

Es erhebt sich weiter die Frage, in welchen Ringsystemen man mit einer Stabilisierung durch Resonanz zu rechnen hat. Prinzipiell ist es denkbar, daß eine Anhebung der Elektronenverteilung des Schwefels nach s^2p^3d oder nach sp^4d erfolgt, und daß dann ein Orbital für eine π -Bindung zur Verfügung steht. Wenn eines der Ringglieder ein elektronegatives Element ist (z. B. Stickstoff), kann sich eine d_{π} - p_{π} -Bindung ausbilden¹⁰⁷⁾. Ob der Anteil an diesen π -Bindungen in Substanzen wie S_7NH , $S_8(NH)_2$ oder $S_4(NH)_4$ freilich groß ist und ob diese Bindungen delokalisiert sind, müssen erst noch weitere Messungen zeigen. In den Verbindungen mit Schwefel der Oxydationszahl +4¹⁰⁸⁾, z. B. in $[ClSN]_3$ (XXXIII), könnten das σ -Bindungsgerüst und ein freies Elektronenpaar in den verfügbaren s - und p -Orbitalen untergebracht werden; ein d -Orbital des Schwefels könnte für ein Molekülorbital zur Verfügung stehen. Das Molekülorbital sollte aus abwechselnd d_{π} - (S-Atom) und p_{π} -Atomorbitalen (N-Atom) aufgebaut sein. Hier könnte man also eine Stabilisierung durch delokalisierte d_{π} - p_{π} -Bindungen erwarten. Vielleicht gilt Analoges auch für S_4N_4 . In den Metallkomplexen dagegen, die sich durch besonders große Stabilität auszeichnen, wie z. B. in $Pt(HN_2S_2)_2$ (XXIX), kann man vielleicht sogar mit delokalisierten p_{π} - p_{π} -Bindungen rechnen. In den Verbindungen mit Schwefel der Oxydationszahl +6 schließlich könnte eine Anhebung der Elektronenverteilung am Schwefel nach sp^3d^2 erfolgen. Das σ -Bindungsgerüst in z. B. $[Cl(O)SN]_3$

¹⁰⁸⁾ D. P. Craig, Chem. Soc. [London], Spez. Publ. No. 12, 343 [1958].

(XXXIV) könnte mit den sp^3 -Orbitalen aufgebaut sein. Ein d -Orbital sollte für eine lokalisierte π -Bindung zum O-Atom zur Verfügung stehen, und ein weiteres d -Orbital könnte dann für das Molekülorbital verwendet werden. Auch hier wäre also mit einer Stabilisierung durch Resonanz zu rechnen.

Nach den Überlegungen von Craig¹⁰⁹⁾ gilt die Hückelsche Regel, daß die Delokalisierungsenergie in den $(4n+2)$ -gliedrigen Ringen größer ist als in den $4n$ -gliedrigen Ringen, für die hier betrachteten Systeme nicht. Bei Systemen mit delokalisierten d_{π} - p_{π} -Bindungen wären vielmehr die achtegliedrigen Ringe bezüglich der Delokalisierungsenergie gegenüber den sechsgliedrigen Ringen bevorzugt. Daran ändert sich im Prinzip auch nichts, wenn man in diesen Ringen keine vollständige Delokalisierung annimmt, sondern fast unabhängige lokalisierte Dreizentrenbindungen für wahrscheinlicher hält¹⁰⁹⁾. Wegen der Zahl und Form der d -Orbitale verhindert bei einer d_{π} - p_{π} -Bindung eine Wellung des Ringsystems die Resonanzstabilisierung nicht.

Durch diese Überlegungen findet die Tatsache, daß stabile achtegliedrige Ringe neben sechsgliedrigen Ringen auftreten, ihre qualitative Deutung. Zur Klärung der Frage, wann im einzelnen sechsgliedrige Ringe oder achtegliedrige Ringe stabiler sind, reichen Theorie und Experimente noch nicht aus.

Eingegangen am 20. Juni 1961 [A 153]

¹⁰⁹⁾ M. J. S. Dewar, E. A. C. Lucken u. M. A. Whitehead, J. chem. Soc. [London] 1960, 2423.

Zur Biochemie der K-Vitamine

Von Prof. Dr. C. MARTIUS

Laboratorium für Biochemie der Eidgen. Techn. Hochschule, Zürich

Viele natürlich vorkommende und synthetische Verbindungen zeigen antihämorrhagische Wirkung. Es sind vor allem Naphthalin-Derivate mit unsubstituierter 3-Stellung oder solche, die eben dort eine — meist aliphatische — Seitenkette tragen. Entscheidendes Intermediärprodukt des betr. Stoffwechsels ist sehr wahrscheinlich das Methyl-naphthochinon, die entscheidende Wirkform des Vitamin $K_{2(30)}$. Die K-Vitamine dürften neben ihrer auffälligen Wirkung an einem mehr oder weniger allen Zellen gemeinsamen Stoffwechselprozeß beteiligt sein, sehr wahrscheinlich an der Atmungskettenphosphorylierung.

Seit der Entdeckung des antihämorrhagischen Vitamines durch Dam im Jahre 1929 und der Aufklärung der Konstitution der natürlich vorkommenden Wirkstoffe aus Pflanzen (Vitamin K_1 ; „Phyllochinon“) und aus Bakterien (Vitamin $K_{2(30)}$, $K_{2(35)}$) durch Dam, Doisy, Karrer u. a. hat dieses Vitamin seinen ihm zukommenden und der ein wenig begrenzten und speziellen Funktion bei der Synthese der gerinnungsfördernden Proteine angemessen erscheinenden Platz in den Lehrbüchern eingenommen¹⁾. Eine Reihe wesentlicher Probleme, die mit diesem Vitamin und seiner Wirkung verknüpft sind, ist dabei bis heute offen geblieben, bzw. zum Teil in ihrer Bedeutung offenbar gar nicht erkannt worden. So ist das Studium der Frage, wie die K-Vitamine die Synthese der Gerinnungsproteine beeinflussen, über vage Hypothesen nie recht hinausgekommen. Daß überdies auch die Biochemie dieser Stoffe selbst, d. h. ihr Stoffwechsel, noch durchaus neuartige und wesentliche Aspekte bietet, hat sich erst in letzter Zeit herausgestellt. Es

ist vor allem die Frage nach der im Körper wirksamen Form des K-Vitamines, die sich aufdrängt. Antihämorrhagische Wirksamkeit findet sich nämlich bei sehr vielen natürlich vorkommenden und synthetischen Verbindungen, die in ihrer Struktur von den natürlichen Vitaminen z. T. recht weit abweichen. Eine Aufstellung aus dem Jahre 1950^{1b)} zählt über 60 Stoffe mit antihämorrhagischer Wirkung auf. Auch wenn man hiervon Verbindungen streicht, bei welchen die für den Wirkungseintritt notwendige, vergleichsweise sehr hohe Dosierung den Verdacht aufkommen läßt, ob nicht geringe Mengen höher aktiver Verunreinigungen, die sich bei diesen häufig öligen Stoffen schwer nachweisen und abtrennen lassen, für die Wirkung verantwortlich zu machen sind, bleibt doch noch eine große Zahl sicher wirksamer Verbindungen übrig.

Sie lassen sich in zwei große Gruppen einteilen, nämlich in Naphthalin-Derivate mit unsubstituierter 3-Stellung und in solche, welche an dieser Stelle eine mehr oder weniger lange, meist aliphatische Seitenkette tragen. Die erste Gruppe wird angeführt von dem hochaktiven 2-Methyl-1,4-naphthochinon („Menadion“). In der Natur ist diese Substanz wie alle andern dieser Gruppe — einschließlich des als Artefakt erkannten, bei der Aufarbeitung von Tuberkelbazillen entstehenden Phthiocols — bisher noch

¹⁾ Zusammenfassende Darstellungen und Übersichtsreferate: a) H. Dam in „Vitamins and Hormones“, Bd. VI, Academic Press Inc. Publishers, New York 1948. b) Vogel-Knobloch: „Chemie und Technik der Vitamine“, Bd. I, Verlag F. Enke, Stuttgart 1950 (enthält die Literatur bis 1950 sehr vollständig). c) O. Isler u. O. Wiss in „Vitamins and Hormones“, Bd. XVII. d) O. Isler, Angew. Chem. 71, 7 [1959] (Chemie der K-Vitamine).

niemals nachgewiesen worden. Sie können offenbar sämtlich durch Oxydation, Reduktion, Hydrolyse oder auf andere Weise vom Körper in das 2-Methyl-naphthochinon übergeführt werden, wie z. B. 2-Methyl-1-naphthol, β -Methyl-naphthalin und verschiedene 1- oder 1.4-Amino-Derivate, partiell hydrierte oder Oxydo-Verbindungen usw. Somit läßt sich ihre Wirkung zwanglos auf einen gemeinsamen Nenner bringen.

Dies scheint indessen nicht mehr möglich, wenn man die Vertreter der zweiten Gruppe hinzunimmt. Neben dem Phyllochinon mit der Phytol-Seitenkette finden wir hier die Bakterienvitamine mit der Farnesyl-farnesyl ($K_{2(30)}$) bzw. Farnesyl-geranyl-geranyl-Seitenkette ($K_{2(36)}$). Neben ihnen stehen — abgesehen von verschiedenen Derivaten wie den Hydrochinonen und deren Estern, Äthern usw. — eine große Zahl synthetischer Produkte mit abgewandelter, verkürzter oder verlängerter, vollständig hydrierter oder aromatischer Seitenkette wie z. B. das 3-Cinnamyl, oder 3-Benzyl-Derivat des 2-Methyl-naphthochinons und andere Verbindungen mehr.

Die qualitativ gleiche, wenn auch quantitativ oft sehr unterschiedliche Wirksamkeit aller dieser Verbindungen schien auf eine recht geringe Spezifität hinzuweisen, wie sie an sich auf dem Gebiet fettlöslicher Wirkstoffe nicht unbekannt war. Es braucht nur an die große chemische Verschiedenheit der natürlichen und der hochwirksamen synthetischen Oestrogene erinnert zu werden. Im Gegensatz zu dieser scheinbar geringen Bedeutung des Einflusses der Substitution in 3-Stellung stand andererseits die offenbar große Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen der Substitution in 2-Stellung. Ersatz der 2-ständigen Methylgruppe durch Wasserstoff setzt die K-Wirksamkeit aller Verbindungen nämlich sehr stark herab, während bereits eine Äthyl-Gruppe in dieser Stellung sie überhaupt völlig zum Verschwinden bringt. Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, daß Angaben von *Mentzer* und *Meunier*³⁾, wonach auch Methylchromone- und chromane antihämorrhagische Eigenschaften zeigen sollen, nicht bestätigt werden konnten⁴⁾. Ein Naphthalin-Kern ist also unbedingt für die K-Wirksamkeit erforderlich. Trotzdem bot die Liste K-wirksamer Verbindungen immer noch ein reichlich buntes Bild.

Mehr als Kuriosum sei hier eine Hypothese erwähnt⁴⁾, welche auf einfachste Weise die qualitativ gleiche Wirksamkeit aller dieser verschiedenen Verbindungen erklärt hätte, indem sie einen oxydativen Abbau aller K-wirksamen Verbindungen zu Phthalsäure im Körper annahm. Diese hätte dann die gemeinsame Wirkform dargestellt. Diese Hypothese ist indessen bald zurückgewiesen worden⁵⁾. Auch eine Überführung aller K-wirksamen Verbindungen mit Einschluß der Vitamine K_1 und K_2 in das Methyl-naphthochinon, hätte schließlich eine einfache Erklärung für die Vielfältigkeit physiologisch gleich wirksamer Stoffe geboten. Mit einem solchen Erklärungsversuch waren jedoch wieder andere Beobachtungen schlecht vereinbar.

So hatte *H. Dam* gefunden⁶⁾, daß die Gerinnungszeit des Blutes K-frei ernährter Küken durch Vitamin K_1 deutlich schneller normalisiert wird als durch Methyl-naphthochinon. Von verschiedener Seite ist die wichtige Feststellung gemacht worden⁷⁾, daß die durch Gaben von Dicumarol

oder anderen Antikoagulantien hervorgerufene, bei entsprechender hoher Dosierung zum Tode durch Verbluten führende Verlängerung der Blutgerinnungszeit durch Applikation von Vitaminen der K_1 - und K_2 -Reihe schneller und sicherer als durch Menadion aufgehoben wird. Bei hoher Dosierung der Antikoagulantien vermögen überhaupt nur K-Vitamine mit bestimmter Seitenkettenlänge — jedenfalls innerhalb gewisser Mengenbereiche des Vitamins und der Antikoagulantien — die Gerinnungsfähigkeit des Blutes zu normalisieren⁸⁾. Damit war ein offenbar auch qualitativer Unterschied der substituierten Methyl-naphthochinone von dem einfachen Stammkörper nachgewiesen.

Am stärksten traten die Unterschiede zwischen dem Menadion und den natürlichen K-Vitaminen jedoch bei Versuchen in vitro zu Tage, welche geradezu einen Antagonismus der Wirkung in bezug auf die Beeinflussung der oxydativen Phosphorylierung enthüllten^{9,10)} (vgl. weiter unten).

Die Aufklärung dieses im Ganzen recht verwirrenden Tatbestandes kam dann durch die Entdeckung^{11,12)}, daß Methyl-naphthochinon im Tierkörper durch Einführung einer Geranyl-geranyl-Seitenkette in das Vitamin $K_{2(20)}$ übergeführt wird und weiterhin auch alle anderen Stoffe mit K-Wirksamkeit vom Tierkörper durch Austausch ihrer 3-ständigen Seitenketten gegen den Geranyl-geranyl-Rest in diese Verbindung umgewandelt werden. Versuche¹¹⁾, die unternommen worden waren, um festzustellen, in welchen Anteilen der tierischen Zelle sich das K-Vitamin vorzugsweise anreichert, hatten zu dieser Feststellung geführt. Hierzu war ¹⁴C-markiertes Methyl-naphthochinon (in Form seines Hydrochinon-diacetates) verfüttert worden. Es hatte sich an Hand der Radioaktivität von Extrakten der verschiedenen Zellfraktionen von Leber, Herz und Niere gezeigt, daß das Vitamin K sich wie erwartet hauptsächlich in den Mitochondrien vorfindet. Dieses aus dem Körper wiedergewonnene K-Vitamin zeigte jedoch ein vom Methyl-naphthochinon völlig verschiedenes Verteilungsverhalten im System Methanol/Heptan, das etwa demjenigen des Phyllochinons entsprach. Mit Hilfe der Craig-Verteilung war es möglich¹²⁾, eindeutig zu beweisen, daß es sich bei dem im Körper aus Methyl-naphthochinon gebildeten Stoff um das in der Natur bis dahin noch nicht gefundene 2-Methyl-3-geranyl-geranyl-1.4-naphthochinon handelt. Die Frage, welches der möglichen Stereoisomeren dabei gebildet wird, konnte noch nicht entschieden werden. Die Annahme, daß es sich um die all-trans-Verbindung handelt, ist sehr wahrscheinlich, aber noch nicht bewiesen.

Diese überraschende Feststellung mußte die Frage aufwerfen, wie es möglich sei, daß der Tierkörper mit solcher Leichtigkeit einen Stoff assimiliere, den man bis dahin als nicht körpereigen, sondern als Produkt rein chemischer Synthese zu betrachten alle Ursache hatte. Denn in der Natur war das „Menadion“ bisher noch niemals gefunden worden und auch das ihm strukturell sehr nahestehende Phthicol (2-Methyl-3-hydroxy-1.4-naphthochinon) aus Tuberkelbazillen war, wie bereits erwähnt, schon längst als Artefakt erkannt worden. Es muß aber andererseits nahezu ausgeschlossen erscheinen, daß der Tierkörper eine so ungewöhnliche und bisher noch nie beobachtete Reaktion, wie sie die Einführung einer langen aliphatischen Seitenkette in ein Chinon darstellt, ohne weiteres durchführen könne, wenn ihm diese Reaktion nicht durchaus geläufig sei. So blieb nur

³⁾ P. Meunier u. C. Mentzer, C. R. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 215, 259 [1942].

⁴⁾ Vgl. ^{1a)}, S. 29.

⁵⁾ M. M. Shemiakin, L. A. Schukina u. J. B. Shevzov, Nature [London] 151, 585 [1943]; M. M. Shemiakin u. L. A. Schukina, ebenda 154, 513 [1944].

⁶⁾ P. Karrer u. F. Koller, Helv. chim. Acta 26, 2114 [1943]; H. Dam, Nature [London] 152, 355 [1943].

⁷⁾ H. Dam, Experimentia 9, 26 [1953].

⁸⁾ Literaturangaben siehe bei T. Gelli, E. Lund, H. Dam u. E. Sørdergaard, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 6, 203 [1954].

⁹⁾ O. Isler, R. Rüegg, A. Studer u. R. Jürgens, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295, 290 [1953].

¹⁰⁾ C. Martius, u. D. Nitz-Litzow, Biochem. Z. 327, 1 [1955].

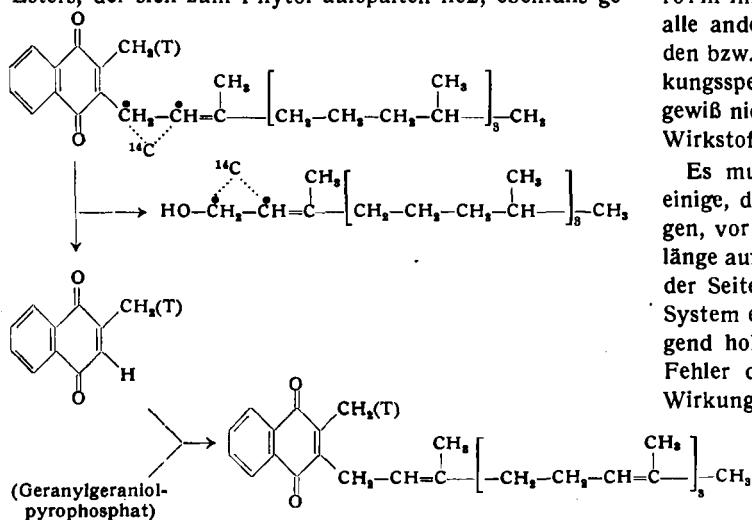
¹¹⁾ A. R. Schultz u. H. Goss, Biochim. Biophys. Acta 20, 443 [1956].

¹²⁾ C. Martius, Biochem. Z. 327, 407 [1956].

¹³⁾ C. Martius u. H. Esser, ebenda 331, 1 [1958].

die Möglichkeit anzunehmen, daß das Methyl-naphthochinon eben doch einen der Zelle vertrauten Stoff darstellt. Da die K-Vitamine aus Pflanzen und Bakterien die einzigen natürlich vorkommenden Stoffe sind, die einen sonst nur noch in 3-Stellung substituierten Methyl-naphthochinon-Kern enthalten, konnten nur diese als Quelle für intermediär in der Zelle auftretendes Methyl-naphthochinon in Frage kommen. Die Hypothese, daß sie im Tierkörper ihre eigene Seitenkette verlieren und obligat Methyl-naphthochinon aus ihnen gebildet wird, war experimentell leicht zu prüfen.

Phyllochinon mit verschiedener radioaktiver Markierung im Chinon-Teil und in der Seitenkette wurde synthetisiert und an Versuchstiere verfüttert¹³). In den Organextrakten dieser Tiere konnte dann wiederum mit Hilfe der *Craig*-Verteilung Vitamin K₂₍₂₀₎ nachgewiesen werden, welches die Markierungsatome aus dem Kern des verfütterten Phyllochinons enthielt, nicht jedoch die der Seitenkette. Letztere konnte an Hand ihrer Markierung in Form eines Esters, der sich zum Phytol aufspalten ließ, ebenfalls ge-



funden werden. Es wird demnach die Phytol-Seitenkette als Ganzes eliminiert. Das übrig bleibende Methyl-naphthochinon wird dann durch Einführung der Geranyl-geranyl-Seitenkette in das Vitamin K₂₍₂₀₎ übergeführt. In welcher Form das Methyl-naphthochinon bei der Spaltungsreaktion anfällt bzw. bei der anschließenden Alkylierungsreaktion vorliegen muß — ob als Chinon, als Hydrochinon (am

ein zellvertrautes Intermediärprodukt des Stoffwechsels der natürlichen K-Vitamine dar. Diese Umwandlungsreaktion ist nämlich nicht auf das Phyllochinon beschränkt, auch die natürlich vorkommenden Vitamine der K₂-Serie aus Bakterien unterliegen ihr, wie am K₂₍₃₀₎ gezeigt werden konnte¹⁴). Da auch das natürlich nicht vorkommende K₂₍₁₀₎ mit der Geranyl-Seitenkette gleiches Verhalten zeigt, desgleichen das noch ausgesprochener körperfremde 3-Cinnamyl-2-methyl-1.4-naphthochinon¹⁵), darf angenommen werden, daß sämtliche Verbindungen, denen in vivo K-Aktivität zukommt, sofern sie eine andere als die Geranyl-geranyl-Seitenkette tragen, analog in das Vitamin K₂₍₂₀₎ umgewandelt werden. Ihre verschiedene Aktivität im Anti-hämorrhagietest ist somit Ausdruck der sehr unterschiedlichen Leichtigkeit, d. h. Schnelligkeit und Vollständigkeit, mit welcher sie zum Methyl-naphthochinon aufgespalten werden, und nicht als Maß für eine K-Aktivität der nicht umgewandelten Verbindungen als solcher zu betrachten. Das Vitamin K₂₍₂₀₎ stellt vielmehr die eigentliche Wirkform im Tierkörper dar, den Generalnenner, auf welchen alle anderen, den Methyl-naphthochinon-Kern enthaltenden bzw. bildenden Substanzen gebracht werden. Die Wirkungsspezifität ist also bei diesem fettlöslichen Vitamin gewiß nicht kleiner als bei irgendeinem der wasserlöslichen Wirkstoffe.

Es muß nun allerdings damit gerechnet werden, daß einige, dem Vitamin K₂₍₂₀₎ sehr nahestehende Verbindungen, vor allem das Vitamin K₁, das ja die gleiche Kettenlänge aufweist, vielleicht auch direkt, d. h. ohne Austausch der Seitenkette wirken und das K₂₍₂₀₎ im enzymatischen System ersetzen können. Es wäre denkbar, daß eine genügend hohe Konzentration bei derartigen Substanzen den Fehler der zweifellos geringeren Bindehaftigkeit an den Wirkungsorten des Vitamins K₂₍₂₀₎ auszugleichen vermag und eine direkte K-Wirkung noch vor vollzogener Umwandlung in das K₂₍₂₀₎ auf diese Weise zustande kommt. Die Frage, ob das tatsächlich der Fall ist, ist allerdings nicht leicht experimentell zu entscheiden, weil gerade bei diesen Verbindungen die Umwandlung in das Vitamin K₂₍₂₀₎ sehr schnell eintritt. Bereits eine Stunde nach der Applikation per os (!) von kernmarkiertem Phyllochinon oder K₂₍₃₅₎ ist markiertes K₂₍₂₀₎ in allen Organen des Tieres nachzuweisen und nach 6 Stunden ist die Umwandlung bereits im wesentlichen beendet, wie Abb. 1 zeigt. Dabei ist bemerkenswert, daß

Gruppe I. Einfache Derivate des 2-Methylnaphthalins.

2-Methylnaphthalin
2-Methyl-1-naphthol
2-Methyl-1-naphthylamin
2-Methyltetralon usw.

Oxydation
Hydrolyse etc.

Gruppe II. Derivate des 2-Methylnaphthochinons mit Seitenketten in 3-Stellung.

Vit. K₁ „Phyllochinon“
Vit. K₂₍₂₀₎ und K₂₍₃₀₎ „Bakterienvitamine“
Synthetische 2-Methyl-1.4-naphthochinone mit Seitenketten in 3-Stellung wie 3-Cinnamyl-, 3-Benzyl-2-methyl-naphthochinon u. a. m.

2-Methyl-1.4-naphthochinon

[Abspaltung der Seitenketten]

Mevalonsäure

Geranyl-geraniolpyrophosphat

2-Methyl-3-geranylgeranyl-
1.4-naphthochinon.
(Vitamin K₂₍₂₀₎)

Schema II. Umwandlungen von Stoffen mit Vitamin-K-Wirkung in das Vitamin K₂₍₂₀₎ im Tierkörper

wahrscheinlichsten), oder in Form irgend eines Derivates (Phosphatesters oder dgl.) — ist noch nicht näher untersucht worden. In jedem Falle stellt das Methyl-naphthochinon selbst oder ein leicht aus ihm sich bildendes Derivat

die verfütterten Verbindungen sich in höheren Konzentrationen nur in der Leber vorfinden, während in allen anderen Organen das Umwandlungsprodukt stets überwiegt.

¹³) M. Billeter u. C. Martius, ebenda 333, 430 [1960].

¹⁴) M. Billeter u. C. Martius, ebenda, im Druck.

¹⁵) C. Martius u. H. U. Weber, unveröffentl.

Von besonderem Interesse ist weiterhin, daß offenbar bei verschiedenen Tierspezies erhebliche Unterschiede bestehen in bezug auf die Leichtigkeit, mit welcher die verschiedenen Vitamine in das $K_{2(20)}$ transformiert werden. Bei Vögeln (Huhn, Taube) wird sowohl das Bakterienvitamin wie der pflanzliche Wirkstoff etwa gleich gut umgewandelt. Im Organismus der Säugetiere (Ratte, Meerschweinchen) wird das Vitamin K_1 jedoch kaum nachweisbar angegriffen, während die Umwandlung des $K_{2(30)}$ glatt abläuft. Das hängt zweifellos mit der Art der natürlichen Versorgung mit K-Vitaminen zusammen. Beim Säugetier geschieht sie

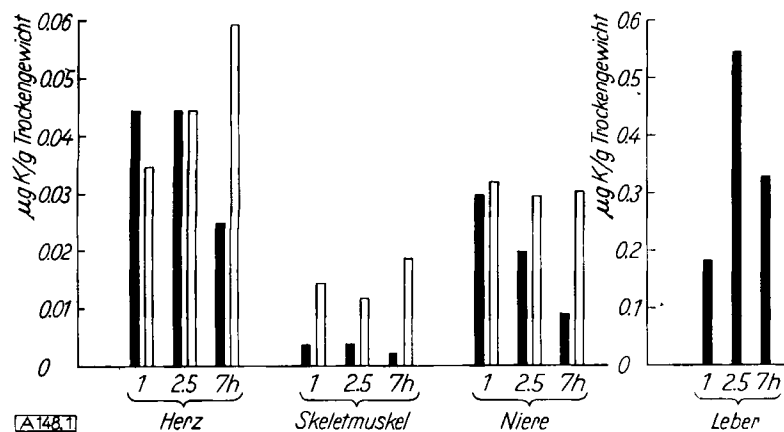
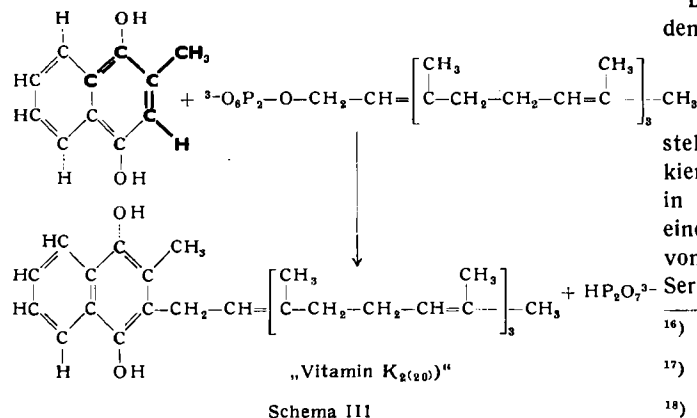


Abb. 1. Gehalt an Vitamin K_1 (■) und $K_{2(20)}$ (□) in verschiedenen Organen von K-frei ernährten Hühnern in Abhängigkeit von der Zeit nach Zufuhr von Vitamin K_1 (355 μg K, per os) (aus: M. Billeter, u. C. Martius, Biochem. Z. 333, 430 [1960])

offenbar in ausreichendem Maße durch die Darmbakterien, die bekanntlich einen sehr hohen Gehalt an K_2 -Vitaminen aufweisen. Die Aufnahme von Phyllochinon aus der Nahrung ist deshalb mehr oder weniger entbehrlich, was darin zum Ausdruck kommt, daß der Organismus des Säugers auf dessen Umwandlung in das Vitamin $K_{2(20)}$ normalerweise gar nicht eingestellt ist. Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß wie bereits erwähnt, das Vitamin K_1 direkt, ohne vorherige Umwandlung in die Wirkungsform eingebaut wird, weil ein Austausch der Seitenkette gar nicht notwendig ist. Dem steht indessen entgegen, daß der Vogelorganismus beide natürlichen K-Vitamine in gleicher Weise in das Vitamin $K_{2(20)}$ überführt. Die Versorgung mit K-Vitaminen durch die Darmbakterien ist bei Vögeln bekanntlich wegen der Kürze des mit Bakterien besiedelten Darmes unzureichend, weshalb es auch nur bei Vögeln möglich ist, durch K-freie Nahrung allein die Symptome einer K-Avitaminose hervorzurufen. Daß sie das Phyllochinon, auf das sie infolgedessen viel stärker angewiesen sind als Säugetiere, nun auch in das Vitamin $K_{2(20)}$ umwandeln, zeigt, daß letztere Verbindung jedenfalls die den speziellen Bedürfnissen der tierischen Zelle am besten entsprechende Form der K-Vitamine darstellt. Das braucht, wie erwähnt, eine Direktwirkung des Phyllochinons nicht auszuschließen, die aber offenbar mit geringerem Wirkungsgrad (größere Michaelis-Konstante?) erfolgt, weshalb dort wo die Versorgung mit K-Vitamin kritisch ist, wie bei Vögeln, dessen Umwandlung in das $K_{2(20)}$ in jedem Fall durchgeführt wird. Es muß schließlich noch darauf hingewiesen werden, daß sich die bisherigen Untersuchungen nur auf wenige Tierspezies erstrecken, es also nicht ausgeschlossen wäre, daß bei anderen Tierarten auch noch andere Seitenketten bevorzugt werden könnten.



Von den beiden enzymatischen Reaktionen ist der Mechanismus der Abspaltung bereits vorhandener Seitenketten noch unbekannt. Letztere kann in bestimmten Fällen als Ganzes erfaßt werden. Die enzymatische Einführung von Seitenketten in das Molekül des Methyl-naphthochinons ist dagegen auch in vitro leicht möglich und prüfbar.

Durch Arbeiten zur Aufklärung der Synthese der Terpen-Verbindungen waren entscheidende Vorarbeiten bereits geleistet worden. Es war kaum zu zweifeln, daß der Einführungsmechanismus ganz entsprechend der Verknüpfung der isoprenoiden Einheiten beim Aufbau des Cholesterin-Moleküls verlaufen mußte, d. h. daß der Pyrophosphorsäureester des Geranyl-geraniols die reaktive Form der einzuführenden Seitenkette ist¹⁶⁾ (Schema III).

Das konnte leicht durch den Versuch in vitro gezeigt werden¹⁷⁾. Das entsprechende, die Verknüpfung bewirkende Enzymsystem findet sich in relativ fester Bindung in den Mitochondrien, kann aber auch, z. B. durch Schallbehandlung, in Lösung gebracht werden. Die Spezifität bzgl. der Kettenlänge ist nicht groß, da auch z. B. Farnesyl- oder Geranyl-pyrophosphat leicht die entsprechend substituierten Naphthochinone ergeben^{17, 18)}. Dagegen scheint sich das Phytolpyrophosphat bemerkenswerterweise enzymatisch nicht entsprechend umzusetzen. Dieser Alkylierungsreaktion kommt allgemeinere Bedeutung zu, da sich ebenso mit 2,3-Dimethoxy-5-methylbenzochinon die Reihe der homologen Ubichinone darstellen läßt¹⁷⁾. Die Reaktion verläuft in diesem Falle sogar in vitro sehr viel glatter, d. h. mit viel besserer Ausbeute als die Synthese des K-Vitamins. Auf die Gleichartigkeit dieser beiden Alkylierungsreaktionen sei im Hinblick auf die wahrscheinlich nahe verwandte Rolle im Zellgeschehen der beiden im Aufbau so ähnlichen Chinone besonders hingewiesen (vgl. weiter unten). Das Enzymsystem, welches diese Alkylierung bewirkt, ist in seinem Vorkommen nicht auf ein einzelnes Organ, etwa die Leber beschränkt, sondern findet sich z. B. auch in Herzmuskelmitochondrien¹⁸⁾. Dieser Befund ist insofern wichtig, als er zeigt, daß nicht etwa nur die Leber am Umbau und Aufbau der K-Vitamine beteiligt ist, was zu erwarten wäre, wenn die Funktion dieses Wirkstoffes irgendwie auf die Synthese von Gerinnungsproteinen beschränkt wäre, die nur in der Leber stattfindet. Im Zusammenhang damit sei auch darauf hingewiesen, daß Herzmuskelmitochondrien einen besonders hohen Gehalt an Vitamin K besitzen, dessen Gegenwart hier wohl ebenfalls recht schwierig mit einer Prothrombin-Synthese in Zusammenhang gebracht werden könnte¹¹⁾.

Die Frage, ob auch die Abspaltung der Seitenkette aus den Vitaminen K_1 bzw. $K_{2(30)}$ und (35) überall im Körper möglich ist oder aber nur in der Leber, d. h. ob wenigstens hierbei eine Arbeitsteilung zwischen der Leber und anderen Organen besteht, ist noch offen. Daß sich per oral gegebenes, markiertes Vitamin K_1 oder $K_{2(30)}$ in der Leber, nicht aber in anderen Organen, stark anhäuft, dürfte zu Gunsten einer solchen Annahme sprechen. Bei der Elektrophorese von mit markiertem Methyl-naphthochinon versetztem Serum, wandert ersteres mit der Albuminfraktion, von der

¹⁶⁾ F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Hemming u. E. M. Mäselein, Angew. Chem. 71, 657 [1959].

¹⁷⁾ W. Stoffel u. C. Martius, Angew. Chem. 72, 627 [1960]; dieselben, Biochem. Z. 333, 440 [1960].

¹⁸⁾ H.-G. Schiefer u. C. Martius, Biochem. Z. 333, 454 [1960].

es recht fest gebunden wird¹⁹⁾; es könnte also gut auf dem Blutwege zu den Organen transportiert werden. Die Kuppungsreaktion ist, wie ein Blick auf die Formel des Methyl-naphthochinons zeigt (Schema III), formell sehr ähnlich der Reaktion eines Geranyl-geranyl-pyrophosphates mit einem Isopentenol-pyrophosphat; der Isopren-Rest des letzteren ist in diesem Falle eben noch an einen Phenyl-Kern kondensiert. Es wird damit verständlich, daß der Ersatz der 2-ständigen Methyl-Gruppe durch Äthyl die Wirksamkeit des Methyl-naphthochinons vernichtet. Offenbar gelingt dann bereits die Einführung der für die Vitaminwirkung nötigen Geranyl-geranyl-Seitenkette nicht mehr, weil die Äthyl-Gruppe in 2-Stellung den „Isopren“-Charakter der in Reaktion tretenden Molekülhälfte zerstört (vgl. Schema III).

Auf eine Schwierigkeit besonderer Art, die Nomenklatur der K-Vitamine, soll nur kurz hingewiesen werden. Die bisher schon ziemlich arg „durchlöcherten“ Begriffe des Vitamines, Provitamines usw. scheinen hier überhaupt nicht mehr zu passen. Sollen das Phyllochinon und die Chinone aus Bakterien künftig noch als Vitamine bezeichnet werden, oder müßte man nicht zutreffender von Provitaminen sprechen, da sie ja doch im Tierkörper erhebliche Umformungen unter Verlust von mehr als der Hälfte ihrer C-Atome erleiden? Oder müßte nicht vielmehr diese Bezeichnung dem Methyl-naphthochinon als Vorstufe bei der Bildung des K₂(20) vorbehalten bleiben, auch wenn dieser Stoff in faßbarer Menge in der Natur nirgends vorkommt, sondern eben als ein Metabolit anzusehen ist? Wenn man bedenkt, daß die lange Seitenkette des Vitamin K₂(20) sicherlich keine andere Funktion ausübt als es die Pyrophosphat-, Adenyl- oder Polyglutaminyl-Reste in den Wirkformen anderer Vitamine tun, nämlich die eigentliche prosthetische Gruppe, den Naphthochinon-Kern, in geeigneter Position auf dem Trägerprotein oder -Lipoid zu fixieren, erscheint es ebenso berechtigt, dem Methyl-naphthochinon die Bezeichnung „Vitamin K“ zuzuerkennen.

Zum Wirkungsmechanismus der K-Vitamine

Mit der Frage nach dem Wirkungsmechanismus der K-Vitamine betreten wir einen noch nicht ganz sicheren Boden. Die bisher gegebene Erklärung war im Grunde nichts weiter als die Zuordnung eines klinischen Symptomes, der Hämorrhagie, wie sie bei einem Mangel an Vitamin K zu beobachten ist, zu einem in vielen Details noch unbekannten, komplexen, biochemischen Prozeß, nämlich der Synthese einiger für die normale Blutgerinnung notwendiger spezifischer Proteine, deren Menge im Blut in solchen Fällen vermindert ist. Sofern diese Erklärung (und so wurde sie und wird sie vielfach noch heute verstanden) eine direkte und unmittelbare Kausalverknüpfung zwischen der Vitaminwirkung und der Synthese dieser Gerinnungsproteine impliziert, ist sie unhaltbar. Würde sie doch von uns nichts mehr und nichts weniger verlangen als zu glauben, daß Pflanzen und Mikroorganismen Stoffe produzieren, für welche bei ihnen selbst, wenn sie nur für diese bestimmten Protein-synthesen da wären, auch nicht im Geringsten eine entsprechende Verwendung zu finden wäre. Die primäre Struktur der verschiedenen Gerinnungsproteine ist zwar noch nicht bekannt, es spricht jedoch nicht das Mindeste dafür, daß diese im Prinzip irgendwie anders aufgebaut sind oder ihre Bildung anders verläuft als diejenige aller andern bekannten Eiweißstoffe auch. Wie und wo soll bei der Synthese der Gerinnungsproteine (d. h. einiger, nicht einmal aller) noch ein weiterer essentieller Faktor eingeordnet werden, der bei allen andern Eiweißsynthesen nicht benötigt würde?

Mit den bisherigen Erfahrungen der Vitaminforschung widerspruchslös vereinbar und acceptabel erscheint nur eine Erklärung, welche auch in diesem Falle annimmt, daß die K-Vitamine an einem fundamentalen, mehr oder weni-

ger allen Zellen gemeinsamen Stoffwechselprozeß beteiligt sind und daß die klinischen Symptome einer Avitaminose nur spezieller Ausdruck einer solchen allgemeineren Störung sind. Die verschiedenen, durch Mangel an Vitamin B₁₂ oder Folsäure bedingten Anämieformen mögen als Hinweis und Beispiel dienen. Die Beziehungen zwischen Ursachen und klinisch erkennbarer Wirkung erstrecken sich bekanntlich bei diesen über sehr viele Glieder einer Kausalkette; das klinische Symptom zeigt nur den locus minoris resistentiae an, die Störung ist viel allgemeinerer Art. Wäre heute nur der sich jetzt langsam abzeichnende Wirkungsmechanismus der Cobalamine im molekularen Bereich bekannt²⁰⁾, würde wohl niemand im Stande sein vorherzusagen, daß eine B₁₂-Avitaminose sich klinisch als perniciose Anämie manifestieren müsse.

Wie der Verfasser und seine Mitarbeiter in einer Folge von Arbeiten seit dem Jahre 1953 zu zeigen bemüht waren, ist der Ort der Wirkung der K-Vitamine bei dem biochemischen Fundamentalprozeß der Zellatmung bzw. der diese begleitenden oxydativen Phosphorylierung zu suchen^{21, 23)}. Es ist nicht möglich, hier näher auf dieses komplizierte und viel diskutierte, in wesentlichen Zügen aber auch heute noch ungeklärte Problem näher einzugehen. Die vom Verfasser aufgestellte Theorie nimmt an, daß an dem System der Atmungsfermente neben den schon länger bekannten Dehydrogenasen und Flavoproteinen sowie den Cytochromen auch noch Chinone beteiligt sind, unter ihnen das Vitamin K. Diese Auffassung stützt sich insbesondere auf die Beobachtung, daß Mitochondrien K-frei ernährter Tiere eine verminderte Fähigkeit zur Überführung von anorganischem Phosphat in energiereiche Bindung („erniedrigten P/O-Quotient“) zeigen²²⁾ und daß Stoffe, welchen in vivo der Charakter von Antagonisten des Vitamin K zukommt, den in der Klinik heute viel gebrauchten Antikoagulantien vom Typ des Dicumarols, des Marcumar usw., in vitro sehr wirksame „Entkoppler“ von Atmung und Phosphorylierung darstellen²³⁾. Die aufgeführten Tatsachen allein würden zunächst nur auf eine Rolle des Vitamins K beim eigentlichen Phosphorylierungsprozeß hinweisen. Es stellen die K-Vitamine ja aber leicht reversible Redoxsysteme dar, womit ein Hinweis auf die Verknüpfung von Atmung, d. h. Elektronenübertragung und eigentlicher Phosphorylierungsreaktion gegeben ist. Dieses einmal als gegeben angenommen, würde das Normalpotential des Vitamins K ($E'_0 = -60$ mV) ihm einen Platz in der Atmungskette knapp unterhalb der Flavoproteine zuweisen. Da bei einem Mangel an Vitamin K oder bei einer funktionellen Ausschaltung desselben durch K-Antagonisten wie Dicumarol o. ä. nur die oxydative Phosphorylierung und nicht das Ausmaß der Zellatmung als solches betroffen wird, mußte angenommen werden, daß für den Weg des Wasserstoffes von den Substraten der Atmung bis zum Niveau des Cytochrom c zwei Alternativwege in der Zelle angelegt sind, ein phosphorylierender, Vitamin K enthaltender und ein nicht-phosphorylierender.

Schema IV zeigt ein solches Schema, wie es im Prinzip vom Verfasser 1954 vorgeschlagen wurde²⁴⁾, mit den neueren Ergänzungen. Die Existenz von zwei Alternativwegen

²⁰⁾ Vgl. H. Eggerer, P. Overath u. F. Lynen, J. Amer. chem. Soc. 82, 2643 [1960].

²¹⁾ C. Martius, Proc. Third Intern. Congr. of Biochemistry, Brussels, 1955, Acad. Press Inc. Publishers New York 1956; Chem. Weekblad 53, 196 [1957]; Klin. Wschr. 35, 223 [1957]; D. Med. Wschr. 83, 1701 [1958]; ders. in: Ciba Foundation Symposium on „Cell Metabolism“ 1959, 194. J. and A. Churchill Ltd., London 1959; ders. in Ciba Foundation Symposium on „Quinones in Electron Transport“ 1960, 312; J. and A. Churchill, Ltd., London 1961.

²²⁾ C. Martius u. D. Nitz-Litzow, Biochim. Biophys. Acta 13, 152 [1954].

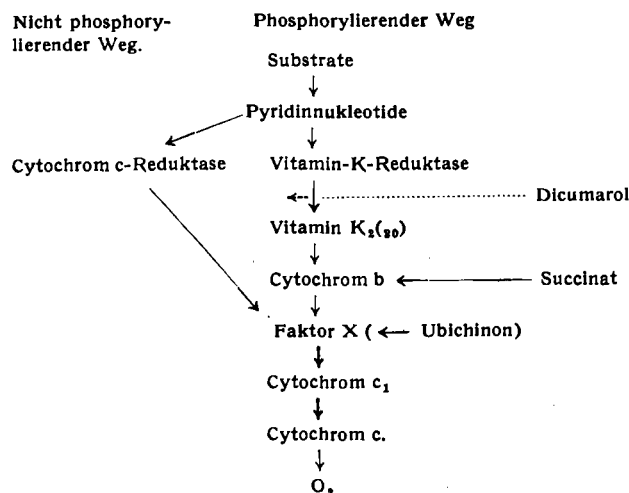
²³⁾ C. Martius u. D. Nitz-Litzow, ebenda 12, 134 [1953].

²⁴⁾ C. Martius, Biochem. Z. 326, 26 [1954].

¹⁹⁾ K. Scherrer u. C. Martius, unveröffentl.

für den Wasserstoff im oberen Abschnitt der Atmungskette wird heute allgemein angenommen.

Es ist nun in der letzten Zeit die Reindarstellung eines bisher unbekannten Flavoproteins (mit FAD als Wirkgruppe), von uns Vitamin-K-Reduktase genannt, gelungen, welches alle geforderten Eigenschaften eines Bindegliedes zwischen Vitamin K und den Pyridin-nukleotiden



Schema IV. Einordnung des Vitamins K und der Vitamin-K-Reduktase in die Atmungskette. Die Einordnung des Ubichinons ist in Einzelheiten noch nicht festgelegt

aufweist²⁵). Es kommt sowohl im Cytoplasma wie auch innerhalb der Mitochondrien vor²⁶). Bei gleichem enzymatischem Verhalten bestehen kleine Unterschiede in den physikalischen Konstanten der beiden Enzyme. Diese werden von den hydrierten Formen beider Codehydrasen reduziert und von Naphthochinonen (Methyl-naphthochinon bis zu $K_{2(20)}$) oxydiert. Eine strenge Acceptorspezifität besteht, wie zu erwarten, jedoch nicht. Das Bemerkenswerteste an diesem Enzym ist die ganz außerordentlich hohe und spezifische Hemmung durch den Vitamin-K-Antagonisten Dicumarol und andere Antikoagulantien (50% Hemmung bereits durch 2×10^{-9} M Dicumarol). Es ist schwer zu denken, daß zwischen der bekannten pharmakologischen Wirkung dieser Stoffe in vivo und ihrer spezifischen Inhibitorwirkung auf die Vitamin-K-Reduktase sowie ihrem „Entkopplungseffekt“ auf die oxydative Phosphorylierung kein direkter Zusammenhang bestehen soll. Es ist ohne weiteres klar, daß durch eine Blockierung der K-Reduktase der — phosphorylierende — Weg über das Vitamin K gesperrt wird und die Wasserstoffatome auf den parallelen, nicht mit Phosphorylierung verknüpften Alternativweg gezwungen werden. Die dadurch, ebenso wie beim Vitamin K-Mangel, verminderte Phosphorylierungsrate würde dann zu einer Verknappung des verfügbaren Adenosin-triphosphates führen, worin die Ursache der ausbleibenden Synthese der Gerinnungsproteine zu suchen wäre. Da diese eine sehr kurze Halbwertszeit haben (Größenordnung 1 Tag gegenüber ca. 100 Tagen bei den andern Serumproteinen), kann diese Störung der Proteinsynthese manifest werden, ehe andere charakteristische Symptome auftreten. Auf die Möglichkeit, daß daneben vielleicht noch spezifischere, auf die Ausschaltung des K-Vitamines direkter ansprechende Beziehungen zwischen den die Gerinnungsproteine produzierenden Enzymsystemen und ihrem Energielieferanten bestehen, sei nur hingewiesen. Da wir über die Art, wie die Protein synthetisierenden Partikel, die Mikrosomen, mit

den Energieerzeugern, den Mitochondrien in der intakten Zelle regulatorisch verknüpft sind, kaum etwas wissen, verbietet sich eine Diskussion solcher Möglichkeiten von selbst. Im übrigen besteht für eine solche Zusatzhypothese m.E. auch kein Bedürfnis.

Bei der Aufstellung der Arbeitshypothese über die Beteiligung von Chinonen an der phosphorylierenden Gewebsatmung wurde die Annahme gemacht, daß jedem Phosphorylierungsschritt ein Chinon mit entsprechendem Redoxpotential zugeordnet sei. Gedacht war dabei u. a. an das Vitamin E²¹). Mit der in den letzten Jahren gelungenen Entdeckung eines bisher unbekannten Chinons, des Ubichinons oder Coenzym Q, hat diese Auffassung eine willkommene Stütze erhalten^{27, 28}). Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchung dieses Stoffes lassen es als höchst wahrscheinlich erscheinen, daß es ebenfalls ein Glied der phosphorylierenden Atmungskette bildet und seinem Redoxpotential entsprechend auf der Höhe der zweiten Phosphorylierungsstufe eingebaut ist²⁹). Es erscheint in diesem Zusammenhang sehr bemerkenswert, daß die bereits erwähnte Synthese des Ubichinons im Tierkörper und auch in vitro auf ganz analoge Weise und vielleicht sogar mit dem gleichen Enzym wie die Bildung des Vitamins $K_{2(20)}$ abläuft.

Zum Schluß sei noch eine sehr merkwürdige Beobachtung erwähnt, die die Zusammenhänge zwischen Vitamin K, Atmungskettenphosphorylierung und dem Flavoprotein K-Reduktase beleuchtet. Die Durchmusterung der verschiedensten Tierarten und ihrer Organe hatte überall die Anwesenheit dieses Enzymes Vitamin-K-Reduktase ergeben, es wurde jedoch bis auf geringe Spuren, die bei einigen wenigen Exemplaren gefunden werden konnten, bei der Taube vermißt²⁵). Nun ist die Taube, wie H. Dam 1937 beobachtet hat³⁰), im Gegensatz zu den meisten andern Vögeln, nicht auf Vitamin K angewiesen. Eine Untersuchung der Verhältnisse bei der oxydativen Phosphorylierung in Taubenleber-Mitochondrien ergab dann, daß bei diesem Tier auf der ersten K-abhängigen Phosphorylierungsstufe überhaupt keine Phosphorylierung stattfindet. Das Zusammenreffen dieser drei Merkmale, Abwesenheit der K-Reduktase, Unabhängigkeit vom Vitamin K und mangelnde Phosphorylierung auf der ersten Stufe können wohl kaum als rein zufällig betrachtet werden. Daß dabei ganz normale Verhältnisse bei der Blutgerinnung vorliegen, zeigt einmal mehr, daß ein direkter Zusammenhang zwischen dem Vitamin K und der Synthese der Gerinnungsproteine nicht bestehen kann. Es ist für diesen Zweck entbehrlich, wenn die Anlietung von Energie für diese Synthese auf andere Weise gewährleistet ist, wie dies offensichtlich im Taubenorganismus der Fall ist. Wir hätten es in diesem Fall mit einer Adaption an besondere, durch die Ernährung bedingte Verhältnisse zu tun, da das normale Futter der Taube äußerst arm an K-Vitaminen ist. Daß diese Adaption aber überhaupt möglich ist, erscheint im Lichte der im Vorstehenden skizzierten Theorie über den Wirkungsmechanismus des K-Vitamines verständlich, wenn seine Funktion eben bei der Atmungskettenphosphorylierung zu suchen ist. Ein Auffall des Vitamines würde dann nur einen quantitativen Einfluß haben, der durch Mehrleistung auf den anderen, K-unabhängigen Stufen prinzipiell ausgeglichen werden kann.

Eingegangen am 13. April 1961 [A 148]

²⁷) R. A. Morton et al., *Helv. chim. Acta* 41, 2343 [1958].

²⁸) F. L. Crane in: *Ciba Foundation Symposium on „Quinones in Electron Transport“*, 1960, S. 36, J. and A. Churchill Ltd., London 1961.

²⁹) D. E. Green, ebenda, S. 130.

³⁰) H. Dam, F. Schenheyder u. L. Lewis, *Biochemic. J.* 37, 22 [1937].

²⁵) F. Märki u. C. Martius, ebenda 333, 111 [1960].

²⁶) F. Märki u. C. Martius, ebenda, im Druck.