



Doctoral Thesis

Untersuchungen zur Aufklärung der biochemischen Wirkungsweise von Vitamin K

Author(s):

Lutz, William Rudolf

Publication Date:

1983

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000309410> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH 7295

**Untersuchungen
zur Aufklärung der biochemischen
Wirkungsweise von Vitamin K**

*Abhandlung zur Erlangung des Titels
eines Doktors der Naturwissenschaften
der*

**EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN
HOCHSCHULE ZÜRICH**

vorgelegt von
WILLIAM RÜDOLF LUTZ
dipl. Chem. ETH

geboren am 29. Mai 1950
von Basel

Angenommen auf Antrag
von Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
und
Prof. Dr. E. Carafoli, Koreferent

1983

Zusammenfassung

Als Beitrag zur Aufklärung der biochemischen Wirkungsweise von Vitamin K wurden drei Teilprojekte bearbeitet.

1. Die Suche nach synthetischen Substraten für die Vitamin-K-abhängige CO_2 -Fixierung.
 - Neben dem bekannten, als Standard verwendeten Pentapeptid Phe-Leu-Glu-Glu-Ile (38), wurden die Glutaminsäurederivate BOC-L-Glutaminsäure- α -methylester (43) und Z-L-Glutaminsäure- α -methylester (46) synthetisiert und zusammen mit dem käuflichen BOC-L-Glutaminsäure- α -benzylester (39) als Substrate für die Vitamin-K-abhängige Carboxylase getestet, wobei Aktivitäten zwischen 14 und 29 % bezogen auf das Pentapeptid 38 gefunden wurden.
 - Der Nachweis, dass der Einbau des ^{14}C -Bicarbonates in der γ -Stellung des biologisch aktivsten Glutaminsäurederivates 43 zum 5- ^{14}C -BOC-L- γ -Carboxyglutaminsäure- α -methylester erfolgte, konnte durch chemische Ueberführung in den Tosyl-L-glutaminsäuredimethylester (51) und Bestimmung seiner spezifischen Radioaktivität erbracht werden.
2. Experimentelle Ueberprüfung einer mechanistischen Hypothese zur Rolle von Vitamin K bei der Carboxylierungsreaktion. Nach dieser Hypothese (vergl. Schema 12, Seite 68) soll CO_2 vorübergehend in Stellung 2 des Vitamin-K-Hydrochi-

nons fixiert werden und man könnte erwarten, dass bei Verwendung von nor-Vitamin-K₁-Hydrochinon an Stelle von Vitamin-K₁-Hydrochinon unter normalen Bedingungen der Inkubation keine Carboxylierung der Glutaminsäurereste, sondern eine irreversible Fixierung von CO₂ auf dem nor-Vitamin K stattfindet.

Zur Ueberprüfung einer solchen Hypothese war es notwendig, das vermutete Carboxylierungsprodukt (2-Carboxy-3-phytyl-1,4-naphthohydrochinon) synthetisch zugänglich zu machen. Zuerst wurden die chemischen Eigenschaften einer Modellverbindung, der 1,4-Dihydroxy-2-naphthoesäure, untersucht. Anschliessend synthetisierte man das unbekannte 2-Methoxycarbonyl-3-phytyl-1,4-naphthohydrochinon (71) und einige seiner Derivate. Nach diesen Vorbereitungen wurde ¹⁴C-Bicarbonat unter Standardbedingungen mit nor-Vitamin-K₁-Hydrochinon an Stelle von Vitamin-K₁-Hydrochinon inkubiert. Der Ansatz wurde nach dem Aufarbeiten mit Diazomethan behandelt und mit kaltem Ester versetzt. Im anschliessend zurückgewonnenen Verdünnungsmaterial konnte keine Aktivität festgestellt werden. Damit konnte die Schema 12 gezeigte elektrophile Addition von CO₂ in Stellung 2 von Vitamin K widerlegt werden.

3. Stereochemische Aspekte.

Im Hinblick auf eine geplante Untersuchung des stereochemischen Verlaufs der enzymatischen Carboxylierungsreaktion,

versuchte man, die beiden diastereotopen Carboxylgruppen chemisch zu unterscheiden. Ein Weg dazu wäre die Reduktion der beiden Carboxylgruppen der γ -Carboxyglutaminsäurereste zu den entsprechenden Hydroxymethylgruppen. Die Hydrolyse des reduzierten Carboxylierungsprodukts führt zum 5,5'-Dihydroxyleucin, dessen Laktonisierung zwei diastereomere Laktone ergeben sollte. In diesen kann jeweils ein Ast selektiv weiter manipuliert werden.

- Als Modellverbindung wurde die 2-Benzylmalonsäure mit Diboran, ohne Protonenaustausch in der 2-Stellung, zum 2-Benzylpropan-1,3-diol reduziert.
- Mit den an der 2-Benzylmalonsäure erprobten Bedingungen konnte selektiv die freie Carboxylgruppe im Z-Asparaginsäure- α -benzylester zum Z-Homoserin- α -benzylester reduziert werden.
- Unter den gleichen Bedingungen wurde der Z- γ -Carboxyglutaminsäure- α -methylester mit Diboran umgesetzt. Das Reduktionsprodukt wurde mit Methanol verkocht und anschliessend acetyliert. Aus dem Produktgemisch konnte man chromatographisch ein Hauptprodukt isolieren. Dieses konnte man jedoch nicht vollständig reinigen. Anhand der spektroskopischen Daten kann dem Hauptprodukt keine eindeutige Struktur zugeteilt werden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass das Produkt die von Bory et al ⁸⁰⁾ bei ähnlichen Versuchen gefundene cyclische Struktur des 3-Hydroxymethylprolinderivates 94 hat.

Summary

The present work offers three independent approaches to the elucidation of the rôle of vitamin K in CO₂-fixation.

1. Search for simple synthetic substrates as substitutes for preprothrombin in the vitamin K-dependent enzymatic carboxylation reaction

- In addition to the known pentapeptide Phe-Leu-Glu-Glu-Ile (38) which was used as a standard in the enzymatic assay, the glutamic acid derivatives BOC-L-glutamic acid- α -methyl-ester (43) and Z-L-glutamic acid- α -methylester (46) were synthesized and tested along with the commercially available BOC-L-glutamic acid- α -benzylester (39) as substrates for the vitamin K-dependent carboxylase. Activities between 14 und 29 % of that of the standard were found.

- In the case of the biologically most active glutamic acid derivative 43 it was shown that carboxylation with ¹⁴C-bi-carbonate occurred in the γ position to give 5-¹⁴C-BOC-L- γ -carboxyglutamic acid- α -methylester (48) by chemical transformation into the crystalline tosyl-L-glutamic dimethylester (51) and determination of the specific radioactivity.

2. Experimental check of a mechanistic hypothesis

According to this hypothesis (c.f. Scheme 12, page 68) vitamin K-hydroquinone can act as an intermediate acceptor of

CO₂ by fixation in the 2 position; if so, it would be expected that substitution of nor-vitamin K-hydroquinone for vitamin K-hydroquinone in the standard enzymatic carboxylation reaction would lead to irreversible fixation of CO₂ in the 2 position of vitamin K₁. By dilution techniques it should be possible to detect even small amounts of the "blocked intermediate" 2-carboxy-3-phytyl-1,4-naphthoquinone (70). To this end, the dilution material had to be synthesized. First, the chemical properties of a model compound 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid were investigated. Next, the unknown 2-methoxycarbonyl-3-phytyl-1,4-naphthohydroquinone (71) and some of its derivatives were synthesized. In the crucial experiment ¹⁴C-bicarbonate was incubated under standard conditions with nor-vitamin K-hydroquinone. After workup, the incubation mixture was treated with diazomethane and cold ester 71 was added. No radioactivity could be detected in the recovered carrier. This result is not consistent with the hypothesis put forward in Schema 12.

3. Stereochemical aspects

Preliminary experiments towards elucidation of the stereochemical course of the enzymatic carboxylation step were conducted. It was planned to distinguish between the two diastereotopic carboxyl groups in the γ-carboxyglutamic acid residues

after their reduction to hydroxymethyl groups. Hydrolysis of the reduced carboxylation product should result in the formation of 5,5'-dihydroxyleucine, this can form two diastereomeric lactones in which the two branches could then be manipulated further in a selective way.

- In a model reaction 2-benzylmalonic acid was reduced with diborane to 2-benzylpropan-1,3-diol without proton exchange in the 2 position.
- Under the same condition the free carboxyl group in Z-aspartic acid- α -benzylester was reduced selectively with formation of Z-homoserine- α -benzylester.
- Next, a similar reduction was attempted with Z- γ -carboxyglutamic acid- α -methylester. The reaction product was refluxed with methanol and subsequently acetylated. From the resulting mixture a main product was isolated by chromatography. Final purification of this product was not achieved and, therefore, spectroscopic derivation of an unambiguous formula was not possible. However, the structure of the product is certainly not related to that of the 3-hydroxymethylproline derivative 94 obtained by Bory et al ⁸⁰⁾ under similar conditions.