

- ¹ J. T. EDSALL, *Conference on Hemoglobin, Natl. Acad. Sci., Natl. Res. Council Publ.*, 557, 1958, p. 1.
- ² V. M. INGRAM, D. W. RICHARDS AND A. P. FISHMAN, *Science*, 138 (1962) 996.
- ³ R. E. BENESCH AND R. BENESCH, *Biochem.*, 1 (1962) 735.
- ⁴ E. O. FIELD AND J. R. P. O'BRIEN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 656.
- ⁵ U. HASSERODT AND J. VINOGRAD, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 12.
- ⁶ J. VINOGRAD AND W. D. HUTCHINSON, *Nature*, 187 (1960) 216.
- ⁷ E. ANTONINI, J. WYMAN, E. BUCCI, C. FRONTECELLI AND A. ROSSI-FANELLI, *J. Mol. Biol.*, 4 (1962) 368.
- ⁸ H. A. ITANO AND S. J. SINGER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 522.
- ⁹ H. A. ITANO AND E. A. ROBINSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 46 (1960) 1492.
- ¹⁰ H. M. RANNEY, C. O'BRIEN AND A. S. JACOBS, *Nature*, 194 (1962) 743.
- ¹¹ C. BAGLIONI, *Biochim. Biophys. Acta*, 48 (1961) 392.
- ¹² J. A. HUNT AND V. A. INGRAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 409.
- ¹³ M. MURAYAMA, *Nature*, 196 (1962) 276.
- ¹⁴ R. E. BENESCH, H. M. RANNEY, R. BENESCH AND G. M. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2926.
- ¹⁵ O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 71 (1959) 585.
- ¹⁶ H. G. KUNKEL, R. CEPELLINI, U. MÜLLER-EBERHARD AND J. WOLF, *J. Clin. Invest.*, 36 (1957) 1615.
- ¹⁷ R. E. BENESCH, R. BENESCH AND M. E. WILLIAMSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48 (1962) 2071.

Received February 14th, 1963

Biochim. Biophys. Acta, 74 (1963) 544-547

SC 2277

Zum Mechanismus der mikrosomalen Ascorbinsäure-abhängigen NADH₂-Oxidation

Der Frage, ob Dehydroascorbinsäure imstande ist, die mikrosomale NADH₂-Oxidation zu beschleunigen, kommt für den Mechanismus der Ascorbinsäurewirkung grundsätzliche Bedeutung zu. Die hierin aufgetretene Diskrepanz zwischen den von uns^{1,2} und den unlängst von FRUNDER, BLUME UND KLUGE³ veröffentlichten Befunden veranlasste uns deshalb, erneut die Identität der eingesetzten Dehydroascorbinsäure zu prüfen und mit der so definierten Substanz die NADH₂-Oxidation zu untersuchen.

Dazu verwendeten wir als Dehydroascorbinsäure Praeparate aus den Forschungslabatorien der Firmen E. Merck AG, Darmstadt, und der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Baden. Beide Substanzen zeigten identische Ultraviolett- und Infrarotspektren. Darin ist neben zahlreichen anderen Gruppenschwingungen besonders die scharfe, nach kürzeren Wellen (5.62μ) verschobene Carbonylabsorption der für die Dehydroascorbinsäure charakteristischen Diketo- γ -Lacton-Gruppierung für die Konstitution beider Praeparate beweisend. Die aus Dehydroascorbinsäure durch Reduktion mit H₂S in neutraler Lösung gewonnenen und durch Umkristallisierten gereinigten Ascorbinsäureproben ergaben die für Ascorbinsäure typischen Ultraviolett- und Infrarotspektren.

Zur Bestimmung der enzymatischen Ascorbinsäure-abhängigen NADH₂-Oxidation wurde die Extinktionsabnahme über die Zeit registriert. Wie Tabelle I zeigt, sind die spezifischen Aktivitäten für authentische Ascorbinsäure und für Ascorbinsäure, gewonnen durch Reduktion aus Dehydroascorbinsäure, annähernd gleich. Demgegenüber lässt sich mit Dehydroascorbinsäure keine, bzw. lediglich in den angereicherten Proteinfraktionen eine geringe Aktivierung der NADH₂-Oxidation erreichen. Prinzipiell gleiche Befunde wurden mit dem von FRUNDER, BLUME UND

KLUGE³ angegebenen Testsystem (mit KCN, ohne Ascorbinsäure-Oxidase) erhoben. In diesen Fällen lagen lediglich die berechneten spezifischen Aktivitäten niedriger.

Die aufgeführten Befunde lassen vermuten, dass die von FRUNDER, BLUME UND KLUGE³ nach POHLOUDEK-FABINI UND FÜRTIG⁵ hergestellte Dehydroascorbinsäure entweder nicht frei von Ascorbinsäure war, oder aber andere, bei der NADH₂-Oxidation als Elektronenüberträger fungierende Substanzen enthielt.

TABELLE I

SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN IN μMol NADH₂ PRO mg PROTEIN PRO min

Messung bei 366 $\text{m}\mu$ und 1 cm Schichttiefe im Photometer Eppendorf bei 37°. Endvolumen: 2.5 ml; 140 μM Phosphatpuffer (pH 7.4); 0.5 μM NADH₂, 0.3–0.4 E Ascorbinsäure-Oxidase (nach LOVETT-JANISON UND NELSON⁴); 0.3–0.5 mg Protein; Start mit 1.25 μM Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure oder zu Ascorbinsäure reduzierter Dehydroascorbinsäure.

Elektronenacceptor	Rattenlebermikrosomen	Mäuselebermikrosomen	Schweineebennierenmikrosomen	Aus Schweineebennieren angereicherte Proteinfraktionen
Ascorbinsäure	22.8	31.2	25.7	22.7
Dehydroascorbinsäure	0	0	0	16.9
Ascorbinsäure durch Reduktion aus Dehydroascorbinsäure	19.0	23.7	—	21.0
				194.0 348.0
				16.9 5.8
				190.5 334.0

Im Gegensatz zu der Frage, ob die mikrosomale NADH₂-Oxidation durch Dehydroascorbinsäure aktivierbar ist, stimmen wir mit FRUNDER, BLUME UND KLUGE darin völlig überein, dass die mikrosomale NADPH₂-Oxidation durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst wird. Unsere diesbezüglichen Untersuchungen wurden bereits 1958 veröffentlicht, während FRUNDER, BLUME UND KLUGE sich auf eigene, "unveröffentlichte" Untersuchungen stützen.

Wir danken den Firmen E. Merck, AG, Darmstadt und der Deutschen Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Baden, für die freundliche Überlassung von Versuchsmengen der Dehydroascorbinsäure.

Physiologisch-chemisches Institut
der Justus Liebig-Universität,
Giessen (Deutschland)

HANSJÜRGEN STAUDINGER
RUDOLF ABRAHAM
WOLFGANG SCHNEIDER

¹ H. KERSTEN, W. KERSTEN UND H.J. STAUDINGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 598.

² K. KRISCH UND H.J. STAUDINGER, *Biochem. Z.*, 331 (1959) 195.

³ H. FRUNDER, E. BLUME UND H. KLUGE, *Biochim. Biophys. Acta*, 65 (1962) 146.

⁴ P. L. LOVETT-JANISON UND J. M. NELSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 1409.

⁵ R. POHLOUDEK-FABINI UND W. FÜRTIG, *Arch. Pharmakol.*, 292 (1959) 350.

Eingegangen den 14 Januar, 1963