

**Prom. Nr. 3146**

**I. Carnosin und energiereiches Phosphat**

**II. Biosynthese von Vitamin K<sub>2</sub>  
aus Methylnaphthochinon und Mevalonsäure**

Von der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH

zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der technischen Wissenschaften  
genehmigte

**PROMOTIONSARBEIT**

vorgelegt von

**KLAUS SCHERRER**

dipl. Ing.-Chem. E. T. H.

von Schaffhausen und Neunkirch (Kt. Schaffhausen)

Referent: Herr Prof. Dr. C. Martius  
Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Eschenmoser

Juris-Verlag Zürich  
1961

Meinen lieben Eltern  
und Peti gewidmet

Zu Dank verpflichtet bin ich

Herrn PD. Dr. A. Winterstein und

Herrn Prof. Dr. L. Ruzicka

deren Anregung und eigenes Interesse für die  
Biochemie mich meinen Weg finden liessen.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. C. Martius

für Anleitung und Unterstützung im Laufe dieser  
Arbeit sowie für seine Grosszügigkeit und das mir  
bewiesene Vertrauen.

Dem Schweizerischen Schulrat und der  
Monsanto Research S.A. Zürich

danke ich für die Gewährung eines  
Ausbildungsstipendiums im Jahre 1959/60

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
I. CARNOSIN UND ENERGIEREICHES PHOSPHAT	1
II. BIOSYNTHESE VON VITAMIN K <sub>2</sub>	5
1 Einleitung	6
2 Material	9
21 Radioaktive Substanzen	9
211 Synthese von Mevalolacton-H <sup>3</sup>	9
22 Inaktive Substanzen	24
23 Versuchstiere	24
3 Methodik	24
31 Allgemeine Methoden	24
32 In vivo Versuche	31
33 In vitro Versuche	33
34 Identifizierung der radioaktiven Substanzen	35
4 Resultate	39
41 In vivo Versuche	39
411 Synthese von Vitamin K <sub>2</sub>	39
412 Synthese von Ubichinon <sup>2</sup> (50)	47
413 Verteilung der Tritiumaktivität auf die markierten Substanzen	50
42 In vitro Versuche	52
421 Umwandlung von 2-(Methyl-C <sup>14</sup> )-1,4-naphthochinon	52
422 Synthese von Vitamin K <sub>2</sub>	56
423 Synthese von Ubichinon <sup>2</sup>	72
424 Nachweis der Bildung von Farnesol, Squalen und Cholesterin	74
5 Diskussion	75
51 In vivo Versuche	75
52 In vitro Versuche	76
521 Bindung von Menadion an das Protein	76
522 Synthese von Vitamin K <sub>2</sub>	79
6 Zusammenfassung	83
7 Literaturverzeichnis	84

CARNOSIN UND ENERGIEREICHES

PHOSPHAT

Die zu Beginn dieser Dissertation durchgeführte Untersuchung über das Carnosin führte zu einem Ergebnis, das eine Weiterbearbeitung im Rahmen unserer Problemstellung uninteressant erscheinen liess. Da die Befunde in der Zwischenzeit von anderer Seite bestätigt worden sind, scheint eine Darstellung in extenso der damaligen Experimente wenig sinnvoll. Problemstellung und Ergebnis sollen daher hier nur kurz skizziert werden.

Carnosin und Anserin ( $\beta$ -Alanylhistidin,  $\beta$ -Alanyl-N-methylhistidin) erweckten schon früh das Interesse der biochemischen Forschung durch ihre weite Verbreitung und hohe Konzentration in tierischem Gewebe (z.B. Skelettmuskulatur vom Rind: 1,1 g %). Zudem waren diese beiden Peptide bis zur Entdeckung von Pantoensäure und Coenzym A vor wenigen Jahren die einzigen Naturstoffe mit einer  $\beta$ -Alanyl-Gruppierung. Einzigartig ist ferner, dass seit der Entdeckung des Carnosins im Jahre 1900 durch Gulewitsch [00] im Verlaufe von 60 Jahren Forschung (Übersichten s. du Vigneaud [39] und Fusier [50]) alle Bemühungen um die Aufklärung seiner Rolle im Stoffwechsel scheiterten.

Carnosin wird im Körper aufgebaut. Es findet sich mengenmässig mit Kreatin an erster Stelle unter den stickstoffhaltigen Extraktivstoffen des Muskels. Die bekannte Rolle des Kreatins im Muskelmetabolismus liess für Carnosin eine ähnliche Funktion erwarten. Severin [48] zeigte rein chemisch, dass in die Imidazolstickstoffatome des Carnosins eingeführtes Phosphat energiereich gebunden ist. So postulierte er später [52] ein im Stoffwechsel gebildetes, energiereiches Carnosinphosphat und dessen Einfluss auf die oxydative Phosphorylierung.

Orientierende Versuche von Martius und Ritzl [56] hatten ebenfalls einen Einfluss des Carnosins auf den Prozess der oxydativen Phosphorylierung gezeigt. In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, dafür weitere Belege zu finden. Arbeitshypothese war, dass in ähnlicher Weise wie beim Kreatin Phosphat von ATP auf Carnosin übertragen würde. Das Carnosinphosphat wäre demnach

ein Speicher für energiereiches Phosphat. Beim hohen Gehalt des Muskels an Carnosin käme einem solchen leicht greifbaren Energie-reservoir erhebliche Bedeutung zu. Die Schwierigkeit eines Nachweises liegt jedoch in der hohen Labilität des Carnosinphosphats.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Effekt von Carnosin auf den P/O Quotienten von atmenden Mitochondrien und Zwerchfellstückchen von der Ratte untersucht. Bei Mitochondrien erhöhte die Zugabe des Dipeptids den P/O Wert im besten Fall von 2,05 auf 2,20, bei Zwerchfell von 2,24 auf 3,00 ( $\beta$ -Oxybutyrat als Substrat), wobei der Effekt auf einer Erhöhung der Phosphorylierung beruhte.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Carnosin ( $2,5 \cdot 10^{-2} M$ ) auf den Abbau von ATP zu bei Raumtemperatur säurelabilem und anorganischem Phosphat (Carnosinphosphat ist labiler als Kreatinphosphat, s. Wahlen [58]) in Homogenaten von Skelettmuskulatur der Ratte untersucht. In fast allen Experimenten zeigten sich geringe Erhöhungen des Abbaus von ATP unter Carnosinzusatz, die aber nicht an die parallel dazu überprüften Wirkungen von Kreatin heranreichten. Sie wurden jedoch fragwürdig, als festgestellt werden konnte, dass sich auch mit Histidin dieselben Effekte erzielen lassen. In Gegenwart von Histidin zeigte Carnosin keine Wirkung mehr. Der Einfluss von Carnosin auf die Phosphorylierung musste daher auf eine unspezifische Wirkung des Imidazolrings zurückgeführt werden. Anzuführen wäre noch die Beobachtung, dass in den Ansätzen mit Carnosin oder Histidin die Werte des End-pH in der Regel über denjenigen der Kontrollen lagen. Ein reiner Puffereffekt scheint möglich zu sein.

In der Folge erschienen mehrere Arbeiten, die ebenfalls gegen eine Beteiligung von Carnosin am Phosphatstoffwechsel sprachen. Cain [58], Nagradova [58], Scherstnev [58], Jenks [59] und Davey [60] fanden für die beobachteten Carnosineffekte Erklärungen, die ebenfalls gegen eine Rolle des Dipeptids in der oxydativen und der Substratphosphorylierung sprachen. Von russischer Seite wird



aber, wie Publikationen von Severin [58] und Meshkova [60] zeigen, weiterhin an der alten Hypothese festgehalten.

### Literaturverzeichnis

- [00] W.Gulewitsch, S.Amirabzibi, B. 33, 1902 (1900)
- [39] V.du Vigneaud, O.K.Behrens, *Ergebn.Physiol.* 41, 917 (1939)
- [48] S.E.Severin, E.F.Georgievskaya, V.I.Jvanov, *Biochimija* 12, 35 (1948)
- [50] P.Fusier, *Produits Pharmaceutiques* 5, 325 (1950)
- [52] S.E.Severin, N.P.Meshkova, *Doklady Akad.SSSR* 84, 105 (1952)
- [56] C.Martius, F.Ritzl, unveröffentlichte Versuche.
- [58] D.F.Cain, A.M.Delluva, R.E.Davies, *Nature* 182, 720 (1958)
- [58] N.K.Nagradova, *Biochimija* 23, 478/511 (1958)
- [58] E.A.Scherstnev, *Doklady Akad. SSSR* 118, 753 (1958)
- [58] S.E.Severin, Yü Shu-yü, *Biochimija* 23, 816/862 (1958)
- [58] B.Wahlen, A.Wollenberger, *Bio.Z.* 329, 508 (1958)
- [59] W.P.Jenks, M.Hyatt, *Biochim.biophys.Acta* 31, 262 (1959)
- [59] N.P.Meshkova, *Biochimija* 24, 303 (1959)
- [60] C.L.Davey, *Arch.Biochem.* 89, 303 (1960)

BIOSYNTHESE VON VITAMIN K<sub>2</sub>  
=====

AUS METHYLNAPHTHOCHINON  
=====

UND MEVALONSAEURE  
=====

## 1 E I N L E I T U N G

Vitamin K wurde 1929 durch Dam [29] entdeckt. Das Auftreten von schweren Blutungen bei Küken, die mit einer lipoidfreien Nahrung gefüttert worden waren, wies auf die Existenz eines antihämorrhagischen, fettlöslichen Wirkstoffes hin. Da das Fehlen dieses "Koagulationsvitamins" in der Nahrung zu einem Absinken des Prothrombinspiegels im Blut führte, sah man lange Zeit seine Funktion ausschliesslich im Zusammenhang mit dem Prozess der Blutgerinnung. Die weite Verbreitung nicht nur in Tieren, sondern auch in der Pflanzenwelt, wies jedoch von Anbeginn auf eine fundamentalere Rolle im Stoffwechsel hin.

In einer Reihe von Arbeiten konnte dann Martius [58] dem Vitamin K eine Funktion in der oxydativen Phosphorylierung zuweisen, indem er zeigte, dass dieser Wirkstoff die Atmung und Phosphorylierung von Mitochondrien koppelt. Durch die Isolierung und Reinigung einer Vitamin K-Reduktase (Märki [60]), die Wasserstoff von den Pyridinnucleotiden auf Vitamin K überträgt - von diesem wird er über Cytochrom b, die Cytochrome c und a an den Sauerstoff weitergeleitet - war die Beteiligung des Vitamins an der Atmungskette sichergestellt.

War somit die Funktion von Vitamin K weitgehend geklärt, so konnte aber in all diesen Arbeiten über die tatsächlich aktive Form des Wirkstoffes keine Aussage gemacht werden. Die frühen Bestimmungen des Vitamin K-Gehaltes von tierischen und pflanzlichen Materialien wurden nach dem Test von Almquist [38] durch Verfüttern an Vitamin K-freie Küken ausgeführt und sagten nichts über die Natur der aktiven Stoffe aus. Die Isolierung von Vitamin K<sub>1</sub> erfolgte durch Binkley, Doisy et al. [39] und Karrer [39]; seine Aufklärung als 2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthochinon durch Karrer [39], MacCorquodale, Doisy et al. [39] und Fieser [39]. In der Folge wurden noch andere in der Natur vorkommende Vitamin K-aktive Stoffe isoliert:

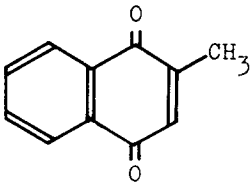
Die Vitamine  $K_2(30)$  und  $K_2(35)$  aus Microorganismen in faulendem Fischmehl (McKee, Doisy et al. [39]) sowie das viel schwächer aktive Phthiocol aus Tuberkelbazillen (Almquist, [39]). Unter der grossen Anzahl von in der Natur nicht vorkommenden Vitamin K-aktiven Stoffen (Uebersicht in: Vogel-Knobloch [50]) nahm das 2-Methyl-1,4-naphthochinon (Menadion) als aktivster Stoff überhaupt eine Sonderstellung ein. Gemeinsam war allen Verbindungen mit hoher Vitamin K-Wirksamkeit der 2-Methyl-1,4-naphthochinonkern. Ein Umbau dieses Moleküls in vivo zu einer und derselben aktiven Form erschien als wahrscheinlich. Infolge der äusserst kleinen Konzentration (Vitamin K-Tagesbedarf: ca. 4  $\mu$ g Menadion/kg Lebendgewicht) stiess aber deren Isolierung auf Hindernisse.

Erst Versuche von Martius [56], aus denen hervorging, dass das Tier imstande ist, aus Menadion (Provitamin K) einen Stoff aufzubauen, der in der Folge von Martius und Esser [58] als Vitamin  $K_2(20)$  identifiziert werden konnte, erfassten den zelleigenen Wirkstoff. Aus den bisherigen Befunden ging hervor, dass nur der 2-Methyl-1,4-naphthochinonkern dem Körper zugeführt werden muss, wobei dieser in verschiedener Art substituiert sein kann. Das Interesse konzentrierte sich nun auf den Aufbau des zelleigenen Wirkstoffes unter Beteiligung körpereigener Stoffe.

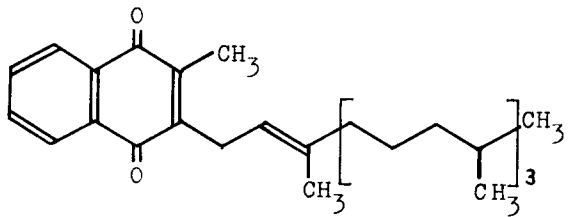
Nach der Entdeckung der Mevalonsäure durch Wolf, Folkers et al. [57] im Jahre 1956 wurde der Aufbau von Cholesterin (Tsvormina, 56a) und Squalen (Bloch [57]) aus diesem lange gesuchten Isopren-Vorläufer nachgewiesen. Auf Grund dieser Befunde - die Arbeiten von Lynen [58] über das Isopentenylpyrophosphat waren damals (1958) noch nicht bekannt - stellten Martius und Esser die Hypothese auf, dass auch die Geranyl-geranyl-Seitenkette von Vitamin  $K_2(20)$  aus Mevalonsäure aufgebaut werden müsse. Das konnte in in vivo-Versuchen mit Hilfe von tritiiertem Mevalolacton in der vorliegenden Arbeit bewiesen werden. In weiteren Experimenten wurde die Bildung von Vitamin K in vitro untersucht (Vorversuche in dieser Richtung waren schon von Esser [58] unternommen worden).

Die in vitro aus Menadion gebildete Verbindung konnte als Vitamin K<sub>2</sub>(15) identifiziert und der Aufbau ihrer Farnesyl-Seitenkette aus Mevalonsäure sichergestellt werden.

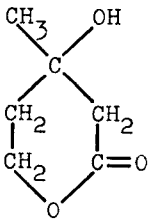
Formelübersicht



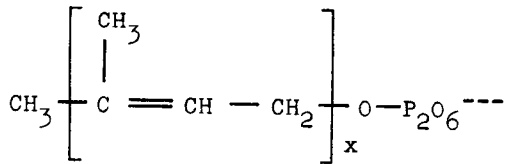
Menadion



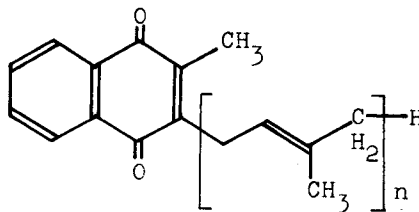
Vitamin K<sub>1</sub>



Mevalolacton



Polyisoprenpyrophosphat



n = 3 Vitamin K<sub>2</sub>(15)  
n = 4 Vitamin K<sub>2</sub>(20)

2 M A T E R I A L

21 R a d i o a k t i v e S u b s t a n z e n

211 SYNTHESE VON MEVALOLACTON-H<sup>3</sup>

2111 Allgemeiner Teil

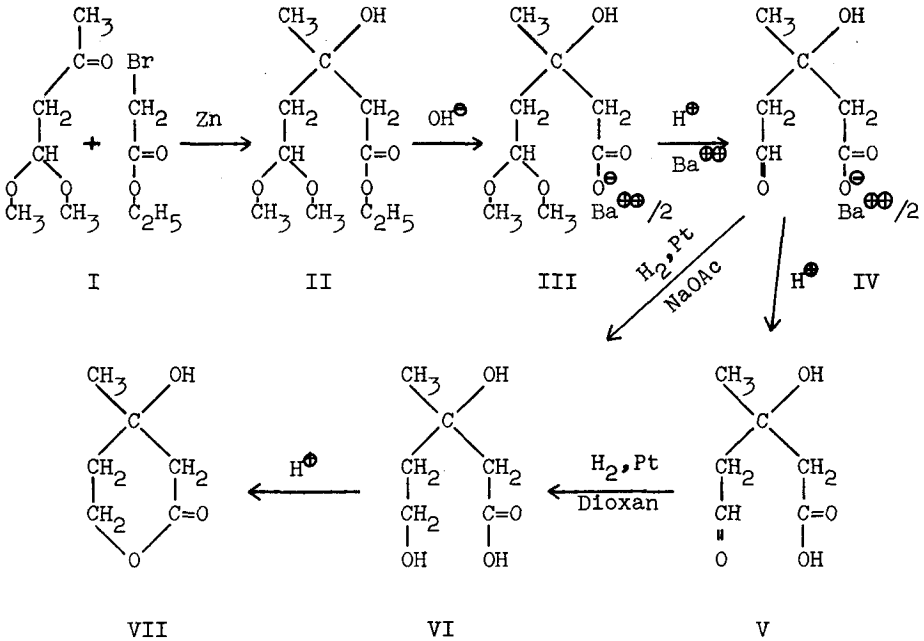
Ziel dieser Synthese war eine radioaktive Mevalonsäure, die geeignet sein musste, nach unserer Hypothese die Seitenkette eines Vitamin K<sub>2</sub> aufzubauen. Zusammen mit ebenfalls markiertem 2-Methyl-1,4-naphthochinon musste eine doppelt markierte Verbindung entstehen, die man zu isolieren hoffte. Da ein Menadion-C<sup>14</sup> mit einer Aktivität von 11'000 I/m/μg zur Verfügung stand, galt es, eine tritiummarkierte Mevalonsäure zu synthetisieren, die ungefähr die doppelte Aktivität aufweisen sollte. Im Scintillationszähler (s. 3142) wird die Zählung von C<sup>14</sup> durch gleichzeitig anwesendes Tritium nicht gestört, umgekehrt stört aber C<sup>14</sup> die Messung von Tritium. Deshalb darf die Aktivität der Mevalonsäure nicht tiefer liegen als die des Menadions.

An diese Mevalonsäure mussten gewisse Anforderungen gestellt werden. So schied die Tritiermethode nach Wilzbach [57] aus, da eine uniform markierte Substanz wegen der durch Austausch oder Abspaltung verursachten Streuaktivitäten unerwünscht war. Auch hatten frühere Versuche in unserem Laboratorium nach dieser Methode zu einer wenig aktiven Mevalonsäure und viel Abbauprodukt geführt. Um Verluste und Streuung von Radioaktivität zu vermeiden, durfte das Isotop nicht in eine Position des Kohlenstoffgerüsts eingebaut werden, die im Verlaufe der biochemischen Umsetzungen abgespalten oder als "labiler" Wasserstoff ausgetauscht werden konnte. Aus Versuchen von Tavormina [56b] mit C<sup>14</sup>-markierter Mevalonsäure war bekannt, dass diese unter Decarboxylierung in die - damals noch hypothetische - Isopreneinheit übergeht, andererseits aber

die C-2 Position unangetastet bleibt. Diesen letzteren Befund bestätigten Rilling, Bloch et al. [58] und berichteten die für die vorliegende Untersuchung wesentliche Tatsache, dass in C-5 der Mevalonsäure eingeführtes Tritium ohne Verlust auf dem Wege zu Squalen und Cholesterin eingebaut wird. Damit waren die Positionen 2-6 des Kohlenstoffgerüsts gesichert, ein Austausch von  $H^3$ -Aktivität mit der Umgebung musste aber immer noch erwogen werden. Das galt vor allem für Position 2, da die Wasserabspaltung und Decarboxylierung nicht ohne Einfluss auf die dort gebundenen Wasserstoffatome sein konnten. Gesichert schienen somit nur die Positionen 4, 5 und 6. Die Entdeckung der Isopentenyl-Pyrophosphat-Isomerase durch Agranoff, Lynen et al. [59] zeigte später jedoch, dass auch in Position 4 mit einem Verlust dort gebundener Tritiumatome gerechnet werden musste. Aus diesen Erwägungen folgte, dass vor allem Position 5 und 6 des Kohlenstoffgerüsts der Mevalonsäure für die Einführung von Tritium geeignet waren.

Seit der Entdeckung der Mevalonsäure durch Wolf, Folkers et al. [57] sind von verschiedenen Arbeitsgruppen Synthesen publiziert worden: Folkers [57], Cornforth [58], Rilling, Bloch et al. [58], Lynen [57] u.a. Diese waren auf ihre Eignung für unsere Zwecke zu prüfen. Die relativ einfache Methode von Bloch, der  $H^3$  in die Position 5 durch Reduktion des 3-Acetoxy-3-methyl-glutarsäuremonomethylesters mittels Lithiumaluminiumtritid oder Lithiumtritid eingeführt hatte, schied aus, da die Reagenzien nicht zur Verfügung standen.

Für unsere Zwecke am geeignetsten schien uns eine Anpassung der von Eggerer und Lynen [57] publizierten Mevalonsäuresynthese an die Verwendung von Tritium zur katalytischen Reduktion. Ausgehend vom Acetessigaldehydimethylacetal I (s. 22) wurde durch Reformatzky-Synthese mit Bromessigester und Zink der Aethylester der  $\delta, \delta$ -Dimethoxy- $\beta$ -methyl- $\beta$ -hydroxy-valeriansäure II synthetisiert. Durch alkalische Verseifung mit Baryt bildete sich das Bariumsalz der Acetalsäure III, die ihrerseits durch saure Spaltung



der Acetalgruppierung in die Aldehydsäure V und deren Bariumsalz IV übergeführt wurde. Die katalytische Hydrierung des Aldehyds zur Mevalonsäure VI bzw. deren Lacton VII wurde in Acetatpuffer vorgenommen, da die Ueberführung des Bariumsalzes in die äusserst labile freie Aldehydsäure stets zu Verlusten führt. Das grösste Hindernis auf diesem Syntheseweg bildete die Instabilität der anfallenden Verbindungen. So wird das Acetal durch Spuren von Mineralsäure gespalten; die Aldehydsäure spaltet sehr leicht Wasser ab (Eggerer [57]), worauf in der Allyl-aldehydformation eine ideale Gruppierung für Kondensationen vorliegt. In saurem Milieu ist auch eine Decarboxylierung möglich (Tavormina, [56b]).

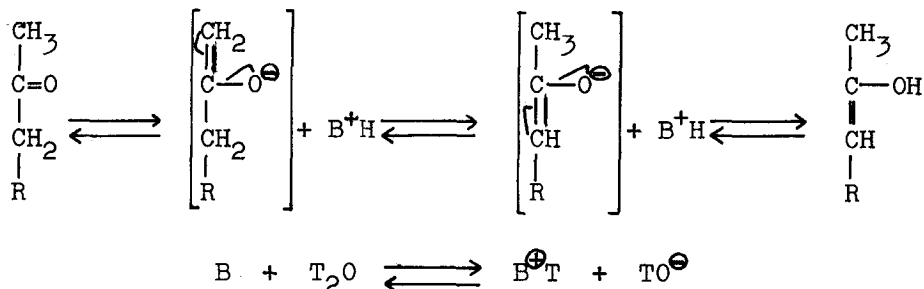


Die Mevalonsäure selber ist instabil in saurem Milieu, relativ stabil gegen Alkali. Ihre Acidität steht mit einem pK von 4,3 (Wolf, Folkers et al. [57]) zwischen der von einfachen Carbonsäuren und der von  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren. In saurem Milieu bildet sich spontan das  $\delta$ -Lacton aus. Das Arbeiten mit Mevalonsäure wird erschwert durch starke Hygroskopie, die das Lacton an der Luft sofort zerfliessen lässt. Demgemäss ist es in Wasser und Alkohol leicht löslich, in Chloroform, Aether und stärker lipophilen Lösungsmitteln nur schlecht.

In Vorversuchen mit inaktivem Material konnte durch Hydrierung des Aldehydsäurebariumsalses IV in Acetatpuffer Mevalolacton in guter Ausbeute dargestellt werden. Versuche, die gleiche Methode auf die Einführung von Tritium an Stelle von Wasserstoff zu übertragen, schlugen fehl. Es zeigte sich, dass das Tritiumgas in Gegenwart von Katalysatoren schneller mit der wässrigen Phase ausgetauscht als in die Mevalonsäure eingeführt wird. Das Resultat war ein schwach markiertes Produkt und hoch tritiiertes Wasser.

Der Versuch, die Aldehydsäure V in einem aprotischen Lösungsmittel zu tritieren, führte zu einem teilweisen Erfolg (s.21122a). Der Aldehyd nahm 79% des berechneten Volumen Tritium/Wasserstoffgemisch auf. Doch wurde weniger Tritium eingebaut, als dem Isotopenverhältnis im Gasgemisch entsprochen hätte. Das Mevalolacton-5- $H^3$  wies eine Aktivität von nur 5'180 I/m/ $\mu$ g auf. Den gleichen Syntheseweg zugrundelegend entschloss ich mich, durch Tritierung der Ausgangssubstanz mit Tritiumwasser eine 4,6- $H^3$ -Mevalonsäure darzustellen. Die Struktur des Acetessigaldehyddimethylacetal I liess eine Keto-Enol-Tautomerie erwarten und damit einen Protonenaustausch mit dem Milieu. Klar [34] untersuchte analoge Austauschreaktionen zwischen Deuteriumoxyd und Aceton, 2,4-Pentandienon und anderen Ketonen. Aus dieser Arbeit ging hervor, dass der Austausch von Protonen zwischen Keton und Wasser umso intensiver vor sich geht, je stärker das Erstere enolisiert ist. Die besten Ergebnisse erzielte Klar in basischem Milieu, wo

sich in wenigen Stunden ein Gleichgewicht einstellt.



Das Isotopenverhältnis  $D = \frac{D/H \text{ Produkt}}{D/H \text{ Austauschwasser}}$  war für Aceton 0,88.

So war auch für unser Produkt mit einem negativen Isotopeneffekt zu rechnen. In Vorversuchen mit niedrig markiertem Tritiumwasser (20 Teile) und Triäthylamin als Katalysator wurde dann festgestellt, dass Keton I (1 Teil) 2/3 der Aktivität des Ausgangswassers erreicht. Um eine Tritierung von  $1 \times 10^4$  I/m/ $\mu\text{g}$  zu erzielen, musste also bei einem Mischungsverhältnis von 1 Teil Tritiumwasser zu 5 Teilen Keton ein Ausgangswasser mit mindestens  $1 \times 10^5$  I/m/ $\mu\text{g}$  eingesetzt werden.

Die dreifache Tritierung von 5 g Acetessigaldehyddimethylacetal I mit je 1,0 ml Tritiumwasser der Aktivität 0,2C/g in homogener Phase, katalysiert durch Triäthylamin, führte dann auch zu einem Produkt mit 11'000 I/m/ $\mu\text{g}$  (s. 21122b). Unter der Voraussetzung, dass im Verlaufe der Synthese keine Aktivitätsverluste eintreten würden, genügte diese Markierung für eine Mevalonsäure von ebenfalls ca.  $10^4$  I/m/ $\mu\text{g}$ . Da die Keto-Enolstruktur des Ketons I immer zu Aktivitätsverlusten Anlass geben musste, konnte das

wasserlösliche Keton I nicht durch Ausschütteln aufgearbeitet werden. Man trennte deshalb das Tritiumwasser durch Aussalzen mit Natriumchlorid ab, trocknete die Lösung mit Molekularsieben \*) und führte sie direkt in die Reformatzky-Synthese ein. Nach der Umwandlung der Ketogruppe in einen tertiären Alkohol musste nicht mehr mit einem Austausch von Protonen gerechnet werden, da die  $\alpha$ -ständigen Wasserstoffatome nicht mehr aktiviert waren.

Die Vorschrift von Eggerer [57] für die Kondensation von Keton I mit Bromessigsäureäthylester wurde nach einer in unserem Laboratorium üblichen Methode dahingehend modifiziert, dass man an Stelle von Aether ein Essigester/Aethergemisch und statt Zinkstaub verkupferte Zinkspäne, die zudem mit wenig Quecksilbersalz im Ansatz amalgamiert wurden, verwendete. Die Bildung von Harzprodukten konnte so zurückgedrängt werden. Der Zinkkomplex musste mit Ammoniumchlorid zersetzt werden, da die Acetalgruppierung eine saure Aufarbeitung ausschloss. Die Aktivität des am Hochvakuum isolierten Acetalesters III entsprach mit 8'100 I/m/ $\mu$ g den Erwartungen.

Die Verseifung des Acetalesters III mit Bariumhydroxyd, die Acetalspaltung mit Salzsäure und die Reduktion der Aldehydsäure mit Natriumborhydrid in alkalischem Milieu bot keine Schwierigkeiten mehr und konnte mit hoher Ausbeute durchgeführt werden. Das resultierende Mevalolacton-4,6- $H^3$ , das in der Folge in die biochemischen Experimente eingesetzt wurde, wies eine Aktivität von 9'220 I/m/ $\mu$ g auf oder 3,6  $\mu$ C/ $\mu$ Mol.

Um eine Vereinfachung der Synthese durch Umgehung der Aldehydreduktion zu erreichen, wurde die Tritierung von  $\beta$ -Ketobutylacetat nach der gleichen Methode untersucht. Da sich in diesem Falle Keton und Tritiumwasser in Gegenwart von Triäthylamin nicht mischen, musste Dioxan als Lösungsvermittler zugegeben werden. Das in einem solchen verdünnten System markierte Produkt wies eine Aktivität von nur 4'000 I/m/ $\mu$ g auf. Da ausserdem die Ausbeute der Reformatzky-Stufe mit diesem Keton schlechter war, wurde diese Synthese nicht weitergeführt.

\*) Molecular Sieves, Typ 4A; Linde, Union Carbide Int., Genève.

## 2112 Arbeitsvorschriften

Sämtliche Stufen der Synthese wurden zuerst mit inaktiven Substanzen durchgeführt und die Produkte durch Analyse identifiziert.

## 21121 Charakterisierung der Mevalonsäure sowie ihrer Vorstufen

### a) Papierchromatographie

Zur Identifizierung der Mevalonsäure und ihrer Vorstufen erweist sich die Papierchromatographie auf Whatman 1-Papier als vorteilhaft. Entwickelt wird im System n-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (6:3:1). Die Säuren werden in Form ihres Natriumsalzes in Mengen von 30-60 µg aufgetragen. Das Chromatogramm wird während einer Stunde vorgesättigt. Man lässt die Lösungsmittelfront ca. 16 cm laufen. Die Flecken werden durch Besprühen des Chromatogramms mit einem Säure-Basen-Indikator sichtbar gemacht. Als besonders vorteilhaft erweist sich die Technik von Paskova [60] für Carbonsäuren: Eine Indikatorenlösung - 0,075% Bromkresolgrün und 0,025% Bromphenolblau in abs. Alkohol - und eine 0,5% Kaliumpermanganatlösung in Wasser unter Zusatz von 1% kristallisiertem Natriumborcarbonat werden unmittelbar vor dem Versprühen im Verhältnis 1:1 gemischt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Flecken nicht nur klar erscheinen, sondern auch - je nach Natur der Säure - Farbe und Zeitpunkt des Erscheinens verschieden sind. Für unsere Produkte ergab sich folgendes Bild:

Carbonsäure	Form	R <sub>f</sub> -Wert	Farbe	Zeitpunkt
Acetalsäure III	Na Salz	0,78	Rosa	nach 1-2 Min.
Aldehydsäure IV	Na Salz	0,52	Grasgrün	sofort
Mevalonsäure VI	Na Salz	0,67	Rot-beige	nach 1 Min.

Zur Identifizierung radioaktiver Produkte zerschneidet man die Chromatogramme nach Entwicklung und Sichtbarmachung der Flecken in Abschnitte von 0,5 oder 1,0 cm Länge. Die 2 cm breiten Schnitt-

zel gibt man zusammen mit Scintillatorlösung (s. 3142) in die Zählgläschen und schüttelt leicht während mehrerer Stunden. So werden die radioaktiven Substanzen eluiert und können im Scintillationszähler bestimmt werden. Bei sehr hohen Aktivitäten ist es jedoch einfacher, die Schnitzel in Aluminiumhülsen zu legen und direkt im Gasflusszähler (s. 3141) zu zählen.

b) p-Bromphenacylderivat

250 mg Mevalolacton werden in 5 ml Wasser gelöst und bei 40° mit 1-n. Natronlauge gegen Phenolphthalein neutralisiert. Dazu gibt man 700 mg p-Bromphenacylbromid (F = 110-112°, Fluka AG) in 5 ml Aethanol. Man lässt 2 Std. unter leichtem Rückfluss sieden. Beim Abkühlen fällt das Produkt aus und kann abgenutscht werden. Nach 4-maligem Umkristallisieren aus abs. Aethanol zeigt das Produkt einen konstanten Schmelzpunkt von 136-137°. Durch Mischschmelzpunkt des Derivates einer authentischen Mevalonsäure (Fluka AG) mit den Derivaten der Syntheseprodukte werden die letzteren charakterisiert. Ausserdem können die Derivate auf acetyliertem Papier (Schleicher & Schüll 2043 b) mit dem System Chloroform/Methanol/Wasser (5:6:2) chromatographiert werden. Im UV-Licht lassen sich die dem Derivat entsprechenden Flecken mit  $R_f$ -Wert von 0,67 beobachten.

c) Dibenzaethylendiammoniumsalz der Mevalonsäure

Das Mevalolacton wird bei 40° mit 0,1-n. Baryt gegen Phenolphthalein neutralisiert. Die dem Barytverbrauch äquivalente Menge N,N'-Dibenzaethylendiammoniumsulfat wird als wässrige Lösung zugesetzt. Mit Kohlensäure wird der Ueberschuss des Bariums ausgefällt, abgenutscht und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wird i.V. zur Trockene gebracht, das kristallisierte Salz mit einem Minimum an Methanol gelöst und durch Zusatz der 10-fachen Menge Aether ausgefällt. Nach mehrmaligem Umfällen zeigen die Derivate einen Smp. von 122-125°.

21122 Synthese der radioaktiven Mevalonsäuren

a) Mevalonsäure-5-H<sup>3</sup> durch Tritiumhydrierung der Aldehydsäure (V)

Die Tritiumhydrierung wurde in einer von M. Billeter und P. Rüst in unserem Laboratorium entworfenen Apparatur vorgenommen. Das geschlossene System erlaubte die Beimengung definierter Mengen Tritiumgas zu Wasserstoff. Das eigentliche Reaktionsgefäss bestand aus einem Rundkolben mit senkrecht abstehendem Seitenarm. Da der Kolben in einem Winkel von 45° an die Apparatur angeschlossen war, liess sich der Inhalt des Seitenarms durch einfache Drehung um die Kolbenachse ins Hauptgefäss einkippen.

Wegen der Instabilität der Aldehydsäure IV wurde der Katalysator vor dem Einbringen der Aldehydsäure vorhydriert. So liess man 50 mg Platinoxid nach Adams und 2 mg Ferrichlorid in Dioxan während 2 Std. Wasserstoff aufnehmen. Danach wurde das Hydriergefäss geöffnet und die unmittelbar vorher aus 260 mg Acetalsäurebariumsals (0,5 mMol) präparierte und in 10 ml Dioxan gelöste Aldehydsäure in den Hauptraum eingebracht. Während der ganzen Operation blies man Wasserstoff durch den Hydrierkolben, um das Eindringen von Sauerstoff zu verhindern. Katalysatorsuspension, Aldehydsäure und Dioxan wurden darauf bei -40° eingefroren und der wieder angeschlossene Kolben mit der Hochvakuumpumpe leergepumpt. Dann liess man den im Vorratsgefäss befindlichen Wasserstoff einströmen. Einstündiges Weiterhydrieren zeigte, dass die Sättigung des Katalysators tatsächlich erreicht worden war. Darauf gab man die abgemessene Menge Tritiumgas (100 mC) zu der berechneten Menge Wasserstoff im Vorratsgefäss und startete die Reaktion durch Einkippen der Katalysatorsuspension. Nach 4 Std. ging die Wasserstoffaufnahme nur noch langsam vor sich; nach weiteren 4 Std. brach man die Hydrierung ab. Total nahm die Substanz 21 ml Tritium-Wasserstoffgemisch auf (707 Torr, 25°). Auf

die 0,5 mMol Ausgangssubstanz III berechnet betrug die Wasserstoffaufnahme 79%. Der Katalysator wurde zusammen mit einer Spur Norit über Celit abgenutscht und mit abs. Aethanol nachgewaschen. Nach dem Eindampfen im Wasserstrahlvakuum dampfte man noch 6-mal mit 10 ml Methanol ab, um labil gebundene Tritiumatome zu entfernen. Nachdem dieselbe Operation noch 3-mal mit abs. Aethanol wiederholt worden war, trocknete man die Substanz im Hochvakuum. Man gewann so 126 mg (85% d.Th.) eines farblosen Oels.

Im Papierchromatogramm zeigte sich neben der Hauptmenge Mevalonsäure ein Rest Aldehydsäure, was die Differenz zwischen der auf den Wasserstoffverbrauch bezogenen Ausbeute und der Substanzausbeute erklärt. Die Mevalonsäure wurde darauf den im nächsten Abschnitt besprochenen Reinigungsschritten unterworfen. Es resultierte ein chromatographisch reines Mevalolacton-H<sup>3</sup>. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab mit unserem Scintillationszähler 5'180 I/m/μg. Dies entspricht 1,9 μC/μMol (Zählausbeute 16%). Die erzielte Aktivität lag wesentlich unter der angestrebten von mindestens 20'000 I/m/μg.

b) Tritierung von Acetessigaldehyd-Dimethylacetal (I)  
durch Austausch mit Tritiumwasser

Ein Pyrexreagenzglas mit Schliff von ca. 30 ml Inhalt wurde in eine Spitze ausgezogen. In diesem Gefäß mischte man 5 ml frisch destilliertes Keton I mit 1,0 ml Tritiumwasser (0,2 C) und 0,1 ml Triäthylamin. Die homogene Mischung wurde darauf auf 50° erwärmt. Durch einen aufgesetzten Rückflusskühler, der über ein mit Molekularsieben gefülltes Rohr mit dem Abzug verbunden war, verhinderte man das Entweichen von aktivem Wasserdampf. Nach 2 Std. kühlte man die Reaktionsmischung im Reagenzglas mit Kohlensäure auf -60°, verschloss den oberen Ausgang des Rückflusskühlers und liess warmes Wasser durch die Kühlwindung fließen, um etwa hinaufkondensierte Substanz zurückzuführen. Dann nahm man den Kühler ab, verschloss das Reagenzglas mit einem Schliffstopfen und liess die Mischung weitere 12 Std. stehen.

Um Wasser und Keton zu trennen, gab man zu der homogenen Flüssigkeit 0,2 g reines Natriumchlorid, das am Hochvakuum bei 300° getrocknet worden war. Tritiumwasser und Keton schieden sich, worauf das erstere mittels einer feinen Kapillare aus der Spitze des Reagenzglases abgesogen werden konnte. Die ganze Tritierung wurde mit frischem Tritiumwasser und Triäthylamin noch 2-mal wiederholt. Das Keton nahm im Verlaufe der Operation eine gelbbraune Färbung an. Um das Triäthylamin zu entfernen, schloss man das Produkt während einiger Zeit über 3 Kühlfallen ans Wasserstrahlvakuum an. Das abgesaugte Tritiumwasser wurde vorsichtig neutralisiert, um die darin befindliche Hauptmenge an Triäthylamin ins Salz zu überführen. Darauf schüttelte man 3-mal mit 10 ml Essigester aus, um den Rest des Ketons zu extrahieren. Die Auszüge wurden mit Molekularsieben getrocknet, mit der Hauptmenge Keton vereinigt und mit etwas Aktivkohle versetzt. Zur völligen Trocknung liess man die Ketonlösung über eine Kolonne (100 x 5 mm) frisch aktivierte Molekularsiebe laufen. Die Kolonne wurde mit mehreren Portionen abs. Aether nachgespült. Die Ketonlösung wurde bei -20° aufbewahrt. Um Substanz zu sparen und zu schonen, wurde das Keton weder isoliert noch weiter raffiniert, sondern als leicht gelbliche Lösung in die nächste Stufe der Synthese gegeben. Die Aktivität betrug ungefähr 10'000 I/m/μg.

c) δ,δ-Dimethoxy-β-(methyl-H<sup>3</sup>)-β-hydroxy-valeriansäure-4-H<sup>3</sup>-äthylester

Die 40 ml Ketonlösung in Essigester/Aether wurden mit weiteren 20 ml Aether gemischt. Dazu gab man 5 g frisch destillierten Bromessigsäureäthylester und 5 g frisch verkupferte Zinkspäne. Die Mischung wurde auf 60° erwärmt. Dann gab man 0,3 g Quecksilber-II-Chlorid zu, worauf die Reaktion sofort anlief, um das Lösungsmittelgemisch während 10 Min. am Sieden zu erhalten. Zusätzlich wurde noch während 2 Std. schwach am Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen goss man das Reaktionsgemisch in die



auf  $-10^{\circ}$  gekühlte Mischung von 40 ml gesättigter Ammoniumchlorid-lösung und 4 ml konz. Ammoniak. Mit weiterem Ammoniak wurde ein pH von 7 - 8 eingestellt. Die wässrige Phase wurde nun 4-mal mit ca. 100 ml Aether ausgezogen, die Auszüge mit 0,01-n. Schwefelsäure, 10% Kaliumbicarbonatlösung und Wasser neutral gewaschen, um dann über Molekularsieben getrocknet zu werden. Nach der Entfernung des Lösungsmittels und der Trocknung am Vakuum blieben 3,8 g Rohprodukt. 2,8 g davon wurden einer Hochvakuumdestillation unterworfen. Dabei isolierte man eine Fraktion (1,06 g) vom Siedepunkt  $83-87^{\circ}$  (0,05 Torr). Spezifische Radioaktivität:  $8 \cdot 10^3$  I/m/ $\mu$ g.

d) Bariumsalz der  $\delta, \delta$ -Dimethoxy- $\beta$ -methyl- $H^3$ - $\beta$ -hydroxy-valeriansäure-4- $H^3$  (III)

Eine Lösung von 0,95 g krist. Bariumhydroxyd wurde in 10 ml Wasser mit Stickstoff gesättigt. Dann gab man 1,0 g (4,55 mMol) Acetalester- $H^3$  II dazu und rührte während 2 Std. bei  $40^{\circ}$ . Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurde mit Aktivkohle entfärbt und das überschüssige Barium mit Kohlensäuregas gefällt. Nach dem Abnutschen wurde das Filtrat im Vakuum unter Vorschaltung von 3 Kühlfallen zur Trockene gebracht. Es blieben 1,15 g leicht gelbliches Produkt (95% d.Th.), die in 20 ml abs. Aethanol gelöst und umkristallisiert wurden. Gewonnen wurden 0,98 g eines weissen Produktes, das papierchromatographisch als reine Acetalsäure III identifiziert wurde.

e) Mevalolacton-4,6- $H^3$  durch Spaltung und Reduktion der Acetalsäure- $H^3$  (III) mit Natriumborhydrid

0,98 g Bariumsalz der Acetalsäure- $H^3$  III wurden in 5 ml Wasser gelöst und mit 8 ml 2-n. Salzsäure angesäuert. Nach 5 Min. Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf  $0^{\circ}$  abgekühlt und unter stetem Kühlen mit 9,8 ml 2-n. Natronlauge gegen Bromthymolblau neutralisiert. Die gekühlte Lösung des Spaltungsproduktes liess man darauf im Verlaufe von 45 Min. zu der ebenfalls auf  $0^{\circ}$

gekühlten Lösung von 90 g Natriumborhydrid in 3 ml Wasser zutropfen. Danach wurde noch 1 3/4 Std. bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach erneuter Abkühlung wurde mit 5-n. Salzsäure pH 3 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde nun in einen Perforator überführt, mit Natriumchlorid gesättigt und mit stündlich erneuertem, peroxydfreiem Aether extrahiert. Nach 6 Std. nahm man die Aetherauszüge zusammen und trocknete sie, während die Extraktion noch 3 Tage weiterlief. Die Hauptfraktion ergab nach der Trocknung im Hochvakuum über Molekularsieben 430 mg gelbliches Oel, die Restextraktion weitere 58 mg (488 mg Rohausbeute, 95% d.Th.). Die Produkte wurden papierchromatographisch geprüft. Dabei zeigte sich für die Hauptfraktion ein einheitlicher, Mevalonsäure entsprechender Fleck. Die Auswertung des Chromatogramms im Flow-Counter zeigte jedoch ausser dem Maximum an Radioaktivität für den Mevalonsäurefleck noch weitere Aktivität an der Front. Daraus musste auf das Vorhandensein labil gebundener Tritiumatome geschlossen werden. Das Produkt der Restextraktion zeigte ausserdem noch eine kleine Menge einer kürzer laufenden Substanz, die ebenfalls markiert war und ca. 10% der der Mevalonsäure zuzuschreibenden Aktivität enthielt.

Die Hauptfraktion wurde nun am Kühlfinger sublimiert. An Sublimat ergab sich eine fast farblose, teils kristalline Masse, die jedoch bei Normaltemperatur sofort zerfloss. Sie wurde 6-mal mit Methanol abgedampft, um die labil gebundenen Tritiumatome zu entfernen, mit wenig Aktivkohle versetzt, abgenutscht, eingedampft und am Hochvakuum getrocknet. Es blieben 370 mg klares, farbloses Oel, das sich radiometrisch im Papierchromatogramm als einheitliche Mevalonsäure erwies. Während der Sublimation war jedoch eine beträchtliche Zersetzung (Braunfärbung) der Mevalonsäure zu beobachten, die auch chromatographisch nachgewiesen werden konnte. Sublimationsrückstand und Produkte der Restextraktion wurden daher vereinigt, in Wasser gelöst und auf eine Säule (800 x 150 mm) frisch regenerierten und gewaschenen Dowex 1 (200/400 mesh) aufgezogen. Die Radioaktivität der Eluate wurde durch Auszählen eines

Tropfens in Dioxan/PPO Lösung im Scintillationszähler (s. 3142) bestimmt. Die so ermittelten Werte hatten natürlich nur relative Bedeutung. Die Kolonne wurde zuerst mit Wasser, dann mit Methanol und wieder mit Wasser gewaschen, danach mit 0,05-n. Ameisensäure eluiert. Es ergab sich folgendes Bild:

Produkt	Fraktionen	Lösungsmittel	ml	Aktivität
a	1 - 2	Wasser	30	12,3 Mill I/m
b	3 - 8	Methanol	120	16,7 "
c	9	Wasser	20	0,2 "
d	10 - 18	0,05-n.Ameisensäure	180	1,9 "
e	19 - 24	do.	120	205,6 "
f	25 - 27	do.	80	10,0 "

Die Aktivität in den ersten Fraktionen war wahrscheinlich auf labil gebundenes Tritium zurückzuführen. Produkt e) wurde eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Es blieben 86 mg klar farbloses Öl. Die totale Ausbeute ergab somit 456 mg Mevalolacton. Auf die 1,93 mMol eingesetzter Bariumacetalsäure III bezogen, sind dies 91% d.Th. Das Produkt wurde papierchromatographisch im üblichen System geprüft (s. 21121a). Die Auswertung der Radioaktivitätsverteilung ergab das Bild von Abb. 2.1.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität im Scintillationszähler ergab 9'220 I/m/μg. Das sind 3,6 μC/μMol.

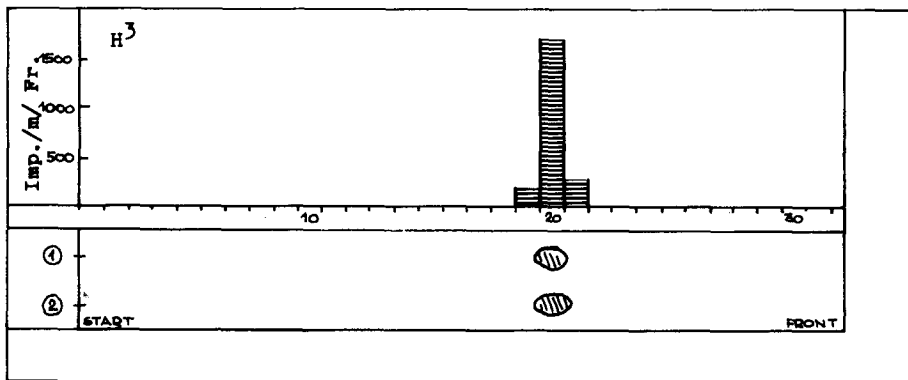


Abb. 2.1 Papierchromatogramm und radiometrische Auswertung, Whatman 1, System n-Propanol/k.Ammoniak/Wasser (6:3:1)  
 Substanz 1: synthetisches Mevalolacton-4,6- $H^3$  (je 30  $\mu g$  des  
 Substanz 2: authentisches Mevalolacton(Fluka) (Natriumsalzes  
 radiometrisch ausgewertet im Flow-Counter (s.3141)

## 212 RADIOAKTIVES 2-METHYL-1,4-NAPHTHOCHINON

2-(Methyl- $C^{14}$ )-1,4-naphthochinon (Menadion- $C^{14}$ ) wurde bezogen von The Radiochemical Centre, Amersham, England. Die spezifische Aktivität betrug 1,63 mC/mMol. In unserem Scintillationszähler konnte das Produkt mit 11'608 I/m/ $\mu g$  erfasst werden.

2-(Methyl- $H^3$ )-1,4-naphthochinon (Menadion- $H^3$ ) wurde in unserem Laboratorium hergestellt von M. Billeter durch Bromierung von Menadiondiäacetat in der Seitenkette mit N-Bromsuccinimid und katalytische Hydrierung mit einem Gemisch von Tritium und Wasserstoff. Im Scintillationszähler zeigte das Produkt eine Aktivität von 96'000 I/m/ $\mu g$  entsprechend 46,5 mC/mMol.

Diäacetat des 2-(Methyl- $H^3$ )-1,4-Naphthohydrochinon wurde nach der üblichen Vorschrift (s. 3512) dargestellt durch reduzierende Acetylierung mit Acetanhydrid und Zink in Gegenwart von Pyridin. Charakterisiert und auf radiometrische Reinheit geprüft wurde das Produkt im Dünnschichtchromatogramm (s. 312).

## 22 Inaktive Substanzen

Die zur Identifizierung der in vivo und in vitro synthetisierten K-Vitamine notwendigen authentischen Substanzen verdanken wir dem Entgegenkommen der Firma HOFFMANN-LA ROCHE AG. in Basel.

Das zum Vergleich mit den synthetisierten Produkten notwendige D,L-Mevalolacton (Fp. 26-28°) war ein kristallisiertes Produkt der Fluka A.G. in Buchs.

Acetessigsäuredimethylacetal erhielten wir von den Chemischen Werken Hüls AG., Marl.

Weiter benötigte Substanzen waren Produkte des Handels.

## 23 Versuchstiere

Ratten: Normal ernährte, männliche Sprague Dawley Ratten (ca. 250 g).

Hühner: Weisse Leghornküken wurden ab dritter Woche mit einer Vitamin K-freien Diät ernährt. Diese entsprach in ihrer Zusammensetzung im wesentlichen den Angaben von Dam [51]. Im allgemeinen verwendete man die Tiere bei Eintritt schwerer Haemorrhagien. Die Blutgerinnungszeit nach Fiechter [40] betrug immer über 10 Min. In einigen Fällen kamen ältere Tiere, die einmal durch Gaben von 30 - 50µg Menadion vor dem Verbluten gerettet worden waren, zur Verwendung. Auch bei dauernder Fütterung mit Vitamin K-freier Diät erreichten solche Tiere keine hochgradige K-Freiheit mehr. Ihre Prothrombinzeit betrug im besten Falle 5 Min.

## 3 M E T H O D I K

### 31 Allgemeine Methoden

#### 311 Multiplikative Verteilung nach Craig

Zur Charakterisierung und Trennung der in vivo und in vitro gebildeten radioaktiven Substanzen wurde hauptsächlich die Gegenstromverteilung nach Craig angewendet. Wichtig war, dass sich damit noch geringste Radioaktivitätsmengen mit ausreichender Sicherheit identifizieren liessen, ohne dass die in Organextrakten immer vorhandenen Begleitsubstanzen störten. So erübrigte sich eine Gewichtsverminderung der Extrakte durch alkalische Verseifung der

Fette, eine Operation die zur Zerstörung der K-Vitamine führt. Zudem konnte man relativ grosse Mengen authentischer Substanzen mitverteilen, sie wieder isolieren und mit ihnen chemische Umsetzungen durchführen ohne Reduzierung des radioaktiven Anteils.

Zur Verfügung standen zwei Apparaturen, die im Prinzip nach den Vorschlägen von Hecker [54] gebaut waren. Die 79-stufige, automatische Apparatur war als geschlossenes System konstruiert, so dass unter Stickstoff verteilt werden konnte. Oberphase und Unterphase enthielten je 2,5 ml. Dieses Instrument eignete sich vor allem für die erste Auftrennung der Extrakte, während für die Charakterisierung der einzelnen Komponenten hauptsächlich die offene, 36-stufige Handapparatur mit je 3 ml Ober- und Unterphase verwendet wurde. Ober- und Unterphase der Lösungsmittelsysteme wurden vor der Verteilung gegeneinander gesättigt. Um eine optimale Sättigung auch während der Verteilung aufrecht zu erhalten, liess man der Substanz in je zwei Röhrchen Ober- und Unterphase vorauslaufen. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils direkt in die Zählgläschen für den Scintillationszähler abgefüllt und in einem Eindampfgerät (Fa. E. Bühler, Tübingen) bei 15 Torr im Verlaufe von 4-6 Stunden zur Trockene gebracht (Temperaturen 40-60°C).

T a b e l l e 3.1

Maxima diverser Substanzen in der multiplikativen Verteilung

Verbindung	Lösungsm System :	I		II	III	IV
	Stufen :	79	35	35	35	35
2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon			0			0
Menadion Umwandlungsprodukt		4	0-1			0
Phthiocol			2			
Menadion			6			31
Menadion Diacetat						33
Vitamin K <sub>2</sub> (5)			11			
K <sub>2</sub> (10)			15			
K <sub>2</sub> (10) Diacetat		46-48	5-6			
K <sub>2</sub> (15)			17-18			
K <sub>2</sub> (15) Diacetat			8-10			
K <sub>2</sub> (15) p-Brombenzoyl-				23-24		
K <sub>2</sub> (20)		52-54	20-21			
K <sub>2</sub> (20) Diacetat			11-12		21	
K <sub>2</sub> (30)			25			
Vitamin K <sub>1</sub>		61	26			
K <sub>1</sub> Diacetat			14			
K <sub>1</sub> p-Brombenzoat				29		
Dihydro-Vitamin K <sub>1</sub>			28-29			
Vitamin K <sub>2</sub> (45)			29			
K <sub>2</sub> (45) Diacetat			21-22			
Ubichinon(15)			13-14			
(20)			16-17			
(20) Diacetat			13-14			
(Phytyl)			21-22			
(45)			26			
(45) Diacetat			22-23			
(50)			29			
(50) Diacetat			24			
Mevalolacton		2	0			
Farnesol		27				
Cholesterin		46	16			
Cholesterinacetat			25-26			
Squalen		73	31			
2,5-Diphenyloxazol (PPO)			9-10	9	9	

Die K-Werte der 79- und der 35-stufigen Verteilung lassen sich wegen apparativer Unterschiede nicht vergleichen.

Zur Verteilung dienten folgende Lösungsmittelsysteme:

- System I : Heptan/Methylglykol (1:1)
- System II : Heptan/Methanol/Acetonitril (2:1:1)
- System III : Hexan/Methylglykol/Wasser (10:9:1)
- System IV : Hexan/Benzol/Acetonitril/Wasser (1:2:2:2)

Als Standardsystem diene das erste, da es bei optimaler Trennung die bearbeiteten Vitamine in den mittleren Bereich der Verteilung bringt ( $K = 1$ ), sich sehr gut in die beiden Phasen trennt und relativ schnell abzudampfen ist.

System II diene für die Verteilung der p-Brombenzoylderivate, während System III die Vitamin K-Diacetate in den mittleren Bereich brachte. Für hydrophile Substanzen, wie das Umwandlungsprodukt des Menadions, kam System IV zur Anwendung.

In Tabelle 3.1 findet sich eine Zusammenstellung der wichtigsten verteilten Substanzen mit der Nummer der Spitzenfraktionen. Diese wurden durch Wägen, mit dem Spektralphotometer oder durch Zählung der Aktivität ermittelt. Die Schwankungen der Maxima in der kleinen Apparatur betragen eine bis maximal 2 Fraktionen.

### 312 DUENNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Chromatographie nach Stahl [59] an auf Glasplatten gestrichenen dünnen Schichten von Kieselgel oder Aluminiumoxyd bewährte sich gut zur weiteren Auftrennung der einzelnen Aktivitätsmaxima aus der Gegenstromverteilung. Da im Chromatogramm Polarität und räumliche Struktur eine ungleich grössere Rolle spielen als in der Verteilung, lassen sich Substanzen mit gleichem Verteilungsmaximum chromatographisch leicht auftrennen (z.B. Squalen und Ubichinon). Da sich die Schicht quantitativ von der Glasplatte abkratzen und eluieren lässt - für die Aktivitätsbestimmung direkt im Zählglas - eignet sich die Methode nicht nur zur analytischen Identifizierung, sondern auch zur präparativen Trennung kleiner Substanzmengen. Die Laufzeit von 30 - 60 Min. ermöglicht es, chemische oder biochemische Umsetzungen fortlaufend zu überwachen. Die  $R_f$ -Werte sind nicht so konstant wie in der Papierchromatographie, daher muss man in der Regel authentische Substanzen mitlaufen lassen. Entwickelt wurde im allgemeinen mit reinen Lösungsmitteln (Benzol, Chloroform, Methylchlorid Essigester oder Methanol), auf Kieselgel und Aloxschichten, mit und ohne Beimengung von Fluoreszein.



Da die K-Vitamine und andere untersuchte Stoffe UV-Licht absorbieren, waren sie gut zu lokalisieren, vor allem auf der Fluoreszenzplatte. Ungesättigte Substanzen addieren Brom. So konnten die Isoprenoide, nach Behandlung der Platten mit Bromdämpfen, als gelbe Flecken auf dem roten Grund des bromierten Fluoresceins beobachtet werden. Carbonsäuren wurden mit dem Kaliumpermanganat/Indikatoren-gemisch nach Paskova [60] sichtbar gemacht. Durch Besprühen der Platten mit konz. Schwefelsäure konnten sonst inerte Kohlenwasserstoffe als braun-schwarze Flecken lokalisiert werden. Die betreffenden Substanzen wurden so zerstört, waren aber trotzdem noch radiometrisch erfassbar. Die radiometrische Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte durch Abkratzen von Abschnitten bestimmter Grösse und Elution der markierten Substanzen aus dem Gel mit Scintillatorlösung direkt im Zählglas.

### 313 PAPIERCHROMATOGRAPHIE

Für die Papierchromatographie der K-Vitamine wurden zuerst die von Green und Dam [54] vorgeschlagenen Lösungsmittelsysteme zur Entwicklung auf siliconisiertem Papier verwendet. Das zur Verfügung stehende Papier (Schleicher & Schüll SS 2043 b hy) zeigte jedoch andere  $R_f$ -Werte als die von Dam angegebenen. Einzig das System Aethanol/Eisessig/Wasser (600:25:225) wurde angewendet. Die beste Auftrennung der K-Vitamine erzielte man durch Verwendung von acetyliertem Papier (SS 2043 b acet.) und dem Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser (5:6:2). Dieses System kam auch für die p-Bromphenacylderivate der Mevalonsäure und verwandter Carbonsäuren zur Anwendung. Es wurde auf und absteigend chromatographiert. Für den speziellen Fall der Auftrennung von Vitamin  $K_2$ (20) Isomeren liess man das Lösungsmittelgemisch von einem absteigenden Chromatogramm so lange abtropfen, bis die im UV-Licht verfolgbaren Flecken den Papierrand beinahe erreichten. Die Durchlaufzeit konnte so auf über 50 Std. gesteigert und damit die geringen Laufunterschiede verstärkt werden. Sowohl die K-Vitamine als auch die

p-Bromphenacylderivate der Carbonsäuren waren im UV-Licht sichtbar.

Die Papierchromatographie der Mevalonsäure und verwandter Verbindungen ist schon unter Abschnitt 21121 besprochen worden

### 314 RADIOAKTIVITÄTSMESSUNG

#### 3141 Gasdurchflusszähler (Flow Counter)

Wir verwendeten ein Gerät der Firma Tracerlab (Typ SC-16), das mit einer Mischung von Helium, Isobutan und Butadien als Zählgas arbeitet (Typ G-1). Als Anzeigegerät diente ein 1000-Scaler derselben Firma. Die radioaktiven Proben wurden in Zählchalen aus Aluminium eingebracht. Gemessen wurde bei unendlicher Schichtdicke ( $C^{14}$ : 20 mg Substanz/cm<sup>2</sup>, bei  $H^3$ : 1 mg/cm<sup>2</sup>). Zählausbeute:  $C^{14}$ : 10%,  $H^3$ : 1%.

#### 3142 Scintillationszähler

Der überwiegende Teil der Radioaktivitätsbestimmung wurde mit einem Packard Liquid Scintillation Spectrometer \*) durchgeführt. Dieser Apparat erlaubte die simultane Messung von  $C^{14}$ - (Zählausbeute 42%) und  $H^3$ -Aktivitäten (Zählausbeute 16%) in derselben Probe. Für technische und methodische Details wird auf C.G.Bell [58] verwiesen.

Als Scintillator kam eine Lösung von 0,3% 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in Toluol zur Anwendung. Die Zählausbeute für  $H^3$  liess sich durch Zusatz von 0,01% 1,4-Bis-(2-(5-phenyl)-oxazolyl)-benzol (POPOP) wesentlich verbessern. Da sich diese Substanz aber nur sehr schlecht wieder abtrennen liess, verzichteten wir im allgemeinen auf ihre Anwendung.

---

\*) Packard Inc., La Grange, Illinois, USA.

Die Lösungen der zu bestimmenden Substanzen wurden jeweils direkt im Zählglas eingedampft und dann - wo immer möglich - in 5 ml Toluol-Scintillatorlösung wieder gelöst. Nicht zu lösende Substanzen versetzte man mit 1 ml Dioxan - PPO, bevor mit Toluol-PPO aufgefüllt wurde. Extrem hydrophile Verbindungen und wässrige Lösungen konnten nach der Methode von Gordon und Wolfe [60] gezählt werden. Durch Zusatz von 4% Cab-O-Sil \*) erzeugte man aus der Toluol-PPO-Lösung ein stabiles Gel, in dem sich eine wässrige Lösung suspendieren liess. Die Mischung war opak, liess aber trotzdem eine Zählhausbeute von bis 8% für H<sup>3</sup> und bis 40% für C<sup>14</sup> zu.

Gefärbte Lösungen verursachten eine Verminderung der Zählhausbeute durch Selbstabsorption (quenching), die zu berücksichtigen war.

### 315 OPTISCHE BESTIMMUNGEN

Für optische Bestimmungen verwendete man ein Zeiss-Spektralphotometer oder ein Photometer Eppendorf mit Filtern. Die Proben wurden in Isooctan oder optischem Alkohol gelöst. Tabelle 3.3 enthält die Wellenlängen, die für die Bestimmung der wichtigsten Verbindungen Anwendung fanden.

T a b e l l e 3.3

<u>Verbindung</u>	<u>Wellenlängen in mμ</u>
2-Methylnaphthohydrochinon-1,4	243
Menadion	248 und 270
Menadion Diacetat	283
Vitamin K	248 und 270
Vitamin K Diacetate	263
Ubichinon-Reihe	270
Ubichinon Diacetate	265
Phthiocol	250 und 275
2,5-Diphenyloxazol (PPO)	305

\*) Cab-O-Sil, Godfrey L. Cabot Inc., 127, High Street  
Boston 10, Mass./USA

## 32 I n v i v o V e r s u c h e

### 321 APPLIKATION DER RADIOAKTIVEN SUBSTANZEN

Die isotop markierten Verbindungen wurden entweder per os gegeben oder intraperitoneal gespritzt.

Per os: Menadion -  $C^{14}$  und Mevalolacton- $H^3$  wurden in 20% Feinsprit gelöst und dem Küken mit einer Pipette in den Schlund getropft.

Intraperitoneal: Die markierte Mevalonsäure wurde mit 1-N Natronlauge neutralisiert und dann mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, dass pro Einzeldosis 1,0 ml Lösung zur Verfügung standen. Menadion- $C^{14}$  löste man pro Dosis in 0,1 ml Methylglykol. Vor jeder Injektion wurden 0,1 ml Menadion und 1,0 ml Mevalolactonlösung gemischt und dem Küken direkt unterhalb des Brustbeins ins Peritoneum gespritzt. Mit weiteren 1,0 ml physiologischer Kochsalzlösung spülte man die Spritze und injizierte auch diesen Rest.

### 322 AUFARBEITUNG DER ORGANE

Sämtliche Operationen wurden im Kühlraum zwischen 1-4° vorgenommen. Am Vortag der Schlachtung liess man die Tiere ohne Nahrung. Durch Schlag auf den Kopf wurden sie betäubt und darauf decapitiert. Aufgearbeitet wurden jeweils Leber und Milz, Herz, Nieren, Hirn, Blut, weisse und rote Muskulatur. Die Organe wurden möglichst von Fett und Bindegewebe befreit und darauf gewogen. Nach einer älteren Methode zerschnitt man sie in Stücke und homogenisierte mit einem Turrax Homogenisator im 4-fachen Volumen destillierten Wassers, fror ein und lyophilisierte das Wasser weg. Später wurden die ganzen Organe in flüssigem Stickstoff (99,6%) eingefroren, mit fester Kohlensäure im Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen und danach 24 Std. lyophilisiert. Durch eine zusätzliche Trocknung während 12 Std. über Phosphorpentoxyd konnte der im Verlaufe der Extraktion miteluierte Anteil an hydrophilen Ballaststoffen wesentlich vermindert werden. Die Lyophilisate wurden in Soxhlet-Apparaten unter Stickstoff während 50 Std. extrahiert. Durch Restextraktion während weiteren 72 Std. prüfte man in einigen Testfällen die quantitative Erfassung des lipophilen, radioaktiv

markierten Materials. Als Trägersubstanz gab man zur Extraktion je 10 mg Vitamin K<sub>1</sub> oder 2 mg Vitamin K<sub>2</sub>(20). Die Extrakte wurden unter Stickstoff bei -20° aufbewahrt.

### 323 VERTEILUNG

Zur Gewichtsverminderung fällte man in den Leberextrakten und in bestimmten Fällen auch in andern Organextrakten die Phosphatide durch Zugabe von 6 Teilen Aceton zu einem Teil Aetherlösung. Die ausgefällten Produkte prüfte man auf ihren Radioaktivitätsgehalt. Den eingedampften Ueberstand verteilte man darauf unter Stickstoff in der 74-stufigen Craig-Apparatur. Die einzelnen Fraktionen wurden dann zur Lokalisierung des zugesetzten Vitamin K optisch bei 248 m $\mu$  gemessen. Darauf folgte die Bestimmung der Radioaktivität im Scintillationszähler. Die hydrophilen Fraktionen von 0-30 löste man zuerst in 1 ml Dioxan/PPO bevor man, wie in den Fraktionen 31 - 79, 5 ml Toluol/PPO zusetzte. Nach der Ermittlung der einzelnen Maxima wurden die betreffenden Fraktionen zusammengenommen, eingedampft und unter Stickstoff bei -20° aufbewahrt.

## 33 I n v i t r o V e r s u c h e

### 331 HERSTELLUNG DER HOMOGENATE

Sämtliche Operationen zwischen Schlachtung der Tiere und Versuchsbeginn wurden bei einer Temperatur zwischen 1° - 4° ausgeführt. Ratten tötete man durch Zertrümmern des Schädels und Ausbluten. Hühner wurden durch einen Schlag auf den Kopf betäubt und dann decapitiert. Dem ausströmenden Blut wurden Proben zur Bestimmung der Prothrombinzeit entnommen. Nach der sofortigen Präparation der Leber kühlte man diese 10 Min. auf Eis. Darauf wurde sie zur Zerkleinerung und zur Abtrennung von Bindegewebe mit einem Pistill durch ein engmaschiges Drahtnetz in das 3-4-fache Volumen Suspensionsmedium gedrückt.

Folgende Suspensionsmedien wurden verwendet:

Suspensionsmedium I	: Primäres Kaliumphosphat	0,056 m
	Sekundäres Natriumphosphat	0,035 m
	Krist. Magnesiumchlorid	0,005 m
	Natriumacetat	0,016 m
	Nicotinsäureamid	0,003 m

Suspensionsmedium II : Gleiche Konzentrationen,  
aber ohne Acetat

Der Leberbrei wurde unter Kühlung im Potter Homogenisator (Zylinder aus Plexiglas, Kolben aus Teflon) homogenisiert.

### 332 FRAKTIONIERUNG DER ZELLBESTANDTEILE

Aus den Organhomogenaten schleuderte man die Zelltrümmer und Kerne bei 600 x g während 15 Min. ab. Die Mitochondrien wurden bei 11'000 x g 15 Min. in einer Servall Zentrifuge (Typ SS-1) abzentrifugiert. In einigen Versuchen inkubierte man den Ueberstand eines Homogenates, nachdem in der präparativen Spinco Ultrazentrifuge bei 30'000 x g (15 Min.) die Partikel entfernt worden waren.

### 333 INKUBATIONSANSÄTZE

Nach der Fraktionierung füllte man die Homogenate mit Suspensionsmedium auf das gewünschte Volumen auf. Die Inkubationsansätze hatten ein Endvolumen zwischen 20 und 40 ml, die Konzentration an Frischgewebe variierte zwischen 0,25 - 0,50 g/ml Inkubationslösung.

#### 3331 Cofaktoren

Die Cofaktoren wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn im Suspensionsmedium gelöst und auf die Ansätze verteilt. Ihre Zusammensetzung basierte auf Vorschriften von Amdur, Bloch et al. [57], sowie Martius und Esser [58]. Sie wurde aber im Verlauf der Untersuchung immer wieder verändert.

Im Standardansatz verwendete man folgende Konzentrationen:

ATP	1,0	$\cdot 10^{-3}M$
AMP	0,9	$\cdot 10^{-3}M$
DPN	1,7	$\cdot 10^{-3}M$
TPN	0,2	$\cdot 10^{-3}M$
Biotin	0,1	$\cdot 10^{-3}M$
Mevalolacton	15,0	$\cdot 10^{-3}M$
Ascorbinsäure	30,0	$\cdot 10^{-3}M$
Glutathion	30,0	$\cdot 10^{-3}M$

TPN und Glutathion wurden nur gelegentlich verwendet.

### 3332 Zugabe der aktiven Substanzen

Die Konzentration der isotop markierten Substanzen war Gegenstand der Untersuchung und wurde von Versuch zu Versuch variiert.

Menadion C<sup>14</sup>: Die angewendeten Konzentrationen variierten zwischen 0,1 - 0,7  $\cdot 10^{-4}M$ . Man löste die Substanz jeweils in 0,1 ml Methylglykol. Unmittelbar vor der Zugabe verdünnte man diese Lösung mit 3 ml Suspensionsmedium, kippte zum Ansatz und spülte mit weiteren 2 ml nach. (Das Chinon soll nicht vor Versuchsbeginn zum Homogenat gegeben werden, da es sofort ans Protein gebunden wird).

Mevalolacton-4,6-H<sup>3</sup>: Die Konzentrationen variierten zwischen 2,1 - 8,5  $\cdot 10^{-4}M$ . Man gab jeweils eine wässrige Lösung des mit Natronlauge neutralisierten Lactons zum Inkubationsansatz.

### 3333 Inkubation

Die Homogenate wurden noch bei 0° auf den gewählten pH-Wert (7,1-7,4) eingestellt. Die den Ansatz enthaltenden Erlenmeyerkolben von 300 ml Inhalt wurden im Thermostaten auf 37° gebracht. Zur Zeit 0 kippte man die Aktivität zu und startete den Schüttelmechanismus. Die Homogenate wurden in der Regel aerob inkubiert. Jede halbe Stunde kontrollierte man den pH-Wert und stellte den Ausgangswert wieder ein. Im Standardversuch inkubierte man während 2 Std. und stoppte darauf den Versuch durch Eingliessen der Homogenate in auf -40° gekühlte Kristallisierschalen.

### 334 TROCKNUNG UND EXTRAKTION

Die eingefrorenen Homogenate wurden bei 0-5° über Nacht lyophilisiert. Das trockene Pulver überführte man darauf in Extraktionshülsen, die für 6-12 Std. im Vakuum über Phosphorpentoxyd einer Nachtrocknung unterzogen wurden. Diese Operation war notwendig, um

die Menge mitteluiertes, hydrophiler Ballaststoffe zu reduzieren. Da die Lyophilisate nach der Trocknung äusserst hygroskopisch waren, wurden sie schnell gewogen und sofort unter Aether gesetzt. Die Extraktion erfolgte analog der in den in vivo Versuchen (s.323).

### 335 VERTEILUNG

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurden die Rohextrakte zwischen Heptan und 95% Methanol vorverteilt. Damit konnten die hydrophilen Umwandlungsprodukte des Menadions und die Mevalonsäure entfernt werden. Da mit dieser Operation immer auch ein Verlust an lipophiler Aktivität einherging, setzte man in späteren Experimenten die Rohextrakte direkt für die 79-stufige Verteilung mit dem Lösungsmittelsystem I ein. Bei 79 Stufen wurden die dem Vitamin K zuzuschreibenden Maxima nicht mehr durch die hydrophilen, in den Anfangsfractionen laufenden, enormen Aktivitäten gestört. Die Technik war dieselbe wie in den in vivo Versuchen (s.323).

### 35 I d e n t i f i z i e r u n g d e r m a r k i e r t e n V e r b i n d u n g e n

#### 351 VITAMINE K<sub>2</sub>

##### 3511 Vergleich mit authentischen Vitaminen

Die in vivo und in vitro gebildeten Vitamine K wurden zuerst identifiziert durch Vergleich der Verteilungskurven von authentischen Vitaminen mit denjenigen der biosynthetisch gebildeten radioaktiven Substanzen. Die Zugabe von 2-4 mg authentischen Vitamins zur Verteilung eines Extraktes über 35 Stufen, erlaubte die Bestimmung der betreffenden Maxima durch optische Messung bei 248 m $\mu$ . Fiel dann das im Scintillationszähler ermittelte Maximum der C<sup>14</sup>-Aktivität - des Menadionkerns also - mit dem optisch bestimmten zusammen, so konnte dies als erster Hinweis für die Identität von zugesetzter und synthetisierter Substanz gewertet werden.



### 3512 Derivate

Zur Abtrennung der Scintillatorsubstanz wurden die dem Vitamin K zugeschriebenen Maxima vereinigt, eingedampft und erneut im Lösungsmittelsystem I verteilt. Da sich die Maxima von Diphenyloxazol (PPO) und dem Vitamin um 10 Fraktionen in der 35-stufigen Verteilung unterscheiden, konnten sie voneinander getrennt werden. Nach einer andern Methode konnte man das Vitamin mit einem Gemisch von 4 Teilen tiefsiedendem Petrolaether und 1 Teil Benzol von einer Silicagelsäule eluieren und so vom stärker adsorbierten PPO abtrennen.

Wurde in den Versuchen Mevalonsäure-H<sup>3</sup> zugesetzt, so musste das ebenfalls entstehende, radioaktiv markierte Cholesterin vor der Darstellung des Derivats mit Digitonin gefällt werden (s. 353).

p-Brombenzoyl-Derivate: Zur aktiven Substanz gab man 2-5 mg authentisches Vitamin K, 100 mg p-Brombenzoylchlorid und löste in 6 ml Aether. Dazu gab man 300 mg Dithionit in 6 ml 2N Natronlauge und 2 ml Dioxan. Das Gemisch wurde im Dunkeln unter wiederholter Prüfung des pH geschüttelt. 2-3mal schüttete man 150 mg Dithionit und 50 mg Säurechlorid nach. Nach Beendigung der Reaktion, die durch vollständige Entfärbung der Aetherphase gekennzeichnet war, wurde die letztere abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die p-Brombenzoyl-Derivate konnten aus einem Gemisch von Benzol und Aethanol umkristallisiert werden. Die Derivate wurden durch Verteilung im Lösungsmittelsystem II charakterisiert (s. 311 und Tab. 3.1).

Diacetylderivate: Die aktiven Substanzen wurden zusammen mit 2-5 mg authentischem Vitamin K in 2 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze Zinkstaub und eines Tropfens Pyridin füllte man das Reaktionsgefäß mit Stickstoff und erhitzte unter intensivem Rühren während 20 - 40 Min. auf 90°. Nach dem Abkühlen zersetzte man das Anhydrid mit 10 ml 1N Salzsäure und extrahierte die wässrige Phase mit Cyclohexan. Darauf wusch man mit 10 ml 1N Salzsäure, 10 ml 0,1N Salzsäure und mit Wasser. Mit etwas Natriumsulfat trocknete man das Cyclohexan und dampfte ab.

Die Diacetylderivate wurden im System I über 35 Stufen verteilt. Die Ermittlung der Maxima - optisch und im Scintillationszähler - zeigte diese in Fraktion 10. Da dieser Bereich der Verteilung keine optimale Trennung versprach, vereinigte man die betreffenden Spitzenfraktionen und verteilte sie zur weiteren Charakterisierung noch im Lösungsmittelsystem III (s. 311 und Tab. 3.1).

### 352 UBICHINON UND SQUALEN

Der Nachweis von Ubichinon und Squalen bereitete zuerst Schwierigkeiten, da sich die beiden Substanzen in der Verteilung genau gleich verhielten. Im Verteilungssystem I (35 Stufen) fand sich Ubichinon(45) in Fraktion 26, Ubichinon(50) in 29, während Squalen nach 31 lief. Die beiden Substanzen konnten jedoch im Dünnschichtchromatogramm auf einfache Art aufgetrennt werden. Auf mit Fluoreszein gefärbten Silicagelschichten (mit Benzol entwickelt), zeigte Ubichinon(50) einen  $R_f$ -Wert von 0,18; Squalen einen solchen von 0,79. (Diese  $R_f$ -Werte waren nicht so konstant wie auf Papier, man liess daher immer authentische Substanzen parallel laufen). Ubichinon war im UV-Licht als dunkel absorbierender Fleck leicht zu erkennen. Nach der Behandlung der Platte mit Bromdämpfen wurden Ubichinon und Squalen als gelbe Flecken im roten Grund sichtbar. Zusätzlich fand sich bei der Auftrennung von Fraktionen aus der Verteilung von Organextrakten immer - unmittelbar vor Ubichinon laufend - eine stark ungesättigte Substanz unbekannter Natur.

Die radiometrische Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte durch Einteilung der entwickelten Bahnen in Felder bestimmter Grösse, die einzeln von der Platte gekratzt und im Zählgläschen eluiert und ausgezählt wurden. Lagen Fleck und Aktivitätsmaximum im selben Feld, so konnte auf Identität von markierter und authentischer Substanz geschlossen werden. Zur Sicherung des Resultates verwendete man jeweils noch andere Lösungsmittel bei der Entwicklung, die andere  $R_f$ -Werte ergaben. Auch Aloxschichten wurden verwendet.

Durch Auftrennen im Dünnschichtchromatogramm von aliquoten Teilen sämtlicher Aktivität enthaltenden Fraktionen einer Verteilung und durch separate Elution und Zählung der Ubichinon und Squalen zugehörigen Flecken, wurden die Spitzenfraktionen beider Substanzen bestimmt.

### 353 CHOLESTERIN

Cholesterin konnte in erster Linie an seinem Verteilungsverhalten erkannt werden. Im Lösungsmittelsystem I über 79 Stufen verteilt, fand es sich in Fraktion 46, bei 35 Stufen in Fraktion 16. War radioaktives Cholesterin nachzuweisen, so führte man in den betreffenden Fraktionen eine Digitoninfällung durch. Die aktive Substanz wurde zusammen mit 10 mg Cholesterin in 1 ml Feinsprit gelöst. Mit 8 ml 1% Digitoninlösung in Aethanol fällte man bei einer Temperatur von 80° das Cholesterin aus. In der Regel wurde diese Operation mehrmals wiederholt. Cholesterin konnte auch acetyliert werden. Das Verteilungsmaximum von Cholesterinacetat fand sich in Fraktion 26 (System I, 35 Stufen). Als dritte Nachweismöglichkeit wurde auch hier die Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln angewendet.

### 354 FARNESOL

Farnesol konnte dank seinem, durch keine andere markierte Substanz gestörten Verteilungsverhalten erkannt werden (s. Tab. 3.1). Auch für diese Substanz wurde die Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Lösungsmitteln und Schichten benutzt. Dank seiner stark ungesättigten Natur waren seine Flecken auf der Fluoreszenzplatte nach Behandlung mit Brom sehr schön sichtbar.

4 R E S U L T A T E

41 I n v i v o V e r s u c h e

411 SYNTHESE VON VITAMIN K<sub>2</sub>

Normalen und Vitamin K-freien Hühnern wurde mehrere Tage lang Mevalolacton-4,6-H<sup>3</sup> und 2-Methyl-C<sup>14</sup>-1,4-naphthochinon (Menadion-C<sup>14</sup>) verfüttert in der Absicht, aus den Organlipoiden ein doppelt markiertes Vitamin K zu isolieren.

Da beide zur Verfügung stehenden, markierten Substanzen ungefähr dieselbe spezifische Radioaktivität aufwiesen, musste bei der geringen zu erwartenden Vitamin K-Synthese befürchtet werden, dass die Tritiumaktivität neben C<sup>14</sup> nicht mehr nachgewiesen werden könne, besonders da neben dem Einbau der zugeführten radioaktiven Mevalonsäure immer mit einer starken Beteiligung körpereigener Substanz zu rechnen war. Um im synthetisierten Vitamin das Verhältnis von C<sup>14</sup> zu H<sup>3</sup> zugunsten des letzteren zu verschieben, beschloss man, einem Küken vorerst einige Tage lang Mevalolacton-H<sup>3</sup> zusammen mit wenig inaktivem Menadion zu geben, um dann mit relativ hohen Dosen von Menadion-C<sup>14</sup> auch noch eine Kernmarkierung zu erzielen.

Einem 7-wöchigen Hahn, der 23 Tage lang Vitamin K-frei ernährt worden war und stark blutete, gab man in 4 Portionen 16 mg (55 Mill. I/m) Mevalolacton-H<sup>3</sup> und 70 µg inaktives Menadion per os. Am 5. und 6. Tag erhielt das Tier ausserdem noch 1,0 mg Mevalolacton-H<sup>3</sup> und 400 µg Menadion-C<sup>14</sup>. 15 Stunden nach der letzten Dosis wurde das Tier getötet (Technik s. 32).

Nach der Aufarbeitung der Organe und der Verteilung der Extrakte über 79 Stufen mit System I, zeigten sich wohl tritiummarkierte Verbindungen, aber so wenig C<sup>14</sup>-Aktivität, dass kein eindeutiges Maximum lokalisiert werden konnte. Gleichwohl wurden die Fraktionen, in denen das Vitamin vermutet werden konnte, vereinigt

und mit authentischem Vitamin  $K_2(20)$  versetzt. Da in den gleichen Fraktionen hohe, dem Cholesterin zuzuschreibende Tritiumaktivitäten vorhanden waren, führte man eine Digitoninfällung durch (s. 353) und verteilte erneut über 35 Stufen im System I. Die radiometrische Auswertung zeigte ein  $H^3$ -Maximum von 100 I/m, das der optisch ermittelten Kurve von Vitamin  $K_2(20)$  parallel verlief. Da aber kein Menadion  $C^{14}$  eingebaut worden war, konnte dieser Befund nur als Indiz für die Anwesenheit eines seitenkettenmarkierten Vitamin  $K_2$  gewertet werden. Aus diesem Experiment musste geschlossen werden, dass der Umsatz an Vitamin K so klein ist, dass bei Absättigung des Körpers (Tagesbedarf 4  $\mu$ g) kein weiteres Vitamin mehr gebildet wird. Menadion wird weder als solches gespeichert, noch auf Vorrat umgewandelt. Auf weitere Gesichtspunkte soll im Verlauf der Diskussion eingegangen werden (s. 51).

Ein weiteres Experiment wurde mit einem 3 Monate alten Hahn, der mit 7 Wochen K-frei gewesen war, dann aber normal gefüttert wurde, durchgeführt. Die Blutgerinnungszeit war normal. In 4 Tagesdosen spritzte man ihm intraperitoneal 16 mg (141 Mill. I/m) tritiierte Mevalonsäure und 920  $\mu$ g (9,9 Mill. I/m) Menadion- $C^{14}$ . 15 Stunden nach der letzten Dosis tötete man das Tier und arbeitete alle Organe auf (s. 32). In der Verteilung (System I, 79 Stufen) zeigten sich in sämtlichen Organextrakten  $C^{14}$ -Maxima in den Fraktionen 53-54. In allen Fällen lagen die optisch ermittelten Verteilungskurven des zugesetzten Vitamin  $K_2(20)$  parallel dazu (Abb. 41.1). Andere  $C^{14}$ -Aktivitäten konnten in keinem der Organe festgestellt werden, hingegen waren verschiedene Tritiumpeaks zu sehen, so in Fraktion 45, 74 und gelegentlich auch in Fraktion 19. Ein direkter Rückschluss auf den Einbau von Tritium in Vitamin K konnte aus dieser ersten Verteilung nur im Falle der Muskelextrakte gezogen werden. In allen andern Fällen überdeckten auf Cholesterin zurückzuführende, hohe Aktivitäten ein mögliches Tritium-Vitamin  $K_2$ -Maximum. Die Verteilung der Tritiumaktivitäten von Muskelextrakten zeigte jedoch deutlich eine Schulter im Cholesterinpeak, die Vitamin  $K_2$  zuzuschreiben war (Abb. 41.2).

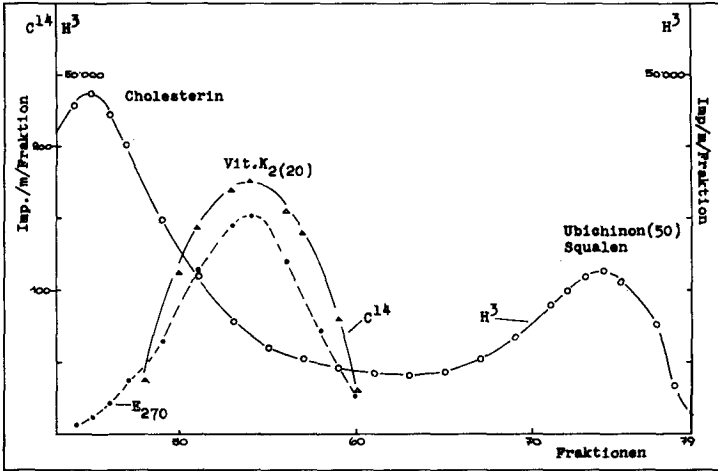


Abb. 41.1 Verteilungsdiagramm eines Leberextraktes und von Vitamin K<sub>2</sub>(20) (System I, 79 Stufen). Hahn, 12 Wochen, normal ernährt; in 4 Tagen 9,9 Mill. I/m Menadion-C<sup>14</sup> und 141 Mill. I/m Mevalolacton-H<sup>3</sup> intraperitoneal; Aetherextrakt des Lyophilisates.

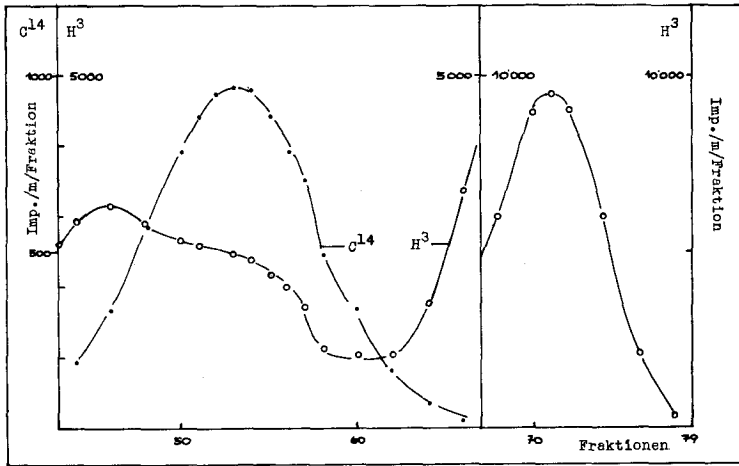


Abb. 41.2 Verteilungsdiagramm eines Muskelextraktes (System I, 79 Stufen), gleiches Tier wie 41.1.

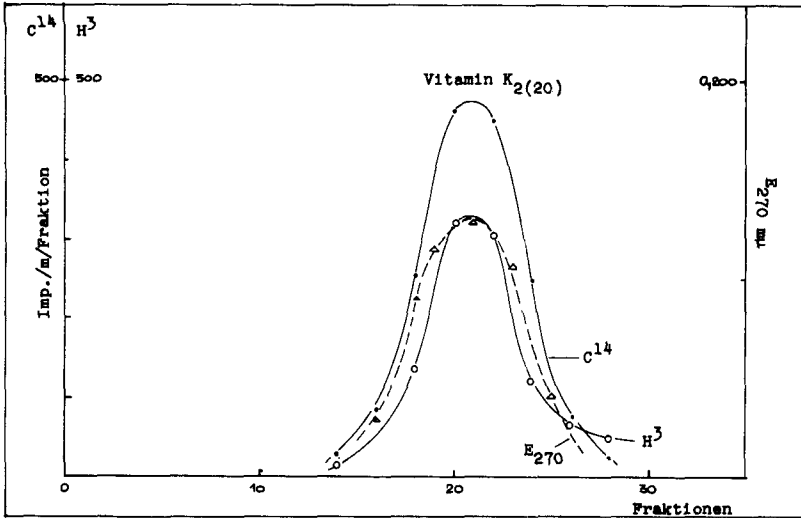


Abb. 41.3 Verteilung der Vitamin K-haltigen Fraktionen nach Digitoninfällung (System I, 35 Stufen), Fraktionen 48-60 aus Abb. 41.1.

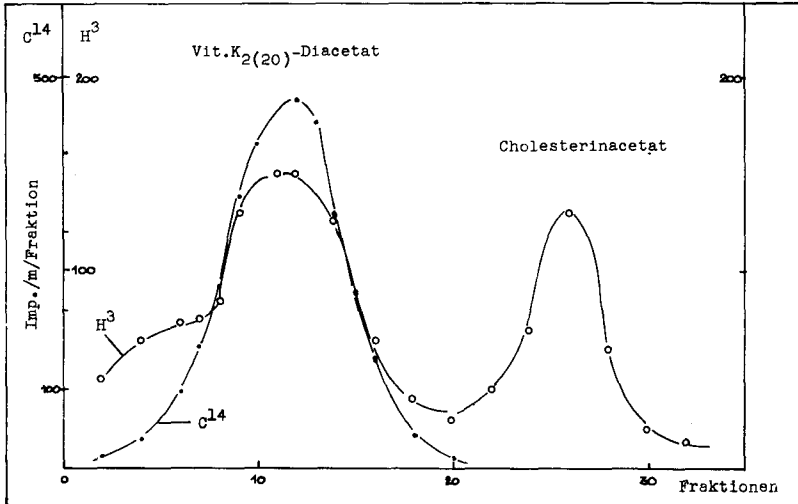


Abb. 41.4 Verteilung des markierten Diacetyl-Vitamin  $K_2(20)$  (System I, 35 Stufen), Fraktionen 16-26 aus Abb. 41.3, reaktiv acetyliert.

Zur Abtrennung des Cholesterins fällte man mehrmals mit Digitonin. In der darauf folgenden Verteilung (System I, 35 Stufen) zeigte sich dann auch ein der optischen und  $C^{14}$ -aktiven Kurve parallel verlaufender Tritiumpeak (Abb. 41.3). Die hohe Aktivität und Ungenauigkeiten der Kurve liessen jedoch noch tritiummarkierte Verunreinigungen vermuten. Zur Charakterisierung der entstandenen Substanz und zur Isolierung der Tritiumaktivität überführte man die Fraktionen mit  $C^{14}$ -Aktivität zusammen mit dem zugesetzten Vitamin  $K_2(20)$  in die Diacetylderivate (s. 3512) und verteilte erneut im selben System. Nach optischer und radiometrischer Auswertung fielen alle Maxima auf Fraktion 10-12 (Abb. 41.4). Da die Tritiumkurven oft noch Ungenauigkeiten aufwiesen, verteilte man die Aktivität enthaltenden Fraktionen zur erneuten Charakterisierung im neuen System III, das die Diacetate nach Fraktion 21 in den Bereich der optimalen Trennung bringen musste (s. 311). In dieser Fraktion fand man denn auch in guter Uebereinstimmung die Maxima der  $C^{14}$  und  $H^3$ -Aktivität, sowie die optisch ermittelte Kurve von Vitamin  $K_2(20)$  Diacetat (Abb. 41.5). Mit diesem und analog verlaufenen Experimenten mit allen Organen des Huhns war der Nachweis für die Bildung eines Vitamin  $K_2(20)$  aus Menadion und Mevalolacton im Tierkörper erbracht. Durch Vergleich des Verteilungsverhaltens von Vitamin  $K_2(15)$  und  $K_2(25)$  sowie ihrer Derivate mit dem der aktiven Substanz, konnte mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass Homologe mit 3 oder 5 Isopreneinheiten gebildet worden waren. Wie aus Tab. 3.1 ersichtlich, differieren diese Homologe in der 79-stufigen Verteilung um ca. 6 Fraktionen. Die exakte Uebereinstimmung der Radioaktivitätskurve mit der optischen von Vitamin  $K_2(20)$  (Abb. 41.1) schliesst jedes andere Homologe aus.

Die Menge an synthetisiertem Vitamin variierte von Organ zu Organ. Zum Vergleich bezog man die gebildeten Aktivitäten auf das Trockengewicht (Lyophilisate) der Organe. Erstaunlicherweise enthielt die Leber weitaus am wenigsten Vitamin K. Ihr folgten mit steigenden Konzentrationen Nieren, weisse Muskulatur, Herz und



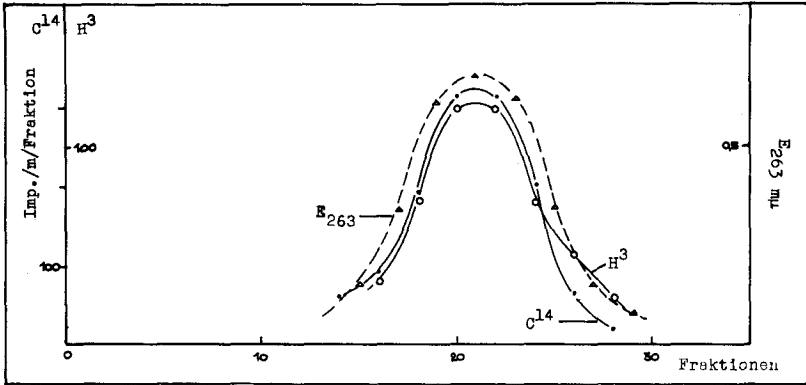


Abb. 41.5 Verteilung des markierten Diacetyl-Vitamin  $K_2(20)$  System III, 35 Stufen.

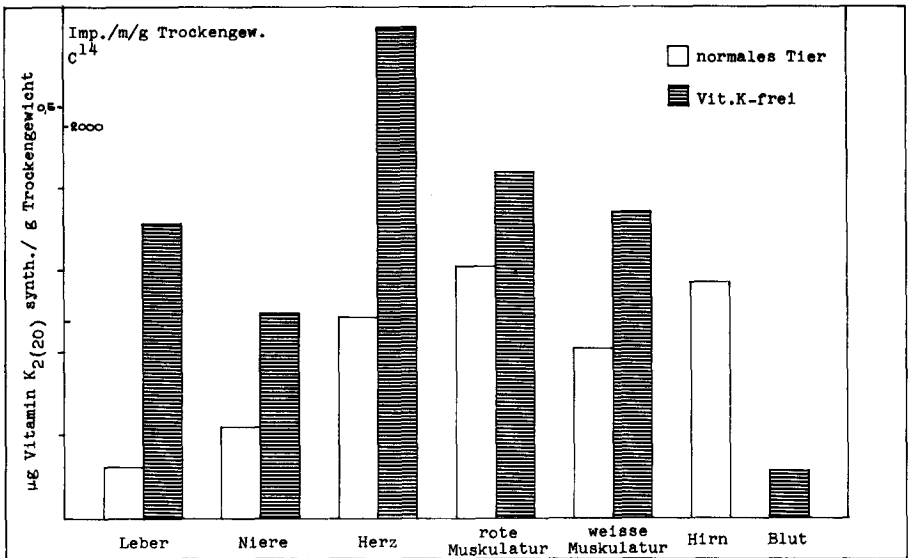


Abb. 41.6 Umwandlung von Menadion- $C^{14}$  in Vitamin  $K_2(20)$  in den Organen.

Tier 1: normal ernährt, 12 Wochen, 9,9 Mill. I/m.

Tier 2: Vitamin K-frei (30 Min.Prothr.Zeit), 8 Wochen, 10,9 Mill. I/m.

beide : Aktivität in 4 Tagen i.p.gespritzt, 15 Std.nach letzter Dosis getötet; Aetherextrakt der Organlyophilisate.

rote Muskulatur. Die Syntheseleistungen der einzelnen Organe sind in Tabelle 41.1 zusammengefasst und in Abb. 41.6 veranschaulicht. Im Falle der Muskelextrakte betrug das Verhältnis von  $C^{14}$ - zu Tritiumaktivität im mehrfach verteilten Diacetylderivat von Vitamin  $K_{2(20)}$  2,6. Mit Hilfe der spezifischen Aktivitäten beider Komponenten liess sich eine Einbaurrate von 0,55 Isopreneinheiten pro Menadionkern errechnen. Trotz der hohen verabreichten Mevalonsäureaktivität beteiligten sich also die körpereigenen Stoffe zu 86% an der Synthese.

In der Folge wiederholte man den beschriebenen Versuch mit Vitamin K-freien Tieren. Einem 7 Wochen alten Küken, seit 23 Tagen auf Vitamin K-freier Diät, das unmittelbar vor dem Verbluten stand, (Prothrombinzeit erfahrungsgemäss über 30 Minuten), spritzte man intraperitoneal in 4 Tagesdosen 993  $\mu$ g Menadion- $C^{14}$  und 16 mg Mevalolacton- $H^3$ . Die Organe wurden aufgearbeitet und die Extrakte in der Verteilung analysiert. Auch in diesem Experiment konnte die Bildung von Vitamin  $K_{2(20)}$  nachgewiesen werden, ebenso der Einbau von Mevalonsäure. Die Aktivitäten lagen aber allgemein höher als beim normalen Tier. So steigerte sich der Gehalt der Leber auf das Sechsfache, der Niere und des Herzens auf das 2,5-fache. Die genauen Werte sind wiederum in Tabelle 41.1 und Abbildung 41.6 ersichtlich.



#### 412 SYNTHESE VON UBICHINON(50)

Die Tatsache, dass radioaktive Mevalonsäure in die Seitenkette von Vitamin K<sub>2</sub>(20) eingebaut worden war, liess die Frage auftauchen, ob auch Ubichinon nach dem gleichen Schema aufgebaut werde. Da in dieser Untersuchung in erster Linie die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub> interessierte, spritzte man den Versuchstieren nur markiertes Methyl-naphthochinon, nicht aber den Ubichinonkern (2,3-Dimethoxy-5-methyl-benzochinon). Da die Bildungsrate von Ubichinon wesentlich höher ist als die von Vitamin K<sub>2</sub>, war es trotzdem möglich, Ubichinon nachzuweisen. Die für die Identifizierung der K-Vitamine hauptsächlich verwendete Technik der multiplikativen Verteilung versagte an dieser Stelle, da die zu erwartenden, langkettigen Ubichinone das gleiche Verteilungsverhalten zeigten, wie das ebenfalls markierte Squalen. Durch Anwendung der Dünnschichtchromatographie konnte diese Schwierigkeit jedoch überwunden werden (s. 312 und 352).

In der 79-stufigen Verteilung von Rohextrakten der in Abschnitt 411 beschriebenen in vivo-Versuche mit markierter Mevalonsäure und Methyl-naphthochinon, fanden sich neben der dem Vitamin K<sub>2</sub>(20) zuzuschreibenden Kohlenstoff- und Tritiumaktivität immer noch Tritiummaxima in Fraktion 44-46 und 71-72 (Abb. 41.9). Das erste war auf Cholesterin zurückzuführen (s. 413), das zweite entsprach in seinem Verteilungsverhalten Squalen, konnte aber auch Ubichinon (45) oder (50) enthalten. Die Aktivität in diesen lipophilen Fraktionen schwankte von Organ zu Organ. Die stärkste Markierung war in der Niere zu finden und ich versuchte daher im Nierenextrakt eines Vitamin K-freien Kükens, dem Mevalonsäure-H<sup>3</sup> und Menadion-C<sup>14</sup> gespritzt worden war (s. 411), Ubichinon nachzuweisen.

Die Fraktionen 62-79 der Verteilung des Rohextraktes wurden vereinigt und zusammen mit authentischem Ubichinon (50) über 35 Stufen im System I verteilt. In der Auswertung zeigte sich das photometrisch bestimmte Maximum von zugesetztem Ubichinon in Fraktion 29, die radiometrische Spitzenfraktion in 30-31 und das höchste

Gewicht in Fraktion 31-32. Ein Aliquot von 100  $\mu\text{g}$  aus Fraktion 29 wurde auf einer Silicagelschicht mit Benzol aufgetrennt. Parallel dazu liess man Ubichinon (50) und Squalen laufen. Nach Sichtbarmachung der Flecken und radiometrischer Auswertung ergab sich das aus Abb. 41.7 ersichtliche Resultat: Mit einem  $R_f$ -Wert von 0,18 zeigte sich Ubichinon (50) parallel mit einer Tritiumaktivität von 43 I/m, bei  $R_f$  0,79 Squalen mit 80 I/m. Zur Kontrolle wiederholte man dieses Experiment mit anderen Lösungsmitteln und auch auf Aloxschichten. Immer zeigte sich Parallelität von Aktivität und zugesetzter Substanz. Auf Grund ihres Verhaltens in der multiplikativen Verteilung und der Dünnschichtchromatographie scheint mir die Identität der tritiummarkierten Substanz mit Ubichinon (50) erwiesen zu sein. Mit Hilfe der klaren Auftrennung von Squalen und Ubichinon in der Dünnschichtchromatographie suchte man die beiden Maxima, die unter einem einzigen in Fraktion 30-31 verschmolzen waren, aufzutrennen. So wurden Aliquote sämtlicher Fraktionen die Tritium enthielten, zusammen mit je 5  $\mu\text{g}$  Ubichinon (50) und Squalen auf einer Silicagelschicht mittels Benzol aufgetrennt. Nach Sichtbarmachung der Flecken kratzte man in der Bahn jeder Fraktion die Squalen und Ubichinon (50) entsprechenden Regionen von der Platte und wertete sie radiometrisch aus (s. 353). Abb. 41.8 zeigt das Resultat: Die höchste, Ubichinon (50) entsprechende Aktivität fand sich in Fraktion 29 und lag damit dem photometrisch ermittelten Maximum parallel. Für Squalen fand sich die Spitzenfraktion in 31 und entsprach damit seinem bekannten Verteilungsverhalten.

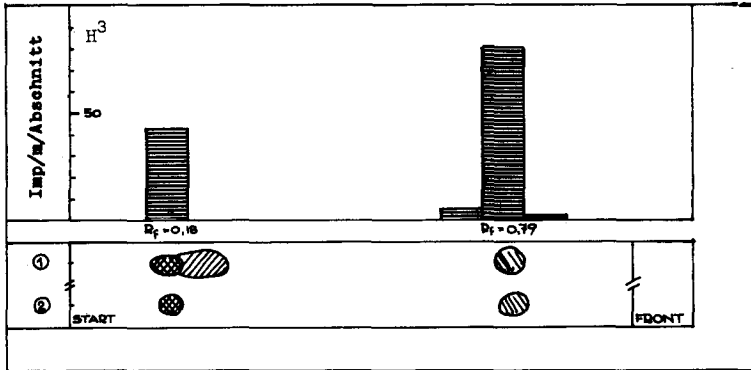


Abb. 41.7 Dünnschichtchromatogramm von Ubichinon (50) und Squalen (Silicagel Merck, Fluorescein, Benzol, 30 Min.)  
Bahn 1 : Tritiumaktive Ubichinon-Spitzenfraktion 29,  
je 5 µg Ubichinon und Squalen  
Bahn 2 : je 5 µg Ubichinon (50) und Squalen  
Abschnitte von 1 cm einzeln eluiert und radiometrisch bestimmt.

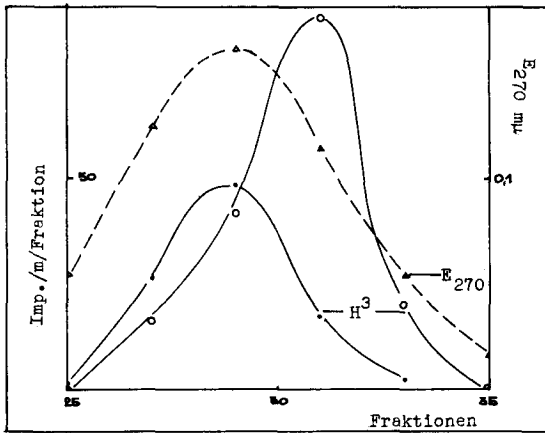


Abb. 41.8 Aktivitätsmaxima von Ubichinon (50) und Squalen nach Verteilung (System I, 35 Stufen), Photometrische Bestimmung von Ubichinon (50), Differenzierung von Squalen und Ubichinonaktivität jeder Fraktion im Dünnschichtchromatogramm.

#### 413 VERTEILUNG DER TRITIUMAKTIVITÄT AUF DIE MARKIERTEN SUBSTANZEN

Abb. 41.9 zeigt die Verteilung des Nierenextraktes aus dem unter Abschnitt 411 besprochenen in vivo-Versuch an einem Vitamin K-freien Küken. Das Maximum in Fraktion 44 entsprach Cholesterin (s. 353); die lipophilen Spitzenfraktionen bei 71-72 enthielten ein Gemisch von Ubichinon (50) und Squalen (s. 412). Der Einbau der markierten Mevalonsäure in diese Substanzen variierte von Organ zu Organ. Tabelle 41.2 gibt die in den einzelnen Organen und Verbindungen gefundenen Aktivitäten bei einem normal ernährten und einem Vitamin K-freien Tier. Erstaunlicherweise war beim Vitamin K-freien Tier nicht nur die Synthese an Vitamin  $K_2(20)$  verstärkt, sondern auch diejenige anderer Isoprenabkömmlinge. Der Effekt war hier sogar grösser. Der Nachholbedarf des Vitamin K-frei ernährten Tieres scheint sich nicht nur auf das Vitamin selber zu erstrecken, sondern auch auf Cholesterin, Squalen und eventuell Ubichinon. Dieser Befund wird noch diskutiert werden. Neben der allgemeinen Verstärkung des Einbaus von markierter Mevalonsäure in die Isoprenabkömmlinge, fanden sich auch Verschiebungen zwischen normalem und Vitamin K-freiem Tier in Bezug auf die Einbaurate in die einzelnen Organe und Verbindungen. Für eine sichere Interpretation dieses Befundes fehlen jedoch die statistischen Grundlagen, so dass diese Probleme einer separaten Arbeit vorbehalten werden müssen.

Da die Differenzierung von Ubichinon und Squalen erst in den letzten Versuchen gelang, sind in Tabelle 41.2 beide Substanzen zusammen erfasst. Tabelle 41.3 zeigt jedoch den Einbau der markierten Mevalonsäure in die verschiedenen Isoprenabkömmlinge in der Niere eines Vitamin K-freien Küken. In vergleichbarer Grössenordnung fand sich die Tritiumaktivität im Cholesterin (54,2%), im Squalen (28,7%) und im Ubichinon (17,0%). Vitamin  $K_2(20)$  enthielt nur 0,07% der im Organ eingebauten  $H^3$ -Aktivität.

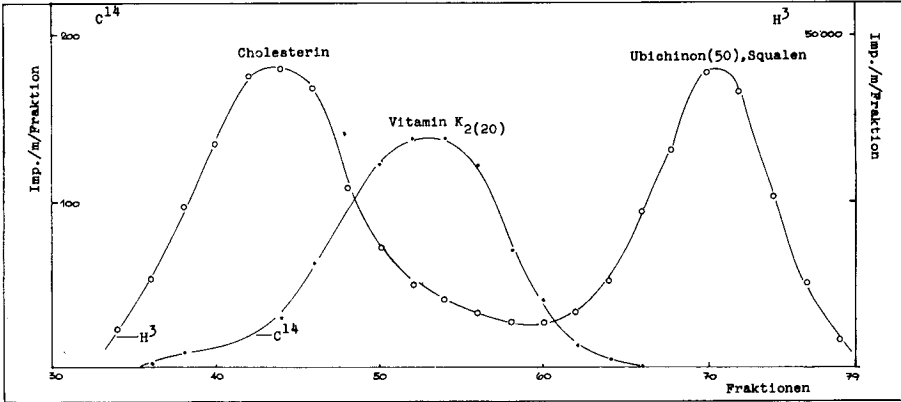


Abb. 41.9 Verteilung eines Nierenrohextraktes System I, 79 Stufen.

Tabelle 41.2

Tritiumeinbau in die aus "aktivem Isopren" aufgebauten Substanzen in den einzelnen Organen des Huhnes nach Zufuhr von Mevalolacton-H<sup>3</sup>.

Substanz	Vitamin K <sub>2</sub> (20)		Cholesterin		Ubichinon und Squalen	
	1	2	1	2	1	2
Tier No. :	1	2	1	2	1	2
Gewebe	I/m/g	I/m/g	I/m/g	I/m/g	I/m/g	I/m/g
Leber und Milz	87	580	52'524	133'111	25'671	36'273
Niere	172	401	111'904	301'242	163'736	254'000
Herz	392	960	12'250	61'899	11'400	36'709
rote Muskulatur	492	682	4'223	11'699	8'525	23'563
weisse Muskulatur	337	599	1'854	7'396	12'707	43'909
Blut		93		55'377		34'292
Aktivitäten in: Impulse/Min./g Trockengewicht						

Tier 1 : normal      Tier 2 : Vitamin K-frei



Tabelle 41.3

Tritiummarkierung von Isoprenabkömmlingen  
in der Niere

	I/m/g Tr.	%
Vitamin K <sub>2</sub> (20)	401	0,07
Ubichinon(50)	94'300	17,0
Squalen	159'500	28,7
Cholesterin	301'242	54,2

42 In vitro Versuche

421 UMWANDLUNG VON 2-(METHYL-C<sup>14</sup>)-1,4-NAPHTHOCHINON

Im Verlaufe der Inkubationsversuche von Leberhomogenat mit Menadion-C<sup>14</sup> zur Synthese von Vitamin K<sub>2</sub> beobachtete ich, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der eingesetzten Aktivität sich wieder in irgend einer Form aus den Lyophilisaten eluieren liess. Die Art der Extraktion - erschöpfende Aetherextraktion - in einigen Fällen Extraktion mit Chloroform/Methanol - musste sowohl unverändertes Menadionals auch lipophile Umwandlungsprodukte erfassen (s. 322).

In einem typischen Experiment wurden von den eingesetzten 2,5 Mill. I/m nur 8% (18'000 I/m) nach Inkubation und Aufarbeitung wieder eluiert. Von diesen 18'000 I/m fanden sich nach der Vorverteilung zwischen Heptan und Methanol (95%) nur 250 I/m in der Oberphase, entsprachen also einem Vitamin K<sub>2</sub> (Abb. 42.2). Der Rest fand sich im Methanol und nach der Verteilung über 35 Stufen (System I) mit einem Maximum in Fraktion 0. Es musste sich also um ein stark hydrophiles Umwandlungsprodukt des Menadions handeln. Das Gewichtsmaximum lag ebenfalls auf Fraktion 0; das optisch bestimmte Maximum von mitverteiltem Menadion auf Fraktion 6. (Abb. 42.1). Die

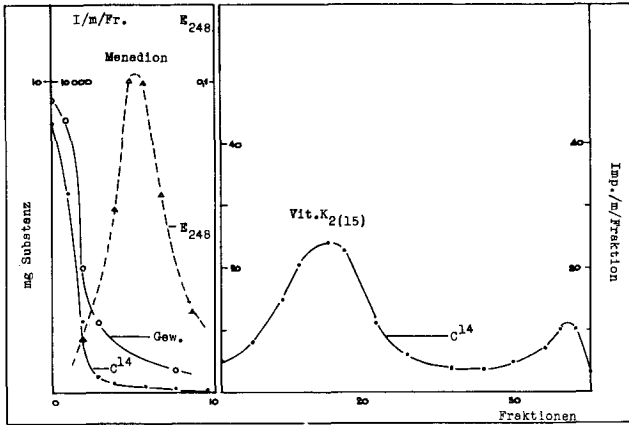


Abb. 42.1 Verteilung des hydrophilen Umwandlungsproduktes von Menadion-C<sup>14</sup> (System I, 35 Stufen) unter Zusatz von inaktivem Menadion. Unterphase der Vorverteilung.

Abb. 42.2 Verteilung des lipophilen Umwandlungsproduktes von Menadion-C<sup>14</sup> (System I, 35 Stufen). Oberphase der Vorverteilung zwischen Heptan/Methanol (95%).

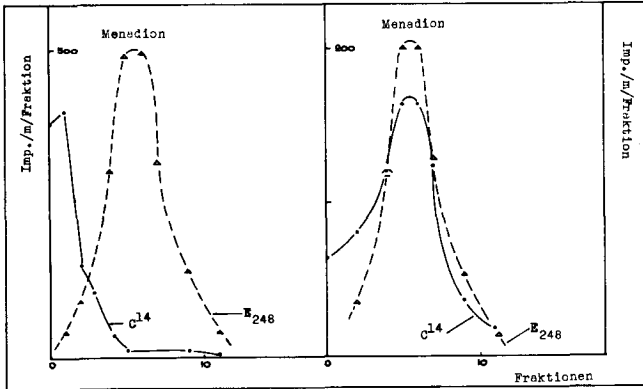


Abb. 42.3 Hydrophiles Umwandlungsprodukt nach saurer Hydrolyse (Verteilung System I, 35 Stufen). Zusatz von inaktivem Menadion. Hydrolyse mit 1N Salzsäure, 60 Minuten.

Abb. 42.4 Hydrophiles Umwandlungsprodukt nach reduktiver Spaltung. (Verteilung System I, 35 Stufen). Zusatz von inaktivem Menadion. Reduktion in Aetherlösung mit LiAlH<sub>4</sub>, 30 Minuten.

Menge des hydrophilen Produktes nach Gewicht und Aktivität liess sich steigern durch Extraktion der Lyophilisate mit feuchtem Aether oder mit Methanol. Dieses eluierte bis 500 mg einer braun gefärbten Substanz, die sich in kleinen Mengen Aether, Dioxan oder Methanol nicht mehr lösen liess. Sie zeigte eine positive Biuretreaktion, was auf mitteluierte Peptide schliessen liess. Zu Beginn der Untersuchung zog ich eine Umwandlung von Menadion in wasserlösliche Salze oder Ester in Betracht; etwa die Bildung von Phosphaten, Sulfaten, Glucuroniden u.a. oder eine einfache Reduktion des Chinons zum Hydrochinon.

Um diese letztere Hypothese zu prüfen, wurde das Produkt während 4 Std. in alkoholischer Lösung mit Silberoxyd zusammen mit inaktivem 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon geschüttelt. Die Verteilung über 35 Stufen im System I zeigte das Verbleiben der Aktivität in Fraktion 0 und die Ueberführung der zugesetzten, reduzierten Form in Menadion in Fraktion 6 (optisch bestimmt).

Es wurde daraufhin versucht, aus dem Menadion-Umwandlungsprodukt wieder freies Menadion zurückzugewinnen. Aber die Hydrolyse mit Salzsäure bei 100° (7 sowie 60 Min. Dauer) veränderte die Substanz nicht, wie aus der Verteilung ersichtlich (Abb. 42.3). Zum gleichen Resultat gelangte man bei der Auswertung eines Inkubationsversuches, bei dem in den letzten 30 Min. zusätzlich zum radioaktiven Menadion noch 2 mg inaktives zugesetzt worden waren. Dieses liess sich vor und nach der Hydrolyse weder optisch noch radiometrisch nachweisen. Die Kontrolle des Hydrolysates auf etwa abgespaltenes Phosphat verlief negativ.

Dagegen konnte durch reduktive Spaltung des Menadion-Umwandlungsproduktes mit Lithiumaluminiumhydrid in Aether unverändertes Menadion regeneriert werden (Abb. 42.4).

Ein weiteres Experiment zeigte, dass es sich bei der Umwandlung von Menadion in dieses hydrophile Produkt nicht um einen enzymatischen Vorgang handeln konnte. Die eine Hälfte eines Homogenates, die für 3 Min. bis zum Auftreten einer Trübung bei 100° denaturiert worden war, wandelte Menadion ebenso um wie die intakte Probe.

Dieser Befund führte uns dazu, die Geschwindigkeit der Umwandlung von Menadion zu prüfen. Zu frisch präpariertem Leberhomogenat wurde bei einer Temperatur von 0° markiertes Menadion gegeben, der Ansatz sofort in der Kühltruhe bei -20° eingefroren und nach dem üblichen Schema aufgearbeitet. Dieses und analoge Experimente zeigten, dass schon 15 und 30 Sekunden nach der Zugabe nur noch 2 0/00 der zugesetzten Aktivität zu eluieren waren. Wurde der Ansatz sofort nach Zugabe der Aktivität in Kohlensäure/Trichloräthylen bei -60° eingefroren, so liessen sich noch 3% der Aktivität als unverändertes Menadion identifizieren. Der Rest fand sich immer in Fraktion 0 der 35-stufigen Verteilung. Die erwähnten Befunde liessen auf eine Bindung von Menadion an das Protein schliessen. Daraufhin untersuchte man das Verhalten von Menadion gegenüber einfachen Aminosäuren. Mit Glycin liess sich beim Erwärmen mit Menadion in Wasser/Äthanol keine Umsetzung beobachten, das Verhalten in der Verteilung entsprach dem freien Chinon. Hingegen bildete Menadion mit Cystein schon in der Kälte einen dunkel gefärbten Komplex, der mit Alkali in Lösung gebracht und mit Säure ausgefällt werden konnte. Er war stabil gegen saure Hydrolyse, konnte aber reduktiv wieder gespalten werden. Zur Abklärung der Frage, ob Menadion mit einem Protein gleich welcher Natur in Reaktion tritt, wurde ein hochmarkiertes 2-(Methyl-H<sup>3</sup>)-1,4-naphthochinon mit Serumalbumin inkubiert. Es zeigte sich die gleiche Erscheinung: Von 825'000 I/m (10<sup>-5</sup>M) konnten nach Inkubation während 2 Std. in einer 2-proz. Rinderserumalbuminlösung in Phosphatpuffer (10<sup>-3</sup>M, pH 7,4) nur noch 4,9% (40'500 I/m) eluiert werden. Der Zusatz von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure, liess diese Rate auf 12% ansteigen. Das Aktivitätsmaximum der Verteilung im System I fand sich wiederum auf Fraktion 0. Da die hohen Aktivitäten etwa vorhandenes Menadion überdeckten, chromatographierte man die vereinigten Fraktionen 0 - 10 an Alox (Akt. III, neutral). Eluiert wurde mit Äther, Äther/Methanol und Methanol. Das Eluat verteilte man in System IV (Heptan/Benzol/Acetonitril/Wasser 1:2:2:2). Dabei zeigte sich, dass noch 5'000 I/m freies Menadion vorhanden waren.

Aus all diesen Versuchen muss wohl geschlossen werden, dass das zum Homogenat gegebene, markierte Menadion zur Hauptsache sofort vom Protein abgefangen wird. Aus dem Verhalten der gebildeten Substanz und aus Modellversuchen mit Aminosäure kann eine Bindung an die SH-Gruppen des Proteins vermutet werden.

#### 422 SYNTHESE VON VITAMIN K<sub>2</sub>

##### 4221 Nachweis und Beeinflussung der Synthese

In allen Experimenten galten die unter 33 und 333 beschriebenen Standardbedingungen mit Ausnahme der in der Folge beschriebenen Variationen.

##### 42211 Einfluss der Versuchsdauer

Das nachfolgende, für die ganze Versuchsreihe typische Experiment soll etwas ausführlicher beschrieben werden:

Das nach üblicher Technik (s. 331 ff) gewonnene Leberhomogenat (Hahn, 12 Wochen alt, normal ernährt) wurde in 4 Ansätzen 30, 60, 120 und 210 Min. mit Menadion-C<sup>14</sup> inkubiert. Abb. 42.5 gibt die Verteilungskurve (System I, 35 Stufen) des Extraktes aus dem 60 Min. inkubierten Homogenat. Aus dem Diagramm geht hervor, dass Menadion-C<sup>14</sup> (Verteilungsmaximum Fraktion 6) in eine lipophilere Substanz (Spitzenfraktion 17) umgewandelt wurde. Es kann sich beim Syntheseprodukt nicht um Vitamin K<sub>1</sub> handeln, da dessen Maximum auf Fraktion 26 fallen müsste. In Analogie zu den Versuchen von Martius und Esser [58b] interpretierte man die aus Menadion gebildete Substanz als Vitamin K<sub>2</sub>. Seine genaue Konstitution wurde durch Vergleich mit authentischen Substanzen aufgeklärt (s. 4222); es handelte sich nicht um ein Vitamin K<sub>2(20)</sub> wie zuerst vermutet wurde, sondern um das um eine Isopreneinheit kürzere Vitamin K<sub>2(15)</sub>. Die Lage der Verteilungsmaxima war - unabhängig von der Versuchsdauer - in allen Ansätzen dieselbe, nur änderte sich die Ausbeute von Fall zu Fall. Neben dem Hauptmaximum ist in Abb. 42.5 noch ein

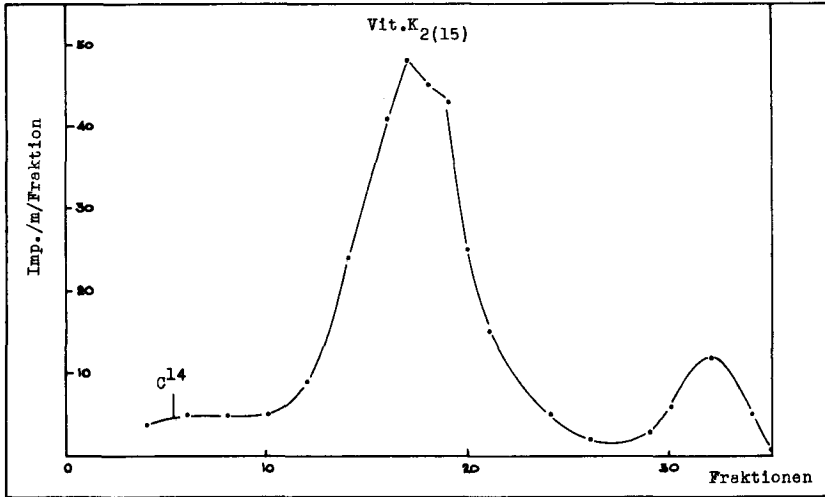


Abb. 42.5 Verteilung von in vitro gebildetem Vitamin K<sub>2</sub>(15) (System I, 35 Stufen), Hahn, normal ernährt, Leberhomogenat 1 Std. inkubiert, 37°; mit 400 µg Menadion-C<sup>14</sup>. Oberphase der Vorverteilung zwischen Heptan/Methanol 95%.

weiteres in Fraktion 31 zu sehen. Die betreffende Substanz konnte wegen zu geringer Aktivität nie aufgeklärt werden; es ist allerdings wahrscheinlich, dass es sich dabei um ein höheres Homologes der Vitamin K<sub>2</sub>-Reihe handeln musste. Aus dem Verteilungsverhalten zu schliessen, käme ein Vitamin K<sub>2</sub>(50) in Frage. Abb. 42.6 zeigt den Einfluss der Inkubationsdauer auf das Ausmass der Vitamin K<sub>2</sub>-Synthese: 120 Min. waren optimal.

Infolge der raschen Bindung von Menadion an Protein (s. 421) vermutete ich, dass für seine Umwandlung zu Vitamin K<sub>2</sub> nur ein kurzer Zeitraum zur Verfügung stehe. Aus dem vorliegenden Versuch ging aber hervor, dass die Konzentration an freiem Menadion noch immer hoch genug war, um eine auf die ganze Versuchsdauer verteilte enzymatische Synthese und die Akkumulierung von Vitamin K<sub>2</sub>(15) zu erlauben.

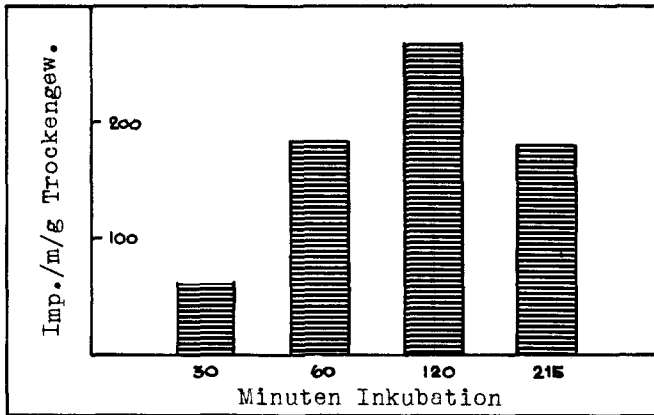


Abb. 42.6 Einfluss der Inkubationsdauer auf die Bildung von Vitamin  $K_2(15)$ . Standardbedingungen, normal ernährtes Tier.

Das absolute Ausmass der Vitamin -Synthese in vitro war in allen Fällen sehr niedrig. Im erwähnten Versuch wurden nur 0,016% der eingesetzten Aktivität in Vitamin  $K_2(15)$  eingebaut, entsprechend der Bildung von 0,14  $\mu\text{g}$  Vitamin  $K_2$ .

#### 42212 Einfluss der Applikationsart und Konzentration von Menadion- $C^{14}$

In Anbetracht der beschriebenen, geringen Synthese an Vitamin  $K_2$  suchte man die Ausbeute durch Veränderung der Bedingungen zu verbessern. Die Art der Zugabe von Menadion war von wesentlicher Bedeutung. Unterstrichen wurde dieser Befund durch die rapide Bindung von Menadion an das Protein (s. 421). Die besten Ausbeuten wurden erzielt, wenn das Menadion- $C^{14}$  unmittelbar vor Versuchsbeginn in einem Tropfen Methylglykol gelöst und mit reinem Suspensionsmedium verdünnt wurde; diese Lösung kippte man zur Zeit 0 zum thermostatierten Homogenat. Wurde jedoch das Chinon in Methylglykol gelöst und dann direkt mit Rohhomogenat verdünnt, so sanken die Ausbeuten ab.

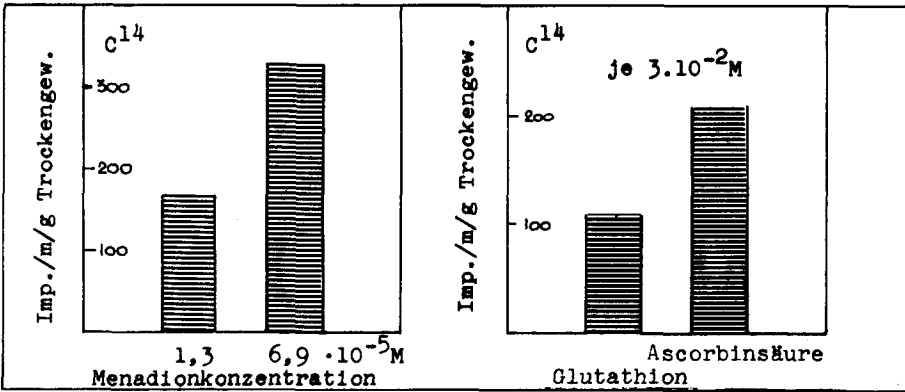


Abb. 42.7 Einfluss der Konzentration an Menadion- $C^{14}$  auf die Vitaminbildung. Standardbedingungen, normal ernährtes Tier.

Abb. 42.8 Einfluss von Ascorbinsäure und Glutathion auf die Vitaminbildung. Standardbedingungen, normal ernährtes Tier.

Inkubationsversuche, bei denen das Chinon vor dem Versuch mit der stöchiometrischen Menge Natriumborhydrid reduziert worden war, schlugen fehl. In einem weiteren Experiment setzte man 2-Methyl- $C^{14}$ -1,4-diacetylnaphthohydrochinon ein. Ich hoffte durch Hydrolyse im Homogenat über eine längere Zeit eine niedrige Konzentration an Chinon zu erzielen. Der Versuch, der mit einer Entenleber durchgeführt wurde, ergab in der Auswertung aber überhaupt kein lipophiles Umwandlungsprodukt der markierten Substanz.

Positiv verliefen Versuche, eine Abhängigkeit der Synthese von Vitamin  $K_{2(15)}$  von der Konzentration an zugegebenem Menadion- $C^{14}$  nachzuweisen. Die Inkubation von Leberhomogenat eines normal ernährten Hahnes mit Menadion- $C^{14}$  ergab bei einer Konzentration von  $1,3 \cdot 10^{-5} M$  im ersten Ansatz eine Vitaminsynthese von 165 I/m/g Trockengewicht (Maximum in Fraktion 17-18 der 35-stufigen Ver-



teilung). Bei einer Konzentration an Chinon von  $6,88 \cdot 10^{-5}M$  im 2. Versuch ergab sich eine Synthese von 332 I/m/g Trockengewicht: es wurde doppelt so viel Vitamin  $K_{2(15)}$  gebildet (Abb. 42.7). Damit ergab sich eine Möglichkeit, durch Veränderung der Chinonkonzentration die Bildungsrate an Vitamin zu beeinflussen. Andererseits durfte wegen der Toxizität des Menadions die Chinonkonzentration nicht beliebig gesteigert werden. Aus Publikationen von Mitchell [47] und Friedmann [54], die mit Gewebekulturen gearbeitet hatten, war bekannt, dass Menadion in Konzentrationen von  $10^{-5}M$  keine toxische Wirkung ausübt. Wenn auch die Verhältnisse in der Gewebekultur nicht ohne weiteres auf diejenigen im Organhomogenat übertragen werden können, so schien doch die Annahme gerechtfertigt, dass eine Menadionkonzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}M$  keinen Einfluss auf den normalen Ablauf der enzymatischen Reaktionen ausüben werde.

#### 42213 Einfluss des Inkubationsmediums

In einer Reihe von Experimenten wurden die Cofaktoren, bzw. deren Konzentrationen variiert, die im wesentlichen den Versuchen von Bloch [57] über die Cholesterinsynthese entsprachen. Wichtig war vor allem die Zugabe von Reduktionsmitteln in relativ hoher Konzentration ( $3 \cdot 10^{-2}M$ ): Ascorbinsäure und Glutathion, zwei SH-Gruppen-Protektoren, ermöglichten oder steigerten den Aufbau der Isoprenketten.

In einem Experiment mit Leberhomogenat von einem normal ernährten Hahn und Menadion- $C^{14}$  wurde die eine Hälfte des Ansatzes mit Ascorbinsäure, die andere mit Glutathion (je  $3 \cdot 10^{-2}M$ ) inkubiert. Nach der üblichen Aufarbeitung ergaben sich in beiden Hälften Aktivitätsmaxima in den Fraktionen 16 - 17 (Vitamin  $K_{2(15)}$ ). Während das Homogenat mit Ascorbinsäure eine Syntheseleistung von 212 I/m/g Trockengewicht ergab, zeigte das mit Glutathion inkubierte nur 113 I/m/g (Abb. 42.8). Weitere Versuche bestätigten dieses Ergebnis.

In einem Versuch nach dem gleichen Schema mit Rattenleberhomogenat wurde die eine Hälfte mit Ascorbinsäure, die andere mit einer aequimolaren Mischung von Ascorbinsäure und Glutathion inkubiert. Die Gesamtkonzentration an Reduktionsmittel war in beiden Fällen  $3 \cdot 10^{-2}M$ . Im ersten Ansatz ermittelte man eine Synthese von Vitamin  $K_{2(15)}$  mit einer Gesamtaktivität von 27 I/m/g Trockengewicht; im zweiten eine solche von 98 I/m/g. Der Versuch kann aber nicht ohne weiteres mit den anderen verglichen werden, da infolge des verschiedenen Tiermaterials eine geringere Synthese auftrat.

Die Erhöhung der ATP-Konzentration von  $1 \cdot 10^{-3}M$  auf  $5 \cdot 10^{-3}M$  übte einen negativen Effekt aus: Die Ausbeute an synthetisiertem Vitamin sank gegenüber dem Standardversuch ab.

Von besonderem Interesse für die vorliegende Untersuchung war der Einfluss der Mevalonsäure auf die Bildung von Vitamin  $K_{2(15)}$ . Die Inkubation von Leberhomogenat eines normal ernährten Hahns ergab ohne Mevalonsäure eine Synthese an Vitamin  $K_{2(15)}$  von 128 I/m/g Trockengewicht, bei Zugabe von Mevalolacton ( $1,5 \cdot 10^{-2}M$ ) eine solche von 378 I/m/g (Abb. 42.9). Interessant war, dass eine Abhängigkeit der Vitaminbildung von der Mevalonsäurekonzentration bei Vitamin K-freien Tieren nicht mehr festgestellt werden konnte. So synthetisierte das Leberhomogenat eines Vitamin K-freien Küken trotz niedrigerer Konzentration an Mevalonsäure ( $1,5 \cdot 10^{-5}M$ ) mehr als doppelt so viel Vitamin  $K_{2(15)}$  wie im eben beschriebenen Versuch: 806 I/m/g Trockengewicht. In allen diesen Experimenten wurde unter Zutritt von Luft inkubiert. Ein Versuch unter Stickstoff zeigte, dass weder Menadion noch Mevalolacton anaerob umgewandelt wird. Nicht nur wurde kein Vitamin  $K_{2(15)}$  gebildet, es konnte auch kein Farnesol, Cholesterin und Squalen nachgewiesen werden.

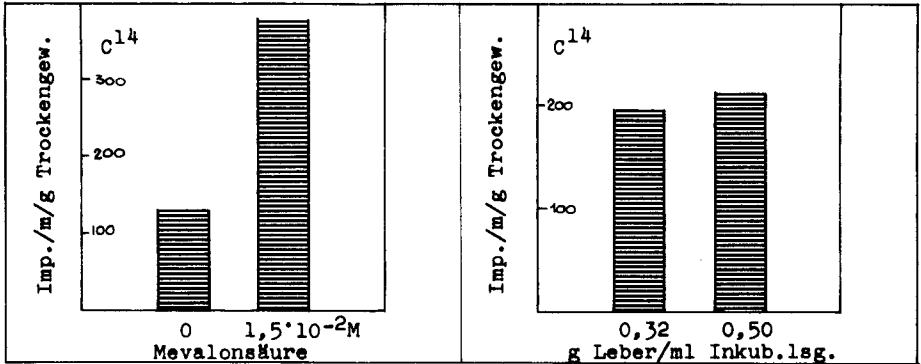


Abb. 42.9 Einfluss der Mevalonsäure auf die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>(15). Standardbedingungen, normal ernährtes Tier.

Abb. 42.10 Einfluss der Gewebekonzentration auf die Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>(15). Standardbedingungen, normal ernährtes Tier.

#### 42214 Einfluss des Gewebematerials

Alle bis jetzt beschriebenen in vitro-Versuche wurden mit Leberhomogenat von normal ernährten Tieren ausgeführt, aus dem durch Zentrifugieren (11'000 x g, 15 Min.) die Mitochondrien entfernt worden waren. In der Folge werden einige Versuche beschrieben, in denen von diesen Standardbedingungen abgegangen wurde. Die Konzentration an Frischgewebe bewegte sich in allen Versuchen um 0,3 g Gewebe/ml Inkubationslösung. Diese Verhältnisse schienen optimal zu sein: Die Erhöhung der Konzentration auf 0,5 g/ml führte nur zu einer unwesentlichen Erhöhung der Bildungsrate von Vitamin K<sub>2</sub>(15) (Abb. 42.10). In mehreren Experimenten beschäftigte ich mich mit der Frage, ob die Zellmitochondrien für die Synthese von Vitamin K<sub>2</sub> benötigt werden oder nicht. In allen Inkubationsversuchen, mit normal ernährten und Vitamin K-freien Tieren zeigte sich, dass ohne Mitochondrien eine höhere Syntheseleistung erzielt

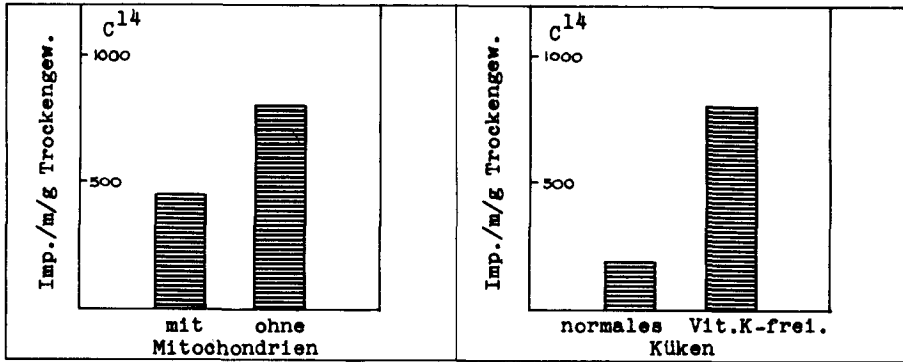


Abb. 42.11 Bildung von Vitamin  $K_{2(15)}$  in Homogenaten mit und ohne Mitochondrien. Standardbedingungen, normal ernährtes Tier, Mitochondrien bei 11'000 x g 15 Min. abzentrifugiert

Abb. 42.12 Bildung von Vitamin  $K_{2(15)}$  in Homogenaten von normalen und Vitamin K-freien Tieren. Standardbedingungen; normales Tier 4 Monate alt, 0,32 g Leber/ml Inkubationslösung; Vitamin K-freies Tier (Prothrombinzeit 10 Min.) 0,32 g Leber/ml Inkubationslösung

wird, als wenn sie im Homogenat belassen werden. So ergab die Inkubation von Leberhomogenat eines Vitamin K-freien Küken (Prothrombinzeit 10 Min.) mit Menadion- $C^{14}$ , bei Belassung der Mitochondrien in der einen Hälfte des Homogenates, eine Synthese an Vitamin  $K_{2(15)}$  von 448 I/m/g Trockengewicht, bei ihrer Entfernung (11'000 x g, 15 Min.) 806 I/m/g (Abb. 42.11). In einem andern Experiment wurden die Mitochondrien in der Ultrazentrifuge bei 30'000 x g abgeschleudert. Trotzdem konnte eine Bildung von Vitamin  $K_{2(15)}$  im Homogenat nachgewiesen werden.

Von besonderem Interesse war der Unterschied in der Syntheseleistung von Leberhomogenaten von normal ernährten und Vitamin K-freien Tieren. Bei normal ernährten lag die Ausbeute an Vitamin  $K_{2(15)}$

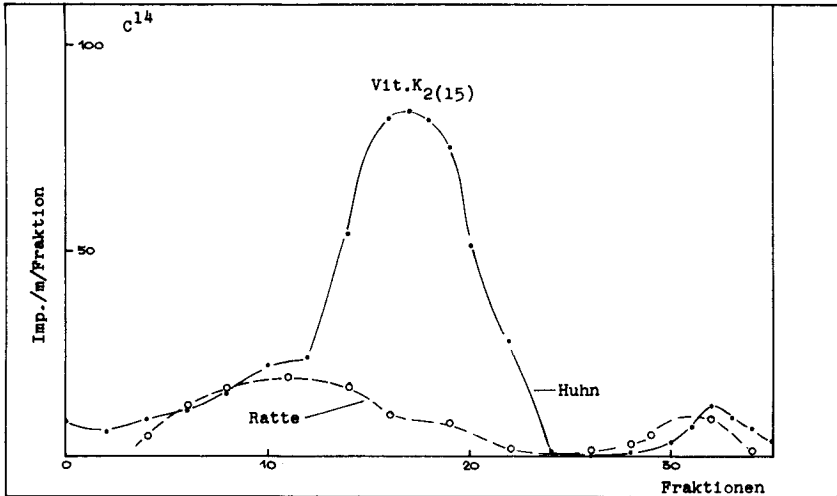


Abb. 42.13 Umwandlung von Menadion-C<sup>14</sup> beim Hahn und bei der Ratte (Verteilung System I, 35 Stufen) Standardbedingungen. Hahn: normal ernährt, 1200 g schwer, 0,29 g Leber/ml Inkubationslösung, Mitochondrien entfernt, 2 Std. Inkub. bei 37°. Ratte: 2 normal ernährte, männliche Tiere, 0,28 g Leber/ml Inkubationslösung, sonst wie oben.

zwischen 190 und 332 I/m/g Trockengewicht; unter vergleichbaren Versuchsbedingungen stieg sie bei Vitamin K-freien Tieren auf 550 bis 1000 I/m/g. In identischen Versuchen mit der Leber eines normal ernährten Kükens und der eines Vitamin K-freien Tieres zeigte die erstere eine Synthese an Vitamin K<sub>2</sub>(15) von 194 I/m/g Trockengewicht, die letztere von 806 I/m/g (Abb. 42.12).

In mehreren Experimenten versuchte ich, die mit Leberhomogenat von Küken erzielte Synthese von Vitamin K<sub>2</sub>(15) auch mit Rattenleber zu reproduzieren. Die Ergebnisse waren nicht einheitlich. Entweder liess sich überhaupt keine Bildung lipophiler Umwandlungsprodukte aus Menadion nachweisen, oder es zeigten sich nach üblicher Aufarbeitung und Verteilung im System I in vielen Fraktionen lipophile Aktivitäten, die keiner einheitlichen Verbindung zugeschrieben werden konnten. In wenigen Versuchen zeigten sich

definierte Verbindungen meist geringer Aktivität. In einem einzigen Versuch (von 8 Experimenten) fand sich ein Aktivitätsmaximum, das Vitamin  $K_2(15)$  zugeschrieben werden konnte. Das Ausmass der erzielten Synthese war jedoch gering. Zwei identische Versuchsanordnungen mit Leberhomogenat eines Kükens und einer Ratte - beide mit Normalfutter ernährt - ergaben eine Synthese von Vitamin  $K_2(15)$  für das Küken (271 I/m/g Trockengewicht). Die Rattenleber ergab in diesem Experiment ein Aktivitätsmaximum in Fraktion 11 (Abb. 42.13).

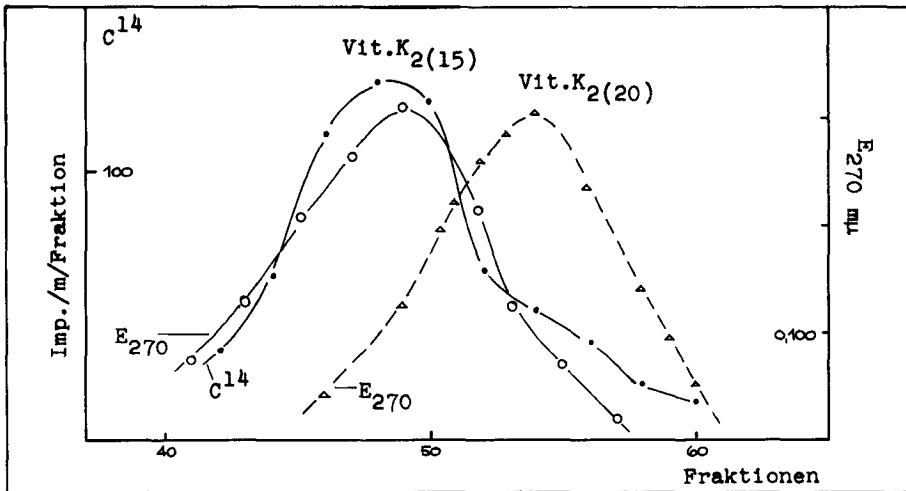


Abb. 42.14 Vergleich des Verteilungsverhaltens von in vitro gebildetem Vitamin mit Vitamin  $K_2(15)$  und Vitamin  $K_2(20)$  (System I, 79 Stufen) Zusatz von Vitamin  $K_2(15)$ . Kurve von Vitamin  $K_2(20)$  aus Parallelversuchen Standardbedingungen; Hahn, Vitamin K-frei, Leberhomogenat ohne Mitochondrien, 2 Std. bei 37° inkubiert, keine Vorverteilung.

4222 Bestimmung der Konstitution des in vitro gebildeten Vitamin K<sub>2</sub>

In Analogie zu den in vivo-Versuchen hatte man erwartet, dass auch in vitro aus Menadion Vitamin K<sub>2</sub>(20) gebildet würde. Aus dem Verteilungsverhalten der synthetisierten Substanz musste aber auf ein anderes, weniger lipophiles Umwandlungsprodukt geschlossen werden. Lagen die Verteilungsmaxima des in vivo gebildeten Vitamin K<sub>2</sub>(20) zwischen Fraktion 20 und 22, so zeigte das in vitro gebildete Produkt in der 35-stufigen Verteilung mit Lösungsmittelsystem I Spitzenfraktionen bei 17-19. Bei gleichzeitiger Verteilung von Vitamin K<sub>2</sub>(20) konnten so die um 3 Fraktionen differierenden radiometrischen und photometrischen Maxima unterschieden werden. Sicherheit gewann man durch Mitverteilen von authentischem Vitamin K<sub>2</sub>(15) bei Verwendung der 79-stufigen Craig-Apparatur, sowie durch Darstellung der Diacetyl- und p-Brombenzoylderivate von Vitamin K<sub>2</sub>(15). In der 79-stufigen Verteilung lagen die Maxima von Vitamin K<sub>2</sub>(15) und Vitamin K<sub>2</sub>(20) um 5 - 6 Fraktionen auseinander und erlaubten so eine sichere Differenzierung (Abb. 42.14).

In einem Experiment wurde das Leberhomogenat eines Vitamin K-freien Kükens mit Menadion-C<sup>14</sup> inkubiert. Nach üblicher Aufarbeitung verteilte man den Rohextrakt über 79 Stufen mit System I. Abb. 42.14 zeigt das Resultat: Die radiometrisch und photometrisch ermittelten Maxima decken sich für Vitamin K<sub>2</sub>(15), nicht aber für Vitamin K<sub>2</sub>(20). Da die Kurven noch nicht genau übereinstimmten, verteilte man die Spitzenfraktionen erneut im gleichen System über 35 Stufen. Abb. 42.16 zeigt in optimaler Uebereinstimmung die Verteilungskurven der C<sup>14</sup>-Aktivität und von Vitamin K<sub>2</sub>(15). Wären in den Spitzenfraktionen der ersten Verteilung noch andere Homologe von Vitamin K<sub>2</sub> vorhanden gewesen, so müssten sie in der zweiten Verteilung als Schultern am Fusse der Verteilungskurve sichtbar werden.

Zur Charakterisierung wurden die aktiven Fraktionen zusammen mit Vitamin K<sub>2</sub>(15) in das Diacetyl-Derivat übergeführt (s. 3512). Nach der Verteilung des Reaktionsproduktes über 35 Stufen im System III (s. 311) zeigten sich die photometrischen und radioaktiven Maxima

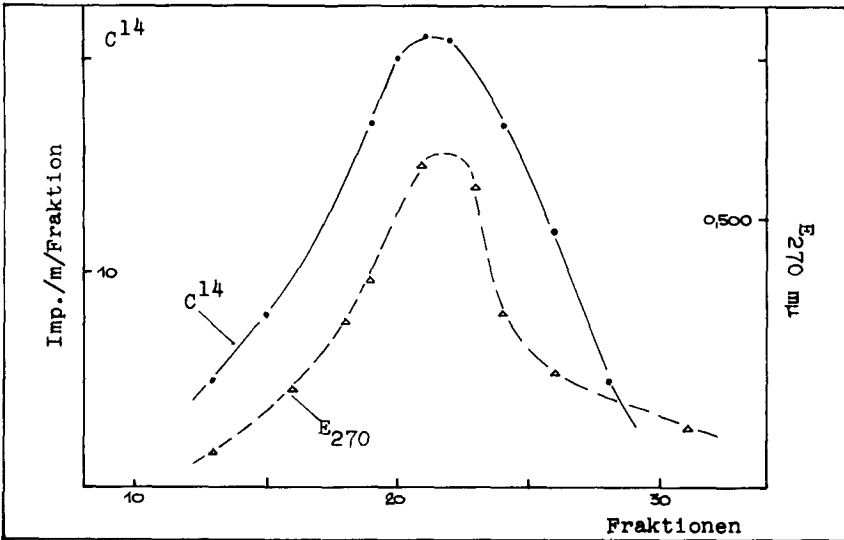


Abb. 42.15 Bis-p-Brombenzoat von in vitro gebildetem und authentischem Vitamin  $K_{2(15)}$  (Verteilung System II, 35 Stufen)

in Fraktion 18 (Abb. 42.17). Zur Erhärtung dieses Befundes, der für Identität von aktiver und zugesetzter Substanz sprach, stellte man aus den  $C^{14}$ -aktiven Spitzenfraktionen der Verteilung eines anderen Experimentes, zusammen mit authentischem Vitamin  $K_{2(15)}$ , das Bis-p-Brombenzoylderivat her. Die Verteilung des Reaktionsproduktes im Lösungsmittelsystem II (s. 311) ergab ein Maximum der Radioaktivität in Fraktion 21-22. Parallel dazu verlief die photometrisch ermittelte Kurve von bis-p-Brombenzoyl-Vitamin  $K_{2(15)}$  (Abb. 42.15). In allen Inkubationsversuchen mit Vitamin K-freien und normal ernährten Hühnern trat dieselbe radioaktive Substanz auf. Es scheint damit bewiesen, dass bei Inkubation mit Leberhomo- genat in vitro aus 2-Methyl- $C^{14}$ -1,4-naphthochinon Vitamin  $K_{2(15)}$  gebildet wird.



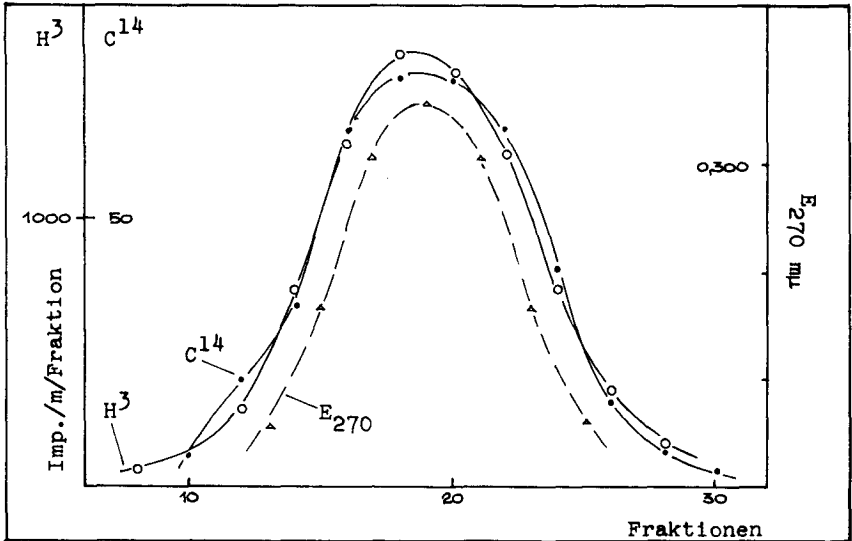


Abb. 42.16 Aus Menadion-C<sup>14</sup> und Mevalolacton-H<sup>3</sup> gebildetes Vitamin K<sub>2</sub>(15). Verteilung nach zweimaliger Digitoninfällung. System I, 35 Stufen. Küken, Vitamin K-frei, Leberhomogenat ohne Mitochondrien, Inkubation 2 Std. bei 37° mit 300 µg Menadion-C<sup>14</sup> und 3,3 mg Mevalolacton-H<sup>3</sup>.

#### 4223 Einbau von Mevalonsäure in die Seitenkette von Vitamin K<sub>2</sub>(15)

Nachdem gezeigt worden war, dass radioaktive Mevalonsäure in vivo in die Seitenkette von Vitamin K<sub>2</sub>(20) eingebaut wird, war es von Interesse zu prüfen, ob sie auch in vitro in das synthetisierte Vitamin K<sub>2</sub>(15) eintritt.

Das von Mitochondrien befreite Leberhomogenat eines Vitamin K-freien Kükens (Prothrombinzeit 10 Min.) wurde zusammen mit 300 µg Menadion-C<sup>14</sup> und 3,3 mg Mevalolacton-H<sup>3</sup> 2 Stunden unter Standardbedingungen (ohne inaktives Mevalolacton und Acetat) inkubiert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurde der Rohextrakt zusammen mit authentischem Vitamin K<sub>2</sub>(15) über 79 Stufen mit dem Lösungsmittelsystem I verteilt. In der radiometrischen Auswertung zeigte sich die C<sup>14</sup>Aktivität in Fraktion 46 zusammen mit dem optisch bestimmten

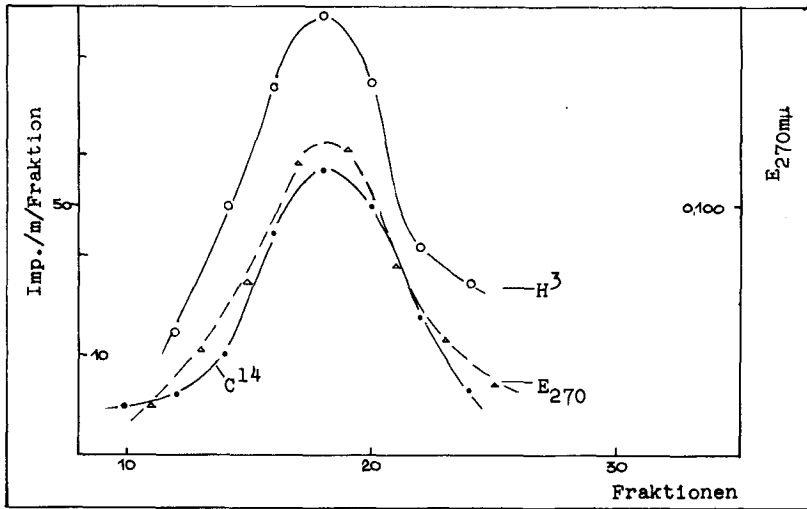


Abb. 42.17 Diacetat des in vitro gebildeten, doppelt markierten Vitamin  $K_{2(15)}$  (Verteilung System III, 35 Stufen) Zusatz von authentischem Vitamin  $K_{2(15)}$  (5 mg) zur Derivatherstellung.

Maximum von Vitamin  $K_{2(15)}$ . Ungefähr parallel dazu verlief die Kurve der wesentlich höheren Tritiumaktivität. Wie in den in vivo-Versuchen war diese auf gleichzeitig gebildetes Cholesterin zurückzuführen, dessen Aktivität die schwache Tritiummarkierung von Vitamin K überdeckte. Durch zweimalige Digitoninfällung (s. 3512) suchte man das Cholesterin aus den Spitzenfraktionen zu entfernen und durch neue Verteilung in demselben System über 35 Stufen die Tritiummarkierung des Vitamins nachzuweisen. Abb. 42.16 zeigt, dass sich die Kurven von Tritium und aktivem Kohlenstoff mit derjenigen des optisch bestimmten Vitamin  $K_{2(15)}$  deckten. Die Tritiumaktivität war aber noch zu hoch, offenbar war noch Cholesterin vorhanden. Die Spitzenfraktionen mit Vitamin  $K_{2(15)}$  wurden nun acetyliert und erneut im selben System verteilt. Das Diacetylderivat des Vitamins zeigte sich nun mit Maximum in den Fraktionen 8 - 9 zusammen mit wenig Tritiumaktivität. Deren Hauptteil war nach Fraktion 26 gewandert und entsprach damit Cholesterinacetat.

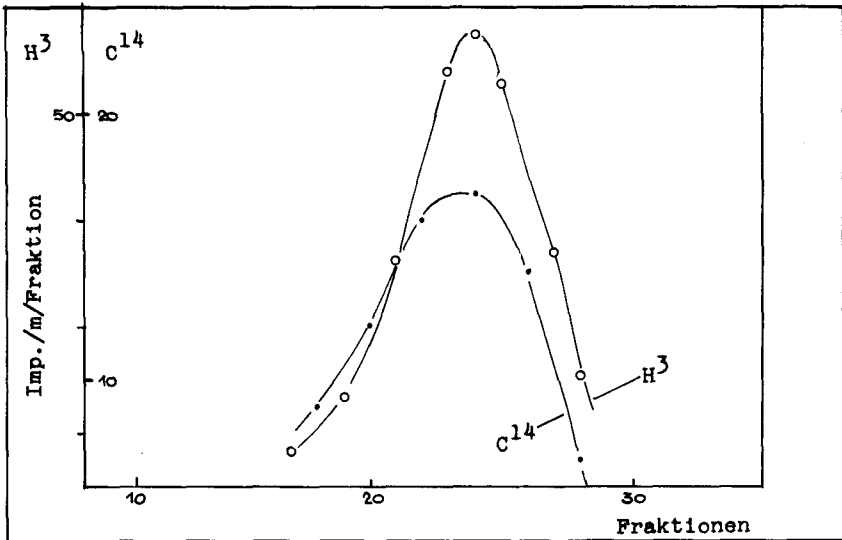


Abb. 42.18 Bis-p-brombenzoat des in vitro gebildeten, doppelt markierten Vitamin  $K_{2(15)}$  (Verteilung System II, 35 Stufen). Reduzierende Veresterung unter Zusatz von 5 mg authentischem Vitamin  $K_{2(15)}$ .

Die Vitamin K enthaltenden Fraktionen wurden erneut einer Digl-  
toninfällung unterworfen. Nach Verteilung im System III (s. 311)  
fanden sich in Fraktion 18-19 in optimaler Uebereinstimmung die  
Maxima von Tritium, radioaktivem Kohlenstoff und Vitamin  $K_{2(15)}$ -  
Diacetat (Abb. 42.17). Zur Erhärtung dieses Befundes charakteri-  
sierte man das in einem andern Experiment entstandene radioaktive  
Produkt zusammen mit Vitamin  $K_{2(15)}$  durch Darstellung des Bis-p-  
brombenzoyl-Derivates. Auch hier konnte die Uebereinstimmung von  
Tritium- und Kohlenstoffaktivität mit dem photometrisch ermittel-  
ten Maximum des Derivates gezeigt werden (Abb. 42.18). In allen  
in vitro Versuchen mit markiertem Menadion und Mevalolacton konnte  
somit gezeigt werden, dass sich die Aktivitäten beider Komponenten  
nach Inkubation mit Leberhomogenat durch alle Reinigungsschritte  
und chemischen Umsetzungen hindurch als zur gleichen Substanz

gehörig verhalten. Die Hypothese, dass Vitamin K<sub>2</sub> von Menadion und dem aus Mevalonsäure gebildeten "aktiven Isopren" aufgebaut werde, konnte somit auch im in vitro-Versuch am Isoprenologen mit 15 C-Atomen bestätigt werden.

#### 423 SYNTHESE VON UBICHINON

Die Verteilung der Rohextrakte aus den lyophilisierten Inkubationsansätzen in vitro über 79 Stufen im System I zeigte, wie in den in vivo-Versuchen, ein Maximum in Fraktion 72, das sowohl Ubichinon(50) als auch Squalen zugeschrieben werden konnte. Abb. 42.19 zeigt die Auftrennung eines Aliquots aus Fraktion 71 im Dünnschichtchromatogramm (Methodik s. 352 und 412) und dessen radiometrische Auswertung. Wie im in vivo-Versuch fand sich Tritium in Ubichinon(50) und in Squalen. Zudem war hier auch die unmittelbar vor Ubichinon laufende, ungesättigte Substanz markiert. Diese Verbindung, die mengenmässig den Hauptteil der Fraktion ausmachte, trat auch im in vivo-Versuch auf, war dort aber nicht aktiv (s. 412, Abb. 41.7). Abb. 42.20 zeigt die radiometrische Auswertung der im Dünnschichtchromatogramm aufgetrennten, einzelnen Fraktionen aus der 79-stufigen Verteilung. Das Maximum von Ubichinon(50) findet sich in Fraktion 71, das von Squalen in 72-73 und das der unbekanntes, stark ungesättigten Substanz in 73-74. Die Natur dieser letzteren Verbindung konnte noch nicht bestimmt werden.

In allen Inkubationsversuchen mit Mevalolacton-H<sup>3</sup> konnte in gleicher Weise Ubichinon(50) und Squalen nachgewiesen werden.

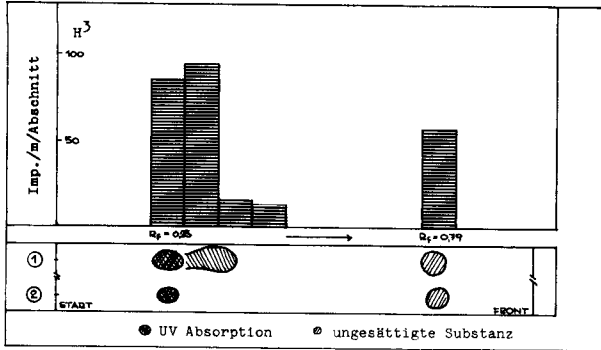


Abb. 42.19 Dünnschichtchromatogramm von Ubichinon(50) und Squalen (Silicagel Merck, Fluoreszein, Benzol, 30 Min.)  
 Bahn 1 : Tritiumaktive Spitzenfraktion 71, je 5  $\mu$ g Ubichinon(50) und Squalen  
 Bahn 2 : je 5  $\mu$ g Ubichinon(50) und Squalen

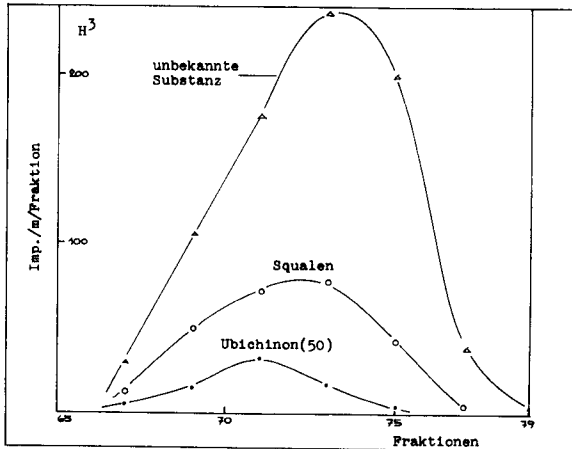


Abb. 42.20 Aktivitätsmaxima von Ubichinon(50), Squalen und einer nicht identifizierten Substanz (Verteilung System I, 79 Stufen). Differenzierung der drei Substanzen in den einzelnen Fraktionen im Dünnschichtchromatogramm.

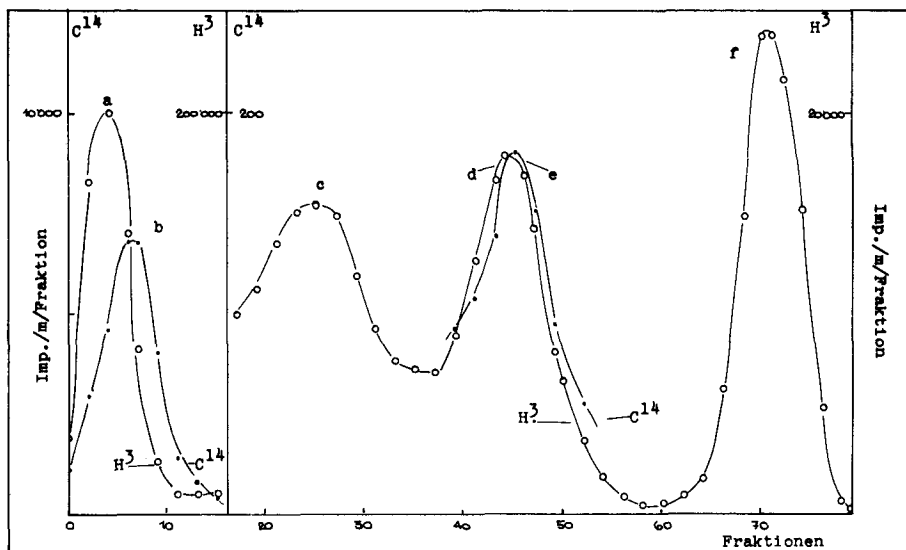


Abb. 42.21 Verteilung des Aetherextraktes aus einem in vitro-Versuch (System I, 79 Stufen)  
a) Mevalonsäure, b) hydrophiles Umwandlungsprodukt von Menadion, c) Farnesol, d) Cholesterin, e) Vitamin K<sub>2</sub>(15), f) Ubichinon(50), Squalen und eine unbekannte Verbindung.

#### 424 NACHWEIS DER BILDUNG VON FARNESOL, SQUALEN UND CHOLESTERIN

Abb. 42.21 zeigt die Verteilung eines Rohextraktes aus einem in vitro-Versuch. In diesem Experiment wurde das Leberhomogenat (mit Mitochondrien) eines Vitamin K-freien Kükens mit Menadion-C<sup>14</sup> und Mevalolacton-H<sup>3</sup> inkubiert. Der Aetherextrakt des lyophilisierten Versuchsansatzes wurde ohne Vorbehandlung im System I über 79 Stufen verteilt. Aus Abb. 42.21 sind die einzelnen Maxima ersichtlich:

- a) entsprach nicht umgewandelter Mevalonsäure
- b) dem hydrophilen Umwandlungsprodukt von Menadion,
- c) konnte nach seinem Verteilungsverhalten und im Dünnschichtchromatogramm als Farnesol identifiziert werden (s. 355)
- d) entsprach Cholesterin, wie durch Digitoninfällung festgestellt wurde (s. 354)
- e) gibt die Kurve des im Ansatz gebildeten Vitamin K<sub>2</sub>(15), die der Cholesterinaktivität fast parallel lief
- f) enthielt Ubichinon(50), Squalen und eine stark ungesättigte, nicht identifizierte Substanz (s. 423). Es könnte sich um den Alkohol mit 10 Isopreneinheiten handeln, der die Seitenkette von Ubichinon(50) bildet. Ein Nachweis konnte noch nicht erfolgen, da uns kein authentisches Präparat zur Verfügung stand.

Da diese Versuche nicht im Hinblick auf die Bildung dieser nur tritiummarkierten Verbindungen angelegt worden waren, liessen sich keine quantitativen Aussagen machen. Anzuführen wäre die Beobachtung dass bei Entfernung der Mitochondrien und Inkubation ohne TPN die Bildung von Cholesterin auf den zehnten Teil absank, während das Ubichinon-Squalen-Maximum nur wenig verringert wurde. Gab man zum Versuchsmedium keine andere Kohlenstoffquelle als das markierte Mevalolacton - und dieses nur in geringer Konzentration - so konnte kein Farnesol nachgewiesen werden.

## 5 DISKUSSION

### 51 In vivo Versuche

Problemstellung und Resultate der in vivo-Versuche (s. 41) bedürfen kaum mehr eines Kommentars. Einerseits wurden die Ergebnisse von Martius und Esser [58b] in bezug auf die Konstitution des gebildeten Vitamin  $K_2(20)$  bestätigt, andererseits konnte der Nachweis für den Einbau von Mevalonsäure in die Seitenkette erbracht werden. Es soll hier nur noch auf einige Beobachtungen eingegangen werden.

Der erste besprochene in vivo-Versuch (Seite 39) ergab keinen Einbau von  $C^{14}$ -markiertem Methylnaphthochinon, weil das Vitamin K-freie Tier vorgängig der Applikation der Aktivität eine etwa dem doppelten Tagesbedarf entsprechende Dosis inaktives Chinon erhalten hatte. Dieser Befund zeigt, dass ein Aufbau von Vitamin K nur erfolgt, sofern ein Bedarf vorhanden ist. Sind die - offenbar in beschränktem Umfang vorhandenen - Rezeptoren abgesättigt, so wird kein weiteres Vitamin mehr synthetisiert oder gespeichert.

Die Probleme des Einbaus von Mevalonsäure in die Seitenkette und die Effekte des Vitamin K-Mangels sollen zusammen mit den in vitro-Versuchen besprochen werden. Eine interessante Beobachtung betrifft den Einbau von Mevalonsäure in andere Isopren-aufgebaute Verbindungen. Identifiziert wurden Ubichinon(50), Cholesterin und Squalen. Den Einbau von Mevalonsäure in Ubichinon(50) hat schon Gloor [59, 60] nachgewiesen. Seine Versuche ergaben eine Erhöhung des Einbaus von Mevalonsäure in Ubichinon(50) und eine Erniedrigung desjenigen in Cholesterin bei Vitamin A-Mangelratten. In der vorliegenden Arbeit konnte ein ähnlicher Effekt in bezug auf Vitamin K beobachtet werden: Beim Vitamin K-freien Tier war der Einbau von Mevalonsäure in Cholesterin, Squalen und Ubichinon wesentlich höher als beim normalen Tier. Da die Küken schon wenige Stunden nach der Applikation von Menadion keine Mangelerscheinungen



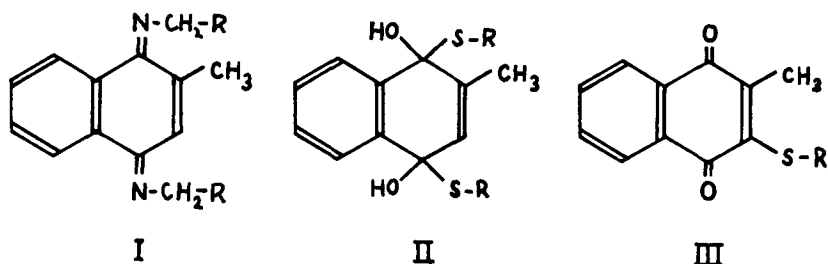
mehr aufwiesen und sich die Prothrombinzeit normalisiert hatte, konnte dieser verstärkte Einbau nicht als Symptom eines noch vorhandenen Vitaminmangels, sondern nur als Folgeerscheinung aufgefasst werden. Ob während der Vitamin K-Mangelzeit eine spezifische Hemmung der Synthese dieser Isoprenabkömmlinge eingetreten ist, die sich als erhöhter Bedarf im Moment der Normalisierung auswirkt, oder ob dieser verstärkte Einbau das Symptom eines zu diesem Zeitpunkt ganz allgemein erhöhten Stoffwechsels ist, kann nicht entschieden werden.

## 52 I n v i t r o V e r s u c h e

### 521 BINDUNG VON MENADION AN DAS PROTEIN

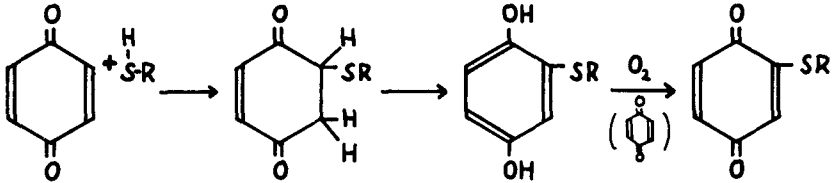
In Abschnitt 421 wurde berichtet, dass Menadion mit grosser Geschwindigkeit an Protein gebunden wird. Dieser Effekt zeigte sich nicht nur bei Gewebehomogenaten, sondern auch mit reinem Serumalbumin. Dadurch, dass das Menadion-C<sup>14</sup> zum grössten Teil aus dem System entfernt wird, bevor es eine Umwandlung eingehen kann, resultierte eine Beeinträchtigung der Synthese. Es fragt sich, warum überhaupt noch eine Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>, wenn auch in geringem Umfang (0,05 - 0,2 µg Vitaminsynthese/g Trockengewicht), erfolgen kann: Offensichtlich muss immer etwas freies Menadion vorhanden sein oder wieder freigesetzt werden. Einen Hinweis gibt vielleicht die folgende Beobachtung: Gab man das Menadion vor Versuchsbeginn zum Rohhomogenat bei 0° , so war die Ausbeute wesentlich schlechter, als wenn es zum fertig bereiteten, thermostatisierten Ansatz gegeben wurde. Nach der ersten Methode scheint eine unspezifische Bindung an das Protein zu erfolgen. Nach der zweiten - unter mehr physiologischen Bedingungen - lässt sich eine Reaktion mit spezifischen Rezeptoren denken, die das Chinon im Laufe der Zeit (die Ausbeute ist von der Inkubationszeit abhängig, Abb. 41.6) wieder abgeben oder eine Umwandlung einleiten. Diese Menadion - Protein - Bindung scheint auch in vivo eine Rolle zu spielen. Jaques [54] gab markiertes Vitamin K<sub>1</sub> oder Menadion peroral

und bestimmte darauf den Gehalt von Lymphe, Galle, Urin und Faecalien an Radioaktivität. Während Vitamin K<sub>1</sub> im Laufe der Zeit (Vitamin K wird im Kreislauf durch die Galle ausgeschieden und im Darm rückresorbiert) quantitativ wieder erfasst werden konnte, blieb Menadion zum Teil im Gewebe gebunden. Sofern eine normale chemische Bindung angenommen wird, kann das Reaktionsprodukt von Menadion folgendermassen formuliert werden:



Da bei der  $\text{LiAlH}_4$ -Reduktion des Adduktes wieder Menadion frei wird, scheint die Bildung einer Schiff'schen Base nach I wenig wahrscheinlich, da diese in das entsprechende Amin übergehen müsste. Gegen Formel II spricht die Stabilität des Komplexes gegenüber Säure. Mit grosser Wahrscheinlichkeit kann aber die Addition einer SH-Gruppe nach III an die Doppelbindung des Chins eintreten. Derartige Reaktionen zwischen Chinonen und Thiolen sind schon beschrieben worden, z.B. von Snell [39] und Schubert [47]. Geiger [45] und Cavallito [45] führen die Wirksamkeit gewisser Antibiotika auf die Reaktion von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketonen oder von ungesättigten Lactonen mit SH-Gruppen der Enzyme zurück. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Modellreaktionen zwischen Menadion und Cystein sprechen für die Bildung von Komplexen analog denen, die Kuhn [44] zwischen Benzochinon und Cystein beschrieben hat. In allen zitierten Arbeiten werden die Addukte nach der allgemeinen Formel III beschrieben.

Ihre Entstehung lässt sich so formulieren:



Wenn auch noch kein direkter Beweis für die Bindung des Menadions an die SH-Gruppen des Proteins erbracht werden konnte, so scheint dieser doch grosse Wahrscheinlichkeit zuzukommen. Die spezielle Reaktivität zwischen Menadion und Protein ist auf jeden Fall von Interesse. Sie gibt eine Erklärung für die Ueberlegenheit von Hydrochinonestern und Bisulfitaddukten gegenüber dem freien Menadion in der Vitamin K-Therapie. Da auch Ubichinon(0) und 2,3,5-Trimethylbenzochinon mit Cystein reagieren, also ebenfalls diese spezielle Reaktivität des Chinons mit der SH-Gruppe aufweisen, erscheint mir der Gedanke, dass auch der Stoffwechsel diese Reaktion in irgend einer Form für seine Zwecke verwenden könnte, prüfenswert.

522 SYNTHESE VON VITAMIN K<sub>2</sub>

Die Inkubationsversuche mit Leberhomogenat waren durch die im vorhergehenden Abschnitt besprochene Menadion-Proteinbindung beeinflusst. Die Effekte der Applikationsart und der Menadionkonzentration sind aus dieser Perspektive zu interpretieren. Die Verwendung von Reduktionsmitteln wie Glutathion oder Ascorbinsäure, von Popjak [58] vorgeschlagen, ermöglichte erst diese Versuche. Ohne sie sank die Ausbeute an Vitamin K<sub>2</sub> stark ab. Dieser Effekt weist auf eine Beteiligung von Enzymen mit essentiellen SH-Gruppen an der Synthese hin. Der im Vergleich zu Ascorbinsäure reduzierte Effekt von Glutathion auf die Ausbeute an Vitamin K<sub>2</sub> lässt sich ebenfalls auf die Chinon-SH-Gruppen-Reaktion zurückführen. Die Menge des gebildeten Vitamin K<sub>2</sub>(15) war in allen Versuchen sehr gering. Im besten beschriebenen Versuch stieg sie auf 0,16 µg/g Trockengewicht an. Wenn auch hier eine Hemmung der Synthese durch die Menadion-Protein-Bindung denkbar ist, so waren wohl in erster Linie allgemeinere Faktoren dafür verantwortlich. Darauf weist auch hin, dass sich diese Bildungsrate grössenordnungsmässig nicht von der in vivo erzielten (z.B. in der Leber: 0,36 µg Vitamin K<sub>2</sub>(20)/g Trockengewicht) unterscheidet. Der geringe Tagesbedarf an Vitamin K von 4 µg/kg Lebendgewicht spricht ebenfalls für eine natürliche Begrenzung. Lässt man eine mögliche Hemmung des aufbauenden Enzymsystems durch das gebildete Vitamin K ausser Betracht, so kann man an eine Absättigung der vorhandenen Bindungsorte denken. Die Vitamin K-Synthese würde demnach erst induziert, wenn ein Bedarf auftritt. Diese These lässt sich stützen durch den Befund, dass Leberhomogenat von Vitamin K-freien Tieren eine wesentlich stärkere Synthese aufweist, als das von normalen (Abb. 42.12). Auch in vivo war dieser Effekt zu beobachten (Abb. 41.6), er wurde ferner von Stoffel [60] an isolierten Mitochondrien bestätigt. Diese geringen Vitamin K-Konzentrationen schränken seine Bedeutung nicht ein: Für enzymatische Umsetzungen sind nur die Enzym-Substrat-Konzentrationen und die Wechselzahl

massgebend. Dass die letztere bei der Vitamin K-Reduktase ausserordentlich hoch liegt, zeigte Märki [60].

Mehrere Versuche bestätigten, dass sich das am Vitamin K<sub>2</sub>-Aufbau beteiligte Enzymsystem nach 5-maligem Homogenisieren im Potter-Elvehjem mit Phosphatpuffer und Zentrifugieren bei 11'000 x g im Ueberstand befindet. Die Syntheseleistung des Homogenisates wird durch das Abschleudern der Mitochondrien (auch bei 30'000 x g) verstärkt. Möglicherweise ist dies auf einen Reinigungseffekt durch Entfernung von Ballastprotein, das mit Menadion in Reaktion treten könnte, zurückzuführen. Diese Befunde, die die Mitochondrien als an der Synthese unbeteiligt erscheinen lassen, stehen aber im Widerspruch zu späteren Versuchen von Stoffel [60], der das Chinon und Polyisoprenpyrophosphat verbindende Enzym in den Mitochondrien lokalisierte. Allerdings waren diese Versuche mit Ubichinon(0) vorgenommen worden. Hingegen stellte Schiefer [60] - ebenfalls in unserem Laboratorium - fest, dass Herzsarkosomen in der Lage sind, Polyisoprenpyrophosphat und Menadion zu kondensieren. Der Widerspruch lässt sich möglicherweise so erklären: Bei der Bildung von Vitamin K<sub>2</sub>(15) aus Menadion und Mevalonsäure, muss das Farnesylpyrophosphat erst gebildet werden. Das dazu benötigte Enzymsystem findet sich nach Cornforth [58] im Ueberstand. Das verbindende Enzym - es lässt sich durch Beschallung leicht in Lösung bringen - ist lose an die Mitochondrienstruktur gebunden. Beim Homogenisieren mit Phosphatpuffer (0,1M) wird es teilweise freigesetzt, nicht aber bei der Präparation der Mitochondrien in Saccharoselösung (0,25M).

Die Versuche mit Rattenleberhomogenat verliefen wesentlich schlechter als diejenigen mit Hühnern. Entweder war überhaupt keine Synthese festzustellen oder es traten Gemische von markierten Substanzen oder von Versuch zu Versuch verschiedene Verbindungen geringer Aktivität auf (z.B. Abb. 42.13). Auch dieser Befund wurde von Stoffel [60] bestätigt: Mitochondrien aus Rattenleber bauen Polyisoprenpyrophosphat wesentlich schlechter in Menadion ein, als

solche von Hühnern. Die Versuche von Martius und Esser [58b] zeigten aber, dass auch die Ratte im Stande ist, Vitamin  $K_{2(20)}$  aus Menadion aufzubauen, wenn auch in geringerer Masse als das Huhn. Erklärbar sind diese Resultate möglicherweise dadurch, dass die Ratte aus ihrer natürlichen Nahrung - Fleisch, Insekten - immer genügend Vitamin  $K_{2(20)}$  aufnehmen und speichern kann. So ist vielleicht das System, das im Falle der Ratte hauptsächlich Vitamin  $K_{2(30)}$  aus Darmbakterien umbauen müsste, verkümmert. Darauf hin weisen auch Versuche von Billeter [60], die ergaben, dass in Ratten der Umbau von Vitamin  $K_1$  in Vitamin  $K_{2(20)}$  schlechter vonstatten geht als im Huhn.

Der Mechanismus des Aufbaus der Isoprenseitenketten ist nach den im Laufe der letzten Jahre erschienenen Arbeiten von Lynen [60], Bloch [59] und Ching Yuan [59] klar geworden. Stoffel [60] konnte dann zeigen, dass ein in Bezug auf die Länge der Seitenkette unspezifisches Enzymsystem Menadion und Polyisoprenpyrophosphat verbindet. Unter Berücksichtigung dieser Arbeiten wird es klar, weshalb im in vitro-Versuch Vitamin  $K_{2(15)}$  entsteht statt Vitamin  $K_{2(20)}$  wie in vivo: Das kondensierende Enzym wurde offenbar bei der Aufarbeitung freigesetzt. Da das Angebot an Farnesylpyrophosphat - als Rohstoff für die Squalen- und Cholesterinsynthese - dasjenige an Geranyl-geranylpyrophosphat bei weitem übersteigt, baut das - offenbar unspezifische - Ferment jenes ein. Auch in vivo wird mehr Farnesylpyrophosphat als Geranyl-geranylpyrophosphat synthetisiert. Die Relation der in dieser Arbeit beobachteten Einbauraten von Mevalonsäure in Vitamin  $K_{2(20)}$ , Ubichinon(50), Cholesterin und Squalen ist aus Tabelle 41.3 ersichtlich. Da das kondensierende Enzym unspezifisch ist, müssen in vivo strukturelle Faktoren den Einbau von Geranyl-geranylpyrophosphat bestimmen.

Die Befunde weisen überdies auf die Existenz zweier verschiedener Enzyme für die Kondensation der Seitenketten mit Menadion und mit Ubichinon(0) hin. Ubichinon(50) wird in vivo und in vitro in weit- aus grösserer Ausbeute synthetisiert als Vitamin K (s. 412 und 423).

Wäre das gleiche freigesetzte, unspezifische Enzym an der Kopplung beider Chinone mit den Seitenketten beteiligt, so müsste im *in vitro*-Versuch, entsprechend dem höheren Angebot an Farnesylpyrophosphat, auch ein Ubichinon(15) entstehen. Für die Existenz eines solchen konnte aber weder durch Verteilung noch im Dünnschichtchromatogramm eine Andeutung gefunden werden.

---

Allen, die mir im Laufe dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, möchte ich herzlich danken. So vor allem meinen Kollegen vom Biochemischen Institut der ETH, meiner Laborantin Fräulein Ursula Kohler, unserer Sekretärin Frau Motycka und unserem Tierpfleger, Herrn Friedrich.

6 Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde versucht, den biosynthetischen Aufbau von Vitamin K aus 2-Methyl-1,4-naphthochinon und Mevalonsäure nachzuweisen.

Mit Hilfe von Methyl-naphthochinon-C<sup>14</sup> und Mevalolacton-H<sup>3</sup> konnte gezeigt werden, dass im Tierkörper ein Vitamin K<sub>2</sub>(20) entsteht, dessen Seitenkette aus Mevalonsäure aufgebaut wird. Der Gehalt verschiedener Organe an diesem markierten Vitamin wurde bestimmt. Auch der Einbau von Mevalonsäure in Ubichinon(50), Cholesterin und Squalen konnte nachgewiesen werden. Die Synthese von Vitamin K<sub>2</sub>(20) und auch - in verstärktem Masse - der anderen aus Isopren aufgebauten Stoffe war beim Vitamin K-freien Tier erhöht.

Inkubation in vitro von Hühnerleberhomogenat mit 2-Methyl-1,4-naphthochinon-C<sup>14</sup> und Mevalolacton-H<sup>3</sup> führte zur Bildung von doppelt markiertem Vitamin K<sub>2</sub>(15). Die Abhängigkeit dieser Synthese von den Inkubationsbedingungen wurde untersucht. Auch in vitro konnte der Einbau von Mevalonsäure in Ubichinon(50), Cholesterin, Squalen und Farnesol nachgewiesen werden.

In Versuchen mit Gewebekomplexen oder reinem Serumalbumin konnte gezeigt werden, dass 2-Methyl-1,4-naphthochinon leicht nicht enzymatisch an Protein gebunden wird.



L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- [29] H. Dam, *Biochem. Z.* 215, 475 (1929)
- [34] R. Klar, *Z.Physik.Chem. B* 26, 335 (1934)
- [38] H.I. Almquist, E. Mecchi, A.A. Klose, *Biochem.J.* 32, 1897 (1938)
- [39] H.I. Almquist, A.A. Klose, *J.Amer.chem.Soc.* 61, 1611 (1939)  
S.B. Binkley, D.W. MacCorquodale, S.A. Thayer, E.A. Doisy, *J.Biol.Chem.* 130, 220 (1939)  
L.F. Fieser, W.P. Campell, E.M. Fry, *J.Amer.chem.Soc.* 61, 2206 (1939)  
P. Karrer, A. Geiger, *Helv.* 22, 945 (1939)  
D.W. MacCorquodale, E.A. Doisy, *J.Biol.Chem.* 131, 35 (1939)  
R.W. McKee, S.B. Binkley, S.A. Thayer, W.D. MacCorquodale, E.A. Doisy, *J.Biol.Chem.* 131, 327 (1939)  
I.M. Snell, A. Weissberger, *J.Amer.chem.Soc.* 61, 450 (1939)
- [40] N. Fiechter, *Schweiz. Med. Wschr.* 12, 259 (1940)
- [44] R. Kuhn, H. Beinert, *B.* 77, 606 (1944)
- [45] C.J. Cavallito, T.H. Haskell, *J.Amer.chem.Soc.* 67, 1991 (1945)  
W.G. Geiger, J.E. Conn, *J.Amer.chem.Soc.* 67, 112 (1945)
- [47] J.S. Mitchell, I. Simon-Reuss, *N.* 160, 98 (1947)  
M. Schubert, *J.Amer.chem.Soc.* 69, 712 (1947)
- [50] H. Vogel, H. Knobloch, *Chemie und Technik der Vitamine I*, 309, Enke, Stuttgart, 1950
- [51] H. Dam, I. Kruse, E. Sondergaard, *Acta Physiol.Scand.* 22, 238 (1951)
- [54] E. Friedmann, D.H. Marrian, I. Simon-Reuss, *Biochim.Biophys. Acta* 13, 260 (1954)  
J. Green, H. Dam, *Acta Chem. Scand.* 8, 1341 (1954)  
E. Hecker, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, p. 34, Verlag Chemie, Weinheim, 1954  
L. Jaques, G. Millar, J.W. Spinks, *Schweiz. Med. Wschr.* 84, 793 (1954)
- [56] C. Martius, *Biochem. Z.* 327, 407 (1936)
- [56] a. P.A. Tavormina, M.H. Gibbs, J.W. Huff, *J.Amer.chem.Soc.* 4498 (1956)  
b. P.A. Tavormina, M.H. Gibbs, *J.Amer.chem.Soc.* 78, 6210 (1956)

- [57] B.H. Amdur, H. Rilling, K. Bloch, J.Amer.chem.Soc. 79, 2646 (1957)  
A.F. Brodie, M.M. Weber, C.T. Gray, Biochem.Biophys.Acta 25, 448 (1957)  
H. Eggerer, F. Lynen, A. 608, 71 (1957)  
K.E. Wilzbach, J.Amer.chem.Soc. 79, 1013 (1957)  
D.E. Wolf, C.H. Hoffmann, P.E. Aldrich, H.R. Skeggs, L.D. Wright, K. Folkers, J.Amer.chem.Soc. 79, 1486 (1957)
- [58] C.G. Bell, F.N. Hayes, Liquid Scintillation Counting, Pergamon Press, New York, 1958  
J. Cornforth, R. Cornforth, G. Popjak, J. Gore, Biochem. J. 69, 146 (1958)  
F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, J. Kessel, Angew.Chem. 70, 738 (1958)
- [58] a. C. Martius, D.Med.Wschr. 83, 1701 (1958)  
b. C. Martius, H.O. Esser, Biochem.Z. 331, 1 (1958)
- [58] G. Popjak, L. Gosselin, J. Gore, R. Gould, Biochem. J. 69, 238 (1958)  
H. Rilling, T. Tschen, K. Bloch, Proc.Nat.Acad.Sci.USA 44, 165 (1958)
- [59] B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, F. Lynen, J.Amer.chem.Soc. 81, 1254 (1959)  
K. Bloch, S. Chaykin, A.H. Philips, A. de Waard, J.Biol. Chem. 243, 2595 (1959)  
Ching Yuan, K. Bloch, J.Biol.Chem. 234, 2605 (1959)  
U. Gloor, O. Wiss, Arch. Biochem. 83, 216 (1959)  
E. Stahl, Pharmazeutische Rundschau 2, 1 (1959)
- [60] M. Billeter, C. Martius, Biochem. Z. 333, 430 (1960)  
U. Gloor, O. Schindler, O. Wiss, Helv. 43, 2088 (1960)  
C.F. Gordon, A.F. Wolfe, Anal.Chem. 32, 574 (1960)  
F. Lynen, U. Henning, Angew. Chem. 72, 820 (1960)  
F. Märki, C. Martius, Biochem. Z. 333, 111 (1960)  
J. Paskova, V. Munk, J.Chromatog. 4, 241 (1960)  
H.G. Schiefer, C. Martius, Biochem. Z. 333, (1960)  
W. Stoffel, C. Martius, Biochem. Z. 333, 440 (1960)

## L e b e n s l a u f

Klaus Scherrer, geboren am 10. Dezember 1931 in Schaffhausen als Sohn von Karl Scherrer, Architekt, und Gertrud, geb. Hengelhaupt. Primar-, Sekundar- und Kantonsschule in Schaffhausen, abgeschlossen mit der Maturität (Typ B) im Oktober 1951.

Im Oktober 1951 begann ich das Chemiestudium bei Prof. Flatt an der EPUL in Lausanne. Nach dem 3. Semester (1. Vordiplom Herbst 1952) absolvierte ich meinen Militärdienst. Ab Oktober 1953 führte ich mein Studium an der IV. Abteilung der Eidgenössischen Technischen Hochschule weiter, um im Sommer 1956 mit dem Diplom abzuschliessen.

Nach einem einsemestrigen Unterbruch, der einer Aufgabe im Rahmen des Studentenflüchtlingswerkes gewidmet war, begann ich im Frühjahr 1957 meine Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C. Martius am neugegründeten Institut für Biochemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule.

Zürich, im Dezember 1960.