überträger dient.

Wenn unsere Vorstellung von der Funktion des Ascorbinsäuresystems als

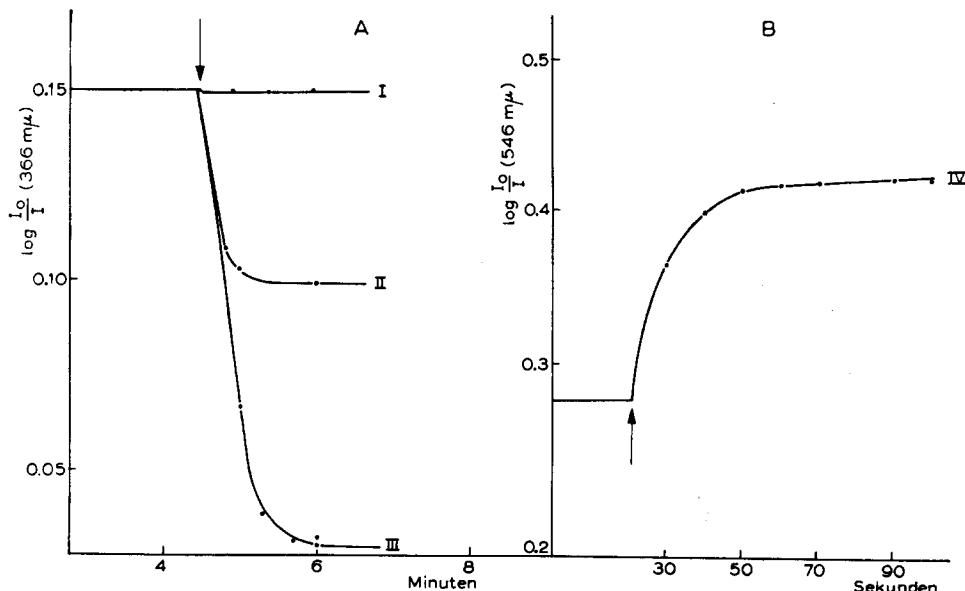


Fig. 6. Fe^{+++} als Elektronenacceptor. $0.15 M$ Phosphatpuffer, pH 7.4, $t = 37^\circ$. DPNH $4.5 \cdot 10^{-5} M$; Enzym ~ 0.1 mg Protein (Biuret); KCN $10^{-8} M$ (Pfeil \downarrow). A. $K_3[Fe(CN)_6]$ als Elektronenacceptor. Start (Pfeil \downarrow) mit: I. $K_3[Fe(CN)_6]$ $1 \cdot 10^{-6} M$; II. $K_3[Fe(CN)_6]$ $4.5 \cdot 10^{-5} M$; III. $K_3[Fe(CN)_6]$ $2 \cdot 4.5 \cdot 10^{-5} M$. B. Cyt. c [Fe^{+++}] als Elektronenacceptor. IV. Cyt. c $10^{-5} M$. Start mit DPNH (Pfeil \downarrow).

Elektronenüberträger zwischen DPNH und O_2 zutrifft, dann ist nicht die Konzentration der Ascorbinsäure, sondern die Konzentration der Monodehydroascorbinsäure limitierend für die Geschwindigkeit der Reaktion. Die Oxydation von Ascorbinsäure zu Monodehydroascorbinsäure wäre also der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt. Diese Annahme würde die grössere Geschwindigkeit der Reaktion mit Fe^{+++} als Acceptor und die hohe Ascorbinsäurekonzentration, die wir für die Versuche benötigen, erklären. Um diesen Unterschied zwischen einer reinen Acceptorwirkung von Fe^{+++} und der Funktion der Ascorbinsäure als Elektronenüberträger zwischen DPNH und Sauerstoff experimentell zu zeigen, haben wir einmal die Ascorbinsäurewirkung auf die DPNH-Oxydation bei verschiedenem O_2 -Gehalt der Lösungen verfolgt. Zum anderen wurde untersucht, ob nicht katalytische Ascorbinsäurekonzentrationen ausreichen, wenn die Ascorbinsäureoxydation durch Zusatz einer Oxydase beschleunigt wird, sodass intermedial eine ausreichende Menge an Monodehydroascorbinsäure entsteht. Die Versuchsergebnisse sind in Fig. 7 und 8 zusammengefasst.

Die Versuche haben ergeben, dass bei der durch Monodehydroascorbinsäure ermöglichten enzymatischen DPNH-Oxydation Sauerstoff als Endelektronenacceptor

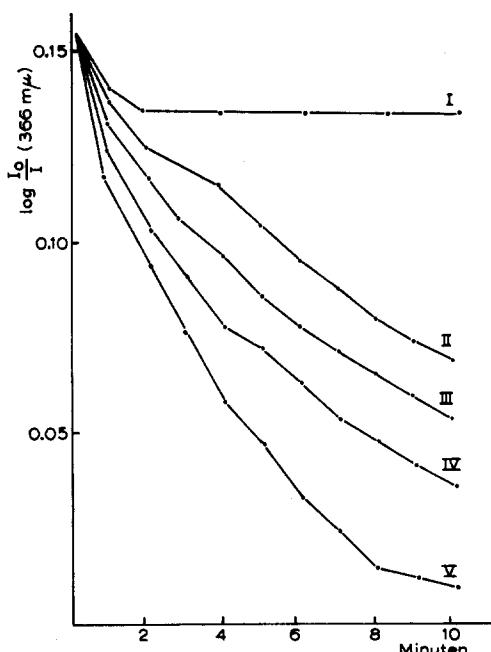


Fig. 7. Abhängigkeit des Ascorbinsäure-Effektes vom Sauerstoffgehalt der Lösung. $M/15$ Phosphatpuffer, pH 7.4. $t = 37^\circ$. DPNH: $4.5 \cdot 10^{-5} M$; Ascorbinsäure: $10^{-8} M$. I. DPNH + Enzym; II. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure, 7 Min. N_2 durchgeleitet; III. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure, 4 Min. N_2 durchgeleitet; IV. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure, 2 Min. N_2 durchgeleitet; V. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure, aerob.

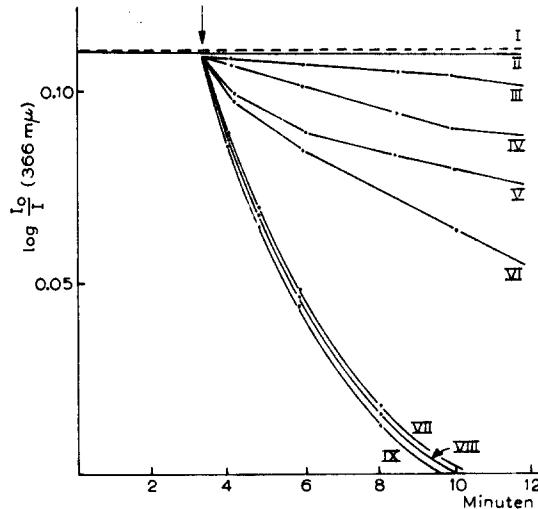


Fig. 8. DPNH-Oxydation in Gegenwart des isolierten Enzymsystems, Ascorbinsäureoxydase und Ascorbinsäure. $M/15$ Phosphatpuffer, pH 6.6, $t = 37^\circ$. DPNH $3.2 \cdot 10^{-5} M$, Enzym ~ 0.1 mg Protein (Biuret). I. DPNH + Enzym, ohne Ascorbinsäure; II. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure-Oxydase, ohne Ascorbinsäure; III. DPNH + Ascorbinsäureoxydase + Ascorbinsäure 10^{-8} – $10^{-6} M$ (ohne Enzym); IV. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure $10^{-5} M$; V. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure $10^{-4} M$; VI. DPNH + Enzym + Ascorbinsäure $10^{-3} M$; VII. DPNH + Enzym + Ascorbinsäureoxydase + Ascorbinsäure $10^{-6} M$; VIII. DPNH + Enzym + Ascorbinsäureoxydase + Ascorbinsäure $10^{-5} M$; IX. DPNH + Enzym + Ascorbinsäureoxydase + Ascorbinsäure $10^{-4} M$. Start der Reaktion mit Ascorbinsäure nach 3 Minuten (Pfeil ↓).

dient. Je geringer der O_2 -Gehalt in der Lösung, umso weniger DPNH wird oxydiert. Experimentell sind wir bei diesen Versuchen so vorgegangen, dass wir den Sauerstoff successive durch Stickstoff ersetzt haben, indem wir den Ansatz vor Zugabe des Enzymsystems verschieden lange mit N_2 behandelten. Dann wurde das Enzym zugegeben, die Küvette sofort luftdicht abgeschlossen und mit der optischen Messung begonnen.

Wie aus Fig. 8 hervorgeht, reagieren DPNH, Ascorbinsäureoxydase und Ascorbinsäure ohne das Enzymsystem praktisch nicht miteinander*. In Gegenwart von Ascorbinsäure, Ascorbinsäureoxydase und dem isolierten Enzym wird jedoch das DPNH wesentlich schneller oxydiert als im Vergleichsansatz ohne Oxydase. Ferner kann die wirksame Ascorbinsäurekonzentration ($10^{-3} M$) um drei Zehnerpotenzen erniedrigt werden, ohne dass die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich abnimmt, sodass im Grenzfalle $0.1 \mu\text{Mol}$ DPNH in Gegenwart von $0.01 \mu\text{Mol}$ Ascorbinsäure und der beiden Enzyme dehydriert wird. Die Konzentration der an der Reaktion beteiligten "Monodehydroascorbinsäure" liegt sogar noch darunter. Diese experimentellen Ergebnisse zeigen, dass das Ascorbinsäuresystem als echter Überträger wirkt. Die isolierte Proteinfraktion enthält demnach eine "DPNH-Monodehydroascorbinsäuretranshydrase". Die unter diesen Versuchsbedingungen nach der Geraegleichung

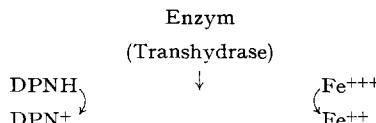
$$S/V = S/V_{max} + K/V_{max}$$

von LINEWEAVER UND BURK¹⁴ graphisch ermittelte Michaelis-Konstante K_{DPNH} beträgt $2 \cdot 10^{-5}$ Mol DPNH/l. Die Versuche mit Zusatz von pflanzlicher Ascorbinsäureoxydase wurden bei pH 6.6 durchgeführt, weil das pH-Optimum der pflanzlichen Ascorbinasen im schwach sauren Milieu liegt. Um dem Einwand zu begegnen, bei der Oxydation von Ascorbinsäure gebildetes H_2O_2 könnte den nötigen Sauerstoff liefern, haben wir unter weitgehend anaeroben Bedingungen H_2O_2 zugesetzt. H_2O_2 hat auch in Gegenwart des Enzymsystems keinerlei Einfluss auf die DPNH-Oxydation.

DISKUSSION

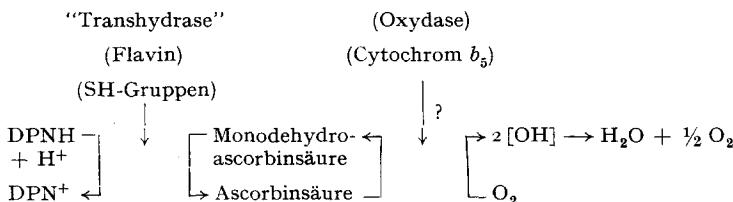
Wie die beschriebenen Versuchsergebnisse zeigen, enthält die von uns aus Nebennierenmikrosomen gewonnene Proteinfraktion eine spezifische "DPNH-Monodehydroascorbinsäuretranshydrase". Monodehydroascorbinsäure wirkt als *Elektronenacceptor* und wird dabei zu Ascorbinsäure reduziert, die ihrerseits durch Sauerstoff oxydiert wird. Auf diesem Wege vermittelt das Ascorbinsäuresystem den Wasserstofftransport bis zum Sauerstoff. Diese Behauptung stützt sich auf folgende Beobachtungen: Wenn man die Ascorbinsäureoxydation durch Zusatz einer Ascorbinsäureoxydase beschleunigt, so wirkt die Ascorbinsäure in katalytischen Konzentrationen, also als echter *Elektronenüberträger*. Ferner ist die DPNH-Oxydation in dem beschriebenen System abhängig vom Sauerstoff-Gehalt der Lösung. Je weniger Sauerstoff vorhanden ist, umso langsamer wird das DPNH oxydiert. Die Möglichkeit, dass durch Autoxydation der Ascorbinsäure entstehendes H_2O_2 in Gegenwart des Enzymsystems oxydierend auf das DPNH wirkt, konnte ausgeschlossen werden. Das Ferment überträgt auch Elektronen auf Fe^{+++} -Komplexe, die Reaktion verläuft jedoch stoechiometrisch, d.h., in diesem Fall ist Fe^{+++} der Endacceptor für die Elektronen.

* Die Konzentration des Extraktzusatzes aus Gurken ist so bemessen, dass die von KERN und RACKER⁵ aus Gurken isolierte ascorbinsäureabhängige DPNH-Oxydase bei dem Versuch keine Rolle spielt.



Wie aus den Absorptionsspektren und der Fluoreszenz hervorgeht, enthält das aus Nebennierenmikrosomen gefällte Protein Cytochrom b_5 und einen Flavinanteil. Wir nehmen daher an, dass es sich bei dem von uns beschriebenen Enzymsystem, ähnlich wie bei der Cytochrom c -Reduktase (MAHLER *et al.*¹⁵, ferner MACKLER *et al.*¹⁶), um ein Metallflavoprotein mit einer Haemochromogenkomponente handelt. (Vergl. auch STRITTMATTER¹⁷.) Die Hemmbarkeit der Enzymreaktion durch β -Chlormercuribenzoat spricht dafür, dass SH-Gruppen bei der enzymatischen DPNH-Dehydrierung durch Monodehydroascorbinsäure beteiligt sind.

Mit Sicherheit nachgewiesen ist also in unserem Enzymsystem eine "DPNH-Monodehydroascorbinsäuretranshydrase". Wie die Monodehydroascorbinsäure aus der Ascorbinsäure entsteht, ist noch nicht zu sagen. Möglicherweise übernimmt das Cytochrom b_5 die Rolle einer "Ascorbinsäureoxydase", denn es ist bekannt, dass Cytochrom b_5 durch Ascorbinsäure reduziert werden kann und selbst autoxydabel ist. Ob Cytochrom b_5 für die ascorbinsäureabhängige DPNH-Oxydation als essentieller Bestandteil notwendig ist, wird zur Zeit von uns untersucht. Die enzymatische DPNH-Oxydation über Monodehydroascorbinsäure lässt sich nach dem Gesagten wie folgt formulieren:



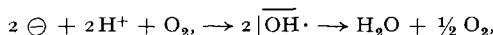
Für das Vorhandensein eines "Faktors", der Ascorbinsäure oxydiert, haben wir bisher einige Anhaltspunkte: Die bei 40% Sättigung gefällte Proteinfraktion zeigt in der Warburg-Apparatur Ascorbinsäureoxydasewirkung. Diese ist nicht durch KCN hemmbar. Wir beobachten im Gegenteil sogar in manchen Fällen eine Aktivierung der Ascorbinsäureoxydation durch KCN. Vor kurzem haben FRIEDEN UND MAGGIOLO¹⁸ über die Aktivierung und die Eigenschaften pflanzlicher Ascorbinsäureoxydase berichtet. Wie die Autoren beobachtet haben, wirken u.a. Komplexbildner, z.B. KCN, Aethylendiamintetraessigsäure, Diäthyldithiocarbamat in geringen Konzentrationen aktivierend auf die pflanzlichen Ascorbinsäureoxydase, während Metall-Ionen die Ascorbinsäureoxydation durch die Oxydase hemmen. Der Mechanismus einer Hemmung der Ascorbinsäureoxydase durch Metall-Ionen wird von den Autoren ausführlich diskutiert. Nach Ansicht der Verfasser werden durch Zusatz von Komplexbildnern in bestimmten Konzentrationen die hemmenden Ionen beseitigt.

Aufschlussreich in diesem Zusammenhang scheinen uns folgende Beobachtungen:

- (a) Von den untersuchten Metall-Ionen wirkt Mn^{++} hemmend auf die DPNH-Oxydation in dem beschriebenen System. Die Hemmung lässt sich aufheben, indem man Mn^{++} durch Zusatz von Aethylendiamintetraessigsäure komplex bindet.

(b) Fügt man Ascorbinsäure zu Nebennierenhomogenaten, so werden die zugesetzte und auch die endogene Ascorbinsäure innerhalb von 90 Min. kaum oxydiert. In gleichen Versuchsansätzen, die als Komplexbildner Aethylendiamintetraessigsäure enthielten, findet eine echte Ascorbinsäureoxydation statt (unveröffentlichte Ergebnisse KRAUSHAAR-KERSTEN-STAUDINGER).

Bei unseren weiteren Versuchen soll geprüft werden, welcher Faktor für die Ascorbinsäureoxydation verantwortlich ist. Gleichgültig wie bei der enzymatischen DPNH-Oxydation in Gegenwart von Ascorbinsäure und der "DPNH-Monodehydroascorbinsäuretranshydrase" die Ascorbinsäure zur Monodehydroascorbinsäure oxydiert wird: der vom DPNH gelieferte Wasserstoff reagiert letzten Endes mit O_2 , nach unserer Vorstellung über folgende Reaktion



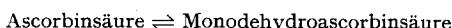
wobei intermediär "Hydroxylradikale" entstehen.

Über die theoretischen Überlegungen und experimentellen Befunde, die zu dieser Annahme führen, werden wir im Teil II unserer Arbeit unter gleichem Titel berichten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Nebennierenmikrosomen wurde ein Enzymsystem isoliert, das unter Vermittlung von Ascorbinsäure in Gegenwart von O_2 DPNH oxydiert.
2. Die angegebenen Spektren und Absorptionsmaxima weisen auf einen Flavinanteil und Cytochrom b_5 als Komponenten hin.
3. Das Enzymsystem enthält SH-Gruppen, die an der beschriebenen Enzymreaktion beteiligt sind. Die Reaktion wird durch *p*-Chlormercuribenzoat vollständig gehemmt. Das Enzym wird ferner durch Mn^{++} , nicht dagegen durch KCN, NaN_3 , Monoiodessigsäure und Antimycin A gehemmt.
4. Weder Dehydroascorbinsäure, noch Glutathion, noch Adrenalin können Ascorbinsäure ersetzen. D-isoAscorbinsäure ist wirksam, jedoch deutlich schwächer als die Ascorbinsäure selbst. TPNH wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen in Gegenwart von Ascorbinsäure und dem Enzymsystem nicht oxydiert.
5. Fe^{+++} in komplexer Form wird durch DPNH in Anwesenheit des Enzyms stoechiometrisch reduziert.
6. Die Geschwindigkeit der DPNH-Oxydation durch Ascorbinsäure ist abhängig vom O_2 -Gehalt des Reaktionsmediums.
7. Aus den experimentellen Unterlagen geht hervor, dass "Monodehydroascorbinsäure" als intermediärer Elektronenacceptor wirkt. Das System



bildet den Elektronenüberträger zwischen DPNH und O_2 . Dabei entstehen vermutlich intermediär Hydroxylradikale.

SUMMARY

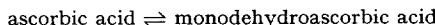
1. An enzyme system has been isolated from suprarenal microsomes that oxidizes DPNH in the presence of ascorbic acid and O_2 .
2. The spectra and absorption maxima point to a flavin constituent and cytochrome b_5 as components.
3. The enzyme system contains SH groups, which are concerned in the enzyme reaction described. The reaction is entirely blocked by *p*-chloromercuri-benzoate. The enzyme is also blocked by Mn^{++} , but not by KCN, NaN_3 , monoiodoacetic acid, or antimycin A.
4. Neither dehydroascorbic acid, nor glutathione, nor adrenalin, can displace ascorbic acid.

D-Isoascorbic acid is active but distinctly weaker than ascorbic acid itself. Under the experimental conditions described, TPNH is not oxidized in the presence of ascorbic acid.

5. Fe^{+++} in complex form is reduced by DPNH in the presence of the enzyme.

6. The speed of the DPNH-oxidation by ascorbic acid is dependent on the O_2 content of the reaction medium.

7. On the basis of the experiments it appears that "monodehydroascorbic acid" acts as an intermediary electron acceptor. The system



forms the electron carrier between DPNH and O_2 . Intermediary hydroxyl radicals probably arise in this way.

LITERATUR

- 1 W. KERSTEN, H. SCHMIDT UND H.J. STAUDINGER, *Biochem. Z.*, 326 (1955) 469.
- 2 H. KERSTEN, W. KERSTEN UND H.J. STAUDINGER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 24.
- 3 D. M. KERN, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 1011.
- 4 H. BEEVERS, *Plant Physiol.*, 29 (1954) 265.
- 5 M. KERN UND E. RACKER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 235.
- 6 M. B. MATHEWS, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 695.
- 7 D. NASON, W. O. WOSSILAIT UND A. I. TERELL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 233.
- 8 H. KERSTEN, W. KERSTEN UND H.J. STAUDINGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 222.
- 9 B. MACKLER UND D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 6.
- 10 C. F. STRITTMATTER UND E. G. BALL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 38 (1952) 19; *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 253.
- 11 D. GARFINKEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 199.
- 12 B. CHANCE UND G. R. WILLIAMS, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 945.
- 13 M. L. SWEAT UND M. D. LIPSCOMB, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5185.
- 14 H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 15 H. R. MAHLER UND D. G. ELOWE, *J. Biol. Chem.*, 210 (1954) 165.
- 16 B. MACKLER, R. REPASKE, M. KOHOUT UND D. E. GREEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 437.
- 17 PH. STRITTMATTER UND S. F. VELICK, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 228.
- 18 E. FRIEDEN UND I. W. MAGGIOLO, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 42.

Ein eingegangen am 20. September 1957

THE ENZYMIC DETERMINATION OF *MYO*-INOSITOL

ARTHUR WEISSBACH

*National Institutes of Health, National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases,
Bethesda, Md. (U.S.A.)*

myo-Inositol has been found to be widely distributed in living cells and to be a major constituent of the phospholipids. The lack of a direct, sensitive, and specific assay for *myo*-inositol has hindered studies as to its metabolism and function in biological systems. Earlier studies on *myo*-inositol metabolism by MAGASANIK have shown that capsulated strains of *Aerobacter aerogenes* are capable of using *myo*-inositol as a sole carbon source for growth¹. Further work revealed that extracts of *myo*-inositol-grown *A. aerogenes* cells catalyzed the reduction of DPN* by *myo*-inositol². Attempts by other workers to adapt this DPN-linked inositol dehydrogenase for the direct spectro-

* The following abbreviations are used: DPN = Diphosphopyridine nucleotide; TRIS = Tris (hydroxymethyl) aminomethane; DPNH = Reduced diphosphopyridine nucleotide.

References p. 611.