

Es ist bereits beschrieben worden,^[1] dass SrN und Sr[N₂] bei höherer Temperatur (300–400 °C) und Normaldruck unter Argon zu Sr₂N (Freisetzung von molekularem Stickstoff) abgebaut werden. Auch Sr₄N₃ durchläuft diese Reaktion. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die analytisch festgestellten Diazenidgehalte von Sr₂N^[2] offensichtlich auf „Verunreinigungen“ mit Sr₄N₃ zurückzuführen sind. Analytisch reines Sr₂N wird nach der Synthese aus den Elementen unter Normaldruck sicher erst durch Nachbehandlung (650 °C) im Vakuum (10⁻⁶ bar) erhalten. Dieser Befund wäre auf der Basis der engen Strukturbeziehungen mit einer Deintercalation zu vereinbaren. Unsere Untersuchungen zum Erhalt topochemischer Wirt-Gast-Beziehungen bei Intercalation oder Deintercalation im System Sr-N sind zurzeit allerdings noch nicht abgeschlossen.^[10]

Sr₄N₃ gehört zur Klasse der Sub-Verbindungen mit metallischem Charakter, einer Eigenschaft, die z. B. für das binäre Subnitrid Ba₃N^[12] mit folgender Formelschreibweise verdeutlicht wird: [Ba²⁺]₃[N³⁻]·3e⁻. Übertragen auf das Strontium-subnitridiazid resultiert eine Formel (Sr²⁺)₈[N³⁻]₄[N₂²⁻]·2e⁻, die allerdings die kristallchemischen Besonderheiten des Strontiums (**1** und Abbildung 2, Mitte) nicht widerspiegelt. Wir bevorzugen daher zur Verdeutlichung der offensichtlich gemischvalenten Sr-Verbindung die Formel (Sr^{+1.5})₄(Sr²⁺)₄[N³⁻]₄[N₂²⁻]. Diese Formel lässt im Einklang mit den Kristallstrukturen auch unmittelbar verstehen, welche Sr-Spezies im Zuge der Reduktion von molekularem Stickstoff bei der Bildung der zweiten Intercalationsstufe (SrN; Abbildung 2, rechts) zu Sr²⁺ oxidiert werden. Zur Frage der tatsächlichen Existenz von „niedervalentem“ Strontium werden weitere experimentelle und theoretische Untersuchungen durchgeführt.

Eingegangen am 28. Februar 2002 [Z18792]

- [1] G. Auffermann, Yu. Prots, R. Kniep, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 565–567; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 547–549.
- [2] G. Auffermann, U. Schmidt, B. Bayer, Yu. Prots, R. Kniep, *Anal. Bioanal. Chem.*, im Druck.
- [3] N. E. Brese, M. O’Keeffe, *J. Solid State Chem.* **1990**, *87*, 134–140.
- [4] G. Auffermann, Yu. Prots, R. Kniep, S. F. Parker, S. M. Bennington, *ChemPhysChem*, im Druck.
- [5] a) W. Bronger, G. Auffermann, *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 2723–2732; b) W. Bronger, G. Auffermann, P. Müller, *J. Less-Common Met.* **1988**, *142*, 243–252.
- [6] Zur Synthese von Sr₄N₃ wurde Sr₂N (hergestellt bei 1120 K aus den Elementen) im Molybdän-Schiffchen unter N₂ (Messer Griesheim, angegebener Reinheitsgrad 99.999 %, nachgereinigt über Oxisorb-Patronen von Messer Griesheim) 6 h bei 920 K im Autoklaven^[5] umgesetzt. Bei einem Anfangsdruck von 8 bar (entsprechend einem Reaktionsdruck von 9 bar) konnte nahezu phasenreines Sr₄N₃ erhalten werden. Der Reaktionsverlauf wurde über einen Druckaufnehmer verfolgt.
- [7] Zur Aufnahme des Neutronenbeugungsdiagramms stand das Pulverdiffraktometer E9 am Reaktor BER II im HMI Berlin zur Verfügung. Sr₄N₃ wurde unter Argon in einen zylindrischen Behälter aus Vanadium (Durchmesser 8 mm, Länge 47 mm, Wandstärke 0.15 mm) eingefüllt und dieser mit einer Kappe mit einer Indium-Dichtung gasdicht verschlossen. Die Kristallstrukturdaten wurden mit $\lambda = 1.7965 \text{ \AA}$ im Messbereich $2^\circ < 2\theta < 158^\circ$ bei 298 K und 2 K aus Neutronenbeugungsdaten bestimmt: monoklin, Raumgruppe *C2/m*, $Z = 2$; 298 K: $a = 6.7070(4) \text{ \AA}$, $b = 3.8280(2) \text{ \AA}$, $c = 13.7625(8) \text{ \AA}$, $\beta = 96.519(5)^\circ$, $V = 351.05(3) \text{ \AA}^3$; Sr1 in (4i): $x = 0.413(1)$, $z = 0.1413(4)$; Sr2 in (4i): $x = 0.127(1)$, $z = 0.3406(3)$; N1 in (4i): $x = 0.775(1)$, $z =$

0.2515(4); N2 in (4i): $x = 0.083(1)$, $z = 0.0217(6)$, Besetzungsfaktor = 0.5; $R_{\text{Profil}} = 0.055$, $R_{\text{Bragg}} = 0.053$, Zahl der gemessenen Reflexe: 272. 2 K: $a = 6.6886(3) \text{ \AA}$, $b = 3.8173(2) \text{ \AA}$, $c = 13.7382(6) \text{ \AA}$, $\beta = 96.447(3)^\circ$, $V = 348.55(3) \text{ \AA}^3$; Sr1 in (4i): $x = 0.4133(7)$, $z = 0.1412(3)$; Sr2 in (4i): $x = 0.1290(7)$, $z = 0.3413(3)$; N1 in (4i): $x = 0.7748(6)$, $z = 0.2483(3)$; N2 in (4i): $x = 0.0850(8)$, $z = 0.0234(4)$, Besetzungsfaktor = 0.5; $R_{\text{Profil}} = 0.066$, $R_{\text{Bragg}} = 0.047$, Zahl der gemessenen Reflexe: 261. Für die Auswertung der Messdaten und die anschließende Profilverfeinerung wurde das Programm Fullprof eingesetzt.^[8] Weitere Einzelheiten zu den Kristallstrukturuntersuchungen können beim Fachinformationszentrum Karlsruhe, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen (Fax: (+49) 7247-808-666; E-mail: crysdata@fiz-karlsruhe.de), unter den Hinterlegungsnummern CSD-412394 und -412395 angefordert werden.

- [8] J. Rodriguez-Carvajal, Laboratoire Léon Brillouin, Saclay FULLPROF2K Version 1.9e May, **2001**.
- [9] Die chemischen Analysen für N, O, H, C wurden mit Analysatoren TC436 DR/5, RH404 bzw. C200CHLH (Firma LECO) nach dem Prinzip des Trägergas-Heißextraktions- und des Verbrennungsverfahrens durchgeführt: Sr₄N₃ (N_{exp} 10.86(8), N_{ber} 10.71 Gew.-%). Zur Kalibrierung wurde Si₃N₄ verwendet. Die Gehalte an O, H und C lagen unterhalb der Nachweisgrenzen (C < 0.1%; H < 0.005%; O < 0.05 Gew.-%). Die über Temperaturrampen von 500–1500 K durchgeführten Bestimmungen des N-Gehaltes^[2] zeigen, dass in Sr₄N₃ = (Sr^{+1.5})₄(Sr²⁺)₄[N³⁻]₄[N₂²⁻] zwei unterschiedliche Stickstoffspezies im Verhältnis 2:1 vorliegen.
- [10] G. Auffermann, Yu. Prots, R. Kniep, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [11] G. V. Vajenine, G. Auffermann, Yu. Prots, W. Schnelle, R. K. Kremer, A. Simon, R. Kniep, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4866–4870.
- [12] P. E. Rauch, A. Simon, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1505–1506; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 1519–1521.

Charakterisierung einer Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase aus Höheren Pflanzen: stereochemische und mechanistische Analyse zum Ursprung von E/Z-Isomeren**

Christoph Beckmann, Janine Rattke, Neil J. Oldham, Petra Sperling, Ernst Heinz und Wilhelm Boland*

Professor Ernst Anders zum 60. Geburtstag gewidmet

Sphingolipide sind Bestandteile von tierischen und pflanzlichen Zellmembranen. Zudem haben sie als Botenstoffe eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels und des Zellwachstums.^[1, 2] Allerdings dominieren in Pflanzen nicht das für tierische Zellen charakteristische Grundgerüst des (4E)-Sphingenins, sondern die Δ^8 -ungesättigten E/Z-Isomere des 4-Hydroxy-8-sphingenins und des (4E)-4,8-Sphingadienins.^[3]

[*] Prof. Dr. W. Boland, Dipl.-Chem. C. Beckmann, J. Rattke,

Dr. N. J. Oldham

Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie

Winzerlaer Straße 10, 07745 Jena (Deutschland)

Fax: (+49) 3641-571-202

E-mail: boland@ice.mpg.de

Dr. P. Sperling, Prof. Dr. E. Heinz

Institut für Allgemeine Botanik

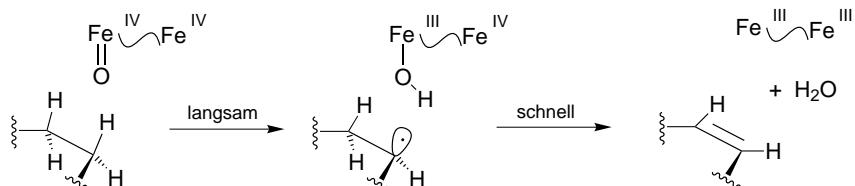
Universität Hamburg

Ohnhorststraße 18, 22609 Hamburg (Deutschland)

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 436) und dem Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung.

Die Eigenschaften von ungesättigten Sphingolipiden, Acyllipiden und anderen Metaboliten der Fettsäuren werden maßgeblich durch Anzahl, Position und Konfiguration ihrer Doppelbindungen bestimmt. Erst in den letzten Jahren gelang es, einige der zugehörigen und durchweg stereospezifisch arbeitenden Desaturasen zu klonieren und mechanistisch zu untersuchen.^[4, 5] Alle bislang bekannten Enzyme enthalten als katalytische Einheit Dieisenzentren mit Carboxylat- und/oder Histidinliganden und ermöglichen die sauerstoffabhängige Einführung von Doppelbindungen in nichtaktivierte Alkylketten. Es gibt lösliche und membrangebundene Desaturasen mit unterschiedlichen Consensus-Motiven, welche die Ligandenumgebung ihrer Dieisenzentren determinieren.^[6] Auf der Basis experimenteller Befunde mit isotopenmarkierten Vorstufen,^[7, 8] der ersten röntgenographisch ermittelten Struktur einer löslichen Δ^9 -18:0-ACP-Desaturase aus Ricinus^[9] sowie mechanistischer und spektroskopischer Untersuchungen^[10, 11] wird angenommen, dass alle Desaturasen nach einem hoch konservierten, zweistufigen radikalischen Mechanismus arbeiten.^[12, 13] Bei membranständigen Desaturasen ist die Entfernung des ersten Wasserstoffatoms durch die Eisen-Oxo-Spezies (Schema 1) geschwindigkeitsbestimmend und mit einem hohen, primären kinetischen Isotopeneffekt (KIE, $k_{H/D} \approx 5-8$) verbunden; für die Entfernung des zweiten Wasserstoffatoms wird kein nennenswerter KIE nachgewiesen.^[14-16] Dagegen zeigen lösliche Desaturasen wie die Stearyl-ACP-Desaturase auch bei der Abspaltung des ersten Wasserstoffatoms keinen nennenswerten KIE; als maskierende Faktoren werden Elektronentransport, Substratbindung oder Produktfreisetzung diskutiert.^[17]

Der Prozess der Desaturierung verläuft suprafacial^[8, 18-21] und entfernt zwei *syn*-ständige Wasserstoffatome aus vororientierten Konformationen (Enzymkontrolle) der Substrate



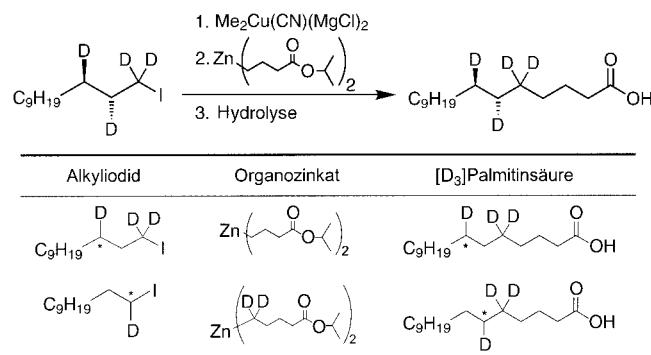
Schema 1. Schematische Darstellung einer Desaturase-katalysierten Doppelbindungsbildung in Alkylketten.

(Schema 1). Es entstehen stereospezifisch *E*- oder *Z*-Alkene. Vor diesem Hintergrund sind Enzyme, die eine Mischung von *E*- und *Z*-Alkenen liefern,^[15, 19] von besonderem mechanistischem Interesse. Zu ihnen gehört auch die Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase Höherer Pflanzen.^[22, 23] Das aus der Sonnenblume (*Helianthus annuus*) klonierte Gen wurde in eine Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) heterolog exprimiert, die keine ungesättigten langkettigen Sphingobasen herstellen kann.^[22] Das in Hefe exprimierte Enzym ermöglicht die Biosynthese von (8*E*)- und (8*Z*)-4-Hydroxy-8-sphingenin im Verhältnis 7:1 (Abbildung 1).

Wird die zelleigene Fettsäurebiosynthese der Hefe durch Cerulenin inhibiert,^[24] kann exogen angebotene markierte Palmitinsäure in guten Ausbeuten in den Sphingolipidstoffwechsel der Hefe eingeschleust werden, sodass bis zu 95 %

des 4-Hydroxysphinganins deuteriert vorliegen. Unter Verwendung von stereospezifisch deuterierten Palmitinsäuren sollten sich deshalb erstmals stereochemische und mechanistische Informationen (KIEs) zur simultanen Bildung von *E*- und *Z*-Olefinen durch eine singuläre Desaturase erhalten lassen.

Wir berichten hier, dass die Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase beide stereoisomeren 4-Hydroxy-8-sphingenine stereospezifisch durch *syn*-Eliminierung von zwei vicinalen Wasserstoffatomen generiert, wobei aber für die Bildung beider Isomere unterschiedliche KIEs bestimmt werden. Die zur Analyse des Desaturierungsprozesses verwendeten deuterierten „Stoffwechselseitonen“ wurden in Anlehnung an Thum et al. synthetisiert.^[25] Hergestellt wurden eine (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-D₄]Palmitinsäure (> 98 % Enantiomerenüberschuss pro Stereozentrum) sowie racemische [5,5,6- oder 5,5,7-D₃]Palmitinsäuren, welche zur Bestimmung der KIEs eingesetzt wurden. Durch Alkylierung von chiralen Alkyliodiden (Schema 2) mit funk-



Schema 2. Synthese deuterierter Palmitinsäuren aus deuterierten Alkyliodiden und funktionalisierten Organozinkaten.

tionalisierten Organocupraten^[26] konnte ein Verlust des eingebrachten Markierungsgrades (> 98 % pro Position) und ein Isotopenscrambling vermieden werden. Die Synthese gestattet durch Kombination geeigneter Edukte eine fast beliebige Positionierung von Wasserstoffisotopen im Molekül. Die beiden zusätzlichen Deuteriumatome an C(5) ermöglichen selbst dann eine sichere Herkunftsanalyse

der Metabolite, wenn die beiden Deuteriumatome an C(6) und C(7) der Vorstufe abgespalten werden.

Zellen der transgenen Hefe, die das Gen der Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase aus der Sonnenblume exprimieren, wurden in Gegenwart von Cerulenin und markierter Palmitinsäure kultiviert und anschließend alkalisch hydrolysiert. Die freigesetzten Sphingobasen wurden durch Sanger-Reagens in Dinitrophenylderivate überführt und durch präparative Dünnschichtchromatographie vorgereinigt.^[23] Die Derivate können mithilfe der Elektrosprayionisations(ESI)-Massenspektrometrie im Negativionen-Modus nahezu untergrundfrei analysiert werden. Durch eine vorgesetzte HPLC-Trennung (RP-18) konnten die *E*- und *Z*-Isomere des 4-Hydroxy-8-sphingenins vollständig getrennt werden (Abbildung 1). Beide liefern Spektren mit intensiven [M - H]⁻

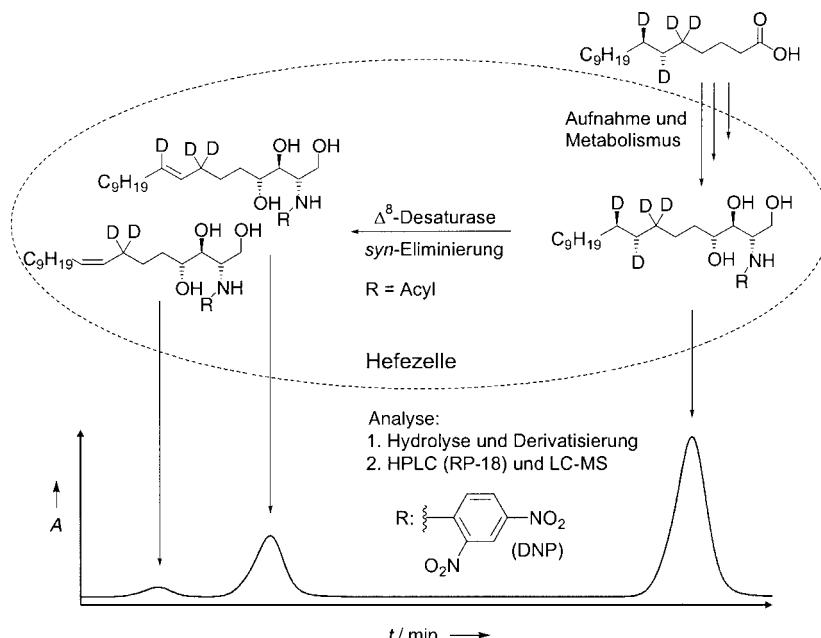


Abbildung 1. Biosynthese und Desaturierung von 4-Hydroxysphingenin. Deuterierte Palmitinsäure aus dem Kulturmedium wird von den transgenen Hefezellen in *N*-Acyl-4-hydroxysphingenin eingebaut und zu acylierten (8*E*)- und (8*Z*)-4-Hydroxy-8-sphingeninen umgesetzt. Die Trennung der DNP-Derivate erfolgt durch HPLC (RP-18-Säule) mit UV-Detektion bei 350 nm.

Quasimolekülien ohne weitere Fragmentierung. Das Hauptisomer, (8*E*)-4-Hydroxy-8-sphingenin, zeigt ein einheitliches $[M - H]^-$ -Ion bei m/z 483, während das *Z*-Isomer ein ebenfalls einheitliches $[M - H]^-$ -Ion bei m/z 482 aufweist. Beide Isomere liefern noch ein schwächeres Signal bei m/z 480, das dem $[M - H]^-$ -Ion des unmarkierten 4-Hydroxy-8-sphingenins zuzuordnen ist, welches aus natürlicher Palmitinsäure entsteht. Mithin verläuft die Bildung des *E*-Isomers stereospezifisch unter Verlust eines Wasserstoff- und eines Deuteriumatoms (jeweils von C(8) oder C(9)). Bei der Bildung des *Z*-Isomers werden ausschließlich die den C(8)-H_R- und C(9)-H_R-Atomen entsprechenden Deuteriumatome der 4-Hydroxysphingeninvorstufe entfernt.

Die Positionen der jeweils verbliebenen Deuteriumatome wurden durch Abbau bestimmt. Dazu wurde die Doppelbindung mit OsO₄^[27] und NaIO₄ unter Phasentransferbedingungen^[28] oxidativ gespalten und das gebildete Decanal durch GC-MS (chemische Ionisation mit Isobutan) untersucht. Decanal aus dem Abbau des (8*E*)-4-Hydroxy-8-sphingenins enthält ein Deuteriumatom,^[29] sodass die Einführung der Δ^8 -*E*-Doppelbindung unter Verlust des C(8)-D_R- und des C(9)-H_S-Atoms erfolgt sein muss. Decanal aus dem Abbau des *Z*-Isomers enthält erwartungsgemäß kein Deuteriumatom, was belegt, dass die verbliebenen Deuteriumatome des Metaboliten (m/z 482) ausschließlich im polaren Kopfsegment des 4-Hydroxy-8-sphingenins lokalisiert sind, nämlich an C(7) (Markerisotope an C(5) der applizierten Palmitinsäure). Der stereochemische Verlauf entspricht damit bei beiden Isomeren der üblichen stereospezifischen *syn*-Eliminierung von zwei vicinalen Wasserstoffatomen. Eine Beteiligung von unspezifischen Isomerasen aus der Hefe kann ausgeschlossen werden, da die Expression von Desaturasen anderer Pflanzen

im selben Hefesystem zu jeweils charakteristischen *E/Z*-Verhältnissen führt.^[22, 23] Ferner wird das resultierende *E/Z*-Verhältnis durch die Isotopensubstitution an C(8) und/oder C(9) der gesättigten Vorstufe bestimmt und ist mithin direkt an den Desaturierungsprozess gekoppelt.^[30]

Die KIEs der Abspaltung der Wasserstoffatome von C(8) und C(9) des Sphingolipids wurden durch Applikation der an C(6) oder C(7) monodeuterierten, racemischen Palmitinsäuren (Schema 2) an Zellen der transgenen Hefe ermittelt. Alle Experimente wurden nach der beschriebenen Methode mindestens dreimal durchgeführt; die gemittelten KIEs sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Für das in geringerer Menge entstandene *Z*-Isomer überrascht zunächst, dass bei beiden Wasserstoffabspaltungen von C(8) und C(9) deutliche Isotopeneffekte gemessen werden. Bei dem in größerer Menge entstandenen *E*-Isomer ist hingegen der übliche Trend zu erkennen: Es gibt einen signifikanten, wenn auch niedrigen KIE für die initiale Wasserstoffabspaltung, der als Nachweis für

Tabelle 1. Kinetische Isotopeneffekte (KIEs) der Desaturierung von positionsspezifisch deuterierten Sphingolipiden.^[a]

Δ^8 -Phytosphingenin	Atom	$k_{H/D}$
<i>E</i> -Isomer	C(8)	1.91 ± 0.14
	C(9)	1.16 ± 0.04
<i>Z</i> -Isomer	C(8)	2.07 ± 0.16
	C(9)	3.79 ± 0.59

[a] Die Berechnung der KIEs erfolgte aus dem Verhältnis der Intensitäten der Quasimolekülien von [D₃]- zu [D₂]Phytosphingenin nach Korrektur um ihre ¹³C-Satellitenpeak-Intensitäten.

einen zweistufigen Verlauf von Desaturierungen gilt.^[12, 31] Da beide Isomere von einem einzigen Enzym gebildet werden, muss auch für beide Produkte von einem zweistufigen Verlauf über ein C-Radikal ausgegangen werden (wie in Schema 1 dargestellt). Demnach sollte bei der Bildung des *E*-Isomers das C(8)-H_R-Atom eines gestaffelten (*anti*) vorliegenden Alkylsegments dem aktiven Zentrum der Desaturase direkt exponiert sein. Nach initialer Wasserstoffabspaltung und Bildung eines intermediären C(8)-Radikals könnte nach weiterem Elektronentransfer oder nach β -Spaltung das C(9)-H_S-Atom ohne merklichen KIE (Tabelle 1, $k_{H/D} = 1.16 \pm 0.04$) unter Bildung eines *E*-Olefins verloren gehen. Die Bildung des *Z*-Isomers erfordert hingegen eine *gauche*-Konformation des Substrats mit initialer Wasserstoffabspaltung an C(9) (Schema 1). Da die jeweils einleitende Wasserstoffabspaltung auf dem Wege zum *E*- oder *Z*-Isomer an unterschiedlichen Methylengruppen stattfindet, ist eine gemeinsame Zwischenstufe (Radikal) ausgeschlossen. Vielmehr deuten unsere Befunde darauf hin, dass die Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase zwei unterschiedlich gewichtete Substratkonfor-

mationen mit *anti*- oder *gauche*-Konformation des betroffenen Alkylsegments unabhängig voneinander und direkt in die *E*- oder *Z*-Alkene überführen kann.

Die simultane Bildung von *E*- und *Z*-Doppelbindungen sowie die unterschiedlichen zugehörigen KIEs (Tabelle 1) unterscheiden die Δ^8 -Sphingolipid-Desaturasen von den bisher untersuchten und stereospezifisch arbeitenden Fettsäuredesaturasen. Ferner findet die initiale Wasserstoffabspaltung bei der Bildung des *Z*-Isomers am zur polaren Kopfgruppe distalen C-Atom statt (C(9)), während alle bislang bekannten Fettsäuredesaturasen^[31, 12] einschließlich der kürzlich untersuchten Δ^4 -*trans*-Dihydroceramid-Desaturase aus Rattenleber^[32] ein Wasserstoffatom des proximalen C-Atoms attackieren. Trotz dieser klaren Unterschiede entspricht die räumliche Positionierung der entfernten Wasserstoffatome denen der bekannten *Z*- und *E*-selektiven Fettsäuredesaturasen.^[18, 19] Es bleibt zu prüfen, ob auch andere *E/Z*-Produkte von Desaturasen, z.B. von solchen aus Pheromondrüsen von Insekten,^[15, 19] auf ähnliche Prinzipien und einheitliche Enzyme zurückzuführen sind, oder ob hier unterschiedliche, aber jeweils stereospezifisch arbeitende Biokatalysatoren für das Auftreten von Isomerenmischungen verantwortlich sind. Weiterführende Arbeiten zur Cryptoregiochemie der Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase sind erforderlich.

Experimentelles

Das offene Leseraster einer Δ^8 -Sphingolipid-Desaturase-cDNA aus *Helianthus annuus* wurde hinter den konstitutiven ADH1-Promotor des Hefeexpressionsvektors pVT-U-102 kloniert und in *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1 transformiert.^[22] Transgene Hefezellen wurden mit 25 µM Cerulenin (Sigma) und 0.25 mM deuterierter Palmitinsäure in 100 mL komplettem Minimalmedium-Dropout-Uracil mit 2% Raffinose und 1% Tergitol-NP40 (Sigma) 4 d bei 30°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 1.0 bei 600 nm ($OD_{600} \sim 1.0$) kultiviert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt, gewaschen und direkt einer starken alkalischen Hydrolyse (10-proz. Ba(OH)₂ (w/v) in H₂O/Dioxan 1:1, 24 h, 110°C) unterzogen. Die freigesetzten Langketten Basen (LCB) wurden in ihre Dinitrophenyl(DNP)-Derivate überführt und durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60, CHCl₃/MeOH 9:1, v/v) vorgereinigt. Die Trennung der isomeren DNP-Derivate erfolgte durch HPLC an einer RP-18-Säule (GROM-SIL 120 ODS-5ST, 3 µm, 125 × 2 mm, Grom. Herrenberg) bei 0.2 mL min⁻¹ mit einem Gradienten von 60% Methanol/Acetonitril/2-Propanol 10:3:1 (v/v/v) und 40% Wasser in 10 min auf 20% Wasser und schließlich auf 0% Wasser in weiteren 40 min. Die massenspektrometrische Charakterisierung der DNP-Derivate erfolgte an einem Quattro-II-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) mit ESI-Interface. Die Spektren wurden im Negativionen-Modus aufgenommen (Quellentemperatur: 100°C, Desolvatations temperatur: 250°C, Konusspannung: 35 V).

Eingegangen am 28. Januar 2002 [Z18587]

- [1] A. H. Merrill, J. Sweeley, C. C. Sweeley in *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes* (Hrsg.: D. E. Vance, J. E. Vance), Elsevier Science, Amsterdam, 1996.
- [2] C. K. Y. Ng, K. Carr, M. R. McAinsh, B. Powell, A. M. Hetherington, *Nature* **2001**, *410*, 596.
- [3] H. Imai, M. Ohnishi, K. Hotsubo, M. Kojima, S. Ito, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 351.
- [4] J. A. Broadwater, J. A. Haas, B. G. Fox, *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 103.
- [5] P. Sperling, E. Heinz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 158.

- [6] J. Shanklin, E. B. Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, *49*, 611.
- [7] L. Fauconnot, P. H. Buist, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1210.
- [8] L. J. Morris, R. V. Harris, W. Kelly, A. T. James, *Biochem. J.* **1968**, *109*, 673.
- [9] Y. Lindqvist, W. J. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, *EMBO J.* **1996**, *15*, 4081.
- [10] J. Du Bois, T. J. Mizoguchi, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 443.
- [11] Y. S. Yang, J. Baldwin, B. A. Ley, J. M. Bollinger, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8495.
- [12] D. Meesapyodsuk, D. W. Reed, C. K. Savile, P. H. Buist, S. J. Ambrose, P. S. Covello, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11948.
- [13] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 871.
- [14] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6295.
- [15] A. Pinilla, F. Camps, G. Fabrias, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15272.
- [16] J. L. Abad, F. Camps, G. Fabrias, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3417; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3279.
- [17] B. Behrouzian, P. H. Buist, J. Shanklin, *Chem. Commun.* **2001**, *401*.
- [18] A. Svatos, B. Kalinova, W. Boland, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29*, 225.
- [19] I. Navarro, I. Font, G. Fabrias, F. Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11335.
- [20] W. Boland, C. Frössl, M. Schöttler, M. Toth, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1155.
- [21] J. L. Abad, F. Camps, G. Fabrias, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *31*, 799.
- [22] P. Sperling, A. Blume, U. Zähringer, E. Heinz, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 638.
- [23] P. Sperling, U. Zähringer, E. Heinz, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 28590.
- [24] F. Schneider, R. Lessire, J. J. Bessoule, H. Juguelin, C. Cassagne, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1152*, 243.
- [25] O. Thum, C. Hertweck, H. Simon, W. Boland, *Synthesis* **1999**, 2145.
- [26] C. E. Tucker, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4781.
- [27] H. C. Kolb, M. S. VanNieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
- [28] T. Takata, R. Tajima, W. Ando, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4764.
- [29] Der Abbau des (*E*)-[D₃]Phytosphingenins liefert ein Gemisch von Decanal und [D₁]Decanal. Das Verhältnis entspricht aber dem Verhältnis von markiertem zu natürlichem (*E*)-4-Hydroxy-8-sphingenin vor der Spaltung.
- [30] Palmitinsäure mit Deuteriumsubstitution an C(6) liefert ein 4-Hydroxy-8-sphingenin mit einem *E/Z*-Verhältnis von etwa 6:1, während Deuteriumsubstitution an C(7) der Fettsäure die Bildung des *Z*-Isomers aufgrund des hohen KIE auf ein Verhältnis von etwa 11:1 reduziert.
- [31] B. Behrouzian, L. Fauconnot, F. Daligault, C. Nugier-Chauvin, H. Patin, P. H. Buist, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3545.
- [32] C. K. Savile, G. Fabrias, P. H. Buist, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4382.