Biochemische Zeitschrift 333, 440—453 (1960)

Über den Mechanismus der Bildung von Vitaminen der K_2-Reihe und von Ubichinonen durch enzymatische Alkylierung der entsprechenden in 3-Stellung unsubstituierten Chinone*

Von

W. Stoffel und C. Martius

Aus dem Laboratorium für Biochemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. Oktober 1960)

Mit der Entdeckung, daß im Tierkörper Methylnaphthochinon in Vitamin $K_{2(20)}$ umgewandelt wird [6], war die Frage nach dem Mechanismus dieser Reaktion aufgeworfen. Wie der Aufbau einer hierbei einzuführenden Polyisoprenkette in der Zelle vorzustellen ist, hatten die Arbeiten von LYNEN, BLOCH [7] u. a. in der letzten Zeit bereits gezeigt. Durch Verwendung von markierter Mevalonsäure konnte leicht bewiesen werden, daß diese auch bei der Bildung von Vitamin K_2 aus Methylnaphthochinon das Ausgangsmaterial für die Seitenkette liefert [9]. Was den Mechanismus der eigentlichen Alkylierungsreaktion des Chinonkernes angeht, war es in Analogie zum Aufbau des Squalens naheliegend anzunehmen, daß dabei die Pyrophosphorsäureester des entsprechenden Polyisoprenalkohols als aktive Reaktionsform der einzuführenden Seitenkette beteiligt sein würden. Ein entsprechendes Schema war auch bereits von LYNEN [4] diskutiert worden. Mit Hilfe von hoch markiertem Methylnaphthochinon und Leberhomogenat bzw. Fraktionen davon, konnte die Richtigkeit dieses hypothetischen Schemas bewiesen werden. Im Verlauf der Arbeit, in welcher unter anderem die Spezifität des beteiligten Enzymsystems untersucht werden mußte, konnte dann der wichtige Befund erhoben werden, daß auch die Ubichinone nach dem gleichen Schema wie das Vitamin K_2 aus dem 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon („U_0") und Polyisoprenalkoholpyrophosphaten enzymatisch in vitro aufgebaut werden können. (Vorläufige Mitt. in [5].)

Experimenteller Teil

1. Synthese der Ausgangsverbindungen β,β-Dimethylallylalkohol wurde durch Lithiumaluminiumhydrid-Reduktion des β,β-Dimethylacrylsäure-äthylesters erhalten:

15 g β,β-Dimethylacrylsäure wurden mit alkoholischer Salzsäure verestert: KP des Äthylesters: 154—155°, $n^{20} = 1{,}6735$, Ausbeute 17 g.

IR: 1725, 1665, 1385, 1235 und 1150 cm^{-1}.

* Herrn Professor RICHARD KUHN zum 60. Geburtstag gewidmet.

15 g (0,117 Mol) β,β-Dimethylacrylsäureester wurden in 30 ml abs. ET_2O gelöst und zu 100 ml einer ätherischen Lösung von $LiAlH_4$ langsam zugetropft. Es wurde noch 15 min am Rückfluß gekocht, überschüssiges $LiAlH_4$ mit Essigester zersetzt und 25 ml 2 n HCl zugefügt. Die ätherische Lösung sowie die ätherischen Auszüge der mit Natriumsulfat gesättigten wäßrigen Phase wurden mit wenig 2 n Na_2CO_3-Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet. Frakt. Destillation des Rückstandes gab 10 g (0,116 Mol) β,β-Dimethylallylalkohol. KP 62°/22 mm, $n^{20} = 1{,}4375$.

IR: 3400—3300, 1680, 1235, 1150 und 1000 cm^{-1}.

Phenylurethan: mp. 63—64°, Stäbchen.

Farnesol wurde über das Acetat und den Phthalsäurehalbester gereinigt. KP 110 bis 113°/0,2 mm, $n^{20} = 1{,}4875$.

Geranyl-geraniol wurde nach Ruzicka u. Firmenich [8] vom Nerolidol ausgehend über die Stufen Farnesylbromid, Geranyldehydrolinalool, Geranyl-linalool, Geranyl-geranylbromid, Geranyl-geranyl-acetat und Geranyl-geranyl-phthalsäurehalbester synthetisiert. KP 154—158°/0,1—0,15 mm, $n^{20} = 1{,}4965$.

Phosphat- und Pyrophosphatester von β,β-Dimethylallylalkohol, Geraniol, Farnesol, Geranyl-geraniol und Solanesol (Farnesyl-farnesyl-farnesol).

Die Darstellung der Phosphat- und Pyrophosphatester erfolgte in Anlehnung an die Methoden von F. Cramer u. Böhm [2]. 0,2 Mol Triäthylamin (wasserfrei) und 0,1 Mol krist. Phosphorsäure wurden im Minimum trockenen Acetonitrils unter Zugabe von 2—3 Tropfen Wasser gelöst und zu einer Lösung von 0,15 Mol Alkohol und 0,3 Mol Trichloracetonitril unter kräftigem Rühren unter Stickstoff langsam zugetropft. Nachdem etwa $^1/_3$ der Ditriäthylammoniumphosphatlösung zugefügt war, wurde auf 50° erhitzt und unter weiterem Zutropfen langsam abkühlen gelassen. Dauer etwa 5 Std. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen, bei 40° ein Teil des Acetonitrils i. V. abgedampft, die Phosphorsäureester nach Zugabe von Äther mit wenig Wasser extrahiert, die wäßrigen Extrakte mit Äther gewaschen und dann auf $^1/_5$ des Volumens i. V. eingeengt. Es wurde mit 0,1 Mol Cyclohexylamin versetzt, und im Eisschrank der Kristallisation überlassen. Wenig Aceton beschleunigte die Kristallisation. Das Cyclohexylammoniumsalz des Monophosphorsäureesters wurde abgesaugt, das Filtrat zur Trockene i. V. bei 40° eingeengt, in wenig Wasser gelöst und mit einer 6 n Lithiumchloridlösung das Pyrophosphat ausgefällt. Dieses wurde mit wenig Aceton-Wasser 1:1 und Aceton gewaschen.

Tabelle 1

R_F-Werte (System n-PrOH:NH_4OH:H_2O 6:3:1) aufsteigend, SS 2043b glatt

Alkohol	Phosphatester	Pyrophosphatester
β,β-Dimethylallylalkohol	0,46	0,41
Geraniol	0,72	0,64
Farnesol	0,78	0,72
Geranyl-geraniol	0,82	0,77

IR.-Spektra: $-\overset{|}{C}=CH-$: 1667 cm^{-1}; Phosphatester: 1180 und 1050 cm^{-1}; Pyrophosphatester: 1250 und 1080 cm^{-1}.

Das 2-Methyl(^{14}C)-1,4-naphthochinon war von Harwell, England, bezogen. Aktivität: 0,1 mC in 12 mg Substanz.

2-Methyl(^{3}H)-1,4-naphthochinon war von M. Billeter synthetisiert und zur Verfügung gestellt worden (vgl. vorstehende Mitteilung).

Tritiummarkiertes 5,6-Dimethoxy-2-methyl-benzochinon: Das Chinon wurde nach ANSLOW, ASHLEY u. RAISTRICK [1] synthetisiert. Rote Nadeln, Fp. 58—59°, λ_{max} 265 mμ, log $E = 4{,}15$.

Diacetat des 5,6-Dimethoxy-2-methyl-dihydro-benzochinons: 214 mg (1,17 mMol) Chinon, 500 mg Zinkstaub, 5 ml Essigsäureanhydrid und 0,5 ml trockenes Pyridin werden 15 min unter Rühren im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Erkalten werden 50 ml Et_2O zugegeben, filtriert und überschüssiges Essigsäureanhydrid mit 2 n HCl zersetzt. Die ätherische Lösung wurde mit 5% $NaHCO_3$ gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und der Rückstand nach Abdampfen des Lösungsmittels in MeOH gelöst und mit Aktivkohle behandelt. Ausbeute: 330 mg (1,15 mMol). Farblose glasige Substanz. λ_{max} 260 mμ log $E = 1{,}2$.

Bromierung des Diacetates des 5,6-Dimethoxy-2-methyl-dihydrobenzochinons: 330 mg (1,15 mMol) Diacetat wurden in 10 ml Tetrachlorkohlenstoff gelöst, 245 mg (1,30 mMol) N-Bromsuccinimid und 5 mg Dibenzoylperoxyd zugefügt und $3^1/_2$ Std unter Rückfluß gekocht. Nach 5stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde vom ausgefallenen Succinimid abdekantiert, das Lösungsmittel abdestilliert, der Rückstand in Äther aufgenommen, mit Wasser mehrmals ausgewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Rückstand: 327 mg (0,92 mMol). Leicht gelblich gefärbtes Öl.

Zur Acetylbestimmung wurde das Bromid mit wasserfreiem Kaliumacetat in Aceton in das Triacetat überführt: 67 mg (0,207 mMol), 0,621 m Äquivalente Essigsäure.

Theoretischer Verbrauch: $\frac{n}{20}$ NaOH 12,4 ml

Gefunden: 12,4 ml = 3 $CH_3C(O^-)O$

275 mg (0,78 mMol) Bromderivat wurden in 5 ml trockenem Dioxan mit 80 mg Palladium-Mohr und 0,12 ml (0,85 mMol) Triäthylamin katalytisch tritiiert. Theoretischer $^3H_2$-Verbrauch: 17,0 ml, gefunden: 17,2 ml.

Der Katalysator wurde über Celite abgesaugt, das Filtrat zur Trockene eingedampft, in MeOH gelöst und mit wenig Aktivkohle behandelt. Nach dem Filtrieren wurde mehrmals mit trockenem Methanol behandelt, um austauschbares Tritium zu entfernen. Ausbeute: 220 mg (0,78 mMol) Diacetat.

190 mg (0,68 mMol) Diacetat wurden in 5 ml trockenem Äther gelöst und eine Lösung von 120 mg $LiAlH_4$ in 20 ml Äther zugetropft. Nach 1 Std Kochen am Rückfluß wurde überschüssiges $LiAlH_4$ mit Essigester zersetzt, mit HCl angesäuert und die wässerige Phase abgetrennt. Die ätherische Lösung wurde mit je 3 ml H_2O dreimal gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und mit 400 mg Silberoxyd 3 Std gerührt. Das Silberoxyd wurde abfiltriert und das rote Filtrat eingedampft. Der Rückstand erstarrte zu kristallinen Nadeln. Ausbeute: 113 g (0,62 mMol), mp. 58°.

Das Chinon wurde bei 55—60° Ölbadtemperatur und 0,1 mm Druck sublimiert. Aktivität: 10000 c/γ min, spezifische Aktivität: 5 μ C/μMol.

Toluchinon-^{3}H wurde nach Überführung in das Diacetat unter den gleichen Bedingungen bromiert und katalytisch tritiiert, wie für 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon beschrieben. Aktivität: 35000 c/γ min. Spezifische Aktivität: 12 μC/μMol.

Trimethylbenzochinon wurde in Anlehnung an die für das 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon gegebene Vorschrift mit Tritium markiert. Aktivität: 7000 c/γ min. Spezifische Aktivität: 3 μC/μMol.

5-Methoxy-2-methylbenzochinon wurde durch Thiele-Acetylierung von Toluchinon, anschließende Verseifung und Methylierung nach WOODWARD et al. [10]

synthetisiert. Reduktive Acetylierung ergab das Diacetat in 95% Ausbeute, mp. 121°. Weiterverarbeitung wie unter 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon beschrieben. Spezifische Aktivität: 5 μC/μMol.

2. Versuche in der Vitamin K_2-Reihe. Bei den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde sowohl ^{14}C-markiertes 2-Methyl-1,4-naphthochinon (10^4 Imp/μg/min) wie ein in der Methylgruppe mit Tritium markiertes Chinon ($7{,}5 \cdot 10^4$ Imp/μg/min) eingesetzt. Das Letztere erwies

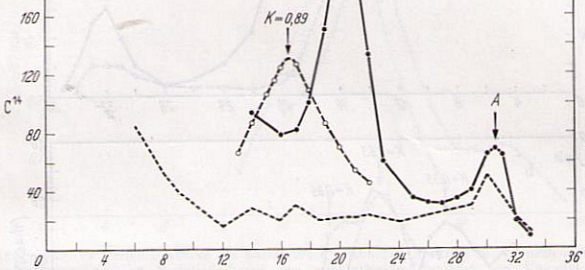


Abb. 1. •——• Verteilungskurve des Lipidextraktes eines Ansatzes mit 2-Methyl-(^{14}C)-1,4-naphthochinon $2{,}5 \times 10^{-4}$ m, Geranyl-geranyl-pyrophosphat 10^{-3} m, Lebermitochondrien eines K-armen Huhnes. Bildung von Vitamin $K_{2\,(20)}$ ($K = 1{,}41$) und Substanz „A"; - - - - - - Kontrollansatz ohne Geranyl-geranyl-pyrophosphat, nur Bildung von Substanz „A"; o- - - -o Verteilungskurve des Di-p-brombenzoates von $K_{2\,(20)}$ aus Ansatz 1

sich, da in dieser Reihe nur relativ geringe Ausbeuten an alkyliertem Chinon erhalten werden, als geeigneter. Die Inkubationsansätze enthielten das Methylnaphthochinon in 10^{-4} molarer, die Pyrophosphatester von Geraniol bzw. Farnesol oder Geranylgeraniol in 10^{-3} molarer, Ascorbinsäure ebenfalls in 10^{-3} molarer Konzentration, dazu 0,1 m Phosphatpuffer p_H 7,4 und $4 \cdot 10^{-3}$ molares $MgCl_2$.

Es sollen hier nicht alle von uns ausgeführten Versuche beschrieben werden, in denen zum Teil mit Vollhomogenat oder mit verschiedenen Homogenatfraktionen gearbeitet worden war. Da die optimalen Bedingungen für die enzymatische Synthese von Verbindungen der K_2-Reihe die gleichen sind wie für die Synthese der Ubichinone, kann hier auf die diesbezüglichen ausführlichen Angaben verwiesen werden, die weiter unten gegeben werden. Das Gleiche gilt bezüglich der Aufarbeitung und Auswertung der Versuche. Die Synthese von Vitaminen der K_2-Reihe läßt sich am besten demonstrieren mit Mitochondrien aus Lebern Vit-

amin K-frei ernährter Hühner (Gerinnungszeit ca. 45—60 min). Die Bildung des Vitamin $K_{2(15)}$ wurde weiterhin mit Lebermitochondrien einer Ratte beobachtet, die durch Unterbindung des Gallenganges Vitamin K-arm gemacht worden war (Dauer 8 Tage). Mit Lebermitochondrien

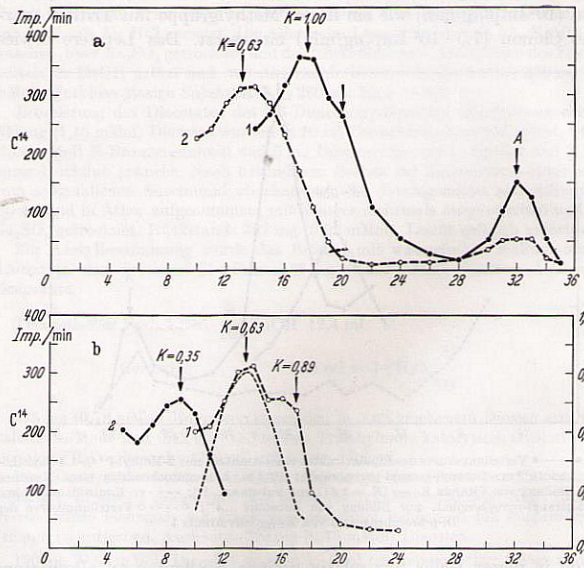


Abb. 2a. Verteilungskurven der Lipidextrakte von zwei Ansätzen mit *1* Farnesylpyrophosphat 10^{-3} m, ●——● *2* Geranylpyrophosphat 10^{-3} m, o - - - - o. Beide Ansätze 2-Methyl-(^{14}C)-1,4-naphthochinon 10^{-4} m und Lebermitochondrien eines K-armen Huhnes. Bildung von Vitamin $K_{2(10)}$ ($K = 0{,}63$), Vitamin $K_{2(15)}$ ($K = 1{,}0$), Vitamin $K_{2(20)}$ (Schulter bei Fraktion 20—21) und Substanz „A"

Abb. 2b. Verteilungskurven der radioaktiven Di-p-brombenzoate gewonnen aus den Maximumsfraktionen von *1* o - - - - o und *2* ●——●. Verteilungskurve von authentischen Di-p-brombenzoat des Vitamin $K_{2(15)}$ - - - - - - . Extinktionsmessung

normaler Ratten gelang der gleiche Versuch nur mit Hilfe des hochmarkierten 2-Methyl (^{3}H)-1,4-naphthochinon, da das Ausmaß der Synthese in diesem Falle so gering ist, daß es sich mit dem weniger „heißen" ^{14}C-markierten Naphthochinon nicht mehr verfolgen ließ. Die Abb. 1 und 2 zeigen repräsentative Beispiele für die Synthese der Vitamine $K_{2(10)}$, $_{(15)}$ und $_{(20)}$.

Bei den hier beschriebenen Versuchen konnte neben der Bildung des dem zugesetzten Polyisoprenalkoholpyrophosphat entsprechenden

K_2-Vitamines stets noch das Auftreten einer weiteren Substanz „A" beobachtet werden, die wesentlich stärker lipophil sein mußte (Verteilungs-Maximum bei Element 31—32 der 35stufigen Verteilung). Die naheliegende Vermutung, daß diese unbekannte Verbindung ein K_2-Vitamin mit einer langen Seitenkette von etwa 50-C-Atomen, wie sie das Ubichinon besitzt, darstellt, konnte leicht bestätigt werden. Hierfür stand allerdings nur ein K_2-Vitamin mit einer um eine Isopreneinheit kürzeren

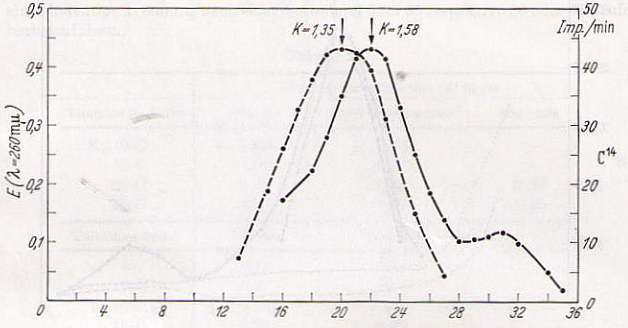


Abb. 3. •——• Verteilungskurve der Substanz „A" (Abb. 2a). Fraktion 30—35 nach reduktiver Acetylierung. •- - - -• Verteilungskurve von authentischem Diacetat von Vitamin $K_{2(45)}$. Extinktionsmessung. Die Verschiebung entspricht einer Differenz von einem Isoprenrest

Seitenkette zur Verfügung ($K_{2(45)}$). Der Vergleich mit dieser authentischen Substanz vor und nach reduktiver Acetylierung zeigt indessen mit genügender Deutlichkeit, daß bei den Inkubationsversuchen das zugesetzte Methylnaphthochinon eine in den Mitochondrien sicherlich für die Synthese des Ubichinons bereitgestellte Seitenkette mit 50 Kohlenstoffatomen „abgefangen" hatte. Die Versuche über den Mechanismus der Einführung von Seitenketten wurden daher auf die Ubichinonreihe ausgedehnt.

3. Synthesen in der Ubichinonreihe. Die Synthese der Ubichinone aus dem 5,6-Dimethoxy-2-methyl-1,4-benzochinon erfolgt mit viel höherer Ausbeute als diejenige der K_2-Vitamine aus dem Methylnaphthochinon (ca. 25—30% der eingesetzten Radioaktivität d. h. des Chinonkernes finden sich im Alkylierungsprodukt). Da beide Prozesse offenbar ganz analog verlaufen, möglicherweise mit dem gleichen Enzymsystem, wurden eingehendere Untersuchungen über den Verlauf desselben, die optimalen Bedingungen etc. nur in der Ubichinonreihe durchgeführt.

Wir beschreiben zunächst einen Versuch, der zeigen sollte, in welcher Zellfraktion sich das die Reaktion ausführende Enzymsystem befindet.

Zwei Rattenlebern (Wistar-Ratten) wurden in neun Volumen 0,25 n Saccharoselösung 2 min im Potter-Elvehjem homogenisiert, über das gleiche Volumen 0,34 molare Saccharoselösung geschichtet und bei 700 · g (10 min) Zellkerne und Detritus abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 7000 · g 10 min zentrifugiert und die sedimentierten Mitochondrien zweimal mit 0,25 m Saccharoselösung gewaschen. Der

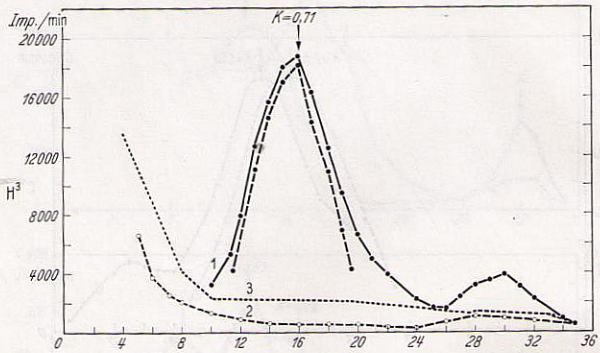


Abb. 4. Verteilungskurven von drei Ansätzen, jeder enthielt 5,6-Dimethoxy-2-methyl(³H)-1,4-benzochinon 10^{-4} m und Farnesylpyrophosphat 10^{-3} m. Ansatz *1* mit Rattenlebermitochondrien ●——●; *2* mit Mikrosomen o- - - -o; *3* mit dem Überstand ------ Verteilungskurve von authentischem Ubichinon [3] ●- - - -●

Überstand hiervon wurde bei 30000 · g 45 min lang zentrifugiert, und die abgetrennten Mikrosomen zweimal mit je 5 ml 0,25 n Saccharose gewaschen.

Die Partikel-Fraktionen (Mitochondrien und Mikrosomen) wurden in 0,1 m Kaliumphosphatpuffer p_H 7,4 suspendiert. Der Proteingehalt der Mitochondrienfraktion war 34 mg/ml, der Mikrosomenfraktion 20 mg/ml.

Jeder Ansatz enthielt 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon in 10^{-4} molarer, Farnesylpyrophosphat (Lithiumsalz) in 10^{-3} molarer, Ascorbinsäure in 10^{-3} molarer und Magnesiumchlorid in $4 \cdot 10^{-3}$ molarer Konzentration. Inkubationsdauer bei 37° 2 Std. Das Inkubat wurde dann lyophilisiert, mit Methanol-Chloroform (1 : 2) bei Zimmertemperatur durch Homogenisieren mit einem Ultra Turrax zweimal extrahiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Trockene bei 30—40° im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen, die ätherische Lösung konzentriert, Phosphatide mit Aceton ausgefällt und der Überstand erneut eingedampft. Der in Petroläther lösliche Teil wurde dann im System n-Heptan-Methylglykol der Gegenstromverteilung unterworfen. Abb. 4 zeigt das Verteilungsdiagramm der aus den drei Zellfraktionen extrahierten radioaktiven Substanzen. Als Vergleichssubstanz

wurde inaktives Ubichinon 15-C (5,6-Dimethoxy-2-methyl-3-farnesylbenzochinon) mitverteilt, um die Lage von Radioaktivitäts- und Extinktionsmaximum vergleichen zu können.

4. Identifizierung der Reaktionsprodukte (Ubichinone und K-Vitamine). Die Gegenstromverteilung nach CRAIG im System n-Heptan/Methylglykol bot sich für die vorliegenden Untersuchungen sowohl für die Reinigung als auch Identifizierung der Reaktionsprodukte wiederum als Methode der Wahl an. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, sind die Unterschiede der Verteilungskoeffizienten der sich durch eine Isopreneinheit unterscheidenden K_2-Verbindungen und Ubichinone hinreichend groß, um eine eindeutige Trennung nach einer Verteilung über 35 respektive 50 oder 60 Stufen herbeizuführen.

Tabelle 2

	Verteilungskoeffizienten (K) in der		
Vitamine K_2-Reihe	Chinone	Bis-p-Brombenzoate	Diacetate
K_2-10-C	0,63	0,35	—
15-C	1,00	0,63	—
20-C	1,41	0,89	0,37
45-C	4,85	—	1,35
Ubichinon-Reihe	**Chinone**	**Diacetate**	
—	0,17	—	
5-C	0,37	—	
10-C	0,52	—	
15-C	0,71	0,43	
20-C	0,90	0,56	
Phytyl	1,59	—	
30-C	1,59	—	
45-C	4,30	1,80	
50-C	7,85	2,33	

In der Verteilung blieben nicht umgesetztes Chinon sowie noch nicht identifizierte stark hydrophile Derivate (Glucuronide, Sulfate, Phosphate?) wegen der kleinen K-Werte fast stationär, während die durch die Einführung der Seitenkette lipophil werdenden Reaktionsprodukte weiter wanderten. Mit den radioaktiven Substanzen wurden gleichzeitig 5—10 mg des inaktiven authentischen Vitamines oder Ubichinons verteilt, das als Reaktionsprodukt erwartet wurde. Dadurch wurde neben dem Maximum der Radioaktivität ein solches der Extinktion erhalten, dessen K-Werte identisch sein mußten. Zunächst wurden die Phasenlösungsmittel jedes Elementes abgedampft, die Extinktion bei der für die Chinone charakteristischen Wellenlänge in Isooctan gemessen, das Isooctan wiederum abgedampft und dann nach Zugabe der Scintillationslösung [0,03% Diphenyloxazol (PPO) in Toluol] die Aktivität im Tricarb-Liquid-Scintillation Counter gemessen. Zur Überführung in geeignete Derivate wie der Bis-p-Brombenzoate oder Diacetate wurden die Fraktionen unter den Maxima vereinigt, eingedampft und der Scintillator durch Chromatographie an Alox Aktivitätsstufe III (6—7% Wasser) mit Petroläther und Petroläther-Äther (5%) abgetrennt. Die Aktivität erschien im Eluat zusammen mit der als scharfe Bande wandernden Testsubstanz. Dieser Reinigungsschritt versagte im Falle der K_2-45-C oder 50-C und Ubichinone 45 und 50-C. Jedoch stellte sich heraus, daß das PPO bei der reduktiven Acetylierung (mit Zinkstaub-Essigsäureanhydrid-

Pyridin) oder reduktiven Benzoylierung (mit Natriumdithionit und p-Brombenzoylchlorid unter Schotten-Baumann-Bedingungen) nicht störte. Die Derivate wurden erneut nach dem Gegenstromverfahren verteilt und Extinktion und Radioaktivität wie beschrieben bestimmt. Die Verteilungskoeffizienten der Derivate sind in Tab. 2 eingefügt.

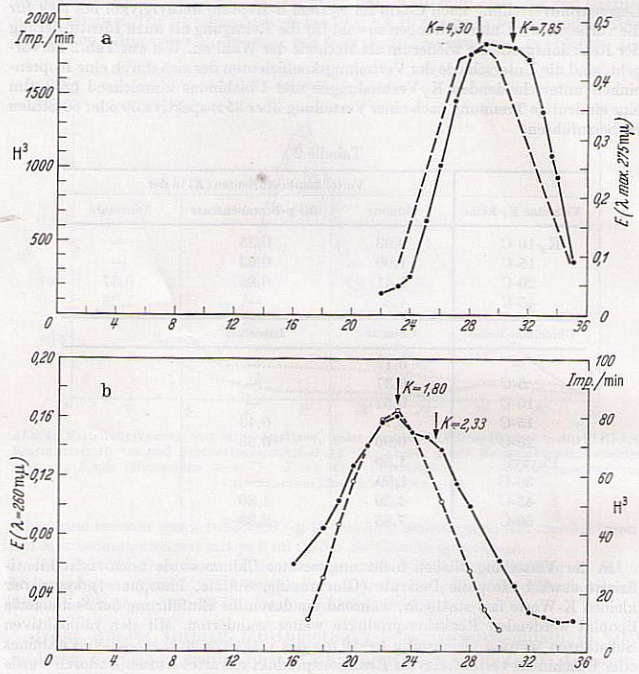


Abb. 5a. Analoger Ansatz wie in Abb. 6a nur mit Solanesylpyrophosphat an Stelle von Farnesylpyrophosphat. •——• Radioaktive Verteilungskurve. Bildung von Ubichinon [45] (K = 4,30) und Ubichinon [50] (K = 7,85). ——— Verteilungskurve von authentischem Ubichinon [45]

Abb. 5b. •——• Verteilungskurve der Diacetate aus Fraktion 24–35, o——o Verteilungskurve von authentischem Diacetat des Ubichinon [45]. Extinktionsmessung

Wie die repräsentativen Beispiele in den Abb. 4, 5 und 6 zeigen, treten alle untersuchten Pyrophosphatester unter Einwirkung des Mitochondrienenzymes mit dem „Ubichinon (0)" in Reaktion. Bei Anwendung von Farnesyl-pyrophosphat ist neben der Bildung des Ubichinon [15] mit der Farnesylseitenkette das Auftreten von etwas Ubichinon [20] bemerkenswert. Offenbar findet hier wie in den analogen Versuchen in der

Vitamin K_2-Reihe eine Kettenverlängerung des Farnesols statt. Entsprechendes scheint auch beim Einsatz von Solanesylpyrophosphat der Fall zu sein, nämlich Bildung von etwas Ubichinon [50] neben Ubichinon [45].

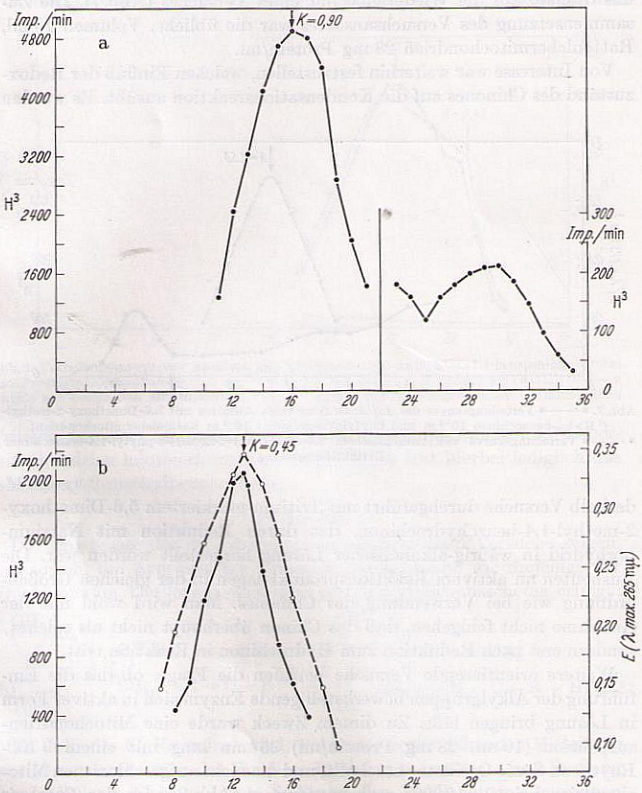


Abb. 6a. •——• Verteilungskurve des Lipidextraktes eines Ansatzes mit 5,6-Dimethoxy-2-methyl(^{3}H)-1,4-benzochinon 10^{-4} m, Geranyl-geranyl-pyrophosphat 10^{-3} m, Rattenlebermitochondrien. Bildung von Ubichinon [20] und Ubichinon [45 u. 50] (rechte Teilkurve)

Abb. 6b. •——• Verteilungskurve des radioaktiven Diacetates aus Fraktion 10–20 der Verteilung von Abb. 6a. o——o Verteilungskurve von authentischem Diacetat des Ubichinon [20]. Extinktionsmessung

Es war von besonderem Interesse zu sehen, ob eine analoge Kondensationsreaktion auch mit Phytylpyrophosphat abläuft. Entsprechende

Versuche wurden sowohl mit Methylnaphthochinon wie mit Dimethoxymethylbenzochinon als Alkylacceptoren durchgeführt. Das Resultat war in beiden Fällen das gleiche: Es trat keine Reaktion ein. Wir beschränken uns deshalb auf die Wiedergabe nur eines Versuches (Abb. 7). Die Zusammensetzung des Versuchsansatzes war die übliche, Volumen 10 ml, Rattenlebermitochondrien 28 mg Protein/ml.

Von Interesse war weiterhin festzustellen, welchen Einfluß der Redoxzustand des Chinones auf die Kondensationsreaktion ausübt. Es wurden

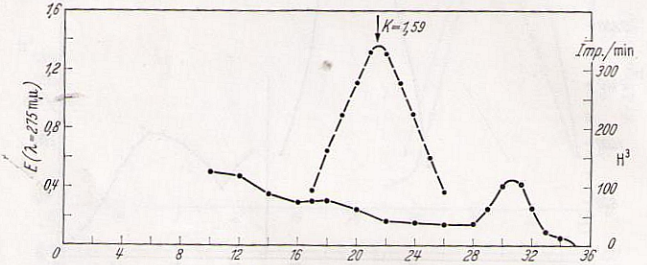


Abb. 7. •——• Verteilungskurve des Lipidextraktes eines Ansatzes mit 5,6-Dimethoxy-2-methyl-(^{3}H)-1,4-benzochinon 10^{-4} m und Phytylpyrophosphat 10^{-3} m Rattenlebermitochondrien; •——• Verteilungskurve von authentischem 5,6-Dimethoxy-2-methyl-3-phytyl-1,4-benzochinon Extinktionsmessung

deshalb Versuche durchgeführt mit Tritium-markiertem 5,6-Dimethoxy-2-methyl-1,4-benzohydrochinon, das durch Reduktion mit Natriumborhydrid in wäßrig-alkoholischer Lösung hergestellt worden war. Die Ausbeuten an aktivem Reaktionsprodukt lagen in der gleichen Größenordnung wie bei Verwendung des Chinones. Man wird wohl mit der Annahme nicht fehlgehen, daß das Chinon überhaupt nicht als solches, sondern erst nach Reduktion zum Hydrochinon in Reaktion tritt.

Weitere orientierende Versuche betrafen die Frage, ob das die Einführung der Alkylgruppen bewerkstelligende Enzym sich in aktiver Form in Lösung bringen läßt. Zu diesem Zweck wurde eine Mitochondriensuspension (10 ml, 28 mg Protein/ml) 35 min lang mit einem 9 KC-Raytheon Sonic Oscillator beschallt, und die nicht aufgeschlossenen Mitochondrien bei 10—12000 · g abzentrifugiert. Abb. 8 zeigt das Ergebnis von Parallelansätzen mit intakten und aufgeschlossenen Mitochondrien (Konzentration der Reaktionspartner wie üblich). Die Menge des erhaltenen, aktiven Reaktionsproduktes ist in beiden Fällen gleich.

Stellt man aus Lebermitochondrien dagegen ein Acetontrockenpräparat her, so geht die enzymatische Aktivität durch diese Behandlung vollständig verloren (Abb. 8).

Als einen Beitrag zur Frage der Substratspezifität des alkylierenden Enzymes in bezug auf den Chinonpartner möchten wir noch orientierende Versuche erwähnen, in welchen Toluchinon, Trimethylbenzochinon und 5-Methoxy-2-methyl-1,4-benzochinon, alle in einer Methylgruppe mit

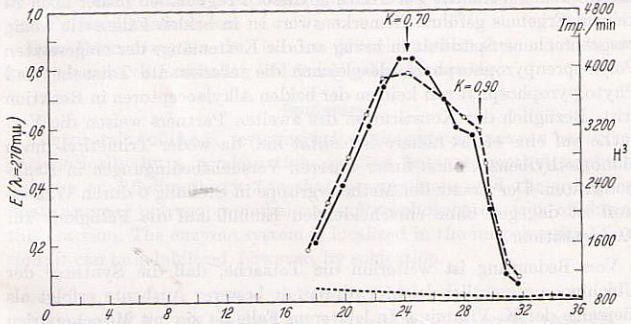
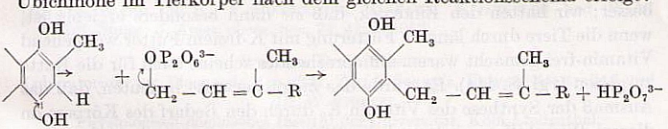


Abb. 8. Verteilungskurven von Ansätzen mit 5,6-Dimethoxy-2-methyl(^{3}H)-1,4-benzochinon 10^{-4} m und Farnesylpyrophosphat 10^{-3} m. •——• Ansatz mit intakten Mitochondrien (Ratte); o — — o Ansatz mit beschallten Mitochondrien; ------ Ansatz mit Aceton-getrockneten Mitochondrien

Tritium markiert, zusammen mit Farnesyl-pyrophosphat und Lebermitochondrien inkubiert wurden. In Reaktion trat hierbei lediglich das 5-Methoxy-2-methylbenzochinon.

Diskussion

Die Ergebnisse der im Vorstehenden beschriebenen Versuche zeigen, daß sowohl die Synthese der Vitamine der K_2-Reihe wie diejenige der Ubichinone im Tierkörper nach dem gleichen Reaktionsschema erfolgt:



Im Falle des K_2-Vitamines wird, wie in der vorhergehenden Mitteilung gezeigt werden konnte, das für diese Reaktionen benötigte in 3-Stellung unsubstituierte Chinon durch Spaltung des Phyllochinons gewonnen sofern es nicht als Produkt chemischer Synthese dem Körper angeboten wird. Im Falle der Ubichinone ist der Tierkörper bekanntlich in der Lage, das in 3-Stellung unsubstituierte 5,6-Dimethoxy-2-methyl-1,4-benzochinon („Ubichinon 0") selbst zu synthetisieren; die Ubichinone sind daher keine Vitamine. Davon abgesehen weist die Gleichheit im Mechanismus des weiteren Aufbaus beider Stoffklassen auf eine nahe

Verwandtschaft derselben hin. Die Frage allerdings, ob das Enzym oder Enzymsystem, welches die Einführung der Seitenketten unter Abspaltung von Pyrophosphat katalysiert, in beiden Fällen dasselbe ist oder ob zwei verschiedene Enzyme existieren, muß vorläufig noch offen bleiben. Orientierende Versuche zur Klärung dieser Frage haben bisher noch zu keinem Ergebnis geführt. Bemerkenswert ist in beiden Fällen die wenig ausgesprochene Spezifität in bezug auf die Kettenlänge der eingesetzten Polyisoprenpyrophosphate, desgleichen die interessante Tatsache, daß Phytolpyrophosphat mit keinem der beiden Alkylacceptoren in Reaktion tritt. Bezüglich der Konstitution des zweiten Partners weisen die Versuche auf eine etwas höhere Spezifität hin, da weder Trimethyl- noch Monomethylbenzochinon unter unseren Versuchsbedingungen in Reaktion traten. Der Ersatz der Methoxygruppe in Stellung 6 durch Wasserstoff ist dagegen ohne entscheidenden Einfluß auf die Fähigkeit zur Kondensation.

Von Bedeutung ist weiterhin die Tatsache, daß die Synthese der Ubichinone wesentlich leichter, d. h. mit besserer Ausbeute erfolgt als diejenige der K_2-Vitamine. In letzterem Falle ist sie mit Mitochondrien von normalen Ratten nur schwierig nachzuweisen. Das könnte möglicherweise bedeuten, daß die Alkylierungsreaktion bei diesen Tieren überhaupt keine große Rolle spielt. Vielleicht wird der Vitamin K-Bedarf bei der Ratte und dann wohl auch bei anderen Säugetieren im wesentlichen durch die von den Intestinalbakterien synthetisierten K_2-Vitamine gedeckt. Man würde dann zur Annahme geführt, daß diese unverändert, d. h. ohne Abspaltung und Austausch der Seitenkette vom Körper eingebaut werden, was (vgl. die vorhergehende Mitteilung) im Falle des Phyllochinons ja nicht der Fall ist. Wie zu erwarten, verläuft die Synthese der K-Vitamine mit Mitochondrien aus Hühnerlebern wesentlich besser; wir hatten den Eindruck, daß sie dann besonders ergiebig ist, wenn die Tiere durch längere Fütterung mit K-freiem Futter weitgehend Vitamin-frei gemacht waren. Entsprechendes scheint auch für die Ratte zu gelten (vgl. S. 444). Es würde das möglicherweise bedeuten, daß das Ausmaß der Synthese des Vitamin K_2 durch den Bedarf des Körpers an diesem Wirkstoff geregelt und die Bildung dann gestoppt würde, wenn alle in den Mitochondrien dafür zweifellos vorgesehenen Bindungsorte besetzt sind. Daß die Bildung der Ubichinone demgegenüber wesentlich ergiebiger verläuft, erscheint nicht überraschend, da die Konzentration desselben in der Zelle ein Vielfaches von der des Vitamin K_2 beträgt [3].

Dem Schweizerischen Nationalfonds danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Für die Gewährung eines Stipendiums an den einen von uns (W. Stoffel) sprechen wir der deutschen Forschungsgemeinschaft unseren besten Dank aus.

Zusammenfassung

Die Vitamine der K_2-Reihe und die Ubichinone können enzymatisch gebildet werden durch eine unter Abspaltung von Pyrophosphat verlaufende Kondensationsreaktion zwischen Methylnaphthochinon bzw. 5,6-Dimethoxy-2-methylbenzochinon und den Pyrophosphorsäureestern von Polyisoprenalkoholen.

Das Fermentsystem ist in der Mitochondrienfraktion lokalisiert, kann aber durch Beschallen in Lösung gebracht werden.

Summary

The vitamins of the K_2 series as well as the ubiquinones can be formed enzymatically by a condensation reaction between methyl naphthoquinone or 5,6-dimethoxy 2-methyl benzoquinone and the pyrophosphate esters of poly isoprenoid alcohols. Pyrophosphate is split off during this reaction. The enzyme system is localized in the mitochondrial fraction; it can be solubilized, however, by sonication.

Literatur

[1] Anslow, W. L., J. N. Ashley and H. Raistrick: J. chem. Soc. **1938**, 499.
[2] Cramer, F. C., u. W. Böhm: Angew. Chem. **71**, 775 (1959).
[3] Lester, R. L., and F. L. Crane: J. biol. Chem. **234**, 2169 (1959).
[4] Lynen, F., u. Mitarb.: Angew. Chem. **71**, 657 (1959).
[5] Martius, C.: in Ciba Symposium on „Quinones in electron transport", 1960. Churchill Ltd., im Druck.
[6] Martius, C., u. H. O. Esser: Biochem. Z. **331**, 1 (1958).
[7] Literaturzusammenfassung: Popjak, G.: „Biosynthesis of cholesterol and related substances" in Ann. Review of Biochemistry 1958, S. 533. Annual Review Inc., Palo Alto, California, USA.
[8] Ruzicka, L., u. G. Firmenich: Helv. chim. Acta **22**, 392 (1939).
[9] Scherrer, K., u. C. Martius: Unveröffentlichte Versuche. Dissertationsarbeit K. Scherrer, Zürich.
[10] Woodward, R. B., F. Sondheimer, D. Taub, K. Heusler and W. M. McLamore: J. Amer. chem. Soc. **74**, 4223 (1952).

Professor Dr. C. Martius,
Laboratorium für Biochemie der ETH, Zürich/Schweiz, Universitätsstraße 6 und
Dr. W. Stoffel,
Physiologisch-chemisches Institut der Universität, Köln-Lindenthal,
Joseph Stelzmann-Straße 52