

SUMMARY

It has been shown that synthetic (-)-3-hydroxy-N-methyl-morphinane (I) possesses the same steric configuration at the C-atoms 9, 13 and 14 as the natural morphine alkaloids, since it can be degraded to the known (-)-*cis*-[2-methyl-carboxy-cyclohexyl-(1)]-acetic-acid.

Organisch-chemisches Institut der ETH, Zürich, und
Chemische Forschungsabteilung der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

19. Die Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch die Vitamine K₁ und K₂ und deren Isoprenologen

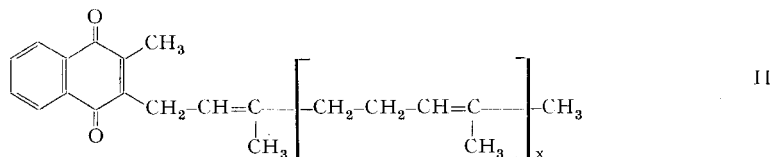
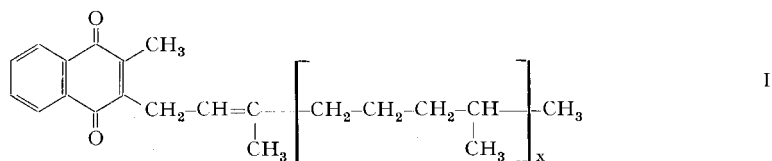
von F. Weber und O. Wiss

Herrn Prof. Dr. W. KUHN zum 60. Geburtstag gewidmet

(13. XI. 58)

In einer früheren Mitteilung wurde über die Reaktivierung der mit Isooctan inaktivierten Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch die Vitamine K₁ und K₂ berichtet¹⁾. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu früheren Auffassungen nicht das Redoxsystem des Vitamins K, sondern die isoprenoide Seitenkette für diesen Effekt verantwortlich ist. Die Ergebnisse machten es wahrscheinlich, dass in dieser Versuchsanordnung eine Teilfunktion des Vitamins K, d. h. die durch die Seitenkette bedingte Haftung an die Mitochondrienstruktur zum Ausdruck kommt.

Das Vorliegen einer grösseren Anzahl Isoprenologer der Vitamine K₁ (I, x = 3) und K₂ (II, x = 6)²⁾ und die Kenntnis deren biologischer Aktivität⁴⁾ liessen es interessant erscheinen, auch die reaktivierende Wirkung der Isoprenologen auf die inaktivierte Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase vergleichend zu prüfen, um so weitere Aufschlüsse über die Bedeutung dieses Phänomens zu erhalten.



1) F. WEBER, U. GLOOR & O. WISS, *Helv.* **41**, 1038 (1958).

2) O. ISLER, R. RÜEGG, A. STUDER & R. JÜRGENS, *Z. physiol. Chem.* **295**, 290 (1953).

3) O. ISLER, R. RÜEGG, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, A. WINTERSTEIN & O. WISS, *Helv.* **41**, 786 (1958).

4) O. WISS, F. WEBER, R. RÜEGG & O. ISLER, *Z. physiol. Chem.*, im Druck.

Am Beispiel des Vitamins K_1 wird gezeigt, dass die Reaktivierung der mit Isooctan inaktivierten Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase konzentrationsabhängig ist (Fig. 1). Somit ist die Voraussetzung für eine vergleichende Prüfung der Vitamine K_1 und K_2 und deren Isoprenologen erfüllt. Die Prüfung erfolgte in je zwei Konzentrationen im konzentrationsabhängigen Bereich (0,16 und 0,32 $\mu\text{Mol/ml}$ Enzymansatz).

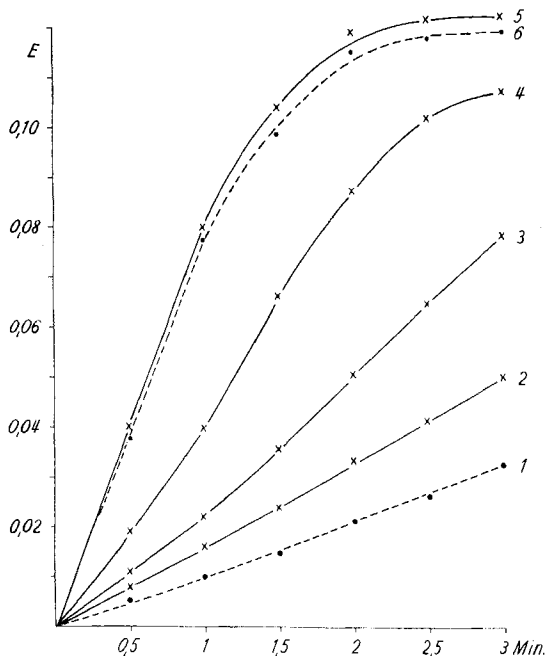


Fig. 1. Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch Vitamin K_1 in verschiedenen Konzentrationen

1. Aktivitätskurve des inaktivierten Enzyms
2. Zusatz von 0,08 μMol Vitamin K_1/ml Enzymansatz
3. Zusatz von 0,16 μMol Vitamin K_1/ml
4. Zusatz von 0,32 μMol Vitamin K_1/ml
5. Zusatz von 0,48 μMol Vitamin K_1/ml
6. Aktivitätskurve des intakten Enzyms

Von der Vitamin- K_1 -Reihe konnten sechs Vertreter mit 5 (I , $x = 0$), 10 ($x = 1$), 15 ($x = 2$), 20 ($x = 3$), 25 ($x = 4$) und 30 ($x = 5$) Kohlenstoffatomen in der Seitenkette geprüft werden. Ihre reaktivierende Wirkung auf die mit Isooctan inaktivierte Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase ist in Fig. 2 dargestellt. Es ergibt sich bei äquimolarer Konzentration der Vitamin- K_1 -Analoge eine deutliche Abhängigkeit der reaktivierenden Wirkung von der Länge der Seitenkette. Das Analoge mit einer Seitenkette von 25 Kohlenstoffatomen (Kurve 6 in Fig. 2) ist am aktivsten. Während das Analoge mit 30 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette nur wenig in der Wirksamkeit abfällt, hat eine Verkürzung der Seitenkette auf 20, 15 und 10 Kohlenstoffatome eine starke Aktivitätsabnahme zur Folge. 2-Methyl-3-dimethylallyl-1,4-naphthochinon (5 Kohlenstoffatome in der Seitenkette) hemmt sogar die Enzymwirkung (Kurve 2).

Vergleicht man die Wirkung von Vitamin K_1 und seinen Analogen auf die Blutgerinnung im Vitamin-K-Mangelkücken⁴⁾, geprüft nach der Methode von DAM⁵⁾, mit deren reaktivierenden Wirkung auf die Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase, so zeigt sich eine gewisse Übereinstimmung (Fig. 3). Auch im Kückentest steigt die

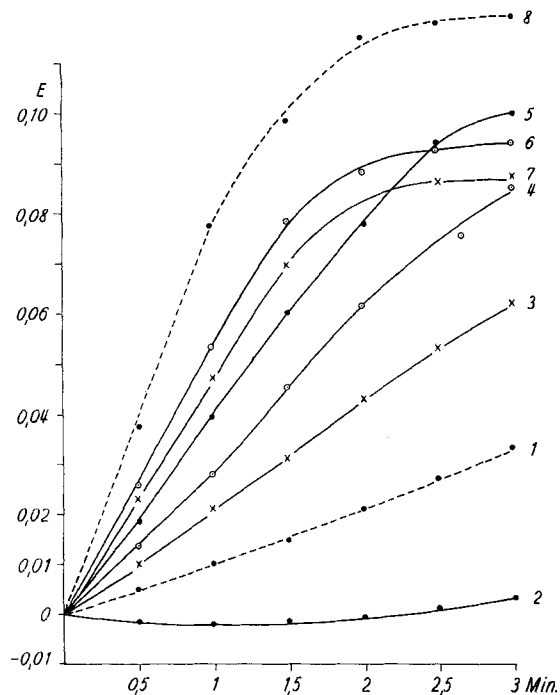


Fig. 2. Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch Vitamin K_1 und dessen Analogen

- | | |
|---|--|
| 1. Aktivitätskurve des inaktivierten Enzyms | 5. Phytyl (C_{20}) |
| 2. Dimethylallyl (C_5)* | 6. Octahydro-farnesylgeranyl (C_{25}) |
| 3. Dihydro-geranyl (C_{10}) | 7. Decahydro-farnesylfarnesyl (C_{30}) |
| 4. Tetrahydro-farnesyl (C_{15}) | 8. Aktivitätskurve des intakten Enzyms |

* Zur Bezeichnung der geprüften Vitamin- K_1 -Analogen (Kurven 2–7) ist jeweils nur die Seitenkette (mit Anzahl der C-Atome) in 3-Stellung des 2-Methyl-1,4-naphtochinons erwähnt. Alle Analogen wurden zum inaktivierten Enzym in einer Endkonzentration von je $0,32 \mu\text{Mol/ml}$ Enzymansatz zugesetzt.

Aktivität der Vitamin- K_1 -Analogen mit zunehmender Länge der Seitenkette an und nimmt bei längeren Seitenketten leicht ab. Das Wirkungsoptimum liegt hier jedoch beim natürlichen Vitamin K_1 . Das Analoge mit 5 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette ist im Vitamin-K-Mangelkücken unwirksam.

Von der Vitamin- K_2 -Reihe wurden insgesamt sechs Isoprenoide mit 10 bis 35 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (II, $x = 1-6$) geprüft. Wie in der Vitamin- K_1 -Reihe ist auch in der Vitamin- K_2 -Reihe das Isoprenoid mit einer Seitenkette von 25 Kohlenstoffatomen am wirksamsten (Fig. 4, Kurve 5). Eine Verkürzung der

⁵⁾ H. DAM, I. KRUSE & E. SØNDERGAARD, Acta physiol. scand. **22**, 238 (1951).

Seitenkette bedingt wiederum eine starke Abnahme der reaktivierenden Wirkung auf das inaktivierte Enzymsystem. Vertreter mit längeren Seitenketten weisen einen leichten Abfall in der Wirksamkeit auf. Alle Isoprenologen wurden in äquimolarer Konzentration zu Vitamin K₁ als Standard eingesetzt.

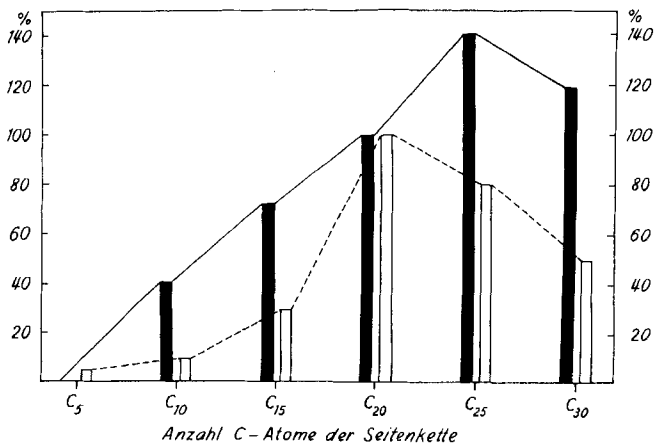


Fig. 3. Vergleich der Wirksamkeit der Vitamin-K₁-Reihe im in-vitro- und in-vivo-Versuch. Schwarze Säulen: Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase. Weisse Säulen: Biologische Aktivität im Vitamin-K-Mangelkücken⁴⁾. In beiden Testen wurde Vitamin K₁ als Standard (= 100% Aktivität) verwendet. Die Berechnung der prozentualen Wirkung im Enzymtest ist im experimentellen Teil beschrieben.

Aus Fig. 5 ist ersichtlich, dass in der Vitamin-K₂-Reihe zwischen Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase und Wirksamkeit im Vitamin-K-Mangelkücken⁴⁾ eine gute Übereinstimmung besteht. Bei beiden Auswertungen liegt das Maximum der Aktivität beim Vertreter mit einer Seitenkette von 25 Kohlenstoffatomen.

Beim Vitamin K₂ und seinen Isoprenologen sind wegen der Doppelbindungen in der Seitenkette verschiedene geometrische Isomeren möglich. In einer früheren Untersuchung⁴⁾ konnten wir feststellen, dass *cis*-Konfiguration einer ringnahen Doppelbindung in der Seitenkette die biologische Aktivität im Kückentest signifikant herabsetzt, während eine vom Naphtochinon-Kern entfernt liegende *cis*-Doppelbindung die Wirksamkeit nicht beeinflusst. Von besonderem Interesse erschien deshalb der Vergleich der reaktivierenden Wirkung stereoisomerer Verbindungen auf die inaktivierte Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase.

Geprüft wurden vom Vitamin-K₂-Isoprenologen mit 20 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette neben der *all-trans*-, die 6',7'-mono-*cis*- und die 10',11'-mono-*cis*-Form. Beim Vitamin K₂ mit einer Seitenkette von 30 Kohlenstoffatomen standen die *all-trans*-, die 6',7'-mono-*cis*- und die 18',19'-mono-*cis*-Verbindungen zur Verfügung. Bei beiden Isoprenologen besitzt die 6',7'-mono-*cis*-Form eine deutlich geringere Wirkung in der Reaktivierung des Enzymsystems (Fig. 6 und 7, Kurve 3).

Der Vergleich zwischen Wirkung auf die Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase und Aktivität im Kückentest⁴⁾ zeigt eine gute Parallelität. Das ist sowohl bei den

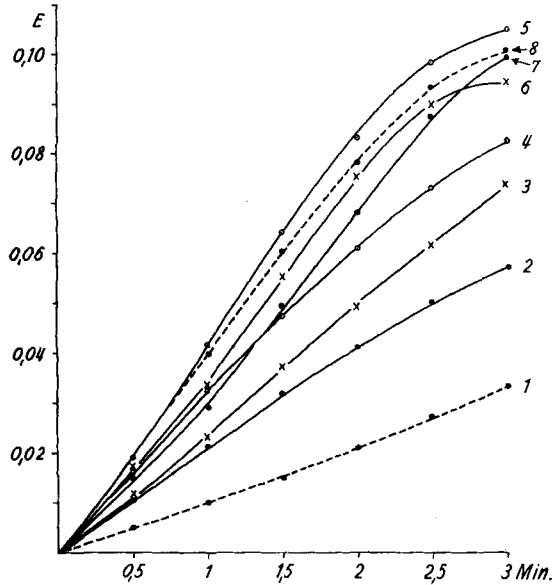


Fig. 4. Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch Vitamin K_2 und dessen Isoprenologen

- | | |
|---|--|
| 1. Aktivitätskurve des inaktivierten Enzyms | 5. Farnesylgeranyl (C_{25}) |
| 2. Geranyl (C_{10}) * | 6. Farnesylfarnesyl (C_{30}) |
| 3. Farnesyl (C_{15}) | 7. Farnesylgeranylgeranyl (C_{35}) |
| 4. Geranylgeranyl (C_{20}) | 8. Reaktivierung durch Vitamin K_1 |

* Zur Bezeichnung der geprüften Vitamin- K_2 -Isoprenologen (Kurven 2-7) ist jeweils nur die Seitenkette (mit Anzahl der C-Atome) in 3-Stellung des 2-Methyl-1,4-naphtochinons erwähnt. Alle Isoprenologen wurden zum inaktivierten Enzym in einer Endkonzentration von $0,32 \mu\text{Mol/ml}$ Enzymansatz zugegeben.

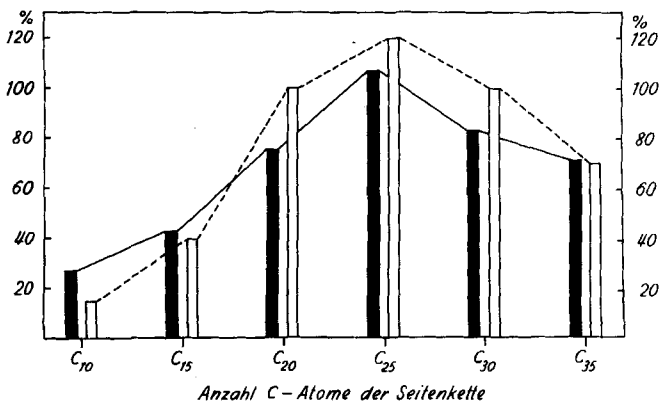


Fig. 5. Vergleich der Wirksamkeit der Vitamin- K_2 -Reihe im in-vitro- und in-vivo-Versuch. Schwarze Säulen: Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase. Weisse Säulen: Biologische Aktivität im Kückentest⁴). In beiden Testen diente Vitamin K_1 als Standard (= 100% Aktivität).

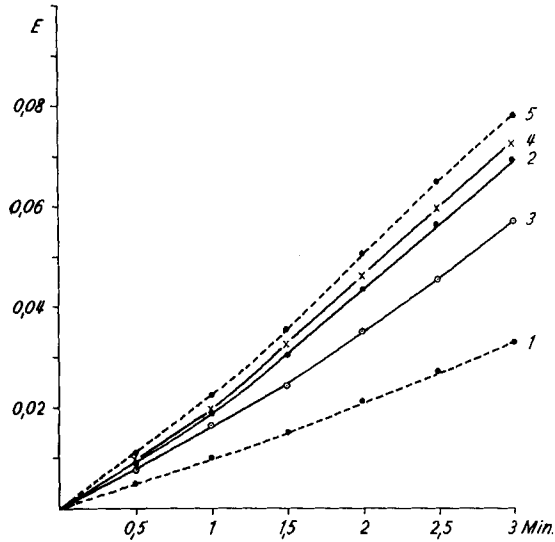


Fig. 6. Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch geometrische Isomere des Vitamin- K_2 -Isoprenologen mit 20 C-Atomen in der Seitenkette

- | | |
|---|--|
| 1. Aktivitätskurve des inaktivierten Enzyms | 4. 10', 11'-mono- <i>cis</i> -Verbindung |
| 2. all- <i>trans</i> -Verbindung* | 5. Reaktivierung durch Vitamin K_1 |
| 3. 6', 7'-mono- <i>cis</i> -Verbindung | |

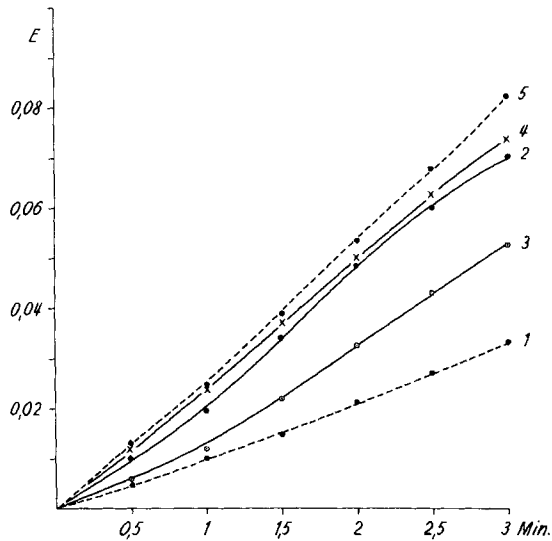


Fig. 7. Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase durch geometrische Isomere des Vitamin K_2 mit einer Seitenkette von 30 C-Atomen

- | | |
|---|--|
| 1. Aktivitätskurve des inaktivierten Enzyms | 4. 18', 19'-mono- <i>cis</i> -Verbindung |
| 2. all- <i>trans</i> -Verbindung* | 5. Reaktivierung durch Vitamin K_1 |
| 3. 6', 7'-mono- <i>cis</i> -Verbindung | |

* Die verschiedenen geometrischen Isomere (Kurven 2-4) wurden zum inaktivierten Enzym in einer Endkonzentration von $0,16 \mu\text{Mol/ml}$ Enzymansatz zugesetzt.

geometrischen Isomeren vom Vitamin K₂ mit 20 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (Fig. 8), wie vom Isoprenologen mit einer Seitenkette von 30 Kohlenstoffatomen (Fig. 9) der Fall.

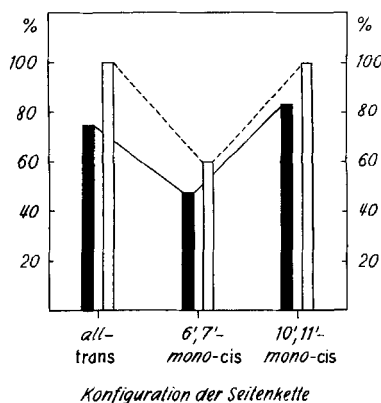


Fig. 8. Vergleich der in-vitro- und in-vivo-Wirksamkeit der geometrischen Isomeren von Vitamin K₂ mit 20 C-Atomen in der Seitenkette.

Schwarze Säulen: Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase. Weisse Säulen: Biologische Aktivität im Kücken-test⁴. In beiden Testen diente Vitamin K₁ als Standard (= 100% Aktivität)

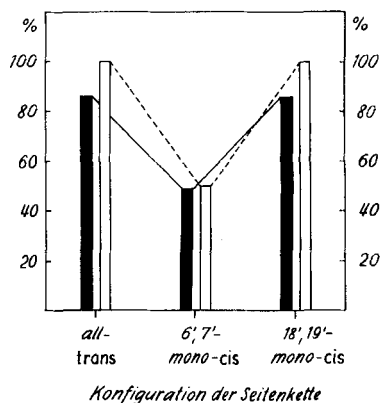


Fig. 9. Vergleich der in-vitro- und in-vivo-Wirksamkeit der geometrischen Isomeren von Vitamin K₂ mit 30 C-Atomen in der Seitenkette.

Schwarze Säulen: Reaktivierung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase. Weisse Säulen: Biologische Aktivität im Kücken-test⁴. In beiden Testen diente Vitamin K₁ als Standard (= 100% Aktivität)

Experimentelles. Aufarbeitung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase aus Schweineherzmuskeln, Durchführung der Aktivitätsmessungen und Auswertung derselben haben wir früher beschrieben¹). Alle Vitamin-K₁- und -K₂-Analoge sind auf äquimolarer Basis in Rinderserumalbumin suspendiert¹) und in zwei Konzentrationen (0,16 und 0,32 μMol/ml Enzymansatz) geprüft.

Die in den Fig. 3, 5, 8 und 9 angegebenen Prozentzahlen der reaktivierenden Wirkung der verschiedenen Vitamin-K-Formen wurden wie folgt ermittelt:

Wie früher beschrieben¹), zeichnete man die Aktivitätskurven aus den Mittelwerten von durchschnittlich vier Aktivitätsmessungen auf (Fig. 1, 2, 4, 6 und 7). Bei jeder Mess-Serie wurde Vitamin K₁ als Standard mitgeführt und ebenso die Aktivität des Enzyms ohne Zusatz einer aktivierenden Substanz bestimmt. Die prozentuale Wirksamkeit der verschiedenen Vitamin-K₁- und -K₂-Analoge im Vergleich zu Vitamin K₁ als Standard ist so errechnet, dass bei 1, 1,5 und 2 Min. der Abstand zwischen Mittelwert des inaktivierten Enzyms und Mittelwert des Enzyms mit Zusatz von Vitamin K₁ abgemessen wurde. Auf die gleiche Weise haben wir bei den anderen aufgezeichneten Vitamin-K-Analoge den Abstand ihrer Mittelwerte zu denen des inaktivierten Enzyms abgelesen und in Prozent umgerechnet, wenn zu demselben Zeitpunkt der Abstand zwischen Vitamin-K₁-Enzym und inaktiviertem Enzym = 100% gesetzt wurde. Sofern die Aktivitätskurven gerade ansteigen, haben wir noch einen vierten Wert, entweder bei 0,5 oder 2,5 Min., berechnet. Da die gleichen Berechnungen bei den Aktivitätskurven von zwei Konzentrationen durchgeführt wurden, erhielten wir so 6–8 Prozentwerte und daraus den Mittelwert für die Aktivität einer bestimmten Vitamin-K-Form im Vergleich zur Aktivität von Vitamin K₁ = 100 %.

Die Streuung der Mittelwerte sowohl bei den Aktivitätskurven wie auch bei der Berechnung der prozentualen Wirksamkeit betrug durchschnittlich ca. 6% (geringste Streuung 2,5%, maximale Streuung 14%).

Diskussion

Die mitgeteilten Ergebnisse bestätigen die früher gemachte Beobachtung¹⁾⁶⁾, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die isoprenoide Seitenkette der Vitamine K₁ und K₂ für die Reaktivierung der mit Isooctan inaktivierten Bernstein-säure-Cytochrom-c-Reduktase verantwortlich ist.

Der Vergleich der reaktivierenden Wirkung der Vitamin-K₁- und -K₂-Analoge auf die Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase mit der Wirkung auf die Blutgerinnung beim Vitamin-K-Mangelkücken⁴⁾ zeigt vor allem in der Vitamin-K₂-Reihe eine gute Übereinstimmung. Das ist nicht nur im Hinblick auf den Einfluss der Länge der Seitenkette, sondern auch hinsichtlich der geometrischen Isomerie in der Seitenkette der Fall. Es ergibt sich daraus ein strenger Hinweis für eine Korrelation der *in vitro* beobachteten Beeinflussung der Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase mit der biologischen Aktivität beim Vitamin-K-Mangelkücken. In früheren Untersuchungen¹⁾⁶⁾ konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass im Enzymversuch die Seitenkette des Vitamins K für die Haftung an die Mitochondrienstruktur verantwortlich ist. Dieser Effekt scheint somit auch der begrenzende Faktor für die biologische Wirksamkeit zu sein.

Mit dieser Vorstellung stimmen die Beobachtungen mehrerer Autoren überein, wonach in verschiedenen Versuchsanordnungen eine Abhängigkeit der Vitamin-K-Wirkung von dem Vorhandensein einer längeren Seitenkette in 3-Stellung des 2-Methyl-1,4-naphtochinons festgestellt wurde. MARTIUS⁷⁾ konnte zeigen, dass die oxydative Phosphorylierung in Mitochondrien von Vitamin-K-Mangelkücken durch Vitamin K₁ gesteigert werden kann. Das Vitamin-K₂-Analoge mit einer Seitenkette von 15 Kohlenstoffatomen war etwas weniger wirksam, während das Vitamin-K₁-Analoge mit 5 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette sogar hemmend wirkte. 2-Methyl-1,4-naphtochinon erwies sich in der gleichen Versuchsanordnung auf äquimolarer Basis als unwirksam⁸⁾. Atmung und oxydative Phosphorylierung in durch UV.-Bestrahlung inaktivierten Zellpartikeln von *Mycobacterium phlei* können nach Untersuchungen von BRODIE und Mitarb.⁹⁾ durch Vitamin K₁ reaktiviert werden, jedoch nicht durch 2-Methyl-1,4-naphtochinon. Vitamin K₁ war wirksamer als seine Analoge mit 15 oder 25 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette¹⁰⁾. ISLER *et al.*²⁾ haben durch Bestimmung der Überlebenszeit von Ratten, die mit Dicumarol oder anderen Cumarinderivaten vergiftet wurden, nachgewiesen, dass die Seitenkette von einer bestimmten Länge in den Vitaminen K₁ und K₂ für deren Wirkung gegen Dicumarolvergiftung notwendig ist. 2-Methyl-1,4-naphtochinon, das in Vitamin-K-Mangelkücken¹¹⁾ und -K-Mangelhunden¹²⁾ auf äquimolarer Basis die gleiche Aktivität wie Vitamin K₁ besitzt, ist nach MARTIUS¹³⁾ nicht als solches wirksam, sondern wird *in vivo* in ein Vitamin-K₂-Analoges mit 20 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette umgewandelt¹⁴⁾.

⁶⁾ F. WEBER, U. GLOOR & O. WISS, *Helv.* **41**, 1046 (1958).

⁷⁾ C. MARTIUS & D. NITZ-LITZOW, *Biochem. Z.* **327**, 1 (1955).

⁸⁾ C. MARTIUS & D. NITZ-LITZOW, *Biochim. biophys. Acta* **13**, 289 (1954).

⁹⁾ A. F. BRODIE, M. M. WEBER & C. T. GRAY, *Biochim. biophys. Acta* **25**, 448 (1957).

¹⁰⁾ A. F. BRODIE, *Fed. Proc.* **17**, 196 (1958).

¹¹⁾ H. DAM & E. SØNDERGAARD, *Acta pharmacol. toxicol.* **9**, 131 (1953).

¹²⁾ L. M. FISHER, G. J. MILLAR & L. B. JAQUES, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1039 (1956).

¹³⁾ C. MARTIUS, *Biochem. Z.* **327**, 407 (1956).

¹⁴⁾ C. MARTIUS, *Dtsch. med. Wschr.* **83**, 1701 (1958).

Zusammenfassung

Vitamin K_1 und seine Analogen mit 5, 10, 15, 25 und 30 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette, sowie die Isoprenologen der Vitamin- K_2 -Reihe mit Seitenketten von 10–35 Kohlenstoffatomen wurden auf ihre reaktivierende Wirkung auf die mit Isooctan inaktivierte Bernsteinsäure-Cytochrom-c-Reduktase vergleichend geprüft. Diese Reaktivierung hängt sowohl in der Vitamin- K_1 - wie auch in der Vitamin- K_2 -Reihe deutlich von der Länge der Seitenkette ab. In beiden Reihen sind die Vertreter mit einer Seitenkette von 25 Kohlenstoffatomen am wirksamsten. Verkürzung der Seitenkette hat einen starken Abfall der Wirksamkeit zur Folge, während Analoge der Vitamine K_1 und K_2 mit 30 oder 35 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette nur leicht an Aktivität abnehmen.

Auffallend ist die gute Übereinstimmung zwischen reaktivierender Wirkung der verschiedenen Isoprenologen auf das inaktivierte Enzym und deren biologischen Aktivität im Vitamin-K-Mangelkücken, speziell in der Vitamin- K_2 -Reihe. Es ergibt sich daraus ein Hinweis, dass die durch die isoprenoide Seitenkette bedingte Bindung des Vitamins K an die Mitochondrienstruktur, wie dies in den *in-vitro*-Versuchen zum Ausdruck kommt, auch der begrenzende Faktor für die Wirkung *in vivo* ist.

SUMMARY

Vitamin K_1 and its analogues with 5, 10, 15, 25 and 30 C-atoms in the side-chain, and the isoprenologues of the vitamin K_2 series with side-chains of 10 to 35 C-atoms, have been tested comparatively as regards their reactivation effect on succinate-cytochrome-c reductase, inactivated by isooctane. This reactivation depends clearly on the length of the side-chain, in the vitamin K_1 as well as in the vitamin K_2 series. In both series the most active substances are those with a side-chain of 25 C-atoms. Shortening of the side-chain is paralleled with a heavy decrease of the activity, while the analogues of the vitamins K_1 and K_2 with 30 or 35 C-atoms in the side-chain lose their activity only to a slight degree.

The good agreement between reactivation effect of the various isoprenologues on the inactivated enzyme and their biological activity in the vitamin K deficient chick is very striking, especially in the vitamin K_2 series. Hence we may conclude that the binding of vitamin K to the mitochondrial structure by its isoprenoid side-chain, as stated in the *in vitro* assays, is also the limiting factor in the *in vivo* assays.

Biochemische Forschungsabteilung
der F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel