

**Mechanistische Charakterisierung von  
ungewöhnlichen Desaturasen aus Pflanzen,  
Hefen und Insekten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker  
Christoph Beckmann

geboren am 31.03.1970 in Bielefeld

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland

2. Prof. Dr. Ernst Anders

Tag der öffentlichen Verteidigung: 10.12.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren .....	1
1.2 Biosynthese ungesättigter Fettsäuren .....	2
1.3 Nomenklatur von Desaturasen .....	4
1.4 Einteilung von Fettsäuredesaturasen .....	5
1.4.1 Lösliche Desaturasen .....	5
1.4.2 Membrangebundene Desaturasen .....	6
1.5 Mechanistische Aspekte von Desaturasen .....	7
1.5.1 Die Elektronentransportkette .....	7
1.5.2 Rolle des katalytisch aktiven Di-Eisenzentrums .....	8
1.6 Mechanismus der Desaturierung .....	11
1.6.1 Untersuchungen zum stereochemischen Verlauf der Desaturierung .....	13
1.6.2 Bestimmung kinetischer Isotopeneffekte .....	14
<b>2. Aufgabenstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>19</b>
3.1 Synthese von deuterierten Fettsäuren .....	19
3.1.1 Synthese gesättigter isopenmarkierter Fettsäuren .....	21
3.1.1.1 Synthese von (6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> )-[5,5,6,7- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Hexadecansäure (22) .....	23
3.1.1.2 Synthese von (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> )-[2,3,4,4- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Hexadecansäure (31) .....	26
3.1.1.3 Synthese von (11 <i>R</i> ,12 <i>R</i> )-[10,10,11,12- <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ]-Tetradecansäure (37) .....	27
3.1.1.4 Synthese von [5,5,6- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hexadecansäure (38) .....	28
3.1.1.5 Synthese von [5,5,7- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hexadecansäure (53) .....	30
3.1.1.6 Synthetischer Zugang zu 11- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> und 12- <sup>2</sup> H <sub>1</sub> -Tetradecansäure .....	30
3.1.2 Synthese monoungesättigter und hochdeuterierter Fettsäuren aus acetylenischen Vorstufen .....	31
3.1.2.1 Synthese von ( <i>E</i> )-[8,8- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Hexadec-6-ensäure (61) .....	33
3.1.2.2 Synthese von ( <i>Z</i> )-[8,8- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Hexadec-6-ensäure (62) .....	34
3.1.2.3 Synthese von [6,6,7,7,8,8- <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-Hexadecansäure (63) .....	34
3.1.3 Synthese ungesättigter Fettsäuren durch Wittig-Olefinierung .....	34
3.1.3.1 Synthetischer Zugang zu ω-Oxoalkansäuremethylestern .....	37
3.1.3.2 Synthese von ( <i>Z</i> )-Hexadec-7-ensäure (67) .....	38
3.1.3.3 Synthese von ( <i>Z</i> )-[2,2- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Hexadec-11-ensäure (71) .....	39
3.1.3.4 Synthese von (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-Hexadeca-9,12-diensäure (75) .....	39
3.1.3.5 Synthese von (4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> )-Octadeca-4,7,10- triensäure (80) .....	40
3.1.3.6 Synthese von (5 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> )-Octadeca-5,8,11-Octadecansäure (90), (7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> )-Octadeca-7,10,13-triensäure (91), (8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> )-Octadeca-8,11,14-triensäure (92) .....	41
3.1.4 Synthese enantiospezifisch deuterierter Fettsäuren durch Wittig-Olefinierung .....	42
3.1.4.1 Synthese von (11 <i>R</i> )-[6,6,11- <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Octadec-9-ensäure .....	44
3.2. Mechanistische Charakterisierung von Desaturasen des Sphingolipidstoffwechsels höherer Pflanzen und Tiere .....	47
3.2.1 Biosynthese von Sphingolipiden .....	47
3.2.2 Mechanistische Charakterisierung der Δ <sup>8</sup> -( <i>E/Z</i> )-Desaturase aus Sonnenblumen ( <i>Helianthus annuus</i> ) .....	51

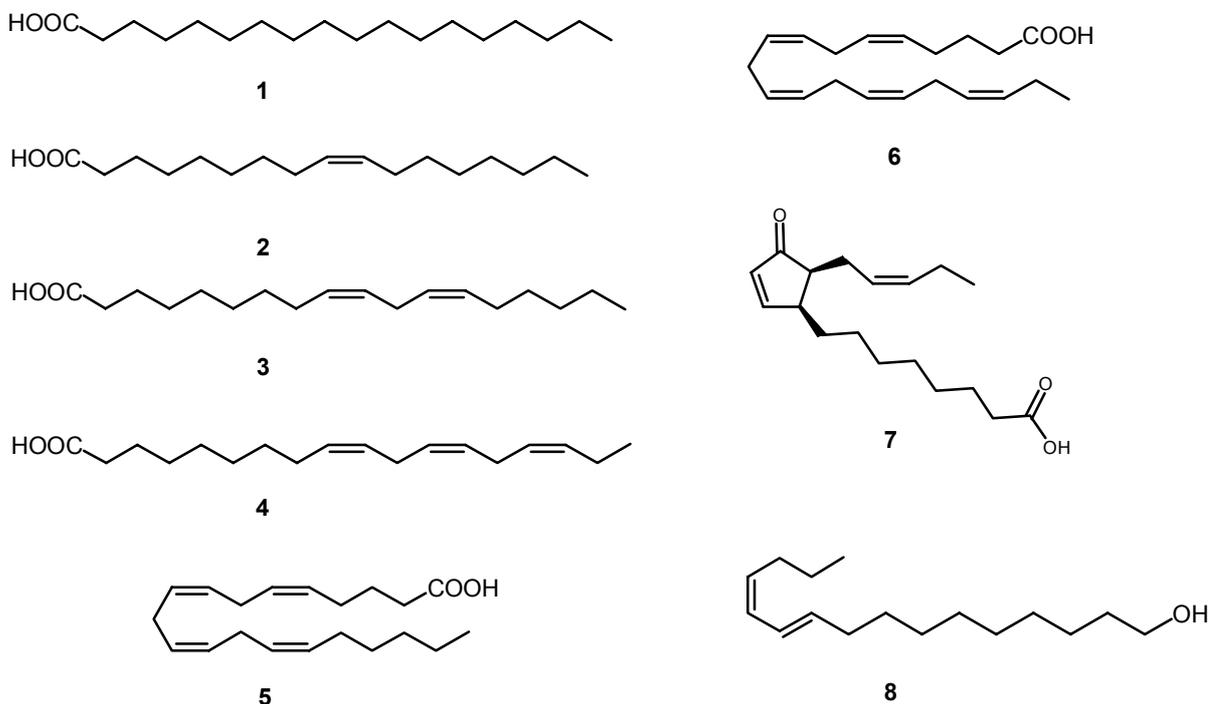
3.2.2.1 Stereochemischer Verlauf der ( <i>E</i> )- und ( <i>Z</i> )-Desaturierung .....	52
3.2.2.2 Ausschluss von unspezifischen Isomerasen.....	62
3.2.2.3 Untersuchungen zur Kryptoregiochemie .....	63
3.2.2.4 Modell zum Ursprung von ( <i>E/Z</i> )-Isomeren .....	66
3.2.2.5 Bestimmung der intrinsischen kinetischen Isotopeneffekte .....	68
3.2.2.6 Einfluss der Kettenlänge auf das Verhältnis von ( <i>8E</i> )- und ( <i>8Z</i> )- Phytosphingenin.....	73
3.2.2.7 Hydroxylierung und Desaturierung von Phytosphinganin .....	75
3.2.2.8 Zusammenfassung.....	76
3.2.3 Stereochemische Charakterisierung einer bifunktionalen $\Delta^4$ -Dihydroceramid- desaturase/C(4)-Dihydroceramidhydroxylase aus <i>Candida albicans</i> .....	78
3.2.3.1 Stereochemischer Verlauf der Desaturierung .....	78
3.2.3.2 Massenspektrometrische Untersuchung des Sphingolipidmusters.....	80
3.2.3.3 Stereoselektivität der Hydroxylierung von Dihydroceramid.....	84
3.2.3.4 Zusammenfassung.....	85
3.3 Mechanistische Untersuchung einer $\Delta^6$ -( <i>E</i> )-Fettsäuresaturase aus dem Wilden Seidenspinner <i>Antheraea polyphemus</i> .....	88
3.3.1 Stereochemische Untersuchung der $\Delta^6$ -( <i>E</i> )-Desaturase aus <i>A. polyphemus</i> .....	90
3.3.2 Kryptoregiochemie der $\Delta^6$ -Desaturase aus <i>Antheraea polyphemus</i> .....	94
3.3.3 Studien zur Sequenz der Desaturierungsschritte .....	95
3.3.4 Zusammenfassung .....	97
3.4 Mechanistischer Vergleich von stereoselektiven $\Delta^{11}$ -( <i>E</i> )- und nicht-stereoselektiven $\Delta^{11}$ - ( <i>E/Z</i> )-Desaturasen aus Insekten .....	99
3.5 Funktionelle Charakterisierung plastidiärer und mikrosomaler $\Delta^{12}$ - Fettsäuresaturasen aus der Kieselalge <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und Raps <i>Brassica napus</i> .....	102
3.6 Stereochemische Charakterisierung von (1,4)-Desaturasen (Konjugasen) .....	104
3.7 Funktionelle Charakterisierung einer Elongase aus dem Moos <i>Physcomitrella patens</i> .....	108
<b>4. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>111</b>
<b>5. Experimenteller Teil.....</b>	<b>117</b>
5.1 Materialien und Geräte.....	117
5.2 Synthese von Fettsäuren .....	118
5.3 Biologische Experimente.....	151
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>162</b>
Allgemeine Abkürzungen.....	162
Abkürzungen bei NMR-Spektren .....	163
<b>8. Publikationen und Vorträge.....</b>	<b>164</b>
Publikationen.....	164
Vorträge.....	164
<b>9. Lebenslauf.....</b>	<b>165</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>166</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>AI-AIV</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung ungesättigter Fettsäuren

Vor knapp 75 Jahren wurde die Bedeutung von ungesättigten Fettsäuren für die Ernährung von Säugetieren entdeckt. Ratten, denen man eine fettfreie Diät fütterte, litten an erheblichen Mangelerscheinungen, die sogar zum Tod der Tiere führen konnten. Durch Zugabe bestimmter Fettsäuren konnten die Stoffwechselstörungen allerdings rückgängig gemacht werden. Als wirksamer Bestandteil wurde Linolsäure (3) identifiziert, für die der Begriff essentielle Fettsäure geprägt wurde. <sup>[1]</sup>

Der biochemische Hintergrund für eine Unterteilung in essenzielle und nicht-essenzielle Fettsäuren ist der, dass Säugetieren Enzyme fehlen, um Doppelbindungen, die weiter als 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt sind, in die Kohlenwasserstoffkette einer Fettsäure einzuführen. Aus diesem Grund können Fettsäuren, wie Linol- und Linolensäure (3 und 4), von Säugetieren nicht selbst biosynthetisiert werden, sondern müssen über die Nahrung aufgenommen werden. Beide Fettsäuren dienen Säugetieren als Vorstufen für länger-kettige und hochungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure (5) oder Eicosapentaensäure (6) (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Stearinsäure (1), Ölsäure (2), Linolsäure (3), Linolensäure (4), Arachidonsäure (5), Eicosapentaensäure (6), 12-Oxophytodiensäure (7), Bombykol (8).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure (5) oder die ( $\omega$ -3)-Fettsäure Eicosapentaensäure (6), sind entweder selbst physiologisch wirksam (vgl. Kapitel 3.7) oder dienen, wie die Arachidonsäure (5), als Vorstufe für weitere Signalmoleküle. Arachidonsäure

(5) ist die wichtigste Vorstufe für eine ganze Klasse von oxygenierten Fettsäuren, die wegen ihrer Anzahl von 20 Kohlenstoffatomen als Eicosanoide bezeichnet werden. Zu den Eicosanoiden zählen Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane, die als hochaktive Signalmoleküle beispielsweise an der Blutgerinnung, der Schmerzentstehung oder am Entzündungsprozess beteiligt sind. <sup>[2]</sup>

Strukturell den Eicosanoiden sehr ähnliche Signalmoleküle findet man in höheren Pflanzen. Hier handelt es sich jedoch um Verbindungen, die von  $\alpha$ -Linolensäure (4) abgeleitet sind, dementsprechend ein C(18)-Kohlenstoffgerüst aufweisen und als Octadecanoide bezeichnet werden. Ein Vertreter dieser Substanzklasse ist z.B. 12-Oxophytodiensäure (7), die als Signalmolekül mit hormonartiger Wirkung an der Regulation der chemischen Verteidigung von Pflanzen beteiligt ist. <sup>[3]</sup>

Neben ihrer Funktion als Vorstufen für Signalmoleküle sind ungesättigte Fettsäuren wichtige Bestandteile von Zellmembranen. So ist der Anteil an ungesättigten Fettsäuren dafür verantwortlich, dass die Lipiddoppelschicht von Zellen nicht fest ist, sondern ein flüssiges Mosaik ausbildet. Dabei ist das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren nicht fest eingestellt, sondern kann variieren. So konnte sowohl für Pflanzen <sup>[4, 5]</sup> als auch für Bakterien <sup>[6]</sup> gezeigt werden, dass diese Organismen auf Hitze- oder Kälteeinfluss durch Veränderung ihres Lipidmusters reagieren und so die Fluidität der Zellmembran steuern.

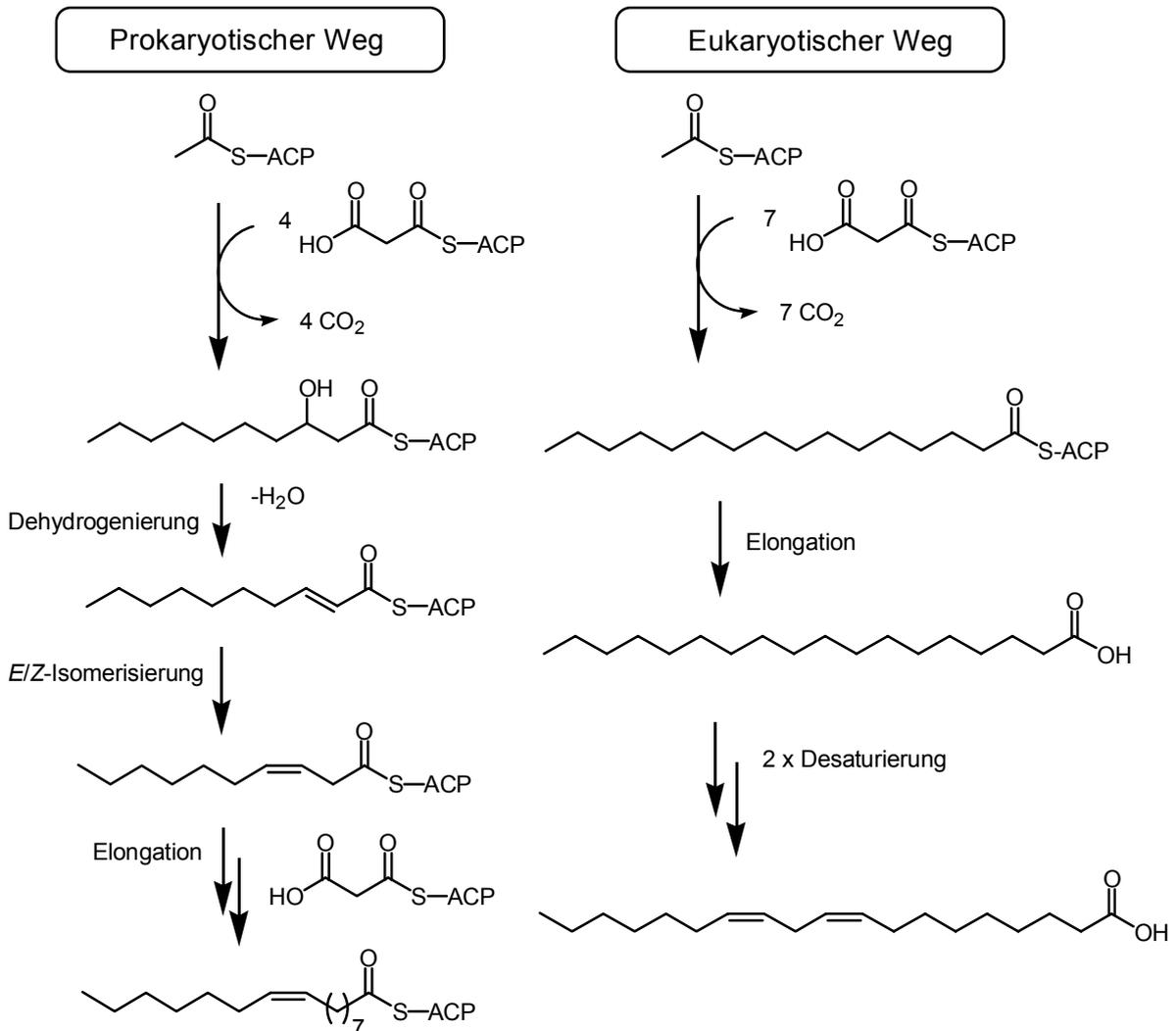
Neben Pflanzen verfügen viele Insekten über eine große Vielfalt an, im Vergleich zu Säugetieren, eher kurzkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Solche Fettsäuren werden oftmals als Vorstufen zur Biosynthese, von z.B. Sexualpheromonen wie Bombykol (8), genutzt und dienen somit der innerartlichen Kommunikation (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). <sup>[7]</sup>

## **1.2 Biosynthese ungesättigter Fettsäuren**

Zur Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren stehen Lebewesen unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Seit den Arbeiten von Konrad Bloch vor 40 Jahren ist bekannt, dass es neben einem sauerstoffabhängigen auch einen sauerstoffunabhängigen Weg zur Einführung von Doppelbindungen in Fettsäuren gibt. <sup>[8]</sup> Der wesentliche Unterschied zwischen diesen beiden Biosyntheserouten besteht darin, dass auf dem sauerstoffunabhängigen Weg lediglich einfach ungesättigte Fettsäuren gebildet werden können. <sup>[9, 10]</sup>

Aerob lebende Organismen können einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren über den sauerstoffabhängigen Weg herstellen. Der Aufbau des Kohlenstoffgerüsts erfolgt dabei an einem als Fettsäuresynthase (FAS) bezeichneten Multienzymkomplex, wobei eine Acetyl-ACP-Startereinheit um C<sub>2</sub>-Einheiten, die von Malonyl-ACP geliefert werden, verlängert wird. Die kettenverlängernden Zyklen werden wiederholt, bis eine Kettenlänge von 16 Kohlenstoffatomen erreicht ist. Erst dann wird die Acylkette in Form von Palmitinsäure von

dem Acyl-Carrier-Protein (ACP) abgespalten und steht als zentraler Baustein weiteren Modifikationen zur Verfügung. Die wichtigsten Modifikationen, die sich an die Biosynthese der gesättigten Palmitinsäure anschließen, sind zum einen kettenverlängernde Schritte, die von Elongasen ausgeführt werden, und zum anderen das Einführen von einer oder mehreren Doppelbindungen, welches von sauerstoffabhängigen Desaturasen übernommen wird.



**Abbildung 2:** links: anaerober Biosyntheseweg zu einfach ungesättigten Fettsäuren, wie Palmitölsäure; rechts: aerober Biosyntheseweg zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linölsäure.

Bei dem z.B. von prokaryotischen Bakterien, wie *Escherichia coli*, beschrittenen nicht-sauerstoffabhängigen Weg werden einfach ungesättigte Fettsäuren, wie Palmitölsäure, über den anaeroben Weg synthetisiert. Wie bei der aeroben Fettsäurebiosynthese beginnt diese Route mit der wiederholten Verlängerung einer ACP-gebundenen Acetyleinheit mit Malonyl-ACP-Einheiten. Sobald eine Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen erreicht ist, wird die gebildete ACP-gebundene 3-Hydroxydecanoil-Säure unter Abspaltung von Wasser dehydriert, wobei (E)-2-Decenoil-ACP entsteht. Abweichend von der aeroben Fettsäurebiosynthese

wird durch stereoselektive Umlagerung (Z)-3-Decenoyl-ACP gebildet, welches nachfolgend durch weitere Malonyleinheiten bis zur Palmitölsäure verlängert wird (siehe Abbildung 2).<sup>[8]</sup>

Bis vor kurzem glaubte man, dass anaerob lebende Organismen nicht in der Lage seien, mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu erzeugen. Seit wenigen Jahren zeichnet sich jedoch ab, dass neben diesen beiden klassischen Biosynthesewegen ein weiterer Weg existiert. Offensichtlich können marine Bakterien Polyketid-Synthasen dazu verwenden, um mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure (**5**) oder Eicosapentaensäure (**6**) zu erzeugen (siehe Kapitel 3.7).<sup>[9, 11, 12]</sup>

Obwohl dieser „neue“ Weg eine weitere Möglichkeit darstellt, mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu biosynthetisieren, ist der „klassische“ Weg unter Beteiligung von Desaturasen wichtiger und weiter verbreitet.

### **1.3 Nomenklatur von Desaturasen**

Ganz allgemein handelt es sich bei Desaturasen um Enzyme, die in der Lage sind, regiospezifisch Doppelbindungen in aliphatische Bereiche von Biomolekülen, wie z.B. Fettsäuren<sup>[13-15]</sup>, Sphingolipiden<sup>[16, 17]</sup> oder Sterole<sup>[18]</sup> einzuführen. Die reinen Fettsäuredesaturasen bilden die bei weitem größte Klasse, wobei zwei Gruppen unterschieden werden können. Einerseits kennt man Desaturasen, die eine erste Doppelbindung in das Kohlenstoffgerüst einer vollständig gesättigten Fettsäure einführen. Ein Beispiel hierfür ist die in allen lebenden Organismen vorkommende  $\Delta^9$ -Desaturase, welche die Überführung von Stearinsäure (**1**) in Ölsäure (**2**) katalysiert. Andererseits kennt man Desaturasen, die Doppelbindungen zu bereits im Molekül vorhandenen Unsättigungen hinzufügen. Wird die neue Doppelbindung zwischen der polaren Kopfgruppe und der bereits existierenden Doppelbindung erzeugt, bezeichnet man diese Desaturasen als „front-end“-Desaturasen. Wird hingegen die neue Doppelbindung zwischen einer bereits vorhandenen Doppelbindung und dem Alkylterminus erzeugt, spricht man von „methyl-end“-Desaturasen. Entsprechend dieser Unterteilung sind zwei Nomenklaturen zur Bezeichnung von Desaturasen gebräuchlich. Bei der  $\Delta$ -Nomenklatur wird die Position, an der die Desaturase eine Doppelbindung einführt, von der Carboxylgruppe durchnummeriert und durch ein  $\Delta$ -Symbol gekennzeichnet. Demnach erzeugt eine  $\Delta^{9Z}$ -Stearoyl-Desaturase eine *cis*-Doppelbindung zwischen C(9) und C(10) von Stearinsäure (**1**) und liefert Ölsäure (**2**) als Produkt. Bei der  $\omega$ -Nomenklatur wird die Kohlenstoffkette vom Alkylende durchgezählt. Eine Desaturase, die Ölsäure in Linolsäure (**4**) überführt, indem eine Doppelbindung zwischen C(12) und C(13) erzeugt wird, kann somit als  $\Delta^{12}$ -Desaturase oder aber auch als ( $\omega$ -6)-Desaturase bezeichnet werden.

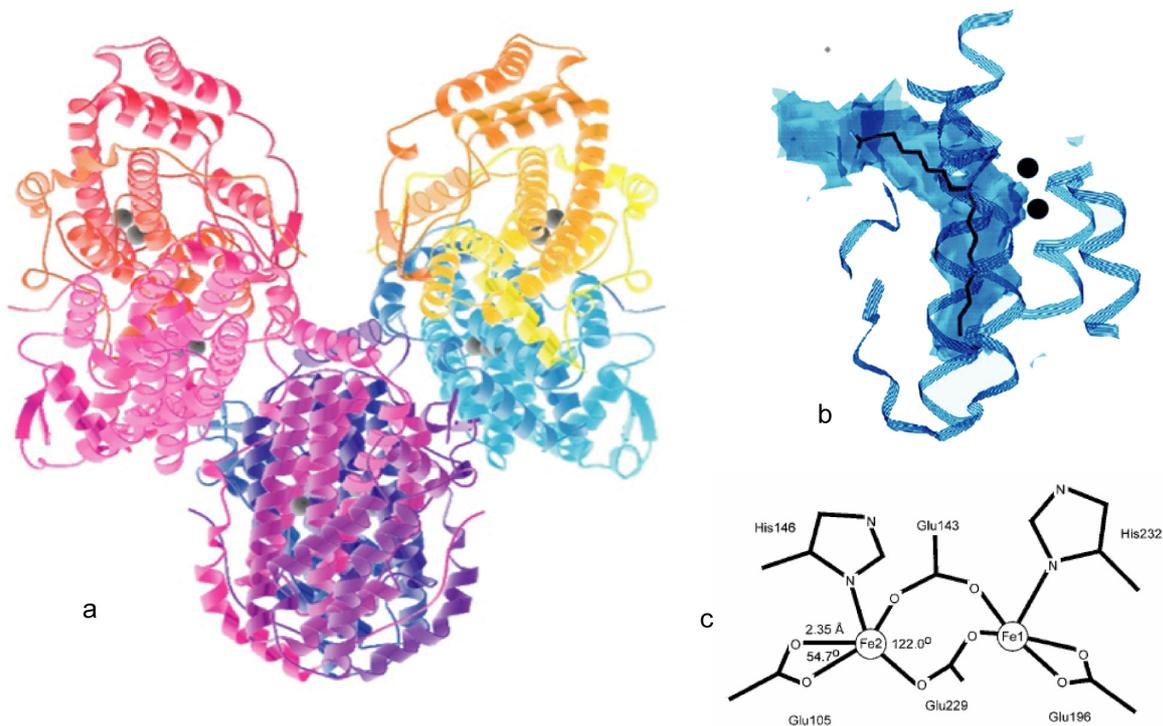
## 1.4 Einteilung von Fettsäuredesaturasen

Desaturasen lassen sich in zwei Klassen einteilen: in eine kleinere Klasse von löslichen Desaturasen, die bis heute lediglich in Pflanzen gefunden wurden und eine bei weitem größere Klasse von membrangebundenen Desaturasen, die in fast allen Lebewesen vorkommen. <sup>[13, 14]</sup>

Eine Gemeinsamkeit membrangebundener und löslicher Desaturasen ist, dass nicht freie, sondern veresterte Fettsäuren die eigentlichen Substrate bilden. Obwohl die genaue Form der Substrate bei den meisten Desaturasen unbekannt ist, gilt, dass lösliche Desaturasen mit ACP-veresterte Fettsäuren als Substrate akzeptieren, während membrangebundene Desaturasen lipidgebundene Fettsäuren oder mit Coenzym A veresterte Fettsäuren als Substrate umsetzen.

### 1.4.1 Lösliche Desaturasen

Die Fettsäurebiosynthese von Pflanzen findet in Plastiden wie z.B. den Chloroplasten statt. <sup>[5, 19]</sup> Diese Organellen enthalten neben membrangebundenen Desaturasen auch die lösliche Form einer  $\Delta^9$ -Stearyl-ACP-Desaturase. Solche löslichen  $\Delta^9$ -Desaturasen wurden aus einer Reihe von Pflanzen isoliert, wobei die  $\Delta^9$ -Desaturase aus *Ricinus communis* am besten charakterisiert ist. <sup>[13, 15, 20-29]</sup> Das Ziel der Arbeiten an dieser löslichen Desaturase ist, zu einem umfassenden Verständnis der strukturellen und mechanistischen Eigenschaften von Desaturasen zu gelangen. Einen Meilenstein stellt die 1996 von Lindqvist *et al.* veröffentlichte Röntgenstruktur der  $\Delta^9$ -Desaturase aus *Ricinus communis* dar <sup>[21]</sup>, bei der es sich bis heute um die einzige Desaturase handelt, von der Röntgenstrukturdaten verfügbar sind. <sup>[30]</sup> Abbildung 3 zeigt die insgesamt drei Untereinheiten der Desaturase, wobei jede Untereinheit aus einem Dimer besteht. Eingebettet in die Proteinhülle eines jeden Monomers befindet sich ein Di-Eisenzentrum, welches das aktive Zentrum der Desaturase bildet (siehe Abbildung 3b und 3c).



**Abbildung 3:** a) Röntgenstruktur der löslichen  $\Delta^9$ -Stearyl-ACP-Desaturase aus *Ricinus communis*; b) hydrophober Substratkanal mit modelliertem Substrat; c) Blick auf den  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -Komplex im aktiven Zentrum des Enzyms.

In der Nähe des aktiven Zentrums kann ein hydrophober Kanal identifiziert werden, in dem eine hineinmodellerte Stearinsäure so zu liegen kommt, dass die Methylengruppen dem Eisenzentrum exponiert sind, zwischen denen die Doppelbindung gebildet wird (siehe Abbildung 3b). Ein Blick auf die unmittelbare Umgebung der Eisenzentren zeigt, dass die Metallatome von Glutamat- und Histidinliganden koordiniert sind (siehe Abbildung 3c). Dieses Koordinationsmuster aus zwei Histidin- und vier Glutamatliganden, wobei ein Glutamat-Rest durch Aspartat ersetzt sein kann, ist charakteristisch für lösliche Desaturasen. Abgekürzt mit dem Einbuchstabencode für Aminosäuren bezeichnet man diese Gemeinsamkeit auch als  $[(D/E)X_2H]_2$  Konsensus-Motiv.

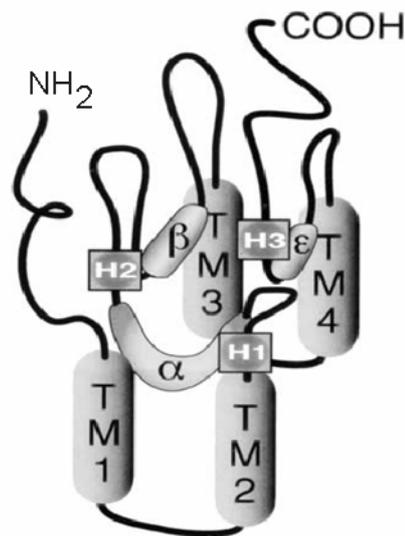
Kürzlich wurden weitere Kristallstrukturen der löslichen  $\Delta^9$ -Desaturase aus *R. communis* mit gebundenem Azid und Acetat veröffentlicht. <sup>[30]</sup> Alle bis heute verfügbaren Kristallstrukturen zeigen jedoch ausschließlich die  $\Delta^9$ -Desaturase in ihrer nicht mit Sauerstoff aktivierten und damit nicht zur Katalyse befähigten Form. Röntgenstrukturdaten von Desaturasen mit gebundenem Sauerstoff und/oder gebundenem Substrat existieren bis heute nicht.

### 1.4.2 Membrangebundene Desaturasen

Trotz intensiver Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, die Röntgenstruktur einer membrangebundenen Desaturase zu erhalten. Deshalb stützt sich das Wissen über membranassoziierte Desaturasen vor allem auf die Ergebnisse aus bioinformatischen

Ansätzen. Hierzu wurden innerhalb der letzten Jahre in schneller Abfolge mehr als 400 Desaturasen unterschiedlicher Herkunft kloniert und deren Sequenzdaten miteinander verglichen. <sup>[31, 32]</sup> Auf Basis der abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnte ein allgemeines Modell der Struktur membrangebundener Desaturasen entworfen werden. <sup>[31, 32]</sup> Alle Desaturasen weisen in ihrer Aminosäuresequenz ausgeprägte hydrophobe Bereiche auf, von denen man annimmt, dass sie vier transmembranen Helices (TM1-4) entsprechen (siehe Abbildung 4). <sup>[13, 31, 32]</sup> Zwischen diesen hochkonservierten transmembranen Bereichen finden sich weitere, variabelere hydrophobe Domänen ( $\alpha, \beta, \epsilon$ ). Mit diesen Abschnitten verbunden sind drei histidinreiche Segmente (H1-H3). Da bis auf einzelne Ausnahmen alle membrangebundenen Desaturasen diese, aus insgesamt acht Histidinresten bestehenden, so genannten Histidinboxen besitzen, geht man davon aus, dass diese Aminosäuren für die Koordination der Di-Eisenzentren im aktiven Zentrum verantwortlich sind. <sup>[13, 15, 31]</sup> Zudem konnten Shanklin *et al.* durch gerichtete Mutagenese zeigen, dass jedes der 8 Histidine für die katalytische Aktivität einer  $\Delta^9$ -Desaturase aus der Ratte notwendig ist. <sup>[33]</sup>

Es ist gut vorstellbar, dass die variablen hydrophoben Bereiche  $\alpha, \beta$  und  $\epsilon$  sowohl die Lage der Histidinboxen festlegen, als auch die Größe der Substrattasche beeinflussen. Durch Variation dieser Bereiche ließe sich so die Kettenlängenspezifität und die Regiokontrolle von membranständigen Desaturasen beeinflussen. <sup>[31, 32]</sup>



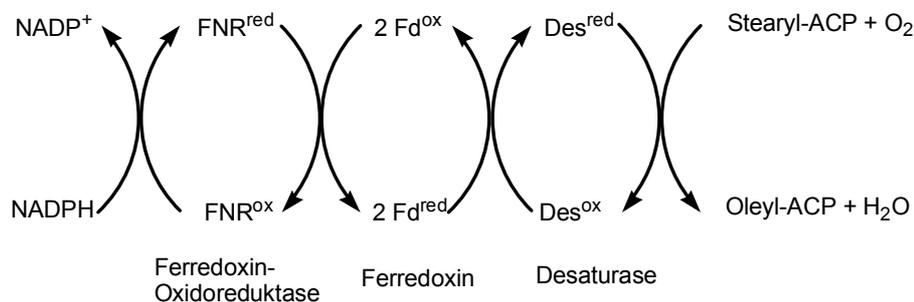
**Abbildung 4:** Modell membrangebundener Desaturasen (TM1-4: transmembrane Helices; H1-H3: Histidinboxen;  $\alpha, \beta, \epsilon$ : variable hydrophobe Bereiche). <sup>[32]</sup>

## 1.5 Mechanistische Aspekte von Desaturasen

### 1.5.1 Die Elektronentransportkette

Bei der Einführung von Doppelbindungen durch Desaturasen handelt es sich um einen sauerstoffabhängigen Prozess. Bereits K. Bloch konnte durch seine Arbeiten seit den 1960er

Jahren zeigen, dass neben der Desaturase und molekularem Sauerstoff weitere Co-Faktoren und Co-Enzyme an dem Desaturierungsprozeß beteiligt sind (siehe Abbildung 5).<sup>[8]</sup> Diese fungieren als Elektronenüberträger, um die Desaturase nach der Desaturierung aus ihrer oxidierten Form wieder in die reduzierte Form zu überführen und so den Katalysezyklus zu schließen. Die von löslichen und membrangebundenen Desaturasen verwendeten Elektronentransportsysteme unterscheiden sich im Detail. Bei der Elektronentransportkette von löslichen Desaturasen werden zunächst zwei Elektronen von NADPH auf das Flavoprotein NADPH-Ferredoxin-Oxidoreduktase übertragen, welches anschließend beide Elektronen einzeln auf zwei Ferredoxin-Proteine überträgt. Jedes Ferredoxin überträgt schließlich ein Elektron auf eines der beiden Eisenzentren der oxidierten Desaturase.<sup>[13]</sup>



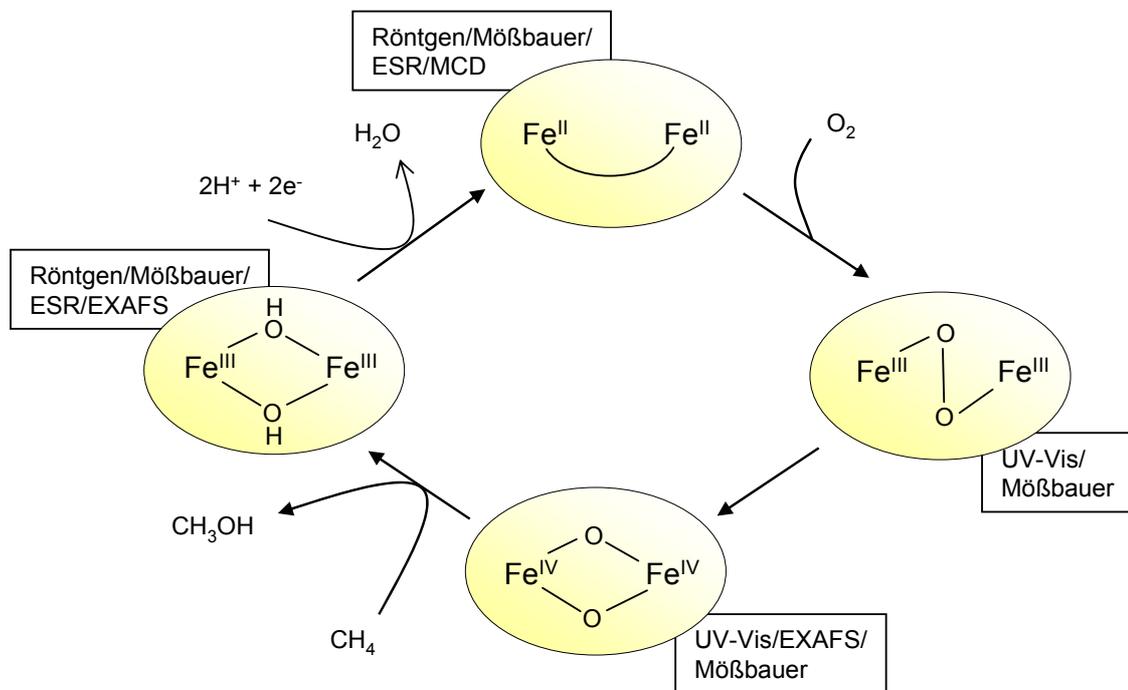
**Abbildung 5:** Elektronentransportkette löslicher  $\Delta^9$ -ACP-Desaturasen.

Der Elektronentransport in membrangebundenen Desaturasen verläuft analog, lediglich die verwendeten Elektronenüberträger unterscheiden sich. Die benötigten Elektronen werden in diesem Fall von NADH/H<sup>+</sup> zur Verfügung gestellt, auf das Flavoprotein Cytochrom b<sub>5</sub>-Reduktase übertragen und von diesem an den Einelektronenüberträger Cytochrom b<sub>5</sub> weitergegeben. Cytochrom b<sub>5</sub>, das bei vielen „front end“-Desaturasen direkt mit der Desaturase verbunden ist,<sup>[34, 35]</sup> stellt das letzte Element der Kaskade dar und überführt die Desaturase von der oxidierten in die reduzierte Form.

### 1.5.2 Rolle des katalytisch aktiven Di-Eisenzentrums

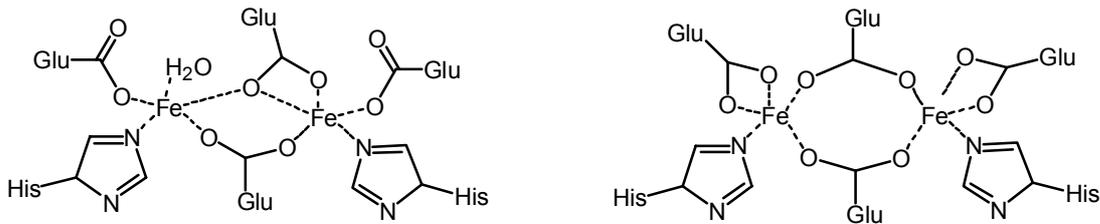
Nachdem das Di-Eisenzentrum durch Elektronenübertragung von Cytochrom b<sub>5</sub> bzw. Ferredoxin von seiner Fe<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>-Form zur Fe<sup>II</sup>Fe<sup>II</sup>-Form reduziert wurde, erfolgt in einem nächsten Schritt die Bindung von molekularem Sauerstoff durch das Di-Eisenzentrum. Dabei wird der zur Desaturierung befähigte, mit Sauerstoff aktivierte, Di-Eisenkomplex gebildet. Die Vorstellung, über welche Zwischenstufen die Sauerstoffkomplexierung verläuft und welche Struktur der katalytisch aktive Eisenkomplex besitzt, resultiert zu einem Großteil aus dem Vergleich der löslichen  $\Delta^9$ -Desaturase aus Rizinus mit der löslichen Form der Methanmonooxygenase (sMMO). Bei der löslichen MMO handelt es sich um ein Enzym, das die wirtschaftlich interessante Hydroxylierung von Methan zu Methanol katalysiert und ebenfalls ein nichthäm-gebundenes Di-Eisenzentrum enthält. Im Gegensatz zur löslichen  $\Delta^9$ -

Desaturase existieren von Methanmonooxygenasen verschiedener Herkunft Röntgenstrukturen, die dieses Enzym sowohl in seiner reduzierten  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form als auch in seiner mit Hydroxid-Gruppen verbrückten  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form zeigen. In den letzten Jahren konnten mit Hilfe von spektroskopischen Methoden <sup>[36]</sup> und zunehmend auch durch quantenchemische Rechnungen <sup>[37-39]</sup> die übrigen Stadien des Katalysezyklus ergänzt werden. <sup>[40-43]</sup> Heute wird deshalb allgemein angenommen, dass aus der reduzierten Form der sMMO durch Anlagerung von molekularem Sauerstoff in einem ersten Schritt ein Peroxokomplex gebildet wird. In einem nachfolgenden Schritt lagert sich dieser in einen rautenförmigen Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-komplex um, bei dem beide Eisenatome in der formalen Oxidationsstufe +IV vorkommen. Dieser auch als „Compound Q“ bezeichnete Eisenkomplex gilt als reaktive Spezies und katalysiert die Oxidation von Methan zu Methanol, wobei der Di-Eisenkomplex in seine  $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Fe}^{\text{III}}$ -Form überführt wird (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Katalysezyklus der Hydroxylierung von Methan durch die lösliche Methanmonooxygenase (MMO). Die verschiedenen spektroskopischen Methoden zur Charakterisierung der Komplexe sind jeweils angegeben.

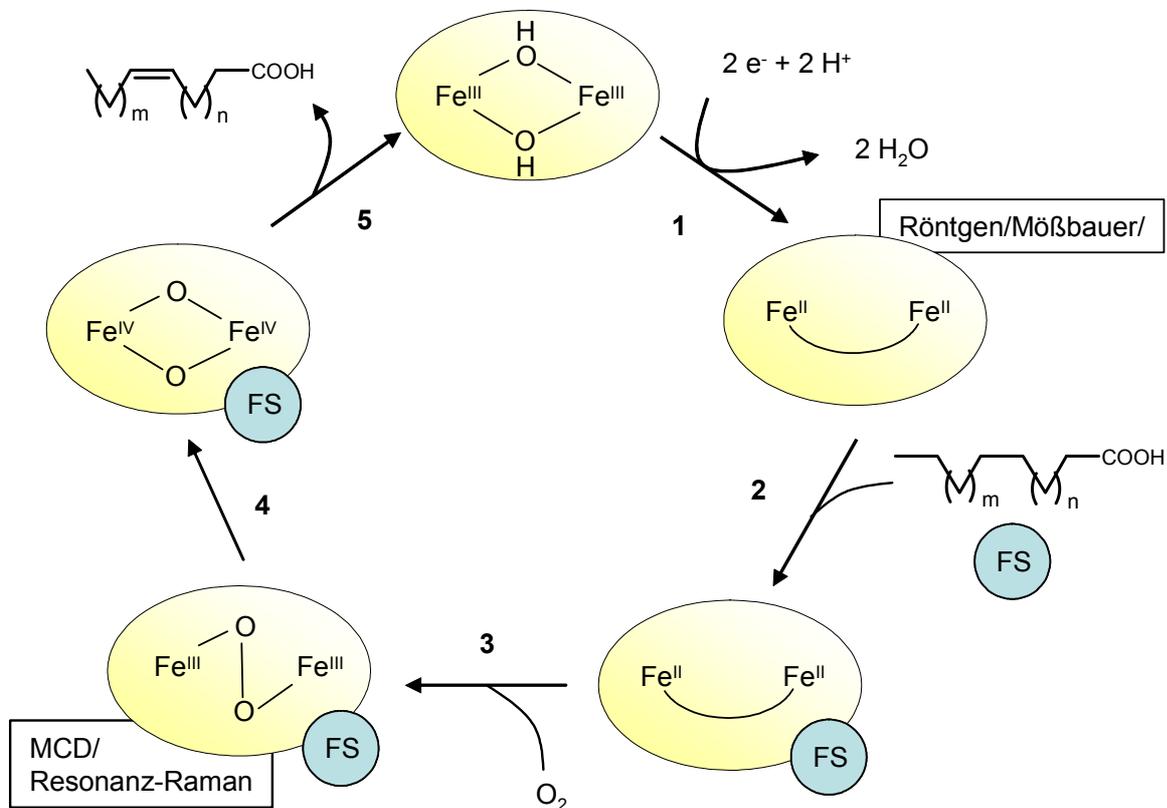
Aufgrund der großen Übereinstimmung in der Ligandenumgebung der Di-Eisenzentren von löslicher  $\Delta^9$ -Desaturase und löslicher MMO (siehe Abbildung 7) in der reduzierten  $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{II}}$ -Form geht man allgemein davon aus, dass die Komplexierung von Sauerstoff analog zur sMMO auch in Desaturasen über Peroxo-Zwischenstufen zu Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-komplexen mit rautenförmiger Struktur führt. Diese Annahme wird durch Untersuchungen mittels Mößbauer- und Resonanz-Raman-Spektroskopie an der löslichen  $\Delta^9$ -Desaturase aus Rizinus bestätigt. <sup>[15, 26, 28, 40, 44]</sup>



**Abbildung 7:** Vergleich der aktiven Zentren von reduzierter löslicher MMO (links) und  $\Delta^9$ -ACP-Desaturase (rechts).

Als experimenteller Hinweis auf die Existenz eines Bis( $\mu$ -oxo)dieisenzentrums kann man Ergebnisse von Que *et al.* werten, die zeigen konnten, dass synthetische Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(III,IV)-komplexe mit Ethylbenzen als Substrat eine, wenn auch schwache, Hydroxylierungs- und Desaturierungsaktivität zeigen. [45, 46]

Bis heute ist es nicht gelungen, die zur Charakterisierung der löslichen  $\Delta^9$ -Desaturase eingesetzten spektroskopischen Methoden auf die Untersuchung von membrangebundenen Desaturasen zu übertragen. Streng genommen muss deshalb die Struktur des reaktiven Di-Eisenkomplexes für membrangebundene Desaturasen als unbekannt angesehen werden. Aufgrund der Parallelen zwischen der Ligandenumgebung von membranständigen und löslichen Desaturasen, abgeleitet aus den Sequenzhomologien, ist es jedoch wahrscheinlich, dass die Sauerstoffkomplexierung ebenfalls zu einem Bis( $\mu$ -oxo)dieisen(IV)-komplex führt.

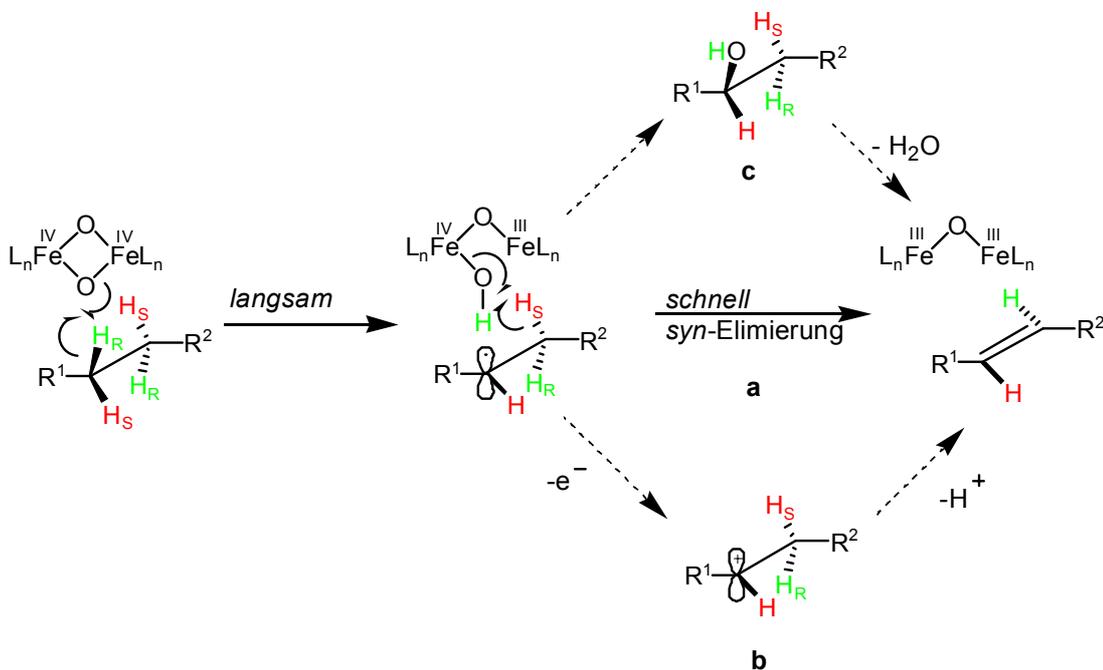


**Abbildung 8:** Postulierter Katalysezyklus für die Desaturierung von Fettsäuren.

Abbildung 8 zeigt schematisch einen Katalysezyklus, wie er zumindest für die lösliche  $\Delta^9$ -Desaturase aus Rizinus angenommen werden kann. Dabei sind experimentelle und spektroskopische Befunde berücksichtigt, die zeigen, dass die Substratbindung der Sauerstoffkomplexierung vorausgeht. <sup>[20, 26, 28, 47]</sup> Aktuelle Untersuchungen zur Kinetik des Desaturierungsprozesses deuten zudem darauf hin, dass möglicherweise die Schritte 1 und 2 in Abbildung 8 in umgekehrter Reihenfolge verlaufen. <sup>[20]</sup> Eine Umordnung der Ligandensphäre, die als Folge der Substratbindung angenommen wird, ist nicht dargestellt. <sup>[28, 47]</sup>

### 1.6 Mechanismus der Desaturierung

Seit mehr als 40 Jahren ist die Frage, wie Desaturasen zwei Wasserstoffatome aus benachbarten unaktivierten Methylengruppen entfernen, um so entweder (*E*)- oder (*Z*)-Doppelbindungen zu erzeugen, Gegenstand intensiver Forschung. <sup>[8, 13, 48]</sup> Um den mechanistischen Verlauf der Desaturierung zu studieren, wurden zunächst Substratsonden mit Tritium- und <sup>13</sup>C-Markierung eingesetzt. Seit der Etablierung der Massenspektrometrie finden nahezu ausschließlich deuteriumsubstituierte Sonden Verwendung. Auf Basis der Experimente mit solchen isotoopenmarkierten Substratsonden und dem Wissen über die an der Katalyse beteiligten Di-Eisen-Komplexe konnte ein mechanistisches Modell entworfen werden, das in Übereinstimmung mit allen experimentellen Daten ist (siehe Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Verschiedene mechanistische Modelle der Desaturierung: **a)** radikalischer Disproportionierungs-Mechanismus; **b)** Mechanismus über Carbokation; **c)** Mechanismus über Alkohol als Zwischenstufe.

Dieses Modell nimmt als reaktive Spezies einen Bis(μ-oxo)di-eisen(IV)-Komplex an, der in einem ersten energetisch aufwendigen Schritt eine nicht-aktivierte C-H-Bindung spaltet.

Unter Abstraktion eines Wasserstoffatoms entsteht dabei eine kurzlebige Zwischenstufe. Unmittelbar auf diesen ersten Schritt folgt der Verlust eines weiteren Wasserstoffatoms von der benachbarten Methylengruppe, wobei die Doppelbindung entsteht und Wasser gebildet wird. Zur Struktur des kurzlebigen Intermediats und dessen Zerfalls existieren verschiedene Vorschläge. Von den meisten Autoren wird ein Modell favorisiert, wie es in Abbildung 9a gezeigt ist. <sup>[49-52]</sup> An die Generierung einer radikalischen Zwischenstufe schließt sich die schnelle Disproportionierung dieser Spezies an, wobei das Olefin, der reduzierte Fe<sup>III</sup>Fe<sup>III</sup>-Eisenkomplex und Wasser entstehen (Weg a). <sup>[53]</sup> Von anderen Autoren wird vorgeschlagen, dass ein Carbokation durch Übertragung eines Elektrons von der radikalischen Zwischenstufe auf das Di-Eisenzentrum gebildet wird. Durch anschließende Deprotonierung wird dann das Olefin gebildet (Weg b). <sup>[54]</sup> Auch für den Mechanismus der Methanmonooxygenase wurde das Auftreten möglicher kationischer Zwischenstufen durch Oxidation eines radikalischen Intermediats vorgeschlagen. Dieser Weg gilt jedoch inzwischen als unwahrscheinlich. <sup>[55]</sup> Als dritte Alternative kommt eine Route in Frage, bei der eine Rückübertragung der eisengebundenen Hydroxygruppe auf die radikalische Zwischenstufe erfolgt, woran sich die schnelle, von der Lewis-Säure Fe(III) vermittelte Eliminierung von Wasser anschließt (Weg c). Dieser Weg gilt jedoch ebenfalls als wenig wahrscheinlich, da bereits in Arbeiten von Bloch *et al.* gezeigt werden konnte, dass weder 9-Hydroxy- noch 10-Hydroxystearinsäure in Hefen zu Ölsäure metabolisiert werden. <sup>[56]</sup>

Die unterschiedlichen Vorschläge über die Struktur des kurzlebigen Intermediats (Radikal oder Carbokation) und sein weiteres Schicksal ähnelt zu einem gewissen Grad der derzeit intensiv und kontrovers geführten Diskussion zum Mechanismus der Methanmonooxygenase. <sup>[43, 55, 57, 58]</sup> Hier haben die zum Teil widersprüchlichen experimentellen Ergebnisse mit Radikalfallen und Radikaluhren (radical traps und radical clocks) <sup>[59], [55, 60-64]</sup> dazu geführt, dass mittlerweile insgesamt vier verschiedene, durch quantenmechanische Rechnungen gestützte, Modelle existieren, die den Mechanismus der Hydroxylierung von Methan zu erklären versuchen. Die mechanistischen Vorschläge reichen dabei von einem nicht-radikalischen Weg, der eine starke Wechselwirkung zwischen dem Substrat und einem der Eisen-Ionen annimmt, <sup>[58]</sup> bis zu einem Modell, das als Zwischenstufe ein Carbokation voraussetzt. <sup>[43, 65]</sup> Andere Autoren schlagen die Existenz eines asynchron-konzertierten zusätzlich zu einem „klassischen“ rebound-Mechanismus vor, bei dem das Auftreten kohlenstoffzentrierter Radikale ausbleibt. <sup>[55, 64, 66]</sup> Trotz dieser Unterschiede herrscht in einigen Punkten Einigkeit in Bezug auf die mechanistischen Aspekte der Hydroxylierung. Einerseits wird allgemein akzeptiert, dass bei der Hydroxylierung durch MMO kurzlebige Zwischenstufen entstehen, die eine homolytische Spaltung einer C-H-Bindung voraussetzen. Andererseits werden von den meisten Autoren so genannte „gebundene Radikale“ (bound radicals) als Intermediate angenommen, also

Radikale, deren Freiheitsgrade eingeschränkt sind und daher in ihrer Reaktivität limitiert sind. [55, 57, 67]

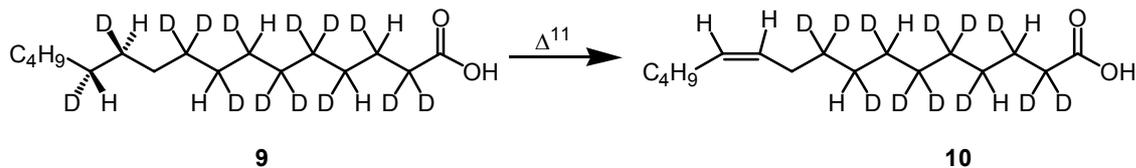
Vor dem Hintergrund der Diskussion über die mechanistischen Details der löslichen Methanmonooxygenase und der strukturellen Verwandtschaft von löslicher Desaturase und Methanmonooxygenase ist das Bild eines kohlenstoffzentrierten Radikals als Zwischenstufe der Desaturierung möglicherweise nur eine erste Näherung. Zwei Punkte sind jedoch für den Desaturierungsprozess von zentraler Bedeutung:

- Es handelt sich um einen suprafacialen Prozess, d.h. der Verlust von zwei Wasserstoffatomen erfolgt als *syn*-Eliminierung. Dabei verläuft die Eliminierung unter absoluter Stereokontrolle, da das Substrat ausschließlich aus einem Halbraum heraus angegriffen wird.
- Der initiale C-H-Bindungsbruch ist geschwindigkeitsbestimmend und führt zu einer kurzlebigen Zwischenstufe. Der anschließende Verlust eines benachbarten Wasserstoffatoms erfolgt hingegen sehr schnell und ist damit nicht mehr für den Desaturierungsprozess geschwindigkeitsbestimmend.

Diese beiden Punkte wurden durch eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen sowohl für Desaturasen, die (*Z*)-, als auch für Desaturasen, die (*E*)-Olefine erzeugen, bestätigt. Alle Erkenntnisse basieren dabei auf Experimenten mit Substratsonden, die einerseits der Untersuchung zum stereochemischen Verlauf und andererseits der Bestimmung von kinetischen Isotopeneffekten dienen.

### 1.6.1 Untersuchungen zum stereochemischen Verlauf der Desaturierung

Um den stereochemischen Verlauf der Desaturierung unbekannter Desaturasen aufzuklären, hat es sich bewährt, Substratsonden einzusetzen, die an den von der Desaturierung betroffenen Methylengruppen enantioselektiv isotoopenmarkiert sind. [52, 68-71] Während in frühen Arbeiten oft tritiummarkierte Substratsonden eingesetzt wurden und der Verlust an Radioaktivität als Folge der Desaturierung beobachtet wurde, werden heute ausschließlich deuteriummarkierte Sonden eingesetzt. Nach Umsetzung dieser Substrate mit der relevanten Desaturase können die Metabolite massenspektrometrisch untersucht werden. Anhand der aufgetretenen Deuterium- bzw. Wasserstoffverluste kann letztlich zwischen einem *syn*- oder einem *anti*-Eliminierungsmechanismus unterschieden werden. Diese Strategie ist am Beispiel der  $\Delta^{11}$ -Desaturase aus *Mamestra brassicae* verdeutlicht. Die Desaturierung von (11*S*,12*R*)-[<sup>2</sup>H<sub>14</sub>]-Palmitinsäure<sup>[72]</sup> führt zum Verlust beider enantiospezifisch eingebrachten Deuteriummarkierungen und beweist damit, dass die Desaturierung im Sinne einer *syn*-Eliminierung unter Verlust des C(11)-H<sub>R</sub> und des C(12)-H<sub>R</sub> erfolgt. [68]



**Abbildung 10:** Desaturierung von enantiospezifisch markierter Palmitinsäure **9** durch eine  $\Delta^{11}$ -Desaturase aus *Mamestra brassicae*.

Der stereochemische Verlauf, bei dem ein pro(*R*)-Wasserstoff von der der Carboxylgruppe näheren Methylengruppe und ein weiteres pro(*R*)-Wasserstoffatom von der weiter entfernten Methylengruppe abstrahiert wird, ist in allen bis heute untersuchten (*Z*)-selektiven Desaturasen identisch. Damit verlaufen nicht nur alle Desaturierungen zu (*Z*)-Doppelbindungen als *syn*-Eliminierungen, sondern darüber hinaus in allen Desaturasen mit identischer absoluter Stereoselektivität.

Im Gegensatz zu der großen Anzahl an Desaturasen, die (*Z*)-Doppelbindungen generieren, gab es bis zu Beginn dieser Arbeit nur ein literaturbekanntes Beispiel, bei dem die Stereochemie einer (*E*)-Desaturase untersucht wurde. Bei dieser Desaturase handelt es sich um die  $\Delta^{11}$ -(*E*)-Fettsäuredesaturase aus der Motte *Spodoptera littoralis*. Auch hier erfolgt die Einführung der Doppelbindung als *syn*-Eliminierung unter analoger absoluter stereofacialer Kontrolle, wie sie für alle (*Z*)-Desaturasen berichtet wurde. Dabei werden der pro(*R*)-Wasserstoff von C(11) sowie der pro(*S*)-Wasserstoff von C(12) abgespalten. <sup>[69]</sup>

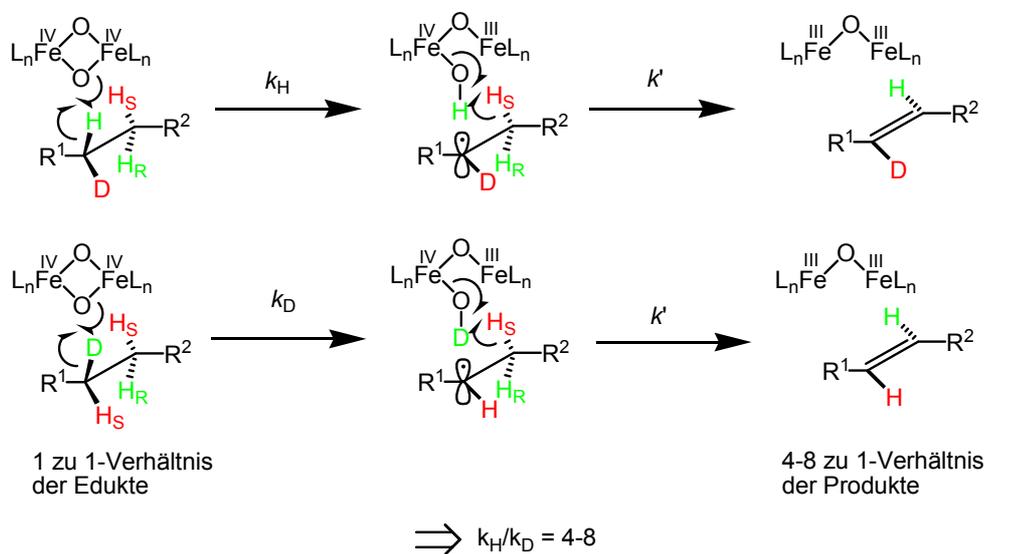
### 1.6.2 Bestimmung kinetischer Isotopeneffekte

Zusätzlich zu den Untersuchungen zum stereochemischen Verlauf mit enantiospezifisch markierten Substratsonden lassen sich weitere mechanistische Aspekte der Desaturierung durch die Bestimmung von kinetischen Isotopeneffekten aufklären.

Bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Wasserstoff und Deuterium unterscheiden sich die Frequenzen einer C-H- von der einer C-D-Streckschwingung im Schwingungsgrundzustand. Die damit verbundene Nullpunktsenergie ist für eine C-D-Bindung niedriger als für eine C-H-Bindung. Um eine C-D-Bindung zu brechen, muss zum Erreichen des Übergangszustandes mehr Energie aufgebracht werden, als für eine C-H-Bindung. Daher unterscheiden sich die Reaktionsgeschwindigkeiten für eine C-D- und eine C-H-Bindungsspaltung voneinander; beide Reaktionen sind an unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten  $k_H$  und  $k_D$  gekoppelt. Das Verhältnis  $k_H/k_D$  wird als kinetischer Isotopeneffekt (KIE) bezeichnet und kann unterschiedliche Werte annehmen. Deutliche KIE (>2) sind immer dann zu erwarten, wenn der Bindungsbruch im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt einer Reaktion stattfindet, während vernachlässigbare KIE auftreten, wenn der Schritt nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Übertragen auf den Mechanismus der Desaturierung bedeutet es, dass es durch die

Messung von kinetischen Isotopeneffekten möglich ist, die geschwindigkeitsbestimmende(n) C-H-Bindungspaltung(n) zu identifizieren.

Kinetische Isotopeneffekte wurden experimentell für eine Reihe membrangebundener Desaturasen bestimmt. [29, 49, 51, 73-78] Dabei wurde ausnahmslos gefunden, dass der Wasserstoffverlust von dem der Carboxylgruppe näheren Kohlenstoffzentrum einen hohen KIE in der Größenordnung von 3,9-8,0 aufweist. Die Abspaltung eines Wasserstoffatoms aus der Methylengruppe, die dem Alkylende am nächsten ist, weist hingegen einen KIE von etwa 1,1 auf. Dieser Trend eines hohen und eines vernachlässigbaren KIE ist in vollkommener Übereinstimmung mit dem radikalischen Disproportionierungsmechanismus in Abbildung 9 (Weg a). In einem ersten geschwindigkeitsbestimmenden und energetisch aufwändigen Schritt wird eine nichtaktivierte C-H-Bindung gespalten und ein radikalisches Intermediat gebildet. Während dieser Schritt erwartungsgemäß einen hohen KIE aufweist, ist die nachfolgende  $\beta$ -Eliminierung eines weiteren Wasserstoffatoms schnell und zeigt keinen KIE. Zwar ist dieser Trend prinzipiell auch mit den beiden anderen in Abbildung 9 gezeigten Reaktionsmechanismen konform, doch erscheinen diese aus den in Kapitel 1.5 genannten Gründen weniger wahrscheinlich. In jedem Fall sollte der Ort des hohen KIE der Methylengruppe entsprechen, an dem das Di-Eisenzentrum angreift. Untersuchungen dieser Art werden daher auch Untersuchungen zur Kryptoregiochemie genannt. [49, 50]



**Abbildung 11:** Der initiale C-H-Bindungsbruch erfolgt etwa 4-8 mal ( $k_H/k_D = 4-8$ ) schneller als der C-D-Bindungsbruch. Bei einem 1:1-Verhältnis der Edukte stellt sich demzufolge ein Verhältnis der Produkte von 4-8 zu 1 ein.

Die Befunde an membrangebundenen Desaturasen stehen im vermeintlichen Gegensatz zu Untersuchungen an der löslichen  $\Delta^9$ -ACP-Desaturase aus Rizinus. Für dieses Enzym wurde sowohl an C(9) als auch an C(10) ein KIE nahe eins beobachtet. [29] In einer kürzlich erschienenen Studie konnte jedoch ein kinetisches Modell für den gesamten

Desaturierungsprozess aufgestellt werden, welches eine plausible Erklärung für die niedrigen experimentellen KIE liefert. <sup>[20]</sup> Ferner konnten die Autoren zeigen, dass auch im Fall der löslichen  $\Delta^9$ -ACP-Desaturase aus Rizinus der intrinsische KIE, also jener, der unmittelbar mit der C-H bzw. C-D-Bindungsspaltung verbunden ist, bei etwa 10 liegt. Das Ergebnis dieser Untersuchung verdeutlicht die Komplikationen, die grundsätzlich bei der Bestimmung von KIE bei enzymkatalysierten Reaktionen <sup>[79-81]</sup> im Vergleich zu chemischen Reaktionen auftreten können. Bei Enzymreaktionen sind Prozesse wie Substratbindung, Elektronentransport oder Produktfreisetzung beteiligt, was dazu führen kann, dass die experimentellen KIE maskiert werden. <sup>[82, 83]</sup> Daher ist nicht unbedingt der absolute Wert der kinetischen Isotopeneffekte aussagekräftig, sondern vielmehr der Trend eines deutlichen und eines vernachlässigbaren KIE.

## 2. Aufgabenstellung

Desaturasen gehören zu einer weit verbreiteten Enzymfamilie, die Doppelbindungen in unaktivierte Alkylsegmente einführen können. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten in den letzten Jahren mehrere hundert Desaturasen kloniert und weitestgehend funktionell charakterisiert werden. Neben den bekannten Fettsäuresaturasen wurden zahlreiche Desaturasen mit neuartiger Funktion entdeckt.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, einige dieser ungewöhnlichen Desaturasen aus Pflanzen, Hefen und Insekten mechanistisch zu charakterisieren. Da es sich bei der überwiegenden Anzahl von Desaturasen um solche handelt, die stereo- und regioselektiv (Z)-Doppelbindungen in das Alkylgerüst von Fettsäuren einfügen, kann man solche Desaturasen als ungewöhnlich betrachten, die in der Substratwahl, der Regio- oder der Stereokontrolle von (Z)-selektiven Desaturasen abweichen. Folgende Desaturasen sollen daher eingehend mechanistisch untersucht werden:

- eine nicht stereoselektiv arbeitende  $\Delta^8$ -(E/Z)-Desaturase aus dem Sphingolipidstoffwechsel der Sonnenblume *Helianthus annuus*, die neben (E)- auch (Z)-Doppelbindungen generiert,
- eine  $\Delta^4$ -(E)-Desaturase aus der Hefe *Candida albicans*, die an der Biosynthese von Sphingosin beteiligt ist,
- eine  $\Delta^6$ -(E)-Desaturase, die an der Biosynthese der Sexualpheromone in der Motte *Antheraea polyphemus* beteiligt ist,
- eine unspezifische  $\Delta^{11}$ -(E/Z)-Desaturase aus dem Insekt *Argyrotaenia velutinana* und
- eine Desaturase aus dem Granatapfel *Punica granatum*, welche eine 1,4-Dehydrogenierung bei der Biosynthese der Punicinsäure katalysiert.

Eine mechanistische Untersuchung dieser Desaturasen sollte mit Hilfe isotoopenmarkierter Substrate als Sonden erfolgen. Zum einen sollte mit enantioselektiv deuterierten Substraten der stereochemische Verlauf der Desaturierung untersucht werden. Zum anderen sollten, durch die Bestimmung von kinetischen Isotopeneffekten, weitere mechanistische Details herausgearbeitet werden.

Neben den mechanistischen Arbeiten an Desaturasen sollten isotoopenmarkierte Stoffwechselfonden zur Untersuchung einer Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens* sowie einer  $\Delta^{12}$ -Desaturase aus der Alge *Phaeodactylum tricornutum* hergestellt werden. Diese Arbeiten wurden im Wesentlichen im Arbeitskreis von Prof. E. Heinz am Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg durchgeführt und durch die Synthese von artifiziellen Substratsonden unterstützt.

Die mechanistischen Studien an Desaturasen gliedern sich in drei Teile; die Synthese von isotoopenmarkierten Substratsonden, die Fütterungsstudien mit diesen Substraten und die HPLC/MS- und GC/MS-Analytik der resultierenden Metabolite.

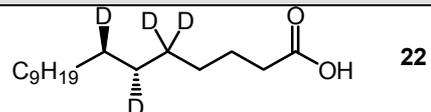
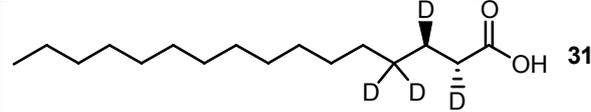
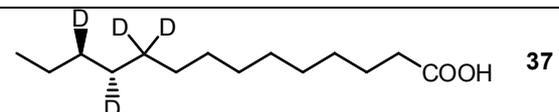
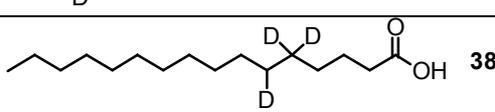
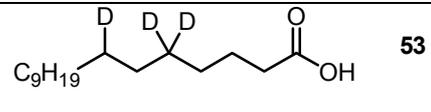
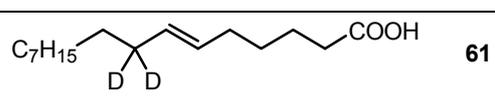
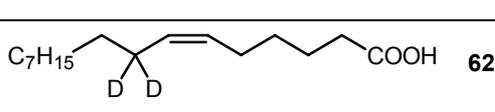
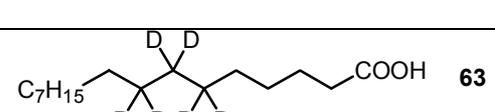
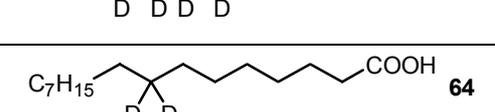
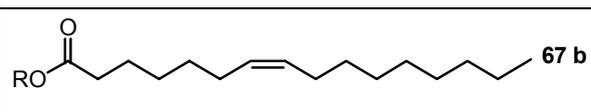
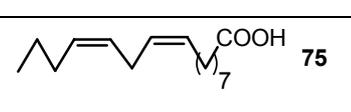
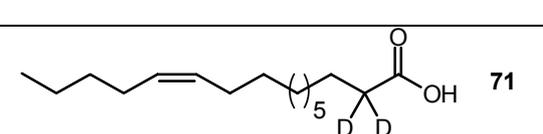
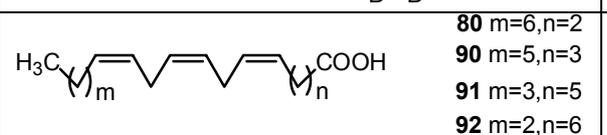
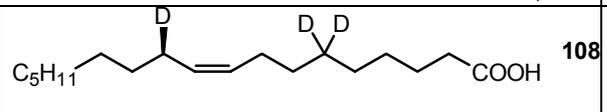
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Synthese von deuterierten Fettsäuren

Deuterierte Fettsäuren, die zur Untersuchung der mechanistischen Aspekte von Desaturasen geeignet sind, müssen einer Reihe von Anforderungen genügen. Entscheidend ist ein hoher Deuterierungsgrad an den bei der Desaturierung beteiligten Zentren, und im Falle einer enantioselektiv eingebrachten Markierung, zusätzlich ein hoher Enantiomerenüberschuss ( $ee > 95\%$ ). Da der Desaturierungsprozess mit einem kinetischen Isotopeneffekt behaftet ist, würde ein großer kinetischer Isotopeneffekt bei einem gleichzeitig geringen Markierungsgrad ( $<90-95\%$ ) des Substrats dazu führen, dass vermehrt der nichtmarkierte Anteil desaturiert wird. Eine genaue Bestimmung von Isotopeneffekten oder eine eindeutige Zuordnung des stereochemischen Verlaufs der Desaturierung wäre nicht mehr möglich. Für den Erfolg einer Synthese mit hohen Markierungsgraden ist daher entscheidend, auf Schritte zu verzichten, die zu einem Verlust der eingebrachten Markierung oder zu einer statistischen Verteilung von Deuteriumatomen über das Molekülgerüst, dem so genannten Isotopenscrambling, führen. Um deuterierte Fettsäuren als chemische Sonden für Desaturasen einsetzen zu können, muss bei der Konzeption der Synthese als weiterer Punkt beachtet werden, dass in jedem Fall das künstliche Substrat auch nach der Desaturierung vom natürlichen Produkt unterscheidbar bleibt. Deshalb müssen geeignete Sonden nicht nur eine Deuteriummarkierung an den Zentren tragen, an denen die Desaturase die Doppelbindung einführt, sondern zusätzliche Marker im Molekül enthalten. Eine solche Aufgabe kann beispielsweise von Schwefelatomen in der aliphatischen Kette oder von zusätzlichen Deuteriumatomen im Molekül erfüllt werden.

Neben deuterierten Fettsäuren wurden innerhalb dieser Arbeit eine Reihe ungesättigter Fettsäuren zur Untersuchung von Desaturasen, Elongasen und für die Aufklärung von Fettsäurebiosynthesewegen in verschiedenen Organismen synthetisiert.

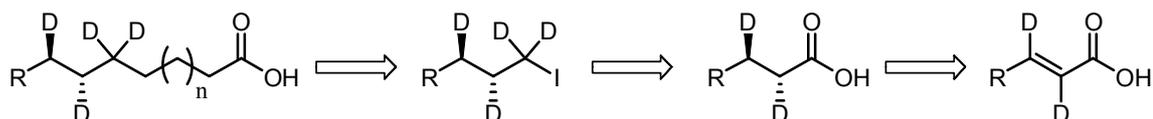
Die Synthesen der in dieser Arbeit verwendeten Fettsäuren lassen sich in drei Kategorien einteilen; die Synthese gesättigter, einfach ungesättigter und mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Im Folgenden wird zunächst die allgemeine Synthesestrategie für jede dieser Klassen vorgestellt, an die sich die Synthese der individuellen Fettsäuren anschließt. Eine Übersicht der synthetisierten Fettsäuren sowie deren Verwendungszweck gibt Tabelle 1.

Synthetisierte Fettsäure	Synthese	Verwendung
 22	Kap. 3.1.1	$\Delta^8$ -(E/Z)-Sphingolipiddesaturase aus <i>H. annuus</i> . Kap. 3.2.2
 31	Kap. 3.1.1	$\Delta^4$ -Dihydroceramidessaturase aus <i>C. albicans</i> . Kap. 3.2.3
 37	Kap. 3.1.1	$\Delta^{11}$ -(E/Z)-Fettsäuredesaturase aus <i>A. velutinana</i> . Kap. 3.4
 38	Kap. 3.1.1	$\Delta^8$ -(E/Z)-Sphingolipiddesaturase aus <i>H. annuus</i> . Kap. 3.2.2
 53	Kap. 3.1.1	$\Delta^8$ -(E/Z)-Sphingolipiddesaturase aus <i>H. annuus</i> . Kap. 3.2.2
 61	Kap. 3.1.2	Pheromonbiosynthese in <i>A. polyphemus</i> . Kap. 3.3
 62	Kap. 3.1.2	Pheromonbiosynthese in <i>A. polyphemus</i> . Kap. 3.3
 63	Kap. 3.1.2	$\Delta^8$ -(E/Z)-Sphingolipiddesaturase aus <i>H. annuus</i> . Kap. 3.2.2
 64	Kap. 3.1.2	$\Delta^8$ -(E/Z)-Sphingolipiddesaturase aus <i>H. annuus</i> . Kap. 3.2.2
 67 b	Kap. 3.1.3	$\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturase aus <i>P. tricornutum</i> . Kap. 3.5
 75	Kap. 3.1.3	$\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturase aus <i>P. tricornutum</i> . Kap. 3.5
 71	Kap. 3.1.3	Pheromonbiosynthese in <i>A. polyphemus</i> . Kap. 3.3
 80 m=6,n=2 90 m=5,n=3 91 m=3,n=5 92 m=2,n=6	Kap. 3.1.3	Elongase aus <i>Physcomitrella patens</i> . Kap. 3.7
 108	Kap. 3.1.4	Konjugase aus <i>Punica granatum</i> . Kap. 3.6

**Tabelle 1:** Übersicht synthetisierter Fettsäuren und deren Verwendung.

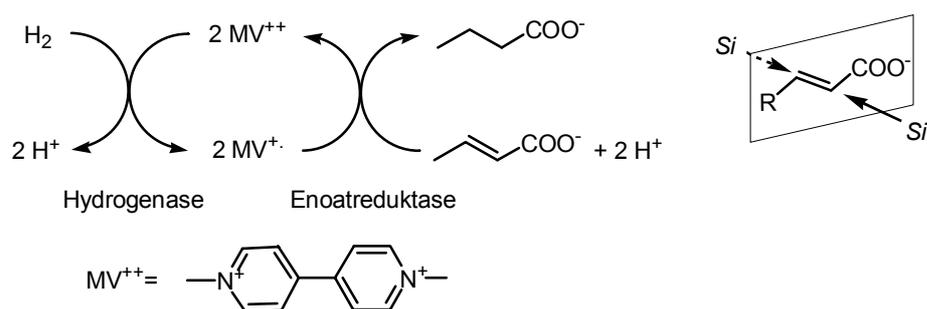
### 3.1.1 Synthese gesättigter isotopenmarkierter Fettsäuren

Der synthetische Zugang zu enantiospezifisch deuterierten Fettsäuren basiert auf einer Verknüpfung von klassischer Acetylenchemie zum Aufbau des Kohlenstoffgrundgerüsts mit einer enzymatischen Reduktion zum Aufbau der chiralen Zentren und wird durch eine kettenverlängernde metallmedierte Kreuzkupplung zweier Iodide abgeschlossen (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Retrosynthese enantiospezifisch markierter gesättigter Fettsäuren.

Ein Schlüsselschritt der Synthese ist die biokatalytische Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Carbonsäuren mit Zelltrümmern des Bakteriums *Clostridium tyrobutyricum* (Stamm C. La 1).<sup>[84]</sup> Dieses Bakterium verfügt über ein Enzymsystem, bestehend aus einer Hydrogenase und einer Enoatreduktase, welches zwei Wasserstoffatome enantiospezifisch auf die Doppelbindung des Substrats überträgt (siehe Abbildung 13). Mechanistisch verläuft die Reduktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure, indem im ersten Schritt ein Ein-Elektronenübertrag der Hydrogenase auf zugesetztes Methylviologen (MV), einem synthetischen Funktionsanalogon von NADH, stattfindet. Im zweiten Schritt überträgt die Enoatreduktase die Elektronen zweier Methylviologen-Radikalkationen auf die Doppelbindung, jeweils gefolgt von einer *anti*-2*Si*,3*Si*-Addition zweier Protonen aus dem wässrigen Medium (siehe Abbildung 13).



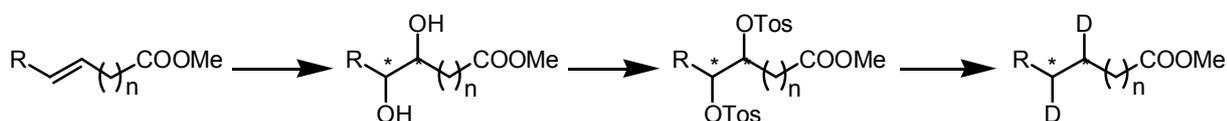
**Abbildung 13:** Enantiospezifische Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Carbonsäuren mit Zelltrümmern von *C. tyrobutyricum*; **links:** Mechanismus der Reduktion; **rechts:** Stereochemie der Wasserstoff-Übertragung.

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die Reduktion der Doppelbindung mit der Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum* hoch enantiospezifisch mit

Enantiomerenüberschüssen von >97% pro Zentrum verläuft.<sup>a</sup> [72, 88, 89] Somit gelingt es in einem Schritt, zwei benachbarte nahezu enantiomerenrein deuterierte Zentren an den Kohlenstoffatomen zu erzeugen, die am Desaturierungsprozeß beteiligt sind

Limitierend für die Verwendung der Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum* in der organischen Synthese ist deren Verfügbarkeit. Clostridien sind pathogen und können nur aufwändig unter anaeroben Bedingungen kultiviert werden. Alternativen zur enzymatischen Reduktion  $\alpha,\beta$ -ungesättigter Carbonsäuren sind derzeit nicht in Sicht. Zwar ließe sich eine enantiospezifische Reduktion durch asymmetrische Hydrierung der Doppelbindung erzielen; [90, 91] bislang liefern solche Reduktionen, z.B. unter Verwendung von Noyori's Ruthenium-BINAP-Komplexen, aber nur an ausgewählten Substraten mit der biokatalytischen Reduktion vergleichbare Enantiomerenüberschüsse. [92, 93]

Zum Aufbau zweier benachbarter chiraler Zentren erscheint zunächst auch eine Syntheseroute unter Verwendung von Sharpless asymmetrischer Dihydroxylierung attraktiv (siehe Abbildung 14). [94, 95] Diese Reaktion liefert zuverlässig hohe Enantiomerenüberschüsse und generiert zwei benachbarte chirale Zentren in einem Schritt. Eine Substitution der vicinalen Hydroxygruppen nach Überführung in entsprechende Tosylate oder Mesylate mit Lithiumaluminiumdeuterid führte jedoch zu einem teilweisen Verlust der Enantiomerenreinheit. [96, 97]



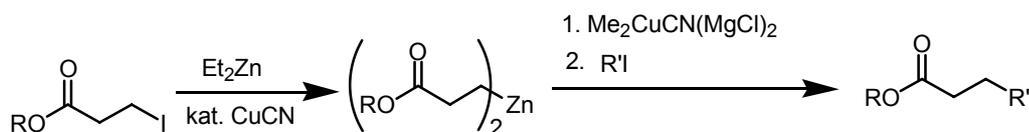
**Abbildung 14:** Syntheseroute für enantiospezifisch-deuterierte Fettsäuren durch asymmetrische Dihydroxylierung.

Es erscheint deshalb sinnvoll, auch in Zukunft an der bewährten Syntheseroute festzuhalten. Die Verwendung von reinen Enzymen, statt der Arbeit mit Zelltrümmern von *C. tyrobutyricum*, sollte die Synthesearbeit erleichtern. Erste Enoatreduktasen wurden im Arbeitskreis von Prof. Bacher (TU München) kloniert und liegen als reine Enzympräparate vor. [98] Eine mechanistische und methodische Untersuchung dieser Enzyme steht jedoch noch aus.

An die biokatalytische Reduktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäuren schließt sich eine Reduktion mit Lithiumaluminiumdeuterid zum korrespondierenden Alkohol an. Hierdurch werden zwei weitere Deuteriumatome im Molekül eingeführt, die gewährleisten, dass das

<sup>a</sup> Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses kann durch NMR-Untersuchung des Mandelsäuremethylesters erfolgen. [85, 86] Im Vergleich dazu sind NMR-Methoden unter Verwendung von Shiftreagenzien wenig geeignet. [87]. Ebenso kommen chromatographische Methoden nicht in Frage. [85]

Desaturierungsprodukt der markierten Fettsäure vom natürlichen Produkt massenspektrometrisch unterschieden werden kann. Eine Überführung des Alkohols zum Iodid kann routinemässig mit dem System Triphenylphosphin/Imidazol/Iod<sup>[99-101]</sup> durchgeführt werden. Damit steht einer der Bausteine für die metallvermittelte Kreuzkupplung zur Verfügung. Die Kreuzkupplung von  $\omega$ -Iodalkansäureestern mit Alkylidioden zu Carbonsäureestern basiert auf Arbeiten von Knochel *et al.* und kombiniert die Vorteile zink- und kupferorganischer Chemie.<sup>[102-104]</sup> Durch Umsetzung von  $\omega$ -Iodoestern mit Diethylzink in Gegenwart von katalytischen Mengen Kupfercyanid oder -halogenid werden durch Halogen-Zink-Austausch Dialkylzinkate gebildet.<sup>[104, 105]</sup> Zinkorganyle dieser Art lassen sich in Gegenwart vieler funktioneller Gruppen problemlos darstellen, sind aber folglich auch wenig reaktiv. Eine Aktivierung des unreaktiven Dialkylzinkats erfolgt in diesem Fall durch Transmetallierung mit dem Kupferkomplex  $\text{Me}_2\text{CuCN}(\text{MgCl})_2$  zum Organocuprat.<sup>[104, 106]</sup> In Gegenwart von polar aprotischen Co-Solvenzien, wie DMPU oder NMP, erfolgt anschliessend eine langsame Kupplung mit dem zweiten Iodbaustein (siehe Abbildung 15). Bei allen Synthesen wurde die Reaktion so geführt, dass das aufwändiger zu synthetisierende Iodid im Unterschuss eingesetzt wurde.



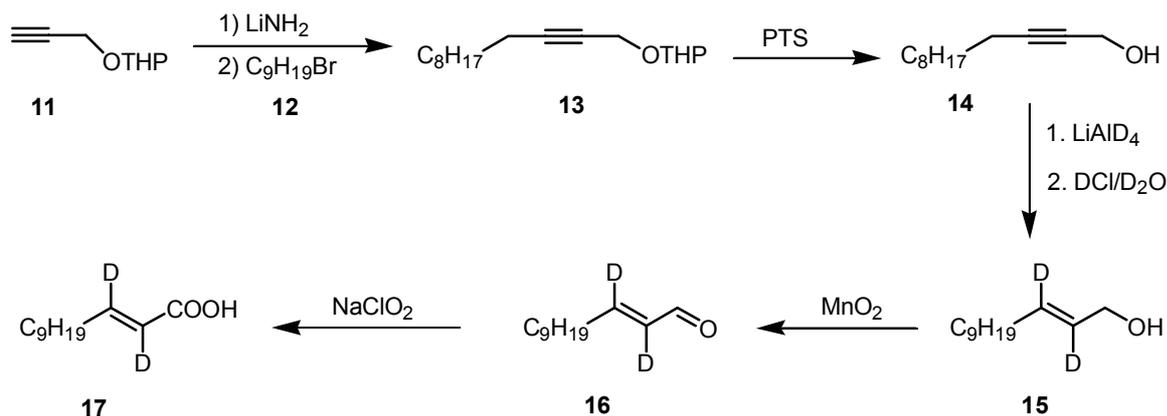
**Abbildung 15:** Zink-Kupfer-vermittelte Kreuzkupplung von Alkylidioden.

Die metallvermittelte Kreuzkupplung ist hinsichtlich der Deuteriumpositionierung und der Kettenlänge der Alkylidiodide sehr flexibel. Die Einführung von Deuterium ist in beiden Iodbausteinen möglich. Dabei konnten nicht nur  $\omega$ -Iodisopropylester, sondern auch die reaktiveren Methylester mit lediglich etwas schlechteren Ausbeuten als Kupplungspartner eingesetzt werden. Ein Verlust des eingebrachten Markierungsgrades (>97 % pro Zentrum) oder das Auftreten eines Isotopenscramblings wurde in keinem Fall beobachtet. Damit bietet diese Variante große Vorteile gegenüber anderen Routen, die jeweils einen Hydrierungsschritt an Katalysatoren benötigten und bei längeren Reaktionszeiten zu einem beachtlichen Isotopenscrambling führten.<sup>[89]</sup> Ein entscheidender Vorteil der hier skizzierten Synthesestrategie ist darüber hinaus ihre Flexibilität. Im Sinne eines Baukastenprinzips lassen sich Fettsäuren mit variabler Kettenlänge und nahezu beliebiger Deuteriumpositionierung innerhalb der Alkylkette darstellen.

### 3.1.1.1 Synthese von (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (22)

Nach dem oben skizzierten Synthesekonzept erfolgte die Darstellung von (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (22). Als Substrat für die biokatalytische Reduktion mit Zelltrümmern

von *C. tyrobutyricum* wurde die dideuterierte  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonsäure (**17**) benötigt. Ihre Darstellung erfolgte in Anlehnung an bereits zuvor im Arbeitskreis durchgeführte Synthesen (siehe Abbildung 16).<sup>[107]</sup> Durch Alkylierung von Nonylbromid (**12**) mit dem Lithiumsalz des Tetrahydropyranoyl-geschützten Propargylalkohols (**11**) in flüssigem Ammoniak wurde zunächst das Kohlenstoffgrundgerüst aufgebaut. Nach Entfernen der THP-Schutzgruppe mit katalytischen Mengen para-Toluensulfonsäure in Methanol wurde das Alkinol (**14**) erhalten.



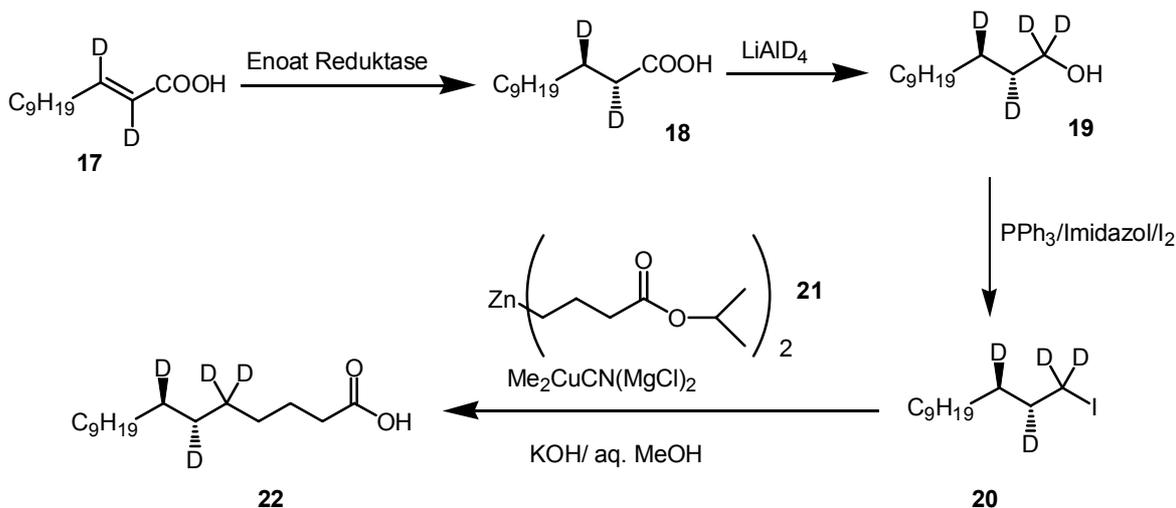
**Abbildung 16:** Darstellung der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure **17** als Substrat für die enzymatische Reduktion mit Zelltrümmern von *C. tyrobutyricum*.

Dreifachbindungssysteme, die sich in allylischer Position zu Alkoholgruppen befinden, lassen sich mit einer Reihe von Metallhydriden stereoselektiv zum (*E*)-konfigurierten Allylalkohol reduzieren.<sup>[108]</sup> Die Reduktion von **14** mit Lithiumaluminiumdeuterid (98 % <sup>2</sup>H) und Hydrolyse des intermediär auftretenden Organo-Aluminium-Komplexes mit DCI/D<sub>2</sub>O führte stereoselektiv zum (*E*)-konfigurierten, deuterierten Alkenol (**15**). Die GC-MS-Analyse des Syntheseproduktes zeigte, dass ein entsprechendes (*Z*)-Isomer nur im Spurenbereich gebildet wird.

Um eine möglichst schonende Oxidation ohne Isotopenaustausch des Alkohols **15** zur Carbonsäure **17** zu erreichen, ist eine zweistufige Reaktionsführung vorteilhaft. Zunächst wurde der Allylalkohol **15** mit aktiviertem Braunstein (MnO<sub>2</sub>) in den  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Aldehyd **16** überführt. In einem zweiten Reaktionsschritt wurde **16** mit Natriumchlorit in gepufferter wässriger Lösung zur Säure **17** oxidiert.<sup>[109]</sup> Die  $\alpha,\beta$ -ungesättigte dideuterierte Dodecensäure **17** wurde enzymatisch mit Zelltrümmern von *C. tyrobutyricum* in die gesättigte (2*R*,3*S*)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodecensäure (**18**) überführt (siehe Abbildung 18). Der für die Reduktion benötigte Wasserstoff wurde dazu über ein gasdichte Bürette zugeführt, so dass jeglicher Sauerstoffzutritt, der zu einem sofortigen Abbruch der Reduktion führt, über 72 Stunden vermieden werden konnte. Auf diesem Weg konnte eine quantitative Umsetzung von **17** erzielt werden. Durch kontinuierliche Extraktion des Zellmaterials mit Diethylether

über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde die Carbonsäure (**18**) weitestgehend aus der wässrigen Phase extrahiert und in 88 % Ausbeute gewonnen.

Im Anschluss an die biokatalytische Reduktion wurde die Carbonsäure (**18**) mit Lithiumaluminiumdeuterid zum Alkohol (**19**) reduziert. Dieser Schritt diente dazu, zusätzliche Deuteriumatome im Molekül einzuführen, die nach Desaturierung eine massenspektrometrische Unterscheidbarkeit vom natürlichen Desaturierungsprodukt gewährleisten sollten.



**Abbildung 17:** Synthese von (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (**22**).

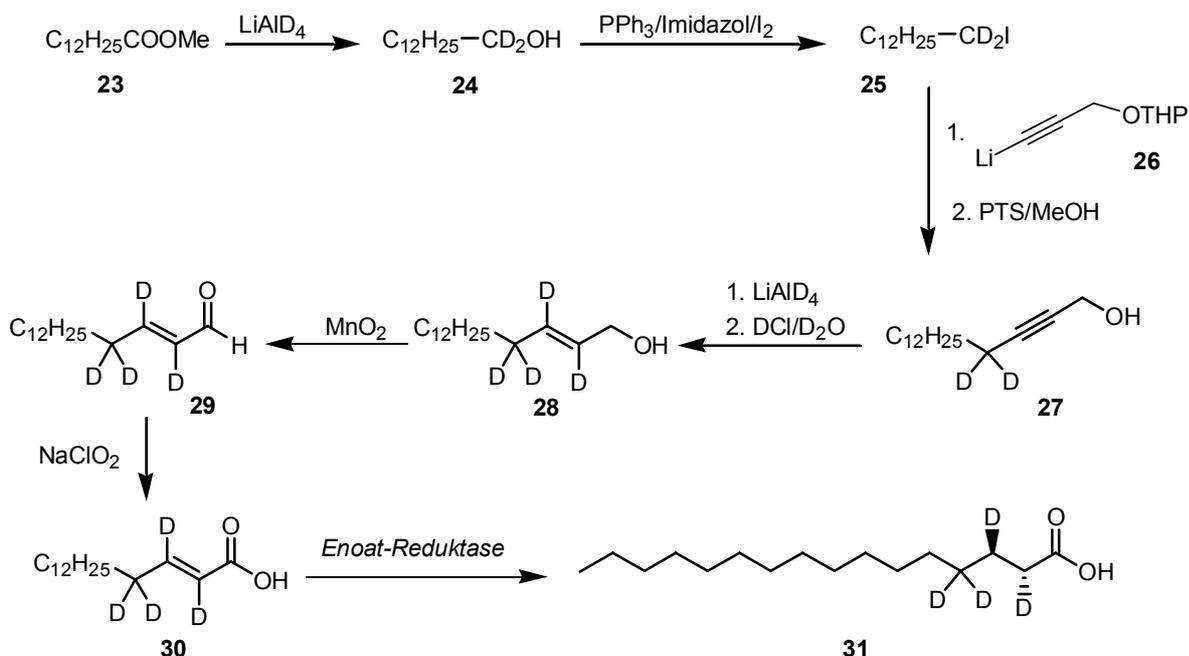
Mit dem System Triphenylphosphin/Imidazol/Iod wurde der Alkohol **19** quantitativ in das Iodid **20** überführt. Die anschließende Kreuzkupplung von **20** mit dem Dialkylzinkat **21** führte zu dem (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäureisopropylester (**22**). Die Darstellung von **21** erfolgte durch Umsetzung von Diethylzink mit Iodbuttersäureisopropylester, welcher leicht durch Finkelstein-Reaktion aus dem entsprechenden Bromid dargestellt werden kann. Um eine möglichst quantitative Umsetzung des kostbaren deuterierten Iodids **20** zu erzielen, wurde das Zinkat **21** in zweifachem Überschuss eingesetzt. Nach Transmetallierung von **21** mit dem Kupferkomplex Me<sub>2</sub>CuCN(MgCl)<sub>2</sub> setzt oberhalb von -40 °C und in Gegenwart von absolutem NMP<sup>b</sup> die Kreuzkupplung mit **20** zum Palmitinsäureisopropylester ein. Entscheidend für den Erfolg der Kreuzkupplung ist die erfolgreiche Darstellung des gemischten Mg/Cu-Komplexes Me<sub>2</sub>CuCN(MgCl)<sub>2</sub>. Diese erfolgt, indem CuCN mit 2 eq MeMgCl entweder bei -30 °C in THF/NMP<sup>[104]</sup> oder bei 0 °C in THF gemischt werden.<sup>[104]</sup> Die besten Ergebnisse werden dabei erhalten, wenn eine 1 M Lösung von MeMgCl in THF eingesetzt wird.

Durch Verseifen des Isopropylesters mit wässrig-methanolischer KOH-Lösung<sup>[110]</sup> wurde die freie Palmitinsäure **22** erhalten.

<sup>b</sup> Kommerziell erhältlich, absolutes NMP kann als Ersatz für DMPU als polares Cosolvens problemlos eingesetzt werden<sup>[106]</sup>

### 3.1.1.2 Synthese von (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (31)

Für die Darstellung der deuterierten Palmitinsäure **31** wird kein kettenverlängernder Schritt durch Kreuzkupplung zweier Iodbausteine benötigt. Vielmehr stellt die enzymkatalysierte, asymmetrische Reduktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure **30** den letzten Schritt der Syntheseroute dar (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Syntheseroute von (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (**31**).

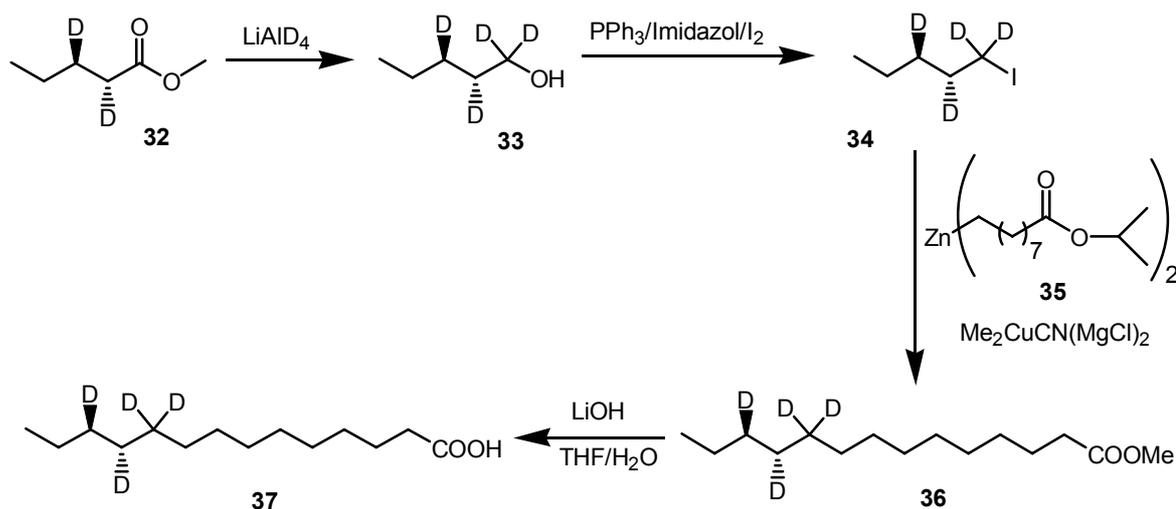
Im ersten Schritt wurde Tridecansäuremethylester (**23**) mit Lithiumaluminiumdeuterid (98 % <sup>2</sup>H) zum [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**) reduziert. Die Isotopensubstitution an C(4) der fertigen Palmitinsäure **31** dient wiederum als zusätzliche Markierung.

Mit Triphenylphosphin/Imidazol/Iod konnte der Alkohol **24** vollständig in das korrespondierende Iodid **25** überführt werden, welches in flüssigem Ammoniak mit dem Lithiumsalz von THP-geschütztem Propargylalkohol (**26**) alkyliert wurde. Nach Entfernen der Schutzgruppe wurde das Alkinol **27** mit Lithiumaluminiumdeuterid und Hydrolyse der intermediär auftretenden organo-Aluminium-Spezies mit DCI/D<sub>2</sub>O selektiv in das (*E*)-konfigurierte Alkenol (**28**) überführt. Die Oxidation von **28** zur Carbonsäure **30** wurde wiederum über eine zweistufige Reaktionssequenz erzielt, um einen Verlust der Isotopenmarkierung zu vermeiden. Auf diesem Weg wurde in 70 % Gesamtausbeute isomerenreine [2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadec-2-ensäure (**30**) erhalten. Nach biokatalytischer Reaktion der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäure **30** mit der Enoat-Reduktase aus *C. tyrobutyricum* wurde (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (**31**) mit einem ee >97 %, bestimmt durch NMR-Untersuchung des Mandelsäurediesters, in 81 % Ausbeute erhalten.

### 3.1.1.3 Synthese von (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**)

Bei der Synthese von (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**) muss mit den leicht flüchtigen Zwischenstufen [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**) und [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyljodid (**34**) gearbeitet werden (siehe Abbildung 19). Um Ausbeuteverluste gering zu halten, empfiehlt es sich, Reinigungsschritte zu minimieren und stattdessen Rohprodukte in den nachfolgenden Schritten einzusetzen. Darüber hinaus können Verluste minimiert werden, indem die organischen Lösungsmittel nicht am Rotationsverdampfer, sondern durch vorsichtige Destillation entfernt werden.

Im ersten Syntheseschritt erfolgte die Reduktion von (2*R*,3*R*)-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (**32**) mit Lithiumaluminiumdeuterid (98 % <sup>2</sup>H) zum deuterierten Pentanol **33**, um zusätzliche Deuteriumatome im Molekülgerüst einzuführen. Um die Ausbeuteverluste möglichst gering zu halten, wurde die Reduktion in Diethylether, statt in dem mit Wasser beliebig mischbaren und höhersiedenden THF, geführt und mit einem Minimum an Wasser aufgearbeitet.

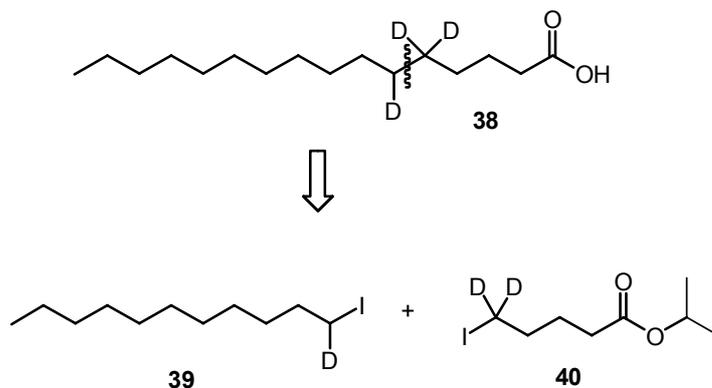


**Abbildung 19:** Synthese von (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**).

Mit dem System Triphenylphosphin/Imidazol/Iod wurde der Alkohol **33** in das Iodid **34** überführt. Durch kupfervermittelte Kreuzkupplung des Iodids **34** mit dem Zinkat von Iodnonansäuremethylester (**35**) wurde die Verbindung **36** erhalten. Dabei wurde das leicht zugängliche Dialkylzinkat **35** in zweifachem Überschuss eingesetzt, um den deuterierten Baustein **34** möglichst vollständig zum Kreuzkupplungsprodukt **36** umzusetzen. Der für die Zinkatbildung benötigte Iodnonansäuremethylester konnte durch Veresterung von ω-Bromnonansäure mit schwefelsaurem Methanol und anschließender Finkelstein-Reaktion dargestellt werden. Nach Verseifen des Kreuzkupplungsprodukts **36** mit LiOH in Wasser/THF wurde (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**) in 51% Gesamtausbeute erhalten.

### 3.1.1.4 Synthese von [5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (38)

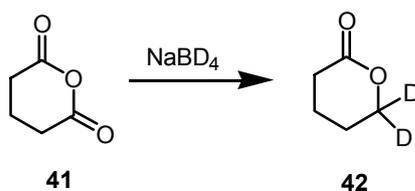
Die retrosynthetische Analyse zeigt, dass [5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (38) leicht durch Kreuzkupplung der beiden Iodide 39 und 40 zugänglich sein sollte (siehe Abbildung 20).



**Abbildung 20:** Retrosynthese von *rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (38).

Monodeuteriertes racemisches Undecyliodid 39 kann in zwei Stufen dargestellt werden. Die Reduktion von Undecanal mit Lithiumaluminiumdeuterid lieferte  $\alpha$ -deuteriertes Undecanol, welches in einem zweiten Schritt mit Triphenylphosphin/Imidazol/Iod in das korrespondierende Iodid 39 überführt wurde.

Vergleichsweise aufwändig gestaltete sich die Synthese des zweiten Bausteins 40. Zunächst erschien es sinnvoll, einen isotopenmarkierten C<sub>5</sub>-Baustein durch regioselektive Reduktion von Glutarsäureanhydrid (41) zu erzeugen. So sollte die Reduktion von 41 mit Natriumbordeuterid zu [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Valerolacton (42) führen (siehe Abbildung 21).

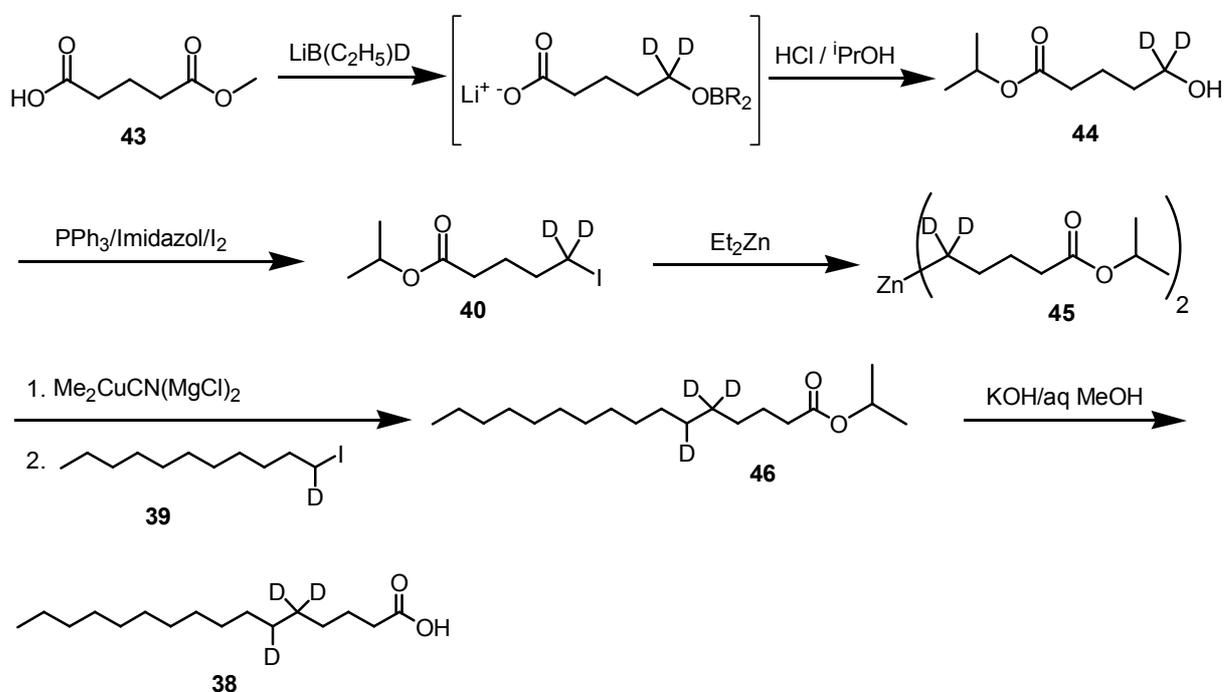


**Abbildung 21:** Regioselektive Reduktion von Glutarsäureanhydrid (41).

Die regioselektive Reduktion von sechsgliedrigen Carbonsäureanhydriden mit Natriumborhydrid ist bekannt.<sup>[111]</sup> Die Reaktion konnte jedoch nicht auf die regioselektive Reduktion von 41 mit Natriumbordeuterid übertragen werden. Trotz Modifikation der Reaktionsbedingungen, z.B. einer erhöhten Reaktionstemperatur, einer Verlängerung der Reaktionszeit oder durch Zugabe polarer Cosolvenzien wie DMF, gelang die Synthese von 42 lediglich in Ausbeuten unter 15 % und mit unzureichender Isotopensubstitution (<90 % Markierungsgrad). Ein möglicher Grund für diese Komplikationen liegt vermutlich darin, dass Deuteridübertragungsreagentien im Vergleich zu Hydridübertragungsreagentien in ihrer Reaktivität deutlich herabgesetzt sind. Demgegenüber steht eine nicht zu vernachlässigende

Tendenz von Valerolacton zur Oligomerisierung, so dass eine Erhöhung der Reaktionstemperatur und verlängerte Reaktionszeiten eher kontraproduktiv für eine erfolgreiche Reaktionsführung waren.

Aufgrund der aufgezeigten Problematik, vor allem aber wegen des für die biologischen Experimente nur unzureichenden Markierungsgrades, wurde diese Syntheseroute verworfen und ein neuer Weg beschritten (siehe Abbildung 22). Hierzu wurde Glutarsäuremonomethylester (**43**) mit Lithiumtriethylbordeuterid (Superdeuterid<sup>®</sup>) regioselektiv reduziert. Superdeuterid<sup>®</sup> greift dabei chemoselektiv die Estergruppe an, die Carboxylgruppe hingegen bleibt unberührt. Indem das bei der Reduktion gebildete Intermediat mit isopropanolischer HCl hydrolysiert wurde, konnte der Isopropylester **44** erhalten werden. Im Vergleich zum Methylester ist der Isopropylester **44** stabil und neigt nicht zur Zyklisierung. Er kann deshalb problemlos in die Iodverbindung **40** überführt werden.



**Abbildung 22:** Synthese von *rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**).

Die Kreuzkupplung von **40** mit dem im Überschuss eingesetzten deuterierten Undecyliodid (**39**) liefert den Isopropylester **46**. Aus dem Massenspektrum lässt sich der Gesamtmarkierungsgrad mit 94 %, entsprechend einem Markierungsgrad von über 98 % pro Zentrum, bestimmen. Ein Verlust der Isotopenmarkierung oder ein Isotopenscrambling bei der Kreuzkupplung wird nicht beobachtet. Die Hydrolyse des Esters **46** mit wässrig-methanolischer KOH liefert [5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**).

### 3.1.1.5 Synthese von [5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (53)

In Analogie zur Synthese der Hexadecansäure **38** kann [5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**) ebenfalls durch kupfervermittelte Kreuzkupplung des Iodids **51** mit dem Zinkat **21** dargestellt werden (siehe Abbildung 23).

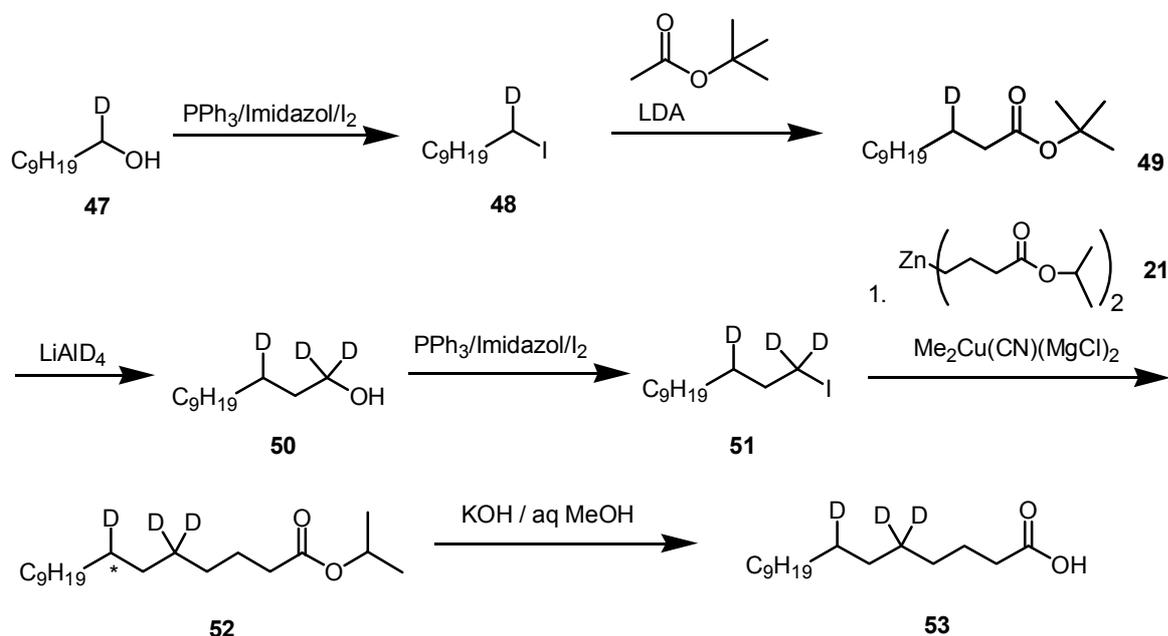


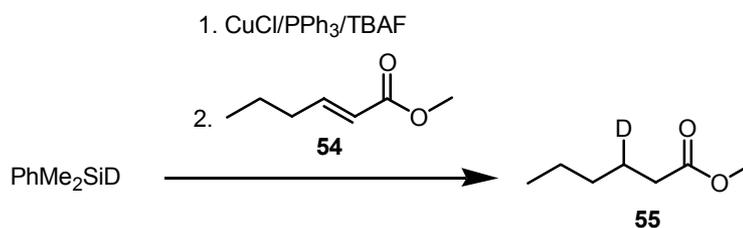
Abbildung 23: Synthese von *rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**).

Zur Darstellung von **51** wurde zunächst Decanal mit Lithiumaluminiumdeuterid (98 % <sup>2</sup>H) zum racemischen Alkohol **47** reduziert. Nach Substitution der Hydroxyfunktion mit Iod wurde das Decyliodid **48** erhalten und um eine C<sub>2</sub>-Einheit zum Dodecylsäure-*tert.*-butylester (**49**) verlängert. Hierzu wurde Essigsäure-*tert.*-butylester bei -78 °C mit einer 1 M Lithiumdiisopropylamid-Lösung deprotoniert. Durch langsames Erwärmen der Lithiumenolatlösung auf Raumtemperatur in Gegenwart des Iodids **48** wurde das Substitutionsprodukt **49** in 68 % Ausbeute erhalten. Die Reduktion von **49** mit Lithiumaluminiumdeuterid dient zur Einführung zusätzlicher Deuteriumatome an Positionen, die von der zu untersuchenden Desaturase nicht berührt werden. Der Austausch der Hydroxygruppe gegen Iod lieferte **51**.

### 3.1.1.6 Synthetischer Zugang zu 11-[<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] und 12-[<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Tetradecansäure

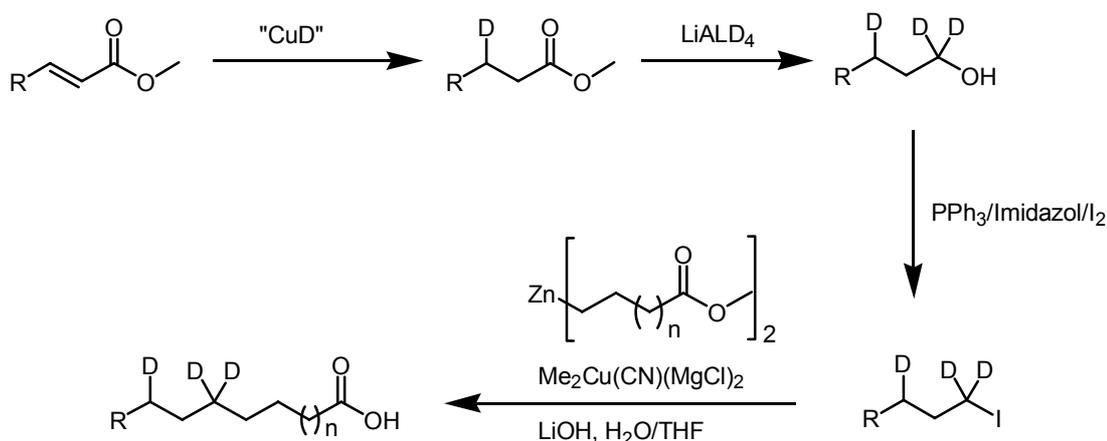
In β-Position deuteriumsubstituierte Ester, wie **49**, sind auch auf einem anderen Weg als durch Kettenverlängerung mit einem C<sub>2</sub>-Baustein zugänglich (siehe Abbildung 23). Der alternative Zugang nutzt hierbei die Fähigkeit von kupferorganischen Verbindungen, Michael-Additionen an α,β-ungesättigte Carbonylverbindungen einzugehen (siehe Abbildung 24).<sup>[102]</sup> Aus Arbeiten von Mori *et al.* ist bekannt, dass „Kupferdeuteride“, die aus PhMe<sub>2</sub>SiD und CuCl/TBAF/PPh<sub>3</sub> gebildet werden, solche Michael-Additionen an α,β-ungesättigte Ketone eingehen können.<sup>[112]</sup> Analog sollten sich auch aliphatische α,β-ungesättigte Carbon-

säureester zu in  $\beta$ -Stellung deuterierten Estern umsetzen lassen. Diese Reaktion wurde exemplarisch an Hex-2-ensäuremethylester (**54**) durchgeführt.



**Abbildung 24:** Michael-Addition komplexer Kupferdeuteride an Hexedec-2-ensäuremethylester (**54**).

Hierbei zeigte sich, dass **54** glatt zum gesättigten Methylester **55** umgesetzt wird. Die NMR-spektroskopische Charakterisierung von **55** belegt, dass eine Deuteriumsubstitution ausschließlich an C(3) stattgefunden hat. Der Substitutionsgrad konnte anhand des des NMR-Spektrums von **55** zu größer 97 % bestimmt werden. Damit stellt die Methode, an C(3) racemisch monodeuterierte Carbonsäureester durch Michael-Addition von „Kupferdeuteriden“ darzustellen, eine attraktive Alternative zum in Abbildung 23 gezeigten Weg dar.



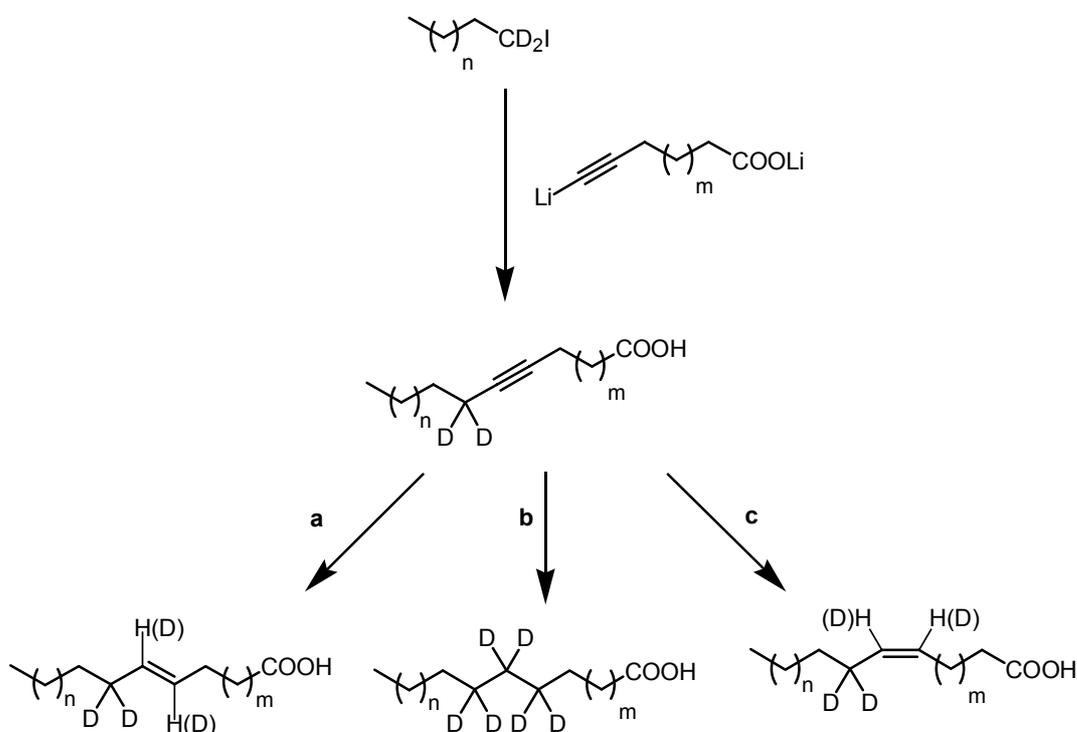
**Abbildung 25:** Potentielle Syntheseroute zu racemisch deuterierten Fettsäuren.

Insbesondere, wenn kurz-kettige deuterierte Fettsäuren zu synthetisieren sind, bietet diese Route entscheidende Vorteile. Da die synthetische Arbeit mit extrem leichtflüchtigen Synthesebausteinen umgangen werden kann, sollten z.B. an C(11) oder C(12) markierte Tetradecansäuren auf dem in Abbildung 25 gezeigten Weg schnell zugänglich sein.

### 3.1.2 Synthese monoungesättigter und hochdeuterierter Fettsäuren aus acetylenischen Vorstufen

Acetylenische Carbonsäuren sind variable Bausteine für die Synthese von deuterierten Fettsäuren. Einerseits erlauben sie den Zugang zu Monoensäuren mit wahlweise (*E*)- oder (*Z*)-Konfiguration der Doppelbindung. Andererseits bieten sie die Möglichkeit, durch

vollständige Reduktion der Dreifachbindung zu vielfach-deuterierten gesättigten Fettsäuren zu gelangen (siehe Abbildung 26). Acetylenische Carbonsäuren lassen sich leicht in großem Maßstab durch Kupplung von Lithiumacetylidien mit Brom- oder Iodalkanen in flüssigem Ammoniak gewinnen, ohne dass die Säurefunktion geschützt werden muß.



**Abbildung 26:** Synthetischer Zugang zu mehrfach deuterierten Fettsäuren über acetylenische Carbonsäuren.

Die stereoselektive Umsetzung acetylenischer Carbonsäuren zu Monoensäuren mit (*E*)-konfigurierter Doppelbindung gelingt unter Bedingungen der Birch-Reaktion mit Alkalimetallen in flüssigem Ammoniak. Bei dieser über Di- und Radiokationen verlaufenden Reaktion entsteht aus sterischen Gründen bevorzugt das (*E*)-Isomer (siehe Abbildung 26, Weg a).<sup>[108]</sup>

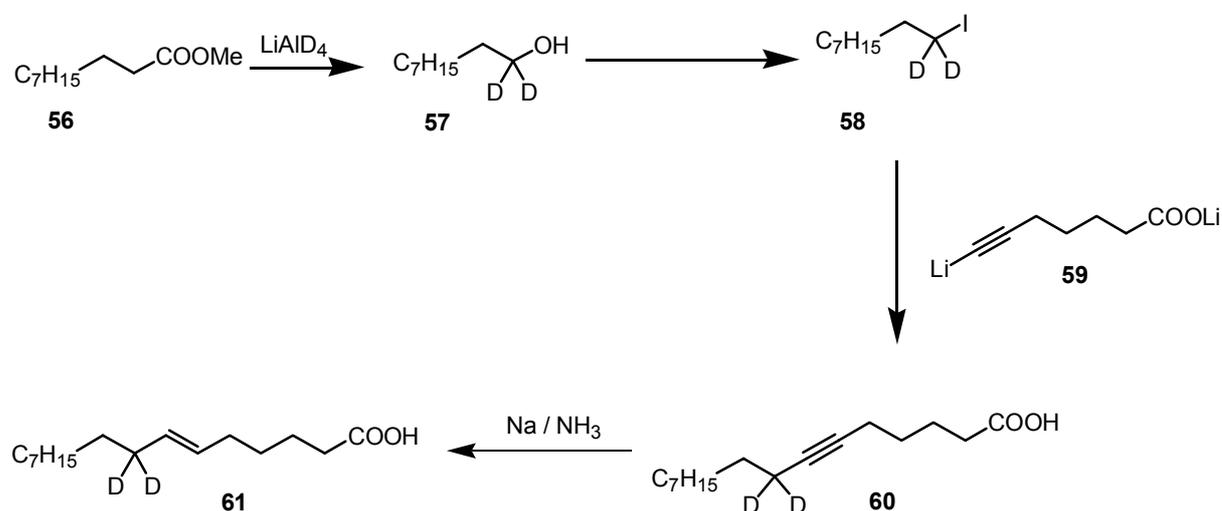
Die komplementäre Umsetzung acetylenischer Carbonsäuren zu (*Z*)-konfigurierten Monoensäuren gelingt durch partielle heterogenkatalysierte Hydrierung der Dreifachbindung (siehe Abbildung 26, Weg c).<sup>[113]</sup> Die Hydrierung mit Wasserstoff in Gegenwart des von Brown *et al.* entwickelten Katalysators P2-Nickel ist hier die Methode der Wahl.<sup>[114]</sup> Bei mit Ethanolamin vergiftetem P2-Nickel handelt es sich um einen Nickelkatalysator, der gegenüber anderen Hydrierungs-Katalysatoren<sup>[115]</sup> den entscheidenden Vorteil besitzt, dass die Reduktion einer Dreifachbindung auf der Stufe des Alkens stoppt. Eine Reduktion bis zur Stufe des Alkans wird entweder gar nicht oder nur im Spurenbereich beobachtet.

Ist hingegen eine vollständige Reduktion der Dreifachbindung erwünscht (siehe Abbildung 26, Weg b), ist der Wilkinson-Katalysator Tris(triphenylphosphin)-rhodium(I)chlorid

gegenüber heterogenen Katalysatoren zu bevorzugen. <sup>[116]</sup> Entscheidender Vorteil des Wilkinson-Katalysators ist, dass dieser kein Isotopenscrambling verursacht. Da Deuterierungen im Vergleich zu Hydrierungen, aufgrund der kinetischen Isotopeneffekte, nur langsam verlaufen, empfiehlt es sich, den *in situ* generierbaren und reaktiveren Katalysator Tris(triphenylphosphan)-rhodium(I)iodid zu verwenden. <sup>[117]</sup>

### 3.1.2.1 Synthese von (*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**)

Die Synthese von (*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**) geht von Nonansäuremethylester (**56**) aus, der mit Lithiumaluminiumdeuterid zum Alkohol **57** reduziert und anschließend mit Triphenylphosphin/Iod in 1,1-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Iodnonan (**58**) überführt wurde. Durch Alkylierung von **58** mit dem Lithiumsalz der Hept-6-ensäure (**59**) in flüssigem Ammoniak wurde Hexadec-6-ensäure (**60**) in 68 % Ausbeute erhalten. Um die Löslichkeit von [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Nonyliodid (**58**) zu erhöhen, wurde abs. DMSO als Cosolvenz eingesetzt.



**Abbildung 27:** Synthese von (*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**).

Die Reduktion von [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**60**) zur ungesättigten Hexadec-6-ensäure (**61**) erfolgte mit Natrium in flüssigem Ammoniak. Während solche Reaktionen normalerweise unterhalb der Siedetemperatur von Ammoniak durchgeführt werden <sup>[118]</sup>, erfolgte hier die Reduktion bei Raumtemperatur im Autoklaven. <sup>[119]</sup> Diese vergleichsweise drastischen Bedingungen erklären sich vermutlich aus der geringen Löslichkeit der langkettigen Carbonsäure **60** bei tiefen Temperaturen. Die Reaktion verlief glatt und stereoselektiv zum (*E*)-Isomer; der Anteil an (*Z*)-Isomer lag unterhalb von 1% (bestimmt per GC durch Integration der Peakflächen). Durch Reinigung von **61** mittels semipräparativer HPLC konnte die für biologische Fütterungsexperimente benötigte isomerenreine Carbonsäure gewonnen werden.

### 3.1.2.2 Synthese von (Z)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**)

Die Darstellung von (Z)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecensäure (**62**) erfolgte durch Hydrierung von **60** mit dem Katalysator P2-Nickel. Die Hydrierung verlief glatt zum (Z)-Alken, eine Reduktion bis zur Stufe des Alkans erfolgte nur im Spurenbereich (siehe Abbildung 28). Für biologische Fütterungsexperimente wurde die Fettsäure **62** durch HPL-chromatographische Reinigung an einer semipräparativen RP18-Säule hochrein erhalten.

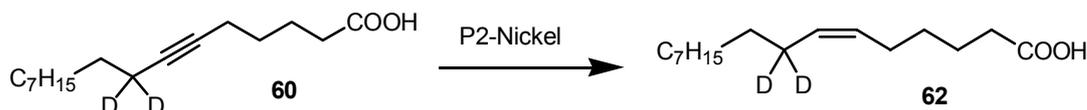


Abbildung 28: Synthese von (Z)-8,8-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**).

### 3.1.2.3 Synthese von [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecensäure (**63**)

Die Darstellung von [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecensäure (**63**) gelang durch vollständige Deuterierung der Dreifachbindung der acetylenischen Carbonsäure **60**. Wegen des mit der Deuteridübertragung behafteten KIE ist es vorteilhaft, nicht den käuflichen Wilkinson-Katalysator (PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>RhCl einzusetzen, sondern stattdessen den wesentlich reaktiveren (PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>RhI-Komplex zu verwenden. [117]

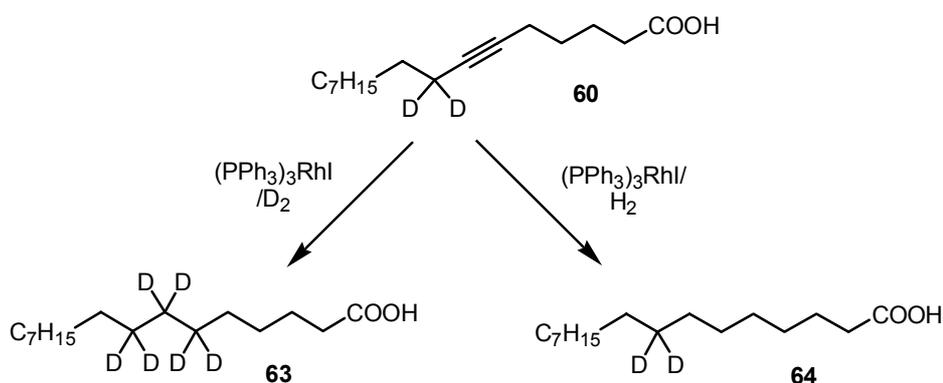


Abbildung 29: Synthese von [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecensäure (**63**) und [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecensäure (**64**).

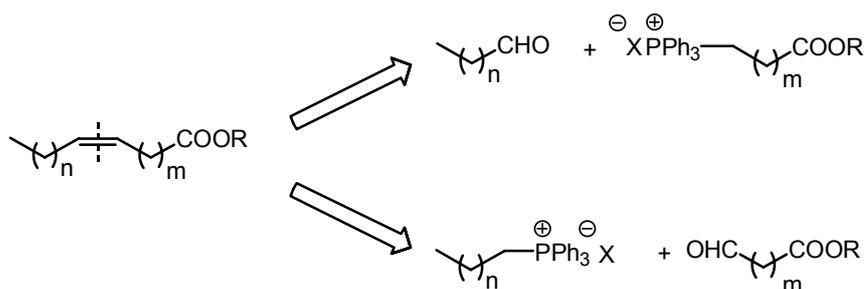
Während die Deuterierung von **60** mit dem Rhodiumchlorid-Komplex innerhalb vertretbarer Reaktionszeiten (12h) lediglich zu einem Alken/Alkan-Gemisch führte, lieferte die Umsetzung mit dem *in situ* erzeugten Rhodiumiodid-Komplex innerhalb des gleichen Zeitraums ausschließlich die gesättigte Verbindung **63** (siehe Abbildung 29). Die Darstellung von **64** gelang durch Hydrierung von **60** mit demselben Katalysator.

### 3.1.3 Synthese ungesättigter Fettsäuren durch Wittig-Olefinierung

Viele einfach und auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren lassen sich durch Wittig-Olefinierung darstellen. Wird dabei die Reaktion unter so genannten „salzfreien

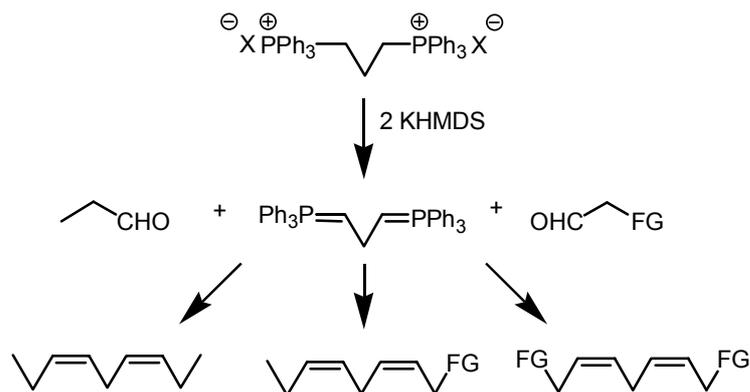
Bedingungen“, das heißt in Abwesenheit von Lithiumsalzen, geführt, lassen sich stereoselektiv *cis*-Alkene erzeugen. <sup>[120]</sup> Als Ersatz für lithiumhaltige Basen, wie BuLi, hat sich die Verwendung von Natrium oder Kaliumhexamethyldisilylamid bewährt. Einerseits sind die mit dieser Base erzielten (*Z*)-Selektivitäten sehr hoch (ca 95 %). Andererseits greift die Base aufgrund ihrer geringen Nucleophilie Esterfunktionalitäten nicht an und ist somit bestens geeignet, um auch funktionalisierte Wittig-Salze umzusetzen. Natriumhexamethylsilylamid wurde erstmals von Bestman *et al.* für die *cis*-selektive Wittig-Olefinierung eingesetzt und hat sich für die Synthese einer Vielzahl von fettsäureabgeleiteten Verbindungen, bewährt. <sup>[121]</sup>

Prinzipiell existieren zwei Möglichkeiten, einfach ungesättigte Fettsäuren in einem Schritt durch Wittig-Olefinierung aufzubauen. Wie die retrosynthetische Analyse zeigt, kann nach Bruch der Doppelbindung jeder der resultierenden Bausteine entweder das Wittigsalz oder die Aldehydkomponente darstellen (siehe Abbildung 30). Welche der beiden möglichen Wege für die Verknüpfung gewählt wird, kann sich in erster Linie danach richten, wie leicht die Bausteine synthetisch zugänglich sind.



**Abbildung 30:** Retrosynthese von Monoenfettsäuren durch Wittig-Olefinierung.

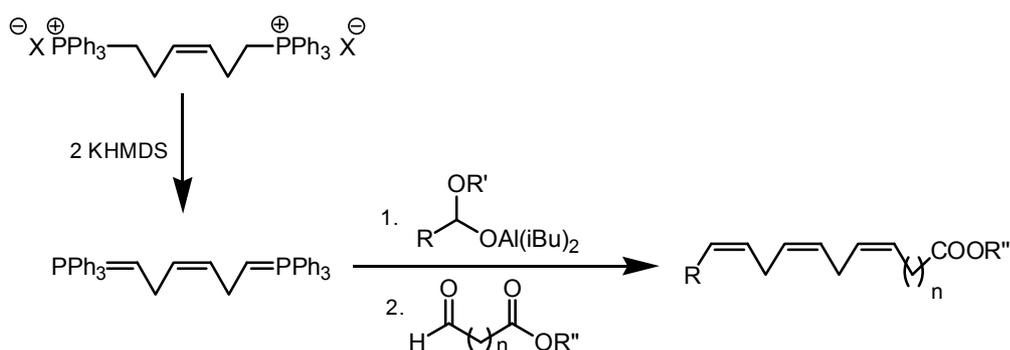
Die *cis*-selektive Wittig-Reaktion ist nicht auf die Synthese von Monoensäuren beschränkt. Eine bedeutende Rolle kommt ihr auch bei der Synthese von Verbindungen mit methylenverbrückten Doppelbindungen zu. Dieses Strukturmotiv mehrerer homokonjugierter Doppelbindungen findet sich häufig in der Natur und ist etwa Bestandteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder Insektenpheromonen. Das Konzept der dissymmetrischen Wittig-Olefinierung wurde daher erstmals durch Bestmann *et al.* zur Synthese von Insektenpheromonen genutzt. <sup>[122-124]</sup> Die Synthese basiert auf einem symmetrischen *bis*-Ylid, das durch Deprotonierung des *bis*-Wittigsalzes mit Natriumhexadimethylsilazid entsteht. Nach Zugabe der Aldehydkomponenten entstehen in einer Eintopfsynthese die drei möglichen Diene (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Konzept der dissymmetrischen *bis*-Wittig-Olefinierung.

Das Konzept der dissymmetrischen Wittig-Olefinierung konnte durch Arbeiten von Pohnert *et al.* auf die Synthese homokonjugierter Trienfettsäuren ausgedehnt und deutlich in seiner Effektivität gesteigert werden. <sup>[125]</sup> Ein entscheidender Vorteil dieser Weiterentwicklung ist, dass die beiden Aldehyde nicht mehr gleichzeitig mit dem symmetrischen *bis*-Ylid umgesetzt werden, sondern sukzessiv. Besonders elegant ist es, wenn der erste Aldehyd als Alumokomplex, erzeugt durch DIBAL-H Reduktion entsprechender Carbonsäureester, dem *bis*-Ylid zugegeben wird (siehe Abbildung 32). Bei dieser so genannten reduktiven Olefinierung wird zunächst bevorzugt das Monoadditionsprodukt erhalten. Als Grund hierfür wird in erster Linie eine nur langsame thermische Freisetzung des Aldehyds aus dem Alumokomplex und die im Vergleich zum *bis*-Ylid herabgesetzte Reaktivität des Monoadditionsaddukts diskutiert. <sup>[125]</sup> Nach Zugabe des zweiten Aldehyds wird selektiv das unsymmetrische Kupplungsprodukt gebildet. Die beiden symmetrischen Kupplungsprodukte entstehen lediglich als Nebenprodukte.

Anders als in den Arbeiten von Bestmann *et al.* führt diese Variante somit nicht zu einer nahezu statistischen Gleichverteilung der möglichen Kupplungsprodukte, sondern zur bevorzugten Bildung der unsymmetrischen Zielverbindung in guten Ausbeuten. Etwas schlechtere Resultate werden erzielt, wenn der erste Aldehyd nicht *in situ* aus dem Alumokomplex freigesetzt wird, sondern direkt langsam dem *bis*-Ylid zugegeben wird. Der Ausbeuteverlust kann aber in vielen Fällen in Kauf genommen werden, wenn die entsprechenden Aldehyde preiswert sind oder bei kurzkettigen Aldehyden eine gaschromatographische Überprüfung der DIBAL-H-Reduktion schlecht möglich ist.



**Abbildung 32:** Reduktive Variante der dissymmetrischen *bis*-Wittig-Olefinierung.

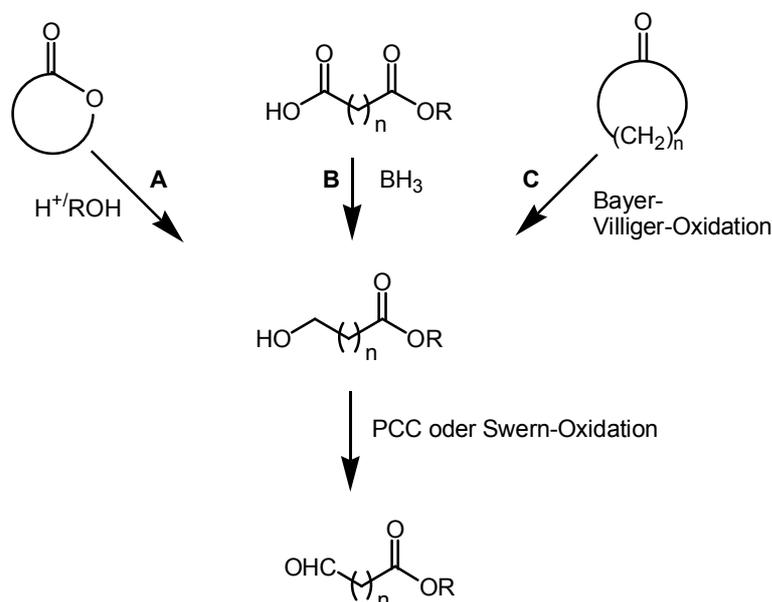
Die dissymmetrische *bis*-Wittig-Olefinierung hat sich mittlerweile mehrfach zur Synthese von Naturstoffen und davon abgeleiteten Verbindungen bewährt. <sup>[125-127]</sup> Die Stärke dieser Methode liegt darin, dass in einem Schritt Verbindungen mit mehreren methylenverbrückten (*Z*)-konfigurierten Doppelbindungen effizient zugänglich sind. Synthesen vergleichbarer Verbindungen, die auf der Kupplung von Alkinen und einer anschließenden teilweisen Reduktion der Dreifachbindungen basieren, sind stets mehrstufig und somit aufwändiger. <sup>[128]</sup>

### 3.1.3.1 Synthetischer Zugang zu $\omega$ -Oxoalkansäuremethylestern

Für die Synthese homokonjugierter Fettsäureester durch *bis*-Wittig-Olefinierung werden  $\omega$ -funktionalisierte Aldehyde benötigt. Verbindungen dieser Art mit unterschiedlichsten Kettenlängen sind in der Regel literaturbekannt, so dass ihre Synthese nach erprobten Protokollen erfolgen kann. Die meisten Syntheserouten nutzen als Zwischenstufe  $\omega$ -Hydroxyester, aus denen sich durch PCC- oder Swern-Oxidation die entsprechenden Oxocarbonsäureester gewinnen lassen (siehe Abbildung 33). Grundsätzlich gilt, dass die PCC-Oxidation zwar weniger aufwändig ist, die Swern-Oxidation aber saubere Produkte und bessere Ausbeuten liefert. Bei Verwendung der Swern-Oxidation ist in der Regel keine Reinigung des Rohprodukts notwendig.

Als Zugang zu  $\omega$ -Hydroxycarbonsäureestern bieten sich je nach Kettenlänge unterschiedliche Synthesestrategien an. Zur Synthese kurzkettiger Hydroxycarbonsäureester mit  $n = 2-5$  eignet sich eine Route, bei der cyclische Lactone in Methanol durch säurekatalysierte Ringöffnung in entsprechende  $\omega$ -Hydroxymethylester überführt werden. <sup>[129, 130]</sup> (siehe Abbildung 33, Weg A) Es ist empfehlenswert, auf eine Reinigung des  $\omega$ -Hydroxymethylesters zu verzichten, da gerade kurzkettige Spezies, wie etwa  $\omega$ -Hydroxypentansäuremethylester, stark zur Relactonisierung neigen. <sup>[130]</sup> Eine Reinigung durch Destillation oder Säulenchromatographie an Kieselgel kann deshalb nur unter Ausbeuteverlusten durchgeführt werden.

Eine Alternative zur Darstellung von  $\omega$ -Hydroxycarbonsäuremethylestern, die vor allem für die Synthese längerkettiger Verbindungen geeignet ist, stellt die Bayer-Villiger-Oxidation cyclischer Ketone in Methanol dar (siehe Abbildung 33, Weg C).<sup>[131]</sup>



**Abbildung 33:** Synthetischer Zugang zu  $\omega$ -Oxocarbonsäureestern.

Der synthetische Zugang zu  $\omega$ -Hydroxycarbonsäureestern mit der universellsten Anwendbarkeit geht von Halbestern entsprechender Dicarbonsäuren aus. Durch chemoselektive Reduktion der Carboxygruppe mit  $BH_3$  erhält man in sehr guten Ausbeuten und frei von Nebenprodukten die  $\omega$ -Hydroxycarbonsäureester (siehe Abbildung 33, Weg B), welche durch Swern-Oxidation zum Aldehyd oxidiert werden können.<sup>[132]</sup> Sofern entsprechende Halbestere kommerziell erhältlich sind, ist diese Variante die Methode der Wahl. Beide Schritte verlaufen mit sehr guten Ausbeuten und liefern Produkte, die ohne weitere Reinigung eingesetzt werden können.

### 3.1.3.2 Synthese von (Z)-Hexadec-7-ensäure (67)

Die Synthese von (Z)-Hexadec-7-ensäure (**67**) erfolgte durch *cis*-selektive Wittig-Olefinierung mit dem Wittigsalz **65** und Nonanal (**66**). Das Triphenylphosphoniumsalz **65** wurde aus  $\omega$ -Bromheptansäuremethylester durch Umsetzung mit Triphenylphosphin in siedendem Toluol gewonnen.

Die Ausbeute der Wittig-Olefinierung war mit 40 % eher moderat. Die Ursache hierfür ist darin zu suchen, dass langkettige Wittigsalze, wie **65**, stark hygroskopisch sind. Selbst durch Trocknen am Hochvakuum wurde das Wittigsalz lediglich als zähe, glasartige und noch Wasser enthaltende Substanz erhalten.<sup>c</sup> Bei der Wittigreaktion sind deshalb die Verluste darauf zurückzuführen, dass Teile von zugegebenem KHMDS durch Wasser hydrolysiert

<sup>c</sup> Der Gehalt an Wasser kann aus dem  $^1H$ -NMR-Spektrum abgeschätzt werden.

wurden und somit die Ylidbildung nicht vollständig verlief. Um diese Probleme zu mindern, würde es sich anbieten, das Wittigsalz aus Ether/Dichlormethan umzukristallisieren und über Phosphorpentoxid zu trocknen. Alternativ könnte das Wittigsalz auch durch Reaktion von  $\omega$ -Bromheptansäuremethylester mit Triphenylphosphin in der Schmelze dargestellt werden (siehe Synthese von **68**).

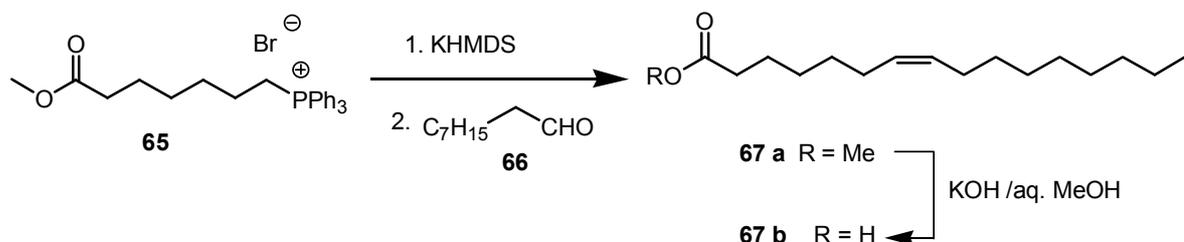


Abbildung 34: Synthese von (Z)-Hexadec-7-ensäure (**67**).

### 3.1.3.3 Synthese von (Z)-[2,2- $^2H_2$ ]-Hexadec-11-ensäure (**71**)

Die Synthese von (Z)-[2,2- $^2H_2$ ]-Hexadec-11-ensäure (**71**) erfolgte durch *cis*-selektive Wittig-Olefinierung des Triphenylphosphoniumsalzes **68** mit Pentanal (siehe Abbildung 35). Das Wittigsalz **68** wurde durch Reaktion von  $\omega$ -Bromoundecansäureisopropylester mit Triphenylphosphin in der Schmelze als harte glasartige Substanz erhalten. <sup>[133]</sup> Der Austausch der C-H-aciden Protonen in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe erfolgte mit Natrium in deuteriertem Methanol ( $CH_3OD$ ). Durch Hydrolyse mit  $DCl/D_2O$  wurde die Carbonsäure **71** erhalten.

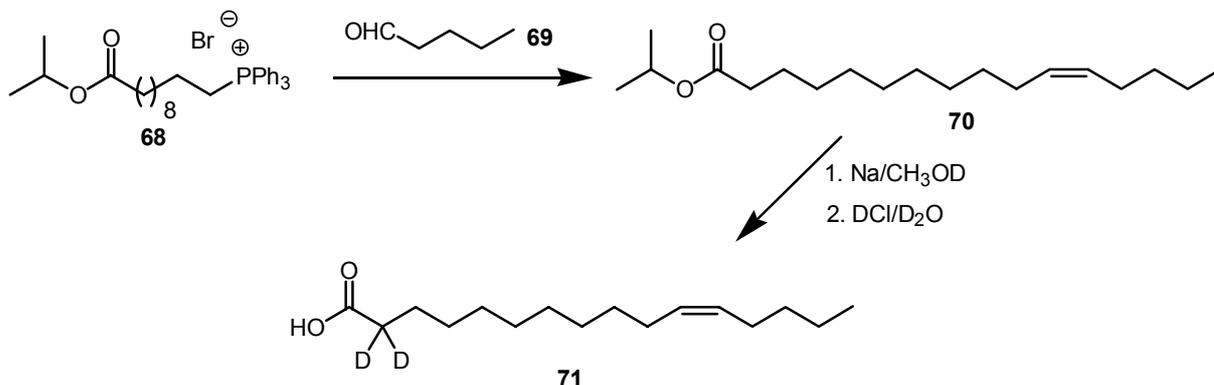
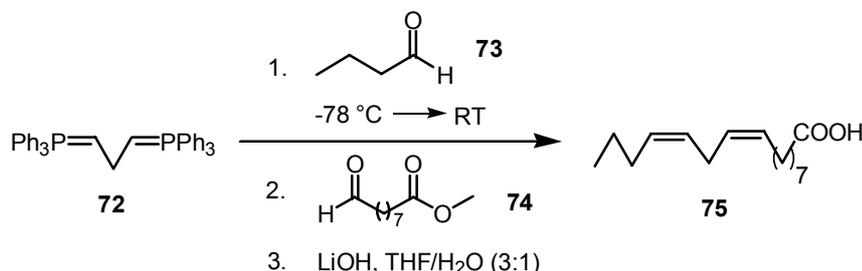


Abbildung 35: Synthese von (Z)-[2,2- $^2H_2$ ]-Hexadec-11-ensäure (**71**).

### 3.1.3.4 Synthese von (9Z,12Z)-Hexadeca-9,12-diensäure (**75**)

Die Darstellung von (9Z,12Z)-Hexadeca-9,12-diensäure (**75**) gelang durch gekreuzte Wittig-Olefinierung des *bis*-Ylids **72** mit Butanal (**73**) und dem  $\omega$ -Oxononansäuremethylester (**74**) in 40 % Gesamtausbeute (siehe Abbildung 36). Durch langsame Zugabe des ersten Aldehyds Butanal (**73**) und langsames Erwärmen der Lösung auf Raumtemperatur konnte eine Addition an beiden Enden des *bis*-Ylids **72** weitestgehend vermieden werden. Nach Zugabe

des zweiten Aldehyds **74** im leichten Überschuss (1,1 eq) entstand so das gekreuzte Olefinierungsprodukt als Hauptkomponente. Durch Verseifung mit LiOH in THF/Wasser wurde die Carbonsäure **75** erhalten.

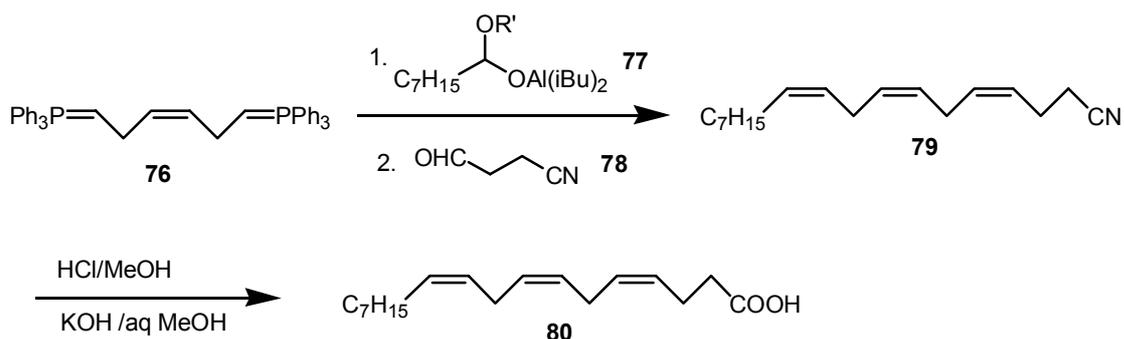


**Abbildung 36:** Synthese von (9Z,12Z)-Hexadeca-9,12-diensäure (**75**).

### 3.1.3.5 Synthese von (4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (**80**)

Die Synthese von (4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (**80**) erfolgte durch dissymmetrische Wittig-Olefinierung des *bis*-Ylids **76** mit dem Alumokomplex von Octanal (**77**) und 3-Cyanopropanal (**78**) in 40 Prozent Ausbeute (siehe Abbildung 37).

Alternativ wäre unter Verwendung von 4-Oxobuttersäuremethylester direkt der Methylester von **80** zugänglich; zumal durch säurekatalysierte Ringöffnung von Butyrolacton und anschließende Oxidation ein potentieller Syntheseweg zur Verfügung steht. Da Butyrolacton als mögliche Vorstufe des Neurotransmitters GABA (liquid extasy) aber mittlerweile nur unter Auflagen käuflich erhältlich ist und zudem die Zwischenstufe 4-Hydroxybuttersäuremethylester stark zur Relactonisierung neigt <sup>[129]</sup>, wurde stattdessen der Umweg über das Nitril (**79**) gewählt.



**Abbildung 37:** Synthese von (4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (**80**).

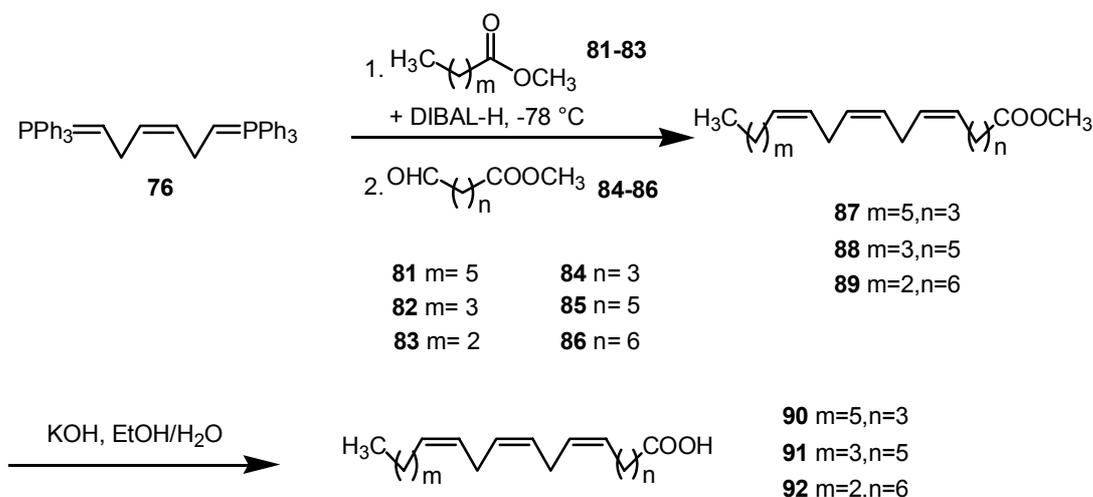
Durch DIBAL-H-Reduktion von Octansäuremethylester wurde der Alumokomplex (**77**) erhalten und bei  $-78^\circ\text{C}$  langsam zu einer Lösung des *bis*-Ylids (**76**) transferiert. Nach langsamem Erwärmen auf Raumtemperatur und erneutem Abkühlen der Reaktionsmischung auf  $-78^\circ\text{C}$  wurde 3-Cyanopropanal (**78**) zugegeben. Die Darstellung von **78** erfolgte durch säurekatalysiertes Entschützen des korrespondierenden Dimethylacetals. <sup>[134]</sup>

Durch Hydrolyse des Nitrils **79** wurde die Octadecatriensäure (**80**) erhalten. Im Vergleich zur basischen Hydrolyse mit wässrig-ethanolischer KOH bei 80 °C <sup>[135]</sup> lieferte die saure Hydrolyse mit methanolischer HCl bei Raumtemperatur <sup>[135]</sup> bessere Ausbeuten und weniger Verunreinigungen. Die saure Hydrolyse führte jedoch, trotz der Zugabe von Wasser, nur zu einem Gemisch von Methylester und freier Säure. Aus diesem Grund wurde das Produktgemisch im Anschluss einer basischen Hydrolyse mit wässrig-methanolischer KOH unterworfen. Ausgehend vom Nitril **79** wurde die Carbonsäure (**80**) in 45 % Ausbeute erhalten.

### 3.1.3.6 Synthese von (5Z,8Z,11Z)-Octadeca-5,8,11-Octadecansäure (**90**), (7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (**91**), (8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (**92**)

Die drei homokonjugierten Triensäuren **91**, **92** und **93** wurden nach der reduktiven Variante der gekreuzten *bis*-Wittig-Olefinierung in Ausbeuten von 28-37 % hergestellt (siehe Abbildung 37).

Die aliphatischen unfunctionalisierten Aldehyde wurden jeweils durch DIBAL-H-Reduktion der Methylester generiert und als Alumoacetale dem *bis*-Ylid **76** zugegeben. Die Synthese der  $\omega$ -Oxocarbonsäureester erfolgte nach literaturbekannten Vorschriften. Die Darstellung von 5-Oxopentansäuremethylester (**84**) erfolgte durch säurekatalysierte Ringöffnung von Valerolacton und anschließender Oxidation mit PCC (siehe Abbildung 33, Weg A). <sup>[130]</sup> Die Synthese von 7-Oxoheptansäuremethylester (**85**) gelang durch ringöffnende Bayer-Villiger-Oxidation von Cycloheptanon und anschließende PCC-Oxidation (siehe Abbildung 33, Weg C). <sup>[131]</sup> 8-Oxooctansäuremethylester (**86**) wurde durch chemoselektive Reduktion von Suberinsäuremonomethylester mit BH<sub>3</sub> und anschließender Swern-Oxidation dargestellt (siehe Abbildung 33, Weg B). <sup>[132]</sup>

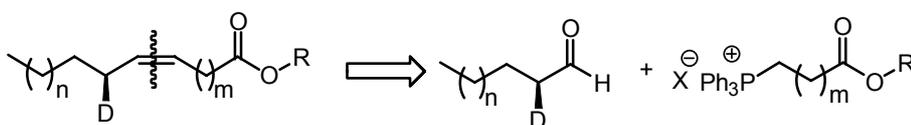


**Abbildung 38:** Synthese homokonjugierter Trienfettsäuren durch *bis*-Wittig-Olefinierung.

Die durch *bis*-Wittig-Olefinierung erhaltenen Fettsäuremethylester wurden mittels wässrig-ethanolischer KOH verseift, so dass die Carbonsäuren in 90-95 % Ausbeute gewonnen werden konnten. Um für biologische Fütterungsstudien hochreine Fettsäuren einsetzen zu können, wurden diese per HPLC an einer RP18-Säule gereinigt.

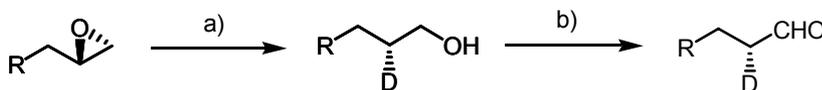
### 3.1.4 Synthese enantiospezifisch deuterierter Fettsäuren durch Wittig-Olefinierung

Die Wittig-Olefinierung kann auch zur Synthese von ungesättigten Fettsäuren, die in Allylstellung enantiospezifisch deuteriert sind, genutzt werden. Hierzu eignet sich ein Ansatz, bei dem chirale Aldehyde mit entsprechenden Wittig-Salzen verknüpft werden (siehe Abbildung 39).



**Abbildung 39:** Retrosynthese von allylständig deuterierten chiralen Monoenfettsäuren.

Der in Abbildung 39 skizzierte Ansatz benötigt für die Wittig-Olefinierung Aldehyde mit einer enantiospezifischen Deuteriumsubstitution am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Solche Verbindungen sollten sich durch regioselektive Ringöffnung chiraler Epoxide, gefolgt von einer Oxidation des erhaltenen Alkohols zum Aldehyd gewinnen lassen (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 40:** Synthesekonzept in  $\alpha$ -Position chiral deuterierter Aldehyde; a) Regioselektive Ringöffnung, b) Oxidation.

Die Oxidation des Alkohols soll, ohne dass durch Keto-Enol-Tautomerie eine Racemisierung am isotopenmarkierten  $\alpha$ -Kohlenstoffatom hervorgerufen wird, erfolgen. Am besten geeignet scheint für diese Umsetzung das Dess-Martin-Reagenz <sup>[136]</sup>, da es eine schnelle und schonende Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden erlaubt

Die für die mechanistische Untersuchung von Desaturasen notwendige Isotopensubstitution mit einem ee-Wert von >95 % setzt voraus, dass für die Ringöffnung zum Alkohol möglichst enantiomerenreine Epoxide als Ausgangsverbindungen eingesetzt werden. Eine allgemein verwendbare Epoxidierungsmethode, welche die asymmetrische Synthese von terminalen Epoxiden mit solch hohen ee-Werten erlaubt, gibt es bis heute nicht. Seit wenigen Jahren existieren jedoch Arbeiten von Jacobsen *et al.*, die die Synthese von nahezu enantiomerenreinen terminalen Epoxiden auf einem Umweg erlaubt. <sup>[137]</sup> Nach dem Prinzip der kinetischen Racematenspaltung werden dabei racemische Epoxide in Gegenwart von

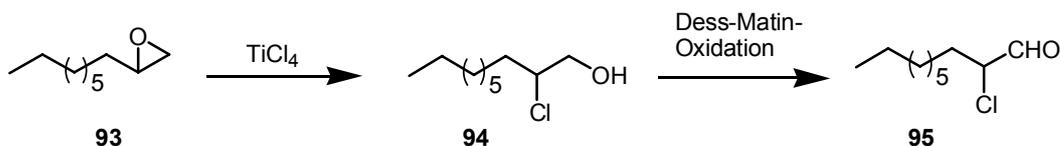
einem Cobalt-Salen-Komplex und Wasser umgesetzt. Dieser Katalysator erlaubt die beschleunigte Hydrolyse eines Enantiomers des racemischen Epoxidgemisches, so dass nach 50 % Umsatz das andere Enantiomer angereichert zurückbleibt. <sup>[138, 139]</sup> Während die asymmetrische Epoxidierung mit Mangan-Salen-Komplexen im Falle von terminalen unfunctionalisierten Alkenen nur mit einer geringen asymmetrischen Induktion verläuft, <sup>[140, 141]</sup> liefert die kinetische Racematspaltung mit Cobalt-Salen-Komplexen durchweg nahezu enantiomerenreine Produkte. Der Nachteil der kinetischen Racematspaltung racemischer Epoxide besteht darin, dass mindestens 50 % der ursprünglichen eingesetzten Menge an racemischem Epoxid verloren gehen. Terminale Epoxide sind jedoch preiswert und in grossem Maßstab durch Epoxidierung von käuflichen Alkenen mit Peroxysäuren darstellbar.

Grundsätzlich erfolgt ein nucleophiler Angriff von terminalen Epoxiden durch Metallhydride bevorzugt am sterisch besser zugänglichen C-Atom und führt somit unter Ringöffnung zu sekundären Alkoholen. Für die in Abbildung 40 gezeigte Syntheseroute musste deshalb zunächst ein Weg gefunden werden, um den nucleophilen Angriff auf das höhersubstituierte Kohlenstoffatom zu lenken, um so zu primären Alkoholen zu kommen.

Bereits vor etwa 50 Jahren ist die regiochemische Reduktion von Epoxiden mit Metallhydriden intensiv erforscht worden. <sup>[142]</sup> In mehreren Studien ist dabei der Einfluss von Lewisäuren, wie  $\text{AlCl}_3$  <sup>[143-145]</sup>, auf die Regioselektivität der Reduktion untersucht worden; andere Autoren haben den Einfluss von sterisch anspruchsvollen Hydridübertragungsreagenzien wie 9,9-di-n-butyl-9-borabicyclo-[3.3.1]-nonan untersucht. <sup>[146]</sup> Insbesondere im Fall von unverzweigten, nicht-cyclischen Epoxiden gibt es jedoch nur wenige literaturbekannte Ausnahmen, bei denen es gelang den nucleophilen Angriff auf das höhersubstituierte C-Atom zu lenken. <sup>[147-150]</sup> Problematisch ist außerdem, dass sich nicht alle Methoden ohne weiteres auf die Reduktion mit Metalldeuteriden übertragen lassen. Einerseits sind sterisch anspruchsvolle Metalldeuteride nur mit größerem synthetischen Aufwand zugänglich. Andererseits liefert zwar die Reduktion terminaler Epoxide mit Natriumcyanoborodeuterid in Gegenwart von Bortrifluorid mit hoher Regioselektivität den primären Alkohol, führt aber zu einem 70:30-Verhältnis einer Deuteriumsubstitution an C(1) und C(2). <sup>[151]</sup>

Um ein Syntheseprotokoll für die regiochemische Ringöffnung terminaler Epoxide zu primären Alkoholen auszuarbeiten, wurde zunächst racemisches Epoxydecan (**93**) als Modellsubstanz gewählt und die Reduktion mit Lithiumaluminiumdeuterid in Gegenwart verschiedener Lewisäuren untersucht. Weder die Reaktion von **93** in Gegenwart von  $\text{AlCl}_3$ , noch von  $\text{TiCl}_4$  oder  $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$  unter denselben experimentellen Bedingungen führten zur regioselektiven Ringöffnung unter Bildung des primären Decylalkohols. Problemlos gelang im Vergleich dazu die regioselektive Ringöffnung von Epoxydecan mit  $\text{TiCl}_4$  zum  $\alpha$ -

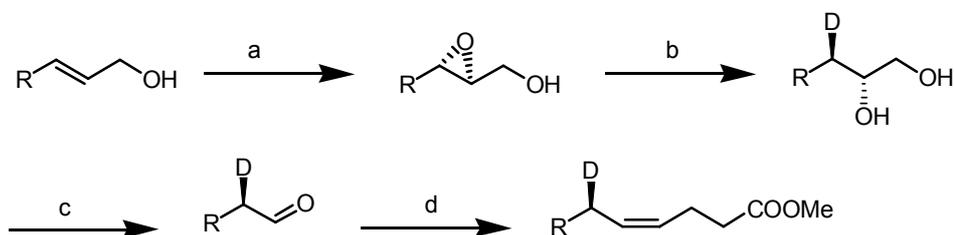
Halohydrin **94**.<sup>[147]</sup> Durch anschließende Oxidation von **94** mit Dess-Martin-Periodinan<sup>[136]</sup> gelang die Synthese von  $\alpha$ -Chlordecanal (**95**) (siehe Abbildung 41).



**Abbildung 41:** Synthese von  $\alpha$ -Chlordecanal (**95**) durch regioselektive Ringöffnung des terminalen Epoxids (**93**).

Aufgrund der hohen Neigung zur Isomerisierung ist **95** jedoch nicht zur Synthese von enantioselektiv markierten Fettsäuren geeignet. Dieses Synthesekonzept wurde deshalb verworfen und stattdessen auf eine etablierte Syntheseroute<sup>[152]</sup> zurückgegriffen.

Diese etablierte Syntheseroute nutzt ebenfalls chirale Epoxide als Synthesebausteine. Die asymmetrische Synthese dieser Epoxide erfolgt über die Sharpless-Epoxidierung allylischer Alkohole (Abbildung 42). Da wiederum eine nahezu enantiomerenreine Isotopenmarkierung das Ziel dieser Synthese ist, empfiehlt es sich, statt der katalytisch geführten Sharpless-Epoxidierung die stöchiometrische Variante zu verwenden. Während die stöchiometrische Variante ee-Werte > 95 % liefert, erhält man bei der katalytischen Variante meist etwas niedrigere Werte.<sup>[153]</sup> Ausgehend vom Produkt der Sharpless-Epoxidierung erfolgt im nächsten Schritt die regioselektive Ringöffnung mit Natriumbordeuterid. Dabei wird der Epoxyalkohol zunächst mit Titan-tetraisopropoxylat komplexiert<sup>[152]</sup>, so dass ein Angriff des Nucleophils bevorzugt am  $\gamma$ -Kohlenstoffatom stattfindet und das 1,2-Diol gebildet wird. Durch Spaltung des Diols mit Natriumperodat<sup>[154]</sup> gelangt man schließlich zum chiralen  $\alpha$ -deutierten Aldehyd. Nach der in Abbildung 42 gezeigten Route lässt sich dieser Aldehyd zum Aufbau von chiralen deutierten Monoenfatssäuren nutzen.

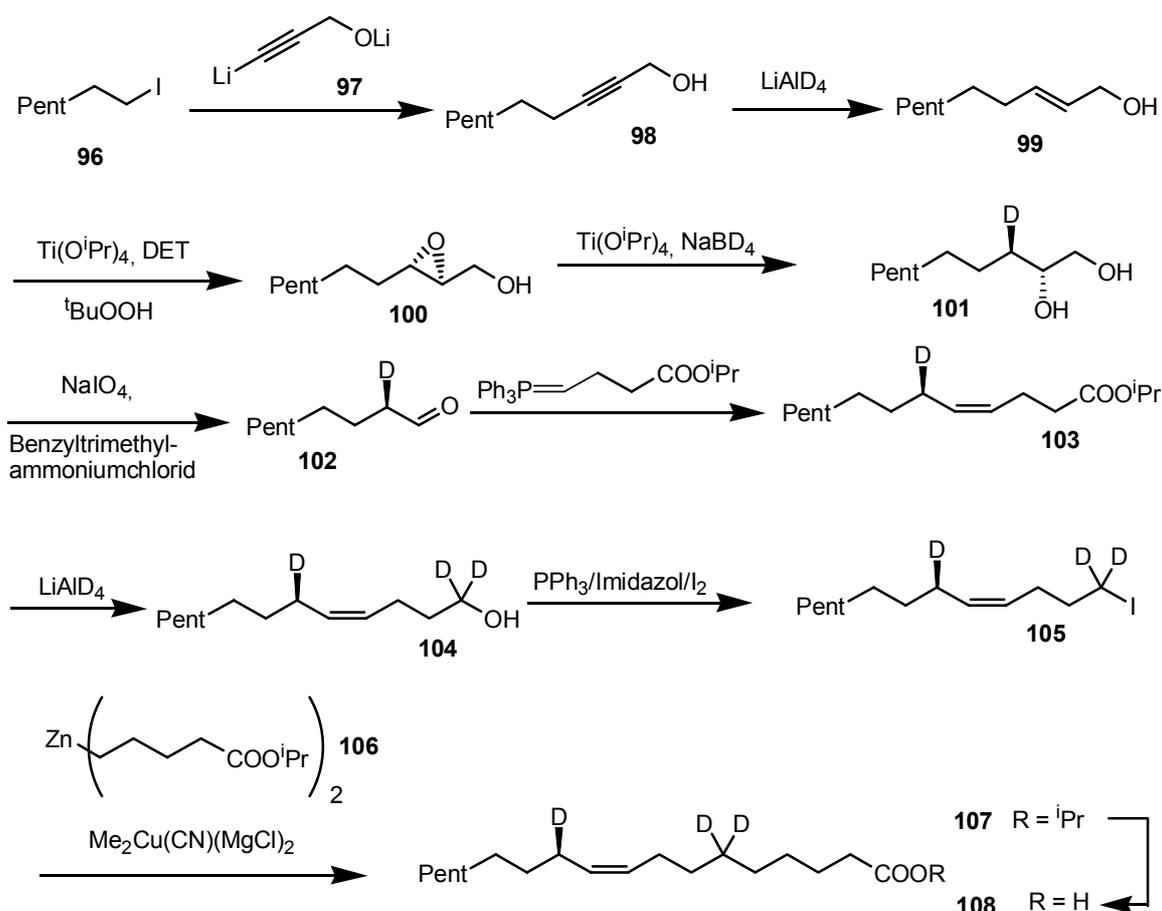


**Abbildung 42:** Synthesekonzept enantiospezifisch deutierter Monoenfatssäuren: a) Sharpless-Epoxidierung, b) regioselektive Ringöffnung, c) Diolsplaltung, d) Wittig-Reaktion.

### 3.1.4.1 Synthese von (11*R*)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäure

Als Substrat für die Sharpless-Epoxidierung wurde der Allylalkohol **99** benötigt. Dessen Synthese gelang ausgehend von Pentyljodid (**96**) in 2 Stufen. Im ersten Schritt wurde Pentyljodid (**96**) mit dem Lithiumsalz von Propargylalkohol (**97**) in flüssigem Ammoniak umgesetzt. Auf ein Schützen der Hydroxygruppe als THP-Ether kann verzichtet werden, da

nach dem HSAB-Prinzip Lithiumacetylide mit Alkyljodiden bevorzugt unter C-C-Verknüpfung reagieren. Die Reduktion des Alkylierungsprodukts **98** mit Lithiumaluminiumhydrid führte stereoselektiv zur Bildung des (*E*)-Allylkohols **99**. Für die asymmetrische Epoxidierung von **99** wurde eine Vorschrift verwendet <sup>[155]</sup>, die alle Verbesserungen des ursprünglich von Katsuki und Sharpless entwickelten Protokolls <sup>[156]</sup> wie bsp. ein „Altern“ des Katalysators <sup>[157]</sup>, berücksichtigt. Die Sharpless-Epoxidierung von **99** lieferte den nahezu enantiomerenreinen Epoxyalkohol **100**. Der ee-Wert wurde nach Umsetzung zum Mosher-Ester mittels NMR-Spektroskopie bestimmt. <sup>[152, 157]</sup>.



**Abbildung 43:** Synthese von (11*R*)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäure (**108**).

Im Vergleich zur regioselektiven Reduktion von Epoxyalkoholen mit dem System Natriumborhydrid/Titantetraisopropoxylat <sup>[152]</sup> verläuft die entsprechende Umsetzung des Epoxyalkohols **100** mit Natriumbordeuterid/Titantetraisopropoxylat weniger glatt. Da die Deuteriumübertragung mit einem kinetischen Isotopeneffekt behaftet ist, erforderte die Reduktion von 2,3-Epoxydecanol (**100**) vergleichsweise drastische Reaktionsbedingungen. Erst bei Erhitzen unter Rückfluss gelang eine vollständige Umsetzung des Epoxyalkohols **100**, allerdings mit dem nachteiligen Effekt, dass die Regioselektivität der Reduktion deutlich

herabgesetzt ist. So führte die Umsetzung unter diesen Bedingungen lediglich zu einem 60:40-Gemisch von 1,2- zu 1,3-Diol.<sup>d</sup>

Deshalb wurde versucht, die reaktiveren Metalldeuteride, Lithiumaluminiumdeuterid und Lithiumbordeuterid, darstellbar aus NaBD<sub>4</sub> durch Metallaustausch <sup>[158]</sup>, für die nucleophile Ringöffnung von **100** einzusetzen. Zwar gelang mit beiden Reagenzien die Reduktion bei Raumtemperatur; als Produkt wurde allerdings jeweils ein nahezu 1:1-Gemisch von 1,2- zu 1,3-Diol erhalten.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Reduktion des Epoxyalkohols **100** unter den gestesteten experimentellen Bedingungen nur mit mäßiger Regioselektivität und in moderaten Ausbeuten zum deuteriumsubstituierten 1,2-Diol **101** führt.

Das als Nebenprodukt gebildete 1,3-Diol konnte nur teilweise durch säulenchromatographische Reinigung abgetrennt werden. Die Spaltung des 1,2-Diols (**101**) zum Aldehyd (**102**) im nachfolgenden Syntheseschritt konnte jedoch problemlos in Gegenwart von Spuren des 1,3-Diols durchgeführt werden. Hierzu wurde **102** mit Natriumperodat in dem Zweiphasensystem Wasser/Dichlormethan umgesetzt. In Gegenwart des Phasentransferkatalysators Benzyltrimethylammoniumchlorid gelang die selektive Spaltung von **102** innerhalb weniger Minuten. <sup>[154]</sup> Das als Verunreinigung enthaltene 1,3-Diol wurde nicht gespalten und verblieb bei der Aufarbeitung in der wässrigen Phase. Um eine Isomerisierung des Aldehyds **102** zu vermeiden, wurde dieser ohne eine weitere Reinigung für die anschließende Wittig-Olefinierung eingesetzt. Durch *cis*-selektive Wittig-Olefinierung mit dem Triphenylphosphoniumsalz von Brombuttersäuremethylester wurde der markierte Tridecensäureisopropylester **103** erhalten. Zur Einbringung weiterer Isotopenmarkierungen wurde **103** mit Lithiumaluminiumdeuterid reduziert. Durch Substitution des Alkohols **104** wurde das Iodid **105** erhalten. Die Zink-Kupfer vermittelte Kreuzkupplung von **105** mit  $\omega$ -Iodovaleriansäureisopropylester führte schließlich zum Methylester der deuterierten Ölsäure **106**. Um eine möglichst gute Umsetzung des deuterierten Iodids **105** zu erzielen, wurden zwei Äquivalente des aus  $\omega$ -Iodovaleriansäuremethylester dargestellten Dialkylzinkats eingesetzt. Durch Verseifung von **106** mit LiOH in Wasser/THF 1:3 wurde die deuterierte Ölsäure **107** erhalten.

---

<sup>d</sup> Die Identifikation von 1,2- und 1,3-Diol ist leicht anhand des HH-COSY-Spektrums möglich. Die Integration der Signale liefert dabei das Verhältnis der beiden gebildeten Produkte.

## 3.2. Mechanistische Charakterisierung von Desaturasen des Sphingolipidstoffwechsels höherer Pflanzen und Tiere

### 3.2.1 Biosynthese von Sphingolipiden

1888 entdeckte der deutsche Arzt Tudichum eine Substanz, die er wegen ihres rätselhaften chemischen Verhaltens, abgeleitet von dem Begriff Sphinx, Sphingosin nannte. <sup>[159]</sup> Heute weiß man, dass Sphingosin Strukturbestandteil einer Klasse von mittlerweile mehr als 300 verschiedenen so genannten Sphingolipiden ist. <sup>[160, 161]</sup> Sphingolipide sind in der Natur weit verbreitet und wurden in Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen, Tieren und im Menschen nachgewiesen.

Neben Glyco- und Phospholipiden sind Sphingolipide Bestandteil der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen. Während die Phospholipidzusammensetzung unter anderem maßgeblich die Membranfluidität steuert, übernehmen Sphingolipide im Wesentlichen andere Aufgaben. Viele Sphingolipide sind hochaktive Signalmoleküle, die an wichtigen Prozessen, wie dem Zellwachstum, der Zell-Zell-Erkennung, der Zelldifferenzierung oder dem programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt sind. <sup>[16, 162-164]</sup> Die physiologische Wirkung wird dabei wahrscheinlich nicht von einem einzigen Sphingolipid bestimmt. Vielmehr scheint ein komplexes Zusammenspiel, bestehend aus *de novo* Synthese und Abbau verschiedener Sphingolipide, die physiologische Wirkung zu bestimmen. <sup>[164, 165]</sup> Obwohl die Regulation und die Bedeutung der meisten Sphingolipide bis heute nur teilweise verstanden sind, nimmt doch ein Baustein, das Ceramid (**115**), innerhalb dieses komplexen Netzwerkes eine herausragende Stellung ein. <sup>[166]</sup> Nahezu alle Sphingolipide, mit Ausnahme von denen in höheren Pflanzen, leiten sich von dieser gemeinsamen Vorstufe ab. Ceramid (**115**) kann dabei entweder durch Abbau höher funktionalisierter Sphingolipide oder durch *de novo* Biosynthese entstehen. <sup>[167, 168]</sup>

Die *de novo* Biosynthese von Ceramid (**115**) beginnt mit der von einer Palmitoyltransferase katalysierten Kondensation von Palmitinsäure-CoA-Ester (**108**) mit der Aminosäure Serin (**109**) (siehe Abbildung 44). Das so gebildete 3-Ketosphinganin (**110**) wird im nachfolgenden Schritt von einer 3-Ketosphinganin-Reduktase in Sphinganin (**111**) überführt. Durch Acylierung der Aminogruppe mit Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge wird Dihydroceramid (**113**) gebildet. Den letzten Schritt der Biosynthese von Ceramid (**115**) stellt die Einführung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C(4) und C(5) dar und wird von einer  $\Delta^4$ -Dihydroceramid-Desaturase katalysiert. Dieser letzte Schritt ist von doppelter Bedeutung. Einerseits liefert er mit Ceramid (**115**) einen Baustein, von dem sich z.B. durch Glycosylierung eine Vielzahl weiterer Sphingolipide ableitet. Andererseits wird das biologisch

wenig aktive Dihydroceramid (**113**) durch die Desaturase in den hochaktiven sekundären Botenstoff Ceramid (**115**) überführt. <sup>[167]</sup>

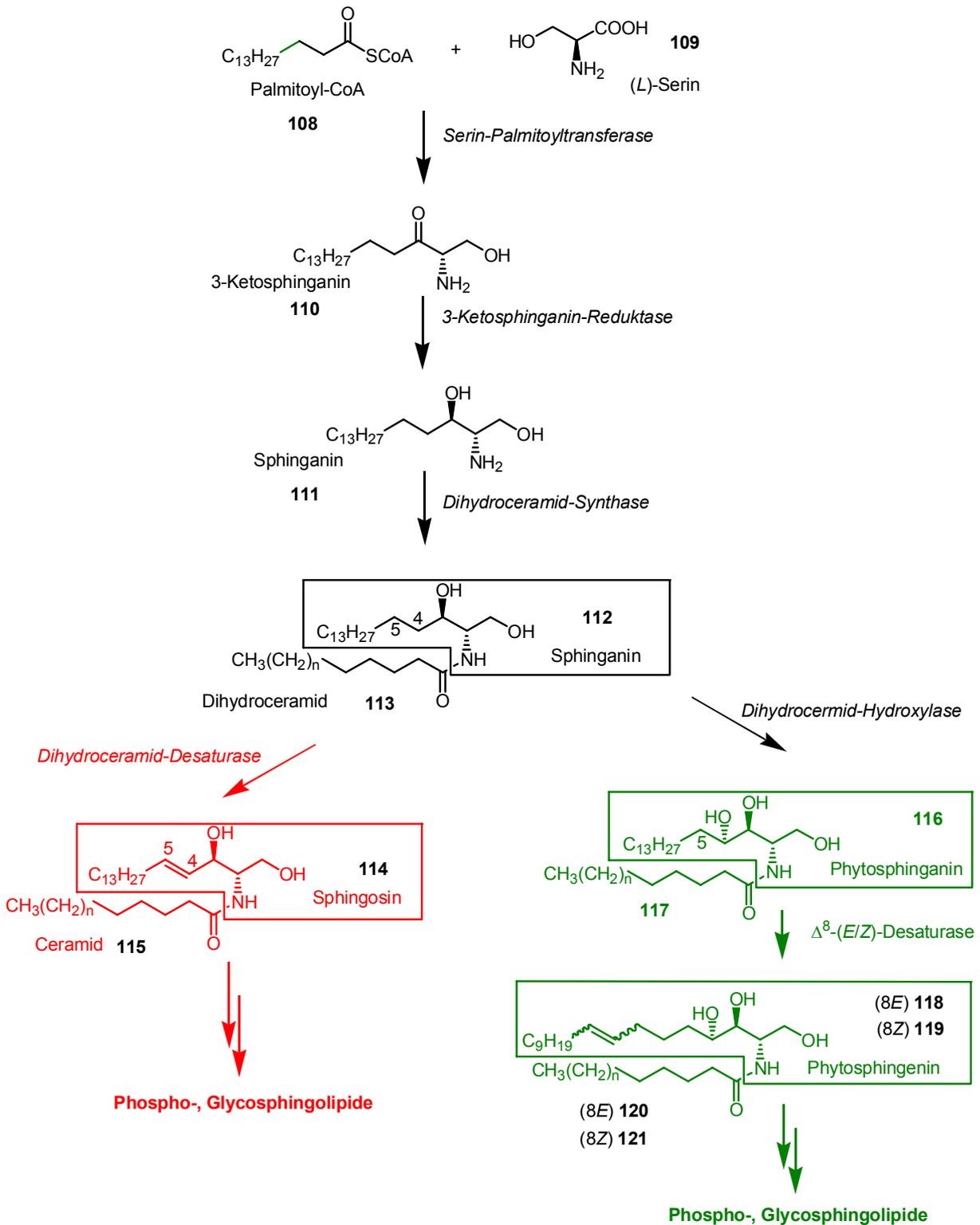
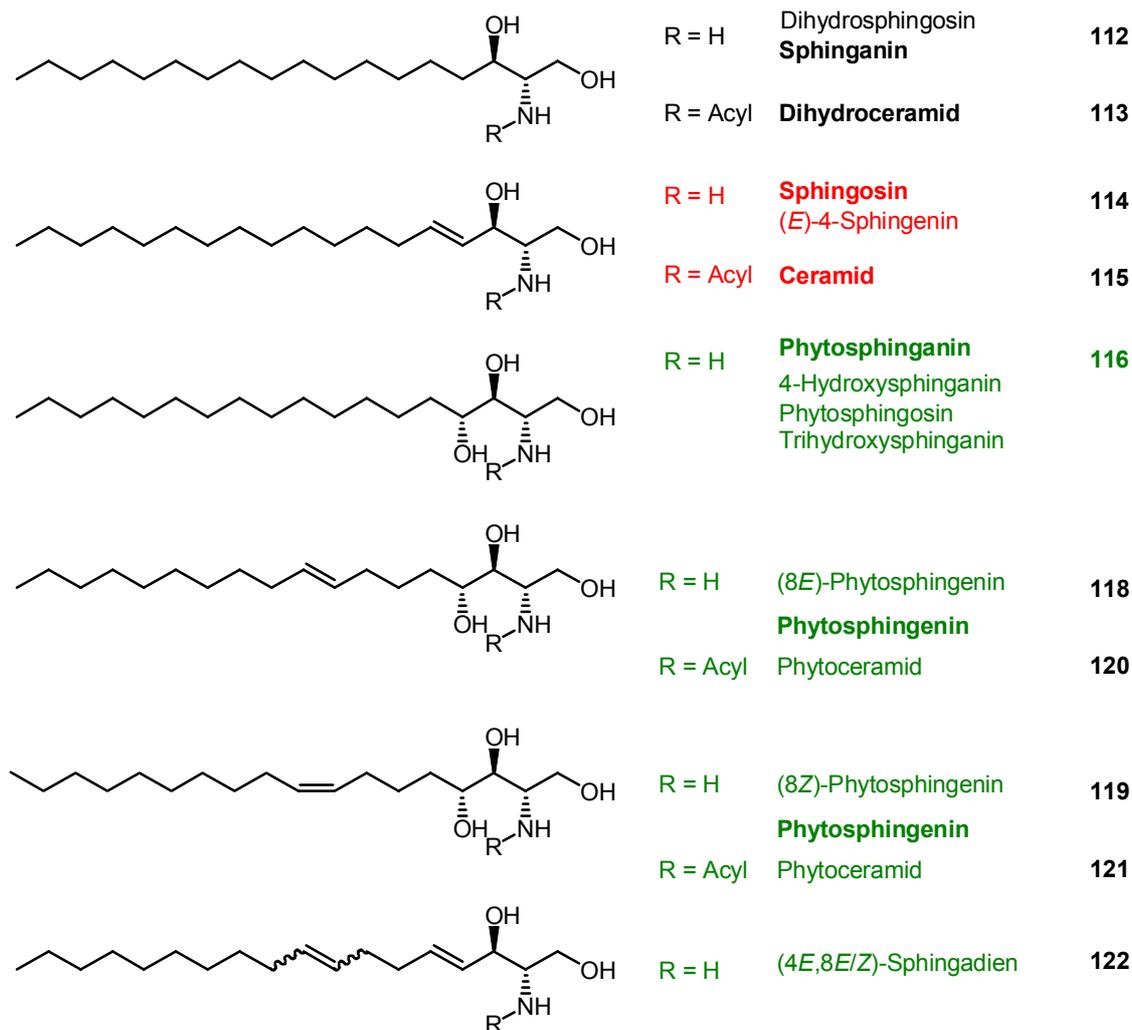


Abbildung 44: Biosynthese von Sphingolipiden in Tieren (links) und in Pflanzen (rechts).

Während man in den meisten Organismen Ceramid (**115**) als Strukturelement von Sphingolipiden findet, ist dessen zentrale Rolle in höheren Pflanzen weniger ausgeprägt. <sup>[16]</sup> Vielmehr findet man dort hauptsächlich Sphingolipide, die an C(4) hydroxyliert und zwischen C(8) und C(9) ungesättigt sind. Die Doppelbindung kann dabei sowohl in (*E*)- als auch in (*Z*)-Konfiguration vorliegen. In Analogie zum Ceramid (**115**) mit seinem Sphingosinrückgrat werden die trihydroxylierten pflanzlichen Sphingobasen als Phytosphingosine oder Phytosphinganine bezeichnet. Die ungesättigten trihydroxylierten Sphingobasen mit einer  $\Delta^8$ -Doppelbindung werden entsprechend als Phytosphingenine bezeichnet. Neben den trihydroxylierten Sphingolipiden finden sich in Pflanzen häufig Sphingadiene, die eine (*E*)-konfigurierte Doppelbindung zwischen C(4) und C(5) und eine (*E*)- oder (*Z*)-Doppelbindung zwischen C(8) und C(9) besitzen. Die für Säugetiere typischen auf Ceramid basierenden Sphingolipide sind in den meisten Pflanzen nur in Spuren enthalten. <sup>[16, 17, 169]</sup>

Die in Abbildung 44 dargestellte Biosynthese der Sphingolipide ist zu einem gewissen Grad spekulativ. Obwohl von den meisten Autoren in entsprechenden Schemata Sphingolipide als Substrate der Hydroxylierung und Desaturierung dargestellt werden, ist bis heute ungeklärt, ob letztlich Sphingolipide oder freie Sphingobasen die Substrate darstellen. <sup>[16, 17]</sup>

Die Namensgebung der Sphingolipide unterliegt keinen strengen Regeln. Zudem werden oftmals die historischen Trivialnamen zur Bezeichnung verwendet, so dass das im Zusammenhang mit Sphingolipiden verwendete Vokabular vielfach unübersichtlich ist. So können die Produkte einer  $\Delta^4$ -Sphingolipiddesaturase als Dihydroxysphingenin, Sphingosin und Ceramid bezeichnet werden. Eine Übersicht aller für diese Arbeit relevanten Sphingolipide bzw. Sphingobasen gibt Abbildung 45, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Begriffe fett gedruckt sind.



**Abbildung 45:** Struktur und Nomenklatur der häufigsten Sphingolipide in Pflanzen (grün) und Tieren (rot).

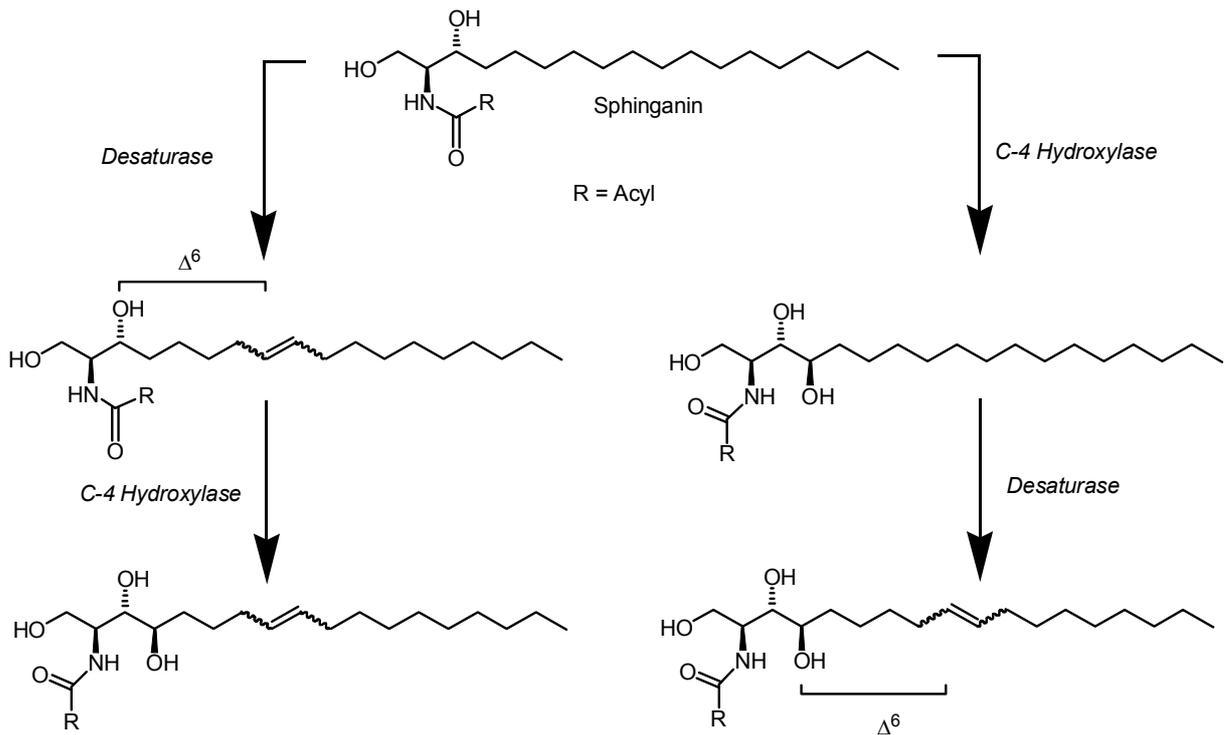
Die Funktion von Sphingolipiden in Säugetieren ist vor allem wegen des pharmazeutischen Interesses in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht worden. <sup>[162, 163]</sup> Nahezu verschwindend gering ist demgegenüber das Wissen über die Bedeutung von Sphingolipiden in Pflanzen. In neuerer Zeit zeichnet sich jedoch ab, dass Sphingolipide in pflanzlichen Systemen ähnliche Aufgaben übernehmen und etwa an der Signaltransduktion, der Stressantwort oder der Phytopathogenese beteiligt sind. <sup>[16, 17, 170, 171]</sup> Vor diesem Hintergrund erscheint es kein Zufall zu sein, dass einige Pflanzen ein individuelles, für ihre jeweilige Art charakteristisches Verhältnis von (*E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenin erzeugen.

Aus dem Bereich der chemischen Ökologie kennt man bereits Isomerengemische als chemische Signalstoffe. Insekten nutzen individuelle (*E/Z*)-Gemische von fettsäureabgeleiteten Verbindungen als spezifische Sexualpheromone. <sup>[172]</sup> Sicherlich ist ein direkter Vergleich der Bedeutung von (*E/Z*)-Isomerengemischen in Pflanzen und Insekten nicht zulässig; möglicherweise handelt es sich jedoch in beiden Fällen um ein ähnliches Prinzip, bei dem ein individuelles Verhältnis zweier Isomere als spezifisches Signal dient. Neben der

physiologischen Bedeutung von (*E/Z*)-Phytosphingenin für pflanzliche Systeme stellt sich aber die Frage, wie solche (*E/Z*)-Gemische mechanistisch unter Zuhilfenahme von spezialisierten Desaturasen gebildet werden.

### 3.2.2 Mechanistische Charakterisierung der $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Desaturase aus Sonnenblumen (*Helianthus annuus*)

Die  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipiddesaturase aus der Sonnenblume *Helianthus annuus* wurde 1998 durch Dr. P. Sperling im Arbeitskreis von Prof. E. Heinz kloniert und konnte in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert werden. <sup>[173]</sup> Eine erste Charakterisierung dieses Enzyms führte zu dem Schluss, dass es ein Gemisch von (*E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenin zweier Stellungsisomere produziert. Die ursprüngliche Hypothese war deshalb, dass es sich bei diesem Enzym um eine  $\Delta^6$ -Desaturase handelt, die wahlweise die C(3)-Hydroxygruppe von Sphinganin oder die C(4)-Hydroxyfunktion von Phytosphinganin als Erkennungsstelle nutzt. Auf diesem Weg würden je nach Substrat (*E/Z*)-Gemische von  $\Delta^8$ - oder  $\Delta^9$ -Phytosphingenin gebildet (siehe Abbildung 46).



**Abbildung 46:** Ursprüngliches Arbeitsmodell zur Biosynthese von Phytosphingeninen in höheren Pflanzen, wie *H. annuus*.

Dieses ursprüngliche Modell zur Biosynthese von Phytosphingenin in Pflanzen musste jedoch revidiert werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Sonnenblumendesaturase keine (*9E/Z*)-Isomere, sondern ausschließlich ein Gemisch von (*8E/Z*)-Phytosphingenin im Verhältnis von ca 7:1 erzeugt. <sup>[174]</sup> Durch Fütterungsstudien an transformierten Hefen

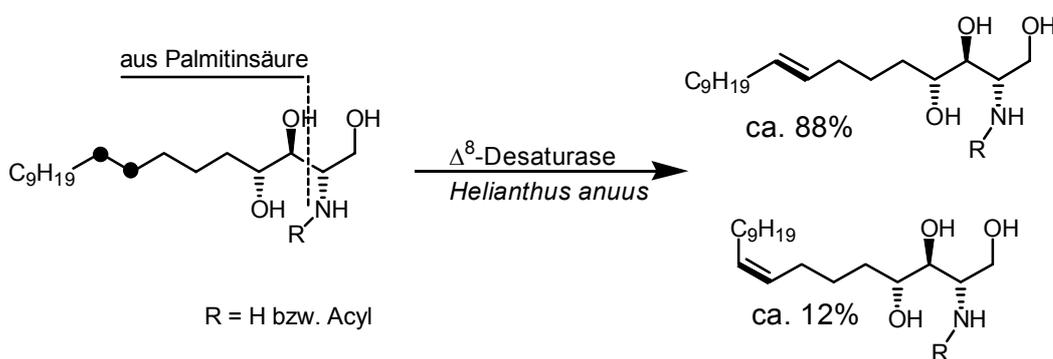
(Mutante sur2 $\Delta$ ), denen die Fähigkeit zur C(4)-Hydroxylierung genommen ist, konnte zudem bewiesen werden, dass die Hydroxylierung zum Phytosphinginin der Desaturierung zum (*E/Z*)-Phytosphingenin vorausgeht. <sup>[174]</sup> Damit erfolgt die Biosynthese von Phytosphingenin auf dem in Abbildung 44 gezeigten Weg.

Mittlerweile konnten im Arbeitskreis von Prof. Heinz eine Reihe weiterer, in ihrer Sequenz sehr ähnliche  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturasen kloniert, in *S. cerevisiae* überexprimiert und funktionell charakterisiert werden. So erzeugen die  $\Delta^8$ -Desaturasen aus *Brassica napus* und *Helianthus annuus* (*E/Z*)-Phytosphingenin im Verhältnis ca. 7:1, die aus *Arabidopsis thaliana* (*E/Z*)-Phytosphingenin im Verhältnis ca. 3:1 und die Desaturase aus *Borago officinalis* (*E/Z*)-Phytosphingenin im Verhältnis ca. 4:1. <sup>[175, 176]</sup>

Offensichtlich handelt es sich bei der gesamten Gruppe von pflanzlichen  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturasen nicht nur um Enzyme, die gleichzeitig zwei Stereoisomere erzeugen, sondern diese zudem in einem spezifischen (*E/Z*)-Verhältnis bilden. Um dem mechanistischen Ursprung dieses Phänomens nachzugehen, wurde die Desaturase aus *H. annuus*, da sie die höchste Aktivität in *S. cerevisiae* aufweist, stellvertretend für die Klasse der pflanzlichen  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturasen mechanistisch untersucht.

### 3.2.2.1 Stereochemischer Verlauf der (*E*)- und (*Z*)-Desaturierung

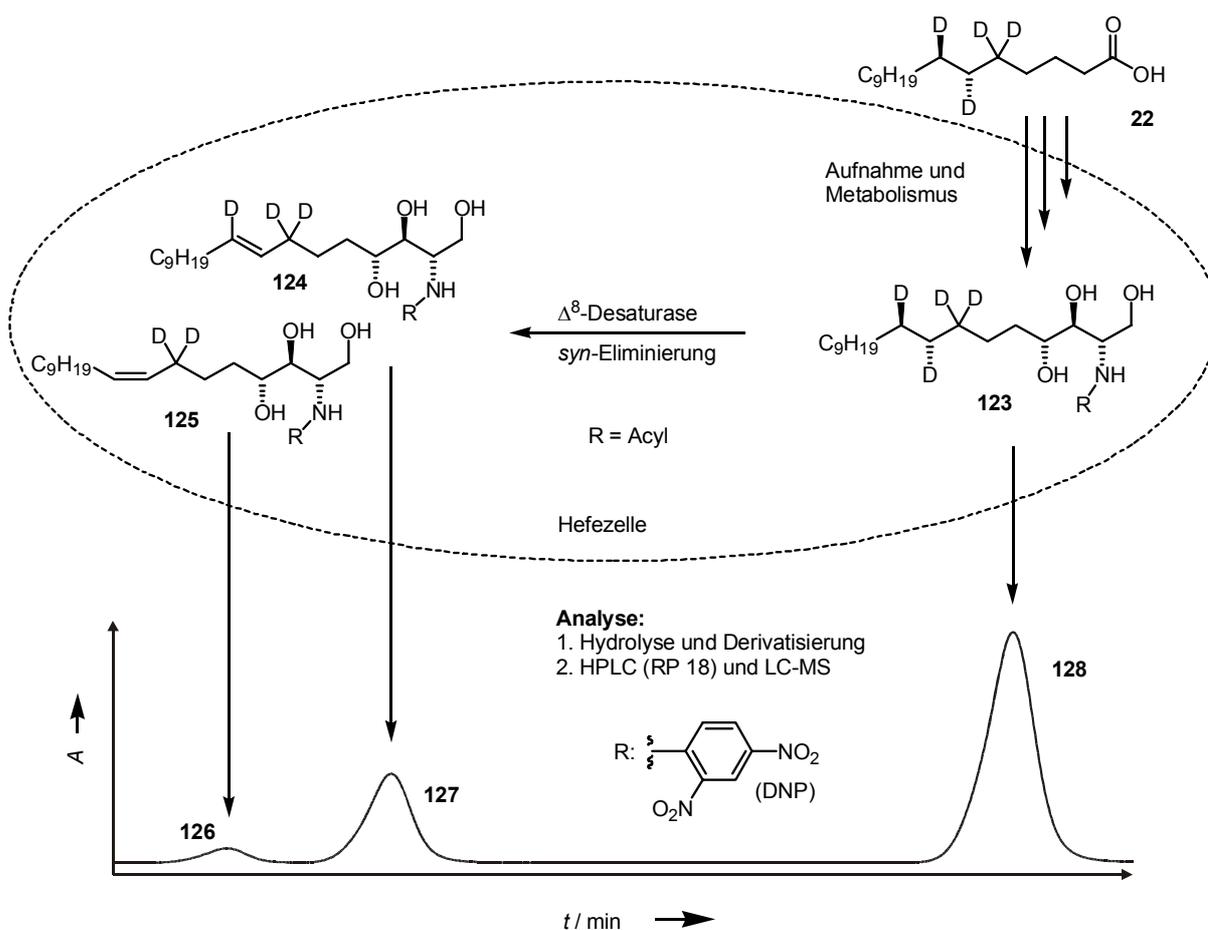
Um den stereochemischen Verlauf der Desaturierung zu (*E*)- und (*Z*)-Phytosphingenin in transformierten *S. cerevisiae* Zellen<sup>e</sup> untersuchen zu können, wurde an C(8) und C(9) enantioselektiv deuteriertes Phytosphinginin benötigt. Durch eine Analyse der Deuterium- und Wasserstoffverluste nach Desaturierung sollten dann Aussagen zum stereochemischen Verlauf der Reaktion möglich sein (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Aufgrund der Verluste von Wasserstoffisotopen an C(8) und C(9) (●) sind Aussagen zum stereochemischen Verlauf der Desaturierung möglich.

<sup>e</sup> Es handelt sich dabei um die Mutante sur2 $\Delta$ , der die  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipid-desaturase aus der Sonnenblume *H. annuus* überexprimiert.

Da Sphingobasen nur durch aufwändige Synthesen zugänglich sind, wobei vergleichsweise kurze Syntheserouten erst in den letzten Jahren entwickelt wurden [89, 177, 178], wurde versucht, deuterierte Phytosphinganine durch die Hefe selbst biosynthetisch erzeugen zu lassen. Phytosphingalin **116** ist das häufigste in *S. cerevisiae* vorkommende Sphingolipid und wird ausgehend von Palmitinsäure biosynthetisiert. Durch Zugabe von enantiosektiv markierter Palmitinsäure **22** zum Kulturmedium der transformierten *S. cerevisiae*-Zellen war es so möglich, auf dem in Abbildung 48 gezeigten Biosyntheseweg deuteriertes Phytosphingalin **123** *in vivo* zu erzeugen.



**Abbildung 48:** Die Biosynthese und Desaturierung von 4-Hydroxysphingalin (**123**) erfolgt nach Applikation der deuterierten Palmitinsäure **22** in der transformierten Hefe. Nach Überführung in DNP-Derivate konnten die Sphingobasen **126**, **127** und **128** mittels RP-HPLC getrennt und durch ESI-Massenspektrometrie analysiert werden.

Um möglichst gute Einbauraten zu erzielen, wurde die Fähigkeit der Hefe zur Fettsäurebiosynthese durch Zugabe von Cerulenin unterdrückt. Bei Cerulenin handelt es sich um (2*R*,3*S*,*E*,*E*)-2,3-Epoxy-4-oxo-7,10-dodecadienamid, einem aus dem Pilz *Cephalosporium caerulens* gewonnenen Metabolit, der als effektiver Inhibitor der Fettsäurebiosynthese bekannt ist. [179] Auf diesem Weg kann die Fettsäurebiosynthese der

Hefen effektiv gehemmt werden, so dass Einbauraten der exogen applizierten Palmitinsäure **22** von über 90 % erzielt wurden.

Das aus der deuterierten Palmitinsäure **22** *in vivo* generierte isotopenmarkierte Phytosphinginin **123** wird durch die in der transformierten Hefe überexprimierte  $\Delta^8$ -Sphingolipid-Desaturase aus *Helianthus annuus* in die isomeren Phytosphingenine **124** und **125** überführt. Es ist zu beachten, dass der in Abbildung 48 skizzierte Ansatz nur möglich ist, weil die Hefe *S. cerevisiae* zwar Phytosphinginin (**116**), im Gegensatz zu anderen Hefen aber selbst kein (*E/Z*)-Phytosphingenin (**118**, **119**) bildet.

Die transgenen Hefen wurden mit 0,25 mM Palmitinsäure **22** inkubiert und bei 30° C innerhalb von 3-5 Tagen bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,8-1,0 kultiviert. Im Anschluss wurden die Hefezellen einer Bariumhydroxidhydrolyse unterzogen. Die freigesetzten Sphingobasen wurden anschließend mit Sangers Reagenz (2,4-Dinitrofluorbenzol) in Dinitrophenylderivate (DNP-Derivate) überführt und dünnschichtchromatographisch vorgereinigt.<sup>f [173]</sup> Um die isotopenmarkierten DNP-derivatisierten (*E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenine **126** und **127** hinsichtlich ihrer Wasserstoff- und Deuteriumverluste analysieren zu können, wurden die Extrakte per LC/MS analysiert.

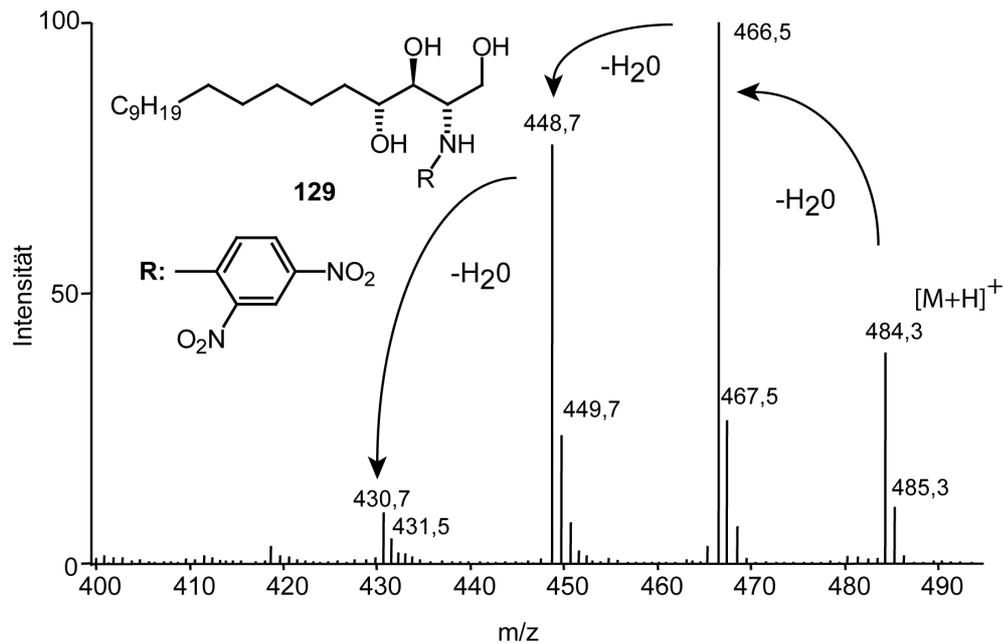
### **3.2.2.1.1 Massenspektrometrische Untersuchung von DNP-derivatisierten Sphingobasen**

Eine Derivatisierung der Sphingobasen mit Sangers-Reagenz zu DNP-Derivaten bietet entscheidende Vorteile. DNP-Derivate lassen sich auf einfache Weise dünnschichtchromatographisch mittels UV-Detektion vorreinigen. Darüber hinaus können die (*E/Z*)-Phytosphingenine durch HPL-Chromatographie an einer RP18-Säule basisliniengetrennt und mit hoher Empfindlichkeit bei 350 nm detektiert werden (siehe Abbildung 48). DNP-Derivate lassen sich aufgrund ihrer hohen Polarität und geringen Flüchtigkeit nicht mehr durch GC-MS-Methoden untersuchen. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, die DNP-Derivate mittels LC/MS zu analysieren.

Zunächst wurde eine MS-Methode ausgearbeitet, bei der die DNP-Derivate unter APCI-Bedingungen detektiert wurden. Eine Feinabstimmung der MS-Parameter erfolgte mit synthetischem DNP-Sphingosin unter den HPLC-Bedingungen, wie sie zum Zeitpunkt der Elution von DNP-Phytosphingenin herrschten.

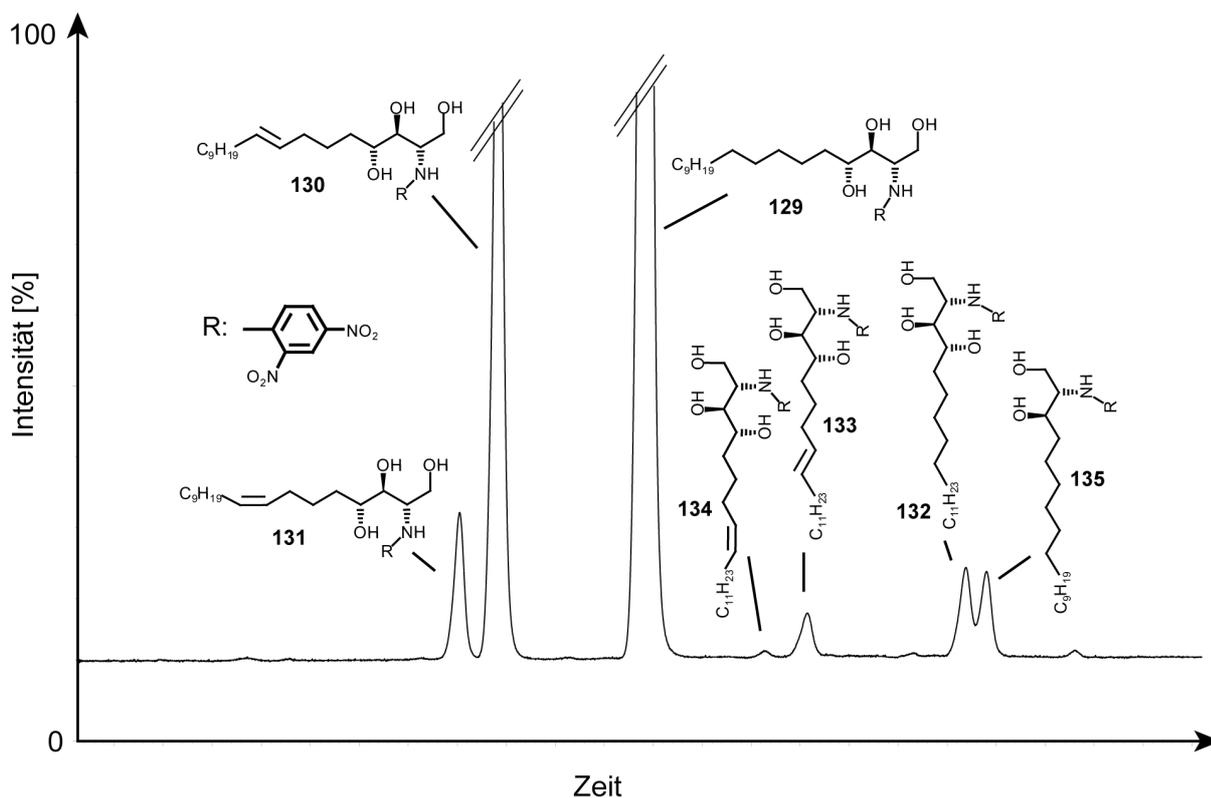
<sup>f</sup> Auf eine zeitraubende und mit Verlusten verbundene dünnschichtchromatographische Vorreinigung kann in vielen Fällen verzichtet werden. Dabei macht sich lediglich nachteilig bemerkbar, dass zusätzliche unbedeutende Signale auftreten. Demgegenüber steht der Vorteil, dass keine, möglicherweise relevanten Verbindungen durch die DC-Reinigung verloren gehen (vgl. Abschnitt 3.2.2.7).

Die APCI-Ionisierung von DNP-derivatisierten Sphingolipiden liefert Spektren mit intensiven  $[M+H]^+$ -Ionen. Neben diesen Pseudomolekülonen zeigen die Spektren Fragmentationen die, entsprechend den drei im Molekül vorhandenen Hydroxygruppen, dem sukzessiven Verlust dreier Wassermoleküle entsprechen. Damit lassen sich die DNP-Derivate massenspektrometrisch einwandfrei als Phytosphinganine bzw. -sphingenine identifizieren (siehe Abbildung 49).



**Abbildung 49:** APCI-Spektrum von DNP-Phytosphingenin (**129**).

Folgende DNP-derivatisierten Sphingobasen wurden im Extrakt detektiert: Als Hauptkomponenten treten C(18)-Phytosphinginin (**129**) und dessen Desaturierungsprodukte (*E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenin (**130** und **131**) auf. Darüberhinaus lassen sich die um eine  $C_2$ -Einheit verlängerten C(20)-Phytosphinginin (**132**) und C(20)-(*E/Z*)-Phytosphingenine (**133** und **134**) nachweisen. Sphinginin (**135**) als biosynthetische Vorstufe von Phytosphinginin (**129**) ist in geringeren Mengen vorhanden (siehe Abbildung 50).

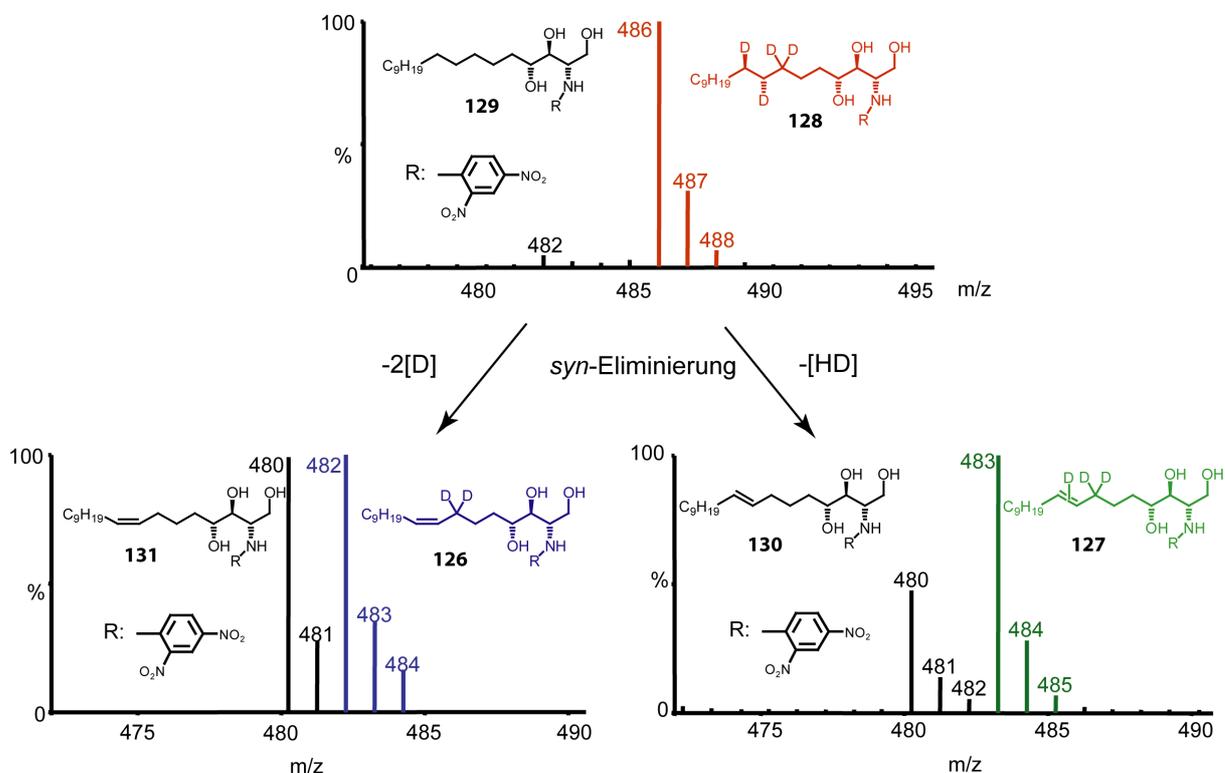


**Abbildung 50:** Das RP-HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) zeigt exemplarisch die Sphingolipidzusammensetzung transformierter Hefezellen, die in Gegenwart von Cerulenin und unmarkierter Palmitinsäure kultiviert wurden.

Der Nachteil der APCI-Methode wird deutlich, wenn die Wasserstoff- und Deuteriumverluste als Folge der Desaturierung bestimmt werden sollen. Da die DNP-Phytosphingenine (**126**) und (**127**) im Vergleich zum DNP-Phytosphinganin (**128**) in deutlich geringerer Konzentration vorkommen (siehe Abbildung 48), erhält man Spektren, die von erheblichem Untergrundrauschen begleitet sind. Dadurch ist eine zuverlässige Bestimmung der Anzahl der verbliebenen Deuteriumatome in den markierten DNP-Phytosphingeninen (**126**) und (**127**) erschwert.

Dank der Unterstützung durch Dr. Neil Oldham konnte die Analytik der Sphingobasen erheblich in ihrer Empfindlichkeit gesteigert werden. Dinitrophenylgruppen sind hervorragend in der Lage, negative Ladungen zu stabilisieren und lassen sich daher massenspektrometrisch sehr empfindlich als Anionen detektieren. In Verbindung mit der sanften Elektronenspray-Ionisierung (ESI) erhält man HPLC/negativ-ESI-Massenspektren, die nahezu untergrundfrei intensive  $[M-H]^-$ -Ionen liefern (siehe Abbildung 51). Eine Fragmentierung wird unter diesen Bedingungen nicht beobachtet. Dementsprechend zeigt das Massenspektrum der Phytosphinganinfraktion ein dominantes Ion bei  $m/z$  486, entsprechend dem vierfach deuteriumsubstituierten DNP-Derivat **128**. Daneben ist ein schwaches  $[M-H]^-$ -Ion bei  $m/z$  482 erkennbar, welches unmarkiertem DNP-Phytosphinganin (**129**), das aus natürlicher Palmitinsäure biosynthetisiert wurde, entspricht. Das Verhältnis von deuteriertem

DNP-Phytosphingalin (**128**) und natürliches DNP-Phytosphingalin (**129**) kann aus dem Verhältnis der beiden Ionen  $m/z$  486 und  $m/z$  482 mit 100:5 bestimmt werden und belegt den ausgezeichneten Einbau der exogen applizierten markierten Palmitinsäure **22**.



**Abbildung 51:** Die Desaturierung von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Phytosphingalin (**129**) zu (8Z)-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Phytosphingalin (**126**) verläuft unter Verlust von zwei Deuteriumatomen im Sinne einer *syn*-Eliminierung. (8E)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingalin (**127**) entsteht durch *syn*-Eliminierung, wobei ein Wasserstoff- und ein Deuteriumatom abgespalten werden.

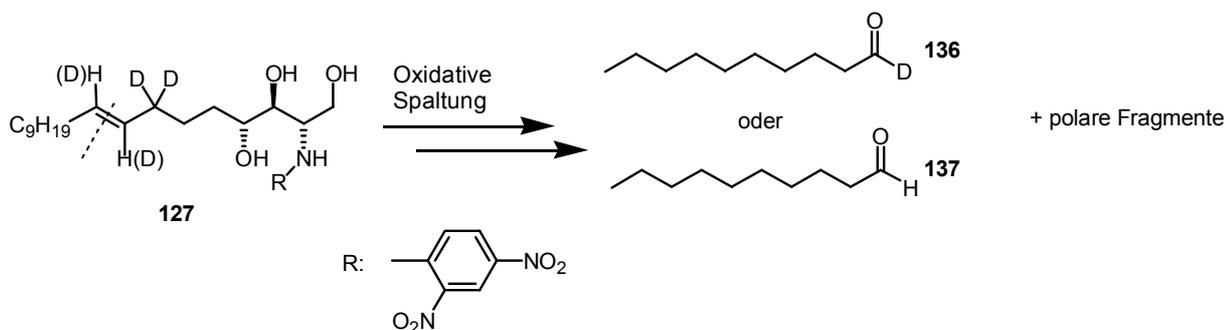
Für die (8Z)-Phytosphingalinfraktion (**126** und **131**) erhält man ein Massenspektrum, das intensive Ionen bei  $m/z$  480 und  $m/z$  482 zeigt. Hier entspricht wiederum das Ion mit der niedrigeren Massenzahl unmarkiertem Phytosphingalin **131**. Das [M-H]<sup>-</sup>-Ion bei  $m/z$  482 hingegen gehört zu einem zweifach deuteriumsubstituierten Phytosphingalin **126**, das aus der Desaturierung von **128** entstanden sein muss. Die benachbarten Ionen bei  $m/z$  483 und 484 entsprechen den <sup>13</sup>C-Satelliten und stimmen in ihrer Intensität mit dem berechneten Spektrum von **128** überein. Der Verbleib von lediglich zwei Deuteriumatomen ist gleichbedeutend mit dem Verlust beider Isotopenmarkierungen von C(8) und C(9) der markierten Vorstufe **128**. Eine solche Abspaltung aus dem enantioselektiv markierten Phytosphingalin **128** ist nur möglich, wenn die Desaturierung nach einem *syn*-Eliminierungsmechanismus verläuft. Dabei wird ausschließlich der Verlust von 2[D], nicht aber die Abspaltung von 2[H]-Atomen beobachtet. Die Desaturierung kann also ausschließlich aus einem der beiden Halbräume, die das Substrat umgeben, erfolgen. Die Bildung von (8Z)-

Phytosphingenin **126** verläuft somit unter absoluter diastereofacialer Kontrolle als *syn*-Eliminierung unter Verlust des C(8)-H<sub>R</sub> und des C(9)-H<sub>R</sub> (siehe Abbildung 51).

Das Hauptisomer (8*E*)-Phytosphingenin **127** zeigt ein intensives [M-H]<sup>-</sup>-Ion bei *m/z* 483 und ein schwächeres Signal bei *m/z* 480. Wiederum entspricht das Pseudomolekülion mit der niedrigeren Massenzahl dem natürlichen Phytosphingenin **130**, das mit der höheren Massenzahl dem deuteriumsubstituierten Phytosphingenin **127**. Der Verlust von drei Masseneinheiten durch die Desaturierung von **128** (*m/z* 486) resultiert aus dem Verlust von einem Wasserstoff- und einem Deuteriumatom von C(8) bzw. C(9). Wiederum ist dieses Abspaltungsmuster nur mit einem *syn*-Eliminierungsmechanismus zu erklären (siehe Abbildung 51). Eine Bestimmung der absoluten enantiofacialen Kontrolle für die Produktion des (8*E*)-Phytosphingenins **127** erfordert jedoch zusätzlich die Lokalisierung des verbliebenen Deuteriums an der Doppelbindung dieses Isomers.

### 3.2.2.1.2 Bestimmung der absoluten enantiofacialen Kontrolle

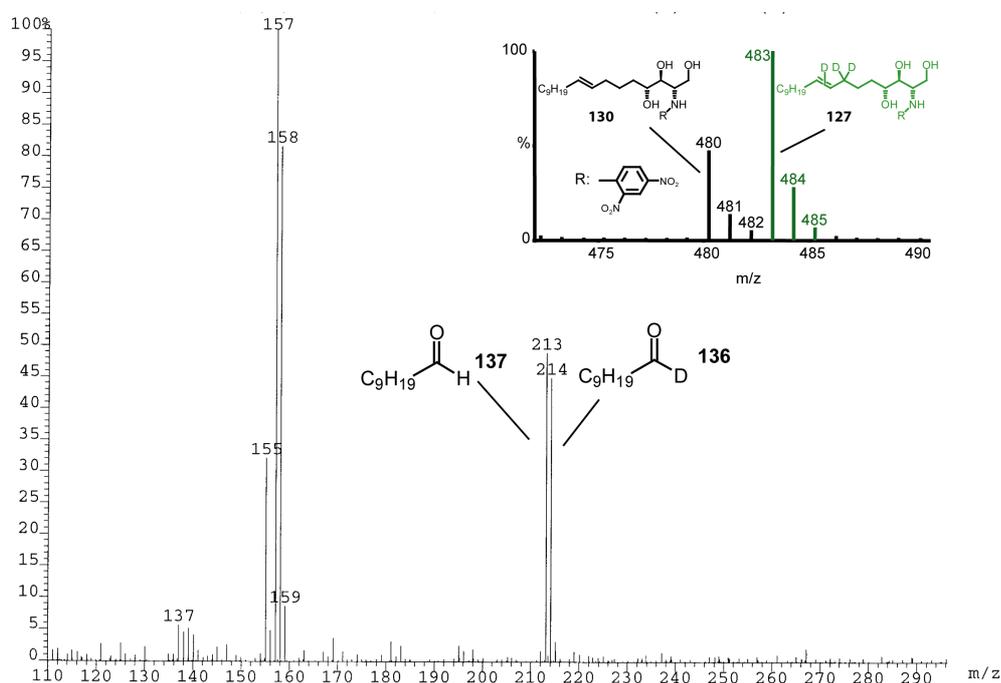
Um das verbliebene Deuterium an der Doppelbindung von (8*E*)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingenin (**127**) zu lokalisieren, erschien es sinnvoll, die Doppelbindung oxidativ abzubauen<sup>[180]</sup> und die Spaltprodukte mittels GC/MS zu untersuchen. So sollten durch Dihydroxylierung der Doppelbindung und Spaltung des resultierenden Diols Decanalfragmente gebildet werden, die für den Fall, dass sich das verbliebene Deuterium an C(9) befindet, eine Isotopenmarkierung aufweisen sollten (siehe Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Die oxidative Spaltung von **127** führt, je nach Positionierung des verbliebenen Deuteriumatoms, entweder zum Aldehyd **136** oder **137**. **137** entsteht jedoch in jedem Fall aus dem Abbau von natürlichem (8*E*)-Phytosphingenin (**130**).

Die Fraktion des (8*E*)-Phytosphingenins, bestehend aus einem Gemisch von natürlichem **127** und deuteriertem **130**, wurden per HPLC an einer analytischen RP18-Säule gesammelt. Da die Gesamtmenge aller DNP-Sphingobasen, die aus 100 ml einer Hefekultur gewonnen werden, ca. 50 µg beträgt, liegt die per HPLC gesammelte Menge an (8*E*)-Phytosphingenin bei wenigen Mikrogramm.

Die oxidative Spaltung des isolierten (8*E*)-Phytosphingenins erfolgte durch Dihydroxylierung der Doppelbindung mit Osmiumtetroxid und der Spaltung des resultierenden Diols mit Natriumperiodat. Da sich die Menge an gesammeltem (8*E*)-Phytosphingenin nur grob abschätzen lässt, ist eine katalytische <sup>[95]</sup> oder stöchiometrische <sup>[181]</sup> Reaktionsführung der Dihydroxylierung präparativ schwierig. Daher wurde ein Protokoll ausgearbeitet, das mit Osmiumtetroxid/Natriumperiodat im Überschuss und im Zweiphasensystem Wasser/Diethylether <sup>[182]</sup> die Spaltung der Modellsubstanz Ölsäuremethylester im Submikrogrammmaßstab erlaubt. Dieses Protokoll<sup>9</sup> wurde dann für die Spaltung der (8*E*)-Phytosphingenin-Fraktion übernommen.



**Abbildung 53:** Aus der oxidativen Spaltung von DNP-(8*E*)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingenin (**127**) entsteht [1-<sup>2</sup>H]-Decanal (**136**). Allerdings entspricht das Verhältnis von deuteriertem zu natürlichem Phytosphingenin (**127** zu **130**) nicht mit dem Verhältnis ihrer Spaltprodukte Decanal (**137**) und [1-<sup>2</sup>H]-Decanal (**136**) überein.

Die Produkte der Spaltung des Phytosphingenins wurden per GC/MS analysiert. Da Aldehyde unter EI-Bedingungen nur schwache Molekülionen liefern, wurde stattdessen die Messung unter CI-Bedingungen mit Isobutan als Ionisierungsgas durchgeführt. Man erhält so Massenspektren der Aldehyde, die neben intensiven [M+H]<sup>+</sup>-Molekülionen zusätzlich [M+57]<sup>+</sup>-Adduktionen des Aldehyds mit dem CI-Gas zeigen. Das Massenspektrum des Decanalfragments aus dem Abbau des Gemisches aus **127** und **130** weist neben dem [M+H]<sup>+</sup>-Molekülionenpeak bei m/z 157 für unmarkiertes Decanal (**137**) einen intensiven [M+H]<sup>+</sup>-Molekülionenpeak bei m/z 158 für [1-<sup>2</sup>H]-Decanal (**136**) auf. Allerdings sollte man erwarten,

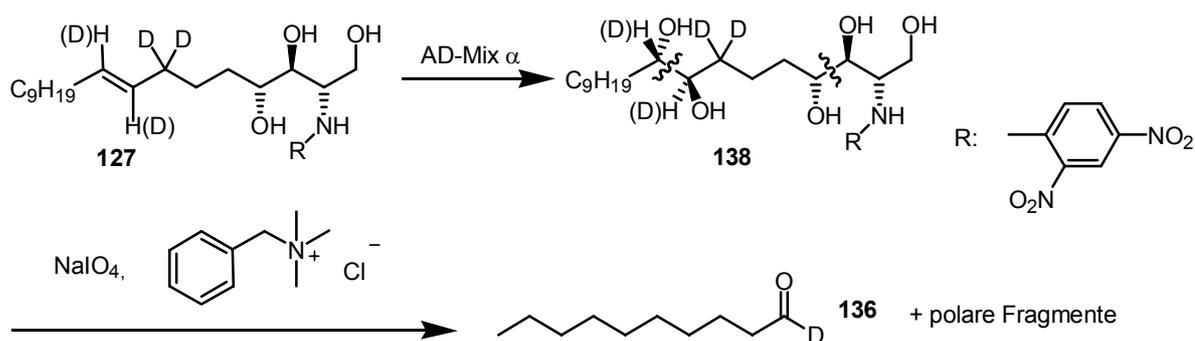
<sup>9</sup> Die Spaltung der jeweiligen Menge an Ölsäuremethylester wurde mit 100 µl Ether, 100 µl einer gesättigten wässrigen Natriumperiodat-Lsg. und 20 µl OsO<sub>4</sub> (4 Gew.-% in Wasser) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mehrfach im Zeitraum von 2-12 Stunden.

dass das Verhältnis von [1-<sup>2</sup>H]-Decanal (**136**) zu Decanal (**137**) dem Verhältnis von markiertem zu natürlichem (8*E*)-Phytosphingenin (**127** zu **130**) entspricht. Statt des 2:1-Verhältnis wie vor der Spaltung (Abbildung 51), zeigt das Massenspektrum jedoch nahezu ein 1:1 Verhältnis aus markiertem und nichtmarkiertem Spaltprodukt. Dieser Befund lässt zwei mögliche Erklärungen zu. Entweder verläuft die Desaturierung zum (8*E*)-Phytosphingenin **127** im Gegensatz zur Bildung des (*Z*)-Isomeren **126** nicht unter absoluter diastereofacialer Kontrolle oder aber die verwendete Abbaumethode ist wegen Komplikationen im Mikrobereich nicht geeignet. Um letzteren Punkt auszuschließen, wurde der Abbau alternativ durch Ozonolyse durchgeführt.

Hierzu wurde bei -78 °C für 30 Sekunden lang Ozon in eine Methylenchloridlösung von (8*E*)-Phytosphingenin eingeleitet. Die Probe wurde unmittelbar per GC/CI-MS analysiert. Ein Zerfall des Ozonids zum Decanal erfolgt thermisch im Injektor des Gaschromatographen.<sup>[183, 184]</sup> Wiederum konnte [1-<sup>2</sup>H]-Decanal als Spaltprodukt nachgewiesen werden; jetzt betrug das Verhältnis von [1-<sup>2</sup>H]-Decanal zu natürlichem Decanal jedoch nahezu 1:2.

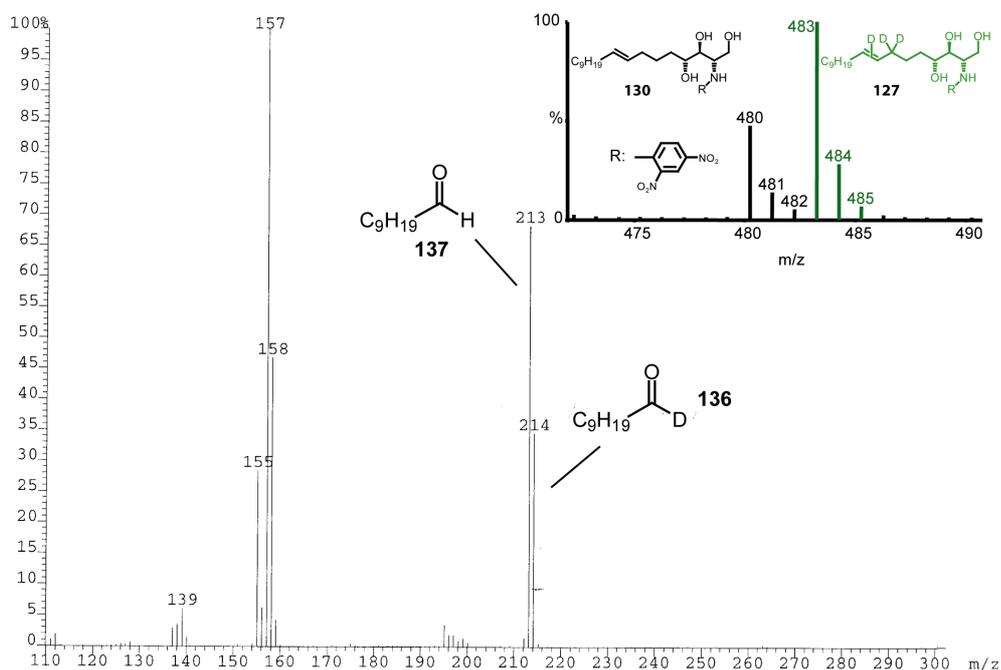
Demnach wird das Verhältnis von deuteriertem zu nichtdeuteriertem Decanal von der verwendeten Abbaumethode beeinflusst. Um dem nachzugehen, wurde [9,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Ölsäuremethylester in unterschiedlichen Konzentrationen mittels Osmiumtetroxid/Natriumperiodat in Wasser/Diethylether gespalten und massenspektrometrisch untersucht. Während bei Konzentrationen oberhalb von 10 µg pro ml der Markierungsgrad mit >96 % bestimmt werden konnte, lieferte der Abbau von 0.1 µg 9,10-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Ölsäuremethylester in 100 µl Diethylether einen Markierungsgrad von nur noch 75 %. Wodurch ein Verlust der Isotopenmarkierung bei niedrigen Konzentrationen verursacht wird, lässt sich nicht genau sagen. Ein möglicher Grund wäre, dass α-Ketolzwischenstufen bei der Dihydroxylierung, wie sie von van Rheenen beschrieben wurden, gebildet werden.<sup>[185]</sup>

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine schonende Variante zur Dihydroxylierung und anschließenden schnellen Spaltung des Diols ausgearbeitet (siehe Abbildung 54). Dieses Protokoll nutzt den von Sharpless *et al.* zur asymmetrischen Dihydroxylierung entwickelten, kommerziell erhältlichen AD-Mix.<sup>[186]</sup> Die allgemein verwendete Vorschrift der asymmetrischen Dihydroxylierung mit AD-Mix<sup>[95]</sup> ist selbst im 100 µl-Maßstab leicht handhabbar und verspricht eine saubere Umsetzung des DNP-(8*E*)-Phytosphingenins **127** zur Dihydroxyverbindung **138**. Die Spaltung von **138** wurde mit Natriumperiodat unter Phasentransferbedingungen durchgeführt.<sup>[154]</sup> Die Reaktion ist innerhalb weniger Minuten beendet und sollte somit die Bildung von Nebenprodukten auf ein Minimum reduzieren.



**Abbildung 54:** Oxidativer Abbau von deuteriertem DNP-(8E)-Phytosphingenin (**127**).

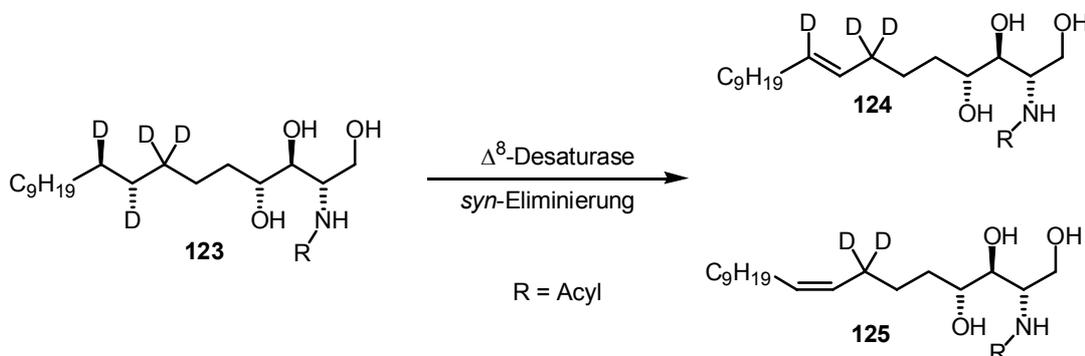
Erneut wurde die DNP-(8E)-Phytosphingeninfraktion mittels HPLC isoliert und mit dem modifizierten Protokoll oxidativ gespalten. Der Abbau liefert wiederum ein Gemisch von Decanal und [1-<sup>2</sup>H]-Decanal, wobei in diesem Fall das Verhältnis dem von markiertem und natürlichem (8E)-Phytosphingenin vor der Spaltung entsprach (siehe Abbildung 55). Die Abweichung liegt bei etwa 10 % und erlaubt somit im Vergleich zu den beiden anderen Methoden eine sichere Zuordnung des verbliebenen Deuteriums zur Position C(9) des DNP-(8E)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingenins (**127**).



**Abbildung 55:** Aus der oxidativen Spaltung von DNP-(8E)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingenin (**127**) entsteht [1-<sup>2</sup>H]-Decanal (**136**). Aus der Spaltung von natürlichem DNP-(8E)-Phytosphingenin (**130**) entsteht Decanal (**137**). Die Verhältnisse der Isotopomeren vor und nach der Spaltung sind nahezu identisch.

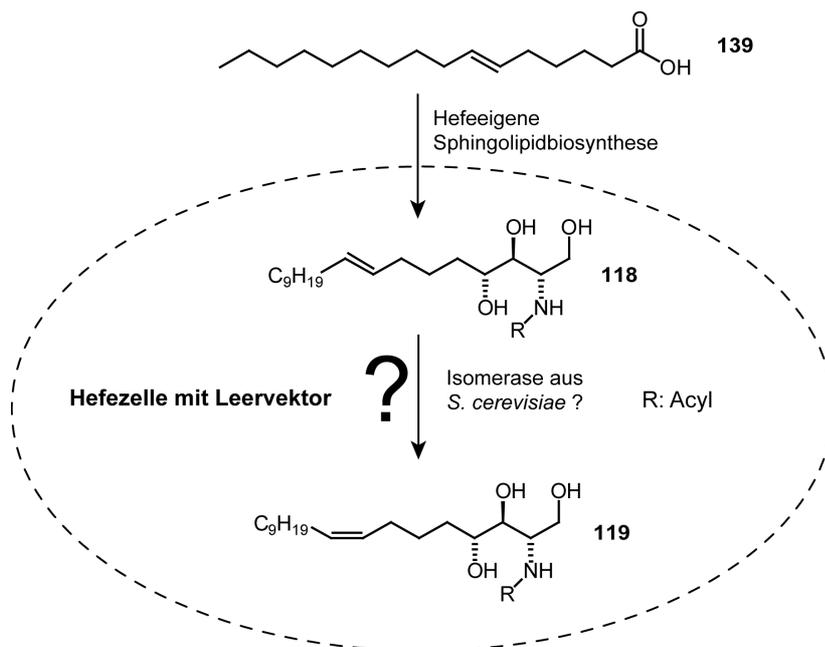
Demnach erfolgt die Einführung der (E)- als auch der (Z)-Doppelbindung durch *syn*-Eliminierung zweier vicinaler Wasserstoffatome. Die Desaturierung von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Phytosphingenin **123** zu (8E)-Phytosphingenin (**124**) verläuft dabei unter Verlust des C(8)-<sup>2</sup>H<sub>R</sub> und des C(9)-<sup>1</sup>H<sub>S</sub>. Das (8Z)-Isomer **125** entsteht hingegen durch Abspaltung des C(8)-<sup>2</sup>H<sub>R</sub> und des C(9)-<sup>2</sup>H<sub>R</sub>. Damit

erfolgt die Desaturierung in beiden Fällen aus dem gleichen Halbraum; die absolute enantiofaciale Kontrolle ist somit für die Bildung von (*E*)- und (*Z*)-Isomeren identisch (siehe Abbildung 56).



**Abbildung 56:** Stereochemischer Verlauf der Desaturierung von enantiospezifisch isotopenmarkiertem Phytospermin **123**.

### 3.2.2.2 Ausschluss von unspezifischen Isomerasen

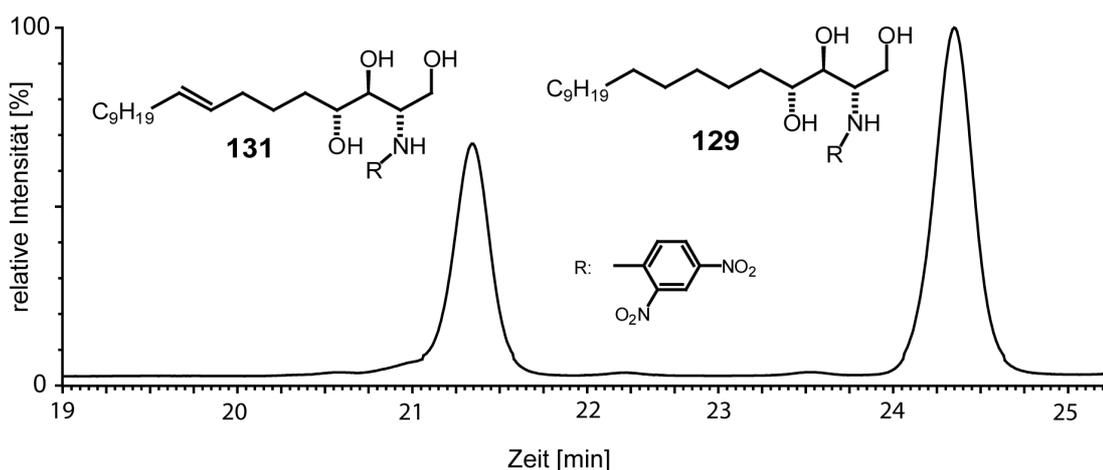


**Abbildung 57:** Kulturen von *S. cerevisiae*, die lediglich einen Leervektor enthalten und nicht die Desaturase aus *H. annuus* exprimieren, wurden mit (*E*)-Hexadec-6-ensäure (**139**) inkubiert. Für den Fall, dass die Hefe eine unspezifische Isomerase besitzt, würde auch (*Z*)-Phytospermin (**119**) gebildet.

Prinzipiell wäre es denkbar, dass das Gemisch von (*E*)- und (*Z*)-Phytospermin, statt von der transgenen  $\Delta^8$ -Sonnenblumendesaturase, von einer bisher unbekannt, unspezifischen Isomerase aus der Hefe *S. cerevisiae* gebildet wird. Da  $\Delta^8$ -Sphingolipiddesaturasen aus unterschiedlichen Pflanzen in demselben Expressionssystem verschiedene Verhältnisse von (*E*)- und (*Z*)-Phytospermin einstellen (vgl. Einleitung), erscheint die Beteiligung einer Isomerase unwahrscheinlich, kann jedoch nicht explizit

ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde (*E*)-Hexadec-6-ensäure<sup>h</sup> (**139**) analog der in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebenen Vorgehensweise zu transformierten *S. cerevisiae*-Kulturen gegeben (siehe Abbildung 57).

Der erste Schritt der Sphingolipidbiosynthese wird von einer Serin-Palmitoyltransferase katalysiert. Dieses Enzym ist hochspezifisch für die Übertragung von Palmitinsäure, so dass ungesättigte Fettsäuren mit (*Z*)-Konfiguration der Doppelbindung sowie Fettsäuren anderer Kettenlänge entweder gar nicht oder deutlich schlechter übertragen werden.<sup>[187]</sup> Da aber (*E*)-Hexadec-6-ensäure (**139**) konformativ dem natürlichen Substrat Palmitinsäure (**108**) sehr ähnlich ist, wird sie auf dem in Abbildung 44 gezeigten Biosyntheseweg gut eingebaut und in (8*E*)-Phytosphingenin (**118**) überführt. Eine Isomerisierung zum (8*Z*)-Phytosphingenin (**119**) kann in LC/MS-Untersuchungen des Sphingolipidmusters nicht beobachtet werden (siehe Abbildung 58). Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine Isomerase an der Bildung von (8*Z*)-Phytosphingenin (**119**) beteiligt ist.



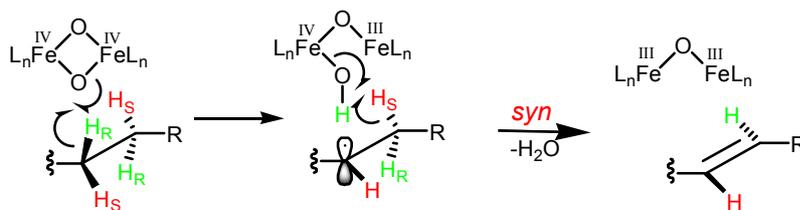
**Abbildung 58:** HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) DNP-derivatisierter Sphingobasen aus Hefezellen, die mit (*E*)-Hexadec-6-ensäure (**139**) inkubiert wurden.

### 3.2.2.3 Untersuchungen zur Kryptoregiochemie

Um weitere mechanistische Details über die  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipid-Desaturase aufzuklären, wurden in weiteren Experimenten kinetische Isotopeneffekte (KIE) bestimmt.

Nach dem allgemein favorisierten mechanistischen Modell verlaufen Desaturierungen nach einem Zweistufen-Mechanismus (siehe Abbildung 59 und vgl. Kapitel 1.6). Ein großer KIE für den Wasserstoffverlust an einem Kohlenstoffzentrum, zusammen mit einem vernachlässigbar kleinen KIE am benachbarten Zentrum, gilt allgemein als Beweis für einen Zweistufen-Prozess, wobei die Position mit dem höheren KIE dem initialen Angriffspunkt des Enzyms entspricht.<sup>[49, 50]</sup> Aus diesem Grund werden Untersuchungen zu kinetischen Isotopeneffekten auch Untersuchungen zur Kryptoregiochemie genannt (vgl. Kapitel 1.6.2).

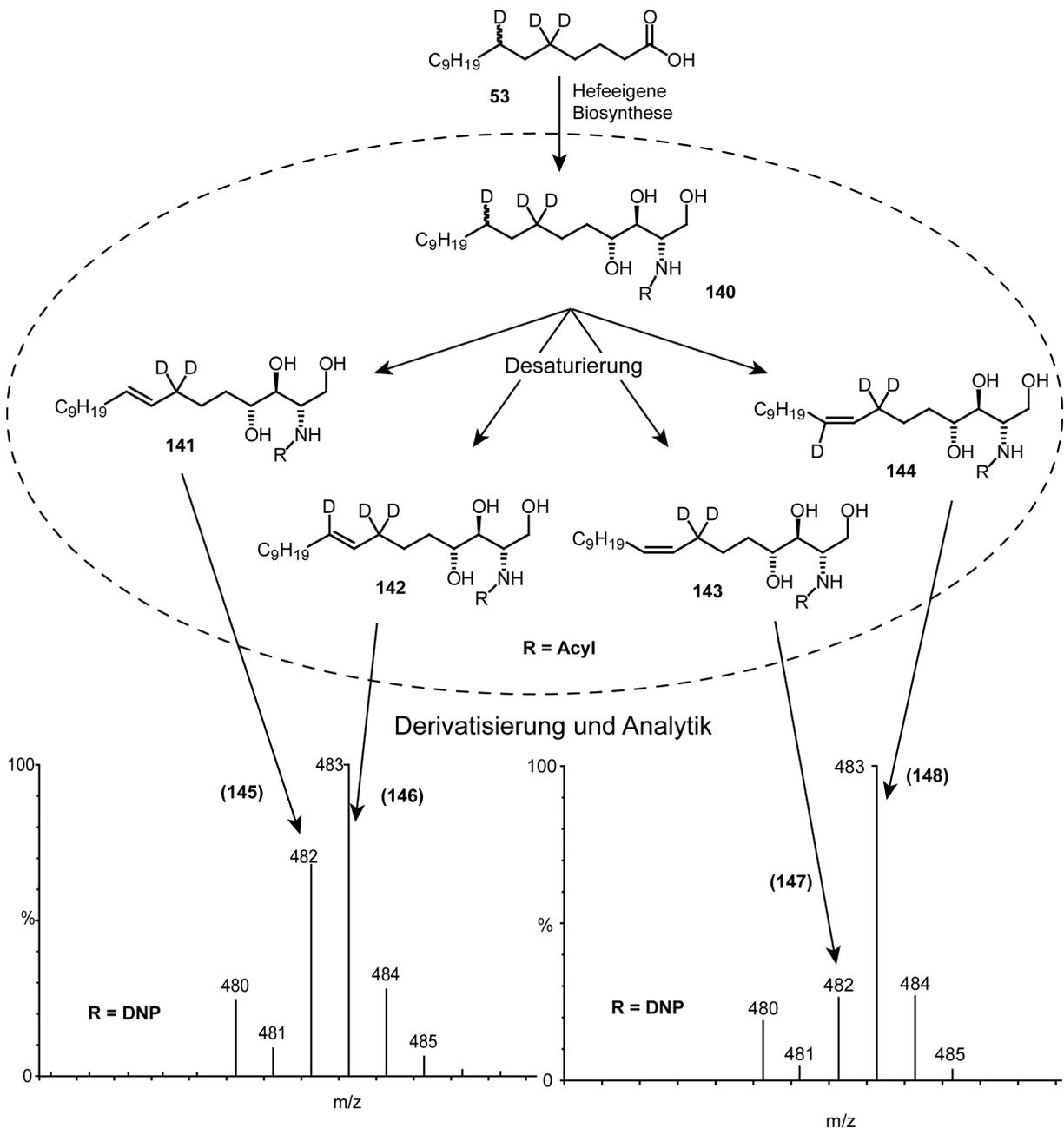
<sup>h</sup> Die Synthese von (*E*)-Hexadec-6-ensäure (**139**) erfolgte analog zur Synthese von **61**.



**Abbildung 59:** Zweistufiger Reaktionsmechanismus, wie er für Desaturasen favorisiert wird.

Zur Bestimmung der KIE wurde die an C(6) bzw. an C(7) racemisch markierten Palmitinsäuren **38** und **53**, die jeweils zwei zusätzliche Deuteriumatome an C(5) besitzen, eingesetzt. Das Vorgehen ist in Abbildung 60 exemplarisch für die Verfütterung von *rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Palmitinsäure **53** gezeigt. Die an C(7) racemisch isotopenmarkierte Palmitinsäure **53** wird von den transformierten Hefezellen aufgenommen und aufgrund der Hemmung der hefeeigenen Fettsäurebiosynthese mit Cerulenin in erhöhtem Umfang zur Biosynthese des an C(9) monodeuterierten Phytosphingans **140** benutzt. Durch Desaturierung von **140** durch die transgene  $\Delta^8$ -Sonnenblumendesaturase werden insgesamt vier mögliche Produkte (**141-144**) gebildet. Da festgelegt ist, mit welcher Seitenselektivität der Desaturierungsprozess verläuft (siehe Kapitel 1.6), führt die Desaturierung zum (8*E*)-Phytosphingin von einer Hälfte des racemischen Phytosphingans **140** zwangsläufig zum Verlust des Deuteriumatoms von C(9) und zur Bildung von **141**. Für die Desaturierung der anderen 50 Prozent hingegen bleibt die Markierung an C(9) erhalten und als Produkt der Desaturierung wird **142** gebildet. Entsprechendes gilt auch für die Bildung der beiden möglichen (8*Z*)-Phytosphingine **143** und **144**. Für den Fall, dass die Wasserstoffabstraktion an C(9) mit einem KIE behaftet ist, wird der Anteil des Racemats, bei dem ein Deuteriumatom der Desaturase exponiert ist, deutlich langsamer umgesetzt. Letztlich resultiert hieraus ein Ungleichgewicht der beiden gebildeten (8*E*)-Phytosphingine **141** und **142**. Das Verhältnis von **142** zu **141** liefert einen experimentellen KIE für die Desaturierung zum (8*E*)-Phytosphingin an C(9). Dieselben Überlegungen führen zum KIE für die Bildung des (8*Z*)-Isomeren, da auch hier zwei Produkte **143** und **144** in unterschiedlichen Mengen entstehen.

Die Metaboliten wurden wiederum in Form ihrer DNP-Derivate (**145-148**) mittels HPLC/ESI-Massenspektrometrie analysiert. Für den Fall des (8*Z*)-Phytosphingins ergibt sich bei Applikation der Palmitinsäure **53** ein Verhältnis von (8*Z*)-[7,7,9-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Phytosphingin (**144**) zu (8*Z*)-[7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Phytosphingin (**143**) von ca. 4:1 (siehe Abbildung 60). Im Gegensatz dazu entstehen (8*E*)-[7,7,9-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- und (8*E*)-[7,7-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Phytosphingin (**141** und **142**) im Verhältnis von nahezu 1:1. Somit ist der Verlust eines Deuteriums von C(9) mit einem kinetischen Isotopeneffekt behaftet, wenn das (8*Z*)-Isomer gebildet wird; die Bildung des (8*E*)-Isomers erfolgt hingegen ohne einen signifikanten KIE an C(9).



**Abbildung 60:** Racemische [5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**) wird von *S. cerevisiae* aufgenommen und fließt in die Sphingolipidbiosynthese der Hefe ein. *In vivo* generiertes, deuteriertes Phytosphinginin **140** wird durch die exprimierte  $\Delta^8$ -Desaturase aus *H. annuus* in die vier möglichen Phytosphinganine (**141-144**) überführt. Entsprechend dem mit der Desaturierung verbundenen experimentellen KIE werden die Produkte **141-144** in unterschiedlichen Mengen gebildet. Die Desaturierungsprodukte wurden per LC/MS als DNP-Derivate (**145-148**) untersucht.

Um die KIE zu bestimmen, die auftreten, wenn ein Deuteriumatom von C(8) abstrahiert wird, wurde *rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**) verfüttert und die KIE, wie zuvor beschrieben, bestimmt. Alle gemessenen KIE, die sich aus mindestens drei unabhängigen Inkubationsversuchen ergaben, sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Eingesetzte Fettsäure	$\Delta^8$ -Phytosphingenin	KIE an	KIE
5,5,6- $^2\text{H}_3$ -Palmitinsäure	( <i>E</i> )-Isomer	C(8)	$k_{\text{H/D}} = 1.91 \pm 0.14$
5,5,7- $^2\text{H}_3$ -Palmitinsäure		C(9)	$k_{\text{H/D}} = 1.16 \pm 0.04$
5,5,6- $^2\text{H}_3$ -Palmitinsäure	( <i>Z</i> )-Isomer	C(8)	$k_{\text{H/D}} = 2.07 \pm 0.16$
5,5,7- $^2\text{H}_3$ -Palmitinsäure		C(9)	$k_{\text{H/D}} = 3.79 \pm 0.59$

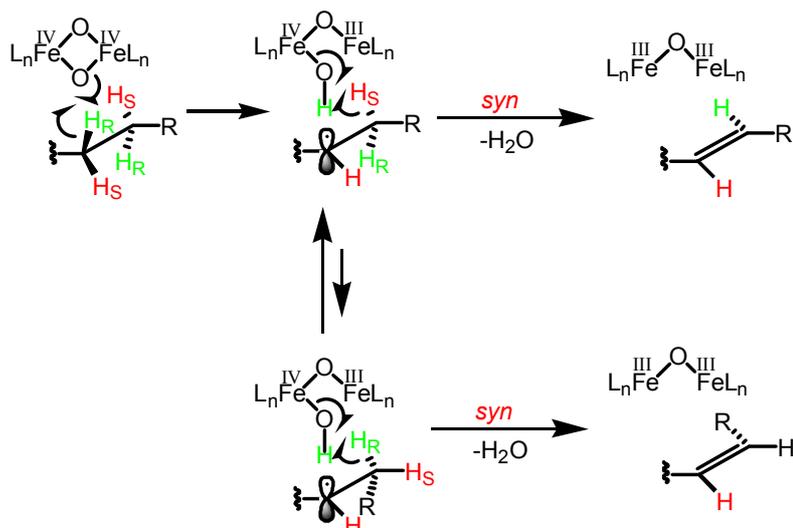
**Tabelle 2:** Experimentell bestimmte kinetische Isotopeneffekte (KIE).

Ein Vergleich der gemessenen KIE macht zwei gegenläufige Trends deutlich. Für das (*8E*)-Isomer wird ein niedriger, aber deutlicher KIE für den Deuteriumverlust von C(8) beobachtet. Die Abspaltung des Deuteriums von C(9) geht demgegenüber ohne signifikanten KIE einher. Demnach sollte das (*8E*)-Isomer durch initialen Angriff an C(8) einem Zweistufenmechanismus folgend gebildet werden. Überraschenderweise wurden für das (*8Z*)-Isomere sowohl an C(8) als auch an C(9) deutliche KIE gemessen. Gleichwohl ist im Vergleich zum (*8E*)-Isomer ein gegenläufiger Trend erkennbar. Für das (*8Z*)-Isomer wird der grössere KIE an C(9) gemessen, ein niedrigerer dagegen an C(8). Dementsprechend sollte die Bildung des (*8Z*)-Isomers durch bevorzugten initialen Angriff an C(9) erfolgen.

Anhand der experimentellen KIE lässt sich in Verbindung mit den Ergebnissen zum stereochemischen Verlauf der Desaturierung ein mechanistisches Modell entwerfen, das den Ursprung von (*8E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenin erklärt.

### 3.2.2.4 Modell zum Ursprung von (*E/Z*)-Isomeren

Allein auf Basis der stereochemischen Analyse wäre ein mechanistisches Modell denkbar, bei dem durch Verlust des C(8)-H<sub>R</sub> zunächst ein Primärradikal gebildet wird (siehe Abbildung 61). Unter der Voraussetzung, dass diese Spezies lange genug stabilisiert wird, um eine teilweise Rotation der C(8)-C(9)-Einfachbindung zu ermöglichen, würde man zwei unterschiedliche Konformationen erhalten. Je nach eingestellter Konformation ist einmal das C(9)-H<sub>R</sub>, im anderen Fall das C(9)-H<sub>S</sub> dem aktiven Zentrum des Enzyms exponiert. Eine *syn*-Eliminierung unter Verlust des C(9)-H<sub>R</sub> führte so zwangsläufig zum (*8Z*)-Phytosphingenin, ein Verlust des C(9)-H<sub>S</sub> jedoch zum (*8E*)-Isomer. Dieses ursprüngliche Modell setzt für die Bildung beider Isomere einen initialen Angriff an Position C(8) voraus, wodurch sich ein eklatanter Widerspruch zu den gemessenen kinetischen Isotopeneffekten ergibt. Unter Einbeziehung der Ergebnisse zur Kryptoregiochemie ergibt sich deshalb ein etwas anderes Bild.

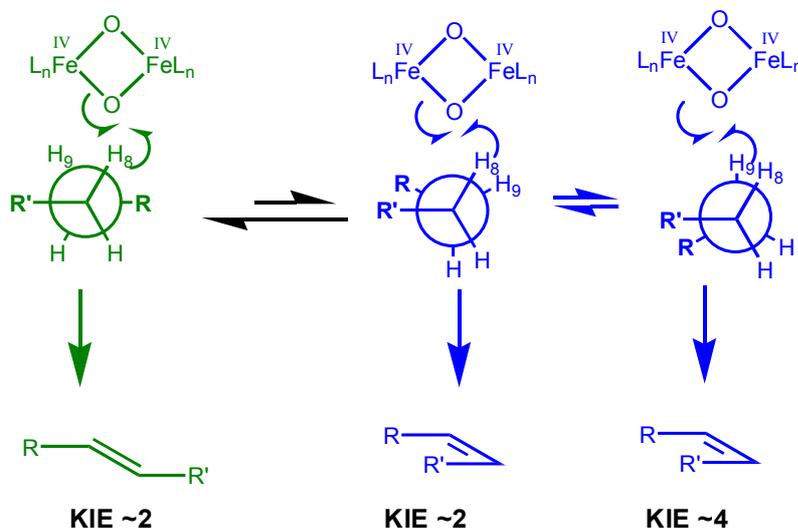


**Abbildung 61:** Ursprüngliches Modell zur Herkunft von (*E*)- und (*Z*)-Isomeren.

Demnach könnten zwei energetisch verschiedene und daher unterschiedlich gewichtete Startkonformationen existieren, aus denen entweder das (*8E*)-Isomer oder das (*8Z*)-Isomer gebildet wird. Aus einer möglichen *anti*-Konformation könnte so, nach initialer Wasserstoffabspaltung an C(8), ein intermediäres Radikal entstehen, welches durch  $\beta$ -Spaltung das C(9)-H<sub>R</sub> ohne merklichen KIE verliert. Neben der bevorzugten *anti*-Konformation, die zum Hauptprodukt (*8E*)-Phytosphingenin führt, sind zwei nahezu energetisch äquivalente *gauche*-Konformationen denkbar, aus denen eine (*Z*)-Doppelbindung gebildet werden kann. Je nach Vorliegen der einen oder der anderen *gauche*-Konformation, ist dabei entweder das C(8)-H<sub>R</sub> oder das C(9)-H<sub>S</sub> dem aktiven Zentrum näher positioniert, so dass der initiale Angriff an beiden Zentren erfolgen kann. Diese Annahme wird von den experimentell bestimmten KIE unterstützt, da sowohl für die Position C(8) als auch C(9) mit 2,07 bzw. 3,79 deutliche KIE gemessen wurden. Aufgrund des grösseren KIE an C(9) verläuft der Desaturierungsprozess bevorzugt aus der *gauche*-Konformation heraus, bei der der initiale Angriff an C(9) erfolgt (siehe Abbildung 62).

Das mechanistische Modell zweier *gauche*- und einer *anti*-Ausgangskonformation ist in Übereinstimmung mit dem stereochemischen Verlauf, der für die Bildung beider Phytosphingeninisomere einen *syn*-Eliminierungsmechanismus mit identischer Seitenselektivität voraussetzt. Zudem erklärt das Modell die ungewöhnlich niedrigen experimentellen kinetischen Isotopeneffekte. So sollte die  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Desaturase in der Lage sein, auf eine Deuteriumsubstitution an C(8) oder C(9) so zu reagieren, dass die Desaturierung vermehrt aus der Konformation heraus erfolgt, die keine initiale Deuteriumabstraktion benötigt. Entsprechend sollte eine Deuteriumsubstitution an C(8) bzw. C(9) auch einen Einfluß auf das (*E/Z*)-Verhältnis der Produkte haben. Eine experimentelle Bestätigung hierfür liefert die Tatsache, dass Fütterungsexperimente mit *rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-

Hexadecansäure (**38**) ein (*E/Z*)-Verhältnis von ca 6:1 liefert, während die Experimente mit *rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**) zur Bildung von (*8E*)- und (*8Z*)-Phytosphingenin im Verhältnis ca. 11:1 führt.



**Abbildung 62:** Mechanistisches Modell zum Ursprung von (*E/Z*)-Phytosphingenin (**118** und **119**). Unterschiedlich gewichtete *anti*- und *gauche*-Konformationen führen unabhängig zu (*8E*)- bzw. (*8Z*)-Phytosphingenin.

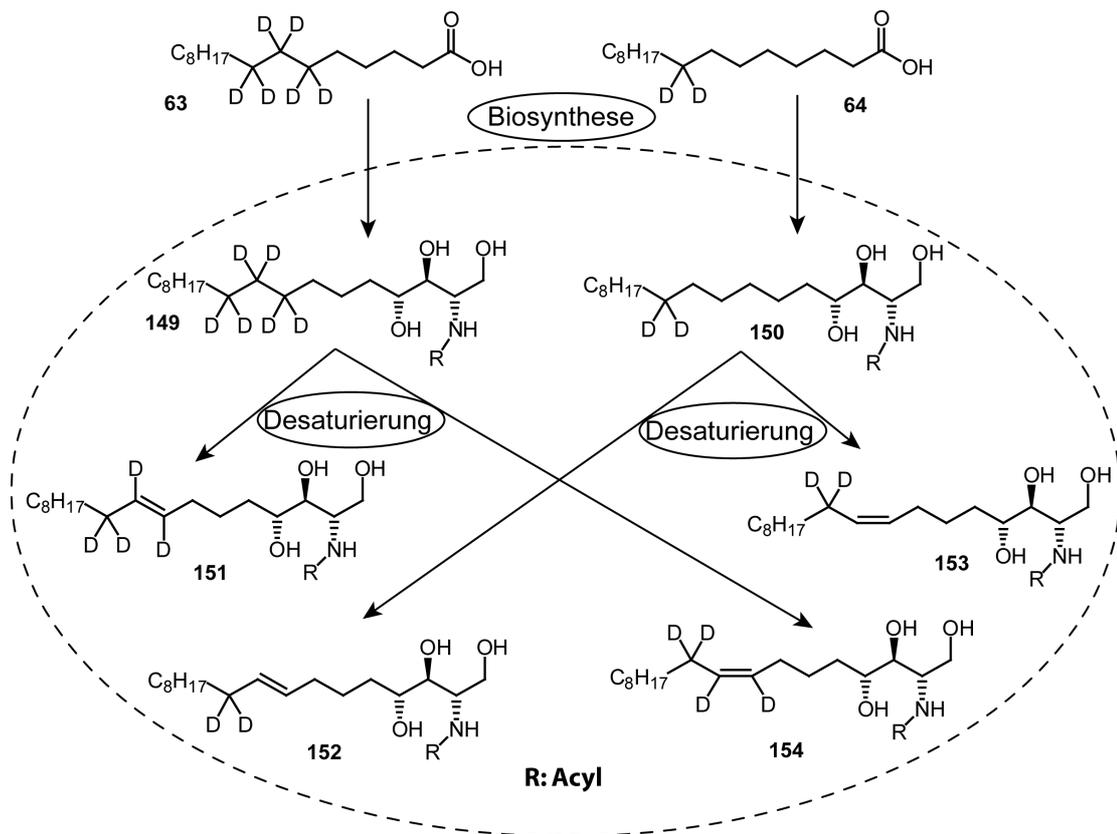
### 3.2.2.5 Bestimmung der intrinsischen kinetischen Isotopeneffekte

Das mechanistische Modell unterschiedlich gewichteter *gauche*- und *anti*-Konformationen liefert eine plausible Erklärung für die durchweg sehr niedrigen experimentellen kinetischen Isotopeneffekte. Allerdings ist auch eine andere Deutung möglich.

Enzymreaktionen bestehen nicht allein aus der chemischen Reaktion, sondern beinhalten eine Reihe weiterer vor- und nachgelagerter Prozesse. Im Fall von Desaturasen sind Schritte wie Elektronentransfer, Sauerstoffbindung und -aktivierung, Substratbindung und Produktfreisetzung beteiligt, die zur Kinetik der Enzymreaktion beitragen.<sup>[81]</sup> Dies kann dazu führen, dass die kinetischen Isotopeneffekte verdeckt werden, also deutlich niedriger ausfallen als man es z.B. für einen geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt erwartet. Diese Effekte können sogar zu einer vollständigen Maskierung des intrinsischen KIE führen, wie das Beispiel der  $\Delta^9$ -ACP-Desaturase aus *Rizinus* zeigt. Während Untersuchungen mit isotope markierten Substraten KIE von ca. 1 ergeben haben<sup>[29]</sup>, deuten aktuelle detaillierte enzymkinetische Untersuchungen darauf hin, dass hier die initiale Bindungsspaltung einen KIE in der Größenordnung von ca. 10 aufweist.<sup>[20]</sup>

Um eine Unterscheidung treffen zu können, ob im Fall der  $\Delta^8$ -Spingolipiddesaturase die durchweg sehr niedrigen KIE auf maskierende Faktoren, oder aber, wie das mechanistische Modell vermuten lässt, durch ein konformatives Ausweichen verursacht werden, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden Substrate verwendet, die es erlauben, kinetische Isotopeneffekte zu bestimmen, die nicht durch ein Ausweichen des Enzyms

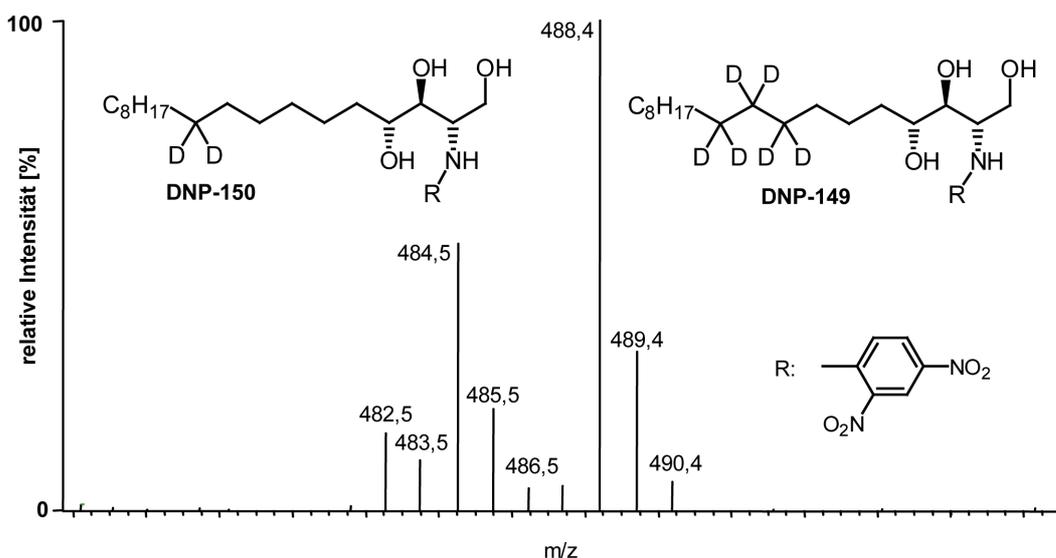
erniedrigt werden können. Diese Stoffwechselsonden wurden dabei so konzipiert, dass in jedem Fall der initiale Angriff die Abspaltung eines Deuteriumatoms beinhaltet. Diese Bedingung wird von der an Position C(6) und C(7) jeweils dideuterierten Palmitinsäure **63** erfüllt. Durch Fütterung eines 1:1 Gemisches aus [6,6,7,7,8,8- $^2\text{H}_6$ ]-Palmitinsäure (**63**) und [8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Palmitinsäure (**64**), in Gegenwart des Fettsäuresyntheseinhibitors Cerulenin, werden beide Fettsäuren in guten Einbauraten in die deuterierten Phytosphinganine **149** und **150** überführt. Durch Desaturierung entstehen daraus in unterschiedlichen Mengen die vier Phytosphingene **151-154**.



**Abbildung 63:** Transformierte Hefezellen wurden mit einem 1:1-Gemisch aus [8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Palmitinsäure (**64**) und [6,6,7,7,8,8- $^2\text{H}_6$ ]-Palmitinsäure (**63**) inkubiert. Beide Fettsäuren fließen in den Sphingolipidstoffwechsel der Hefe ein, so dass die beiden Phytosphinganine **149** und **150** *in vivo* gebildet werden. Durch Desaturierung von **149** und **150** werden, aufgrund KIE, die Phytosphingene (**151-154**) in unterschiedlichen Mengen gebildet.

Die Menge der einzelnen deuterierten Phytosphingene ist abhängig vom kinetischen Isotopeneffekt der initialen Deuteriumabspaltung. Aus dem Verhältnis der (8E)-Isomere (**152** zu **151**) einerseits und aus dem Verhältnis der (8Z)-Isomere (**154** zu **153**) andererseits, lassen sich zwei kinetische Isotopeneffekte berechnen. Diese so ermittelten KIE lassen sich im Gegensatz zu den in Kapitel 3.2.2.3 gemessenen KIE nicht mehr einem Zentrum, also C(8) oder C(9), zuordnen und sind deshalb nicht geeignet, den Ort des initialen Angriffs der Desaturase zu bestimmen. Dafür geben sie, falls keine Maskierung vorliegt, die absoluten Werte der kinetischen Isotopeneffekte für die Bildung des (E)- bzw. des (Z)-Isomers wider.

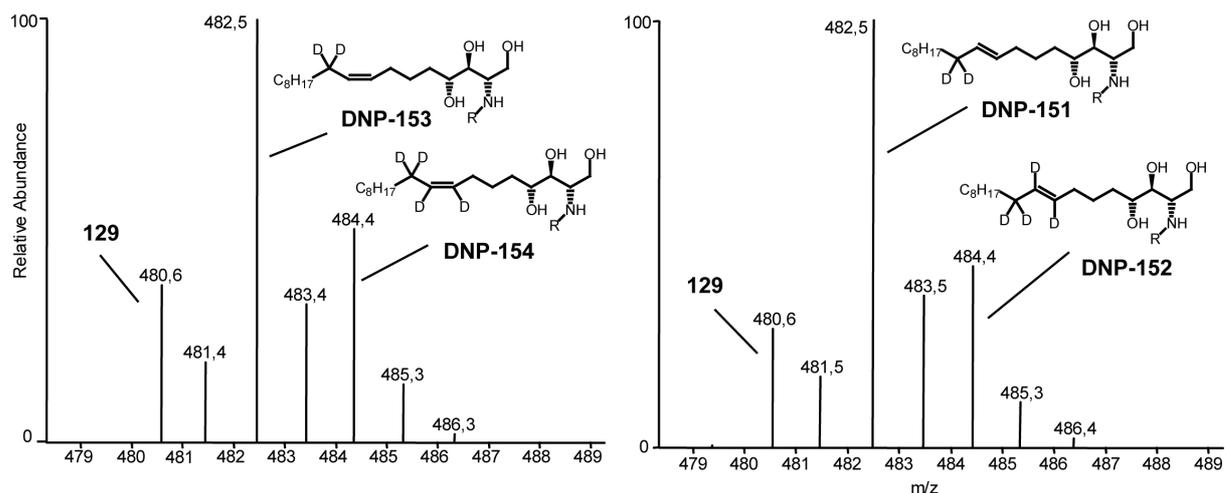
Um die kinetischen Isotopeneffekte zu bestimmen, wurden die Hefezellen nach basischer Hydrolyse und Derivatisierung zu DNP-Derivaten mittels HPLC/ESI-MS untersucht. Überraschenderweise stellte sich dabei heraus, dass die beiden Palmitinsäuren **63** und **64** nicht in gleichen Anteilen in die Substrate **149** und **150** der Desaturase überführt werden (siehe Abbildung 64). Statt eines 1:1-Verhältnisses wurde ein Verhältnis von ca. 1:0,6 von [6,6,7,7,8,8- $^2\text{H}_6$ ]-Phytosphinganin (**149**) und [8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Phytosphinganin (**150**) erhalten.



**Abbildung 64:** Negativ ESI-MS-Spektrum der Phytosphinganin-Fraktion nach Fütterung von **63** und **64** im Verhältnis 1:1.

Die Messung kinetischer Isotopeneffekte basiert auf der Annahme, dass die Substrate der Desaturase in hohem Überschuss zugegen sind und die gleiche Wahrscheinlichkeit besteht, ein Substratmolekül mit oder ohne Deuteriumsubstitution umzusetzen. Der letzte Punkt ist hier jedoch nicht erfüllt, da die Sonnenblumendesaturase nicht einen 1:1 Pool der Substrate **149** und **150**, sondern ein 1:0,6 von **149** und **150** zur Verfügung hat. Daher müssen die experimentellen KIE etwa um den Faktor 2, entsprechend dem Substratangebot von **149** und **150**, korrigiert werden.

Die Massenspektren der (8*E*)- und (8*Z*)-Phytosphingeninfraktionen zeigen beide ein etwa 5:2-Verhältnis von  $d_2$ - zu  $d_4$ -markiertem Phytosphingenin und zeigen damit sowohl für die Bildung des (*E*)-Isomeren als auch des (*Z*)-Isomeren einen deutlichen kinetischen Isotopeneffekt (siehe Abbildung 65).



**Abbildung 65:** Negativ ESI-MS-Spektren der DNP-derivatisierten (8Z)-Phytosphingenin-Fraktion (**links**) und der (8E)-Phytosphingenin-Fraktion (**rechts**), welche aus Hefekulturen isoliert wurden, die mit **63** und **64** im Verhältnis 1:1 inkubiert wurden. Die Verhältnisse der Isotopomeren liefern den beobachteten KIE ( $k_H/k_D$ ).

Nach Korrektur des Ions bei  $m/z$  482 um den  $[M+2]$ -Isotopenpeak von **129** und Korrektur des Ions bei  $m/z$  484 um den  $[M+2]$ -Isotopenpeak von DNP-**153** wurden die in Tabelle 3 zusammengestellten KIE erhalten. Berücksichtigt man zusätzlich das Substratangebot von **150** zu **149** von 1:0,6, ergibt sich ein tatsächlicher kinetischer Isotopeneffekt von 4,3 für das (E)-Isomer und von 5,1 für das (Z)-Isomer.

(E)-Isomer	beobachteter KIE	Verhältnis Substrate	tatsächlicher KIE
Peakintensität [%]	<b>(152/151)</b>	<b>(149/150)</b>	<b>(152/151)*(149/150)</b>
Messung 1	2,18	1,84	4,02
Messung 2	2,71	1,62	4,41
Messung 3	2,51	1,74	4,37
<b>Mittelwert</b>	<b>2,47</b>		<b>4,26 ± 0,22</b>
(Z)-Isomer	beobachteter KIE	Verhältnis Substrate	tatsächlicher KIE
Peakintensität [%]	<b>(154/153)</b>	<b>(149/150)</b>	<b>(154/153)*(149/150)</b>
Messung 1	2,69	1,84	4,95
Messung 2	3,27	1,62	5,31
Messung 3	2,82	1,74	4,91
<b>Mittelwert</b>	<b>2,92</b>		<b>5,06 ± 0,22</b>

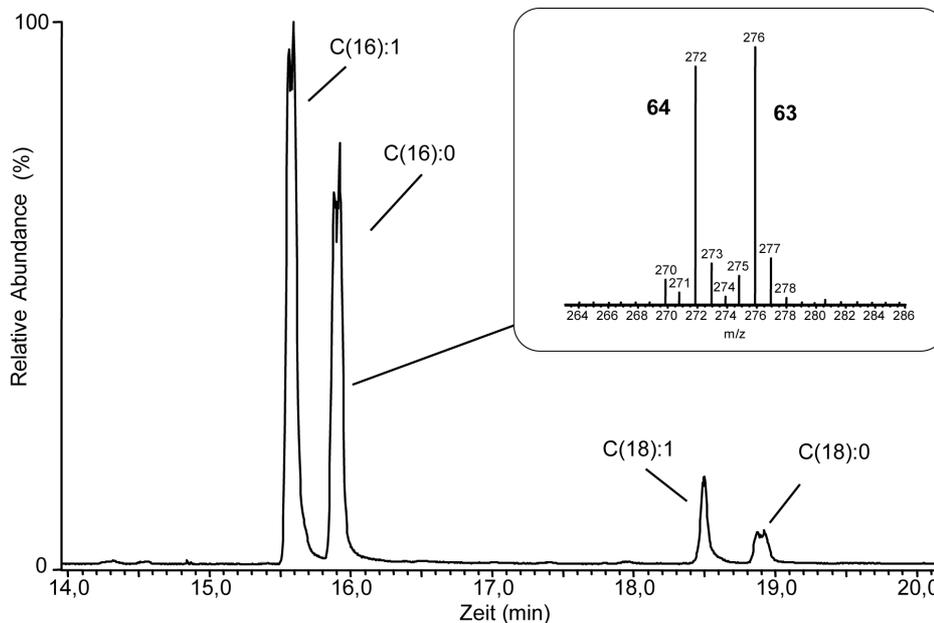
**Tabelle 3:** Experimentell beobachtete KIE und tatsächliche KIE.

Die hier erhaltenen hohen kinetischen Isotopeneffekte zeigen damit eindeutig, dass die niedrigen experimentellen KIE, die in Kapitel 3.2.2.3 bestimmt wurden, nicht durch eine Maskierung der intrinsischen KIE zu erklären sind. Vielmehr stützen die experimentellen KIE

ein Modell, in dem die Desaturase die Wahl zwischen *gauche*- und *anti*-Ausgangskonformationen besitzt und so einer Deuteriumpositionierung ausweichen kann.

### 3.2.2.5.1 Metabolismus von [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Palmitinsäure (63)

Grundsätzlich lässt sich beobachten, dass Hefen besser in Gegenwart ihres natürlichen Substrats Palmitinsäure wachsen als in Gegenwart von deuterierten Palmitinsäuren. Demnach erscheint es wenig plausibel, dass die sechsfach deuterierte Palmitinsäure **63** besser in isotopenmarkiertes Phytosphingalin überführt wird als die lediglich zweifach deuterierte Palmitinsäure **64** (siehe Abbildung 64). Vielmehr kann man vermuten, dass **64** insgesamt besser verstoffwechselt wird und dadurch für die eigentliche Sphingolipidbiosynthese nur begrenzt zur Verfügung steht. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Anteil der inkubierten Hefezellen einer basischen Methanolyse unterworfen und die erhaltenen Fettsäuremethylester per GC/MS analysiert.



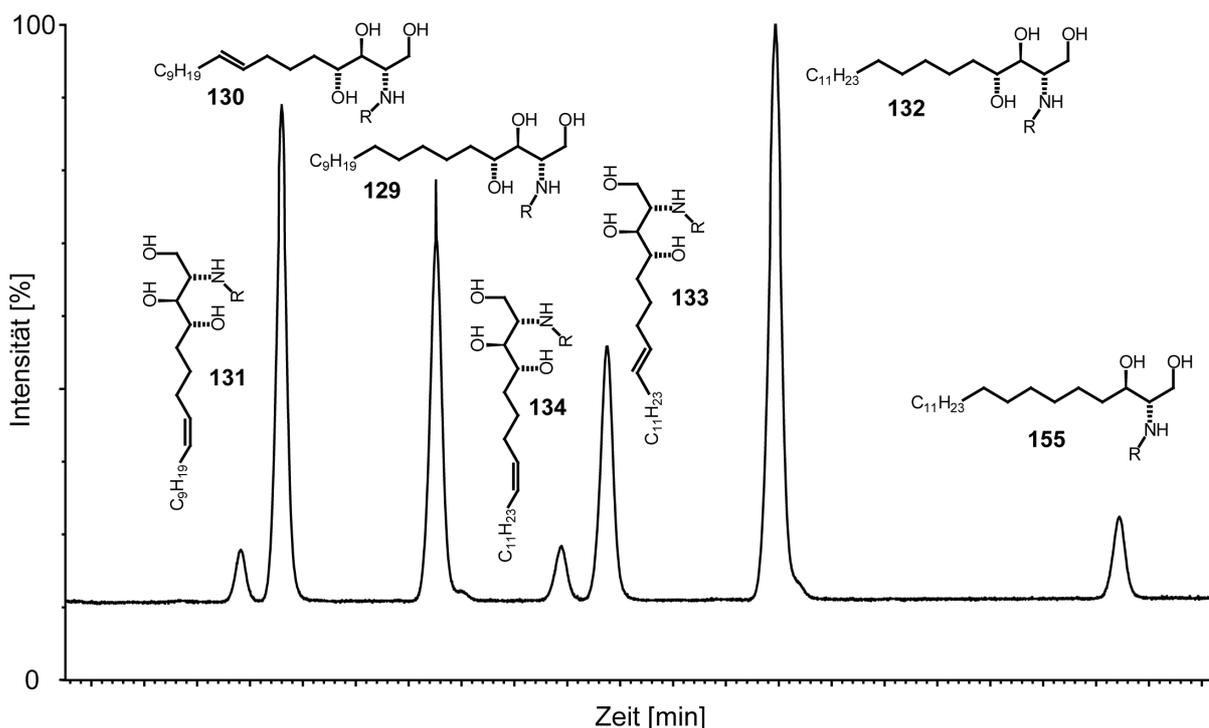
**Abbildung 66:** GC-MS-Chromatogramm der Fettsäuremethylester, welche aus Hefekulturen isoliert wurden, die mit einem 1:1-Gemisch von **63** und **64** inkubiert wurden. Durch die Zugabe von Cerulenin ist die Kettenverlängerung der applizierten Palmitinsäuren fast vollständig unterdrückt.

Unter normalen Wachstumsbedingungen enthält *S. cerevisiae* als Hauptkomponente Ölsäure, in etwas geringeren Mengen Palmitinsäure und darüber hinaus eine Reihe weiterer C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Fettsäuren in unterschiedlichen Anteilen. <sup>[188]</sup> Im Gegensatz dazu besitzen Hefezellen, deren Fettsäurebiosynthese mit Cerulenin gehemmt wurde, C<sub>18</sub>-Fettsäuren nur im Spurenbereich (siehe Abbildung 66). Dominierend sind Palmitinsäure und monoungesättigte C<sub>16</sub>-Fettsäuren, wobei nach Applikation gleicher Mengen **63** und **64** in beiden Gruppen eine nahezu 1:1-Verteilung der [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Isotopomeren herrscht. Die Hypothese, die zweifach deuterierte Palmitinsäure (**64**) könnte vermehrt zur Biosynthese von

längerkettigen ungesättigten Fettsäuren wie der Ölsäure genutzt werden und damit nicht mehr der Sphingolipidbiosynthese zur Verfügung stehen, muss damit ausgeschlossen werden. Zwar wird [10,10-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Octadecansäure (aus **64**) erwartungsgemäß besser zu Ölsäure desaturiert als [8,8,9,9,10,10-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Octadecansäure (aus **63**); die Gesamtkonzentration an C<sub>18</sub>-Fettsäuren ist aber zu gering, um die Hypothese zu stützen. Folglich muss eine Differenzierung zwischen [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]- und [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Palmitinsäure während der Sphingolipidbiosynthese stattfinden.

### 3.2.2.6 Einfluss der Kettenlänge auf das Verhältnis von (8*E*)- und (8*Z*)-Phytosphingenin

Nach dem mechanistischen Modell (siehe Abbildung 62) mit energetisch unterschiedlichen *anti*- und *gauche*-Konformationen sollte auch die Kettenlänge der Substrate einen Einfluss auf deren Gewichtung und damit auf das (*E*)- und (*Z*)-Produktverhältnis haben. Um dieser Frage nachzugehen, wurden C<sub>16</sub>-Dihydroxysphingarin **156** und C<sub>20</sub>-Dihydroxysphingarin **155** an die transformierten Hefekulturen verfüttert. Beide Sphingobasen wurden von Dr. Christian Hertweck synthetisiert und für die Fütterungsexperimente zur Verfügung gestellt. <sup>[178]</sup>

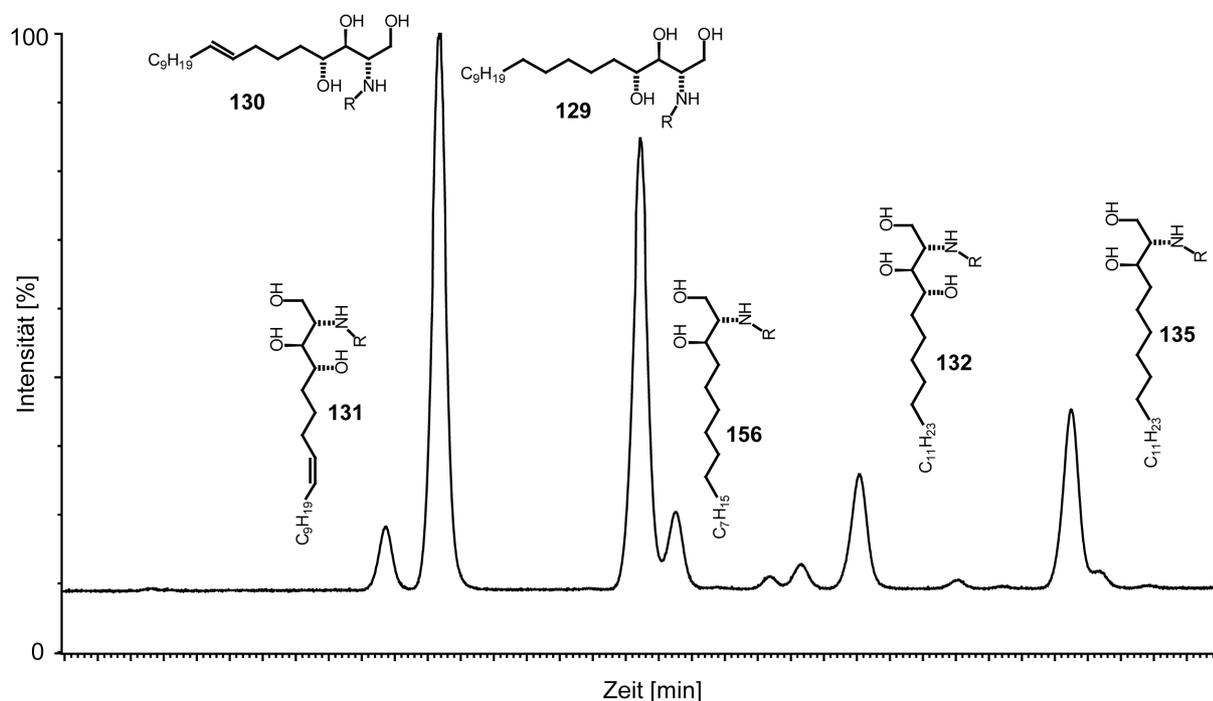


**Abbildung 67:** HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) DNP-derivatisierter Sphingobasen von Hefekulturen, die mit C<sub>20</sub>-Dihydroxysphingarin (**155**) inkubiert wurden.

Das Muster der DNP-derivatisierten Sphingobasen nach Fütterung von C<sub>20</sub>-Dihydroxysphingarin (**155**) ist in Abbildung 67 dargestellt. Hierbei zeigt sich, dass **155** von den transformierten Hefezellen aufgenommen und problemlos zu C<sub>20</sub>-Trihydroxysphingarin **132** hydroxyliert und anschließend zu (8*E/Z*)-C<sub>20</sub>-Phytosphingenin (**133/134**) desaturiert wird.

Die exakte Quantifizierung des (*E/Z*)-Verhältnisses ist nicht möglich, da mit dem (*8E*)-Isomer auch geringe Mengen enthaltenes  $C_{19}$ -Trihydroxysphingonin eluieren. Somit wird das (*8E/Z*)-Verhältnis durch Integration der Peakflächen (UV 350 nm) aus drei Messungen mit  $(5,0 \pm 0,15)$  zu 1 etwas zu hoch bestimmt. Alternativ lässt sich das (*8E/Z*)-Verhältnis aus den Massenspektren durch Integration der Ionenspuren bestimmen. Aus drei aufeinander folgenden Messungen wurde ein Verhältnis von  $(3,9 \pm 0,3)$  zu 1 erhalten. Dieser Wert fällt jedoch vergleichsweise niedrig aus, da eine Integration der Ionenspur nicht exakt möglich war. Das tatsächliche Verhältnis von (*8E*)- und (*8Z*)- $C_{20}$ -Phytosphingonin sollte deshalb zwischen dem aus dem UV bestimmten und dem aus dem Massenspektrum abgeleiteten Wert liegen. Gleichwohl ist ein deutlicher Einfluss der Kettenlänge zu erkennen. Im Vergleich zum  $C_{18}$ -Phytosphingonin ist das (*8E/Z*)-Verhältnis von ca. 7:1 signifikant herabgesetzt.

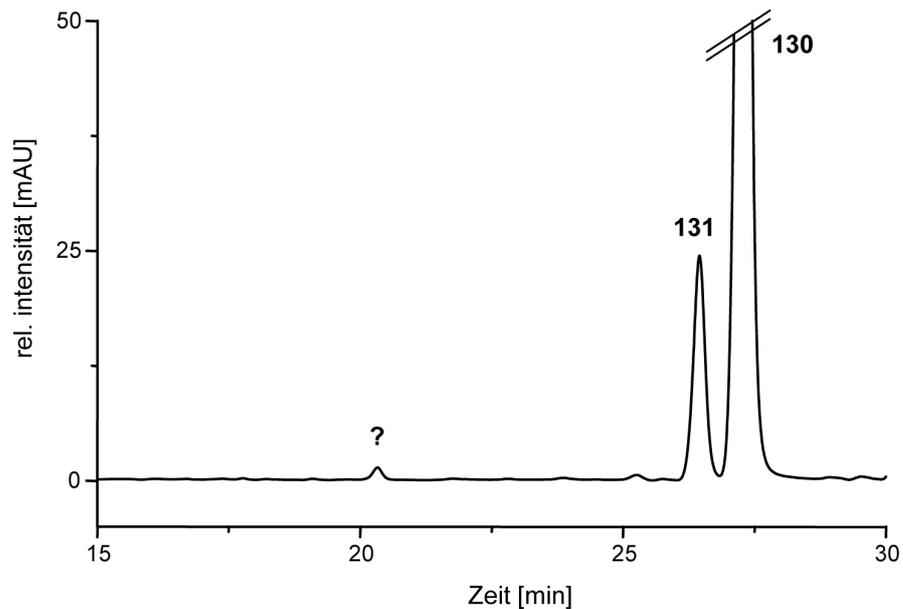
Das HPL-Chromatogramm der DNP derivatisierten Sphingobasen nach Fütterung von  $C_{16}$ -Dihydroxysphingonin (**156**) ist in Abbildung 68 gezeigt. Im Gegensatz zum  $C_{20}$ -Homologen wird keine Hydroxylierung zum Phytosphingonin und folglich auch keine Desaturierung beobachtet. Möglicherweise wird **156** schon von der Dihydroceramidsynthese nicht als Substrat akzeptiert (siehe Abbildung 44). Die Frage, ob es eventuell einen kontinuierlichen Trend der (*8E/Z*)-Verhältnisse von kürzeren zu längeren Kettenlängen gibt, kann somit nicht beantwortet werden.



**Abbildung 68:** HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) DNP-derivatisierter Sphingobasen von Hefekulturen, die mit  $C_{16}$ -Dihydroxysphingonin (**156**) inkubiert wurden.

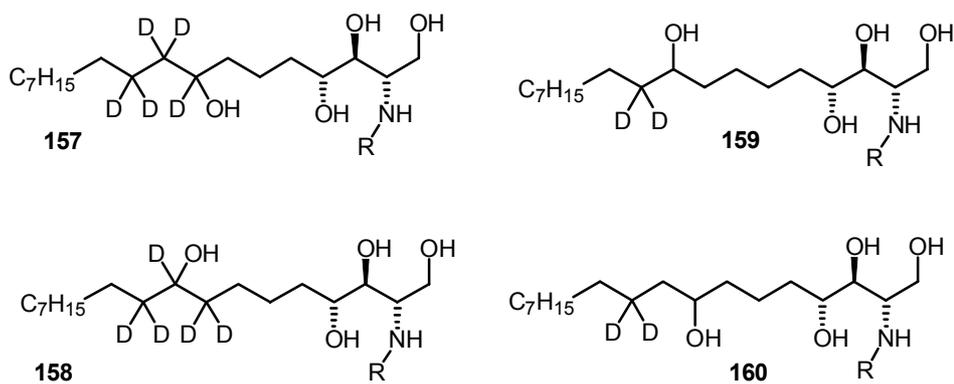
### 3.2.2.7 Hydroxylierung und Desaturierung von Phytosphinganim

Eine Analyse der DNP-derivatisierten Sphingobasen, bei denen die DNP-Derivate entweder gar nicht vorgereinigt oder großzügig von der DC-Platte reisoliert wurden, führt zu interessanten Beobachtungen. Im Gegensatz zu den vorgereinigten Proben kann im Spurenbereich bei einer Retentionszeit von ca 20 Minuten ein zusätzlicher Peak identifiziert werden (siehe Abbildung 69).



**Abbildung 69:** HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) der DNP-derivatisierten Sphingobasen aus transformierten Hefen, die mit Palmitinsäure inkubiert wurden.

Bei Hefekulturen, die mit natürlicher Palmitinsäure inkubiert wurden, gibt das ESI-Massenspektrum dieses Peaks einen Hinweis darauf, dass es sich hierbei möglicherweise um hydroxyliertes Phytosphinganim handelt. Diese Vermutung wird durch Inkubationsversuche mit dem 1:1-Gemisch von  $[8,8\text{-}^2\text{H}_2]$ - und  $[6,6,7,7,8,8\text{-}^2\text{H}_6]$ -Palmitinsäure (**64**) und (**63**) bestätigt. Das Massenspektrum des unbekanntes Peaks zeigt Pseudomolekülonen, wie sie einem dideutierten (**159** oder **160**) und einem fünfmal deutierten Tetrahydroxysphinganim (**157** oder **158**) entsprechen. Der Verlust eines Deuteriumatoms der markierten Vorstufe **149** kann dabei als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich die zusätzliche Hydroxygruppe an Position C(8) bzw. an C(9) befinden sollte.



**Abbildung 70:** Postulierte Strukturen hydroxylierter Phytosphinganine.

Eine detaillierte Untersuchung der Faktoren, die zur Bildung dieser neuen Verbindung führen, steht noch aus. Die Beobachtung, dass neben der Desaturierung zwischen C(8) und C(9) im Spurenbereich wahrscheinlich eine Hydroxylierung an diesen Positionen auftritt, ist von erheblicher Bedeutung für den Mechanismus von Hydroxylierung und Desaturierung. In letzter Zeit häufen sich Beispiele, bei denen Enzyme neben der eigentlichen Desaturaseaktivität eine Hydroxylaseaktivität aufweisen. <sup>[189]</sup> Allgemein wird deshalb vermutet, dass es sich bei diesen beiden Prozessen um mechanistisch eng miteinander verknüpfte Prozesse handelt (siehe Abschnitt 3.3.2).

### 3.2.2.8 Zusammenfassung

Die  $\Delta^8$ -Sphingolipiddesaturase aus *Helianthus annuus* unterscheidet sich von allen bisher untersuchten Desaturasen dadurch, dass sie nicht entweder (*Z*)- oder (*E*)-Olefine erzeugt, sondern beide Isomere parallel bildet. Durch den Nachweis, dass keine hefeeigene Isomerase an der Bildung von (*8E/Z*)-Phytosphingenin beteiligt ist, konnte bewiesen werden, dass es sich hier in der Tat um die Arbeit eines einzelnen Enzyms handelt. Durch einen chemisch-molekularbiologischen Ansatz ist es gelungen, die mechanistischen Details dieses Enzyms aufzuklären. Wie bei stereochemisch einheitlich arbeitenden Desaturasen werden auch von der Sonnenblumendesaturase die Produkte durch *syn*-Eliminierung gebildet. Sowohl für die Bildung von (*8E*)-Phytosphingenin als auch von (*8Z*)-Phytosphingenin werden die vicinalen Wasserstoffatome von ein und derselben Seite abstrahiert (Abbildung 56). Dieser Reaktionsverlauf entspricht damit dem, wie er bisher für alle experimentell untersuchten Fettsäuredesaturasen gefunden wurde. Insofern hat es den Anschein, als wäre der stereochemische Verlauf des Desaturierungsprozesses in allen Desaturasen hochkonserviert.

Neben den Gemeinsamkeiten gibt es deutliche Unterschiede zwischen der (*E/Z*)-Sphingolipiddesaturase und Desaturasen mit ausschließlicher (*Z*)- oder (*E*)-Selektivität. Offensichtlich erlaubt die  $\Delta^8$ -Sphingolipiddesaturase unterschiedliche Ausgangskonformationen, aus denen die Desaturierung erfolgen kann. Die *syn*-Eliminierung aus einer *anti*-

Konformation führt unmittelbar zum (8*E*)-Phytosphingenin, während die *syn*-Eliminierung aus einer *gauche*-Konformation zum (8*Z*)-Olefin führt. Vermutlich bestimmt die energetische Gleichgewichtslage zwischen *anti*- und *gauche*-Konformation maßgeblich das (8*E*)- und (8*Z*)-Produktverhältnis. Die in höheren Pflanzen individuellen Verhältnisse von (8*E*)- und (8*Z*)-Phytosphingenin lassen sich dadurch erklären, wie stark die eine oder andere Startkonformation durch die Umgebung im aktiven Zentrum des Enzyms favorisiert oder destabilisiert wird. Das Modell zweier unterschiedlich gewichteter Startkonformationen wird weiterhin durch die Tatsache gestützt, dass auch die Kettenlänge des Phytosphingenins einen maßgeblichen Einfluss auf das (*E/Z*)-Produktverhältnis hat.

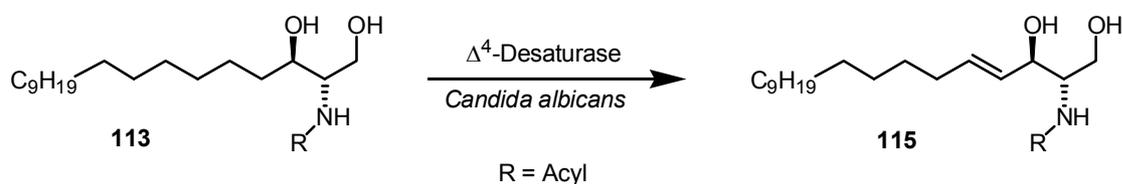
Augenscheinlich führt eine veränderte Ausgangskonformation auch zu einem Wechsel der Kryptoregiochemie der Desaturase. Während die Desaturierung zum (8*E*)-Phytosphingenin durch initialen Angriff am C(8) eingeleitet wird, verläuft die Desaturierung zum (8*Z*)-Olefin unter bevorzugtem Angriff am C(9). Ein initialer Angriff an der zur polaren Kopfgruppe näheren Position wurde, wie bei der Bildung des (8*E*)-Isomers, auch bei allen bisher untersuchten membrangebundenen Fettsäuresaturasen <sup>[50]</sup> sowie einer  $\Delta^4$ -(*E*)-Dihydroceramid-desaturase aus Rattenleber <sup>[190]</sup> gefunden. Ein einleitender Angriff an der zur polaren Kopfgruppe abgewandten Position, wie bei der Bildung von (8*Z*)-Phytosphingenin beobachtet, wurde hier erstmals für eine Desaturase gefunden.

### 3.2.3 Stereochemische Charakterisierung einer bifunktionalen $\Delta^4$ -Dihydroceramid-desaturase/C(4)-Dihydroceramidhydroxylase aus *Candida albicans*

#### 3.2.3.1 Stereochemischer Verlauf der Desaturierung

Die zentrale Rolle von Ceramid (**115**) als Vorstufe wichtiger Signalmoleküle (second messenger) wurde bereits im Rahmen der Sphingolipidbiosynthese ( Kapitel 3.2.1 ) erwähnt. Ceramid selbst wird eine Beteiligung an Apoptose, Zellteilung oder Zellreifung zugeschrieben. <sup>[165]</sup> Im Vergleich dazu besitzt die biosynthetische Vorstufe Dihydroceramid (**113**) keine oder eine deutlich herabgesetzte Aktivität. <sup>[167]</sup> Dementsprechend stellt die Einführung der  $\Delta^4$ -(*E*)-Doppelbindung durch das Enzym Dihydroceramid-desaturase einen Schlüsselschritt dar (siehe Abbildung 44).

Bereits 1971 wurden erste Untersuchungen mit isotoopenmarkierten Vorstufen zum Mechanismus der  $\Delta^4$ -Dihydroceramid-desaturase vorgenommen. <sup>[191, 192]</sup> Damals waren jedoch solche Untersuchungen mit einer Reihe von Hindernissen verbunden. So standen zu dieser Zeit nicht die Methoden zur asymmetrischen Synthese zur Verfügung, wie wir sie heute kennen. Darüber hinaus mussten die Experimente an dem Organismus selbst, also z.B. durch Injektion von markierten Vorstufen in das Gehirn von Ratten, durchgeführt werden. <sup>[191]</sup> Molekularbiologische Methoden, die eine Untersuchung von Desaturasen in transgenen Organismen erlauben, sowie moderne Methoden der HPLC/MS-Analytik, die eine Untersuchung im Submikrogrammmaßstab ermöglichen, standen nicht zur Verfügung. Vor dem Hintergrund dieser Schwierigkeiten ist es nicht verwunderlich, dass zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen. Während Stoffel *et al.* für die Desaturierung einen *syn*-Eliminierungsmechanismus fanden, favorisierte die Arbeitsgruppe um Sweeley einen *anti*-Eliminierungsmechanismus. Im Hinblick auf diese gegensätzlichen Befunde erschien es sinnvoll, den stereochemischen Verlauf der Desaturierung von Dihydroceramid (**113**) mit den heute zur Verfügung stehenden synthetischen, molekularbiologischen und analytischen Methoden erneut zu untersuchen.



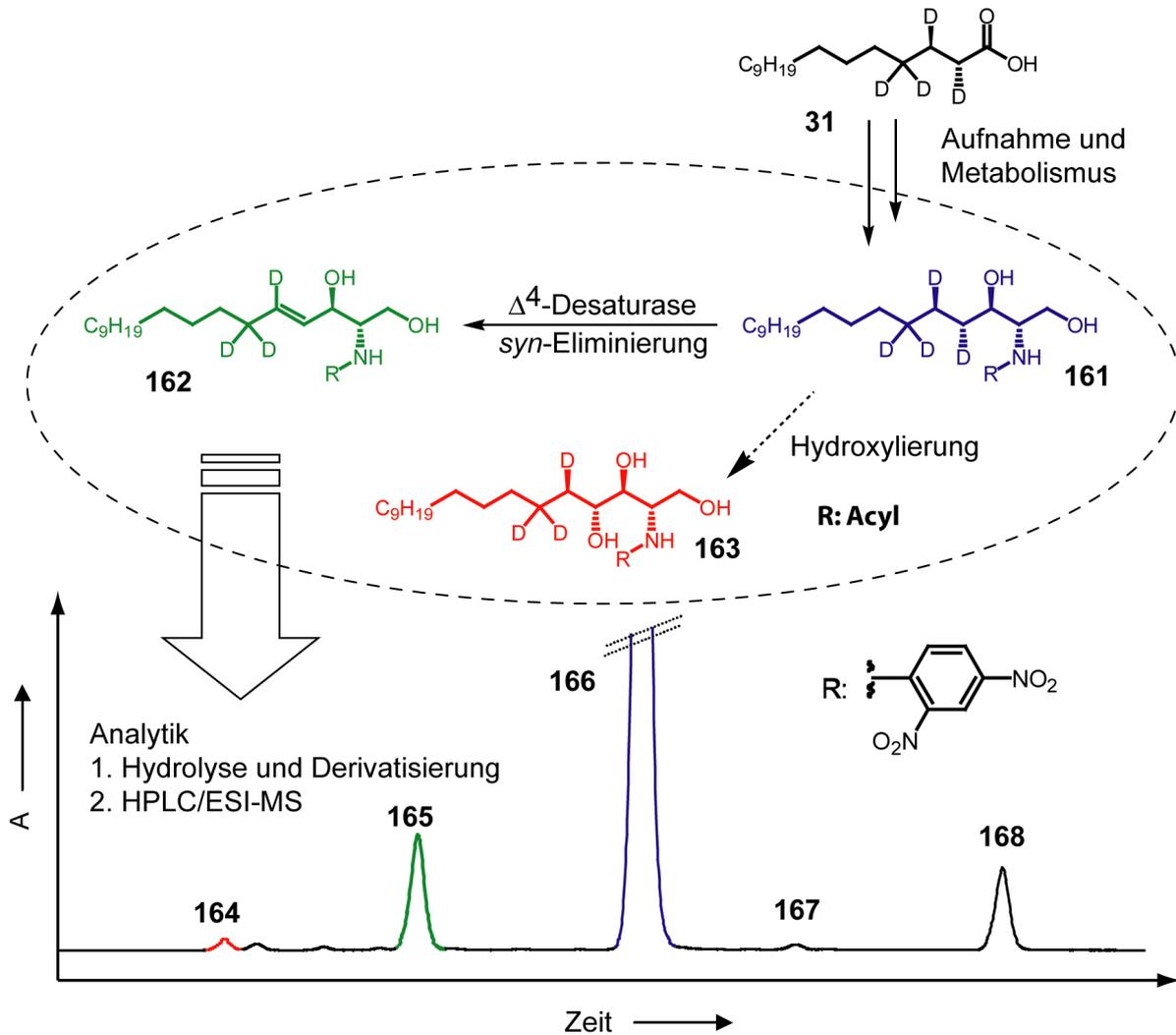
**Abbildung 71:** Desaturierung von Dihydroceramid (**113**) zu Ceramid (**115**).

Kürzlich wurden im Arbeitskreis von Prof. E. Heinz  $\Delta^4$ -(*E*)-Dihydroceramid-desaturasen aus *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster* und *Candida albicans* kloniert und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* überexprimiert. <sup>[193]</sup> Exemplarisch für diese Klasse

von Desaturasen wurde die Stereochemie der  $\Delta^4$ -Desaturase aus der Hefe *Candida albicans* untersucht. Weitestgehend konnten dafür die zur Untersuchung der Sonnenblumendesaturase ausgearbeiteten Techniken übernommen werden.

Kulturen von *S. cerevisiae*, welche die  $\Delta^4$ -Dihydrocermiddesaturase aus *Candida albicans* überexprimieren, wurden mit (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Palmitinsäure (**31**) inkubiert. Bei den verwendeten Hefezellen handelt es sich um den Stamm sur2 $\Delta$ , dem durch Ausschalten des entsprechenden Gens die Fähigkeit zur Hydroxylierung von Dihydroceramid genommen wurde. Die *de novo* Sphingolipidbiosynthese in dieser Mutante führt somit lediglich bis zu Stufe des Dihydroceramids (**113**). Phytosphingarin (**116**) kann diese Mutante hingegen nicht mehr selbst synthetisieren. Auf dem in Abbildung 72 gezeigten Weg wird so die verfütterte Palmitinsäure (**31**) zur Biosynthese von (4*R*,5*S*)-[4,5,6,6-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dihydroceramid (**161**) genutzt und dient der heterolog exprimierten Dihydroceramid-desaturase aus *C. albicans* als Substrat. Die Methylengruppen, die direkt an der Desaturierung zum Dihydroceramid beteiligt sind, tragen dabei eine enantioselektive Markierung und dienen als stereochemische Sonden. Die Markierung an C(6) hingegen erlaubt eine eindeutige Charakterisierung nach der Desaturierung, selbst für den Fall, dass beide Deuteriumatome an C(4) und C(5) verloren gehen.

Die transformierten Zellen von *S. cerevisiae* wurden in Gegenwart von 250  $\mu$ M der markierten Palmitinsäure (**31**) bei 25 °C bis zu einer Objektdichte von  $\sim$  0,8 bei 600 nm kultiviert. Durch Zugabe von 25  $\mu$ M Cerulenin zum Kulturmedium konnte die hefeeigene Fettsäurebiosynthese effektiv unterdrückt werden und so ein sehr guter Einbau der verfütterten Palmitinsäure (**31**) erzielt werden. Zum Ende der Inkubation wurden die Hefezellen für 90 Minuten einem Hitzeschock bei 37 °C ausgesetzt, der zu einer erhöhten Produktion an Sphingobasen in der Zelle führt. <sup>[194, 195]</sup> Anschliessend wurden die Hefen durch Zentrifugieren geerntet und mittels Bariumhydroxid-Hydrolyse aufgeschlossen. Die freigesetzten Sphingobasen wurden mit Sangers Reagenz in Dinitrophenylderivate überführt und dünnschichtchromatographisch vorgereinigt. Die Analyse des Sphingolipidmusters erfolgte mittels HPLC/ESI-MS.



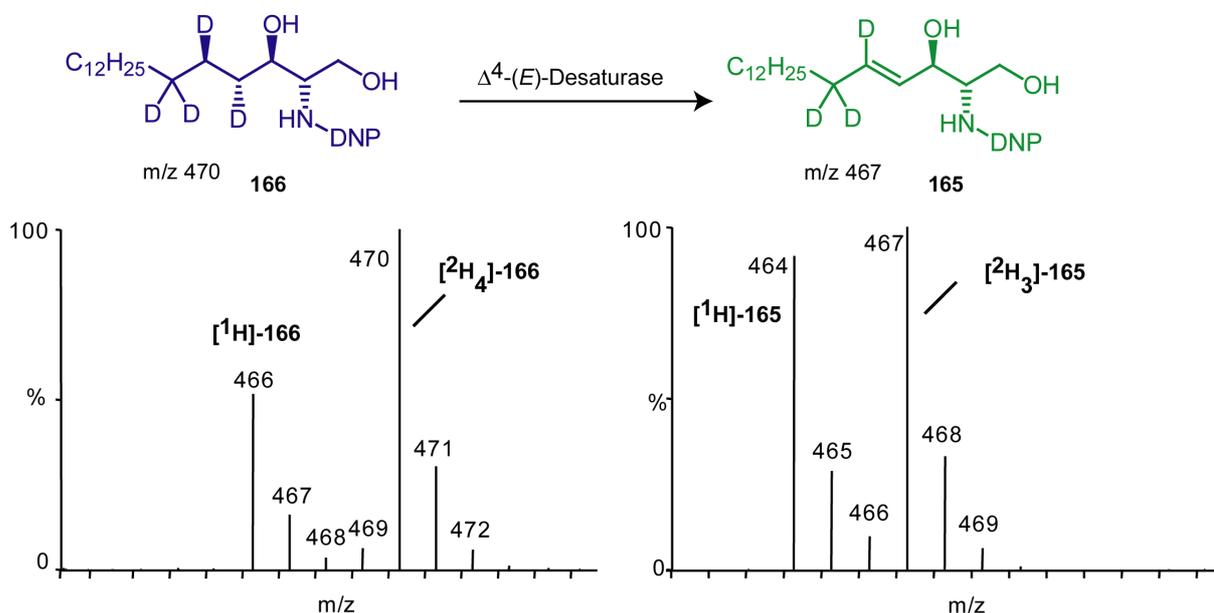
**Abbildung 72:** Biosynthese und Analytik der Sphingobasen in transformierten Hefen. Das HPLC-UV-Chromatogramm (Detektion bei 350 nm) zeigt die DNP derivatisierten Sphingobasen. **blau:** deuteriertes Dihydroceramid **161** und dessen DNP-Derivat **166**; **grün:** deuteriertes Ceramid **162** und dessen DNP-Derivat **165**; **rot:** deuteriertes Trihydroxysphinginin **163** und dessen DNP-Derivat **164**.

### 3.2.3.2 Massenspektrometrische Untersuchung des Sphingolipidmusters

Neben dem als Hauptkomponente auftretenden markierten DNP-Sphinginin (**166**) (85%) lässt sich das um eine  $C_2$ -Einheit verlängerte  $C_{20}$ -Sphinginin (**168**) (6%) nachweisen. Dementsprechend finden sich mit DNP-Sphingosin (**165**) (7%) und  $C_{20}$ -Sphingenin (**167**) (1%) zwei DNP-Sphingenine, die durch Desaturierung gebildet werden. Bei etwas kürzerer Retentionszeit ist darüber hinaus ein Peak zu beobachten, der aufgrund seines Massenspektrums als DNP-Trihydroxysphinginin (**164**) identifiziert werden konnte. Dieses  $C_{18}$ -Phytosphinginin (**164**) macht ebenfalls etwa 1 % des Gesamtgehalts aller DNP-Derivate aus.

Von allen Verbindungen erhält man unter negativ ESI-MS-Bedingungen<sup>i</sup> Spektren, die intensive  $[M-H]^-$ -Ionen zeigen (siehe Abbildung 73). Dementsprechend zeigt das Spektrum der DNP-Sphinganinefraktion ein intensives Ion bei  $m/z$  470 für das isotopenmarkierte DNP-Sphingalin (**166**) und ein weniger intensives Pseudomolekülion bei  $m/z$  466, welches dem DNP-derivatisierten natürlichen Sphingalin ( $^1\text{H-166}$ ) entspricht. Der Anteil an isotopenmarkiertem Sphingalin beträgt ca. 60 % und belegt den sehr guten Einbau der verfütterten Palmitinsäure **31**.

Das Massenspektrum der DNP-Sphinganinefraktion zeigt zwei intensive Pseudomolekülionen bei  $m/z$  464 bzw.  $m/z$  467. Während das Ion mit der kleineren Massenzahl dem in den Hefen natürlich enthaltenem Sphingalin entspricht, kann das Ion bei  $m/z$  467 einem dreifach deuteriumsubstituierten Sphingalin (**165**) zugeordnet werden. Demnach verläuft die Desaturierung von  $[^2\text{H}_4]\text{-166}$  unter Verlust dreier Masseneinheiten, also dem Verlust eines Deuteriumatoms und eines Wasserstoffatoms. Da die Deuteriumatome an C(6) nicht von der Desaturierung betroffen sind, muss die Abspaltung des Deuteriumatoms von C(4) oder C(5) des deuterierten Sphingalins stattgefunden haben. In jedem Fall ist der Verlust eines Deuteriumatoms von einer dieser Positionen gemeinsam mit einem Wasserstoff von der benachbarten Position nur mit einem *syn*-Eliminierungsmechanismus vereinbar.



**Abbildung 73:** Massenspektrometrische Analyse von  $[^2\text{H}_4]\text{-DNP}$ -Sphingalin (**166**) und dessen Desaturierungsprodukt **165**.

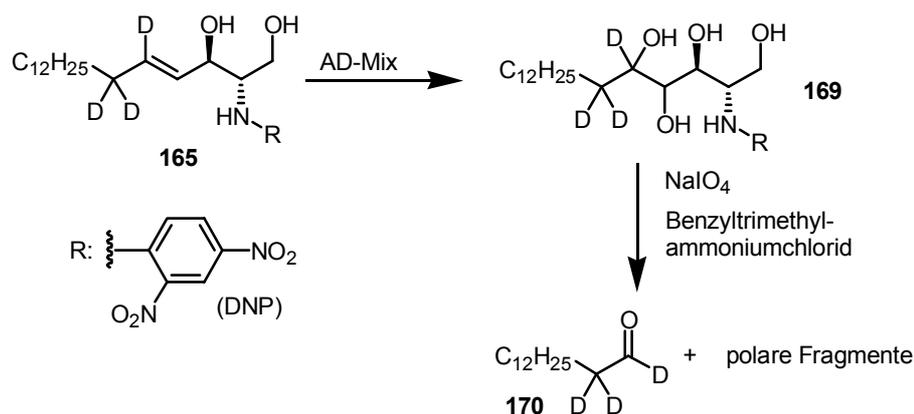
In Untersuchungen einer  $\Delta^4$ -Dihydroceramid-desaturase aus Rattenlebermikrosomen konnte bereits gezeigt werden, dass die Abstraktion eines Deuteriumatoms von C(4) mit einem großen kinetischen Isotopeneffekt behaftet ist.<sup>[190]</sup> Der Verlust eines Deuteriums von C(5)

<sup>i</sup> Es wurden dieselben Parameter wie bei der Untersuchung der Sonnenblumendesaturase verwendet.

erfolgt hingegen ohne kinetischen Isotopeneffekt. Vergleicht man die beiden Massenspektren in Abbildung 73 so fällt auf, dass das Verhältnis von deuterierten zu nichtdeuterierten DNP-derivatisierten Produkten wegen des kinetischen Isotopeneffekts an C(4) <sup>[190]</sup> auf nahezu 1:1 abgenommen hat. Aus diesem Befund könnte man schließen, dass die Desaturierung von **166** mit dem Verlust des Deuteriums von C(4) einhergeht. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die DNP-Sphingeninfraktion oxidativ gespalten, weil sich auf diese Weise das verbliebene Deuterium an der Doppelbindung eindeutig lokalisieren lässt.

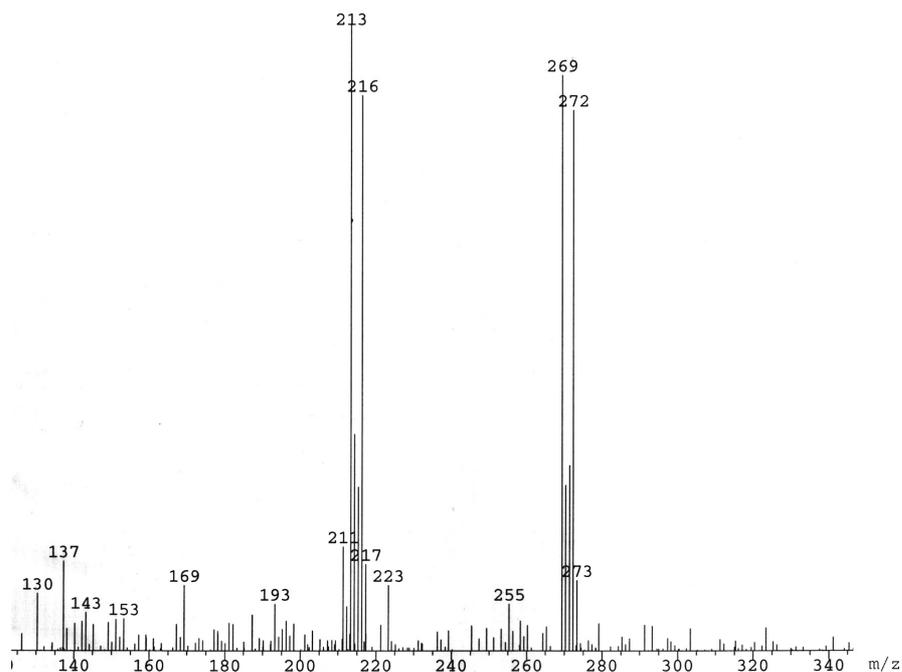
### 3.2.3.2.1 Bestimmung der absoluten Stereochemie

Zur Bestimmung der in **165** verbliebenen Deuteriumatome konnte das für den Abbau von (8*E*)-Phytosphingenin (**127**) ausgearbeitete Protokoll übernommen werden (siehe Kapitel 3.2.2.1.2). Zu diesem Zweck wurde die DNP-Sphingeninfraktion mittels HPLC isoliert, mit AD-Mix dihydroxyliert und unter Phasentransferbedingungen mit Natriumperodat gespalten (siehe Abbildung 74). Das Spaltprodukt Tetradecanal wurde anschliessend per GC/MS auf seinen Gehalt an Deuterium untersucht.



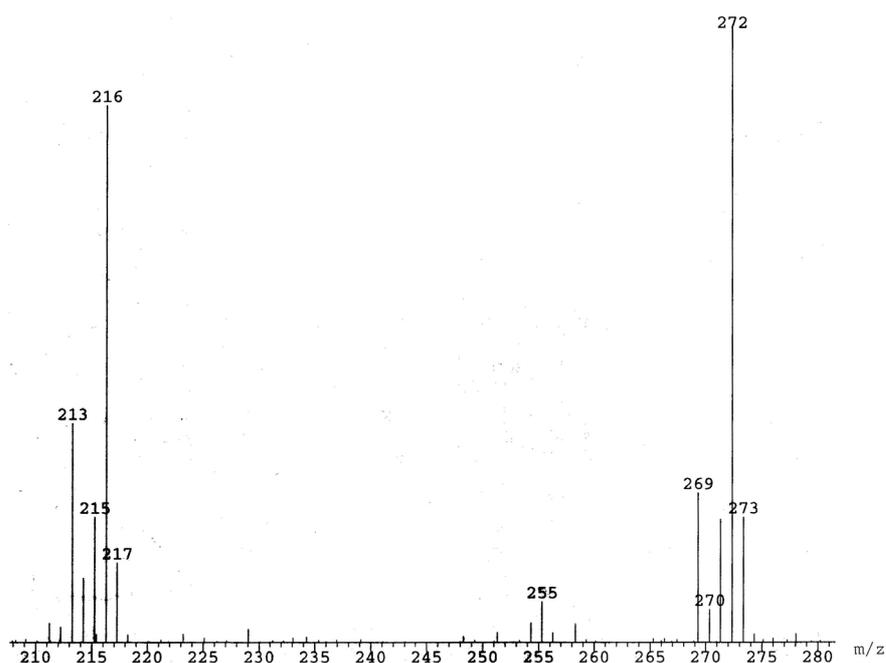
**Abbildung 74:** Oxidativer Abbau von **165**.

Das Massenspektrum aus dem Abbau der DNP-Sphingeninfraktion weist intensive Ionen bei  $m/z$  213,  $m/z$  216 sowie intensive Addukte mit dem Cl-Gas Isobutan bei  $m/z$  269 und  $m/z$  272 auf. Das Ionenpaar  $m/z$  213/269 entspricht unmarkiertem Tetradecanal, welches aus dem Abbau des in der Probe enthaltenen natürlichen DNP-Sphingenins stammt. Das Ionenpaar  $m/z$  216/272 kann einem dreifach deuterierten Tetradecanalfragment **170** zugeordnet werden und entstammt der oxidativen Spaltung des isotopenmarkierten DNP-Sphingenins **165** (siehe Abbildung 75).



**Abbildung 75:** Massenspektrum von [ $^2\text{H}_3$ ]-Tetradecanal (**170**) aus der oxidativen Spaltung von **169** in Wasser.

Es fällt jedoch auf, dass das Ion bei  $m/z$  272 von zwei signifikanten Ionen bei  $m/z$  271 und 270 begleitet wird, die einem dideutierten bzw. einem monodeutierten Tetradecanalfragment entsprechen. Wiederholte Messungen der präparierten Probe über einen Zeitraum von 24 Stunden zeigten darüber hinaus, dass der Anteil der beiden Isotopomeren steigt, während die Intensität des Ions bei  $m/z$  272 kontinuierlich sinkt. Im Gegensatz dazu führt ein oxidativer Abbau der DNP-Sphingeninfraktion in  $\text{D}_2\text{O}$  zu einer deutlichen Zunahme des dideutierten Spaltprodukts (siehe Abbildung 76).



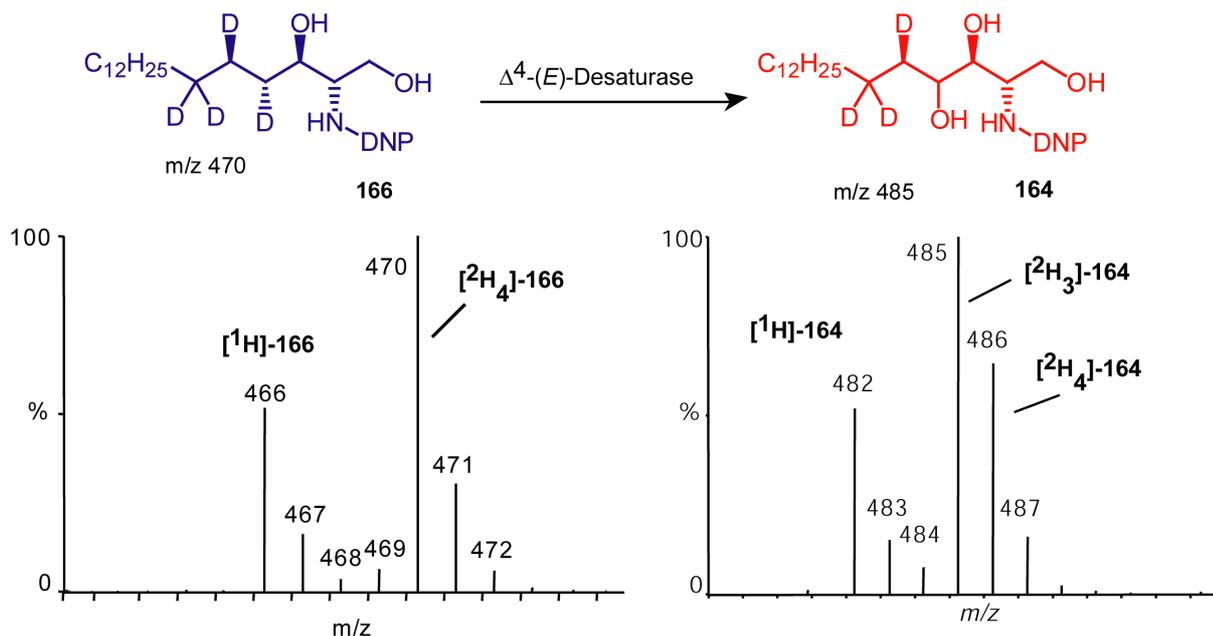
**Abbildung 76:** Massenspektrum von [ $^2\text{H}_3$ ]-Tetradecanal aus der oxidativen Spaltung von **169** in  $\text{D}_2\text{O}$ .

Diese Untersuchungen zeigen damit eindeutig, dass unter den experimentellen Bedingungen ein langsamer Austausch der C-H-aciden  $\alpha$ -Protonen stattfindet. Der Anteil von mono- und dideuteriertem Tetradecanal entstammt damit nicht unmittelbar der oxidativen Spaltung, sondern ist das Produkt dieser Folgereaktion.

Das nach der Desaturierung verbliebene Deuterium kann somit der Position C(5) zugeordnet werden. Die Bildung der  $\Delta^4$ -(*E*)-Doppelbindung durch die Dihydroceramiddesaturase aus *C. albicans* erfolgt als *syn*-Eliminierung durch Verlust des C(4)-H<sub>R</sub> und des C(5)-H<sub>S</sub> (siehe Abbildung 73).

### 3.2.3.3 Stereoselektivität der Hydroxylierung von Dihydroceramid

*S. cerevisiae*-Kulturen der *sur2* $\Delta$ -Mutante, die lediglich einen Leervektor exprimieren, sind nicht in der Lage, Phytosphingarin zu produzieren.<sup>[193]</sup> Im Gegensatz dazu erzeugt dieselbe Mutante, wenn sie das Gen der Dihydroceramiddesaturase aus *C. albicans* überexprimiert, neben Sphingosin **162** auch etwa 7 % von C<sub>18</sub>-Phytosphingarin **163** (siehe Abbildung 72). Offensichtlich ist die Hydroxylierung von Dihydroceramid an den Desaturierungsprozess gekoppelt.



**Abbildung 77:** Massenspektrometrische Analyse von [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-DNP-Sphingarin (**166**) und dem als Nebenprodukt der Desaturierung gebildeten DNP-Trihydroxysphingarin (**164**).

Das ESI-Massenspektrum der Phytosphingarinfraktion **164** weist ein intensives Ion bei *m/z* 482, entsprechend dem natürlichen Gehalt an unmarkiertem Phytosphingarin, auf (siehe Abbildung 77). Daneben zeigt das Massenspektrum zwei Pseudomolekülionen bei *m/z* 485 und 486 für dreifach- und vierfach isotopenmarkiertes Phytosphingarin, welches durch Hydroxylierung von [4,5,6,6-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dihydroceramid (**161**) entsteht. Nach Korrektur um den <sup>13</sup>C-Satelliten von *m/z* 485 ergibt sich ein Verhältnis von [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- zu [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Phytosphingarin von

1:0,6. Die Hydroxylierung von **161** erfolgt somit zwar unter bevorzugtem, nicht aber vollständigen Verlust des Deuteriumatoms von C(4).<sup>j</sup> Die Abspaltung des C(4)-H<sub>R</sub> ist in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zur Biosynthese von Phytosphinginin in der Hefe *Hansenula ciferi*.<sup>[192, 196]</sup> Hier wurde jedoch der fast vollständige Verlust einer enantioselektiv eingebrachten Isotopenmarkierung an C(4) beobachtet. Während die spezialisierte Hydroxylase in der Lage ist, das C(4)-H<sub>R</sub> mit nahezu vollständiger Enantioselektivität zu abstrahieren, gelingt dieses der  $\Delta^4$ -Desaturase nicht. Somit unterscheidet sich der Grad der Enantioselektivität maßgeblich, wenn die Hydroxylierung durch eine spezialisierte (C4)-Hydroxylase erfolgt oder aber als Nebenprodukt der Desaturierung entsteht. Es ist vorstellbar, dass im Falle der  $\Delta^4$ -Desaturase die Hydroxylierung aus einer etwas anderen Ausgangskonformation als die Desaturierung erfolgt und sich so die nur geringe Bevorzugung des C(4)-H<sub>R</sub> erklärt.

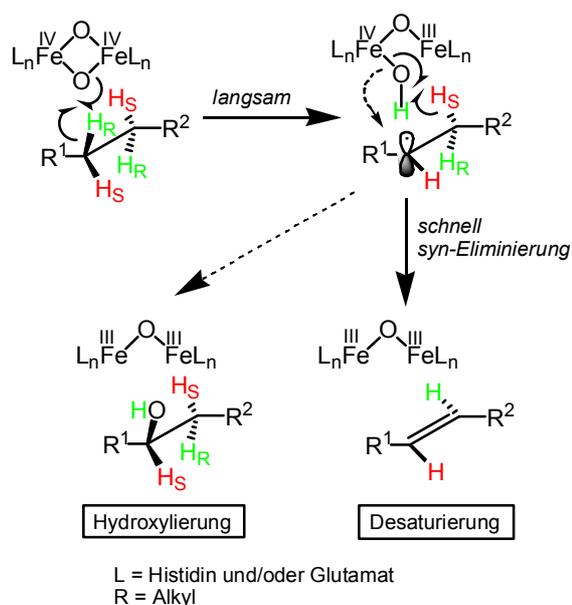
### 3.2.3.4 Zusammenfassung

Am Beispiel der Desaturase aus *Candida albicans* wurde der stereochemische Verlauf der Desaturierung von Dihydroceramid (**113**) zu Ceramid (**115**) exemplarisch untersucht. Wie alle bisher experimentell untersuchten Desaturasen generiert auch die Dihydroceramid-desaturase Doppelbindungen durch *syn*-Eliminierung von zwei benachbarten Wasserstoffatomen. Die Bildung von Ceramid (**115**) erfolgt dabei unter absoluter enantiofacialer Kontrolle durch Verlust des C(4)-H<sub>R</sub> und des C(5)-H<sub>S</sub>. Damit sind die erhaltenen Ergebnisse in voller Übereinstimmung mit den *in vivo* Studien an Ratten von Stoffel *et al.*.<sup>[191]</sup>

Das mechanistische Bild der Desaturierung wird durch Untersuchungen von Buist *et al.* zur Kryptoregiochemie einer  $\Delta^4$ -Dihydroceramid-desaturase aus Rattenlebermikrosomen ergänzt.<sup>[190]</sup> Der Trend eines hohen KIE ( $k_H/k_D \sim 8$ ) für die Abstraktion des Wasserstoffatoms von C(4) und eines vernachlässigbaren KIE für die Abstraktion des Wasserstoffatoms von C(5) kann als beweiskräftig für einen zweistufigen Mechanismus angesehen werden. Demnach sollte ein initialer Angriff an C(4) zum Verlust des C(4)-H<sub>R</sub> und zur Bildung eines kurzlebigen Intermediats führen. Durch schnelle Übertragung eines weiteren Wasserstoffatoms von C(5) auf das Dieisenzentrum wird die reaktive Zwischenstufe deaktiviert. Dabei kommt es zur Ausbildung der Doppelbindung und zur Freisetzung von Wasser.

---

<sup>j</sup> Prinzipiell ist es vorstellbar, dass neben an C(4) hydroxyliertem Sphinginin weitere Positionsisomere auftreten und sich so der Verbleib aller vier Deuteriumatome erklärt. Um dies auszuschließen, wurde eine Sphingolipidprobe mit 10  $\mu$ l einer gesättigten wässrigen Natriumperiodatlösung behandelt und per HPLC/UV vermessen. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Natriumperiodat zu einem vollständigen Verschwinden des DNP-Phytosphingininpeaks, entsprechend einer quantitativen Spaltung des Extrakts, führt. Im Vergleich dazu bleiben alle anderen Sphingobasen von der Behandlung mit Natriumperiodat unbeeinflusst. Somit handelt es sich bei dem Hydroxylierungsprodukt einheitlich um 4-Hydroxysphinginin (Phytosphinginin) **116**.



**Abbildung 78:** Mechanismus der Desaturierung und Hydroxylierung durch Desaturasen.

Das untersuchte Enzym aus *Candida albicans* ist also nicht nur in der Lage, Dihydroceramid zu desaturieren, sondern in geringerem Maß auch zu hydroxylieren (siehe Abbildung 78). Man kann diese Hydroxylierung an C(4) als eine fehlgeleitete Desaturierung verstehen. Dabei sind zwei Fälle zu unterscheiden.

Betrachtet man den ersten Fall, bei dem Desaturierung und Hydroxylierung unter Verlust des C(4)-H<sub>R</sub> verlaufen, kann man eine gemeinsame Zwischenstufe annehmen. Der Verlust eines Wasserstoffatoms von C(5) führt dann zum Hauptprodukt Ceramid (**165**) (93 %), während eine Rückbindung der an den Eisenkomplex gebundenen Hydroxylgruppe zum Hydroxylierungsprodukt (**164**) (7%) führt. Ob eine solche Rückbindung streng stereokontrolliert verläuft und somit Desaturierung und Hydroxylierung ausgehend von der Zwischenstufe, wie in Abbildung 78 gezeigt, von derselben Seite erfolgen, muss in Zukunft gezeigt werden. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, dass die Hydroxylierung durch Rückbindung der eisengebundenen Hydroxylgruppe erfolgt und somit faktisch der Insertion eines Sauerstoffatoms aus der Luft in die C-H-Bindung entspricht, da Kulmacz *et al.* den Einbau von <sup>18</sup>O<sub>2</sub> bei der Hydroxylierung von Dihydroceramid nachweisen konnten. <sup>[197]</sup>

Betrachtet man den zweiten Fall, bei dem die Hydroxylierung unter Verlust des C(4)-H<sub>S</sub> verläuft, kann man nicht mehr eine gemeinsame Zwischenstufe postulieren, da die Desaturierung ausschließlich unter Verlust des C(4)-H<sub>R</sub> erfolgt. Zwangsweise müssen Desaturierung und Hydroxylierung in diesem Fall aus unterschiedlichen Ausgangskonformationen erfolgen. Dieser Befund stellt damit einen direkten Beweis dar, dass es sich bei diesem Hydroxylierungsprodukt nicht um eine Zwischenstufe auf dem Weg zum Desaturierungsprodukt, sondern vielmehr um ein Nebenprodukt handelt (vgl. Einleitung 1.6).

Versucht man die experimentellen Ergebnisse in einem mechanistischen Modell zu erfassen, erscheint es plausibel, für den Hydroxylierungs- und Desaturierungsweg eine etwas andere Positionierung von Substrat und aktivem Zentrum anzunehmen. Im Fall der Desaturierung wird in einem ersten Schritt vollständig stereokontrolliert das C(4)-H<sub>R</sub> entfernt. Die kurzlebige Zwischenstufe reagiert dann in einem schnellen Folgeschritt unter Verlust des C(5)-H<sub>S</sub> zum Olefin. Bei der Hydroxylierung kann, durch die etwas andere Positionierung, sowohl das C(4)-H<sub>R</sub> als auch das weniger bevorzugte C(4)-H<sub>S</sub> entfernt werden. In beiden Fällen würde ein Intermediat entstehen, welches nicht auf dem üblichen Desaturierungsweg weiterreagieren kann, weil möglicherweise die radikalische Spezies und eisengebundene Hydroxygruppe nicht weit genug voneinander entfernt sind, um eine Rückübertragung der Hydroxygruppe zu unterbinden. Das Modell einer mangelhaften Substratkontrolle wird durch Untersuchungen einer  $\Delta^9$ -Stearoyl-Desaturase aus *Arabidopsis thaliana* bestätigt. <sup>[189]</sup> Dort führt bereits der Austausch von lediglich vier Aminosäuren dazu, dass dieses Enzym auch als Hydroxylase fungiert. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine  $\Delta^{12}$ -Desaturase durch punktgerichtete Mutationsversuche erhalten. <sup>[198]</sup> Diese mechanistische Vorstellung von Hydroxylierung und Desaturierung wird durch das komplementäre Verhalten der löslichen Methanmonooxygenase (sMMO) untermauert. Die Umsetzung des nicht natürlichen Substrats Ethylbenzen mit sMMO führt neben den hydroxylierten Produkten Phenylethanol und Ethylphenol zu dem Desaturierungsprodukt Styren. <sup>[199, 200]</sup> Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass immer mehr experimentelle Ergebnisse darauf hindeuten, dass man die Hydroxylierung und Desaturierung durch nicht Häm-Eisenproteine als mechanistisch eng miteinander verwandte Prozesse auffassen muss. <sup>[49, 50, 189, 201]</sup>

### 3.3 Mechanistische Untersuchung einer $\Delta^6$ -(E)-Fettsäuredesaturase aus dem Wilden Seidenspinner *Antheraea polyphemus*

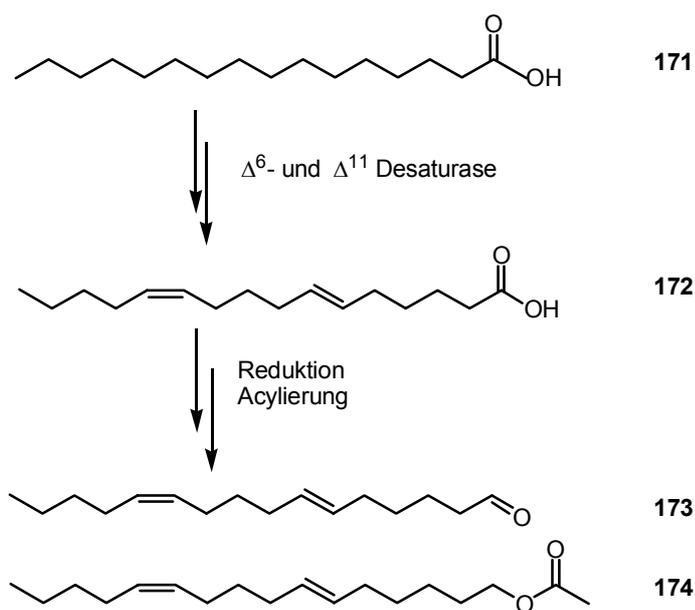
Im Gegensatz zu tagaktiven Schmetterlingen sind nachtaktive Schmetterlinge, d.h. Motten, nur eingeschränkt in der Lage, optische Reize zu ihrer Orientierung zu nutzen. Aus diesem Grund sind sie, um z. B. Nahrungsquellen zu finden, viel mehr auf „Gerüche“ angewiesen. Im Laufe der Evolution haben sie zudem ein ausgefeiltes System entwickelt, mit dem es ihnen unter Verwendung von chemischen Signalstoffen, so genannten Pheromonen (griech.: pherein = tragen, horman = anregen), gelingt, miteinander zu interagieren.



Die Entdeckung, dass Insekten miteinander kommunizieren, reicht mehr als einhundert Jahre zurück. Zu dieser Zeit wurde wiederholt beobachtet, dass männliche Motte durch ihre weiblichen Artgenossen angelockt werden. Schnell war klar, dass hierfür eine bis dato unbekannte Kraft verantwortlich sein musste, da männliche Insekten auch angelockt wurden, wenn sie die Weibchen nicht sehen konnten. Lange Zeit glaubte man deshalb, dass die Weibchen eine unsichtbare Strahlung, wie z.B. Infrarotstrahlung, aussenden und die Männchen in der Lage sind, diese zu empfangen. Erst um 1930 kam es zu wiederholten Beobachtungen, dass auch die Extrakte weiblicher Insekten die Männchen anlocken können. Geleitet von der Idee, dass möglicherweise chemische Verbindungen als Botenstoffe fungieren, machte sich der deutsche Chemiker Adolf Butenandt daran, diese Lockstoffe zu isolieren. Nach mehr als 20 Jahren intensiver Suche konnte Butenandt 1959 aus 500.000 weiblichen Seidenspinnern (*Bombyx mori*) letztlich 12 mg einer Substanz isolieren, die er auf den Namen Bombykol taufte und bei der es sich chemisch gesehen um (10E,12Z)-Hexadeca-10,12-dienol handelt (8).<sup>[202]</sup> Die Entdeckung von Bombykol (8) gilt heute als Meilenstein der Naturstoffforschung und ist Grundlage eines ganzen Forschungszweiges, der sich der chemischen Sprache von Insekten widmet. Ein Großteil des Wissens über die Aussendung der Pheromone durch die Weibchen sowie der Wahrnehmung und die Signalverarbeitung durch die Männchen basiert dabei auf Arbeiten mit dem domestizierten Seidenspinner *Bombyx mori* und dem Wilden Seidenspinner *Antheraea polyphemus*.<sup>[203]</sup> Vergleichsweise wenig ist hingegen über die Biosynthese der Pheromone in diesen Spezies bekannt.

Bei einem Großteil der heute etwa 1600 bekannten Pheromone handelt es sich um Sexualpheromone von nachtaktiven Schmetterlingen (*Lepidoptera*). Bei diesen Pheromonen

handelt es sich meist um Aldehyde, Alkohole oder Acetate, die von Fettsäuren abgeleitet sind und deren Architektur charakteristischen Bauprinzipien folgt. [7] Mit Hilfe von Desaturasen gelingt es den Schmetterlingen, positionsspezifisch (*E*)- oder (*Z*)-Doppelbindungen in die Alkylkette von Fettsäuren einzuführen. In Verbindung mit kettenverlängernden und – verkürzenden Schritten kann so eine individuelle Signatur des Kohlenstoffgerüsts erzeugt werden. Vor diesem Hintergrund lässt sich ein Biosyntheseweg der Hauptkomponenten des Pheromonbouquets von *Antheraea polyphemus* postulieren, der die Beteiligung einer  $\Delta^{11}$ - (*Z*)-Desaturase und einer  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase einschließt (siehe Abbildung 79).



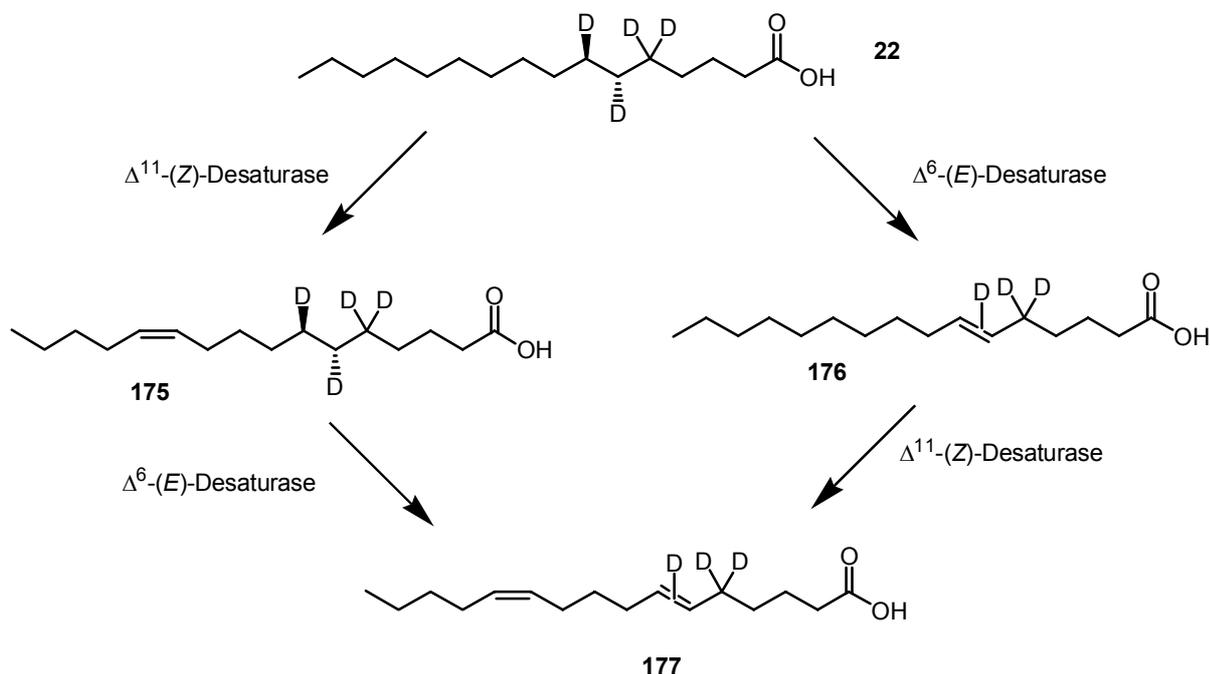
**Abbildung 79:** Mögliche Biosynthese der Sexualpheromone des Wilden Seidenspinners *Antheraea polyphemus*. Die Doppelbindungen werden entweder in die lipid- oder CoA-gebundenen Fettsäuren eingeführt.

Desaturasen, die stereoselektiv (*E*)-Doppelbindungen erzeugen, sind im Vergleich zu (*Z*)-selektiven Desaturasen rar und aus diesem Grund bisher mechanistisch wenig untersucht. Bis heute existiert lediglich eine Arbeit zum Mechanismus einer (*E*)-selektiven  $\Delta^{11}$ -Desaturase aus *Spodoptera littoralis*. [69]

Obwohl *A. polyphemus* der Pheromonforschung als Modellorganismus dient, ist die Biosynthese seiner Pheromone nicht vollständig geklärt. Aus diesem Grund wurde die Biosynthese von (6*E*,11*Z*)-Hexadeca-6,11-diensäure (**172**) unter besonderer Beachtung der mechanistischen Details der vermuteten  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase untersucht.

### 3.3.1 Stereochemische Untersuchung der $\Delta^6$ -(E)-Desaturase aus *A. polyphemus*

Die Biosynthese von (6E,11Z)-Hexadeca-6,11-diensäure (**172**) bzw. deren CoA-Ester sollte durch eine Einführung der Doppelbindungen in  $\Delta^{11}$ - und  $\Delta^6$ -Position von Palmitinsäure (**171**) erfolgen. Welche der beiden Doppelbindungen zuerst gebildet wird, ist nicht bekannt, so dass zwei mögliche Biosynthesewege in Frage kommen (siehe Abbildung 80). Unter Verwendung von an C(6) und C(7) enantiospezifisch deuterierter Palmitinsäure **22** sollte es möglich sein sowohl den Mechanismus der ungewöhnlichen (E)-Desaturase zu untersuchen als auch die Sequenz der Desaturierungsschritte aufzuklären.

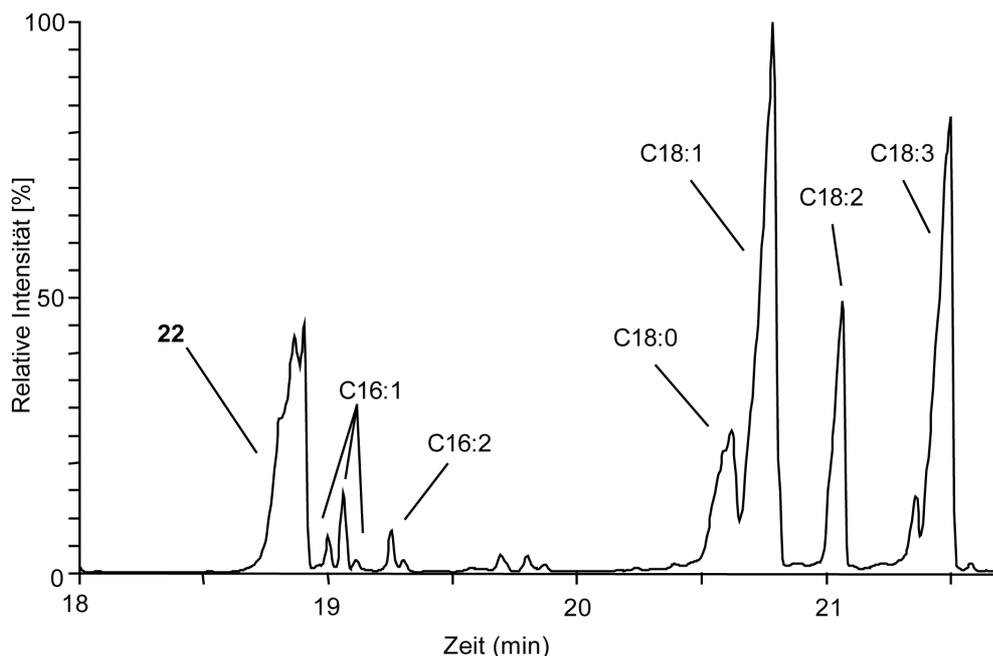


**Abbildung 80:** Durch massenspektrometrische Untersuchung der Metabolite sollte sich die Sequenz der Desaturierungen und der Mechanismus der  $\Delta^6$ -(E)-Desaturase aufklären lassen.

Versuche, die  $\Delta^6$ -(E)-Desaturase des Wilden Seidenspinners (*Antheraea polyphemus*) zu klonieren, sind im Arbeitskreis von Prof. Heinz (Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg) und im Arbeitskreis von Prof. Feussner (Universität Göttingen) bisher erfolglos geblieben. Daher mussten die nachfolgenden Experimente mit Pheromondrüsen von *A. polyphemus* durchgeführt werden. Hierzu wurden ca. zwei Tage alte weibliche Tiere zunächst mit CO<sub>2</sub> betäubt. Ein vorsichtiges Drücken an beiden Seiten des Körpers bewirkt, dass die Pheromondrüse der Weibchen ausgestülpt wird. Die Intersegmentalmembran<sup>k</sup> der so exponierten Drüse wurde dann mit Hilfe einer Mikroliterspritze mit einer Lösung der

<sup>k</sup> Anatomisch werden Insekten in Segmente unterteilt. Die Freisetzung der Pheromone erfolgt über eine gelblich schimmernde Membran, die die beiden letzten Segmente des Körpers miteinander verbindet.

Palmitinsäure<sup>1</sup> benetzt. In Abständen von jeweils einer Stunde wurde diese Prozedur dreimal wiederholt. Die inkubierten Pheromondrüsen wurden nach 5 Stunden entfernt und über Nacht bei -20 °C mit Chloroform/Methanol (v:v, 2:1) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden basisch hydrolysiert und die so erhaltenen freien Fettsäuren wurden mit Diazomethan in die Methylester überführt. Die Fettsäuremethylester wurden an einer DB 225ms-GC-Säule (J&W Scientific) aufgetrennt und massenspektrometrisch charakterisiert (siehe Abbildung 81).

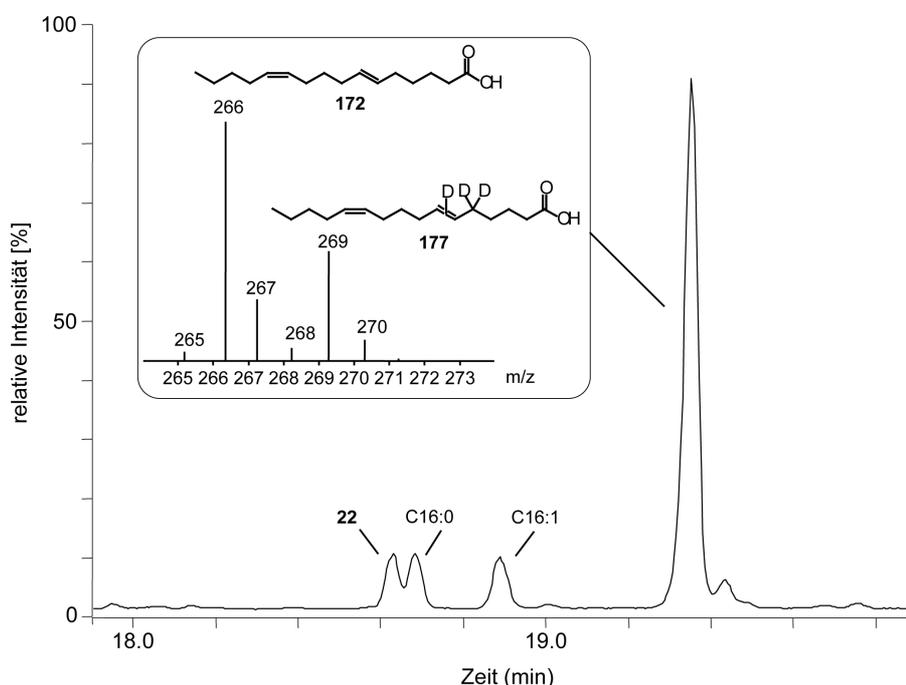


**Abbildung 81:** Gaschromatogramm der Fettsäuremethylester inkubierter Pheromondrüsen.

Bei den Fettsäuren, die in höchster Konzentration in den Drüsen vertreten waren, handelt es sich um C<sub>18</sub>-Fettsäuren. Hierzu zählen Stearinsäure (C18:0), einfach ungesättigte Fettsäuren, wie Ölsäure (C18:1), und mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Linol- und Linolensäure (C18:2<sup>A9,12</sup> und C18:3<sup>A9,12,15</sup>). Neben diesen dominanten Fettsäuren enthalten die extrahierten Drüsen größere Mengen der applizierten deuterierten Palmitinsäure **22**. Im Gegensatz zu den bereits genannten Fettsäuren treten die Intermediate der Pheromonbiosynthese, die C<sub>16</sub>-Monoen- und C<sub>16</sub>-Dienfettsäuren (C16:1 und C16:2), nur im Spurenbereich auf. Zwar konnte innerhalb dieses Bereichs eine deuteriummarkierte Hexadecensäure nachgewiesen werden, eine sichere Bestimmung der Anzahl an Deuteriumatomen war aufgrund der geringen Menge jedoch nicht möglich. Wie an den überladenen Signalen des in Abbildung 81 gezeigten Chromatogramms ersichtlich ist, wurden bereits erhebliche Mengen an Methylestern für die Analyse injiziert. Eine Erhöhung

<sup>1</sup> Es wurde eine 20 mg/ml Lösung von (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Palmitinsäure (**22**) in DMSO/Ethanol/Wasser (v:v:v, 70:20:10) eingesetzt.

der Injektionsmenge hat lediglich zur Folge, dass die Signale der ungesättigten C<sub>16</sub>-Fettsäuren von dem Palmitinsäurepeak überlagert werden. Um dennoch größere Mengen an C<sub>16</sub>-Diensäuren für die Analyse verwenden zu können, wurde der Drüsenextrakt per DC vorgereinigt. Hierzu wurden DC-Platten (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) verwendet, die zuvor mit einer 10 %igen Lösung von Silbernitrat in Acetonitril getränkt und 1 Stunde bei 80 °C im Dunklen getrocknet wurden. An solchen DC-Platten werden Fettsäuremethylester nach der Anzahl der Doppelbindungen getrennt, da die Doppelbindungen ungesättigter Kohlenwasserstoffe unterschiedlich stark mit den Silberionen wechselwirken. [204, 205] Nach erfolgter Trennung wurden Banden von 0,5 cm Breite von den DC Platten abgekratzt und mit Chloroform extrahiert. Die einzelnen Chloroformextrakte wurden separat per GC/MS analysiert.

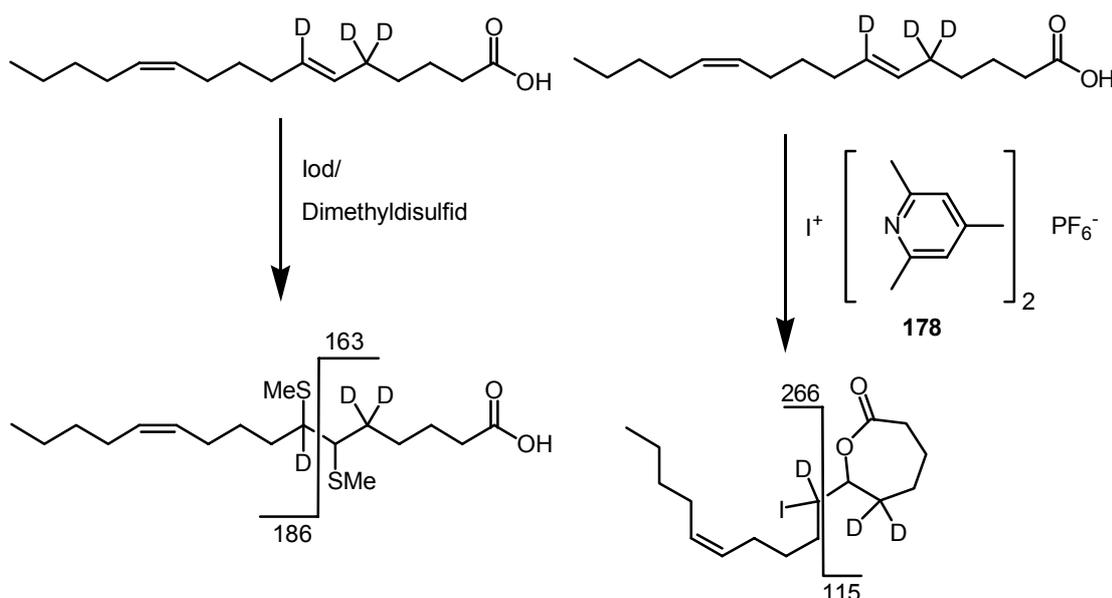


**Abbildung 82:** Gaschromatogramm einer dünnenschichtchromatographisch vorgereinigten Fraktion aus dem Extrakt von Pheromondrüsen, die zuvor mit der chiralen Palmitinsäure **22** inkubiert wurden. Das Massenspektrum lässt darauf schließen, dass die  $\Delta^6$ -Doppelbindung durch *syn*-Eliminierung entsteht.

Durch die Vorreinigung konnte eine Fraktion erhalten werden, in der die Palmitinsäure weitestgehend abgetrennt wurde und dementsprechend der Anteil an C<sub>16</sub>-Diensäuren nun deutlich angereichert war. Aus dem Massenspektrum ist zweifelsfrei ersichtlich, dass diese Fraktion [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecadiensäure **177** enthält. Diese Fettsäure wird damit durch Verlust je eines Wasserstoff- bzw. eines Deuteriumatoms von C(6)- und C(7) der applizierten deuterierten Palmitinsäure gebildet, während die Kontrollmarkierung an C(5) erhalten bleibt. Somit handelt es sich bei der Einführung der  $\Delta^6$ -Doppelbindung durch die  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase um eine *syn*-Eliminierung. Einschränkend muss erwähnt werden, dass diese Aussage nur

zutrifft, sofern keine Isomerase eine mögliche  $\Delta^6$ -(Z)-Doppelbindung in eine (E)-Doppelbindung umwandelt.

Untersuchungen zur absoluten Stereokontrolle der Desaturierung stehen noch aus. Hierzu bedarf es der Lokalisierung des verbliebenen Deuteriumatoms an der Doppelbindung. Generell würde sich eine Derivatisierung der Fettsäure mit Dimethyldisulfid (DMDS) anbieten. Dimethyldisulfid addiert in Gegenwart von Iod bereitwillig an Doppelbindungen und liefert Produkte, die über eine massenspektrometrische Sollbruchstelle verfügen (siehe Abbildung 83).<sup>[183]</sup> Anhand der Fragmentationen im Massenspektrum wäre so eine Zuordnung des verbliebenen Deuteriums an C(6) bzw. C(7) möglich. Im Fall der (6E,11Z)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadeca-6,11-diensäure (**177**) ist hingegen der Erfolg dieser Methode äußerst fragwürdig. Da die Biosynthese von **172** ausgehend von **22** insgesamt zwei Desaturaseschritte erfordert, liegen die erzielten Einbauraten lediglich im Promillebereich.<sup>m</sup> Hinzu kommt, dass die Derivatisierung ein Gemisch zweier DMDS-Monoadditionsprodukte und eines DMDS-Diadditionsproduktes liefern würde.



**Abbildung 83:** Konzept der Derivatisierung mit Dimethyldisulfid (**links**) und der Iodlactonisierung (**rechts**). Die Massenspektren beider Derivate zeigen charakteristische Fragmentationen, die eine Lokalisierung des verbliebenen Deuteriums an der Doppelbindung erlauben sollten. Gezeigt ist der Fall, bei dem sich das verbliebene Deuterium an Position C(7) befindet.

Es erschien daher sinnvoll, ein alternatives Protokoll auszuarbeiten, das auf dem Konzept der intramolekularen Iodlactonisierung der  $\Delta^6, \Delta^{11}$ -Hexadecadiensäure **177** beruht (siehe Abbildung 83). In der Regel zeigen Iodlactone Massenspektren mit intensiven

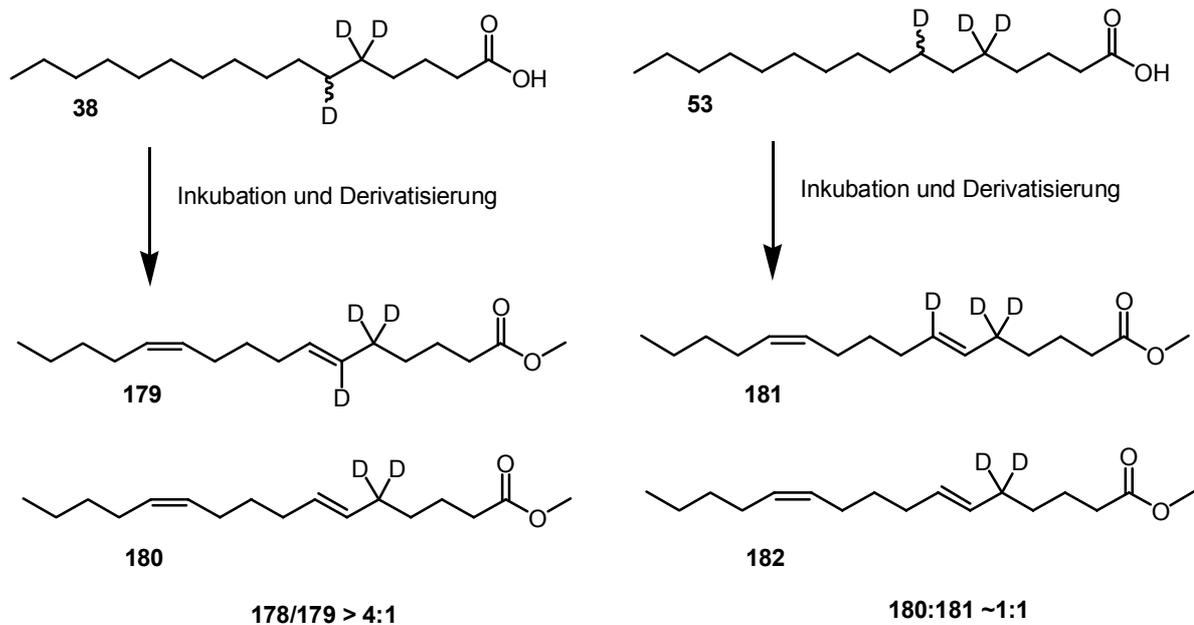
<sup>m</sup> Das Verhältnis von (6E,11Z)-Hexadeca-6,11-diensäure (**172**) zu (6E,11Z)-[<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadeca-6,11-diensäure (**177**) in Abbildung 82 spiegelt nicht die tatsächliche Einbaurate wider, da es sich nur um eine Teilfraktion handelt.

Fragmentionen, anhand derer sich das verbliebene Deuterium detektieren lassen sollte. Im Gegensatz zur klassischen Iodlactonisierung mit Iod/Kaliumiodid <sup>[206]</sup>, lassen sich 7-Ringlactone in guten Ausbeuten mit dem Reagenz **178** darstellen. <sup>[207, 208]</sup> Um die grundsätzliche Anwendbarkeit des Iodlactonisierungskonzepts zu prüfen und um eine entsprechende Referenz zur Verfügung zu haben, wurde synthetische (6*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**61**) mit dem Collidinkomplex **178** zum Iodlacton umgesetzt. Das Massenspektrum dieses Iodlactons zeigt ein charakteristisches, jedoch wenig intensives Fragmention bei *m/z* 113. Zukünftig bleibt zu prüfen, ob diese Methode empfindlich genug ist, um die Deuteriumatome der [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecadiensäure **177** in einer biologischen Probe zuordnen zu können.

### 3.3.2 Kryptoregiochemie der $\Delta^6$ -Desaturase aus *Antheraea polyphemus*

Um die Kryptoregiochemie der  $\Delta^6$ -Desaturase zu bestimmen, wurden Pheromondrüsen mit *rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Palmitinsäure (**38**) und *rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Palmitinsäure (**53**) inkubiert und aus der massenspektrometrischen Analyse der Desaturierungsprodukte kinetische Isotopeneffekte bestimmt (siehe Abbildung 84). Die Substrate wurden, wie oben beschrieben, den Pheromondrüsen der Seidenspinner appliziert. Nach analoger Aufarbeitung und Derivatisierung erfolgte die Analyse der gebildeten Hexadeca-6,11-diensäuremethylester (**179-182**) mittels GC/MS. Wegen des zu erwartenden kinetischen Isotopeneffekts werden die Fettsäuremethylester **179/180** und **181/182** in unterschiedlichen Mengen gebildet. Lediglich für den Deuteriumverlust an C(6) wird ein deutlicher KIE größer vier gefunden, während der Deuteriumverlust an C(7) ohne einen signifikanten KIE einhergeht.<sup>n</sup> Dieser Trend eines deutlichen und eines vernachlässigbaren KIE wird allgemein als Beweis für einen zweistufigen Mechanismus angesehen, wobei der hohe KIE den Ort der initialen Wasserstoffabspaltung angibt. Demnach erfolgt im Fall der  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase aus *A. polyphemus* die initiale Wasserstoffabspaltung an C(6). Eine Überprüfung der experimentellen KIE steht noch aus, da aus Mangel an weiblichen Tieren die Versuche bisher nur einmal durchgeführt werden konnten.

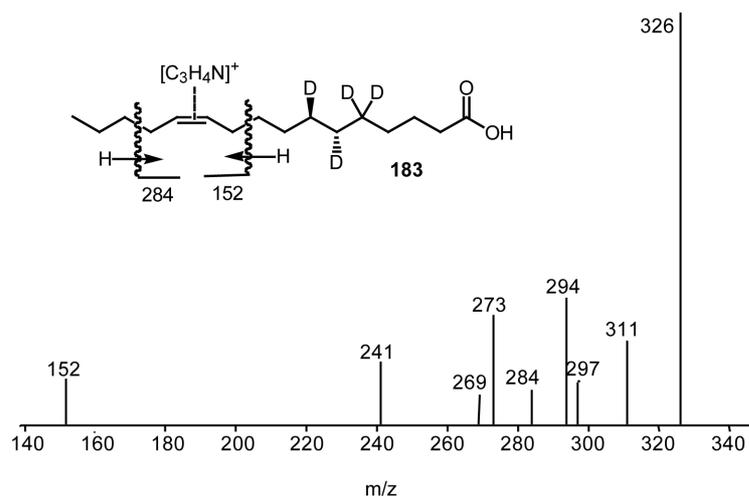
<sup>n</sup> Die Bestimmung der KIE ist mit einem großen Fehler behaftet. Durch die geringen Einbauraten der markierten Vorstufen bedingt, müssen die Intensitäten der [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Fettsäuremethylester um den [M+2]-Satelliten natürlicher (6*E*,11*Z*)-Hexadeca-6,11-diensäure korrigiert werden. Deutlich genauere Werte für die KIE sollten sich erzielen lassen, wenn solche Messungen an einem empfindlicheren Flugzeitmassenspektrometer durchgeführt werden.



**Abbildung 84:** Die Palmitinsäure **38** wird von den Pheromondrüsen zu einem ca. 4:1-Gemisch von **179** und **180**, entsprechend einem KIE von ca. 4, metabolisiert. Die Palmitinsäure **53** wird hingegen ohne signifikanten KIE in ein ca. 1:1-Gemisch von **181** und **182** überführt.

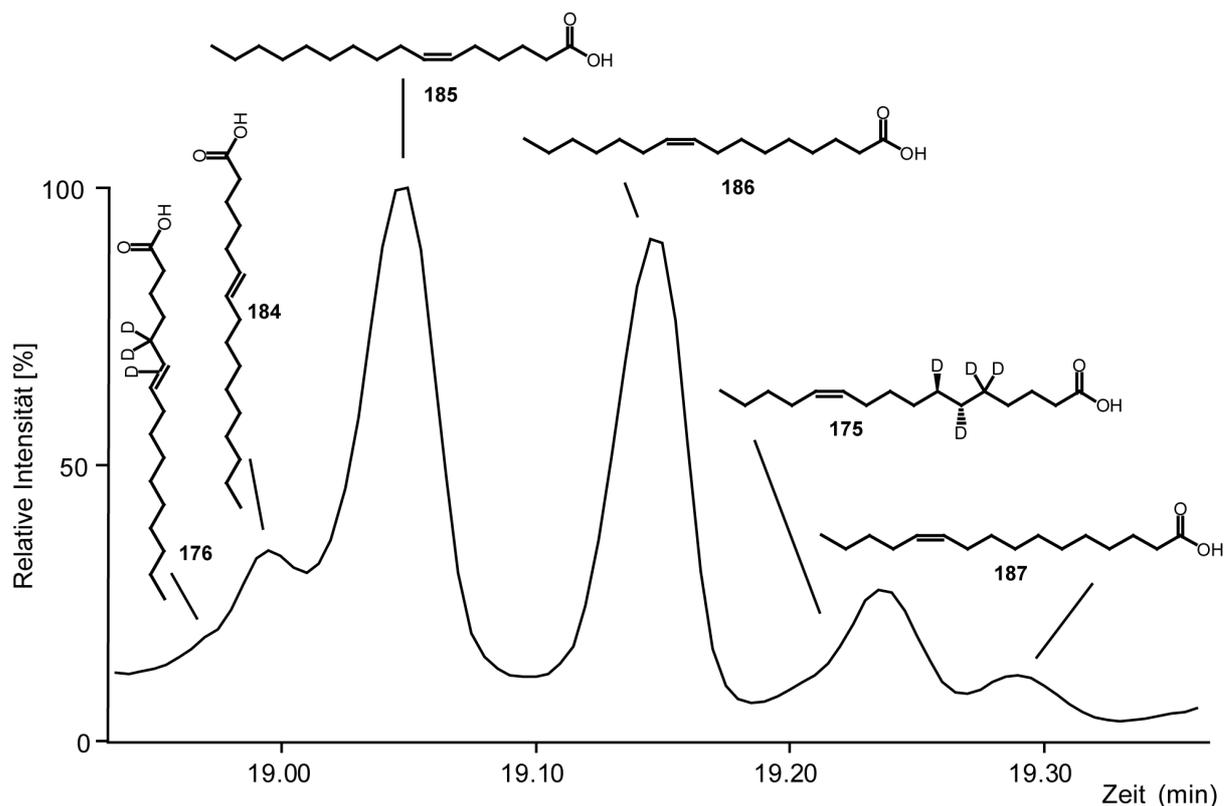
### 3.3.3 Studien zur Sequenz der Desaturierungsschritte

Um eine Aussage über die Reihenfolge der Desaturierungsschritte und damit zur Biosynthese von  $\Delta^6, \Delta^{11}$ -Hexadecadiensäure machen zu können, wurde das Fettsäureprofil nach deuteriummarkierten, einfach ungesättigten Fettsäuren durchsucht. In diesem Fall erfolgte die GC/MS-Untersuchung unter CI-Bedingungen, wobei Acetonitril als Ionisierungsgas eingesetzt wurde. Bei Verwendung von Acetonitril formen sich in der Ionisationskammer des Massenspektrometers Ionen der Summenformel  $[C_3H_4N]^+$ , die mit den Doppelbindungen der Fettsäuren Addukte bilden. Eine Fragmentierung dieser Addukte aus CI-Gas und Fettsäuremethylester liefert charakteristische Ionen, die eine Bestimmung der Doppelbindungsposition erlauben. <sup>[209]</sup> Mit Hilfe dieser MS-Methode konnte unter den verschiedenen  $C_{16}$ -Monoenfettsäuren die  $\Delta^{11}$ -ungesättigte  $[^2H_4]$ -Hexadecensäure **183** zweifelsfrei identifiziert werden. Das Massenspektrum dieser Verbindung zeigt neben einem intensiven Addukt bei  $m/z$  326 zwei charakteristische Fragmentationen bei  $m/z$  284 und  $m/z$  152, die durch eine Spaltung in allylischer Position zur  $\Delta^{11}$ -Doppelbindung entstehen (siehe Abbildung 85).



**Abbildung 85:** Massenspektrum von (6*R*,7*R*)-(11*Z*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadec-11-ensäuremethylester (**183**) unter CI-Bedingungen mit Acetonitril als Ionisierungsgas.

Die vollständige Zuordnung aller einfach ungesättigten C<sub>16</sub>-Fettsäuren im Extrakt ist in Abbildung 86 gezeigt. Neben dem deuteriumsubstituierten Methylester von **175** kann auch natürlicher Δ<sup>11</sup>-ungesättigter Hexadecensäuremethylester **187** sowie der Methylester von Palmitölsäure **186** eindeutig identifiziert werden. Mit Zweifeln behaftet ist hingegen die Identifizierung der drei früh eluierenden Verbindungen als Methylester von (6*E*)- und (6*Z*)-Hexadec-6-ensäure **176**, **184**, **185**. Beide Massenspektren zeigen zwar charakteristische Fragmentationen, die am ehesten eine Zuordnung der Doppelbindung zur Position Δ<sup>6</sup> erlauben würden, die aber im Vergleich zu den anderen Monoenfettsäuren wenig intensiv sind. Die Ionenspursuche des Ions mit der Massenzahl 329 zeigt, dass sich [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadec-6-ensäure **176** in der aufsteigenden Flanke von **184** befindet. Damit lassen sich neben isotopenmarkierter Δ<sup>11</sup>-Hexadecensäure **175** auch Spuren von deuterierter Δ<sup>6</sup>-Hexadecensäure **176** nachweisen. Derzeit lässt sich daher noch keine abschließende Aussage über die Reihenfolge von Δ<sup>6</sup>- und Δ<sup>11</sup>-Desaturierung bei der Biosynthese von (6*E*,11*Z*)-Hexadec-6,11-ensäure (**172**) treffen.



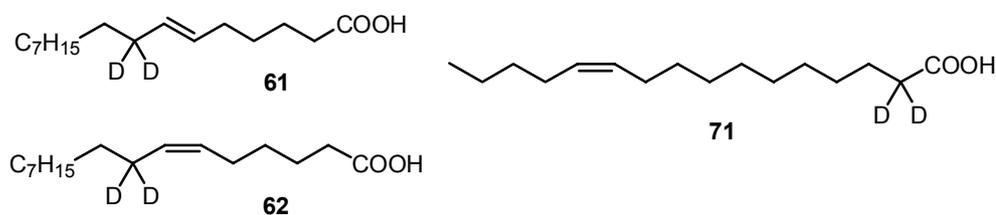
**Abbildung 86:** Das Gaschromatogramm zeigt das Fettsäuremethylesterprofil von Pheromondrüsen, die mit (6*R*,7*R*)-(5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>)-Palmitinsäure (**22**) inkubiert wurden. Die Zuordnung der Doppelbindungen erfolgte anhand charakteristischer Fragmentationen aus den CI-Spektren. Die Identifizierung von **176**, **184** und **185** ist nicht gesichert.

### 3.3.4 Zusammenfassung

Die Pheromonbiosynthese des Wilden Seidenspinners *Antheraea polyphemus* wurde durch Applikation von deuteriumsubstituierten Palmitinsäuren an Pheromondrüsen, gefolgt von massenspektrometrischer Charakterisierung der Metabolite, untersucht. Insbesondere konnten mechanistische Aspekte der an der Pheromonbiosynthese beteiligten  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase aufgeklärt werden. Die  $\Delta^6$ -Doppelbindung wird durch *syn*-Eliminierung zweier benachbarter Wasserstoffatome erzeugt, wobei der initiale Angriff an dem der polaren Kopfgruppe näheren Kohlenstoffzentrum C(6) erfolgt. Damit gleicht die  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase aus *A. polyphemus* in diesen mechanistischen Details allen bisher experimentell untersuchten membrangebundenen Fettsäuresaturasen. Es konnten einige mechanistische Details noch nicht abschließend beantwortet werden. So bleibt die Frage offen, mit welcher absoluten Stereokontrolle die *syn*-Eliminierung erfolgt. Ebenso sollten die experimentell bestimmten kinetischen Isotopeneffekte validiert werden.

Es konnten erste Schritte in Richtung eines besseren Verständnisses der Pheromonbiosynthese in *A. polyphemus* unternommen werden. Aufgrund der Ergebnisse kann als gesichert angesehen werden, dass (6*E*,11*Z*)-Hexadeca-6,11-diensäure (**172**) die

Vorstufe der Sexualpheromone (6*E*,11*Z*)-Hexadeca-6,11-dienal (**173**) und (6*E*,11*Z*)-Hexadeca-6,11-dienylacetat (**174**) darstellt und unter Einwirkung einer  $\Delta^6$ -(*E*)- und einer  $\Delta^{11}$ -(*Z*)-Desaturase aus Palmitinsäure gebildet wird. Weniger eindeutig ist hingegen die Reihenfolge der Desaturierungsschritte. Bei der Inkubation der Pheromondrüsen mit isotopenmarkierter Palmitinsäure **22** wurden neben deutlichen Mengen einer isotopenmarkierten (11*Z*)-Hexadec-11-ensäure **175** auch Spuren einer deuterierten (6*E*)-Hexadec-6-ensäure **176** nachgewiesen (siehe Abbildung 86). Daher lässt sich momentan keine genaue Aussage zur Desaturierungsreihenfolge treffen. Um diese Details in Zukunft zu klären, wurden die deuteriumsubstituierten Fettsäuren (6*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**), isotopenmarkierte (6*Z*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**) sowie (11*Z*)-[2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-11-ensäure (**71**) synthetisiert. Durch Inkubationsversuche mit diesen synthetischen Standards sollte es möglich sein, die noch offenen Fragen zu klären (siehe Abbildung 87).

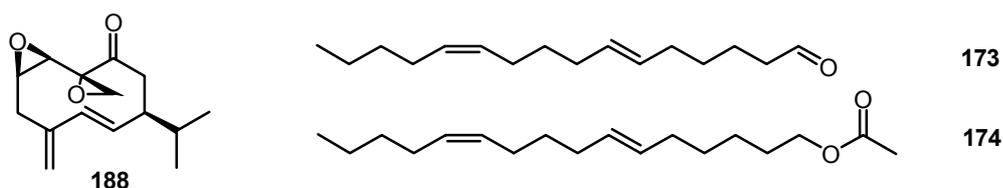


**Abbildung 87:** Isotopenmarkierte Palmitinsäuren **61**, **62** und **71** als Substratsonden für die Pheromonbiosynthese in *A. polyphemus*.

In einigen Fällen konnten im Fettsäureprofil der Pheromondrüsen Hinweise auf eine (6*Z*)-Hexadec-6-ensäure gefunden werden. Da sowohl Insekten aus China als auch aus Kanada bezogen wurden, ist nicht auszuschließen, dass es regionale Unterschiede im Fettsäureprofil und damit möglicherweise auch in der Pheromonzusammensetzung gibt. Mit Hilfe des synthetischen Standards (11*Z*)-[2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-11-ensäure (**71**) sollte es gelingen, mehr über die Bedeutung dieser Fettsäure für die Pheromonbiosynthese zu erfahren. Darüber hinaus könnte durch Applikation von **71** die Beteiligung einer Isomerase an der Produktion von  $\Delta^6$ -(*E*)-Hexadecensäure ausgeschlossen werden. Eine Aufklärung der Reihenfolge von  $\Delta^6$ - und  $\Delta^{11}$ -Desaturierung sollte durch Inkubation der Pheromondrüsen mit synthetischer (6*E*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**), (6*Z*)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**) und (11*Z*)-[2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-11-ensäure (**71**) möglich sein.

### 3.4 Mechanistischer Vergleich von stereoselektiven $\Delta^{11}$ -(E)- und nicht-stereoselektiven $\Delta^{11}$ -(E/Z)-Desaturasen aus Insekten

Grundsätzlich lassen sich zwei Strategien der Kommunikation mit Pheromonen unterscheiden.<sup>[7]</sup> Einerseits können Tiere eine einzelne Verbindung mit relativ komplexer und deshalb im Tierreich einzigartiger Struktur als Pheromon einsetzen. Ein Beispiel für diesen Fall ist Periplanon B, das Sexualpheromon der amerikanischen Kakerlake *Periplaneta americana* (siehe Abbildung 88).<sup>[210]</sup> Im Gegensatz dazu verwenden viele Insekten, insbesondere Motten, ein ganzes Duftbouquet, das aus relativ einfachen und von Fettsäuren abgeleiteten Verbindungen besteht. Ein Beispiel für dieses Kommunikationsprinzip wurde zuvor im Rahmen der Pheromonbiosynthese von *Antheraea polyphemus* erwähnt. Weibchen von *A. polyphemus* verwenden ein 9:1-Gemisch von (6E,11Z)-Hexadeca-6,11-dienylacetat und (6E,11Z)-Hexadeca-6,11-dienal als Sexualpheromone.<sup>[211]</sup> Obwohl *Antheraea pernyi* als naher Verwandter von *A. polyphemus* dieselben Pheromone verwendet, werden Männchen von *A. pernyi* nicht von weiblichen *A. polyphemus* angelockt<sup>[211]</sup>, da beide Arten unterschiedliche Verhältnisse der beiden Pheromonkomponenten einsetzen.<sup>[212]</sup>



**Abbildung 88:** Sexualpheromone der amerikanischen Kakerlake *Periplaneta americana* (**188**) und der Seidenspinner *A. polyphemus* und *A. pernyi* (**173** und **174**).

Die Biosynthese der meisten Schmetterlingspheromone erfolgt nach einem gemeinsamen Prinzip. In der Regel werden zunächst von Desaturasen Doppelbindungen in die Alkylkette von Fettsäuren eingeführt. In Verbindung mit kettenverkürzenden Schritten kann so sehr einfach und schnell eine große Vielfalt von einfach oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren generiert werden. An diese Schritte schließt sich die Reduktion der Fettsäuren zu den korrespondierenden Alkoholen an, welche dann von Oxidasen bzw. Acyltransferasen in leichtflüchtige Aldehyde oder Acetate überführt werden.<sup>[7, 213]</sup> Wie zahlreiche Studien aus dem Arbeitskreis von Prof. W. Roelofs belegen, nutzen Motten offenbar besonders ausgiebig  $\Delta^{11}$ -Fettsäuredesaturasen zur Pheromonbiosynthese.<sup>[7, 213-216]</sup> Die in Abbildung 89 dargestellte Biosynthese der Sexualpheromone der Motte *Trichoplusia ni* fasst die genannten Prinzipien zusammen.<sup>[7, 213, 215]</sup>



*Epiphyas postvittana* und einer nicht-stereoselektiv arbeitenden  $\Delta^{11}$ -(*E/Z*)-Desaturase aus *Argyrotaenia velutinana* miteinander verglichen. Sowohl die (*E*)-Desaturase aus *Epiphyas postvittana* <sup>[217]</sup> als auch die (*E/Z*)-Desaturase aus *Argyrotaenia velutinana* <sup>[218]</sup> konnten kürzlich kloniert werden und stehen als heterolog exprimierte Enzyme in Hefe- bzw. einem Baculovirus-Expressionssystem zur Verfügung. Da beide Desaturasen  $\Delta^{11}$ -ungesättigte Tetradeconsäure erzeugen, wurden für die mechanistische Untersuchung dieser Enzyme eine deuteriumsubstituierte Tetradeconsäure als Substrat benötigt. Mit (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradeconsäure (**37**) wurde deshalb eine Fettsäure synthetisiert, die enantioselektive Deuteriummarkierungen an den für die  $\Delta^{11}$ -Desaturase relevanten Kohlenstoffzentren C(11) und C(12) trägt. Die beiden zusätzlich eingebrachten Deuteriumatome an C(10) gewährleisten, dass das Desaturierungsprodukt von **37** von dem natürlichen Desaturierungsprodukt massenspektrometrisch unterscheidbar bleibt. Analog zu der Vorgehensweise bei der  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipiddesaturase (vgl. Kapitel 3.2.2.1), sollte sich mit **37** der stereochemische Verlauf der Desaturierung zu (11*E*)-Tetradeconsäure einerseits und zu (11*E/Z*)-Tetradeconsäure andererseits untersuchen lassen. Erste Fütterungsexperimente mit transformierten Hefezellen, die die (*E/Z*)-Desaturase aus *Argyrotaenia velutinana* überexprimieren, wurden bereits durchgeführt. Eine detaillierte massenspektrometrische Analyse der Metabolite steht hingegen noch aus.

### 3.5 Funktionelle Charakterisierung plastidiärer und mikrosomaler $\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturasen aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* und Raps *Brassica napus*

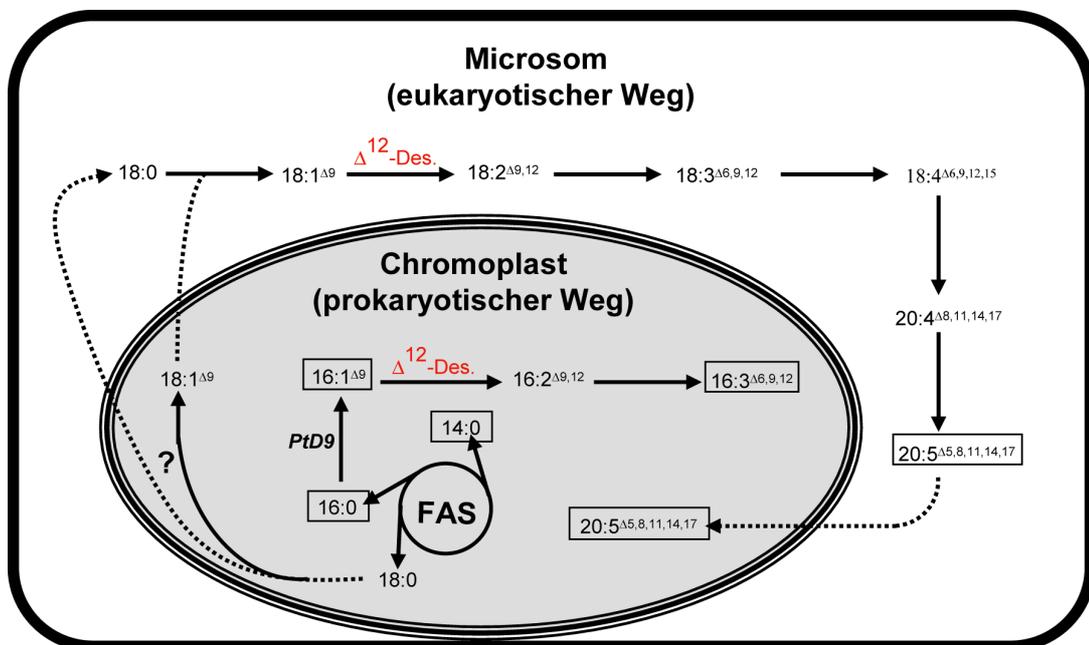
Die Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* enthält große Mengen Eicosapentaensäure (EPA) und ist daher für deren industrielle Gewinnung von Interesse. Neben EPA (C20:5 <sup>$\Delta^{5,8,11,14,17}$</sup> , 30 %) enthält *P. tricornutum* Palmitölsäure (C16:1 <sup>$\Delta^9$</sup> ; 26 %), Palmitinsäure (C16:0, 17 %), Hexadecatriensäure (C16:3 <sup>$\Delta^{6,9,12}$</sup> , 10 %), Myristinsäure (C14:0, 5%) sowie einer Reihe weiterer, in Spuren vorkommender Fettsäuren. Kürzlich konnten von Dr. Frédéric Domergue im Arbeitskreis von Prof. Heinz zwei cDNA Fragmente aus *P. tricornutum* kloniert werden, die Sequenzhomologien zu  $\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturasen höherer Pflanzen aufweisen. Durch heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und dem Cyanobakterium *Synechococcus* konnten cDNA-Fragmente identifiziert werden, die für eine plastidiäre bzw. mikrosomale  $\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturase codieren. [219]

Seit längerem ist bekannt, dass in Pflanzen, wie *Arabidopsis thaliana* oder *Brassica napus*, die beiden häufigsten in den Blättern vorkommenden Fettsäuren, (7Z,10Z,13Z)-Hexadeca-7,10,13-triensäure (C16:3 <sup>$\Delta^{7,10,13}$</sup> ) und  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta^{9,12,15}$</sup> ), in unterschiedlichen Kompartimenten der Pflanzen gebildet werden. Die Biosynthese von  $\alpha$ -Linolensäure erfolgt einerseits über den so genannten „eukaryotischen“ Weg im endoplasmatischen Retikulum, kann andererseits aber auch über den so genannten „prokaryotischen“ Weg in den Chloroplasten der Zelle gebildet werden. Hingegen wird ausschließlich in den Chloroplasten (7Z,10Z,13Z)-Hexadeca-7,10,13-triensäure (C16:3 <sup>$\Delta^{7,10,13}$</sup> ) gebildet. [19, 220]

Durch Fütterungsexperimente mit natürlich vorkommenden Fettsäuren wie C16:1 <sup>$\Delta^9$</sup> , C18:1 <sup>$\Delta^9$</sup> , C18:1 <sup>$\Delta^{11}$</sup>  und den synthetischen Fettsäuren C16:1 <sup>$\Delta^7$</sup>  (**67**) und C16:2 <sup>$\Delta^{9,12}$</sup>  (**75**) konnte die Substratspezifität der beiden heterolog exprimierten  $\Delta^{12}$ -Desaturasen aus *P. tricornutum* untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit Fütterungsstudien an plastidiären und mikrosomalen  $\Delta^{12}$ -Fettsäuredesaturasen aus Raps (*Brassica napus*) in denselben Expressionssystemen verglichen.

Die Ergebnisse der Fütterungsstudien an transformierten Organismen, die entweder mikrosomale oder plastidiäre  $\Delta^{12}$ -Desaturasen aus *P. tricornutum* und *B. napus* exprimieren, zeigen, dass eine mit Pflanzen vergleichbare räumliche Unterteilung der Biosynthese von ungesättigten Fettsäuren in der Alge existiert. Die beiden mikrosomalen  $\Delta^{12}$ -Desaturasen aus *B. napus* und aus *P. tricornutum* katalysieren hochspezifisch die Umwandlung von Ölsäure (C18:1 <sup>$\Delta^9$</sup> ) in Linolsäure (C18:2 <sup>$\Delta^{9,12}$</sup> ) und lassen den Schluss zu, dass diese Desaturase in *P. tricornutum* an der Biosynthese von Eicosapentaensäure beteiligt ist. Demgegenüber unterscheiden sich die plastidiären  $\Delta^{12}$ -Desaturasen aus *B. napus* und *P. tricornutum*. Die

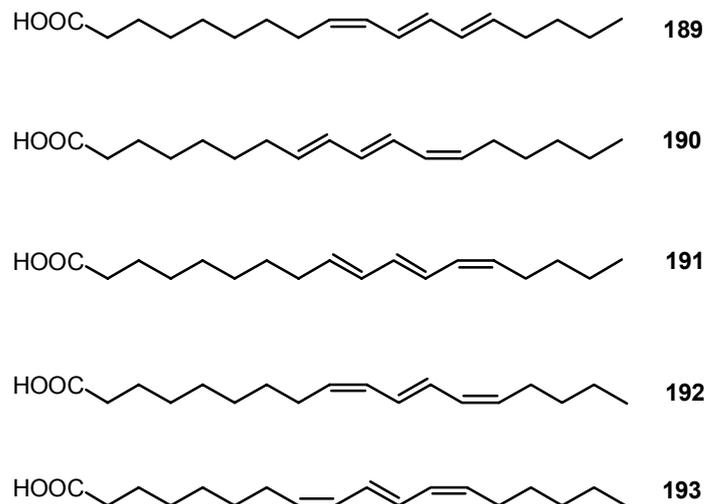
pflanzliche Desaturase zeigt eine hohe Aktivität sowohl für die Umwandlung von C16:1<sup>Δ7</sup> in C16:2<sup>Δ7,10</sup> als auch für die Überführung von C18:1<sup>Δ9</sup> in Linolsäure (C18:2<sup>Δ9,12</sup>). Damit bestätigt die Substratspezifität, dass diese Desaturase sowohl an der Biosynthese von C16:3<sup>Δ7,10,13</sup> als auch C18:3<sup>Δ9,12,15</sup> in Pflanzen beteiligt ist. Die plastidiäre Desaturase aus *P. tricornutum* zeigt hingegen ausschließlich eine hohe Aktivität gegenüber Palmitölsäure (C16:1<sup>Δ9</sup>) und sollte daher an der Biosynthese von C16:3<sup>Δ6,9,12</sup> in der Alge beteiligt sein (siehe Abbildung 90). Fasst man die Ergebnisse der Fütterungsstudien zusammen, so lässt sich ein erstes Bild zur Biosynthese von C16:3<sup>Δ6,9,12</sup> und Eicosapentaensäure in der Kieselalge *P. tricornutum* entwerfen. Demnach wird EPA über einen zu Pflanzen analogen „eukaryotischen“ Weg in den Microsomen der Algen gebildet werden, während C16:3<sup>Δ6,9,12</sup> über den „prokaryotischen“ Weg in den Plastiden der Alge synthetisiert wird.



**Abbildung 90:** Biosynthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren in der Alge *Phaeodactylum tricornutum*.

### 3.6 Stereochemische Charakterisierung von (1,4)-Desaturasen (Konjugasen<sup>o</sup>)

Neben mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linol- oder Linolensäure, die methylenunterbrochene Doppelbindungen aufweisen, können Pflanzen ungesättigte Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungssystemen enthalten. Einige Pflanzen verfügen, vor allem in ihren Samen, über erhebliche Mengen an solchen Fettsäuren. So enthält das aus dem Samen von *Aleurites fordii* gewonnene Öl mehr als 65 %  $\alpha$ -Eleostearinsäure (18:3<sup>A9Z,11E,13E</sup>) (**189**)<sup>[221]</sup> oder das aus *Calendula officinales* gewonnene Öl mehr als 50 % Calendulasäure (18:3<sup>A8E,10E,12Z</sup>) (**190**).<sup>[222]</sup> Aus anderen Pflanzen wurden weitere Stereoisomere konjugierter Linolensäuren isoliert: 18:3<sup>A9E,11E,13Z</sup> (**191**) aus *Catalpa ovata*, Punicinsäure (18:3<sup>A9Z,11E,13Z</sup>) und *Punica granatum* (**192**) und 18:3<sup>A8Z,10E,12Z</sup> (**193**) aus *Jacaranda mimosifolia* (siehe Abbildung 91).<sup>[221, 223, 224]</sup>



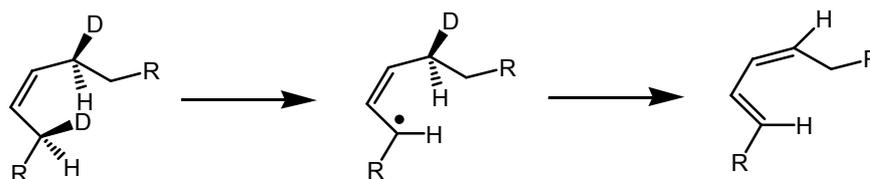
**Abbildung 91:** Konjugierte Linolensäuren.

Konjugierte Fettsäuren besitzen eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung. Als Bestandteil von Farben und Lacken finden sie Verwendung als Trocknungsmittel, da sie leichter als methylenunterbrochene Fettsäuren oxidiert werden und damit schneller während des Trocknens polymerisieren.<sup>[221]</sup> Demgegenüber sind andere konjugierte Fettsäuren, wie Calendulasäure (**190**), als Bestandteil von kosmetischen Produkten interessant. Besonders intensiv wird in den letzten Jahren diskutiert, ob konjugierte Fettsäuren als potentielle Zusätze für die menschliche Nahrung (functional food) verwendet werden können, um so möglicherweise Fettleibigkeit, Krebs und Arteriosklerose vorzubeugen.<sup>[225]</sup>

<sup>o</sup> Um die Beteiligung dieser Desaturasen an der Bildung von konjugierten Doppelbindungen auszudrücken, wurde der Begriff Konjugase von Cahoon *et al.* vorgeschlagen.<sup>[221]</sup>

Die biosynthetische Herkunft konjugierter Fettsäuren war lange unbekannt, so dass unterschiedliche mechanistische Szenarien vorgeschlagen wurden. <sup>[223]</sup> Gleich von mehreren Autoren stammt der Vorschlag, dass konjugierte Trienfettsäuren aus Linolensäure unter Beteiligung von lipoxygenase-ähnlichen Enzymen gebildet werden. Andere Autoren haben eine Isomerisierung von Linolensäure oder einen Reaktionsweg vorgeschlagen, bei dem Epoxylinolensäure als Vorstufe dient. Erste Hinweise, dass möglicherweise Desaturasen an der Biosynthese von Calendulasäure (**190**) beteiligt sind, stammen aus Arbeiten von Fritsche *et al.* <sup>[223, 226]</sup> und Cahoon *et al.* <sup>[221, 222]</sup>, die Gene mit großer Sequenzhomologie zu Desaturasen aus *Calendula officinalis* klonieren konnten.

Ein plausibles mechanistisches Modell für die Bildung von konjugierten Doppelbindungen durch Desaturasen wurde erstmals 1999 im Arbeitskreis von Prof. Feussner <sup>[223]</sup> und in unserem Arbeitskreis <sup>[52]</sup> vorgeschlagen. In Analogie zu den bekannten Fettsäuredesaturasen wird durch 1,4-*syn*-Eliminierung zweier Wasserstoffatome eine bereits vorhandene Doppelbindung in ein konjugiertes Dien überführt wird (siehe Abbildung 92).



**Abbildung 92:** Mechanistisches Modell für die Bildung konjugierter Doppelbindungen.

Bereits 1985 konnten Crombie und Holloway mit isotopenmarkierten Linolsäuren zeigen, dass Calendulasäure durch Verlust eines Wasserstoffatoms an C(8) und C(11) aus Linolsäure gebildet wird. <sup>[227]</sup> Vor dem heutigen Hintergrund können diese frühen Experimente als experimentelle Bestätigung eines 1,4-Eliminierungsprozesses angesehen werden. Erste detaillierte Studien zum Mechanismus von Konjugasen stammen aus den letzten beiden Jahren. Rodriguez *et al.* konnten die Details der Biosynthese von (10*E*,12*E*)-Tetradeca-10,12-diensäure in dem Insekt *Spodoptera littoralis* entschlüsseln. <sup>[228, 229]</sup> Demnach wird (10*E*,12*E*)-Tetradeca-10,12-diensäure durch 1,4-Dehydrogenierung von (*Z*)-Tetradec-11-ensäure gebildet, wobei für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von C(10) ein hoher und für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von C(13) ein niedriger kinetischer Isotopeneffekt (KIE) gemessen wurde. <sup>[228]</sup> Damit entsprechen die KIE einem Trend, wie er für den Zweistufen-Mechanismus einer Desaturase angenommen wird. In Untersuchungen zum stereochemischen Verlauf der 1,4-Dehydrogenierung mit enantiospezifisch markierten (*Z*)-Tetradec-11-ensäuren konnten Rodriguez *et al.* beweisen, dass es sich hierbei um einen suprafacialen Prozess handelt, bei dem sowohl von C(10) als auch von C(13) das *pro*-(*R*)-Wasserstoffatom eliminiert wird. <sup>[229]</sup> Nachteilig bei der umfassenden mechanistischen

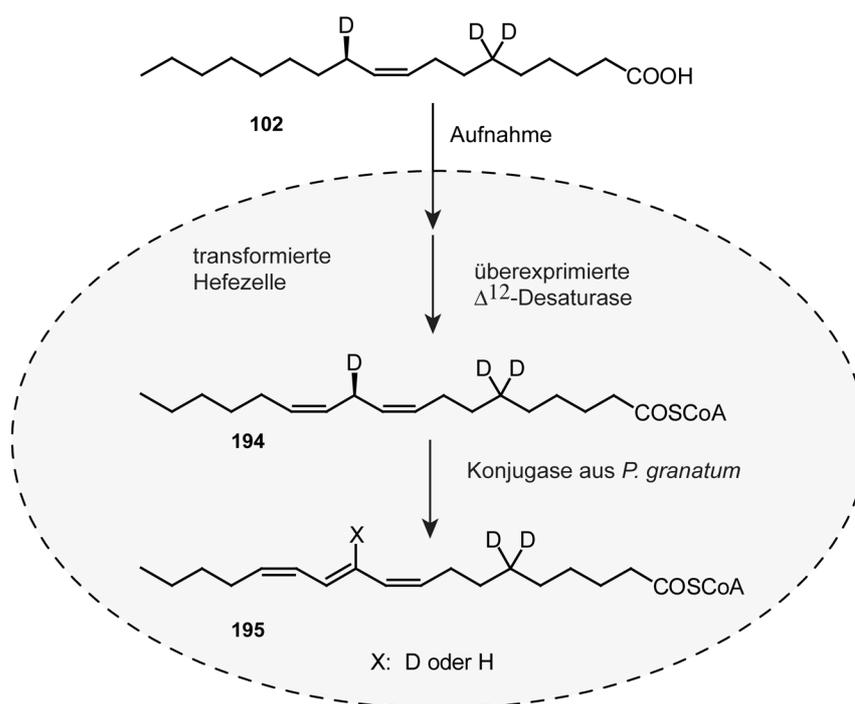
Charakterisierung der Konjugase aus *Spodoptera littoralis* ist die Tatsache, dass die Untersuchungen *in vivo* durchgeführt werden mussten und somit letztlich der endgültige Beweis fehlt, dass ein einzelnes Enzym die Bildung von (10*E*,12*E*)-Tetradeca-10,12-diensäure katalysiert. Eine erste Arbeit, die den Mechanismus einer Konjugase aus *Calendula officinalis* untersucht und dabei die Vorteile molekularbiologischer Methoden nutzt, stammt von Reed *et al.* [230]. Durch Inkubation von transformierten Hefezellen, die die Konjugase aus *C. officinalis* überexprimieren, mit regiospezifisch deuterierten Linolsäuren, konnten kinetische Isotopeneffekte für die Abstraktion der Wasserstoffatome von C(8)- und C(11) experimentell bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten daraufhin, dass Calendulasäure durch initialen Angriff der Konjugase an C(11) des Substrats Linolsäure gebildet wird.

Obwohl alle bis heute verfügbaren Informationen dafür sprechen, dass konjugierte Dieneinheiten von ungesättigten Fettsäuren durch 1,4-*syn*-Eliminierung zweier Wasserstoffatome gebildet werden, steht der Beweis, dass es sich hierbei um ein generelles Prinzip handelt, noch aus. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb die stereochemischen Aspekte der Biosynthese der Calendulasäure (C18:3<sup>Δ8*E*,10*E*,12*Z*</sup>) (**190**) und der Punicinsäure (18:3<sup>Δ9*Z*,11*E*,13*Z*</sup>) (**192**) in Zusammenarbeit mit Prof. Feussner (Universität Göttingen) untersucht werden. Bei diesen beiden konjugierten Linolensäuren handelt es sich um Stereoisomere mit entweder (*E,E,Z*)- oder (*Z,E,Z*)-Konformation der Trieneinheit. Sowohl die Konjugase aus *Calendula officinalis* [223] als auch die Konjugase aus *Punica granatum* [231] wurden im Arbeitskreis von Prof. Feussner erfolgreich kloniert und lassen sich in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimieren. Mit diesen beiden Expressionssystemen stehen ideale Bedingungen für eine Untersuchung dieser Konjugasen zur Verfügung. Im Gegensatz zu *in vivo* Studien an intakten Pflanzen oder Tieren kann mit solchen Systemen die Beteiligung anderer Enzyme leicht ausgeschlossen werden.

Um die stereochemischen Aspekte einer 1,4-Dehydrogenierung zu untersuchen, wurden isotoopenmarkierte Substrate benötigt, die an den relevanten Positionen enantiospezifisch markiert sind. Erstes Ziel dieses Projekts musste es deshalb sein, einen synthetischen Zugang zu solchen isotoopenmarkierten Vorstufen zu finden. Wie in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben, wurde eine Synthesestrategie entwickelt, mit der sich positions- und enantiospezifisch markierte Monoensäuren generieren lassen (siehe Abbildung 43). Diese Route ist flexibel und erlaubt einen raschen Zugang zu einer Palette von deuterierten Fettsäuren, wie sie zur Analyse des stereochemischen Verlaufs von Konjugasen erforderlich sind.

Mit (11*R*)-(9*Z*)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäure (**102**) wurde eine enantiospezifisch deuterierte Monoensäure synthetisiert, die gegenwärtig in Fütterungsexperimenten eingesetzt wird. Hierzu wird **102** dem Kulturmedium transformierter Hefezellen, welche die

Konjugase aus *Punica granatum* überexprimieren, zugegeben. Da das eigentliche Substrat der Konjugase Linolsäure ist, muss **102** zunächst in die isotopenmarkierte Linolsäure **194** durch Einführen einer Doppelbindung in  $\Delta^{12}$ -Position erfolgen. Diese zusätzliche Doppelbindung kann biotechnologisch in ca. 30 % Umsatz eingeführt werden.<sup>[232]</sup> Mit (11*R*)-(9*Z*,12*Z*)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadeca-9,12-diensäure (**194**) sollte damit ein geeignetes Substrat für die Konjugase zur Verfügung stehen. Die anschließende 1,4-Desaturierung sollte je nach stereofacialer Selektivität der Konjugase zum Erhalt oder zum Verlust der Isotopenmarkierung an C(11) führen (siehe Abbildung 93).



**Abbildung 93:** Konzept zur Untersuchung der stereochemischen Aspekte von Konjugasen aus *Calendula officinalis* und *Punica granatum*.

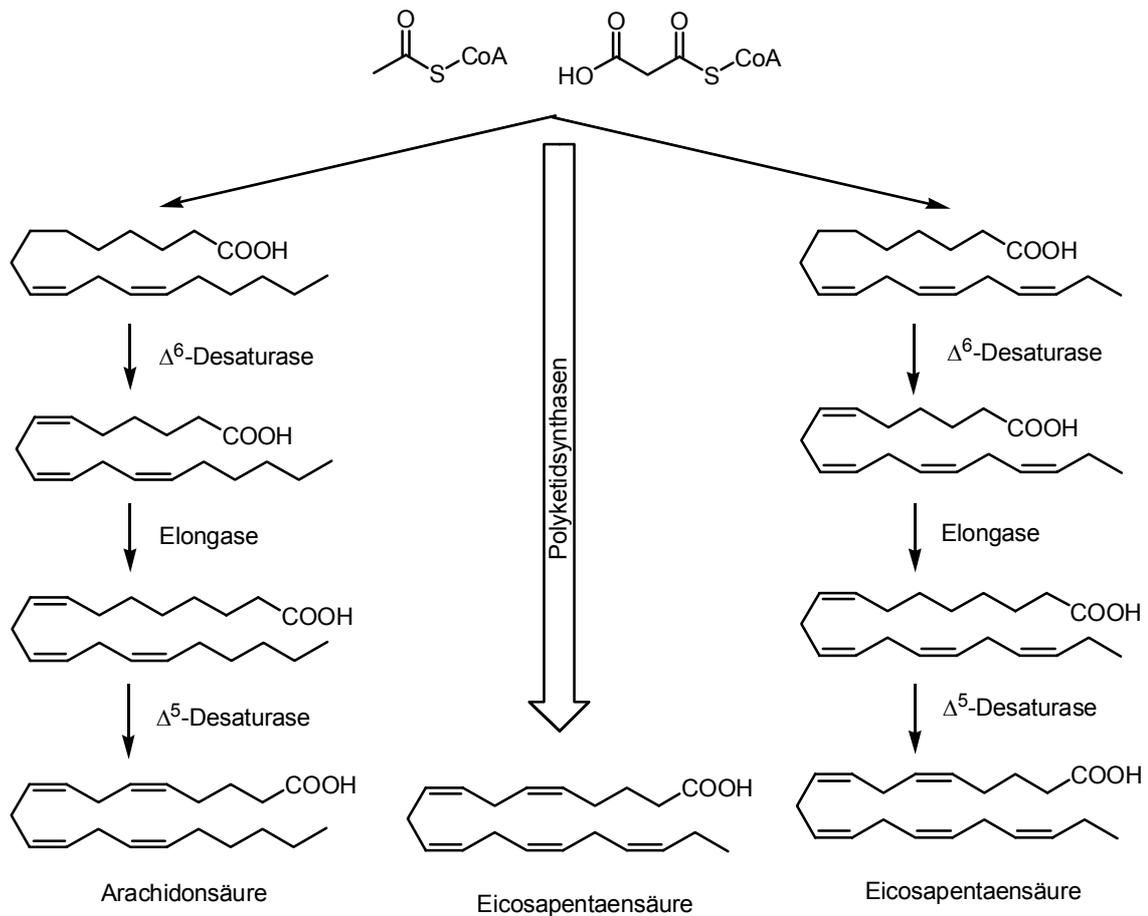
Sofern sich das in Abbildung 93 skizzierte Konzept als praktikabel erweist, müssen an C(14)-enanantiospezifisch deuterierte Vorstufen synthetisiert werden, um den stereochemischen Verlauf der 1,4-Desaturierung vollständig beschreiben zu können. Entsprechend markierte Fettsäuren sind ebenfalls über die ausgearbeitete Syntheseroute (siehe Kapitel 3.1.4) zugänglich.

### **3.7 Funktionelle Charakterisierung einer Elongase aus dem Moos *Physcomitrella patens***

Langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie Arachidonsäure (C20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>) oder Eicosapentaensäure (C20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>), sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und dienen als Vorstufen für Verbindungen mit hormonartigen Eigenschaften, wie Leukotriene, Prostaglandiene und Thromboxane. Seit einigen Jahren stoßen langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LCPUFAs)<sup>p</sup> daher auch wirtschaftlich auf großes Interesse. Wegen ihrer gesundheitsfördernden Wirkung auf Wachstum und Entwicklung oder der Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten sind (ω-3)-Fettsäuren für so genanntes „functional food“ von enormem Interesse für die Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie. <sup>[9, 233]</sup> Als Hauptquelle für LCPUFAs dient dem Menschen in erster Linie der Konsum von Fisch. Durch den gestiegenen Bedarf an „gesunden“ Fettsäuren werden jedoch alternative Quellen gesucht. Ein Schlagwort, das in diesem Zusammenhang vielfach gebraucht wird, ist „crop engineering“, womit das gezielte Design von transgenen Pflanzen gemeint ist, die große Mengen von mehrfach ungesättigten, langkettigen Fettsäuren produzieren können. <sup>[234]</sup> Aus diesem Grund gibt es intensive Bestrebungen, die Enzyme zu identifizieren und die Gene zu klonieren, die an der Biosynthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt sind. <sup>[234]</sup> Im Laufe der Evolution haben anaerob und aerob lebende Organismen unterschiedliche Strategien entwickelt, langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (LCPUFA) zu synthetisieren. Erst vor wenigen Jahren wurde entdeckt, dass anaerob lebende Organismen, wie beispielsweise marine Bakterien, offensichtlich LCPUFA unter Verwendung von Polyketid-Synthasen erzeugen. <sup>[11, 12]</sup> Im Gegensatz dazu können aerob lebende Organismen, wie Pflanzen, Pilze oder Säugetiere, den „klassischen“ Fettsäurebiosyntheseweg nutzen, indem sie desaturierende und kettenverlängernde Schritte miteinander kombinieren. <sup>[5, 234, 235]</sup> So werden Arachidonsäure und Eicosapentaensäure jeweils über eine Sequenz aus Δ<sup>6</sup>-Desaturierung, Δ<sup>6</sup>-Elongation und Δ<sup>5</sup>-Desaturierung aus Linol- bzw. Linolensäure biosynthetisiert (siehe Abbildung 94).

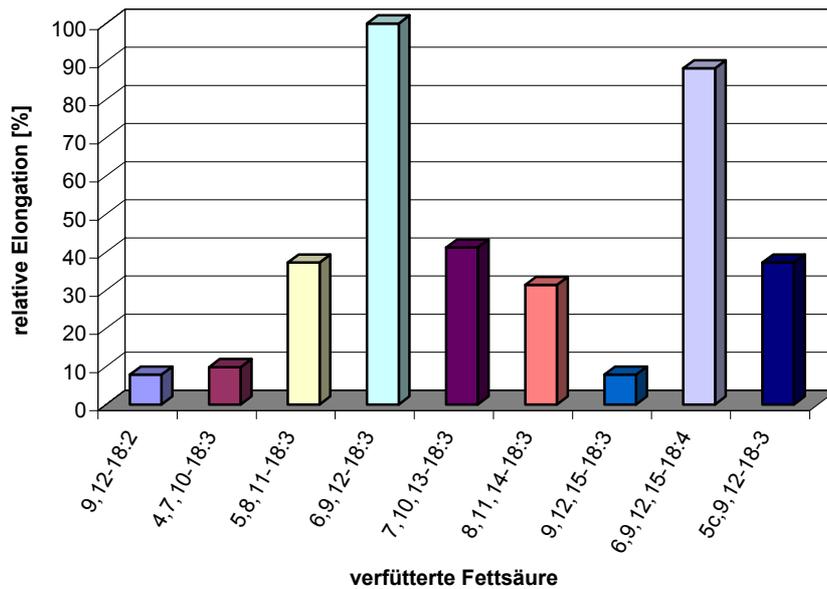
---

<sup>p</sup> LCPUFA = long chain polyunsaturated fatty acid



**Abbildung 94:** Verschiedene Biosyntheserouten zu Arachidon- und Eicosapentaensäure. **mitte:** „neuer“ Weg unter Verwendung von Polyketidsynthasen; **links und rechts:** „klassische“ Wege über Elongations- und Desaturierungsschritte.

Manche Organismen akkumulieren beträchtliche Mengen an langkettigen PUFAs. In dem Moos *Physcomitrella patens* beträgt z.B. der Anteil an Arachidonsäure an der Gesamtmenge aller Fettsäuren bis zu 30 %. Daher erscheint *P. patens* ein idealer Organismus zu sein, um die an der Biosynthese beteiligten Desaturasen und Elongasen zu isolieren. Im Jahr 2001 wurde durch Dr. Thorsten Zank im Arbeitskreis von Prof. Heinz ein Gen aus *P. patens* kloniert, das für eine potentielle  $\Delta^6$ -Elongase codiert. <sup>[236]</sup> Um das Enzym zu charakterisieren, wurde die Elongase in Bäckerhefe (*S. cerevisiae*) überexprimiert und mit einer Reihe synthetischer (siehe Kapitel 3.1.4) und natürlich vorkommender Fettsäuren inkubiert. Nach saurer Methanolyse der Hefezellen wurde das Fettsäureprofil der Hefen in Form der Methylester per GC bzw. GC/MS untersucht. Da *S. cerevisiae* selbst keine langkettigen PUFAs besitzt, konnten die von der heterolog exprimierten  $\Delta^6$ -Elongase erzeugten Fettsäuren hintergrundfrei analysiert werden.



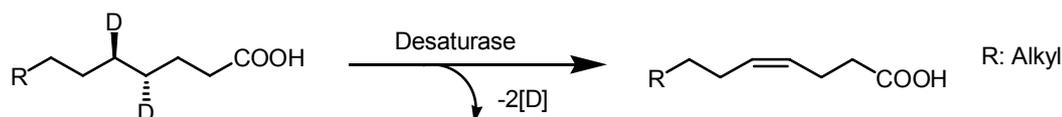
**Abbildung 95:** Vergleich der Elongationsraten verschiedener ungesättigter Fettsäuren.

Die Ergebnisse der Fütterungsstudien sind in Abbildung 95 zusammengefasst. Sowohl  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>) als auch Stearidonsäure (C18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup>) werden als unmittelbare Vorstufen von Arachidonsäure bzw. Eicosapentaensäure mit Abstand am besten kettenverlängert. Im Gegensatz dazu werden die beiden Fettsäuren C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup> und C18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>, denen im Vergleich zu  $\gamma$ -Linolen- und Stearidonsäure lediglich die  $\Delta^6$ -Doppelbindung fehlt, nur noch zu ca. 10 % kettenverlängert. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die  $\Delta^6$ -Doppelbindung ein essentielles Erkennungsmerkmal für die Elongase darstellt. Diese Annahme wird von Fütterungsexperimenten mit den synthetischen Trienfettsäuren C18:3 <sup>$\Delta$ 4,7,10</sup> (**80**), C18:3 <sup>$\Delta$ 5,8,11</sup> (**90**), C18:3 <sup>$\Delta$ 7,10,13</sup> (**91**) und C18:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup> (**92**) bestätigt. Bei diesen Fettsäuren ist die methylenverbrückte Trieneinheit im Vergleich zu  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>) sukzessive verschoben. Die Fütterungsexperimente mit diesen Fettsäuren zeigen einen eindeutigen Trend: Je weiter sich die proximale Doppelbindung von der  $\Delta^6$ -Position entfernt, desto schlechter wird die Trienfettsäure um ein C<sub>2</sub>-Einheit verlängert. Interessanterweise werden methylenverbrückte C18:3 $\Delta$ <sup>5,8,11</sup> und die ethylenverbrückte Pinolensäure C18:3 $\Delta$ <sup>5cis,9,12</sup> nahezu gleich gut kettenverlängert. Offensichtlich differenziert die Elongase also nicht zwischen methylen- und ethylenunterbrochener Trieneinheit.

Alle Fütterungsstudien deuten daraufhin, dass die Elongase aus *P. patens* an der Biosynthese von Arachidonsäure und Eicosapentaensäure beteiligt ist. Die Elongase ist dabei hochspezifisch für  $\Delta^6$ -PUFAs, wobei die  $\Delta^6$ -Doppelbindung der Elongase als essentielles Erkennungsmerkmal dient.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Desaturasen gehören zu einer großen Klasse von Nicht-Häm-Eisenenzymen, die Doppelbindungen in Fettsäuren oder verwandte Verbindungen einführen. Bei der bei weitem größten Gruppe von Desaturasen handelt es sich um membrangebundene Enzyme, von denen bis heute keine NMR- oder Röntgenstrukturinformation verfügbar sind. Daher stützt sich das Wissen zum Mechanismus von membrangebundenen Desaturasen noch weitestgehend auf Untersuchungen mit isotopenmarkierten Substratsonden (siehe Abbildung 96).

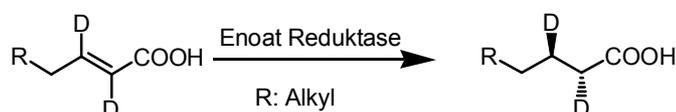


**Abbildung 96:** Mittels isotopenmarkierter Substrate können Desaturasen mechanistisch untersucht werden.

### **Synthese von deuteriummarkierten Fettsäuren**

Für die Untersuchung der stereochemischen Aspekte von Desaturasen wurden (enantiospezifisch) deuteriummarkierte gesättigte Fettsäuren benötigt. Deren Synthese basiert auf zwei Schlüsselschritten:

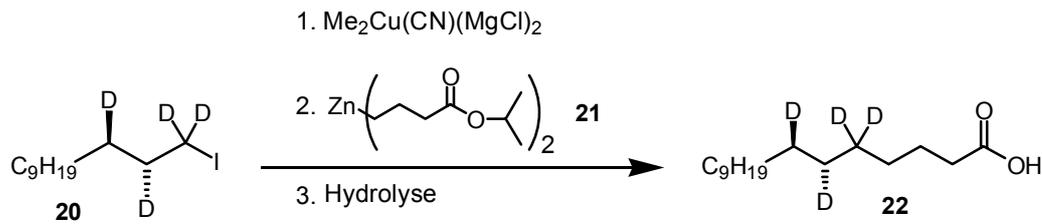
- 1) der enzymatischen Reduktion von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Carbonsäuren, die zu enantiomerenreinen gesättigten Produkten führt (siehe Abbildung 97)



**Abbildung 97:** Enzymatische enantioselektive Reduktion von  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Fettsäuren.

- 2) und der kupfer-medierten Kreuzkupplung von Alkyljodiden mit Zinkorganylanen.

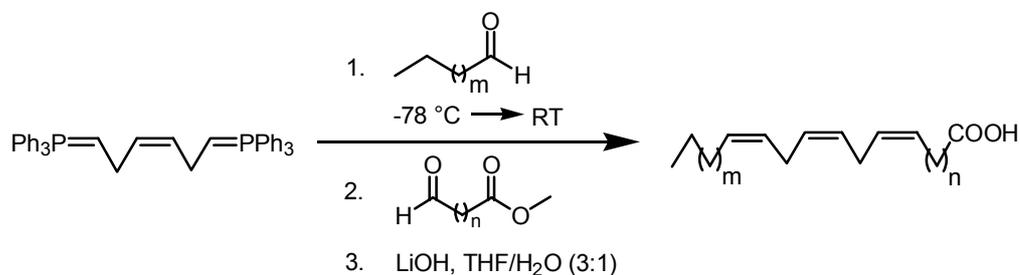
Durch die kupfervermittelte Kreuzkupplung lässt sich im Gegensatz zu früheren Synthesen, die einen Hydrierungsschritt an Metallkatalysatoren benötigten, ein Isotopenscrambling oder ein Verlust der eingebrachten Markierung vermeiden. Im Sinne eines Baukastenprinzips konnten so die Fettsäuren **22**, **37**, **38** und **53** dargestellt werden. Diese Synthesestrategie erlaubt es, Fettsäuren mit beliebiger Kettenlänge und einer nahezu beliebigen Positionierung der Isotopenmarkierung darzustellen (siehe Abbildung 98).



Alkylidiodid	Organozinkat	Fettsäure
<b>51</b>	<b>21</b>	<b>53</b>
<b>39</b>	<b>45</b>	<b>38</b>
<b>34</b>	<b>35</b>	<b>37</b>

**Abbildung 98:** Kupfer-medierte Kreuzkupplung von Alkylidiodiden mit Zinkorganen.

Zur funktionellen Charakterisierung von Desaturasen und Elongasen wurden mehrfach ungesättigte Fettsäuren hergestellt. Deren Synthese basiert auf der gekreuzten *bis*-Wittig-Olefinierung nach Bestmann *et al.* bzw. Pohnert *et al.* (siehe Abbildung 99).

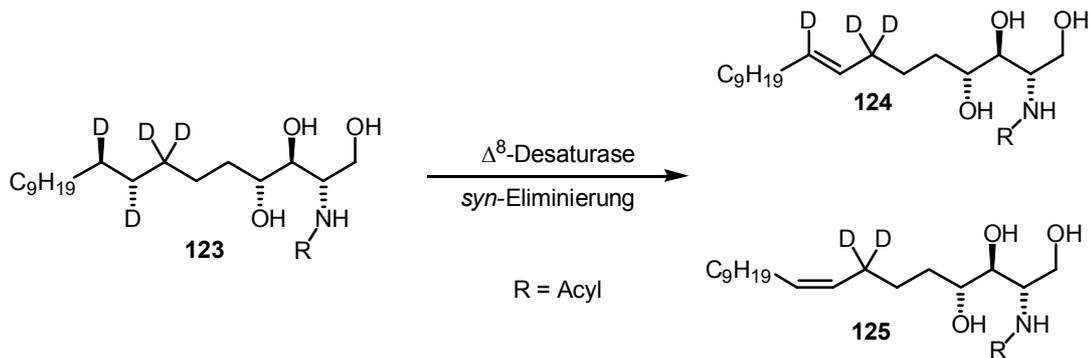


**Abbildung 99:** Schematische Darstellung der *bis*-Wittig-Olefinierung.

## Untersuchung von ungewöhnlichen Desaturasen des Sphingolipidstoffwechsels

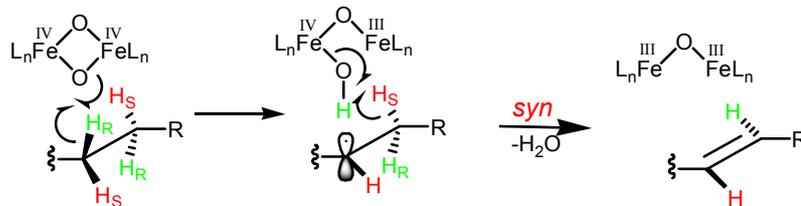
### $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipiddesaturase aus *Helianthus annuus*

Im Gegensatz zu allen bisher untersuchten Desaturasen, die ausschließlich (*E*)- oder (*Z*)-Doppelbindungen bilden, erzeugt die Sphingolipiddesaturase aus *H. annuus* ein charakteristisches Gemisch beider Isomere (siehe Abbildung 100).



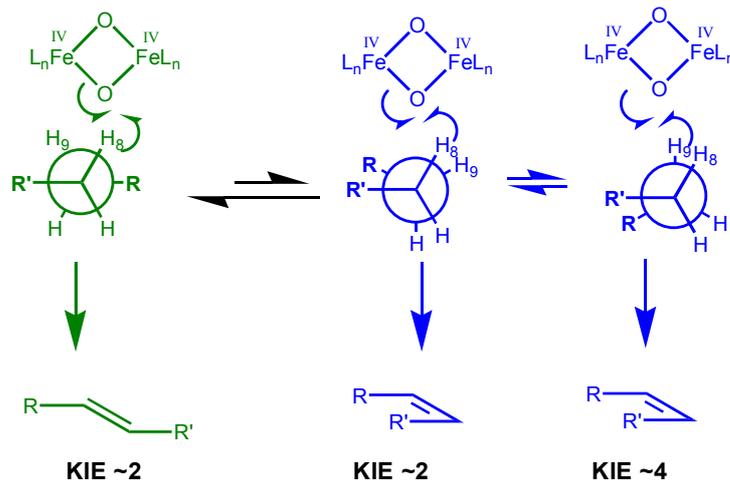
**Abbildung 100:** Die Sphingolipid-desaturase aus *Helianthus annuus* überführt das deuterierte Substrat **123** in ein Isomergemisch von **124** und **125**.

Mit der Untersuchung der  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Sphingolipid-desaturase aus *Helianthus annuus* konnte erstmals eine unspezifisch arbeitende Desaturase mechanistisch charakterisiert werden. Hierzu wurden transformierte Hefezellen, die die  $\Delta^8$ -(*E/Z*)-Desaturase überexprimieren, mit isotopenmarkierten Stoffwechselfonden, wie **123**, inkubiert. Mit Hilfe von LC/MS- und GC/MS-Techniken konnten die Desaturierungsprodukte **124** und **125** identifiziert werden und so anhand der Deuteriumverluste der stereochemische Verlauf der Desaturierung aufgeklärt werden. Demnach erzeugt die Sonnenblumendesaturase beide Isomere durch *syn*-Eliminierung von zwei vicinalen Deuterium- bzw. Wasserstoffatomen, wobei der diastereofaciale Verlauf der Desaturierung für beide Isomere identisch ist. Insofern stimmt die hier nachgewiesene *syn*-Eliminierung mit dem allgemein favorisierten Mechanismus der Desaturierung überein (siehe Abbildung 101).



**Abbildung 101:** Allgemein favorisierter Mechanismus der Desaturierung.

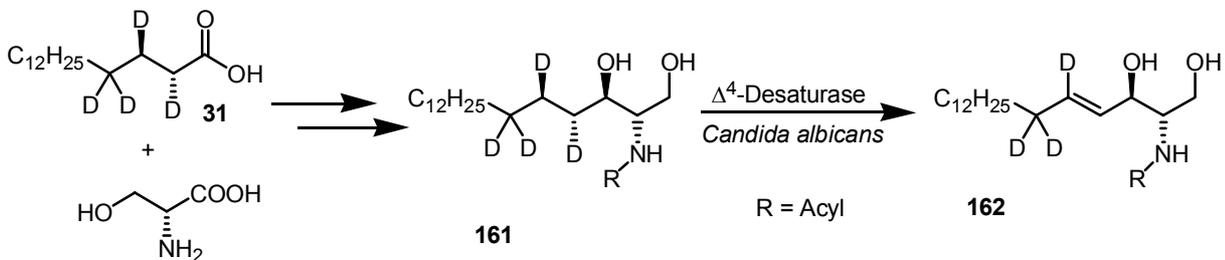
Entscheidende mechanistische Aspekte der *E/Z*-Desaturase konnten durch die Bestimmung kinetischer Isotopeneffekte aufgeklärt werden. Offensichtlich erlaubt die  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturase unterschiedliche Ausgangskonformationen, aus denen die Desaturierung erfolgen kann. Die *syn*-Eliminierung aus einer *anti*-Konformation führt unmittelbar zum (8*E*)-Phytosphingenin, während die *syn*-Eliminierung aus einer *gauche*-Konformation zum (8*Z*)-Olefin führt. Je nach Ausgangskonformation erfolgt der initiale Angriff entweder an C(8) oder an C(9) (siehe Abbildung 102).



**Abbildung 102:** Mechanistisches Modell zum Ursprung von (*E/Z*)-Sphingolipiden in Pflanzen.

### Bifunktionale $\Delta^4$ -Dihydroceramid-Desaturase aus *Candida albicans*

Bei Ceramid handelt es sich um ein Sphingolipid, dem bsp. eine Beteiligung an der Apoptose zugeschrieben wird. Exemplarisch wurde die  $\Delta^4$ -Dihydroceramid-desaturase aus der Hefe *Candida albicans* untersucht. Hierzu wurden transformierte Hefen, welche die Desaturase aus *C. albicans* überexprimieren, mit der enantiospezifisch markierten Fettsäure **31** inkubiert. Auf dem in Abbildung 103 gezeigten Weg wird die applizierte Fettsäure **31** zunächst von *S. cerevisiae* in deuteriertes Dihydroceramid **161** überführt und anschließend von der  $\Delta^4$ -Desaturase aus *C. albicans* zu **162** desaturiert.

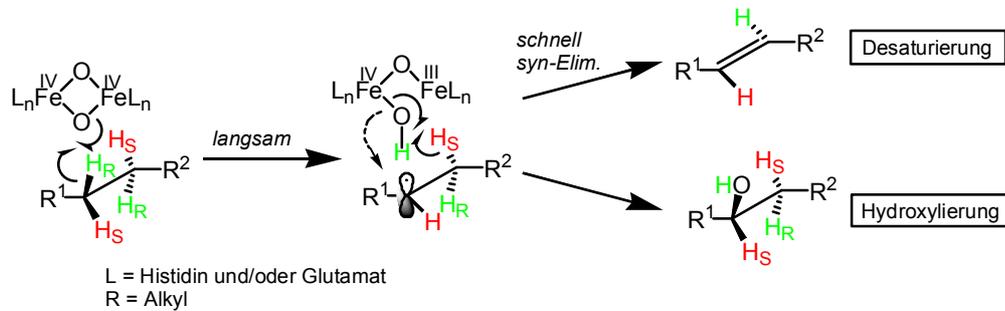


**Abbildung 103:** Die transformierte Hefe *Saccharomyces cerevisiae* überführt die Fettsäure **31** in deuteriertes Dihydroceramid **161**, das anschließend von der transgenen  $\Delta^4$ -Desaturase zu **162** desaturiert wird.

Mit Hilfe von LC/MS- und GC/MS-Techniken konnte Ceramid **162** als ausschließliches Desaturierungsprodukt identifiziert werden. Somit erfolgt die Desaturierung unter absoluter diastereofacialer Kontrolle, wobei bemerkenswerterweise der stereochemische Verlauf mit dem aller bisher untersuchten Fettsäuredesaturasen identisch ist.

Neben dem Desaturierungsprodukt Ceramid (**162**) erzeugt die  $\Delta^4$ -Desaturase als Nebenprodukt ein an C(4) hydroxyliertes Dihydroceramid, welches man als Produkt einer fehlgeleiteten Desaturierung auffassen kann. Damit konnte erstmals mit chemischen Sonden

gezeigt werden, dass es sich bei Desaturierungen und Hydroxylierungen um mechanistisch verwandte Prozesse handelt. Auf der Basis der bisher durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen kann man für beide Prozesse einen Mechanismus formulieren, der eine gemeinsame, kurzlebige Zwischenstufe annimmt. Allerdings unterscheidet sich die Enantioselektivität von Hydroxylierung und Desaturierung

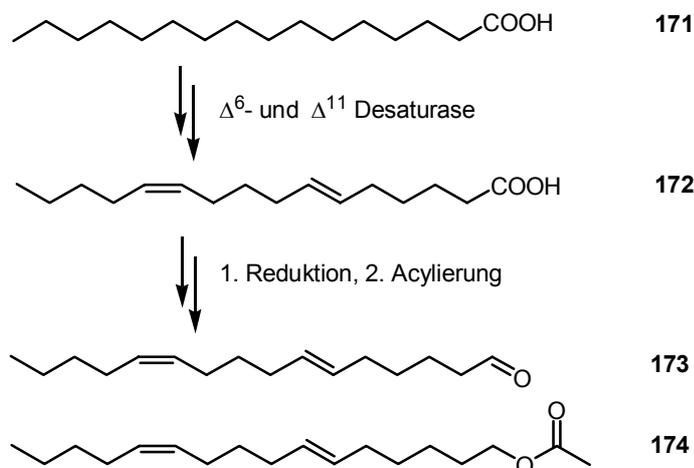


**Abbildung 104:** Bei Desaturierung und Hydroxylierung handelt es sich um eng miteinander verwandte Prozesse, die über eine gemeinsame Zwischenstufe verlaufen.

## Untersuchung von Desaturasen aus Insekten

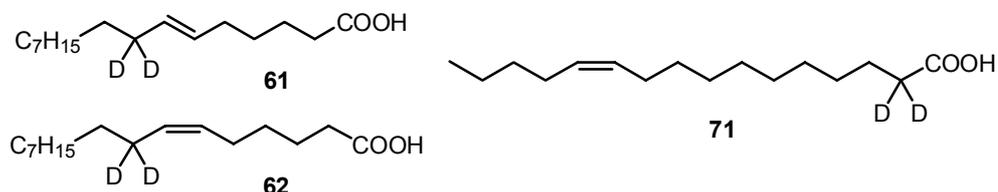
### Untersuchung der Pheromonbiosynthese in *A. polyphemus*

Untersucht wurden frühe Schritte der Pheromonbiosynthese des Wilden Seidespinner *Antheraea polyphemus*. Ausgehend von Palmitinsäure wurde ein Biosyntheseweg postuliert, der zu den beiden Hauptkomponenten des Pheromonbouquets **173** und **174** führt. Dieser Weg erfordert eine  $\Delta^6$ -(*E*)- sowie eine  $\Delta^{11}$ -(*Z*)-Desaturase (siehe Abbildung **105**). Durch Applikation der chiralen Fettsäure **22** an die Pheromondrüsen weiblicher Tiere und der Analyse der Metabolite mit GC/MS-Methoden wurden stereochemische Aspekte der  $\Delta^6$ -(*E*)-Desaturase untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym Doppelbindungen, wie die intensiv studierten (*Z*)-Fettsäuredesaturasen, durch *syn*-Eliminierung erzeugt.



**Abbildung 105:** Postulierte Biosynthese der Sexualpheromone von *Antheraea polyphemus*.

Um der Frage nachzugehen, welche der beiden Doppelbindungen zuerst in das Kohlenstoffgerüst von **172** eingeführt wird, wurden die synthetischen Monoenfettsäuren **61**, **62** und **71** hergestellt, mit denen sich in Zukunft die Reihenfolge der Pheromonbiosyntheseschritte aufklären lassen sollte (siehe Abbildung 106).



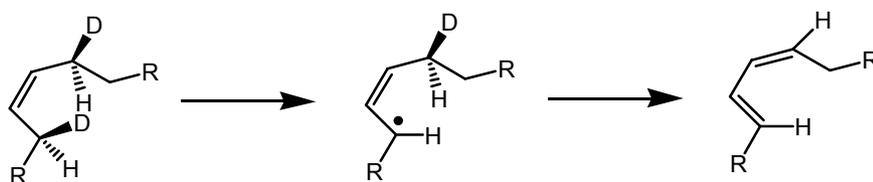
**Abbildung 106:** Isotopenmarkierte Palmitinsäuren **61**, **62** und **71** als Substratsonden für die Pheromonbiosynthese in *A. polyphemus*.

### (E/Z)-Desaturase aus *Argyrotaenia velutinana*

In Kooperation mit Prof. W. Roelofs (Cornell University, USA) wurde die mechanistische Untersuchung einer unspezifischen Fettsäuredesaturase aus *Argyrotaenia velutinana* begonnen. Zur Untersuchung der stereochemischen Aspekte dieses Enzyms wurde die chirale Tetradeconsäure **37** synthetisiert und in Fütterungsexperimenten eingesetzt. Eine ausführliche massenspektrometrische Analyse der Metabolite steht allerdings noch aus.

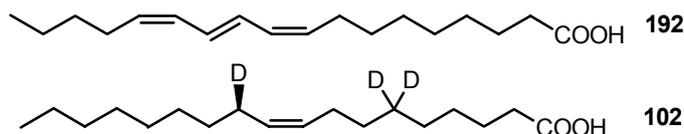
### Untersuchung einer Konjugase aus *Punica granatum*

Konjugasen, die eng mit Desaturasen verwandt sind, überführen eine bereits vorhandene Doppelbindung im Sinne einer 1,4-*syn*-Eliminierung in eine konjugierte Dieneinheit.



**Abbildung 107:** Mechanistisches Modell zur Bildung konjugierter Doppelbindungen.

Es sollten die stereochemischen Aspekte einer Konjugase, die an der Biosynthese von Punicinsäure **192** beteiligt ist, untersucht werden. Hierfür wurde die enantioselektiv deuterierte Octadecensäure **102** synthetisiert.



**Abbildung 108:** Punicinsäure (**192**) und die synthetische Substratsonde **102**.

Die Fütterungsversuche mit **102** werden gegenwärtig im Arbeitskreis von Prof. Feussner (Universität Göttingen) durchgeführt.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien und Geräte

#### Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-Spektren wurden mit einem Avance DRX 500 bzw. Bruker AV 400 aufgenommen.

Die chemische Verschiebung  $\delta$  wird in ppm, die Kopplungskonstante  $J$  = in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf das Lösungsmittel, das als interner Standard dient:  $^1\text{H-NMR}$ :  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  = 7.26 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  = 3.31;  $d_6$ -DMSO  $\delta$  = 2.50 ppm;  $d_6$ -Benzol  $\delta$  = 7.16 ppm.  $^{13}\text{C-Signal}$   $\text{CDCl}_3$   $\delta$  = 77.16 ppm;  $\text{CD}_3\text{OD}$   $\delta$  = 49.00 ppm;  $d_6$ -DMSO  $\delta$  = 39.52 ppm.

#### Massenspektrometrie (MS)

##### Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC-MS)

EI-GC/MS Spektren wurden bei einer Elektronenenergie von 70 eV mit folgendem Gerät aufgenommen:

- Finnigan Trace MS; GC-Säule: Alltech EC 5 15 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

Hochaufgelöste Massenspektren wurden entweder mit Direkteinlass oder unter Verwendung einer Kopplung mit einem Gaschromatographen aufgenommen:

- Micromass MassSpec 2 verbunden mit einem HP 6890 Gaschromatographen; GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .
- Micromass GC-TOF mit einem HP 6890 Gaschromatographen; GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

CI-Messungen mit Acetonitril zur Ionisierung mit einem reaction level  $m/z$  50 wurden an folgendem Ion-Trap-Gerät aufgenommen:

- Finnigan MAT Magnum; GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

CI-Messungen mit Isobutan zur Ionisierung wurden an folgendem Gerät aufgenommen:

- Micromass MassSpec 2 verbunden mit einem HP 6890 Gaschromatographen; GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu\text{m}$ .

##### Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS)

Für ESI-MS und APCI-MS Messungen wurden ein Ion-Trap Gerät bzw. ein Triplequadrupol-Massenspektrometer verwendet:

- Thermoquest LCQ mit ESI Ionenquelle; HPLC: HP 1100 System; analytische HPLC-Säule: GROM-SIL 120 ODS-5, 3µm, 125 x 2 mm, ST, Grom, Herrenberg.
- Micromass Quattro II mit APCI und ESI Ionenquelle; HPLC: HP 1100 System; analytische HPLC-Säule: GROM-SIL 120 ODS-5, 3µm, 125 x 2 mm, ST, Grom, Herrenberg.

### Infrarotspektrometrie (IR)

Infrarotspektren wurden mit einem Bruker Equinox 55 FTIR Spektrophotometer aufgenommen. Flüssige Substanzen wurden als Film mit NaCl-Platten und Feststoffe als KBr-Preßlinge gemessen.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für HPLC-Trennungen wurde ein Gilson HPLC 321 System, Entgaser, UV-Detektor benutzt. Für semipräparative Trennungen konnte ein Fraktionssammler (Gilson 206) benutzt werden.

Für HPL-Chromatographie wurden ausschließlich Lösungsmittel in HPLC-Qualität eingesetzt. Wasser wurde von einer Quarzdestillationsanlage entnommen.

### Analytische Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) der Firma Merck verwendet. Zur Detektion wurde die DC-Folie nach Anfärbung im Tauchbad mit dem Heißluftfön entwickelt.

Tauchbad: 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 1 g Cer(IV)sulfat, 6 ml Schwefelsäure, 65 ml Wasser.

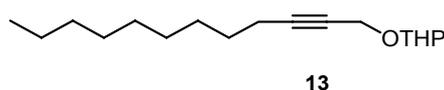
### Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde an Kieselgel von ICN (Silica 32-60, 60 Å) unter Druck (Flash-Chromatographie) durchgeführt. Die Eluenten sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

## 5.2 Synthese von Fettsäuren

### 1-(Tetrahydropyran-2-yloxy)-dodec-2-in (13)

In einem Rundkolben mit KPG-Rührer werden 250 ml Ammoniak einkondensiert und durch Zugabe kleiner Stücke Lithiumdraht bei -78 °C getrocknet. Sobald die blaue Farbe nicht mehr verschwindet, wird Eisen(III)-nitrat (50 mg) zugegeben. Zu der nun braunen Lösung wird Lithiumdraht (550 mg, 79 mmol) in Form kleiner, frisch geschnittener Stücke gegeben. Nach 45 Minuten ist die Amidbildung abgeschlossen, wobei sich eine weißgraue Suspension bildet.



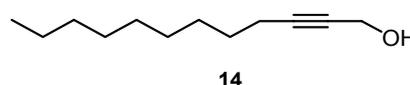
Bei -78 °C wird anschließend Propargyl-THP-Ether (10 g, 72 mmol) innerhalb von 15 min zugetropft. Die Suspension wird weitere 30 min mechanisch gerührt und Nonylbromid (15 g, 72 mmol) wird über einen Zeitraum von 20 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, wobei der Ammoniak verdampft. Der Rückstand wird in Wasser (150 ml) aufgenommen und mit Diethylether (3 x 75 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert.

Das Produkt wird ohne weitere Reinigung für die nächste Reaktion verwendet.

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[107]</sup>

### Dodec-2-in-1-ol (14)

Das ungereinigte 1-(Tetrahydropyran-2-yloxy)-dodec-2-in **13** wird in Methanol (100 ml) gelöst und mit einer Spatelspitze *p*-Toluensulfonsäure versetzt. Nach einer

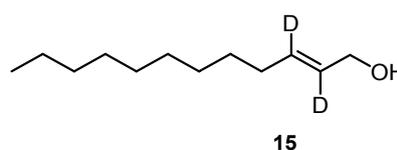


Stunde Rühren bei Raumtemperatur wird 1 ml Pyridin zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wird in Wasser (50 ml) aufgenommen und mit Diethylether (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Petrolether/Ether 4:1) wird der Alkohol **14** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 7,8 g (54 % über zwei Stufen)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[237]</sup>

### (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-en-1ol (15)

Innerhalb von 10 min wird bei 0 °C Dodec-2-in-1-ol **14** (7,6 g, 42 mmol) in abs. THF (25 ml) zu einer Suspension von Lithiumaluminiumdeuterid (2,1 g, 50 mmol) in abs. THF (100 ml) getropft. Das Reaktionsgemisch wird 2 h unter

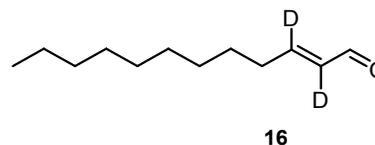


Rückfluss erhitzt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Vorsichtig werden D<sub>2</sub>O (2 ml) und DCI (10 ml, 36 %ige Lösung in D<sub>2</sub>O) zugetropft. Danach wird so lange 2 N HCl zugegeben, bis der Rückstand größtenteils aufgelöst ist. Die resultierende milchige Suspension wird mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser (25 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Ausbeute: 7,4 g (95 %)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[107]</sup>

### (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-en-1-al (**16**)

Zu einer Lösung von (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-en-1-ol (**15**) (7,4 g, 40 mmol) in Dichlormethan (90 ml) wird aktiviertes Mangan(IV)-oxid (Aldrich) (40 g, 460 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird 1 h unter Verwendung eines Circulus

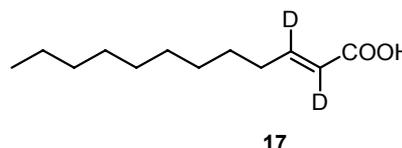


gerührt. Dann wird eine weitere Portion aktiviertes Mangan(IV)-oxid (10 g, 115 mmol) zugegeben. Nach insgesamt 2 h Reaktionszeit ist das Substrat vollständig umgesetzt. Man lässt das Mangan(IV)-oxid absetzen, dekantiert den Überstand ab und extrahiert den Rückstand noch 3 x mit je 100 ml Dichlormethan. Die vereinigten organischen Phasen werden über eine Schicht Celite filtriert, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (Petrolether/Ether 4:1) wird (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-en-1-al (**16**) als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 4,9 g (67 %)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[107]</sup>

### (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-ensäure (**17**)

Innerhalb von 15 min wird bei Raumtemperatur eine Lösung aus Natriumchlorit (22 g, 243 mmol) und Natriumdihydrogenphosphat (28,6 g, 238 mmol) in Wasser (160 ml) zu einer Lösung von (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-en-1-

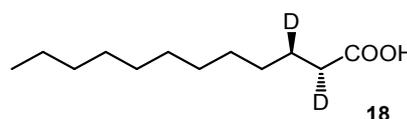


al (**16**) (4,9 g, 27 mmol) in *tert.*-Butanol (250 ml) und 1-Penten (50 ml) zugegeben. Die Lösung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser (100 ml) aufgenommen und mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumhydroxid-Lösung (3 x 100 ml, 1 M) ausgeschüttelt. Die vereinigten basischen Extrakte werden mit 6 N Salzsäure auf pH 2-3 angesäuert und mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert. Die Etherextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Produkt wird als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 4,9 g (92 %)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[89]</sup>

### (2R,3R)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodecansäure (**18**)

Das Natriumsalz von (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-ensäure (**17**) wird durch Lösen von (2E)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodec-2-ensäure (**17**) in einer äquimolaren Menge einer methanolischen NaOH-



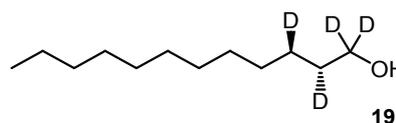
Lösung und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum gewonnen. Das Natriumsalz (1,5 g, 7,3 mmol) wird in Kaliumphosphat-Puffer (75 ml, 0,1 M, pH 7) gelöst und

in ein temperierbares Reaktionsgefäß gegeben. Methylviologen (22 mg, 0,07 mmol) und Tetracyclin (5 mg) werden zugegeben und die Lösung wird 1 h durch Einleiten von Helium entgast. Die Heliumatmosphäre wird durch Argon ersetzt und unter Vermeidung jeglichen Luftzutritts werden ca. 5 g Bakterienfeuchtmasse von *Clostridium tyrobutyricum* (Stamm C. La 1) zugegeben. Die Argonatmosphäre wird durch Wasserstoff ersetzt, und das Reaktionsgefäß wird mit einer wasserstoffgefüllten Bürette verbunden. Die Reaktionsmischung wird auf 35 °C temperiert und langsam geschüttelt, wobei sich der Inhalt nach kurzer Zeit tiefblau färbt. Nach 72 h ist kein weiterer Wasserstoffverbrauch mehr zu beobachten, und das Reaktionsgemisch wird mit Schwefelsäure (10 %) angesäuert. Mit Hilfe eines kontinuierlichen Extraktors wird die wässrige Phase über Nacht mit Diethylether extrahiert. Der organische Extrakt wird über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Ether (v:v, 1:2) wird das Produkt **18** als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 1,3 g (88 %)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein. <sup>[89]</sup>

### (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecanol (**19**)

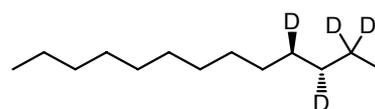
Bei 0 °C wird tropfenweise (2*R*,3*R*)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Dodecansäure (**18**) (1,3 g, 6,4 mmol) in abs. THF (5 ml) zu einer Suspension von Lithiumaluminiumdeuterid (580 mg, 13,8 mmol) in abs. THF (30 ml) gegeben. Die Suspension wird 4 h unter Rückfluß erhitzt und anschließend auf 0 °C gekühlt. Es werden tropfenweise Wasser (3 ml) und anschließend soviel halbkonzentrierte Salzsäure (6 N, 10-20 ml) zugegeben, bis sich der Niederschlag nahezu aufgelöst hat. Die wässrige Phase wird mit Diethylether (3 x 40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit ges. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 ml) und ges. Kochsalz-Lösung (40 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Ether (v:v, 1:2) wird der Alkohol **19** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1,1 g (89 %)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 0.90 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.26-1.35 (17 H, m), 1.48 (1 H, br m); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.23, 22.82, 25.34 (t, *J* = 19 Hz), 29.46, 29.48, 29.74 (2 C), 29.77, 29.80, 32.05, 32.24 (t, *J* = 19 Hz), 62.40 (quin, *J* = 22 Hz); HR-MS: C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>D<sub>4</sub> gefunden: 172,2122 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) berechnet: 172,2129; EI-MS *m/z* (%): 172 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 16), 141 (17), 129 (18), 112 (15), 98 (40), 87 (51), 84 (58), 70 (82), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 3320 (br), 2958, 2922, 2853, 2202, 2095, 1465, 1378, 1260, 1172, 1118, 969, 801.

### (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecylodid (20)

Triphenylphosphin (1,5 g, 5,8 mmol) und Imidazol (390 mg, 5,8 mmol) werden in Diethylether/Acetonitril (30 ml, v:v, 3:1) gelöst. Bei 0 °C wird über einen Zeitraum von 20 min Iod



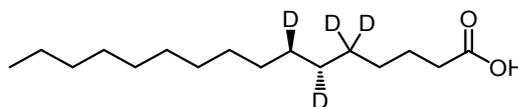
20

(1,5 g, 5,8 mmol) in kleinen Portionen zugegeben. Die Suspension wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 10 Minuten gerührt und wieder auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird der Alkohol 19 (1,0 g, 5,3 mmol) in Diethylether (5 ml) über einen Zeitraum von 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 h gerührt. Petrolether (30 ml) wird zugegeben, die obere Phase abdekantiert und anschließend Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 ml, 5 % in Wasser) zu dem Rückstand gegeben. Die wässrige Mischung wird mit Diethylether (3 x 20 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum konzentriert. Der resultierende Rückstand wird mit Pentan (2 x 30 ml) extrahiert und die vereinigten Pentanextrakte werden im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether wird das Produkt als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 1,2 g (76%)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 0.90 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.24-1.41 (17 H, m), 1.75 (1 H, d, *J* = 8.6 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 6.67 (quin, *J* = 23 Hz), 14.45, 23.75, 29.51, 30.48, 30.55, 30.68, 30.75 (2 C), 30.93 (t, *J* = 19 Hz), 31.13, 34.07 (t, *J* = 19 Hz); HR-MS: C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>D<sub>4</sub>I gefunden: 300,1254 (M<sup>+</sup>) berechnet: 300,1252; EI-MS *m/z* (%): 300 (M<sup>+</sup>, 7), 173 (58), 158 (10), 127 (7), 117 (9), 102 (12), 88 (32), 71 (52), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 2957, 2922, 2852, 2156, 1465, 1437, 1377, 1310, 1288, 1261, 1191, 1119, 997, 966, 911, 743, 721, 694.

### (6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (22)

Unter Argonatmosphäre wird in einem Schlenkkolben CuCN (2,5 mg, 0,03 mmol) und Iodbuttersäureisopropylester (1,28 g, 5 mmol) vorgelegt und mit Diethylzink (2 ml, 20 mmol)



22

versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 5 h auf 50 °C erhitzt, wobei sich ein schwarzer Niederschlag bildet. Anschließend werden das bei der Reaktion entstandene Ethyliodid und das überschüssige Diethylzink im Vakuum entfernt (1,5 h, 50 °C, 0,01 mbar). Man gibt abs. THF (3 ml) zu dem Rückstand und lässt die Suspension solange stehen (ca. 1,5 h), bis sich der Niederschlag abgesetzt hat.

Parallel wird eine Lösung von Me<sub>2</sub>Cu(CN) (MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Hierzu wird bei -30 °C MeMgCl-Lsg. (1,66 ml, 3 M in THF) zu einer Suspension von CuCN (225 mg, 2,5 mmol) in abs. THF/NMP (4 ml, v:v, 1:1) gegeben. Die dabei entstehende blassgelbe Lösung wird auf -

50 °C abgekühlt. Dann wird die Lösung des Zinkorganyls innerhalb von 5 min zugegeben. Die resultierende Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 3 min gerührt und auf -60 °C abgekühlt. Man gibt abs. NMP (2,5 ml) und (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecylidid (**20**) (450 mg, 1,5 mmol) in abs. THF (1 ml) zu und lässt die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Man fügt gesättigte NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (10 ml) zu, rührt für 10 min und filtriert dann über eine Schicht Celite. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird mit Diethylether (3 x 25 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Ether (v:v, 9:1) wird der Isopropylester von **22** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 220 mg (48%)

#### Spektroskopisch Daten des Isopropylesters von **22**:

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0,87 (3 H, t, *J* = = 6.8 Hz), 1.19-1.32 (26 H, m), 1.60 (2 H, quin. *J* = = 7.5 Hz), 2.24 (2 H, t, *J* = = 7.5 Hz), 4.99 (1 H, sept, 6.2 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.24, 21.99, 22.83, 25.16, 28.45 (quin., *J* = = 18 Hz), 28.89 (t, *J* = = 19 Hz), 29.05, 29.17 (t, *J* = = 18 Hz), 29.51, 29.67, 29.80 (2 C), 29.84 (2 C), 32.07, 34.89, 67.43, 173.59; HR-MS: C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>D<sub>4</sub>O<sub>2</sub> gefunden: M<sup>+</sup> 302,3122 berechnet: 302,3123; EI-MS *m/z* (%): 302 (M<sup>+</sup>, 14), 260 (88), 243 (37), 102 (100), 87 (15), 74 (21), 60 (52); IR (cm<sup>-1</sup>): 3448, 2981, 2958, 2853, 2179, 2143, 2096, 1733, 1467, 1455, 1419, 1374, 1340, 1310, 1252, 1177, 1145, 1110, 967, 897, 824, 722.

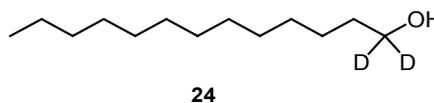
#### Darstellung der freien Säure **22**

(6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäureisopropylester (50 mg, 0,17 mmol) wird in 0,5 M wässrig-methanolischer KOH (Methanol/Wasser, v:v, 90:10, 4 ml) gelöst und 1 h auf 50 °C erhitzt. Die Lösung wird mit 2 N HCl auf pH 2-3 angesäuert und mit Hexan (3 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum konzentriert. Durch HPLC-Reinigung an einer RP18-Säule (Methanol:Wasser; Gradient: 90 % auf 100 % Methanol innerhalb von 20 min) wird die Fettsäure **22** in Form farbloser Kristalle erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0,88 (3H, t, *J* = = 7,0 Hz), 1.19-1.35 (20H, m) 1.63 (2H, quin, *J* = = 7.7 Hz), 2.34 (2H, t, *J* = = 7.7 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.26, 22.84, 24.80, 28.43 (quin, *J* = = 18 Hz), 28.86 (t, *J* = = 19 Hz), 29.00, 29.17 (t, *J* = = 19 Hz), 29.51, 29.68, 29.81 (2 C), 29.84 (2 C), 32.08, 34.21, 180.21; HR-MS: C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>D<sub>4</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 260,26529 (M<sup>+</sup>) berechnet: 260,26534; EI-MS *m/z* (%): 260 (M<sup>+</sup>, 100), 216 (15), 189 (10), 133 (27), 87 (26), 74 (52), 60 (63), 57 (82); IR (cm<sup>-1</sup>): 2955, 2916, 2850, 2175, 2096, 1686, 1470, 1461, 1435, 1429, 1408, 1350, 1294, 1220, 1107, 943, 891, 760, 720, 706.

### [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**)

Zu einer Suspension von Lithiumaluminiumdeuterid (1,0 g, 24 mmol, 98 % <sup>2</sup>H) in abs. THF (50 ml) wird bei 0 °C eine Lösung von Tridecansäuremethylester (10 g,

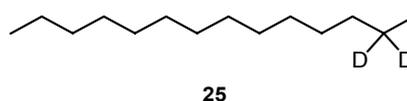


44 mmol) in abs. THF (20 ml) über einen Zeitraum von 10 min zugetropft. Die Mischung wird 1 h unter Rückfluß erhitzt; anschließend auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit Wasser (10 ml) versetzt. Der halb feste Rückstand wird mit 6 N HCl angesäuert, bis eine milchige Suspension resultiert. Es wird mit Diethylether (3 x 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Der Alkohol **24** wird als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 8,4 g (95 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.87 (3 H, t, *J* = 7.1, CH<sub>3</sub>), 1.22-1.36 (20 H, m, 10 x CH<sub>2</sub>), 1.38 (1 H, br s, OH), 1.54 (2 H, t, *J* = 7.2, CH<sub>2</sub>C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.24, 22.83, 25.84, 29.49, 29.59, 29.74, 29.76, 29.79, 29.80, 29.83, 32.06, 32.76, 62.46 (quin, *J* = 21.5, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>); HR-MS: C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>D<sub>2</sub> gefunden: 184.2159 (M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O) berechnet: 184,2160; EI-MS *m/z* (%): 184 (M<sup>+</sup> - H<sub>2</sub>O, 32) 156 (14), 112 (16), 97 (44), 84 (74), 70 (93), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 3305 (br), 2959, 2923, 2852, 1463, 1375, 1166, 1130, 1104, 1073, 962, 713.

### [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Iodtridecan (**25**)

Die Synthese von **25** erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (13,11 g, 50 mmol), Imidazol (3,40 g, 50 mmol), Iod (12,69 g, 50 mmol) in 200

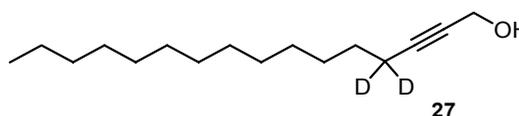


ml Diethylether/Acetonitril (200 ml, v:v, 3:1) sowie [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**) (7,4 g, 37 mmol) in Diethylether (10 ml). Ausbeute: 10,5 g (92 %); farbloses Öl.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.90 (3 H, t, *J* = 6.8, CH<sub>3</sub>), 1.21-1.33 (18 H, m, 9 x CH<sub>2</sub>), 1.38 (2 H, qui., *J* = 7.1, C(3)H), 1.83 (2 H, t, *J* = 7.4, CH<sub>2</sub>C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.08 (qui., *J* = 22.9, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 14.25, 22.83, 28.71, 29.50, 29.57, 29.70, 29.77, 29.79, 29.81, 30.61, 32.07, 32,51; HR-MS: C<sub>13</sub>H<sub>25</sub>D<sub>2</sub>I gefunden: 312.1295 (M<sup>+</sup>) berechnet: 312.1283; EI-MS *m/z* (%): 312 (M<sup>+</sup>, 14), 185 (45), 87 (28), 85 (32), 73 (34); 71 (56), 59 (40), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 2955, 2930, 2853, 1466, 1377, 1124, 1107, 978, 887, 721.

### [4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-2-in-1-ol (**27**)

Bei -78 °C wird Propargyl-THP-Ether (7,00 g, 50 mmol) innerhalb von 10 min zu einer mechanisch



gerührten Suspension von Lithiumamid (50 mmol) in 250 ml Ammoniak getropft. Die Mischung wird 1 h bei  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt. Dann werden nacheinander abs. Dimethylsulfoxid (100 ml) und das Iodid **25** (10 g, 32 mmol) über eine gekühlte Kanüle langsam zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, wobei der Ammoniak verdampft. Der Rückstand wird in Wasser (250 ml) aufgenommen und mit Diethylether (3 x 200 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit Wasser (50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird der THP-Ether von **27** als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 7 g (67 %)

#### Spektroskopische Daten des THP-Ethers:

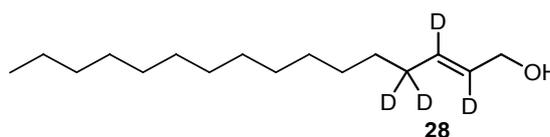
$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0,87 (3 H, t,  $J = 7.1$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1,16-1,89 (28H, m, 14 X  $\text{CH}_2$ ), 3,48-3,56 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_a\text{H}_b\text{O}$ ), 3,79-3,89 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_a\text{H}_b\text{O}$ ), 4,19 (1H, d,  $J = 15.2$ ,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OTHP}$ ), 4,28 (1H, d,  $J = 15.2$ ,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OTHP}$ ), 4,75 (2H, t,  $J = 3.6$ ,  $\text{CH}_2\text{CHO}_2$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.24 ( $\text{CH}_3$ ), 18.39 (quin,  $J = 20.17$ ,  $\text{CD}_2$ ), 19.30 ( $\text{CH}_2$ ), 22.83 ( $\text{CH}_2$ ), 25.56 ( $\text{CH}_2$ ), 28.57 ( $\text{CH}_2$ ), 28.97 ( $\text{CH}_2$ ), 29.29 ( $\text{CH}_2$ ), 29.49 ( $\text{CH}_2$ ), 29.68 ( $\text{CH}_2$ ), 29.77 ( $\text{CH}_2$ ), 29.79 ( $\text{CH}_2$ ), 29.80 ( $\text{CH}_2$ ), 29.82 ( $\text{CH}_2$ ), 30.47 ( $\text{CH}_2$ ), 32.06 ( $\text{CH}_2$ ), 54.78 ( $\text{CH}_2\text{OTHP}$ ), 62.13 ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ ), 75.90 ( $\text{C}_{\text{alkynyl}}$ ), 86.86 ( $\text{C}_{\text{alkynyl}}$ ), 96.77 ( $\text{CH}_2\text{CHO}_2$ ).

Die Abspaltung der THP-Schutzgruppe erfolgt analog zur Darstellung der Verbindung **14** mit dem THP-Ethers von **27** (6.5 g, 20 mmol) in Methanol (50 ml) und *p*-Toluolsulfonsäure (200 mg, 1 mmol). Ausbeute: 4,5 g (94 %), farblose Kristalle

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.87 (3 H, t,  $J = 6.9$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.40 (20 H, m, 10 x  $\text{CH}_2$ ), 1.45-1.51 (2 H, m,  $\text{CH}_2\text{C}^2\text{H}_2$ ), 1.63 (2 H, br s, OH), 4.24 (2 H, s,  $\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.24, 18.30 (qui.,  $J = 18.4$ ,  $\text{C}^2\text{H}_2$ ), 22.83, 28.57, 28.97, 29.30, 29.50, 29.66, 29.77, 29.79, 29.80, 29.83, 32.06, 51.56, 78.44, 86.77; HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{D}_2$  gefunden: 222.2316 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) berechnet: 222.2317; EI-MS  $m/z$  (%): 222 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 4), 137 (33), 123 (45), 113 (67), 95 (77), 83 (100), 69 (91); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3250 (br), 2954, 2914, 2852, 1472, 1259, 1091, 1042, 1024, 1006, 798.

#### **(2E)- [2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-ol (**28**)**

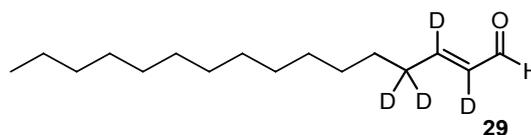
Die Synthese von (2E)- [2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-ol (**28**) erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **15** aus dem Alkohols **27** (4,5 g, 19 mmol) in abs. THF (20 ml) und Lithiumaluminiumdeuterid (0,95 g, 22.5 mmol, 98 %  $^2\text{H}$ ) in abs. THF (50 ml). Ausbeute: 4,1 g (88 %), farbloser Feststoff.



$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 7.0$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.38 (22 H, m, 11 x  $\text{CH}_2$ ), 4.08 (2 H, s,  $\text{CH}_2\text{OH}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.2, 22.84, 29.11, 29.29, 29.51, 29.66, 29.76, 29.81, 29.82, 29.83, 29.84, 31.44 (qui.,  $J = 19.4$ ,  $\text{C}^2\text{H}_2$ ), 32.08, 63.91, 128.59 (t,  $J = 23.8$ ,  $\text{C}^2\text{H}$ ), 133.25 (t,  $J = 23.1$ ,  $\text{C}^2\text{H}$ ); HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{D}_4$  gefunden: 244.27045 ( $\text{M}^+$ ), berechnet: 244.27042; EI-MS  $m/z$  (%): 244 ( $\text{M}^+$ , 9), 226 (14), 141 (8), 127 (13), 99 (45), 85 (63), 71 (55), 59 (100); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3298br, 2917, 2849, 1473, 1043, 1009, 713.

### (2E)-[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-al (29)

Die Darstellung von 29 erfolgte analog der Synthese von 16 mit dem Alkohol **28** (3.67 g, 15 mmol) in Dichlormethan (50 ml) und

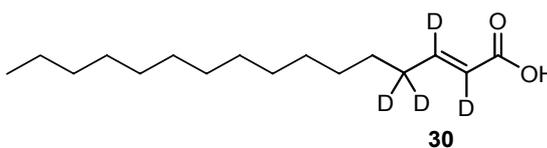


Mangan(IV)-oxid (15 g, 173 mmol) in 2 Portionen. Ausbeute: 2,87 g, 79 %, farblose Flüssigkeit.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.90 (3 H, t,  $J = 7.1$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.40 (20 H, m, 10 x  $\text{CH}_2$ ), 1.51 (2 H, br t,  $J = 7.0$ , C(5)H), 9.50 (1 H, s, CHO);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.22, 22.81, 27.81, 29.21, 29.47, 29.48, 29.63, 29.73, 29.77 (2 x  $\text{CH}_2$ ), 29.79, 31.96 (qui.,  $J = 19.4$ ,  $\text{C}^2\text{H}_2$ ), 32.04, 132.81 (t,  $J = 24.6$ , C(2)), 158.49 (t,  $J = 22.7$ , C(3)), 194.17 (CHO); HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{D}_4$  gefunden: 242.25461 ( $\text{M}^+$ ), berechnet: 242.25477; EI-MS  $m/z$  (%): ( $\text{M}^+$ , 25), 224 (16), 139 (22), 125 (36), 97 (51), 83 (67), 74 (100), 57 (92); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2955, 2913, 2845, 1692, 1665, 1601, 1468, 1395, 1171, 723.

### (2E)-[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-ensäure (30)

Die Darstellung von 30 erfolgte analog zur Synthese der Verbindung 17. Hierzu wurden eine Lösung aus Natriumchlorit (6,2 g, 55 mmol) und Natriumdihydrogenphosphat (8,0 g,



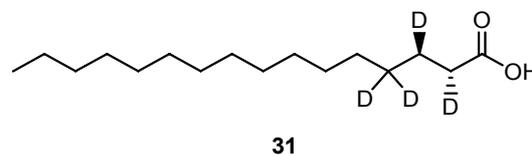
67 mmol) in Wasser (50 ml) sowie eine Lösung des Aldehyds 29 (1,81 g, 7.5 mmol) in tert.-Butanol (70 ml) und 1-Penten (15 ml) eingesetzt. Ausbeute: 1,73 g (89 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 6.9$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.19-1.36 (20 H, m, 10 x  $\text{CH}_2$ ), 1.45 (2 H, m,  $\text{CH}_2$ ), 11.84 (1 H, br s, COOH);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.24, 22.84, 27.86, 29.24, 29.51, 29.53, 29.67, 29.77, 29.80, 29.81, 29.83, 31.58 (qui.,  $J = 18.5$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2$ ), 32.08, 120.48 (t,  $J = 24.6$ , C(2)), 152.14 (t,  $J = 23.1$ , C(3)), 172.48 (COOH); HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{D}_4\text{O}_2$  gefunden: 258.24952 ( $\text{M}^+$ ), berechnet: 258.24969; EI-MS  $m/z$  (%): 258

( $M^+$ , 13), 240 (39), 197 (12), 130 (18), 116 (27), 102 (41), 98 (49), 84 (49), 70 (58), 57 (100); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2963, 2923, 2848, 2662, 2555, 1681, 1468, 1419, 1290, 1059, 931, 789, 718.

### (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]-Hexadecansäure (**31**)

Durch Zugabe einer äquimolaren Menge einer methanolischen NaOH-Lösung zu der Carbonsäure und anschließendem Entfernen des Lösungsmittels wird das Natriumsalz von **30** hergestellt.



Zur Reduktion des Natriumsalzes mit Hilfe der Enoatreduktase aus *Clostridium tyrobutyricum* wurde wie bei der Synthese der Verbindung **18** verfahren. Hierbei wurden das Natriumsalz von **30** (1 g, 3,9 mmol) in Kaliumphosphat-Puffer (50 ml, 0,1 M, pH 7), Methylviologen (15 mg, 0,05 mmol), Tetracyclin (3 mg) und 5 g Bakterienfeuchtmasse von *Clostridium tyrobutyricum* (Stamm C. La 1) eingesetzt. Ausbeute: 0,75 g (81 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 7.1$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.37 (22 H, m, 12 x  $\text{CH}_2$ ), 1.59 (1 H, d,  $J = 8.4$ ,  $\text{CH}_2$ ), 2.32 (1 H, d,  $J = 8.4$ ,  $\text{CH}_2$ ), 11.25 (1H, br s,  $\text{COOH}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.27, 22.85, 24.21 (t,  $J = 19.4$ , C(3)), 28.26 (qui.,  $J = 29.3$ ,  $\text{C}^2\text{H}_2$ ), 29.17, 19.52, 29.54, 29.76, 29.80, 29.81, 29.83, 29.84, 29.85, 32.09, 33.82 (t,  $J = 19.4$ , C(2)), 180.57 ( $\text{COOH}$ ); HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{D}_4\text{O}_2$  gefunden: 260.26551 ( $M^+$ ), berechnet: 260.26534; EI-MS  $m/z$  (%): 260 ( $M^+$ , 100), 214 (14), 133 (30), 119 (10), 74 (41), 57 (42); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2964, 2954, 2916, 2848, 1698, 1471, 1353, 1312, 1296, 1257, 1221, 940, 675.

#### Bestimmung der Enantiomerenreinheit: <sup>[85, 88]</sup>

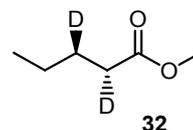
Zu einer Lösung von (2*R*,3*S*)-[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]-Hexadecansäure (32 mg, 0.12 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, 0,5 mg) in Dichlormethan (1 ml) werden bei  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  (S)-(+)-Mandelsäuremethylester (10 mg, 0,12 mmol) und Dicyclohexylcarbodiimid (25 mg, 0,12 mmol) gegeben. Die Mischung wird 4 h bei  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  gerührt, über eine Schicht Celite filtriert und dann im Vakuum konzentriert. Man nimmt den Rückstand in Methylenchlorid (2 ml) auf, filtriert erneut über eine Schicht Celite und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird der Mandelsäurediester von **31** erhalten.

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in  $\text{d}_6$ -Benzol wurde unter Einstrahlung auf das Proton bei 1,6 ppm aufgenommen, um die Kopplung der beiden Protonen von C(2) und C(3) zu unterdrücken. Das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum zeigt für das (2*R*)-Proton ein intensives Singulett bei 2.20 ppm und ein schwaches Signal für das (2*S*)-Proton bei 2.24 ppm. Aus dem Verhältnis der

Signalflächen wurde im Rahmen der Messgenauigkeit der Enantiomerenüberschuss zu ee >97 % bestimmt.

### (2*R*,3*R*)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (**32**)

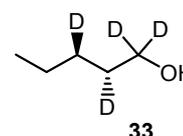
(2*R*,3*R*)-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäure<sup>9</sup> (2 g, 19 mmol) wird in Diethylether (5 ml) gelöst und mit einer Lösung von Diazomethan in Diethylether titriert, bis die Gelbfärbung nicht mehr verschwindet. Man lässt die Lösung 30 min bei Raumtemperatur stehen und entfernt anschließend das Lösungsmittel durch Destillation. (2*R*,3*R*)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (**32**) wird als farbloses Öl erhalten und wird ohne weitere Reinigung für die nachfolgende Synthese verwendet. Ausbeute: 2 g (88 %)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.87 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.29 (2 H, m), 1.54 (1 H, m), 2.24 (1 H, m), 3.60 (3 H, s); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 13.69, 22.20, 26.66 (t, *J* = 19 Hz), 33.48 (t, *J* = 19 Hz), 51.41, 174.35; HR-MS: C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 118,0968 (M<sup>+</sup>) berechnet: 118,0963; EI-MS *m/z* (%): 118 (M<sup>+</sup>, 1), 89 (20), 87 (33), 75 (100), 59 (19); IR (cm<sup>-1</sup>): 2959, 2933, 2904, 2875, 2164, 1744, 1436, 1338, 1247, 1198, 1174, 1077.

### (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**)

Zu einer Suspension von Lithiumaluminiumdeuterid (0,43 g, 10 mmol, 98 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>) in abs. Diethylether (10 ml) wird eine Lösung von (2*R*,3*R*)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (2 g, 17 mmol) in abs. Diethylether (10 ml) bei 0 °C langsam getropft. Die Reaktionsmischung wird zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird H<sub>2</sub>O (2 ml) vorsichtig zugetropft und dann 2 N HCl (5 ml) zugegeben. Die resultierende Suspension wird mit Diethylether (3 x 10 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird über eine kurze Vigreuxkolonne destillativ entfernt und (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**) als farblose Flüssigkeit erhalten. **33** wird ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt. Ausbeute: 1.1 g (71 %)

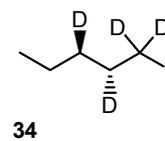


<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.87 (3 H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.29 (2 H, m), 1.49 (1 H, m), 2.04 (1H, OH), <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.13, 22.49, 27.48 (t, *J* = 19 Hz), 31.89 (t, *J* = 19 Hz), 62.35 (quin, *J* = 22 Hz); HR-MS: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>D<sub>4</sub> gefunden: 74,1030, (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) berechnet: 74,1034; EI-MS *m/z* (%): 74 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 100), 59 (72), 58 (63), 57 (51), 56 (30); IR (cm<sup>-1</sup>): 3340 (br), 2959, 2920, 2874, 2201, 2160, 2093, 1463, 1378, 1289, 1260, 1235, 1172, 1155, 1113, 969, 904.

<sup>9</sup> Die Fettsäure wurde von Michael Schöttler im Rahmen seiner Dissertation 1993 hergestellt.

**(2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyljodid (34)**

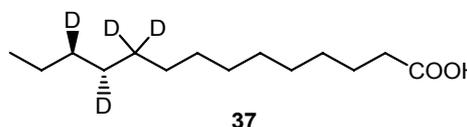
Triphenylphosphin (3,9 g, 15 mmol) und Imidazol (1,0 g, 15 mmol) werden in Diethylether/Acetonitril (60 ml, v:v, 3:1) gelöst. Bei 0 °C wird über einen Zeitraum von 20 min Iod (3,8 g, 15 mmol) in 4 Portionen zugegeben. Die Suspension wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 10 min gerührt und wieder auf 0 °C abgekühlt. Anschließend wird (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**) (1.15 g, 12.5 mmol) über einen Zeitraum von 10 min zugetropft und das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wird über Celite filtriert und die Reaktionslösung wird im Vakuum zur Hälfte eingengt. Der Rückstand wird mit Pentan (3 x 50 ml) extrahiert. Durch destillatives Entfernen des Lösungsmittels über eine Drehband-Kolonnen wird (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyljodid als gelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1,5 g (59 %)



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.90 (3 H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.27-1.39 (3 H, m), 1.79 (1 H, m); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 6.93 (quin, *J* = 23 Hz), 14.00, 21.69, 29.84, 32.25 (t, *J* = 19 Hz), 32.74 (t, *J* = 19 Hz); HR-MS: C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>D<sub>4</sub>I gefunden: M<sup>+</sup>, 202,0155 berechnet: 202,0157; EI-MS *m/z* (%): 202 (M<sup>+</sup>, 55), 158 (18), 127 (38), 75 (100), 58 (13); IR (cm<sup>-1</sup>): 2958, 2929, 2872, 2157, 1463, 1378, 1261, 1116, 1029, 990, 927, 864, 740.

**(11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (37)**

Wie bei der Darstellung der Verbindung **22** beschrieben, werden Iodnonansäuremethylester (1,49 g, 5 mmol) mit Diethylzink (1,5 ml, 15 mmol) zum entsprechenden Zinkorganyl umgesetzt.



Parallel wird eine Lösung von Me<sub>2</sub>Cu(CN) (MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Hierzu wird bei 0 °C MeMgCl-Lsg. (5 ml, 1M in THF) zu CuCN (225 mg, 2,5 mmol) gegeben. Die dabei entstehende blassgelbe Lösung wird auf -50 °C gekühlt. Dann wird die THF-Lösung des Zinkorganyls innerhalb von 5 min zugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 3 min gerührt und auf -60 °C abgekühlt. Man gibt abs. NMP (2,5 ml) und (2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyljodid (**34**) (300 mg, 1,5 mmol) in abs. THF (1 ml) zu und lässt die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Zur Aufarbeitung wird wie für die Synthese von **22** beschrieben verfahren. Ausbeute: 200 mg (54 %), farbloses Öl.

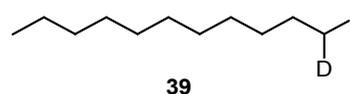
Der Methylester **36** wird mit LiOH in THF/Wasser (v:v, 3:1) verseift und **36** in Form farbloser Kristalle erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 7.4 Hz), 1.18-1.38 (16 H, m), 1.63 (2 H, quin, *J* = 7.5 Hz), 2.35 (2 H, t, *J* = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.23, 22.72, 24.84, 28.78 (t, *J* = 19 Hz), 28.82 (quin, *J* = 19 Hz), 29.21, 29.39, 29.58 (2 C), 29.74

(2 C), 31.49 (t,  $J = 19$  Hz), 34.16, 180.00; HR-MS des Methylesters:  $C_{15}H_{26}D_4O_2$  gefunden: 246.2497 ( $M^{+}$ ) berechnet: 246.2497; EI-MS des Methylesters  $m/z$  (%): 246 ( $M^{+}$ , 14), 215 (14), 203 (24), 143 (34), 129 (10), 87 (92), 74 (100), 55 (12); IR ( $cm^{-1}$ ): 2954, 2915, 2871, 2848, 2172, 1701, 1410, 1301, 1262, 1228, 1195, 941.

### [1- $^2H_1$ ]-Undecyliodid (**39**)

Zu einer Suspension von Lithiumaluminiumdeuterid (1,26 g, 30 mmol, 98 %  $^2H$ ) in abs. THF (100 ml) wird eine Lösung von



Undecanal (17g, 100 mmol) in abs. THF (40 ml) bei 0 °C langsam zugetropft. Die Reaktionsmischung wird eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird  $H_2O$  (10 ml) vorsichtig zugetropft und dann solange 1 N HCl (ca. 40 ml) zugegeben, bis sich der gebildete Niederschlag fast aufgelöst hat. Es wird mit Diethylether (3 x 75 ml) extrahiert; die vereinigten organischen Phasen werden mit ges.  $NaHCO_3$ -Lösung (50 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. [1- $^2H_1$ ]-Undecanol wird als farbloser Feststoff erhalten und kann ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt werden. Ausbeute: 16 g (93 %)

#### Spektroskopische Daten von [1- $^2H_1$ ]-Undecanol:

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 6.9$  Hz), 1.19-1.39 (16 H, m), 1.56 (2 H, q,  $J = 7.0$  Hz), 3.62 (1 H, tt,  $J = 6.6, 1.4$  Hz);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.27, 22.83, 25.86, 29.49, 29.59, 29.75, 29.77, 32.06, 32.86, 62.89 (t,  $J = 21$  Hz); HR-MS:  $C_{11}H_{21}D$  gefunden: 155.1788 ( $M^{+}-H_2O$ ) berechnet: 155.1784; EI-MS  $m/z$  (%): 155 ( $M^{+}-H_2O$ , 26 %), 126 (13), 112 (17), 98 (38), 97 (37), 84 (70), 83 (54), 70 (100), 69 (78), 56 (81), 55 (70); IR ( $cm^{-1}$ ): 3360 (br), 2959, 2934, 2920, 2852, 2148, 1466, 1379, 1351, 1301, 1122, 1067, 908, 735.

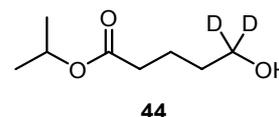
#### Umsetzung zum Iodid **39**:

Die Synthese von **39** erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (27 g, 102 mmol), Imidazol (6,9 g, 102 mmol) und Iod (26 g, 102 mmol) in Diethylether/Acetonitril (400 ml, v:v, 3:1) sowie [1- $^2H$ ]-Undecanol (16 g, 92 mmol). Ausbeute: 22 g (84 %)

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.90 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz), 1.23-1.47 (16 H, m), 1.79 (2 H, q, 7.3 Hz), 3.21 (1H, m);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.91 (t,  $J = 23$  Hz,  $CD_2$ ), 14.46, 23.74, 29.63, 30.47, 30.58, 30.68, 30.71, 31.46, 33.07, 34.65; HR-MS:  $C_{11}H_{22}DI$  gefunden: 283,0903 ( $M^{+}$ ) berechnet: 283,0907; EI-MS  $m/z$  (%): 283 ( $M^{+}$ , 15), 156 (27), 128 (20), 114 (5), 100 (12), 86 (33), 71 (71), 57 (100); IR ( $cm^{-1}$ ): 2959, 2917, 2850, 1466, 1378, 1061, 725.

**[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (44)**

Bei 0 °C wird in 10 min Superdeuterid (30 ml, 1M in THF) zu einer Lösung von Valeriansäuremonomethylester (1,5 g, 10 mmol) in abs. THF (75 ml) getropft. Die Lösung wird für weitere 60 min bei 0

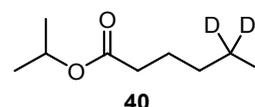


°C gerührt und anschließend tropfenweise mit isopropanolischer HCl (dargestellt aus 18 ml Isopropanol und 2 g Acetylchlorid) versetzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wird in Diethylether (100 ml) aufgenommen. Die etherische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Das Produkt wird als blaugelbes Öl erhalten und wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.23 (6H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.71 (3H, m, CH<sub>2</sub>, OH), 2.31 (2H, t, *J* = 7.2 Hz), 5.00 (1H, sept, *J* = 6.2 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 21.17, 21.98, 32.01, 34.40, 61.68 (quin, *J* = 22 Hz), 67.75, 173.46; HR-MS: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 102,0656 (M<sup>+</sup>-60) berechnet: 102,0650; EI-MS *m/z* (%): 102 (M<sup>+</sup>-60, 47), 70 (20), 58 (100), 57 (18); IR (cm<sup>-1</sup>): 2982, 2937, 2870, 2202, 2104, 1730, 1375, 1257, 1176, 1108, 1055, 966, 819, 736.

**[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Iodpentansäureisopropylester (40)**

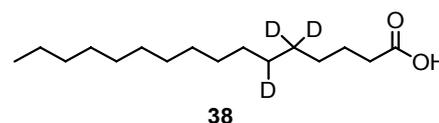
Die Synthese des Iodids **40** erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (3,14 g, 12 mmol), Imidazol (0,82 g, 12 mmol) und Iod (3,05 g, 12 mmol) in Acetonitril/Ether (50 ml, v:v, 3:1), sowie [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (**44**) (1,6 g, 10 mmol). Ausbeute: 1,9 g (71 % über zwei Stufen), farbloses Öl.



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.23(6H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.72 (2H, quin, *J* = 7.4 Hz), 1.84 (2H, br t, *J* = 7.6 Hz), 2.29 (2H, t, *J* = 7.4 Hz), 5.00 (1H, sept, *J* = 6.2 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5.72 (quin, *J* = 23 Hz), 22.00, 25.94, 32.66, 33.61, 67.82, 172.76; HR-MS: C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>D<sub>2</sub>OI gefunden: M<sup>+</sup> 212.97447 berechnet: 212.97454; EI-MS *m/z* (%): 213 (M<sup>+</sup>, 37), 185 (18), 128 (17), 103 (100), 85 (17), 57 (51), 43 (83); IR (cm<sup>-1</sup>): 2980, 2961, 2916, 2849, 1732, 1463, 1449, 1374, 1255, 1165, 1146, 1108, 986, 933, 891, 823.

**rac-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (38)**

Wie bei der Darstellung der Verbindung **22** beschrieben, werden [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Iodpentansäureisopropylester (1,36 g, 5 mmol) mit



Diethylzink (2 ml, 20 mmol) zum entsprechenden Zinkorganyl umgesetzt.

In der Zwischenzeit wird eine Lösung von  $\text{Me}_2\text{Cu}(\text{CN})$  ( $\text{MgCl}_2$ ) hergestellt. Hierzu wird bei 0 °C  $\text{MeMgCl}$ -Lsg. (5 ml, 1M in THF) zu  $\text{CuCN}$  (225 mg, 2,5 mmol) gegeben. Die dabei entstehende blaugelbe Lösung wird auf -50 °C gekühlt. Dann wird die THF-Lösung des Zinkorganyls innerhalb von 5 min zugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 3 min gerührt und auf -60 °C abgekühlt. Man gibt abs. NMP (2,5 ml) und  $[1\text{-}^2\text{H}_1\text{-}]\text{-Undecyliodid}$  (**39**) (1,42 g, 5 mmol) in abs. THF (1 ml) zu und lässt die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Zur Aufarbeitung wird wie für die Synthese von **22** beschrieben verfahren. Ausbeute: 450 mg (60 %), farbloses Öl.

#### Spektroskopische Daten des Isopropylesters von **38**:

HR-MS:  $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{D}_3\text{O}_2$  gefunden: 301.30597 ( $\text{M}^{+}$ ), berechnet: 301.30601; EI-MS  $m/z$  (%): 301 ( $\text{M}^{+}$ , 8), 259 (96), 242 (42), 215 (7), 132 (15), 102 (100), 60 (54), 43 (73).

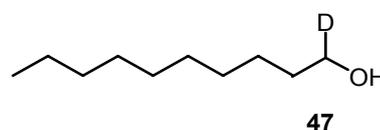
#### Darstellung der freien Säure **38**:

Wie für die Synthese der Verbindung **22** beschrieben wird *rac*- $[5,5,6\text{-}^2\text{H}_3\text{-}]\text{-Hexadecansäureisopropylester}$  (**46**) mit 0,5 M methanolischer KOH verseift und mittels RP-HPLC gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3H, t,  $J = 6.8$  Hz), 1.20-1.35 (21H, m), 1.63 (2H, quin,  $J = 7.5$  Hz), 2.34 (2 H, t,  $J = 7.5$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.25, 22.84, 24.80, 28.46 (quin,  $J = 18$  Hz), 28.96 (t,  $J = 19$  Hz), 28.99, 29.51, 29.59, 29.77, 29.80, 29.82, 29.83, 29.85, 32.08, 34.16, 179.88; EI-MS  $m/z$  (%): 259 ( $\text{M-H}^{+}$ , 100), 215 (16), 132 (35), 74 (50), 60 (65), 57 (63), 43 (70); HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{D}_3\text{O}_2$  gefunden: 259.25913 ( $\text{M}^{+}$ ) berechnet: 259.25906; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 2915, 2848, 2173, 2141, 2094, 1701, 1470, 1460, 1430, 1409, 1294, 1220, 1111, 943, 891, 718.

#### **[1- $^2\text{H}_1$ ]-Decanol (**47**)**

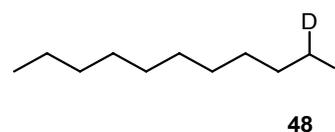
Die Darstellung von **47** erfolgte analog der Synthese der Verbindung **39** durch Reduktion von Decanal (15,6 g, 100 mmol) in abs THF (40 ml) mit Lithiumaluminiumdeuterid (1,26 g, 30 mmol, 98 %  $^2\text{H}_2$ ) in abs. THF (100 ml). Ausbeute: 15,1 g (95 %), farbloser Fetstoff.



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.87 (3 H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.20-1.37 (14 H, m), 1.54 (2 H, q,  $J = 7.4$  Hz), 1,82 (s, 1H), 3.60 (1 H, t,  $J = 6.6$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.21, 22.80, 25.86, 29.45, 29.57, 29.69, 29.75, 32.02, 32.80, 62.78 (t,  $J = 22$  Hz); HR-MS:  $\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{D}$  gefunden: 141.1621 ( $\text{M}^{+}\text{-H}_2\text{O}$ ) berechnet: 141.1628; EI-MS  $m/z$  (%): 141 ( $\text{M}^{+}\text{-H}_2\text{O}$ , 8), 112 (51), 98 (50), 84 (82), 70 (100), 56 (98); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3370 (br), 2958, 2924, 2853, 2149, 1466, 1378, 1135, 1066, 942, 722.

**[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decyliodid (48)**

Die Synthese des Iodids **48** erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (21 g, 79 mmol), Imidazol (5,4 g, 79 mmol) und Iod (20 g, 79 mmol) in

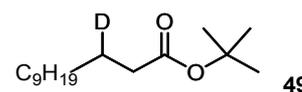


Diethylether/Acetonitril (300 ml, v:v, 3:1), sowie dem Alkohol **47** (11 g, 72 mmol). Ausbeute: 16,8 g (87 %), farbloses Öl.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.18-1.45 (14 H, m), 1.81 (2 H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.17 (1 H, t, *J* = 7.1 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7.38 (t, *J* = 23 Hz), 14.26, 22.83, 28.70, 29.43, 29.58, 29.66, 30.63, 32.03, 33.62; HR-MS: C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>DI gefunden: 269,0742 (M<sup>+</sup>) berechnet: 269,0751; EI-MS *m/z* (%): 269 (M<sup>+</sup>, 3%), 156 (25), 142 (18), 127 (13), 100 (16), 86 (72), 85 (45), 72 (55), 71 (47), 58 (66), 57 (100), 55 (42); IR (cm<sup>-1</sup>): 2957, 2922, 2852, 1465, 1377, 1124, 1101, 721.

**[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Dodecansäure-*tert*-butylester (49)**

Zu einer Lösung von Essigsäure-*tert*-butylester (2,3 g, 20 mmol) in abs. THF (40 ml) wird bei -78 °C eine Lösung von Lithiumdiisopropylamid (10 ml, 20 mmol, 2M in THF) getropft. Die

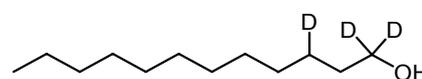


Lösung wird weitere 15 min gerührt und Dodecyliodid (2,7 g, 10 mmol) in abs. THF (10 ml) zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 45 min bei -78 °C gerührt, anschließend über einen Zeitraum von 6 h auf -20 °C und schließlich über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Man säuert mit Salzsäure (1N in Wasser) an und extrahiert mit Diethylether (3 x 50 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (40 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Ether (v:v, 9:1) wird das Produkt als blassgelbes Öl erhalten. Ausbeute: 1,75 g (68 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.21-1.33 (17 H, m), 1.44 (9 H, s), 2.19 (2 H, d, *J* = 7.3 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.26, 22.83, 24.91 (t, *J* = 23 Hz), 28.27, 29.15, 29.43, 29.48, 29.64, 29.75 (2 C), 32.06, 35.71, 80.02, 173.54; HR-MS: C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>DO<sub>2</sub> gefunden: 202.1915 (M<sup>+</sup>-55), berechnet: 202.1917; EI-MS *m/z* (%): 202 (M<sup>+</sup>-55, 77 %), 184 (52), 157 (5), 141 (7), 130 (7), 98 (8), 71 (13), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 2959, 2924, 2854, 2152, 1734, 1456, 1392, 1367, 1259, 1211, 1151, 969, 848, 805, 740.

**[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (50)**

Die Synthese von [1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (**50**) erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **24** durch

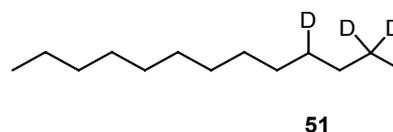
**50**

Reduktion von [3-<sup>2</sup>H]-Dodecansäure-*tert*-butylester (**49**) (1,6 g, 6,2 mmol) in abs. THF (5 ml) mit Lithiumaluminiumdeuterid (170 mg, 4 mmol, 98 % <sup>2</sup>H) in abs. THF (10 ml). Ausbeute: 970 mg (82 %), farbloses Öl.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 6.8 Hz), 1.20-1.36 (17 H, m), 1.54, (2 H, br d, *J* = 5.5 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.27, 22.84, 25.44 (t, *J* = 19 Hz), 29.50 (2 C), 29.75 (2 C), 29.78, 29.81, 32.07, 32.67, 62.50 (quin, *J* = 22 Hz); HR-MS: C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>D<sub>3</sub> gefunden: 171.2069 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O) berechnet: 171.2066; EI-MS *m/z* (%): 171 (M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O, 2), 141 (9), 113 (17), 100 (27), 98 (45), 86 (46), 84 (69), 70 (100), 57 (83); IR (cm<sup>-1</sup>): 3330 (br), 2958, 2923, 2853, 2201, 2134, 2088, 1466, 1378, 1149, 1260, 1149, 967, 800.

### [1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecyljodid (**51**)

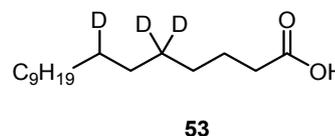
Die Synthese von [1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecyljodid (**51**) erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (1,3 g, 5,1 mmol), Imidazol (0,35 g, 5,1 mmol) und Iod (1,3 g, 5,1 mmol) in Diethylether/Acetonitril (20 ml, v:v, 3:1), sowie dem Alkohol **50** (800 mg, 4,2 mmol) in Diethylether (2 ml). Ausbeute: 1,0 g (79 %), farbloses Öl.



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 0,90 (3 H, t, *J* = 7,0 Hz), 1.24-1.37 (17 H, m), 1.77 (2 H, br d, *J* = 6.8 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ (ppm) = 6.80 (quin, *J* = 23 Hz), 14.45, 23.74, 29.52, 30.47, 30.54, 30.66, 30.74 (2 C), 31.01 (t, *J* = 19 Hz), 33.07, 34.42; HR-MS: C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>D<sub>3</sub>I gefunden: 299.1186 (M<sup>+</sup>) berechnet: 299.1189; EI-MS *m/z* (%): 299 (M<sup>+</sup>, 1), 172 (17), 157 (20), 127 (13), 116 (8), 102 (10), 88 (22), 71 (49), 57 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 3000, 2957, 2852, 2152, 1464, 1434, 1109, 1089, 1027, 998, 981, 742, 697.

### *rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**)

Wie bei der Darstellung der Verbindung **22** beschrieben, werden Iodbuttersäureisopropylester (1,28 g, 5 mmol) mit Diethylzink (1 ml, 10 mmol) zum entsprechenden Zinkorganyl umgesetzt.



In der Zwischenzeit wird eine Lösung von Me<sub>2</sub>Cu(CN) (MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Hierzu wird bei 0 °C MeMgCl-Lsg. (5 ml, 1M in THF) zu CuCN (225 mg, 2,5 mmol) gegeben. Die dabei entstehende blassgelbe Lösung wird auf -50 °C gekühlt. Dann wird die THF-Lösung des Zinkorganyls innerhalb von 5 min zugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 3 min gerührt und auf -60 °C abgekühlt. Man gibt abs. NMP (2,5 ml) und [1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecyljodid (**51**) (450 mg, 1,5 mmol) in abs. THF (1 ml) zu und lässt die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Zur Aufarbeitung wird wie für die Synthese von **22** beschrieben verfahren. Ausbeute: 260 mg (57 %), farbloses Öl

Spektroskopische Daten des Isopropylesters von **53**:

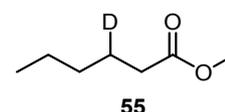
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J$  = 7.0 Hz), 1.18-1.35 (27 H, m), 1.60 (2 H, quin,  $J$  = 7.5 Hz), 2.24 (2 H, t,  $J$  = 7.5 Hz), 5.00 (1H, sept,  $J$  = 6.2 Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.23, 21.98 (2 C), 22.82, 25.14, 28.55 (quin,  $J$  = 19 Hz), 29.07, 29.26 (t,  $J$  = 19 Hz), 29.30, 29.50, 29.69, 29.79, 29.83 (2 C), 32.06, 34.88, 67.40, 173.54; HR-MS:  $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{D}_3\text{O}_2$  gefunden: 301,3061 ( $\text{M}^{+}$ ) berechnet: 301,3060; EI-MS  $m/z$  (%): 301 ( $\text{M}^{+}$ , 10), 259 (100), 242 (40), 216 (7), 132 (13), 102 (90), 85 (13), 71 (19), 60 (54); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2980, 2958, 2923, 2853, 2179, 2135, 2098, 1735, 1466, 1374, 1253, 1177, 1145, 968, 896, 824.

Der Isopropylester von **53** wurde wie für die Synthese der Verbindung **22** beschrieben mit methanolischer KOH zur Fettsäure **53** verseift und mittels RP-HPLC gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 1.18-1.39 (21 H, m), 1.63 (2 H, quin,  $J$  = 7.5 Hz), 2.35 (2 H, t,  $J$  = 7.5 Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.27, 22.85, 24.78, 28.53 (quin,  $J$  = 18 Hz), 29.01, 29.27 (t,  $J$  = 19 Hz), 29.28, 29.52, 29.70, 29.80, 29.81, 29.84, 29.85, 32.08, 34.24, 180.41; HR-MS:  $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{D}_3\text{O}_2$  gefunden: 259,2590 ( $\text{M}^{+}$ ), berechnet: 259,2591; EI-MS  $m/z$  (%): 259 ( $\text{M}^{+}$ , 100), 216 (16), 188 (9), 157 (6), 132 (30), 100 (11), 85 (15), 73 (43), 60 (43), 57 (36); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2954, 2915, 2848, 2171, 2132, 2090, 1701, 1462, 1369, 1295, 1220, 1103, 941, 891, 717.

**[3- $^2\text{H}_1$ ]-Hexansäuremethylester (**55**)**

Bei 0 °C werden CuCl (1 g, 10 mmol), Tetrabutylammoniumfluorid (5 ml, 1 M Lösung in THF) und Triphenylphosphin (2,62 g, 10 mmol) in abs. Dimethylacetamid (200 ml) gelöst und 10 min gerührt. Dann wird



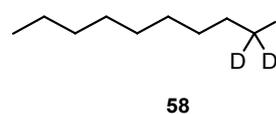
PhSiMe<sub>2</sub>D (8.2 g, 6 mmol) über einen Zeitraum von 5 min zugegeben und die Mischung wird weitere 30 min gerührt. Anschließend wird Hex-2-ensäuremethylester (6,4 g, 50 mmol) zugetropft, das Kältebad entfernt und die Mischung weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung gießt man die Reaktionslösung auf 1 N HCl (200 ml) und extrahiert mit Diethylether (3 x 200 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden über Natrumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird das Produkt als farblose Flüssigkeit erhalten. Ausbeute: 4.19 g (64 %)

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 1.23-1.37 (4 H, m), 1.59 (1 H, m), 2.28 (2 H, d,  $J$  = 7.6 Hz), 3.65 (3 H, s);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.05, 22.44, 24.44 (t,  $J$  = 19 Hz), 31.37, 34.15, 51.58, 174.51; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2957, 2930, 2875, 2859, 2163, 1745, 1465, 1436, 1380, 1270, 1194, 1172, 1021, 978, 923, 785, 737; HR-MS:

$C_7H_{13}D_2O_2$  gefunden: 131.1057 ( $M^{+}$ ) berechnet: 131.1057; EI-MS  $m/z$  (%): 131 ( $M^{+}$ , 2), 100 (43), 88 (60), 74 (100), 59 (14).

### [1,1- $^2H_2$ ]-Iodnonan (**58**)

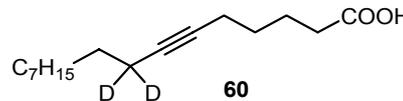
Die Synthese von [1,1- $^2H_2$ ]-Iodnonan (**58**) erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (14.41 g, 55 mmol), Imidazol (3,74 g, 55 mmol) und Iod (14 g, 55 mmol) in Diethylether/Acetonitril (240 ml, v:v, 3:1) sowie [1,1- $^2H_2$ ]-Nonan-1-ol (7,3 g, 50 mmol). Ausbeute: 12,2 g (95 %), farbloses Öl.



$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.91 (3 H, t,  $J$  = 7.0 Hz), 1.23-1.45 (12 H, m), 1.79 (2 H, t,  $J$  = 7.3 Hz);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.81 (quin,  $J$  = 23 Hz), 14.43, 23.72, 29.64, 30.36, 30.55, 31.43, 33.01, 34.53; HR-MS:  $C_9H_{17}D_2I$  gefunden: 256,0652 ( $M^{+}$ ) berechnet: 256,0657; EI-MS  $m/z$  (%): 256 ( $M^{+}$ , 8), 157 (28), 129 (28), 87 (73), 73 (100), 71 (80), 59 (55), 57 (88), 55 (49), 45 (33); IR ( $cm^{-1}$ ): 2957, 2942, 2852, 2153, 1464, 1377, 1340, 1121, 1105, 974, 886, 741, 720.

### [8,8- $^2H_2$ ]-Hexadec-6-insäure (**60**)

Zu einer Lithiumamidsuspension (40 mmol) in 300 ml flüssigem Ammoniak werden bei  $-60$  °C nacheinander Hept-6-insäure (2 g, 16 mmol) und abs. THF (30 ml) gegeben und 1 h (KPG-Rührer) gerührt. Dann wird [1,1- $^2H_2$ ]-Iodnonan (5,12 g, 20 mmol) in abs. THF (15 ml) innerhalb von 10 min zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, wobei der Ammoniak verdampft. Der Rückstand wird in Eiswasser (200 ml) aufgenommen, mit 6 N HCl auf pH 3 angesäuert und mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 1:2) wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 2,5 g (62 %)

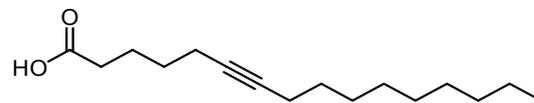


$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0,88 (3 H, t,  $J$  = 7.1 Hz), 1.21-1.40 (14 H, m), 1.45 (2 H, m), 1.54 (2 H, m), 1.74 (2 H, m), 2.18 (2 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 2.38 (2 H, t, 7.4 Hz);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.23, 18.29 (quin,  $J$  = 20 Hz), 18.58, 22.82, 23.95, 28.54, 28.97, 29.06, 29.31, 29.43, 29.65, 32.03, 33.73, 79.43, 80.97, 180.13; HR-MS (des Methylesters):  $C_{17}H_{28}D_2O_2$  gefunden: 268,2369 ( $M^{+}$ ) berechnet: 268,2371; EI-MS (des Methylesters)  $m/z$  (%): 268 ( $M^{+}$ , 1), 156 (40), 124 (21), 96 (65), 82 (100), 69 (14), 55 (15); IR ( $cm^{-1}$ ): 3105 (br), 2962, 2912, 2870, 2847, 2109, 2085, 1685, 1469, 1450, 1430, 1406, 1369,

1346, 1322, 1310, 12280, 1264, 1245, 1206, 1178, 1138, 1077, 1033, 1008, 948, 916, 865, 751, 730, 679.

### Hexadec-6-ensäure

Zu einer Lithiumamidlösung (400 mmol) in 500 ml flüssigem Ammoniak wird bei -78 °C Undec-1-in (25 g, 164 mmol) in THF (20 ml) innerhalb von 10

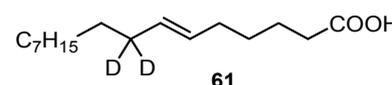


min gegeben und 45 min mechanisch gerührt. Dann wird 5-Bromvaleriansäure (29.69 g, 164 mmol) in abs. THF (20 ml) innerhalb von 10 min zugetropft und abs. THF (50 ml) wird über eine vorgekühlte Kanüle zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt, wobei der Ammoniak verdampft. Zur Aufarbeitung wird wie für die Synthese von **60** beschrieben verfahren. Ausbeute: 23 g (54 %), farbloser Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 6.9$  Hz), 1.17-1.41 (12 H, m), 1.46 (2 H, q,  $J = 7.4$  Hz), 1.54 (2 H, quin,  $J = 7.2$  Hz), 1.74 (2 H, quin,  $J = 7.8$  Hz), 2.12 (2 H, m), 2.18 (2 H, m), 2.38 (2 H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.24, 18.60, 18.89, 22.83, 23.97, 28.56, 29.04, 29.27, 29.31, 29.44, 29.66, 32.03, 33.66, 79.43, 81.03, 179.70; HR-MS (des Methylesters):  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{O}_2$  gefunden: 266,2256 ( $\text{M}^{+}$ ) berechnet: 266,2246; EI-MS (des Methylesters)  $m/z$  (%): 266 ( $\text{M}^{+}$ , 1), 154 (81), 124 (40), 94 (91), 80 (100), 67 (42), 55 (22); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2963, 2956, 2914, 2847, 1689, 1469, 1311, 1263, 1206, 900, 730.

### (*E*)-[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (**61**)

[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure **60** (100 mg, 0,4 mmol) wird in abs. Diethylether (5 ml) gelöst und in einen Autoklaven (50 ml Inhalt) gegeben. Die Lösung wird auf -30 °C gekühlt und



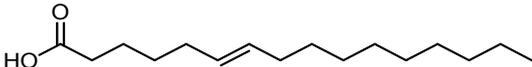
eine Lösung von Natrium (350 mg, 15 mmol) in flüssigem Ammoniak (15 ml) zugegeben. Der Autoklav wird verschlossen und die Reaktionsmischung wird 36 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Autoklav auf -30 °C gekühlt, geöffnet und der Inhalt in ein Becherglas gegeben. Man lässt den Ammoniak verdampfen, nimmt den Rückstand in Eiswasser auf und säuert mit 6 N HCl an. Die wässrige Lösung wird mit Diethylether (3 x 10 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Ausbeute: 90 mg, (89 %)

Mittels HPLC an einer semipräparativen RP18-Säule (Methanol/Wasser, Gradient: 90 % nach 100 % Methanol innerhalb von 20 min) wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J = 6.8$  Hz), 1.18-1.35 (14 H, m), 1.40 (2 H, quin,  $J = 7.5$  Hz), 1.64 (2 H, quin,  $J = 7.6$  Hz), 2.00 (2 H, dt,  $J = 5.5, 7.2$  Hz), 2.35 (2 H, t,  $J$

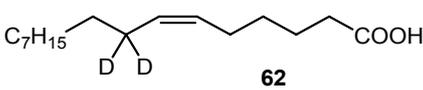
= 7.5 Hz), 5.31-5.44 (2 H, m);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.27, 22.83, 24.28, 29.10, 29.27, 29.49, 29.57, 29.68, 29.74, 32.06, 32.29, 33.99, 129.61, 131.15, 179.84; HR-MS (des Methylesters):  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{D}_2\text{O}_2$  gefunden: 270,2525 ( $\text{M}^{**}$ ) berechnet: 270,2528; EI-MS  $m/z$  (%): 270 ( $\text{M}^+$ , 8), 238 (47), 196 (40), 154 (25), 139 (16), 125 (27), 111 (30), 97 (92), 84 (87), 74 (100), 69 (42), 55 (42); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2956, 2927, 2850, 2176, 1711, 1437, 1325, 1303, 1252, 1203, 1104, 1089, 965, 897, 879, 718.

### (E)-Hexadec-6-ensäure (139)

Die Darstellung von **139** erfolgte aus Hexadec-6-ensäure (100 mg, 0,4 mmol) analog zur  Synthese von (E)-[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (**61**). Ausbeute: 90 mg (90 %).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.89 (3 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 1.21-1.49 (16 H, m), 1.57 (2 H, quin,  $J$  = 7.5 Hz), 1.93-2.06 (4H, m), 2.35 (2 H, t,  $J$  = 7.4 Hz), 5.31-5.48 (2 H, m);  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.22, 22.83, 24.33, 29.16, 29.34, 29.49, 29.68, 29.76, 29.77, 32.07, 32.27, 32.72, 34.01, 129.60, 131.26, 179.72; HR-MS (des Methylesters):  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$  gefunden: 268,2400 ( $\text{M}^+$ ) berechnet: 268,2402; EI-MS  $m/z$  (%): 268 ( $\text{M}^{**}$ , 12), 236 (55), 194 (50), 152 (38), 123 (36), 110 (40), 97 (62), 74 (100), 69 (48), 55 (70); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2963, 2930, 2848, 1712, 1469, 1303, 1274, 1254, 1203, 1113, 1068, 964, 944, 900, 717.

### (6Z)-[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (62)

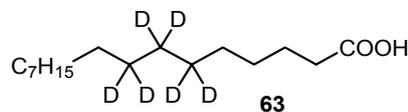
Nickelacetat Tetrahydrat (31,2 mg, 0,13 mmol) wird in Ethanol (1 ml) suspendiert und mit Natriumborhydrid (5 mg, 0,13 mmol) in Ethanol (100  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Der Kolben  wird mit Wasserstoff gespült und Ethylendiamin (17  $\mu\text{l}$ ) sowie [8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (**60**) (254 mg, 1 mmol) in Ethanol (1 ml) zugegeben. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur, unter Wasserstoffatmosphäre, wird über Celite filtriert. Das Filtrat wird mit Wasser (5 ml) verdünnt und mit Diethylether (3 x 5 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 1:2) wird das Produkt als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 200 mg (82 %)

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.88 (3 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 1.21-1.35 (14 H, m), 1.41 (2 H, quin,  $J$  = 7.6 Hz), 1.66 (2 H, quin,  $J$  = 7.6 Hz), 2.05 (2 H, m), 2.36 (2 H, t,  $J$  = 7.5 Hz), 5.29-5.40 (2 H, m);  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.25, 22.83, 24.46, 26.94, 29.26, 29.42, 29.49, 29.69, 29.72, 29.75, 32.06, 33.95, 129.14, 130.65, 179.27; HR-MS (als Methylester):  $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{D}_2\text{O}_2$  gefunden: 270,2527 ( $\text{M}^{**}$ ) berechnet: 270,2528; EI-MS (als Methylester)  $m/z$  (%): 270 ( $\text{M}^+$ , 7), 238 (52), 196 (42), 154 (30), 139 (18), 125 (30), 111 (32),

97 (95), 84 (94), 74 (100), 69 (47), 55 (46); IR (cm<sup>-1</sup>): 3005, 2958, 2922, 2853, 2190, 2098, 1711, 1465, 1411, 1289, 1229, 1153, 938, 722.

### [6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecansäure (**63**)

Trockenes THF wird durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen (freeze-pump-thaw-Methode) entgast und auf -30 °C gekühlt. NaI (0,15 g, 1 mmol), Wilkinson-Katalysator

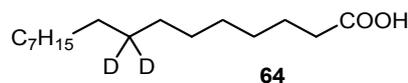


(Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>RhCl (20 mg) und [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**60**) (254 mg, 1 mmol) werden zugegeben. Über einen Ballon wird Deuterium eingeleitet und das Kältebad wird entfernt. Die Mischung wird über Nacht bei 30 °C gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Man nimmt den Rückstand in Pentan auf, filtriert über eine Schicht Celite und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Mittels HPLC an einer semipräparativen RP-18-Säule (Methanol/Wasser, Gradient: 90 % nach 100 % Methanol innerhalb von 20 min) wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 238 mg (91 %).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0,88 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.20-1.38 (18 H, m), 1.63 (2 H, quin, *J* = 7.5 Hz), 2.35 (2 H, t, *J* = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.26, 22.84, 24.85, 28.50 (m), 29.15, 29.18, 29.52, 29.58, 29.80, 29.81, 29.86, 32.09, 34.16, 179.92; HR-MS: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>D<sub>6</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 262,2778 (M<sup>+</sup>) berechnet: 262,2779; EI-MS *m/z* (%): 262 (M<sup>+</sup>, 100), 217 (13), 191 (7), 158 (6), 133 (17), 117 (5), 100 (7), 87 (12), 74 (33); IR (cm<sup>-1</sup>): 3433 (br), 2958, 2916, 2849, 2195, 2081, 1705, 1466, 1432, 1408, 1355, 1316, 1291, 1267, 1205, 1112, 1079, 1049, 940, 890, 743.

### [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**64**)

Die Synthese von [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**64**) erfolgte analog der Darstellung der Verbindung **63** mit Wasserstoff als Reduktionsmittel. NaI (0,15 g, 1 mmol),



Wilkinson-Katalysator (Ph<sub>3</sub>P)<sub>3</sub>RhCl (20 mg) und [8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**60**) (254 mg, 1 mmol) wurden zur Darstellung von **64** eingesetzt. Ausbeute: 232 mg (90 %), farbloser Feststoff.

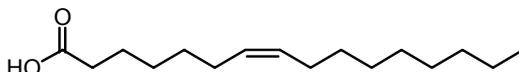
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0,88 (3 H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.17-1.38 (22 H, m), 1.63 (2 H, quin, *J* = 7.3 Hz), 2.35 (2 H, t, *J* = 7.6 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.25, 22.85, 24.85, 28.95 (quin, *J* = 19 Hz), 29.23, 29.41, 29.52, 29.54 (2 C), 29.62, 29.79, 29.81, 29.81, 29.86, 32.09, 34.28, 180,47; HR-MS: C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 258,2532 (M<sup>+</sup>), berechnet: 258,2529; EI-MS *m/z* (%): 258 (M<sup>+</sup>, 100), 215 (16), 187 (7), 173 (6), 129 (14),

115 (5), 99 (7), 85 (8), 73 (35); 3055 (br), 2955, 2914, 2851, 2166, 2086, 1700, 1469, 1432, 1409, 1321, 1288, 1238, 1202, 1086, 984, 896, 720.

### (7Z)-Hexadec-7-ensäure (67b)

Bromheptansäuretriphenylphosphoniumsalz (**65**)

(3 g, 6.2 mmol) wird in abs. THF (50 ml)



suspendiert und auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Hierzu wird innerhalb von 10 min eine Lösung von *Bis*-(trimethylsilyl)-kaliumamid (6.8 mmol, 13,6 ml, 0,5 M in Toluol) getropft. Das Kältebad wird entfernt, und die orange-rote Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt. Die Mischung wird weitere 30 min gerührt und wieder auf  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Nonanal (0,85 g, 6 mmol) wird innerhalb von 5 min zugegeben, und die Reaktionslösung wird innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wird 1 N HCl (30 ml) zugegeben und mit Diethylether (3 x 30 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung (20 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird der Methylester von **65** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 0,65 g (40 %).

#### Spektroskopische Daten des Methylesters:

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.87 (3 H, t,  $J = 6.9$  Hz), 1.18-1.40 (16 H, m), 1.62 (2 H, m), 2.01 (4 H, m), 2.30 (2 H, t,  $J = 7.7$  Hz), 3.66 (3 H, s), 5.26-5.44 (2 H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.26, 22.83, 25.01, 27.14, 27.38, 28.94, 29.46, 29.47, 29.51, 29.67, 29.90, 32.05, 34.22, 51.59, 129.60, 130.36, 174.43; IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2956, 2924, 2854, 1744, 1689, 1464, 1435, 1377, 1363, 1267, 1250, 1147, 1119, 1011, 722.

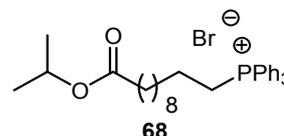
Der Methylester (400 mg, 1,5 mmol) wird in THF/Wasser (3:1, 12 ml) gelöst und mit LiOH (100 mg, 4,5 mmol) versetzt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 1 N HCl auf pH 2-3 gebracht. Man extrahiert mit Diethylether, trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Petrolether/Ether 1:1) wird das Produkt als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 340 mg (90 %).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta = 0.88$  (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 1.21-1,40 (m, 16H), 1.64 (m, 2H), 2.02 (m, 4H), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.27-5.41 (m, 2H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta = 14.25$  ( $\text{CH}_3$ ), 22.83 ( $\text{CH}_2$ ), 24.72 ( $\text{CH}_2$ ), 27.11 ( $\text{CH}_2$ ), 27.38 ( $\text{CH}_2$ ), 28.84 ( $\text{CH}_2$ ), 29.46 ( $\text{CH}_2$ ), 29.47 ( $\text{CH}_2$ ), 29.49 ( $\text{CH}_2$ ), 29.67 ( $\text{CH}_2$ ), 29.90 ( $\text{CH}_2$ ), 32.05 ( $\text{CH}_2$ ), 34.20 ( $\text{CH}_2$ ), 129.53 (CH), 130.42 (CH), 180.40 (CO).; HR-MS (des Methylesters):  $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_2$  gefunden: 268,2410 ( $\text{M}^{+\bullet}$ ) berechnet: 268,2402; EI-MS (des Methylesters)  $m/z$  (%): 268 ( $\text{M}^{+\bullet}$ , 8), 236 (55), 218 (9), 194

(41), 152 (32), 137 (28), 123 (35), 110 (41), 96 (100), 83 (68), 74 (91), 55 (91); IR (cm<sup>-1</sup>): 3005, 2959, 2921, 2853, 1712, 1465, 1435, 1411, 1276, 1219, 1119, 1067, 941, 722.

### Bromundecansäureisopropylester-Triphenylphosphoniumsalz (68)

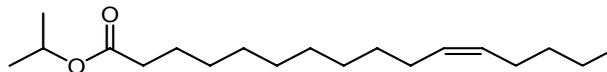
Bromundecansäureisopropylester (6,14 g, 20 mmol) und Triphenylphosphin (5,76 g, 22 mmol) werden zusammengegeben und für 30 min auf 120 °C erhitzt. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und nimmt den glasartigen Rückstand in 4 ml Dichlormethan auf. Man wäscht die resultierende Mischung mit Diethylether (20 ml) und trocknet das Wittig-Salz über Phosphorpentoxid im Exsikkator. Ausbeute: 9 g (79 %).



<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 1.02 (16 H, m), 1.39-1.58 (6 H, m), 2.10 (2 H, t, *J* = 7.6 Hz), 3.52-3.62 (2 H, m), 4.85 (1 H, sept, *J* = 6.3 Hz), 7.56-7.63 (6 H, m), 7.65-7.76 (9 H, m); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 21.66 (2 C), 22.43, 22.48, 22.97, 24.78, 28.80, 28.88, 28.91, 29.04, 30.21 (d, *J* = 15 Hz), 34.48, 67.09, 118.16 (d, *J* = 86 Hz), 130.39 (d, *J* = 12 Hz), 133.46 (d, *J* = 10 Hz), 134.91 (d, *J* = 3 Hz), 173.14.

### (Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (70)

Zu dem Wittigsalz **68** (2,5 g, 4,4 mmol) in abs. THF wird bei -78 °C eine Lösung von Kaliumhexamethylsilylamid (9,7 ml, 0,5 M

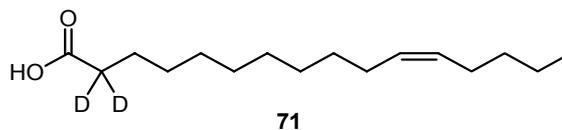


in Toluol) innerhalb von 10 min getropft. Das Kältebad wird entfernt und die Mischung wird für weitere 60 min gerührt. Dann wird die orange-rote Lösung erneut auf -78 °C gekühlt und Valeraldehyd (567 mg, 6,6 mmol) in abs. THF (5 ml) wird tropfenweise zugegeben. Man lässt die Mischung innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur kommen und gibt dann 1 N HCl (25 ml) zu. Man extrahiert mit Diethylether (3 x 25 ml), trocknet die vereinigten organischen Extrakte über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Ausbeute: 790 mg (61 %)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 0.89 (3 H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.22 (6 H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.24-1.37 (16 H, m), 1.60 (2 H, quin, *J* = 7.2 Hz), 2.01 (4 H, m), 2.24 (2 H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.00 (1 H, sept, *J* = 6.4 Hz), 5.28-5.39 (2 H, m); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 14.14, 21.99 (2 C), 22.48, 25.19, 27.05, 27.33, 29.26, 29.40 (2 C), 29.57, 29.61, 29.89, 32.11, 34.88, 67.44, 130.00 (2 C), 173.59; HR-MS: C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 296.2716 (M<sup>+</sup>) berechnet: 296.2715; EI-MS *m/z* (%): 296 (M<sup>+</sup>, 12), 237 (68), 217 (10), 194 (15), 151 (21), 137 (23), 123 (25), 111 (42), 97 (72), 83 (85), 69 (71), 55 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 2958, 2853, 1730, 1466, 1418, 1374, 1259, 1179, 1144, 1110, 1027, 966, 895, 823, 741, 697.

**(Z)-[2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-11-ensäure (71)**

(Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (70) (196 mg, 1 mmol) wird in 2 ml d<sub>1</sub>-Methanol gelöst und nach Zugabe von frisch geschnittenem Na (30 mg) für 15 min unter

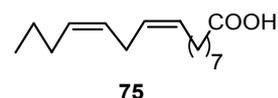


Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Man gibt erneut d<sub>1</sub>-Methanol (2 ml), erhitzt unter Rückfluss (15 min) und entfernt das Lösungsmittel. Diese Prozedur wird ein weiteres Mal wiederholt. Dann wird der Rückstand mit DCI (36 % in D<sub>2</sub>O, 2 ml) behandelt und die wässrige Phase wird mit Chloroform (3 x 2 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Florisil mit Diethylether/Petrolether (v:v, 2:1) wird das Produkt als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 150 mg (58 %), Markierungsgrad anhand des Massenspektrums: 82 % <sup>2</sup>H<sub>2</sub>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ = 0.88 (3 H, t, J = 7.2 Hz), 1.20-1.42 (16 H, m), 1.60 (2 H, m), 2.01 (4 H, m), 5.28-5.39 (2 H, m); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ = 14.12, 22.48, 24.97, 27.05, 27.33, 29.24, 29.39 (2 C), 29.55, 29.60, 299.89, 32.11, 130.00, 130.01, 174.54; HR-MS (als Methylesters): C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>D<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 270,2527 (M<sup>+</sup>) berechnet: 270,2528; EI-MS (als Methylester) m/z (%): 270 (M<sup>+</sup>, 7), 238 (51), 194 (30), 152 (23), 125 (21), 112 (25), 97 (51), 83 (45), 81 (29), 76 (43), 69 (72), 55 (100).

**(9Z,12Z)-Hexadeca-9,12-diensäure (75)**

Zu einer Suspension von Propan-1,3-bis-(triphenylphosphonium)-bromid (0,76 g, 1 mmol) in abs. THF (20 ml) wird bei -78 °C innerhalb von 10 min eine Lösung von Kaliumhexamethyldisilylamid (1,1 mmol,



2,2 ml, 0,5 M in Toluol) gegeben. Die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 30 min gerührt und wieder auf -78 °C abgekühlt. Dann wird Butanal (72 mg, 1.0 mmol) in abs. THF (2 ml) innerhalb von 5 min zugegeben. Das Kältebad wird entfernt, die Mischung wird 15 min bei Raumtemperatur gerührt und erneut auf -78 °C abgekühlt. 9-Oxononansäuremethylester (0,20 g, 1,1 mmol) in abs. THF (1 ml) wird langsam zugegeben und die Reaktionsmischung wird innerhalb von 2 h auf Raumtemperatur erwärmt. Man gibt 1 N HCl (10 ml) zu und extrahiert mit Diethylether (3 x 25 ml). Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird der Methylester von **75** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 110 mg (42 %)

Durch Verseifung des Methylesters mit 3 Äquivalenten LiOH in THF:Wasser (3:1) wird die Fettsäure **75** gewonnen.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 0.91 (t,  $J=7.4$  Hz, 3H), 1.26-1.36 (m, 8H), 1.37 (sext,  $J= 7.4$  Hz, 2H), 1.64 (quint,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.04 (m, 4H), 2.35 (t,  $J=7.5$  Hz, 2H), 2.77 (t,  $J=6.0$  Hz, 2H), 5.29-5.43 (m, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  = 13.95 ( $\text{CH}_3$ ), 22.95 ( $\text{CH}_2$ ), 24.84( $\text{CH}_2$ ), 25.80 ( $\text{CH}_2$ ), 27.33 ( $\text{CH}_2$ ), 29.18 ( $\text{CH}_2$ ), 29.22 ( $\text{CH}_2$ ), 29.29 ( $\text{CH}_2$ ), 29.45 ( $\text{CH}_2$ ), 29.73 ( $\text{CH}_2$ ), 33.86 ( $\text{CH}_2$ ), 128.23 (CH), 128.28 (CH), 130.11 (CH), 130.19 (CH), 178.30 (CO); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3010, 2928, 2856, 1708, 1462, 1413, 1377, 1285, 935, 723; EI-MS  $m/z$  (%): 252 (41,  $\text{M}^+$ ), 123 (10), 109 (24), 95 (40), 81 (72), 67 (100), 55 (47); HR-MS: gefunden: 252.2090 ( $\text{M}^+$ ); berechnet  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2$  252.2089.

### Allgemeine Synthesevorschrift der *bis*-Wittig-Olefinierung

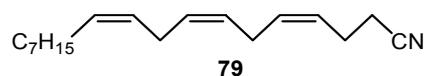
Das Wittigsalz Hex-3-enyl-1,6-bis(triphenylphosphoniumiodid) (0,86 g, 1 mmol) wird in abs. THF (20 ml) suspendiert und auf  $-78$  °C gekühlt. Eine Lösung von Kaliumhexamethyldisilylamid (4.4 ml, 2,2 mmol, 0,5 M in Toluol) wird über einen Zeitraum von 10 min zugegeben, das Kältebad wird entfernt und die Mischung wird auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird erneut auf  $-78$  °C gekühlt.

In der Zwischenzeit wird der entsprechende Methylester (1 mmol) in Diethylether (5 ml) gelöst und auf  $-78$  °C gekühlt. Über eine vorgekühlte Kanüle wird DIBAL-H (1 ml, 1 mmol, 1M in Hexan) innerhalb von 5 min zugegeben. Die Mischung wird solange (10-60 min) gerührt, bis die GC/MS-Kontrolle die vollständige Reduktion des Esters zeigt.

Über eine gekühlte Umdruckkanüle wird die Lösung des Alumoacetals zu der auf  $-78$  °C gekühlten *bis*-Ylidlösung transferiert. Die resultierende Mischung wird innerhalb von 60 min auf Raumtemperatur erwärmt, 30 min bei dieser Temperatur gerührt und wieder auf  $-78$  °C gekühlt. Dann wird eine Lösung der zweiten Aldehydkomponente (1,2 mmol) in abs. THF (1 ml) zugegeben. Das Kältebad wird entfernt und man lässt die Mischung auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wird mit 2 N HCl angesäuert. Man extrahiert mit Diethylether (3 x 20 ml), trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird das homokonjugierte Trien erhalten.

### (4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triennitril (79)

Die Darstellung von **79** gelingt nach der allgemeinen Vorschrift der *bis*-Wittig-Olefinierung mit Octansäuremethylester (0,158 g, 1 mmol) und 3-

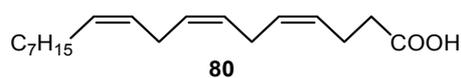


Cyanopropanal<sup>[134]</sup>: (100 mg, 1,2 mmol). Das Produkt wird säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 2:1) gereinigt und als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 100 mg (39 %).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  = 0.88 (3 H, t,  $J$  = 7.0 Hz), 1.21-1.40 (10 H, m), 2.05 (2 H, q,  $J$  = 6.9 Hz), 2.35-2.47 (4 H, m), 2.80 (2 H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 2.84 (2 H, t,  $J$  = 7.2 Hz), 5.29-5.45 (5 H, m), 5.56 (1 H, dtt,  $J$  = 10,65, 7,4, 1,5), <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  = 13.08 (CH<sub>3</sub>), 16.48 (CH<sub>2</sub>), 21.64 (CH<sub>2</sub>), 22.28 (CH<sub>2</sub>), 24.63 (2 CH<sub>2</sub>), 26,26 (CH<sub>2</sub>), 28.19 (CH<sub>2</sub>), 28,26 (CH<sub>2</sub>), 28.61 (CH<sub>2</sub>), 30.84 (CH<sub>2</sub>), 118.24 (CN), 124.40 (CH), 126.10 (CH), 126.26 (CH), 128.09 (CH), 129.65 (CH), 130.55 (CH), EI-MS  $m/z$  (%): 259 (M<sup>+</sup>, 10), 174 (7), 165 (22), 95 (39), 93 (37), 81 (48), 79 (64), 67 (100), 55 (43), 41 (60), HR-MS: C<sub>18</sub>H<sub>29</sub>N gefunden: 259.2302 berechnet: 259.2300.

### (4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (80)

(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triennitril (79) (10 mg, 40  $\mu$ mol) wird bei 0 °C in methanolischer HCl (2 ml, dargestellt aus 200  $\mu$ l Acetylchlorid und 1,8 ml Methanol)

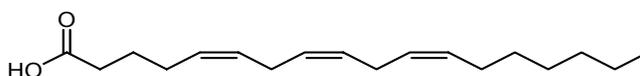


gelöst und mit Wasser (20  $\mu$ l) versetzt. Die Lösung wird 6 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Argonstrom eingengt. Der Rückstand wird in wässriger ethanolischer KOH (3 ml, 1 M Lösung in Wasser/Ethanol v:v, 95:5) aufgenommen und für 60 min auf 50 °C erhitzt. Die Lösung wird mit 1 N HCl auf pH 2-3 angesäuert und mit Pentan (3 x 5 ml) extrahiert. Die vereinigten Pentanextrakte werden im Vakuum konzentriert. Mittels RP-HPLC (Methanol:Wasser, Gradient: 90% nach 100 % Methanol innerhalb von 20 min) wird die Fettsäure **80** als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 5 mg (45 %)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz):  $\delta$  = 0.88 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H), 1.23-1.40 (m, 10H), 2.05 (quart,  $J$  = 6.9 Hz, 2 H), 2.40-2.45 (m, 4 H), 2.81 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.84 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 5.30-5.47 (m, 6H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz):  $\delta$  = 14.25 (CH<sub>3</sub>), 22.66 (CH<sub>2</sub>), 22.82 (CH<sub>2</sub>), 25.74 (CH<sub>2</sub>), 25.80 (CH<sub>2</sub>), 27.42 (CH<sub>2</sub>), 29.38 (CH<sub>2</sub>), 29.44 (CH<sub>2</sub>), 29.81 (CH<sub>2</sub>), 32.02 (CH<sub>2</sub>), 33.97 (CH<sub>2</sub>), 127.61 (CH), 127.64 (CH), 127.83 (CH), 128.89 (CH), 129.87 (CH), 130.70 (CH), 178.47 (CO); EI-MS  $m/z$  (%): 278 (2, M<sup>+</sup>), 152 (8), 105 (20), 93 (47), 91 (41), 79 (75), 67 (75), 55 (55), 41 (100); HR-MS: C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 278.2244, berechnet: 278.2246.

### (5Z,8Z,11Z)-Octadeca-5,8,11-triensäure (90)

Der Methylester von (5Z,8Z,11Z)-Octadeca-5,8,11-triensäure (**90**) wurde durch *bis*-Wittig-Olefinierung (siehe



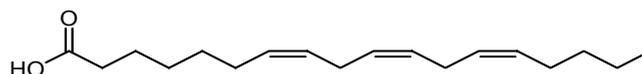
allgemeine Vorschrift) mit Heptansäuremethylester (0,144 g, 1 mmol) und 5-

Oxopentansäuremethylester (0,156 g, 1,2 mmol) <sup>[130]</sup> erhalten. Ausbeute: 90 mg (31 %). Durch Verseifen mit KOH (1 M Lösung in Ethanol:Wasser 95:5) wird die Fettsäure **90** erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz): δ = 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.22-1.40 (m, 8H), 1.72 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.05 (dt, *J* = 7.4 Hz, 6.8 Hz, 2 H), 2.14 (dt, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H), 5.30-5.45 (m, 6H). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz): δ = 14.24 (CH<sub>3</sub>), 22.80 (CH<sub>2</sub>), 24.68 (CH<sub>2</sub>), 25.77 (CH<sub>2</sub>), 25.79 (CH<sub>2</sub>), 26.61 (CH<sub>2</sub>), 27.42 (CH<sub>2</sub>), 29.14 (CH<sub>2</sub>), 29.77 (CH<sub>2</sub>), 31.93 (CH<sub>2</sub>), 33.39 (CH<sub>2</sub>), 127.69 (CH), 128.04 (CH), 128.72 (CH), 128.84 (CH), 129.29 (CH), 130.65 (CH), 178.98 (CO). EI-MS *m/z* (%): 278 (19, M<sup>+</sup>), 166 (35), 106 (37), 93 (76), 79 (100), 67 (88), 57 (44), 55 (57). HR-MS: C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> gefunden 278.2245 berechnet: 278.2246.

### (7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (91)

Der Methylester von (7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (**91**) wurde durch *bis*-Wittig-Olefinierung (siehe

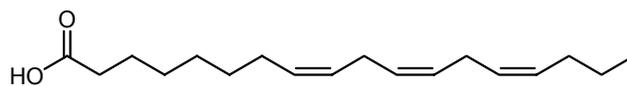


allgemeine Vorschrift) mit Pentansäuremethylester (0,116 g, 1 mmol) und 7-Oxoheptansäuremethylester (0,190 g, 1,2 mmol) <sup>[131]</sup> nach der Allgemeinen Vorschrift dargestellt. Ausbeute: 100 mg (36%). Durch Verseifen mit KOH (1 M Lösung in Ethanol:Wasser 95:5) wurde die Fettsäure **91** als farbloses Öl erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz): δ = 0.82 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.27-1.44 (m, 8H), 1.61 (quint, *J* = 7.4 Hz, 2 H), 2.09 (m, 4 H), 2.28 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 4H), 5.30-5.42 (m, 6H). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): δ = 14.33 (CH<sub>3</sub>), 23.39 (CH<sub>2</sub>), 26.02 (CH<sub>2</sub>), 26.54 (2 CH<sub>2</sub>), 27.94 (CH<sub>2</sub>), 28.06 (CH<sub>2</sub>), 29.88 (CH<sub>2</sub>), 30.43 (CH<sub>2</sub>), 33.03 (CH<sub>2</sub>), 34.96 (CH<sub>2</sub>), 128.82 (CH), 129.04 (CH), 129.16 (CH), 129.23 (CH), 130.89 (CH), 131.10 (CH), 177.64 (CO). EI-MS: *m/z* (%): 278 (M<sup>+</sup>, 37), 221 (5), 194 (29), 136 (37), 121 (21), 107 (25), 93 (62), 79 (96), 67 (100), 55 (51), 41 (57). HR-MS: C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 278.2246 berechnet: 278.2246.

### (8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (92)

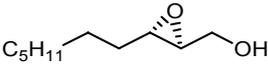
Der Methylester von (8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (**92**) wurde durch *bis*-Wittig-Olefinierung (siehe



allgemeine Vorschrift) mit Buttersäuremethylester (0,102 g, 1 mmol) und 8-Oxo-octansäuremethylester (0,206 g, 1,2 mmol) <sup>[132]</sup> dargestellt. Ausbeute: 86 mg (31 %) Durch Verseifen mit Verseifen mit KOH (1 M Lösung in Ethanol:Wasser, v:v, 95:5) wurde die Fettsäure **92** als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz):  $\delta$  = 0.92 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3H), 1.31-1.44 (m, 8H), 1.60 (quint,  $J$  = 7.4 Hz, 2 H), 2.08 (m, 4 H), 2.27 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 2.82 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 4H), 5.30-5.44 (m, 6H);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz):  $\delta$  = 14.11 ( $\text{CH}_3$ ), 23.85 ( $\text{CH}_2$ ), 26.11 ( $\text{CH}_2$ ), 26.54 ( $\text{CH}_2$ ), 26.56 ( $\text{CH}_2$ ), 28.13 ( $\text{CH}_2$ ), 30.03 ( $\text{CH}_2$ ), 30.12 ( $\text{CH}_2$ ), 30.32 ( $\text{CH}_2$ ), 30.58 ( $\text{CH}_2$ ), 35.03 ( $\text{CH}_2$ ), 128.92 (CH), 129.03 (CH), 129.19 (CH), 129.20 (CH), 130.88 (CH), 131.01 (CH), 177.76 (CO); EI-MS  $m/z$  (%): 278 ( $\text{M}^{+}$ , 8), 235 (7), 208 (46), 122 (71), 93 (73), 79 (100), 67 (96), 55 (44); HR-MS  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$  gefunden: 278.2243 berechnet: 278.2246.

### (2S,3S)-2,3-Epoxydecanol (100)

Methylenchlorid (120 ml) und aktiviertes Molsieb (1 g, 3 Å) werden mit frisch destilliertem Titan-tetraisopropoxylat (7,1 ml, 24 mmol) versetzt  und auf -20 bis -30 °C gekühlt. (*R,R*)-(+)-Weinsäurediethylester (28 ml, 4,8 mmol) wird zugegeben und die Mischung wird weitere 15 Minuten gerührt. Eine Lösung von (*E*)-Dec-2-en-1-ol (3.13 g, 20 mmol) in abs. Methylenchlorid (10 ml) wird über einen Zeitraum von 5 min zugetropft. Anschließend wird 10 Minuten gerührt und *tert*-Butylhydroperoxid (6.5 ml, 5-6 M in Decan) innerhalb von 10 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wird 5 Stunden gerührt. Dann wird eine 15%ige wässrige Lösung (125 ml) von Weinsäure (18 g, 125 mmol) zugegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird über eine Schicht Celite filtriert. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase wird mit Methylenchlorid (2 x 20 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum konzentriert. Der resultierende ölige Rückstand wird in Diethylether (60 ml) aufgenommen, auf 0 °C gekühlt und mit einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (20 ml, 1M), die mit Natriumchlorid gesättigt ist, versetzt. Die Mischung wird 30 Minuten bei 0 °C kräftig gerührt. Anschließend wird die organische Phase abgetrennt. Die organische Phase wird mit ges. Natriumchloridlösung (20 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer konzentriert. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Ether (v:v, 1:1) wird (2S,3S)-2,3-Epoxydecan-1-ol (**100**) in Form farbloser Kristalle erhalten.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.19, 22.77, 26.10, 29.33, 29.51, 31.91, 56.17, 58.50, 61.94; HR-MS:  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$  gefunden: 154,1359 ( $\text{M}^{+} - \text{H}_2\text{O}$ ) berechnet: 154,1358.

Die  $^1\text{H-NMR}$ - und IR-spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein.  
[157]

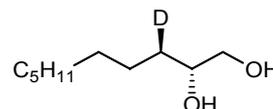
#### Bestimmung des Enantiomerenüberschusses:

4-Dimethylaminopyridin (18 mg, 015 mmol), Triethylamin (100  $\mu\text{l}$ ) und Dichlormethan (500  $\mu\text{l}$ ) werden zusammengegeben und (2S,3S)-2,3-Epoxydecanol (**100**) (26 mg, 015 mmol)

zugefügt. (S)-(+)- $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -trifluormethylphenyllessigsäure-chlorid (30  $\mu$ l) wird zugegeben und die Reaktionslösung wird 15 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Probe wird im Argonstrom eingengt und in 500  $\mu$ l Pentan aufgenommen. Man filtriert über Celite und entfernt das Lösungsmittel im Argonstrom. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 2:1) wird der Mosherester von **100** erhalten. Aus dem  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum kann der Enantiomerenüberschuss mit >97 % bestimmt werden.

### (2R,3R)-[3- $^2\text{H}_1$ ]-Decan-1,2-diol (**101**)

Bei Raumtemperatur wird (2S,3S)-2,3-Epoxydecan-1-ol (3,0 g, 17,4 mmol) in abs. THF (175 ml) gelöst und  $\text{Ti}(i\text{-Pr})_4$  (9,90 g, 34,8 mmol) wird über einen Zeitraum von 5 Minuten zugetropft. Nach 5 Minuten

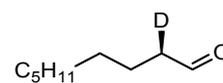


Rühren wird Natriumborodeuterid (1,46 g, 34,8 mmol) in 2 Portionen zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 3 Stunden bei 30 °C gerührt und anschließend weitere 5 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Mischung wird auf 0 °C gekühlt und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 ml, 10 % in Wasser) wird zugetropft. Man extrahiert mit Diethylether (5 x 75 ml), trocknet die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Diethylether wird das Produkt als farbloser Feststoff erhalten. Ausbeute: 0,73 g (24 %).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.87 (3 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 1.29-1.46 (13 H, m), 2.96 (2 H, s, 2 x OH), 3.38-3.48 (1 H, m), 3.60-3.73 (2 H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.24, 22.80, 25.61, 29.40, 29.66, 29.77, 32.01, 32.68, 32.87 (t,  $J$  = 19 Hz), 33.06, 66.88, 72.51; HR-MS:  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{DO}$  gefunden: 144.1497 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{O}$ ) berechnet: 144.1499; EI-MS  $m/z$  (%): 144 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 80), 126 (13), 97 (13), 84 (56), 83 (47), 70 (89), 69 (100), 55 (51); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3475, 3250 (br), 2954, 2916, 2848, 2158, 2139, 1469, 1378, 1348, 1324, 1291, 1267, 1239, 1225, 1205, 1184, 1131, 1110, 1095, 1064, 1055, 1036, 1017, 1003, 971, 927, 885, 851, 810, 721, 698.

### (2R)-[2- $^2\text{H}_1$ ]-Nonan-1-al (**102**)

Bei Raumtemperatur wird (2R,3R)-[3- $^2\text{H}_1$ ]-Decan-1,2-diol (**101**) (526 mg, 3 mmol) in Methylenechlorid (25 ml) gelöst und gesättigte wässrige  $\text{NaIO}_4$ -Lösung (5 ml) sowie  $\text{PhCH}_2(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{Cl}^-$  (25 mg, 0,14 mmol) werden



zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 25 min kräftig gerührt. Anschließend werden 5 ml Wasser zugegeben, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Methylenechlorid (2 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum konzentriert. Um eine Isomerisierung am  $\alpha$ -

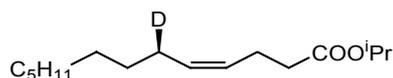
Kohlenstoffatom zu vermeiden, wird das Produkt ohne weitere Reinigung unmittelbar in der nachfolgenden Reaktion eingesetzt. Ausbeute: 0,43 g (93 %).

EI-MS  $m/z$  (%): 143 ( $M^+ - H_2O$ , 8), 125 (11), 114 (17), 98 (71), 96 (54), 83 (43), 82 (37), 70 (60), 69 (68), 57 (100), 56 (94).

### (6*R*)-[6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Tridec-4-ensäureisopropylester (**103**)

Buttersäureisopropylester-4-triphenylphosphoniumbromid

(1,41 g, 2 mmol) wird in abs. THF (50 ml) suspendiert. Bei -78 °C wird K[N(SiMe<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-Lösung (6,6 ml, 0,5 M in Toluol)

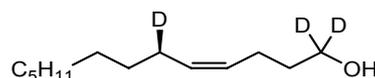


über einen Zeitraum von 5 Minuten zugetropft. Man erwärmt auf Raumtemperatur, rührt 30 Minuten bei dieser Temperatur und kühlt erneut auf -78 °C ab. Eine Lösung von (2*R*)-[2-<sup>2</sup>H]-Nonan-1-al (**102**) (0,286 g, 2 mmol) in abs. THF (10 ml) wird über einen Zeitraum von 5 min zugetropft. Man entfernt das Kältebad und rührt das Reaktionsgemisch für weitere 12 h. Anschließend wird 1 N HCl (10 ml) zugegeben. Man extrahiert mit Diethylether (3 x 50 ml), trocknet die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether/Diethylether (v:v, 9:1) wird das Produkt als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 0,42 g (82 %).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.87 (3 H, t,  $J$  = 6.9 Hz), 1.18-1.36 (20 H, m), 2.01(1 H, m), 2.25-2.38 (4 H, m) 5.00 (1 H, sept,  $J$  = 6.3 Hz), 5.31 (1 H, dt,  $J$  = 10.9 Hz, 6.2 Hz), 5.40 (1 H, dd,  $J$  = 10.9 Hz, 7.1 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.23, 21.98, 22.81, 23.02, 26.80, 26.99, 27.18, 29.41, 29.44, 29.65, 29.69, 32.03, 34.88, 67.64, 127.54, 131.52, 172.94; HR-MS: C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>DO<sub>2</sub> gefunden: 255.2309 ( $M^+$ ) berechnet: 255.2309; EI-MS  $m/z$  (%): 255 ( $M^+$ , 42), 213 (28), 195 (100), 178 (39), 153 (55), 138 (22), 124 (30), 111 (54), 98 (82), 84 (83), 69 (85), 55 (97); IR (cm<sup>-1</sup>): 3008, 2980, 2958, 2854, 1735, 1468, 1454, 1373, 1255, 1225, 1178, 1109, 988, 924, 824.

### (6*R*)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Tridec-4-en-1-ol (**104**)

Lithiumaluminiumdeuterid (84 mg, 2mmol, 98 % <sup>2</sup>H) wird in abs. Diethylether (10 ml) suspendiert und auf 0 °C gekühlt.

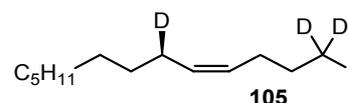


Eine Lösung des Isopropylesters **103** in abs. Diethylether (5 ml) wird langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend erneut auf 0 °C gekühlt. 1 N HCl (5 ml) werden tropfenweise zugegeben. Man extrahiert mit Diethylether (3 x 10 ml), trocknet über Natriumsulfat und entfernt das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das Produkt wird als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 300 mg (91 %).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.89 (3 H, t,  $J = 6.9$  Hz), 1.21-1.39 (12 H, m), 1.62 (2 H, t,  $J = 7.4$  Hz), 2.02 (1 H, m), 2.13 (2 H, q,  $J = 7.0$  Hz), 5.33-5.45 (2 H, m);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14.19, 22.80, 23.73, 27.02 (t,  $J = 19$  Hz), 29.44, 29.66 (2 C), 29.77, 32.04, 32.66, 62.10 (quin,  $J = 22$  Hz), 129.00, 130.95; HR-MS:  $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{D}_3$  gefunden: 183.2059 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ) berechnet: 183.2066; EI-MS  $m/z$  (%): 183 ( $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ , 14), 125 (8), 112 (13), 98 (36), 84 (71), 73 (100), 70 (64), 55 (37); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3005, 2958, 2923, 2853, 2191, 2085, 1465, 1378, 1261, 1135, 1102, 965, 908.

### (6*R*)-[1,1,6- $^2\text{H}_3$ ]-1-Iod-tridec-4-en (105)

Die Synthese von **105** erfolgte analog zur Darstellung der Verbindung **20** mit Triphenylphosphin (0,51 g, 1,9 mmol), Imidazol (0,13 g, 1,9 mmol) und Iod (0,49 g, 1,9 mmol) in

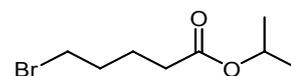


Diethylether/Acetonitril (8 ml, v.v, 3:1), sowie dem Alkohol **104** (300 mg, 1,5 mmol) in Diethylether (1 ml). Ausbeute: 0,40 g (86 %), farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 0.89 (3 H, t,  $J = 7.1$  Hz), 1.19-1.41 (12 H, m), 1.87 (2 H, t,  $J = 7.2$  Hz), 2.04 (1 H, m), 2.15 (2 H, q,  $J = 7.3$  Hz), 5.30 (1 H, ddt,  $J = 10.8$  Hz, 7.3 Hz, 1.5 Hz), 5.44 (1 H, d,  $J = 10.6$  Hz, 7.3 Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 6.31 (quin,  $J = 23$  Hz), 14.23, 22.83, 27.03, 27.15 (t,  $J = 19$  Hz), 27.40, 28.10, 29.45, 29.67, 29.81, 32.06, 33.46, 127.40, 131.94; HR-MS:  $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{D}_3\text{I}$  gefunden: 311.1188 ( $\text{M}^+$ ) berechnet: 311.1189; EI-MS  $m/z$  (%): 311 ( $\text{M}^+$ , 100), 213 (7), 198 (9), 157 (24), 114 (6), 98 (31), 84 (59), 71 (49), 57 (64), 55 (66); IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3005, 2952, 2921, 2852, 2155, 1458, 1377, 1338, 1180, 1105, 1001, 973, 931, 879.

### 5-Bromvaleriansäureisopropylester

Bromvaleriansäure (27,2 g, 150 mmol), 40 ml abs. Isopropanol und 20 ml Toluol werden mit 6 Tropfen konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  versetzt und 1,5 h unter Rückfluß erhitzt. Während dieser Zeit werden 35 ml des



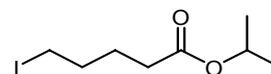
Lösungsmittels an einem Wasserabscheider abdestilliert. Man gibt 100 ml Petrolether/Diethylether (v.v, 1:1) hinzu und wäscht mit Wasser (25 ml) und gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (25 ml). Durch Trocknen mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Entfernen des Lösungsmittels wird 5-Bromvaleriansäureisopropylester als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 29 g (87 %).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 1.23 (6 H, d, 6.3 Hz), 1.79 (2 H, m), 1.90 (2 H, m), 2.30 (2 H, t,  $J = 7.3$  Hz), 3.40 (2 H, t,  $J = 6.5$  Hz), 5.01 (1 H, sept,  $J = 6.3$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 21.98 (2 C), 23.75, 32.20, 33.06, 33.83, 67.82, 172.76; HR-MS:  $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2\text{Br}$  gefunden: 179.9782 ( $\text{M}^+ - 55$ ) berechnet: 179.9786; EI-MS  $m/z$  (%): 182 ( $\text{M}^+ - 55$ , 12), 180 ( $\text{M}^+ - 55$ , 11), 165 (8), 163 (9), 142 (16), 101 (100), 100 (41), 83 (17), 73 (25), 55

(50); IR (cm<sup>-1</sup>): 2981, 2937, 2872, 1723, 1468, 1454, 1294, 1253, 1212, 1200, 1145, 1031, 989, 967, 952, 897, 826.

### 5-Iodvaleriansäureisopropylester

Zu einer Lösung aus 5-Bromvaleriansäureisopropylester (16,7 g, 75 mmol) in abs. Aceton (175 ml) wird NaI (15 g, 100 mmol) gegeben.

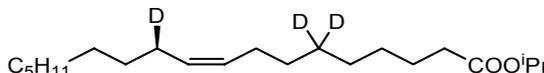


Man rührt über Nacht und filtriert das ausgefallene NaBr ab. Durch säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel mit Petrolether wird 5-Iodpentansäureisopropylester als farbloses Öl erhalten. Ausbeute: 19 g (94 %)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 1.22 (6 H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.73 (2 H, m), 1.86 (2 H, m), 2.29 (2 H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.18 (2 H, t, *J* = 6,8 Hz), 5.00 (1 H, sept, *J* = 6.3 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 5.79, 21.99 (2 C), 26.03, 32.95, 33.62, 67.81, 172.71; IR (cm<sup>-1</sup>): 2979, 2936, 2869, 2836, 1723, 1467, 1452, 1340, 1314, 1290, 1266, 1226, 1108, 1015, 990, 963, 930, 824, 737; HR-MS: C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>OI gefunden: 210.9603 (M<sup>+</sup> -OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) berechnet: 210.9620; EI-MS *m/z* (%): 211 (M<sup>+</sup> -OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, 83), 183 (71), 155 (12), 127 (12), 101 (100), 83 (62), 55 (71).

### (11*R*)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäureisopropylester (107)

Wie bei der Darstellung der Verbindung **22** beschrieben, werden Iodpentansäureisopropylester (1,36 g, 5 mmol) mit Diethylzink



(1,5 ml, 10 mmol) zum entsprechenden Zinkorganyl umgesetzt.

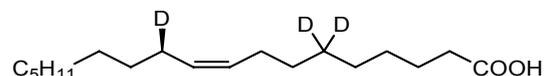
Parallel wird eine Lösung von Me<sub>2</sub>Cu(CN) (MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Hierzu wird bei 0 °C MeMgCl-Lsg. (5 ml, 1M in THF) zu CuCN (225 mg, 2,5 mmol) gegeben. Die dabei entstehende blassgelbe Lösung wird auf -50 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wird die THF-Lösung des Zinkorganyls zugegeben. Die Lösung wird auf Raumtemperatur erwärmt, weitere 3 min gerührt und auf -60 °C abgekühlt. Man gibt abs. NMP (2,5 ml) und das Iodid **105** (0,31 g, 1 mmol) in abs. THF (1 ml) zu und lässt die Reaktionslösung über Nacht auf Raumtemperatur erwärmen. Zur Aufarbeitung wird wie für die Synthese von **22** beschrieben verfahren. Ausbeute: 230 mg (70 %).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.20-1.37 (24 H, m), 1.60 (2 H, quin, *J* = 7.6 Hz), 2.00 (3 H, m), 2.24 (2 H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.00 (1 H, sept, 6.2 Hz), 5.29-5.38 (2 H, m); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.25, 21.99 (2 C), 22.83, 25.19, 27.00 (t, *J* = 19 Hz), 27.27, 28.42 (quin, *J* = 19 Hz), 29.12, 29.20, 29.44, 29.46, 29.64, 29.67, 29.83, 32.05, 34.87, 67.45, 129.94, 130.07, 173.57; HR-MS: C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>D<sub>3</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 327,3217 (M<sup>+</sup>) berechnet: 327,3217; EI-MS *m/z* (%): 327 (M<sup>+</sup>, 27), 285 (15), 268 (96), 267 (100), 266 (44),

225 (14), 182 (15), 168 (13), 140 (18), 126 (24), 112 (33), 98 (57), 84 (62), 70 (58), 55 (70); IR (cm<sup>-1</sup>): 2980, 2958, 2924, 2854, 2178, 2098, 1737, 1467, 1374, 1341, 1313, 1244, 1178, 1110, 962, 824.

### (11R)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäure (108)

Der Isopropylester (107) wurde wie für die Synthese der Verbindung 22 beschrieben mit methanolischer KOH zur Fettsäure 108 verseift und mittels RP-HPLC gereinigt.



<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 0.88 (3 H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.20-1.39 (18 H, m), 1.63 (2 H, quin, *J* = 7.4 Hz), 1.94-2.05 (3 H, m), 2.35 (2 H, t, *J* = 7.6 Hz), 5.29-5.39 (2 H, m); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 14.25, 22.83, 24.83, 27.00 (t, *J* = 19 Hz), 27.26, 28.38 (quin, *J* = 19 Hz), 29.09, 29.13, 29.45, 29.47, 29.63, 29.68, 29.83, 32.06, 34.18, 129.91, 129.12, 180.00; HR-MS: C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>D<sub>3</sub>O<sub>2</sub> gefunden: 285,2745 (M<sup>+</sup>) berechnet: 285,2747; EI-MS *m/z* (%): 285 (M<sup>+</sup>, 21), 267 (58), 225 (10), 182 (8), 168 (7), 154 (10), 140 (15), 126 (24), 112 (36), 98 (72), 84 (80), 70 (91), 56 (100); IR (cm<sup>-1</sup>): 3005, 2958, 2925, 2853, 2178, 2098, 1712, 1465, 1411, 1377, 1340, 131, 1291, 1262, 1240, 1206, 1164, 937, 723.

## 5.3 Biologische Experimente

### Kultivierung von transformierten *Saccharomyces cerevisiae*

Herstellung von Minimalmedium-Dropout-Uracil mit 2 % Raffinose und 1 % Tergitol-NP40

Für die Herstellung von 1 l des Minimalmediums werden benötigt:

- 778 ml H<sub>2</sub>O
- 10 ml Tergitol NP-40 (Sigma) mit Endkonzentration 1 %/l
- 100 ml 20 % Raffinose (sterilfiltriert) mit Endkonzentration 2 %/l
- 100 ml 10 x Yeast Nitrogen Base (sterilfiltriert) [DIFCO]
- 2 ml Histidin (10mg/ml H<sub>2</sub>O) mit Endkonzentration 20 mg/l
- 6 ml Leucin (10mg/ml H<sub>2</sub>O) mit Endkonzentration 60 mg/l
- 4 ml Tryptophan (10mg/ml H<sub>2</sub>O) mit Endkonzentration 40 mg/l
- 1,155 g Dropout Pulver

### Herstellung des Dropout-Pulvers

Für die Herstellung des Dropout-Pulver (67 g) werden folgende Komponenten gründlich miteinander vermischt:

<b>Zusammensetzung</b>		
<b>Aminosäure</b>	<b>Anteil im dropout powder (g)</b>	<b>Endkonzentration (mg/L)</b>
Adenin (Hemisulfat Salz)	2.5	40
L-Arginin(HCl)	1.2	20
L-Asparaginsäure	6.0	100
L-Glutaminsäure	6.0	100
L-Lysin(mono-HCl)	1.8	30
L-Methionin	1.2	20
L-Phenylalanin	3.0	50
L-Serin	22.5	375
L-Threonin	12.0	200
L-Tyrosin	1.8	30
L-Valin	9.0	150

Für die Herstellung des Flüssigmediums werden 1,115 g Dropout Pulver, destilliertes Wasser und verflüssigtes Tergitol gemischt und autoklaviert. Zu der abgekühlten autoklavierten Lösung werden, werden die vorher sterilfiltrierten Komponenten, Raffinose, Yeast Nitrogen Base sowie die restlichen Aminosäuren His, Leu und Trp zugeben.

### **Herstellung der Vorkulturen**

In einem sterilen Reagenzglas werden 3 ml Minimalmedium vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte entnommen und das Minimalmedium angeimpft. Anschließend wird für 2 Tage bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Durch Bestimmung der OD bei  $E_{600}$  wird das Wachstum der Kulturen regelmäßig kontrolliert.

### **Herstellung der Dauerkulturen**

In ein Cryoröhrchen werden 0.9 ml 70 % Glycerinlösung (autoklaviert) vorgelegt und mit 0.9 ml dicht gewachsener Kultur gut vermischt. Die Aufbewahrung der Dauerkultur erfolgt bei -80 °C.

### **Inkubation transformierter Hefen mit der cDNA aus *Helianthus annuus***

100 ml Minimalmedium-Dropout-Uracil und 10 ml einer wässrigen 20 %igen Galactoselösung werden mit einem entsprechenden Volumen der Vorkultur versetzt, so dass eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt wird. 25 µM Cerulenin (Sigma) und 0,25 mM der zu testenden deuterierten Palmitinsäure werden zugegeben und die Hefen für 4 d bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> ~1,0 angezogen. Die Hefezellen werden durch Zentrifugieren geerntet.

### **Inkubation transformierter Hefen mit der cDNA aus *Candida albicans***

100 ml Minimalmedium-Dropout-Uracil und 10 ml einer wässrigen 20 %igen Galactoselösung werden mit einem entsprechenden Volumen der Vorkultur versetzt, so dass eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt wird. 25 µM Cerulenin (Sigma) und 0,25 mM deuterierter Palmitinsäure **31** werden zugegeben und die Hefen für 6 d bei 25 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> ~0,8 angezogen. Die Hefezellen werden für 90 min bei 37 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und anschließend durch Zentrifugieren geerntet.

### **Hydrolyse der Sphingolipide**

Das Zellpellet wird in 6 ml Wasser suspendiert und die Suspension für 15 min auf 110 °C erhitzt. Dann wird erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hefezellen werden in 1,5 ml Wasser und 1,5 ml Dioxan resuspendiert und in ein fest verschließbares Glasgefäß überführt. Man gibt 210 mg Ba(OH)<sub>2</sub> zu und erhitzt das Gemisch für 24 h auf 90 °C. Nach Abkühlen werden 2,5 ml Wasser und 4 ml Chloroform zugegeben. Die Probe wird geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wird abgetrennt, und die wässrige Phase wird erneut mit 4 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 4 ml einer 0,1 M Kaliumhydroxidlösung und 4 ml 0,5 M Kaliumchloridlösung gewaschen. Man zentrifugiert kurz und verwirft die wässrige Phase. Mittels eines Argonstroms wird das Lösungsmittel entfernt.

### **DNP-Derivatisierung der Sphingobasen**

Die hydrolysierten Lipide werden in 800 µl Boratpuffer (2 M Borsäure/KOH, pH 10,5) gelöst und mit 200 µl einer methanolischen Lösung von 1-Fluor-2,4-dinitrobenzen (1 µl in 200 µl Methanol) versetzt. Die Mischung wird 30 min bei 60 °C geschüttelt. Zu der abgekühlten Lösung werden 1,2 ml Wasser, 1,8 ml Methanol und 4 ml Chloroform gegeben. Die Mischung wird gründlich gemischt, kurz zentrifugiert und die organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wird erneut mit 4 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden im Argonstrom konzentriert.

## **Dünnschichtchromatographische Reinigung der DNP-Derivate**

Die DNP-derivatisierten Sphingobasen werden in Chloroform/Methanol (150  $\mu$ l, v:v, 2:1) gelöst und 5 cm breit auf eine präparative DC-Platte (Glas, Kieselgel 60, Schichtdicke 0,5 mm) aufgetragen. Zusätzlich trägt man eine Referenz auf. Die DC-Platte wird mit Chloroform/Methanol (v:v, 90:10) entwickelt. Entsprechend der Referenz, werden die Banden unter UV-Detektion, von der DC-Platte gekratzt. Die DNP-Derivate werden anschließend durch Extraktion mit Chloroform/Methanol (v:v, 2:1) und Entfernen des Lösungsmittels im Argonstrom aus dem Kieselgel gewonnen.

## **HPLC/MS-Analyse der DNP-Derivate**

Die Trennung der isomeren DNP-Derivate erfolgte an einer RP 18 Säule (GROM-SIL 120 ODS-5, 3 $\mu$ m, 125 x 2 mm, ST, Grom, Herrenberg) mit einem Gradienten (0.2 mL min<sup>-1</sup>) von 40% A (A = Methanol/Acetonitril/2-Propanol (10:3:1 v/v/v)) und 60% B (B = Wasser) in 10 min auf 80% A und schließlich auf 100% A in weiteren 40 min. Die massenspektrometrische Charakterisierung der DNP-Derivate erfolgte an einem Micromass Quattro II Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) mit ESI-Interface. Die Spektren wurden im Negativ-Ionen-Modus aufgenommen (Quellentemperatur: 100 °C, Desolvatationstemperatur: 250 °C, cone voltage: 35 Volt).

## **Oxidativer Abbau der DNP-derivatisierten Sphingobasen**

Ca. 1 mg des zu spaltenden DNP-Derivats werden mittels RP-HPLC gesammelt und durch Konzentrieren der Fraktion im Argonstrom erhalten.

Zu dem DNP-Derivat werden AD-Mix-a (14 mg, Aldrich), tert-Butanol:Wasser (100 ml, v:v, 1:1) und eine katalytische Menge Sulfonamid gegeben. Die resultierende zweiphasige Mischung wird für 12 h bei Raumtemperatur gründlich geschüttelt. Anschließend wird ges. Natriumsulfitlösung (100 ml) zugegeben und weitere 5 min geschüttelt. Die Mischung wird mit Ethylacetat (3 x 200 ml) extrahiert und die vereinigten Extrakte im Argonstrom eingeeengt. Der Rückstand wird in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und mit 20 ml einer gesättigten Natriumperiodatlösung sowie Benzyltrimethylammoniumchlorid (1 mg) versetzt. Die Mischung wird 5 min geschüttelt. Ohne weitere Aufreinigung wird ein Aliquot der organischen Phase mittels GC/MS analysiert.

Die Analyse erfolgte an einem Micromass MassSpec 2 Massenspektrometer verbunden mit einem HP 6890 Gaschromatographen; GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m x 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m. Die Messungen erfolgten im CI-Modus mit Isobutan als Ionisierungsgas.

### **Analyse der Fettsäurezusammensetzung von *Saccharomyces cerevisiae***

10 ml der Hefekultur werden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 3 ml Wasser suspendiert in ein fest verschließbares Gefäß überführt und für 15 min auf 100 °C erhitzt. Man lässt die Probe abkühlen, zentrifugiert erneut und verwirft den Überstand. Das Zellpellet wird in 2 N methanolischer H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 ml) suspendiert und 90 min auf 80 °C erhitzt. Anschließend wird mit Wasser (2 ml) verdünnt und mit Pentan (3 x 2 ml) extrahiert. Die vereinigten Pentanextrakte werden im Argonstrom konzentriert. Durch Veresterung mit Diazomethan werden die Fettsäuremethylester erhalten.

Bedingungen der GC/MS-Analyse:

GC-Säule: Alltech EC5 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm; Trägergas: Helium; konstanter Druck: 30 kP; Injektortemperatur 240 °C; Temperaturprogramm: 50 °C (2 min) – 10°C /min – 160 °C – 5 °C/min – 240 °C

### **Experimente mit *Antheraea polyphemus***

Etwa 2 Tage alte weibliche Tiere werden mit CO<sub>2</sub> betäubt. Durch ein vorsichtiges Drücken an beiden Seiten des Körpers wird die Pheromondrüse ausgestülpt. Auf die Intersegmentalmembran (vgl. Kapitel 3.4.1) wird mittels einer Mikroliterspritze eine Lösung der entsprechenden Fettsäure (20 mg/ml in DMSO/Ethanol/Wasser 70:20:10) aufgetragen. Die Prozedur wird in Abständen von 60 min weitere 3 Mal wiederholt. Dann wird die Pheromondrüse des betäubten Tieres mit einer Sezierschere abgeschnitten und das Tier in flüssiger Luft getötet.

Insgesamt 3 inkubierte Pheromondrüsen werden über Nacht bei -20 °C mit Chloroform/Methanol (v:v, 2:1) extrahiert. Der Drüsenextrakt wird im Argonstrom konzentriert. Dann wird methanolische KOH-Lösung (0,5 M, 300 µl) zugegeben und die Probe für 30 min auf 55 °C erhitzt. Dann wird mit 1 N HCl auf pH 3 angesäuert und die saure Lösung mit Pentan (3 x 300 µl) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über eine mit Natriumsulfat gefüllte Pipette gegeben und im Argonstrom konzentriert. Durch Veresterung mit Diazomethan erhält man die Fettsäuremethylester.

Bedingungen der GC/MS-Analyse:

GC-Säule: J&W DB 225 ms 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm; Trägergas: Helium; Fluss 1ml/min; Injektortemperatur 240 °C; Temperaturprogramm: 50 °C (2 min) – 10°C /min – 160 °C – 5 °C/min – 240 °C

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] H. W. Cook, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Eds.: D. E. Vance, J. E. Vance), Elsevier Science B.V., **1996**, pp. 129.
- [2] W. L. Smith, F. A. Fitzpatrick, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Eds.: D. E. Vance, J. E. Vance), Elsevier Science B.V., **1996**, pp. 283.
- [3] I. Feussner, C. Wasternack, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 275.
- [4] Y. Murakami, M. Tsuyama, Y. Kobayashi, H. Kodama, K. Iba, *Science* **2000**, *287*, 476.
- [5] J. Ohlrogge, J. Browse, *Plant Cell* **1995**, *7*, 957.
- [6] N. Murata, H. Wada, *Biochem. J.* **1995**, *308*, 1.
- [7] W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1995**, *92*, 44.
- [8] K. Bloch, *Acc. Chem. Res.* **1969**, *2*, 193.
- [9] N. J. Russell, D. S. Nichols, *Microbiol.* **1999**, *145*, 767.
- [10] C. O. Rock, S. Jackowski, J. E. C. jr, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Eds.: D. E. Vance, J. E. Vance), Elsevier Science B.V., **1996**.
- [11] J. G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse, *Science* **2001**, *293*, 290.
- [12] U. Kaulmann, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1866.
- [13] J. Shanklin, E. B. Cahoon, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **1998**, *49*, 611.
- [14] D. R. Tocher, M. J. Leaver, P. A. Hodgson, *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 73.
- [15] J. A. Broadwater, J. A. Haas, B. G. Fox, *Fett-Lipid* **1998**, *100*, 103.
- [16] P. Sperling, E. Heinz, *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1632*, 1.
- [17] J. A. Napier, L. V. Michaelson, T. M. Dunn, *Trends in Plant Sci.* **2002**, *7*, 475.
- [18] A. Rahier, *Biochemistry* **2001**, *40*, 256.
- [19] C. Somerville, J. Browse, *Trends in Cell Biol.* **1996**, *6*, 148.
- [20] K. S. Lyle, J. A. Haas, B. G. Fox, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5857.
- [21] Y. Lindqvist, W. J. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, *Embo Journal* **1996**, *15*, 4081.
- [22] E. Whittle, J. Shanklin, *Journal Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21500.
- [23] E. B. Cahoon, J. Shanklin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2000**, *97*, 12350.
- [24] J. A. Haas, B. G. Fox, *Biochemistry* **2002**, *41*, 14472.
- [25] R. D. White, B. G. Fox, *Biochemistry* **2003**, *42*, 7828.
- [26] K. S. Lyle, P. Moenne-Loccoz, J. Y. Ai, J. Sanders-Loehr, T. M. Loehr, B. G. Fox, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10507.
- [27] B. G. Fox, J. Shanklin, C. Somerville, E. Munck, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1993**, *90*, 2486.
- [28] J. A. Broadwater, C. Achim, E. Munck, B. G. Fox, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12197.
- [29] B. Behrouzian, P. H. Buist, J. Shanklin, *Chem. Comm.* **2001**, 401.
- [30] M. Moche, J. Shanklin, A. Ghoshal, Y. Lindqvist, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25072.
- [31] P. Sperling, P. Ternes, T. K. Zank, E. Heinz, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2003**, *68*, 73.
- [32] D. C. Knipple, C. L. Rosenfield, R. Nielsen, K. M. You, S. E. Jeong, *Genetics* **2002**, *162*, 1737.
- [33] J. Shanklin, E. Whittle, B. G. Fox, *Biochemistry* **1994**, *33*, 12787.
- [34] P. Sperling, E. Heinz, *Eur. Lipid Sci. Technol.* **2001**, *103*, 158.
- [35] J. A. Napier, L. V. Michaelson, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2003**.
- [36] E. I. Solomon, T. C. Brunold, M. I. Davis, J. N. Kemsley, S. K. Lee, N. Lehnert, F. Neese, A. J. Skulan, Y. S. Yang, J. Zhou, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 235.
- [37] B. D. Dunietz, M. D. Beachy, Y. X. Cao, D. A. Whittington, S. J. Lippard, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2828.
- [38] T. Lovell, W. G. Han, T. Q. Liu, L. Noodleman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5890.
- [39] T. Lovell, F. Himo, W. G. Han, L. Noodleman, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *238*, 211.
- [40] B. J. Wallar, J. D. Lipscomb, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2625.

- [41] S. J. Lange, L. Que, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 159.
- [42] J. Du Bois, T. J. Mizoguchi, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 443.
- [43] M. Merckx, D. A. Kopp, M. H. Sazinsky, J. L. Blazyk, J. Muller, S. J. Lippard, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2782.
- [44] J. A. Broadwater, J. Y. Ai, T. M. Loehr, J. Sanders-Loehr, B. G. Fox, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14664.
- [45] L. Que, W. B. Tolman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1114.
- [46] C. Kim, Y. H. Dong, L. Que, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3635.
- [47] Y. S. Yang, J. A. Broadwater, S. C. Pulver, B. G. Fox, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2770.
- [48] L. J. Morris, *Biochem. J.* **1970**, *118*, 681.
- [49] B. Behrouzian, P. H. Buist, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2003**, *68*, 107.
- [50] B. Behrouzian, P. H. Buist, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 577.
- [51] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6295.
- [52] A. Svatos, B. Kalinova, W. Boland, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, *29*, 225.
- [53] M. Akhtar, J. N. Wright, *Nat. Prod. Rep.* **1991**, *8*, 527.
- [54] J. R. Collins, D. L. Camper, G. H. Loew, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2736.
- [55] M. H. Baik, M. Newcomb, R. A. Friesner, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2385.
- [56] R. J. Light, W. J. Lennarz, K. Bloch, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 1793.
- [57] D. A. Kopp, S. J. Lippard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 568.
- [58] K. Yoshizawa, T. Yumura, *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9*, 2347.
- [59] A. M. Valentine, B. Wilkinson, K. E. Liu, S. KomarPanicucci, N. D. Priestley, P. G. Williams, H. Morimoto, H. G. Floss, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1818.
- [60] A. M. Valentine, M. H. LeTadic-Biadatti, P. H. Toy, M. Newcomb, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10771.
- [61] K. E. Liu, C. C. Johnson, M. Newcomb, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 939.
- [62] S. Y. Choi, P. E. Eaton, D. A. Kopp, S. J. Lippard, M. Newcomb, R. N. Shen, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12198.
- [63] F. Ruzicka, D. S. Huang, M. I. Donnelly, P. A. Frey, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1696.
- [64] B. F. Gherman, B. D. Dunietz, D. A. Whittington, S. J. Lippard, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3836.
- [65] M. Newcomb, P. H. Toy, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 449.
- [66] V. Guallar, B. F. Gherman, W. H. Miller, S. J. Lippard, R. A. Friesner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3377.
- [67] P. E. M. Siegbahn, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, *6*, 27.
- [68] W. Boland, C. Frössl, M. Schöttler, M. Toth, *J. Chem. Soc.-Chem. Comm.* **1993**, 1155.
- [69] I. Navarro, I. Font, G. Fabrias, F. Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11335.
- [70] J. L. Abad, F. Camps, G. Fabrias, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *31*, 799.
- [71] L. J. Morris, R. V. Harris, W. Kelly, A. T. James, *Biochem. J.* **1968**, *109*, 673.
- [72] C. Frössl, W. Boland, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6613.
- [73] D. Meesapyodsuk, D. W. Reed, C. K. Savile, P. H. Buist, S. J. Ambrose, P. S. Covello, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11948.
- [74] P. H. Buist, B. Behrouzian, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 871.
- [75] A. Pinilla, F. Camps, G. Fabrias, *Biochemistry* **1999**, *38*, 15272.
- [76] B. Behrouzian, L. Fauconnot, F. Daligault, C. Nugier-Chauvin, H. Patin, P. H. Buist, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 3545.
- [77] L. Fauconnot, P. H. Buist, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 1210.
- [78] L. Fauconnot, P. H. Buist, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2879.
- [79] D. B. Northrop, *Biochemistry* **1975**, *14*, 2644.
- [80] D. B. Northrop, *Biochemistry* **1981**, *20*, 4056.
- [81] D. B. Northrop, *Annu. Rev. Biochem.* **1981**, *50*, 103.

- [82] G. T. Miwa, W. A. Garland, B. J. Hodshon, A. Y. H. Lu, D. B. Northrop, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 6049.
- [83] K. R. Iyer, J. P. Jones, J. F. Darbyshire, W. F. Trager, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7136.
- [84] H. Simon, J. Bader, H. Gunther, S. Neumann, J. Thanos, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 539.
- [85] D. Parker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1983**, 83.
- [86] G. Görgen, W. Boland, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *185*, 237.
- [87] D. Parker, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1441.
- [88] G. Görgen, W. Boland, U. Preiss, H. Simon, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 917.
- [89] O. Thum, C. Hertweck, H. Simon, W. Boland, *Synthesis* **1999**, 2145.
- [90] A. Börner, J. Holz, in *Transition metals for organic synthesis, Vol. 2* (Eds.: M. Beller, C. Bolm), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [91] T. Ohkumo, M. Kitamura, R. Noyori, in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 2nd ed. (Ed.: I. Ojima), Wiley-VCH, **2000**.
- [92] T. Ohta, H. Takaya, M. Kitamura, K. Nagai, R. Noyori, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3174.
- [93] H. Takaya, T. Ohta, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, S. Inoue, I. Kasahara, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1596.
- [94] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, in *Transition metals for organic synthesis, Vol. 2* (Eds.: M. Beller, C. Bolm), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [95] H. C. Kolb, M. S. Vannieuwenhze, K. B. Sharpless, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483.
- [96] I. Navarro, G. Fabrias, F. Camps, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 164.
- [97] G. Q. Lin, Z. C. Shi, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1369.
- [98] F. Rohdich, A. Wiese, R. Feicht, H. Simon, A. Bacher, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5779.
- [99] J. G. Millar, E. W. Underhill, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4726.
- [100] Classon, Liu, *J. Org. Chem.* **1988**, 6126.
- [101] B. Classon, P. J. Garegg, B. Samuelsson, *Can. J. Chem.* **1981**, *59*, 339.
- [102] N. Krause, *Modern Organocopper Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [103] R. J. K. Taylor, *Organocopper reagents A Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford, **1994**.
- [104] P. Knochel, P. Jones, F. Langer, in *Organozinc reagents* (Eds.: P. Knochel, P. Jones), Oxford University Press, **1999**, pp. 179.
- [105] P. Knochel, J. J. A. Perea, P. Jones, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8275.
- [106] C. E. Tucker, P. Knochel, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4781.
- [107] O. Thum, Diplomarbeit, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität (Bonn), **1999**.
- [108] D. J. Pasto, in *Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 8* (Eds.: B. M. Trost, I. Fleming), Elsevier Science, **1991**, pp. 471.
- [109] B. S. Bal, W. E. Childers, H. W. Pinnick, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 2091.
- [110] W. W. Christie, in *Gas Chromatography and lipids*, The Oily Press, Ayr, **1992**.
- [111] D. M. Bailey, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 3574.
- [112] A. Mori, A. Fujita, H. Kajiro, Y. Nishihara, T. Hiyama, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 4573.
- [113] R. A. W. Johnstone, A. H. Wilby, I. D. Entwistle, *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 129.
- [114] C. A. Brown, V. K. Ahuja, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1973**, 553.
- [115] E. N. Marvell, T. Li, *Synthesis* **1973**, 457.
- [116] D. Evans, J. A. Osborn, F. H. Jardine, Wilkinso.G, *Nature* **1965**, *208*, 1203.
- [117] J. Viala, R. Labaudiniere, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1280.
- [118] H. J. Bestmann, N. E. Gunawardena, *Synthesis* **1992**, 1239.
- [119] F. Riche, J. P. Mathieu, M. Vincens, A. Bardy, M. Comet, M. Vidal, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1984**, 49.
- [120] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen, Organische Reaktionen, Stereochemie, moderne Synthesemethoden*, Spektrum Akademischer Verlag, **2002**.
- [121] H. J. Bestmann, W. Stransky, O. Vostrowsky, *Chem. Ber. Rec.* **1976**, *109*, 1694.
- [122] H. J. Bestmann, M. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 6171.
- [123] H. J. Bestmann, T. Zeibig, *Synthesis* **1990**.
- [124] H. J. Bestmann, K. H. Koschatzky, O. Vostrowsky, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1478.

- [125] G. Pohnert, W. Boland, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1821.
- [126] D. Spiteller, Dissertation, (Jena), **2003**.
- [127] S. Adolph, unveröffentlichte Ergebnisse, **2003**.
- [128] G. d'Ippolito, G. Romano, T. Caruso, A. Spinella, G. Cimino, A. Fontana, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 885.
- [129] S. A. King, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2253.
- [130] M. Huckstep, R. J. K. Taylor, M. P. L. Caton, *Synthesis* **1982**, 881.
- [131] R. Ballini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1419.
- [132] K. Okuma, S. Hirabayashi, M. Ono, K. Shioji, H. Matsuyama, H. J. Bestmann, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4243.
- [133] D. F. Taber, K. K. You, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 547.
- [134] D. E. Bergstrom, J. L. Ruth, P. Warwick, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1432.
- [135] T. Eynard, J. M. Vatele, D. Poullain, J. P. Noel, J. M. Chardigny, J. L. Sebedio, *Chem. Phys. Lip.* **1994**, *74*, 175.
- [136] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155.
- [137] M. Tokunaga, J. F. Larrow, F. Kakiuchi, E. N. Jacobsen, *Science* **1997**, *277*, 936.
- [138] M. E. Furrow, S. E. Schaus, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6776.
- [139] S. E. Schaus, B. D. Brandes, J. F. Larrow, M. Tokunaga, K. B. Hansen, A. E. Gould, M. E. Furrow, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1307.
- [140] K. Muniz-Fernández, C. Bolm, in *Transition Metals for Organic Synthesis, Vol. 2* (Eds.: M. Beller, C. Bolm), Wiley-VCH, **1998**, pp. 271.
- [141] T. Katsuki, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 131.
- [142] E. L. Eliel, D. W. Delmonte, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1744.
- [143] E. L. Eliel, D. W. Delmonte, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3226.
- [144] E. L. Eliel, M. N. Rerick, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1362.
- [145] V. Andrejevic, M. Bjelakovic, M. M. Mihailovic, M. L. Mihailovic, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 2030.
- [146] Y. Yamamoto, H. Toi, A. Sonoda, S. I. Murahashi, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 672.
- [147] J. J. Eisch, Z. R. Liu, X. Ma, G. X. Zheng, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5140.
- [148] S. Murai, T. Murai, S. Kato, in *Comprehensive Organic Chemistry, Vol. 8* (Eds.: B. M. Trost, I. Fleming), Elsevier Science, **1991**, pp. 871.
- [149] J. G. Smith, *Synthesis* **1984**, 629.
- [150] C. Bonini, G. Righi, *Synthesis* **1994**, 225.
- [151] R. O. Hutchins, I. M. Taffer, W. Burgoyne, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5214.
- [152] C. Neumann, W. Boland, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 754.
- [153] T. Katsuki, in *Transition Metals for Organic Synthesis, Vol. 2* (Eds.: M. Beller, C. Bolm), Wiley-VCH, **1998**, pp. 261.
- [154] T. Takata, R. Tajima, W. Ando, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4764.
- [155] V. S. Martin, in *Asymmetric Oxidation Reactions A Practical Approach in Chemistry* (Ed.: T. Katsuki), Oxford University Press, **2001**.
- [156] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974.
- [157] Y. Gao, R. M. Hanson, J. M. Klunder, S. Y. Ko, H. Masamune, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
- [158] J. E. Gozum, G. S. Girolami, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3829.
- [159] J. L. W. Tudichum, *The Chemical Constitution of the Brain*, Bailliere, Tindall & Cox, London, **1884**.
- [160] Y. A. Hannun, *Sphingolipid mediated Signal transduction*, Chapman & Hall, New York, **1997**.
- [161] A. H. Merrill, C. C. Sweeley, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier Science, **1996**, pp. 309.
- [162] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532.
- [163] S. Brodesser, P. Sawatzki, T. Kolter, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2021.
- [164] Y. A. Hannun, C. Luberto, K. M. Argraves, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4893.
- [165] S. Spiegel, S. Milstien, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25851.

- [166] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25847.
- [167] A. H. Merrill, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25843.
- [168] A. Huwiler, T. Kolter, J. Pfeilschifter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, 1485, 63.
- [169] H. Imai, M. Ohnishi, K. Hotsubo, M. Kojima, S. Ito, *Biosci., Biotech., Biochem.* **1997**, 61, 351.
- [170] S. Coursol, L. M. Fan, H. Le Stunff, S. Spiegel, S. Gilroy, S. M. Assmann, *Nature* **2003**, 423, 651.
- [171] C. K. Y. Ng, K. Carr, M. R. McAinsh, B. Powell, A. M. Hetherington, *Nature* **2001**, 410, 596.
- [172] W. L. Roelofs, A. P. Rooney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2003**, 100, 9179.
- [173] P. Sperling, U. Zähringer, E. Heinz, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 28590.
- [174] P. Sperling, A. Blume, U. Zähringer, E. Heinz, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 638.
- [175] P. Sperling, B. Libisch, U. Zähringer, J. A. Napier, E. Heinz, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 388, 293.
- [176] P. Sperling, persönliche Mitteilung.
- [177] S. V. Naidu, P. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1035.
- [178] C. Hertweck, P. Sebek, A. Svatos, *Synlett* **2001**, 1965.
- [179] F. Schneider, R. Lessire, J. J. Bessoule, H. Juguelin, C. Cassagne, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1152, 243.
- [180] D. G. Lee, T. Chen in *Comprehensive Organic Chemistry*, (Eds.: B. M. Trost, I. Fleming), Elsevier Science, **1991**, pp. 541.
- [181] M. Schröder, *Chem. Rev.* **1980**, 80, 187.
- [182] R. Pappo, D. S. Allen, R. U. Lemieux, W. S. Johnson, *Journal of Organic Chemistry* **1956**, 21, 478.
- [183] G. R. Jones, N. J. Oldham, *J. Chromatogr. A* **1999**, 843, 199.
- [184] A. B. Attygalle, E. D. Morgan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 460.
- [185] V. Van Rheezen, R. C. Kelly, D. Y. Cha, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 1973.
- [186] K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2126.
- [187] D. V. Lynch, S. R. Fairfield, *Plant Physiol.* **1993**, 103, 1421.
- [188] A. Botha, J. L. F. Kock, *Int. J. Food Microbiol.* **1993**, 19, 39.
- [189] J. A. Broadwater, E. Whittle, J. Shanklin, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 15613.
- [190] C. K. Savile, G. Fabrias, P. H. Buist, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4382.
- [191] W. Stoffel, G. Assmann, K. Bister, *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **1971**, 352, 1531.
- [192] A. J. Polito, C. C. Sweeley, *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 4178.
- [193] P. Ternes, S. Franke, U. Zähringer, P. Sperling, E. Heinz, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 25512.
- [194] G. M. Jenkins, A. Richards, T. Wahl, C. G. Mao, L. Obeid, Y. Hannun, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32566.
- [195] R. C. Dickson, E. E. Nagiec, M. Skrzypek, P. Tillman, G. B. Wells, R. L. Lester, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30196.
- [196] W. Stoffel, E. Binczek, *Hoppe-Seylers Zeitschrift Fur Physiologische Chemie* **1971**, 352, 1065.
- [197] R. J. Kulmacz, G. J. Schroepfer, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 3963.
- [198] P. Broun, J. Shanklin, E. Whittle, C. Somerville, *Science* **1998**, 282, 1315.
- [199] Y. Jin, J. D. Lipscomb, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 717.
- [200] G. T. Gassner, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1999**, 38, 12768.
- [201] B. Behrouzian, C. K. Savile, B. Dawson, P. H. Buist, J. Shanklin, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3277.
- [202] A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, E. Hecker, *Zeitschrift Fur Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie Und Verwandten Gebiete* **1959**, 14, 283.
- [203] D. Schneider, *Naturwissenschaften* **1992**, 79, 241.
- [204] C. M. Williams, L. N. Mander, *Tetrahedron* **2001**, 57, 425.

- [205] B. Nikolova-Damyanova, in *Advances in Lipid Methodology- one* (Ed.: W. W. Christie), The oily press, **1992**.
- [206] M. D. Dowle, D. I. Davies, *Chem. Soc. Rev.* **1979**, 8, 171.
- [207] B. Simonot, G. Rousseau, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 4.
- [208] B. Simonot, G. Rousseau, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 5912.
- [209] N. J. Oldham, A. Svatos, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 331.
- [210] C. J. Persoons, P. E. J. Verwiël, F. J. Ritter, E. Talman, P. J. F. Nooijen, W. J. Nooijen, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 2055.
- [211] J. Kochansky, J. Tette, E. F. Taschenberg, R. T. Carde, K. E. Kaissling, W. L. Roelofs, *J. Insect Physiol.* **1975**, 21, 1977.
- [212] H.-J. Bestmann, A. B. Attygalle, *Z. Naturforschung* **1986**, 631.
- [213] J. A. Tillman, S. J. Seybold, R. A. Jurenka, G. J. Blomquist, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 29, 481.
- [214] L. B. Bjostad, W. L. Roelofs, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 7936.
- [215] W. Roelofs, L. Bjostad, *Bioorg. Chem.* **1984**, 12, 279.
- [216] L. B. Bjostad, W. L. Roelofs, *J. Chem. Ecol.* **1986**, 12, 431.
- [217] W. T. Liu, H. M. Jiao, N. C. Murray, M. O'Connor, W. L. Roelofs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2002**, 99, 620.
- [218] W. T. Liu, H. M. Jiao, M. O'Connor, W. L. Roelofs, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2002**, 32, 1489.
- [219] F. Domergue, P. Spiekermann, J. Lerchl, C. Beckmann, O. Kilian, P. G. Kroth, W. Boland, U. Zähringer, E. Heinz, *Plant Phys.* **2003**, 131, 1648.
- [220] J. Browse, C. Somerville, *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **1991**, 42, 467.
- [221] E. B. Cahoon, T. J. Carlson, K. G. Ripp, B. J. Schweiger, G. A. Cook, S. E. Hall, A. J. Kinney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1999**, 96, 12935.
- [222] E. B. Cahoon, K. G. Ripp, S. E. Hall, A. J. Kinney, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 2637.
- [223] K. Fritsche, E. Hornung, N. Peitzsch, A. Renz, I. Feussner, *Febs Letters* **1999**, 462, 249.
- [224] L. S. Liu, E. G. Hammond, B. J. Nikolau, *Plant Physiol.* **1997**, 113, 1343.
- [225] S. Gnädig, R. Rickert, J. L. Sebedio, H. Steinhart, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, 103, 56.
- [226] X. Qiu, D. W. Reed, H. P. Hong, S. L. MacKenzie, P. S. Covello, *Plant Phys.* **2001**, 125, 847.
- [227] L. Crombie, S. J. Holloway, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 2425.
- [228] S. Rodriguez, F. Camps, G. Fabrias, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8052.
- [229] S. Rodriguez, P. Clapes, F. Camps, G. Fabrias, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2228.
- [230] D. W. Reed, C. K. Savile, X. Qiu, P. H. Buist, P. S. Covello, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 5024.
- [231] E. Hornung, C. Pernstich, I. Feussner, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 4852.
- [232] Prof. I. Feussner, persönliche Mitteilung,
- [233] E. A. Trautwein, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, 103, 45.
- [234] A. Abbadi, F. Domergue, A. Meyer, K. Riedel, P. Sperling, T. K. Zank, E. Heinz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2001**, 103, 106.
- [235] J.M. Parker-Barnes, T. Das, E. Bobik, A.E. Leonard, J.M. Thurmond, L.T. Chaung, Y.S. Huang, P. Mukerji, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2000**, 97, 8284.
- [236] T. K. Zank, U. Zähringer, C. Beckmann, G. Pohnert, W. Boland, H. Holtorf, R. Reski, J. Lerchl, E. Heinz, *Plant J.* **2002**, 31, 255.
- [237] S. C. Jain, W. L. Roelofs, J. Meinwald, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 2274.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### Allgemeine Abkürzungen

APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation
CI	chemische Ionisation
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAP	4-( <i>N,N</i> -Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ee	Enantiomerenüberschuss
EI	Elektronenstossionisation (electron impact)
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie
G	Gramm
GC	Gaschromatograph / Gaschromatographie
GC-HR-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit hochauflösendem Massenspektrometer
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-ESI-MS	Hochauflösende Elektrospraymassenspektroskopie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
IR	Infrarotspektrometrie/meter
<i>i</i> -	iso-
l	Liter
M	Molar
M <sup>+</sup>	Molekülion
Me	Methyl
MCD	Magnetischer Circular dichroismus
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMO	Methanmonoxygenase
mmol	Millimol
mol	Stoffmenge $6 \cdot 10^{23}$ Teilchen
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrum
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
NMR	magnetische Kernresonanz
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidinon
PCC	Pyridinium-chlorochromat
Ph	Phenyl
RP	Umkehrphase (reversed phase)
t	Zeit
<i>t</i> -	tertiär
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar
δ	chemische Verschiebung
μg	10 <sup>-6</sup> Gramm

**Abkürzungen bei NMR-Spektren**

br	breit
d	Dublett
m	Multipllett
pt	pseudo-Triplett
q	Quartett
quin	Quintett
s	Singulett
se	Sextett
t	Triplett

## 8. Publikationen und Vorträge

### *Publikationen*

- [1] S. Dieckmann, J. Weston, E. Anders, W. Boland, B. Schönecker, T. Hettmann, J. von Langen, S. Erhardt, M. Mauksch, M. Bräuer, C. Beckmann, M. Rost, P. Sperling & E. Heinz. Metal-mediated reactions modeled after nature. (2002) *Rev. Mol. Biotechnol.*, **90**, 73-94.
- [2] C. Beckmann, J. Rattke, N. J. Oldham, P. Sperling, E. Heinz & W. Boland. Characterisation of a  $\Delta^8$ -Sphingolipid Desaturase from Higher Plants: A Stereochemical and Mechanistic Study on the Origin of *E,Z*-Isomers. (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 2298-2300.
- [3] T.K. Zank, U. Zähringer, C. Beckmann, G. Pohnert, W. Boland, H. Holtorf, R. Reski, J. Lerchl, E. Heinz. Cloning, functional and molecular characterisation of a gene involved in the elongation of  $\Delta^6$ -polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. (2002) *Plant J.*, **31**, 255-268.
- [4] F. Domergue, P. Spiekermann, J. Lerchl, C. Beckmann, P. Kroth, W. Boland, U. Zähringer, E. Heinz. New insight into *Phaeodactylum tricorutum* fatty acid metabolism: cloning and functional characterisation of plastidial and microsomal  $\Delta^{12}$ -fatty acid desaturases. (2003) *Plant Physiol.*, **131**, 1648-1660.
- [5] C. Beckmann, J. Rattke, P. Sperling, E. Heinz, W. Boland. Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide  $\Delta^4$ -desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. (2003) *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 2448-2454.

### *Vorträge*

- [1] SFB-Seminar, „Mechanistische und stereochemische Charakterisierung einer  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturase aus Sonnenblumen“, Thalbürgel, April 2001.
- [2] 22. Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen, „Pheromonbiosynthese in *Antherea polyphemus*“, Bayreuth, Oktober 2001.
- [4] GDCh-Kolloquium, „Die Chemische Sprache der Insekten“, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Mai 2002
- [5] 24. Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen, „Mechanistische und stereochemische Charakterisierung einer  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturase aus Sonnenblumen“, Halle, Oktober 2002.
- [6] Kurth-Mothes-Doktorandenworkshop, „Mechanistische und stereochemische Charakterisierung einer  $\Delta^8$ -Sphingolipid-desaturase aus Sonnenblumen“, Jena, Oktober 2002.
- [7] 15. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V., „Sphingolipid-desaturasen in Pflanzen und Hefen; mechanistische und stereochemische Aspekte“, Irsee, Februar 2003

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Christoph Beckmann  
geboren am 31.03.1970 in Bielefeld

### Studium

05/2000 bis 12/2003 Promotion am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena  
06/99 bis 04/2000 Diplomarbeit an der Universität Bonn  
06/99 Diplomprüfung Chemie  
02/96 – 06/99 Hauptstudium Chemie an der Universität Bonn mit dem Nebenfach Biochemie  
02/96 Vordiplomprüfung  
10/90 – 02/96 Grundstudium Dipl.-Chemie, Universität Bonn

### Schulausbildung

05/90 Abitur an der Freien Waldorfschule in Bonn  
07/87 – 12/87 Besuch des lycée international in Paris  
1985 – 1990 Besuch der Freien Waldorfschule Bonn  
1980 – 1985 Besuch des Gymnasiums in Borghorst

### Berufstätigkeit

05/2000 – 12/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena  
02/2003 - 03/2003 Betreuung des Biochemiepraktikums an der FSU Jena  
10/2001 - 02/2002 Lehrtätigkeit an der Fachhochschule Jena: Vorlesung Allgemeine Chemie für Augenoptiker (Teil Nichtmetallchemie)  
03/1998 Praktikum in der Zentralen Forschung der Bayer AG in Leverkusen  
10/95 – 05/99 Studentische Hilfskraft bei der Bundestagsabgeordneten Frau Ilse Schumann (Bitterfeld)  
10/90 – 10/95 Studentische Hilfskraft bei der Mitgliederbetreuung des Deutschen Roten Kreuzes in Bonn und Bad Honnef

## 10. Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Wilhelm Boland für die interessante Themenstellung, seine Hilfsbereitschaft, die vielen Ideen und sein stetiges Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ernst Anders für sein Interesse und die Betreuung meiner Arbeit seitens der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

den Kooperationspartnern Prof. Dr. Wendell Roelofs, Prof. Dr. Ivo Feussner und Prof. Dr. Ernst Heinz für die fruchtbare und unkomplizierte Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Dr. Petra Sperling, ohne deren molekularbiologisches Know-how die Arbeiten an den Sphingolipiddesaturasen nicht möglich gewesen wäre.

Prof. Dr. Karl-Ernst Kaissling für die Versorgung mit Wilden Seidenspinnern.

Dr. Ales Svatos und Sybille Koch für die Aufnahme von hochaufgelösten Massenspektren.

Dr. Bernd Schneider und Dr. Renate Ellinger für die Hilfe bei NMR-Sonderwünschen.

dem Sonderforschungsbereich 436 „Metallvermittelte Reaktionen nach dem Vorbild der Natur“ für die finanzielle Unterstützung.

den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises:

Anja Biedermann, Dr. Uli Lion, Thomas Wichard, Theresa Wiesemeier, Dr. Christoph Steinbeck, Dr. Martin Heil, Christian Kost, Ivonne Höfer, Jürgen Kuhn, Dr. Susanna Andersson, Dr. Jörn Piel, Dr. Birte Feld, Dr. Oliver Fietz, Dr. Andrew Jarvis, Dr. Göde Schüler, Dr. Otmar Schaaf, Dr. Thomas Koch, Dr. Andreas Jux, Dr. Rita Büchler, Dr. Mesmin Mekem Sonwa und den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft, die kleinen Dinge des Alltags und die dadurch motivierende Arbeitsatmosphäre.

Verena Jung für die gemeinsame Zeit am Institut, die damit verbundene vielfältige Hilfe, die Beratung in gestalterischen Fragen und die gemeinsamen Koch- und Backerlebnisse.

Dr. Georg Pohnert für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für die zahlreiche Hilfe in zunächst ausweglos erscheinenden Situationen.

Dr. Dieter Spitteller für seine kompromisslose Hilfsbereitschaft, sein „unermüdliches“ Interesse und die Korrektur dieser Arbeit.

Birgit Schulze für das Korrekturlesen der Arbeit und die nicht versiegende Quelle mit Süßigkeiten.

Sven Adolph für seine Hilfsbereitschaft und die Verpflegung mit westfälischen Köstlichkeiten.

Dr. Christian Hertweck, der maßgeblich mein Interesse für die Forschung geweckt hat.

Doreen Schachtschabel für ihre tatkräftige Mitarbeit als „Hiwin“.

Andreas Habel für die harmonische Zusammenarbeit im Bereich der Lifescience, sein Interesse an Desaturasen und die Durchsicht dieser Arbeit.

Dr. Stefan Bartram für ein bisschen Heimatatmosphäre im Büro und seine Unterstützung in synthetischen und analytischen Fragen.

Dr. Neil Oldham für die Sorgfalt bei der Aufnahme vieler Massenspektren, fachkundigen Rat und Hilfestellungen bei massenspektrometrischen Problemen.

Dr. Nathalie Gatto für die amüsanten Unterbrechungen des Laboralltags.

Grit Winnefeld dafür, dass Sie mir bei bürokratischen Angelegenheiten helfend zur Seite stand.

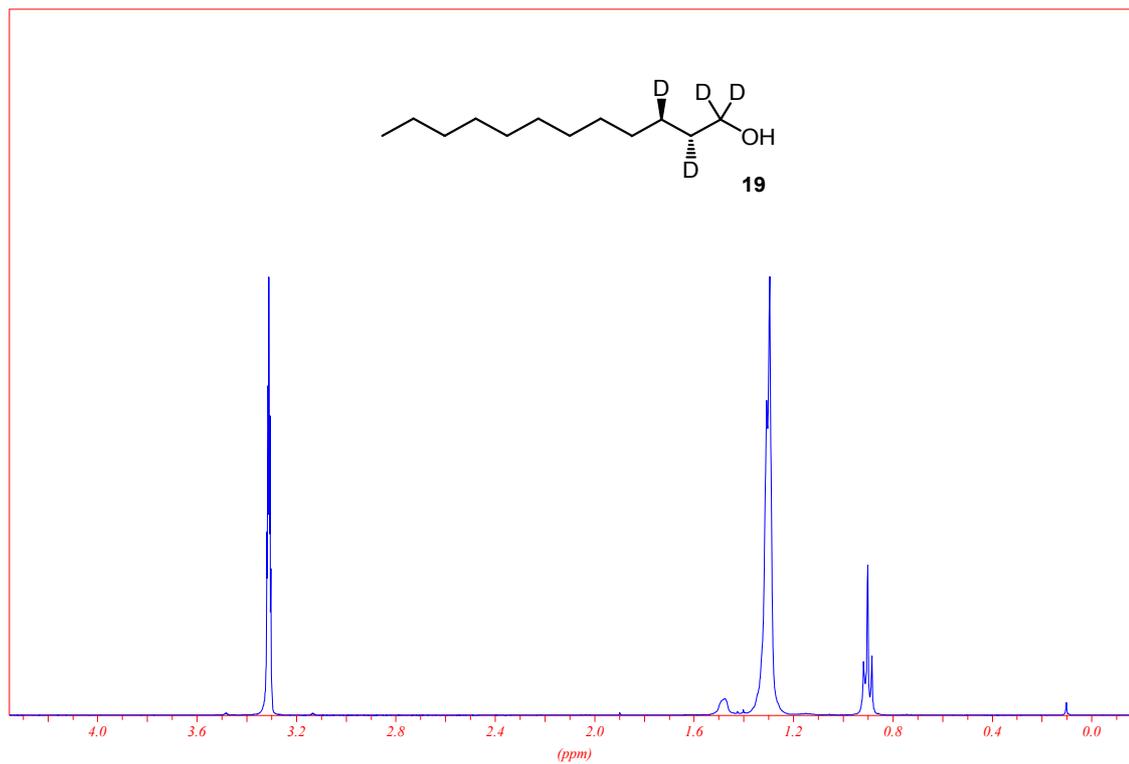
Angelika Berg, für den Nachschub an sauberen Glasgeräten.

Birgit Langers, Ulrike und Jens Peters für ihre Freundschaft und die damit verbundene moralische Unterstützung.

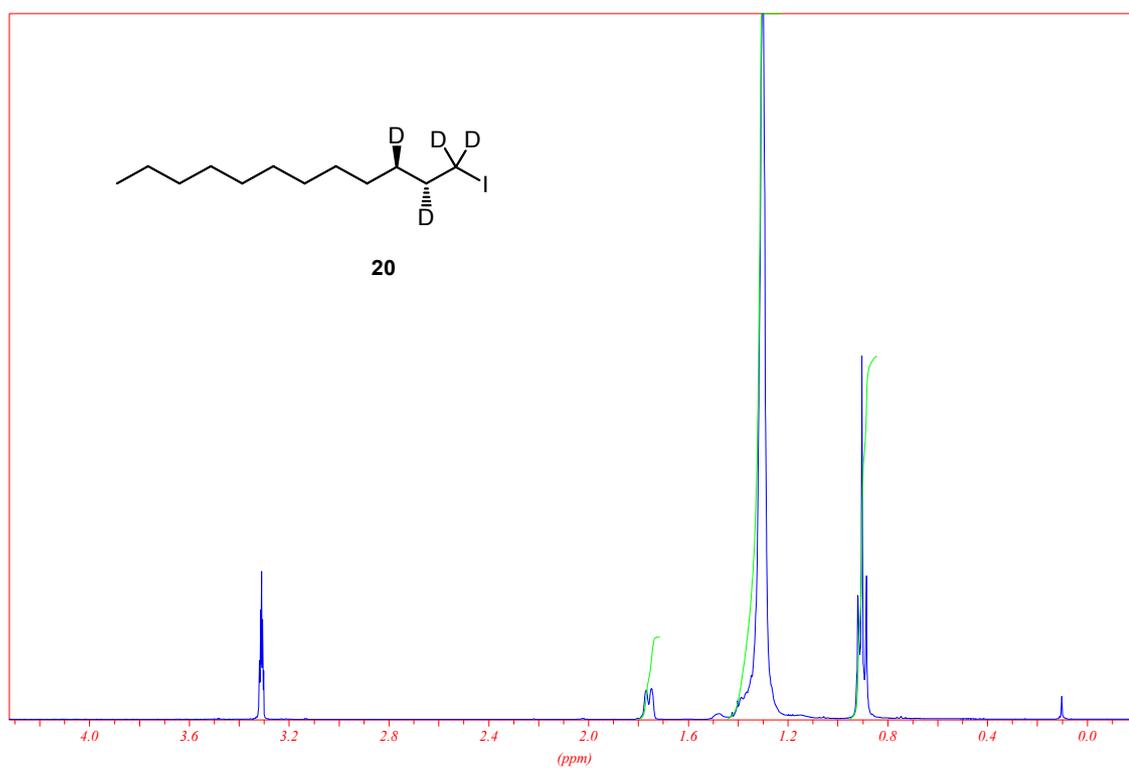
meiner Mutter Marie-Luise Beckmann, meinem Bruder Dr. Holger Beckmann und meiner Schwägerin Dr. Soojin Ryu für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Janine Rattke für die Korrekturarbeiten an dieser Arbeit, der Hilfe bei massenspektrometrischen Problemen und vor allem für ihre Unterstützung bei all den Dingen, die nicht mit Chemie zusammenhängen.

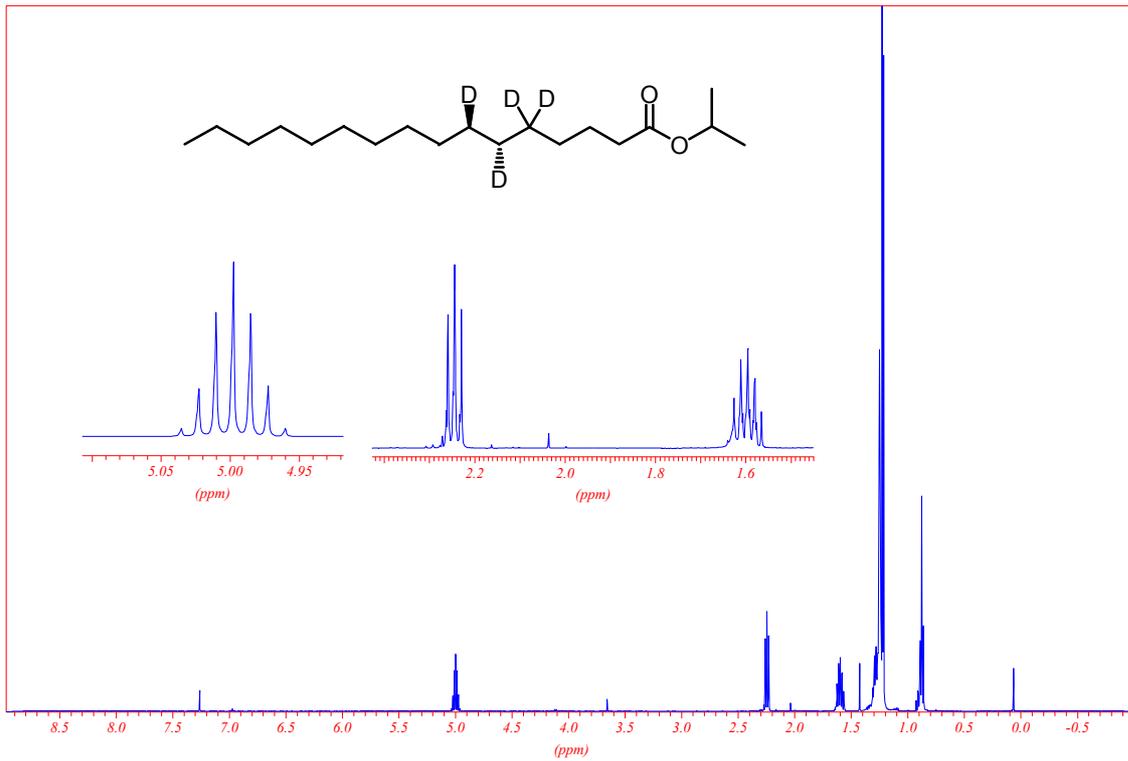
### ***1H*-NMR-Spektren**



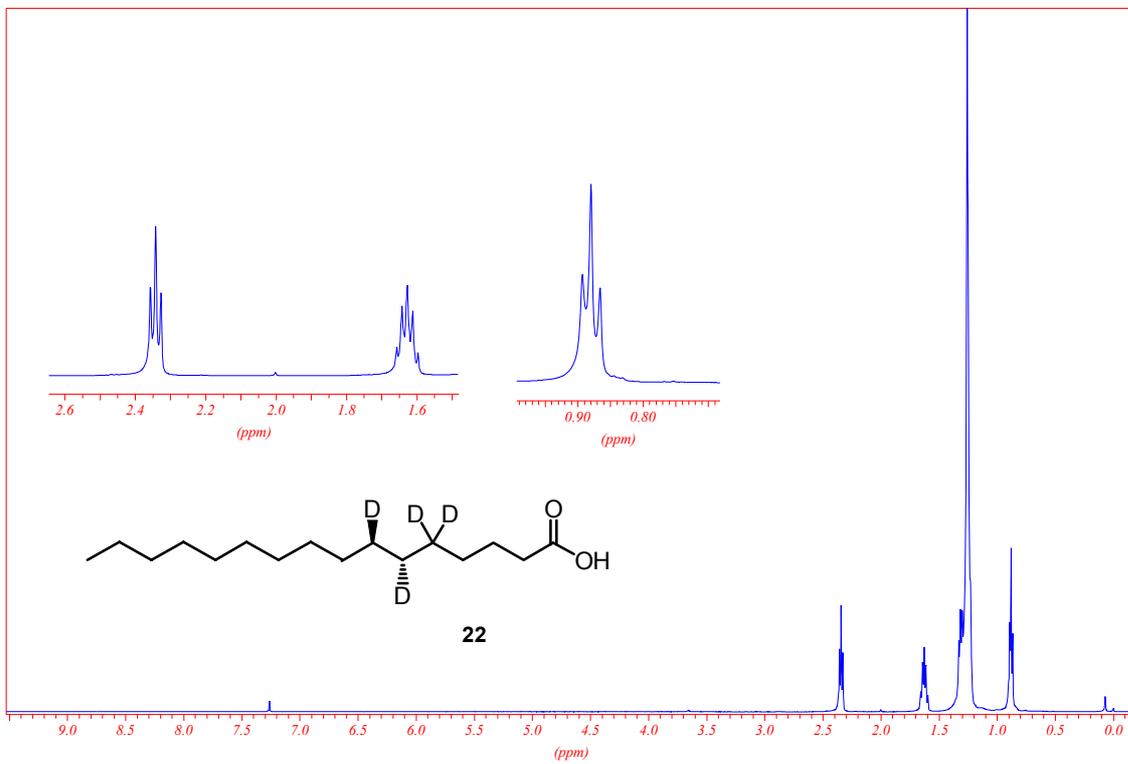
(2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecanol (**19**)



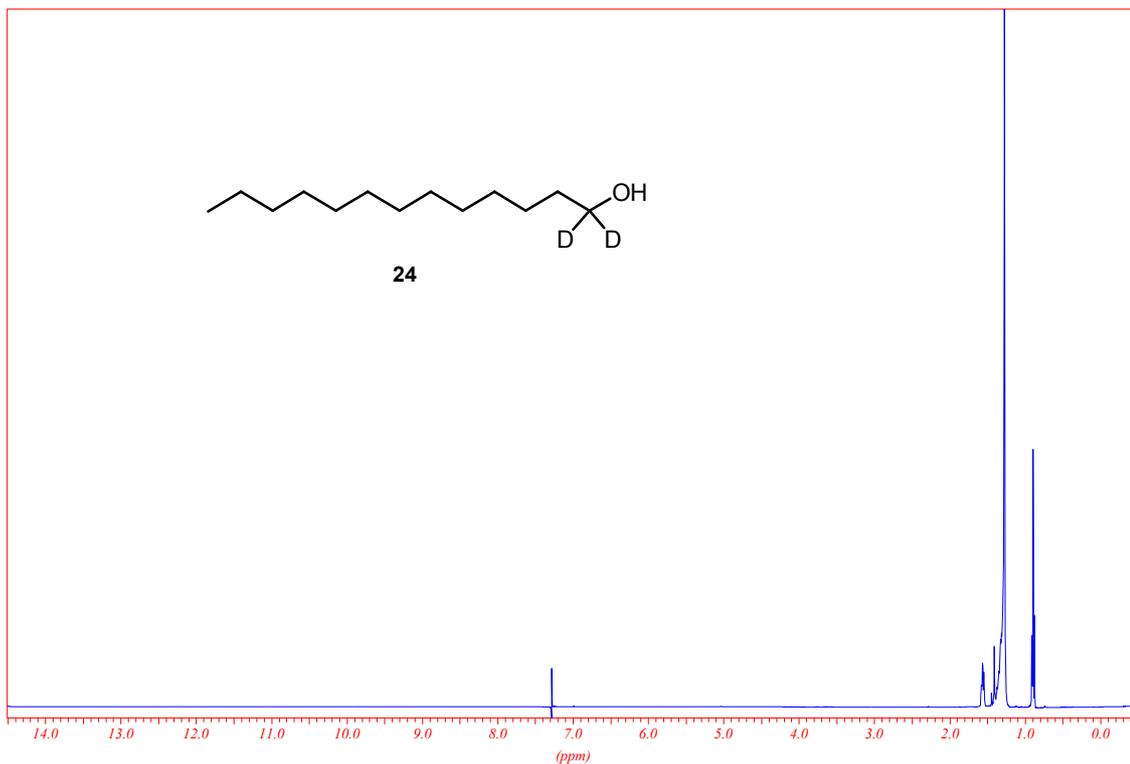
(2*R*,3*R*)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecylidiodid (**20**)



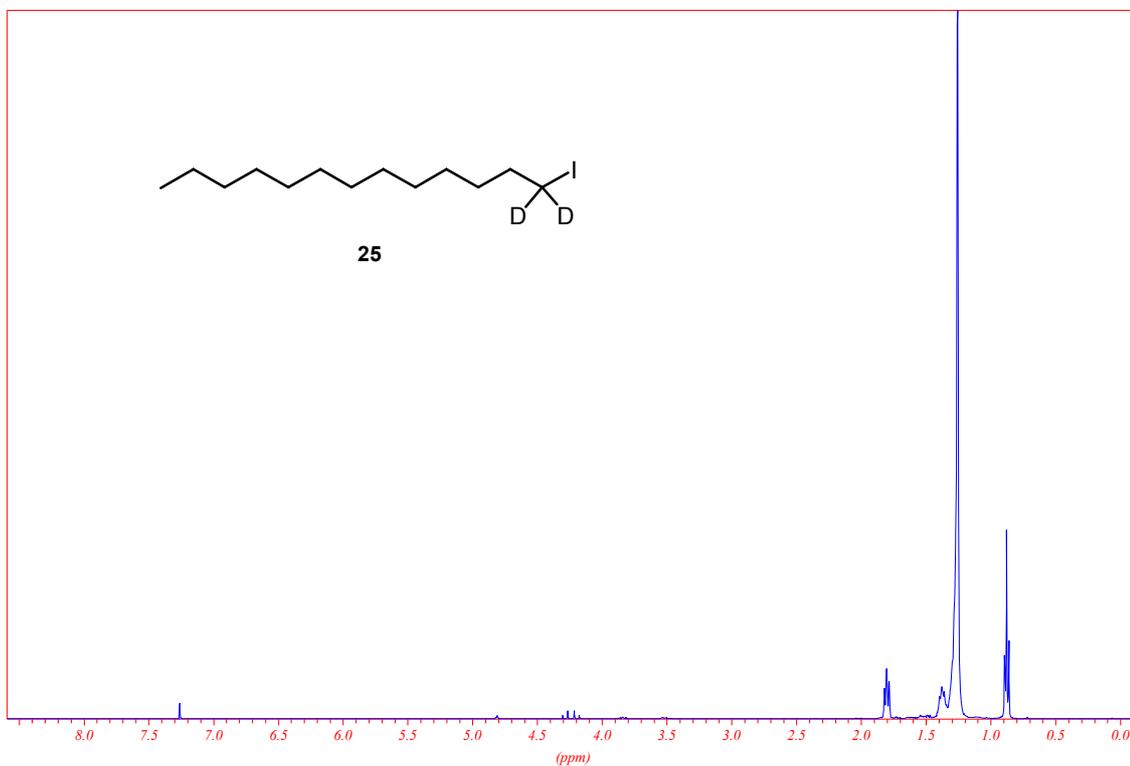
(6R,7R)-[5,5,6,7- $^2\text{H}_4$ ]-Hexadecansäureisopropylester



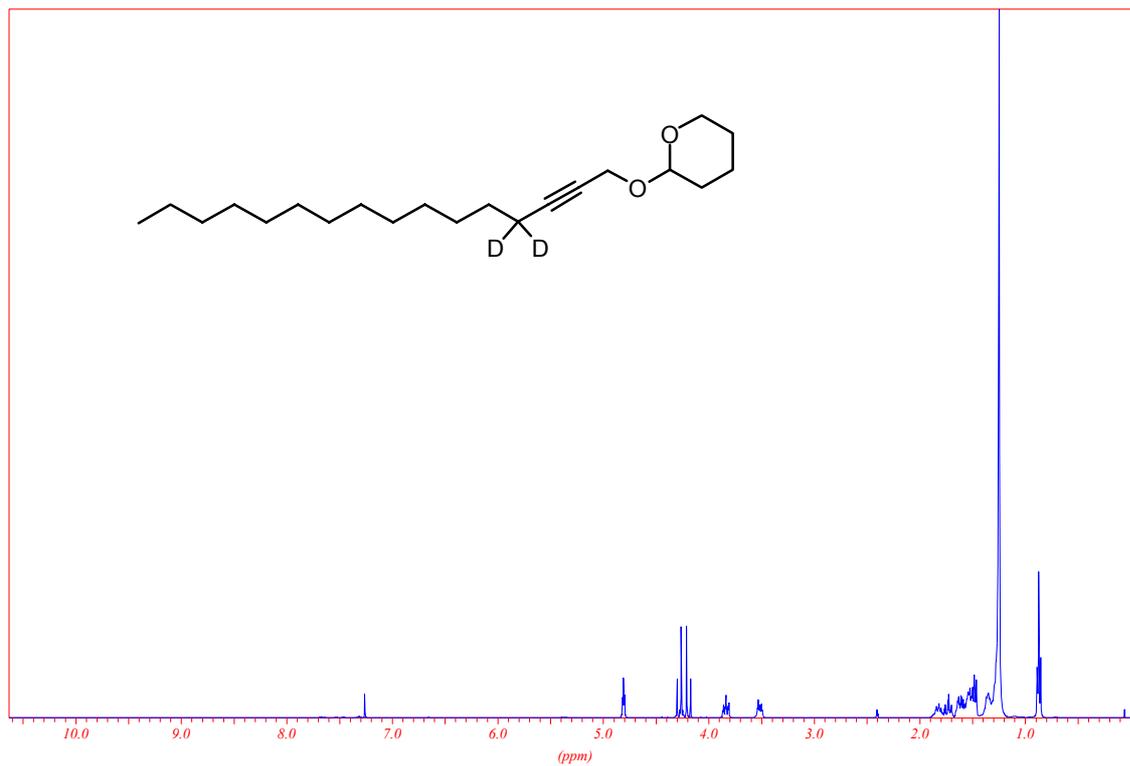
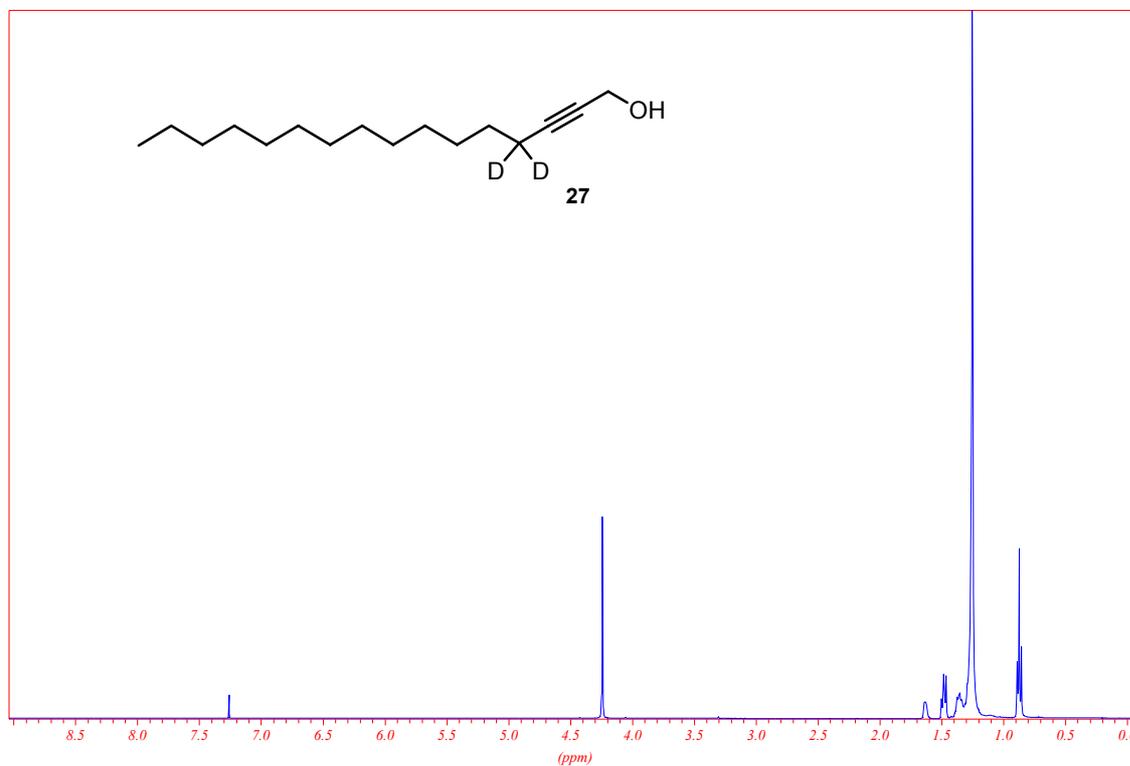
(6R,7R)-[5,5,6,7- $^2\text{H}_4$ ]-Hexadecansäure (**22**)

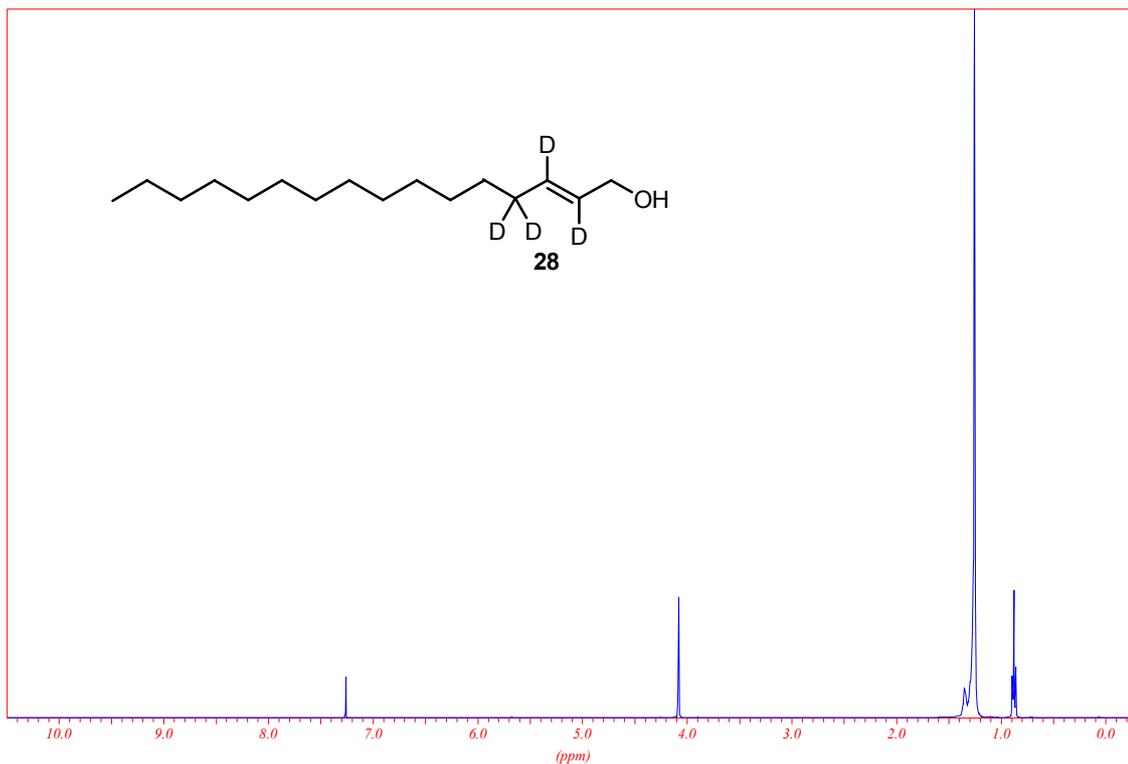


[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**)

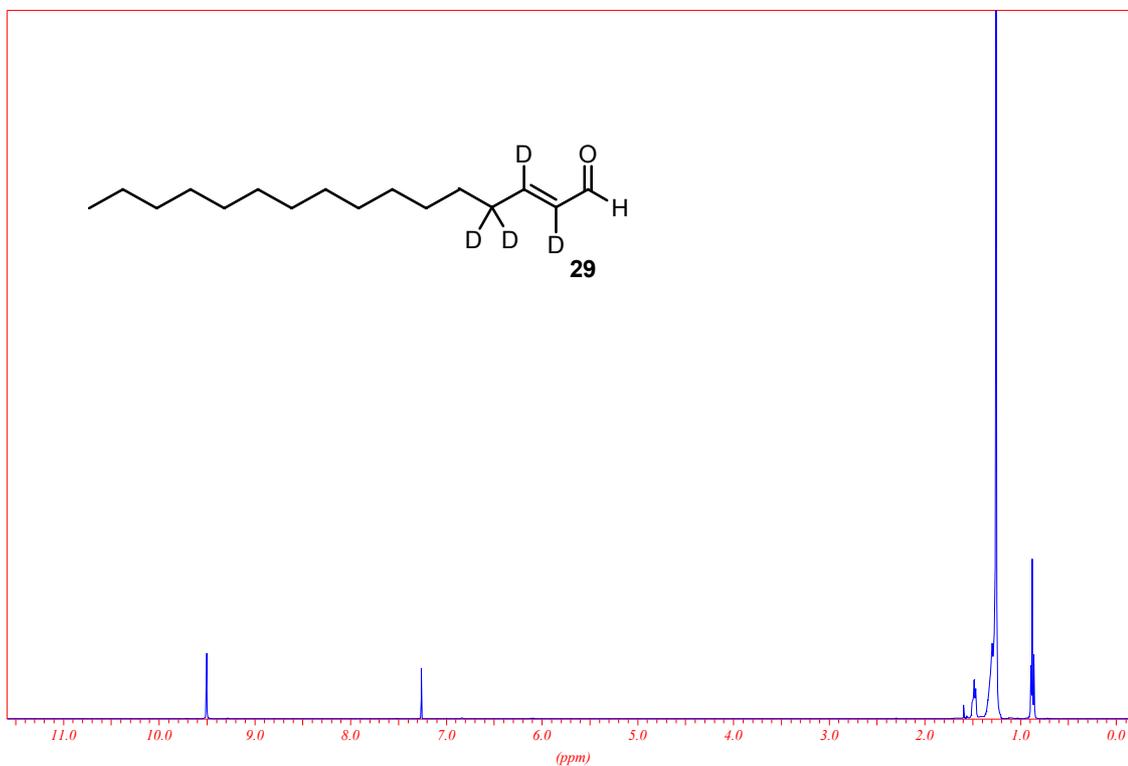


[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Iodotridecan (**25**)

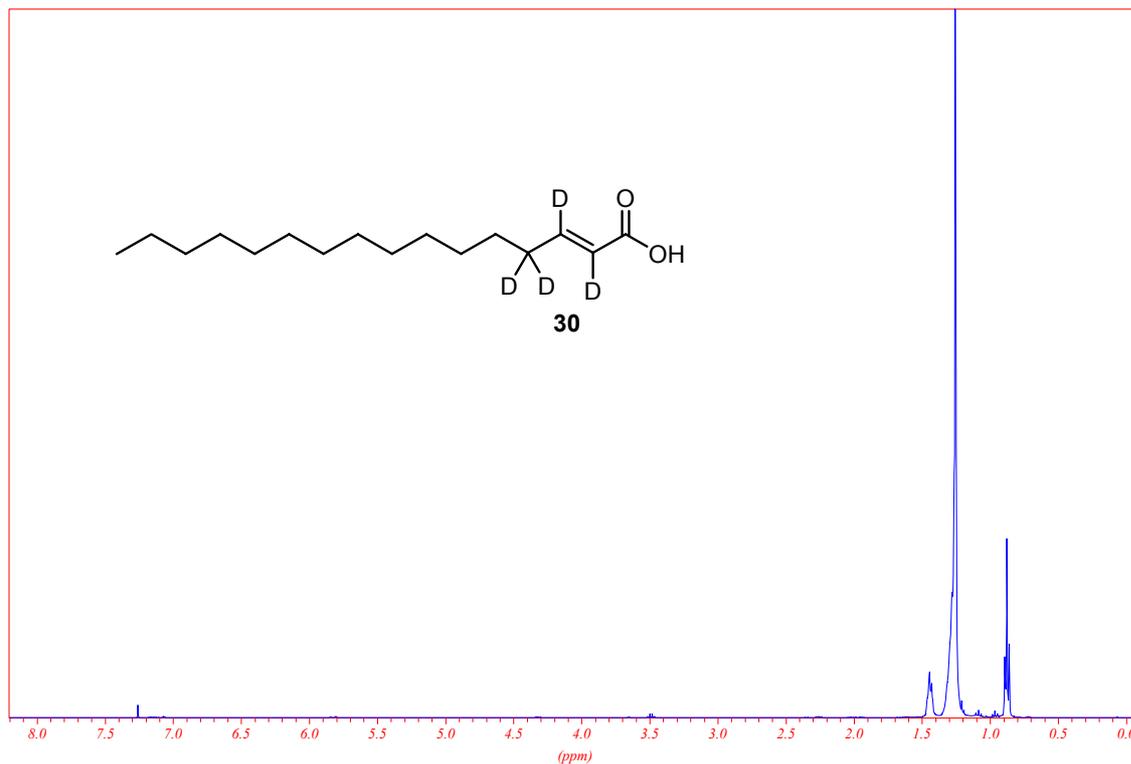
THP-Ether von [4,4- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-2-in-1-ol (27)[4,4- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-2-in-1-ol (27)



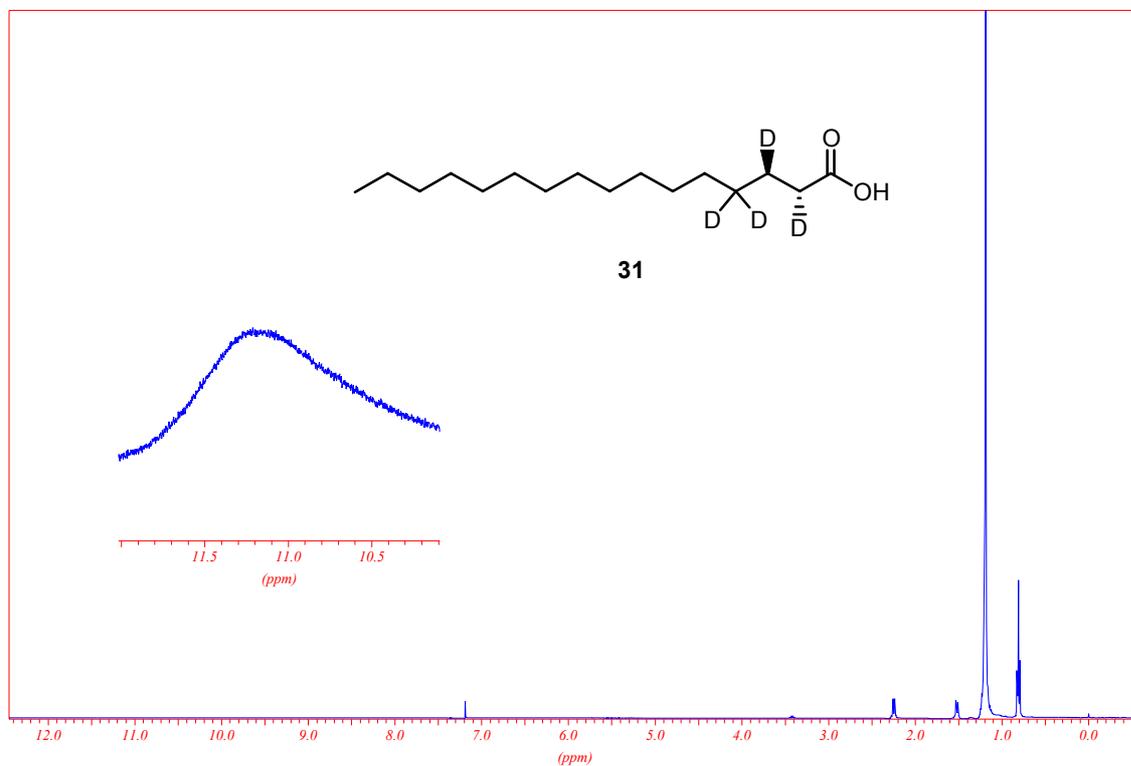
$(2E)$ -[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-ol (**28**)



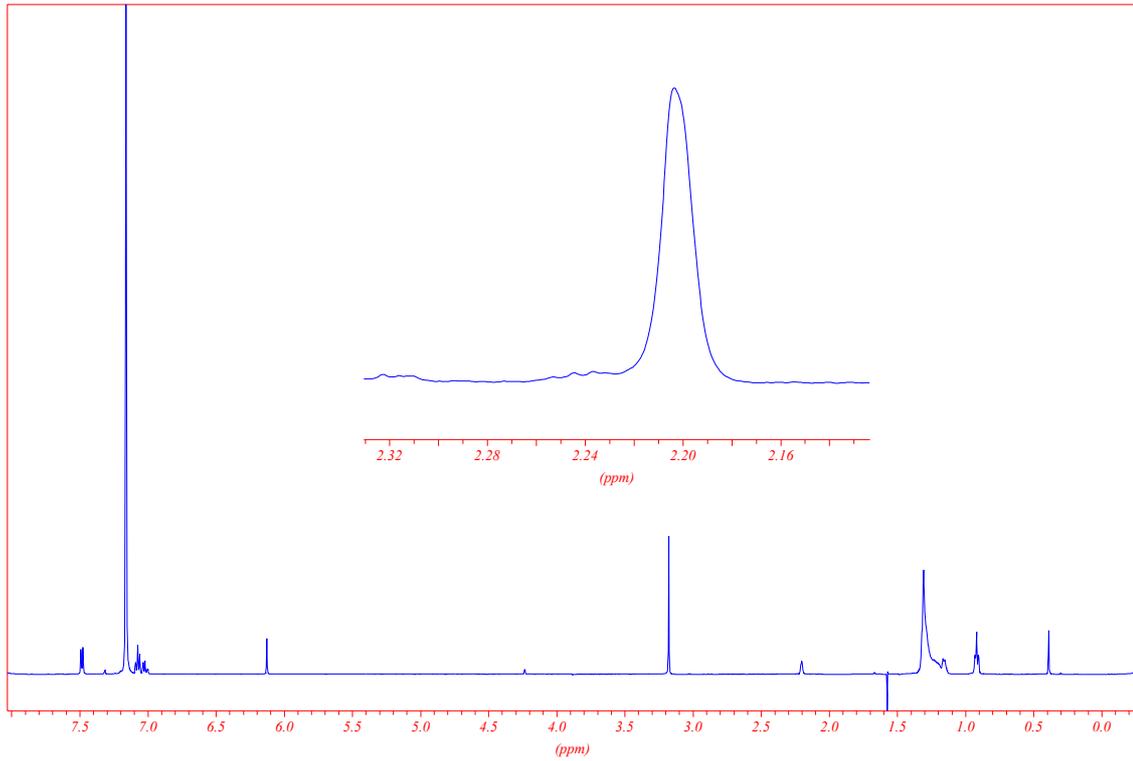
$(2E)$ -[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-al (**29**)



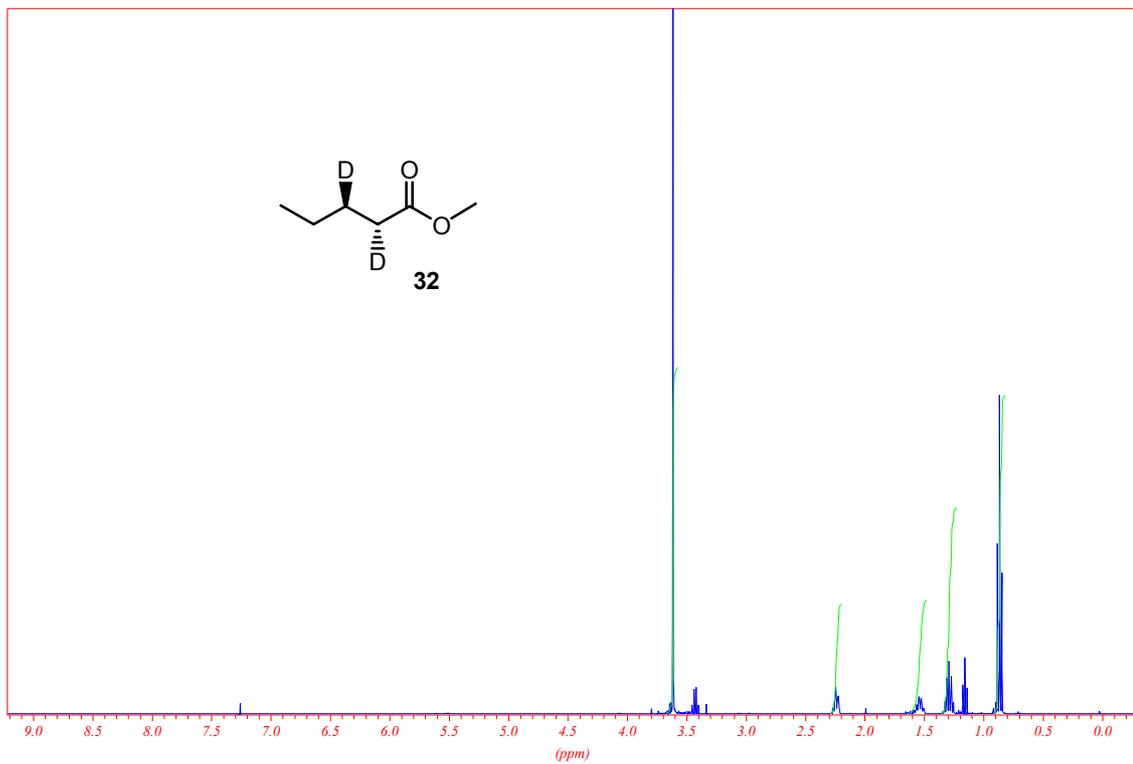
$(2E)$ -[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-ensäure (**30**)



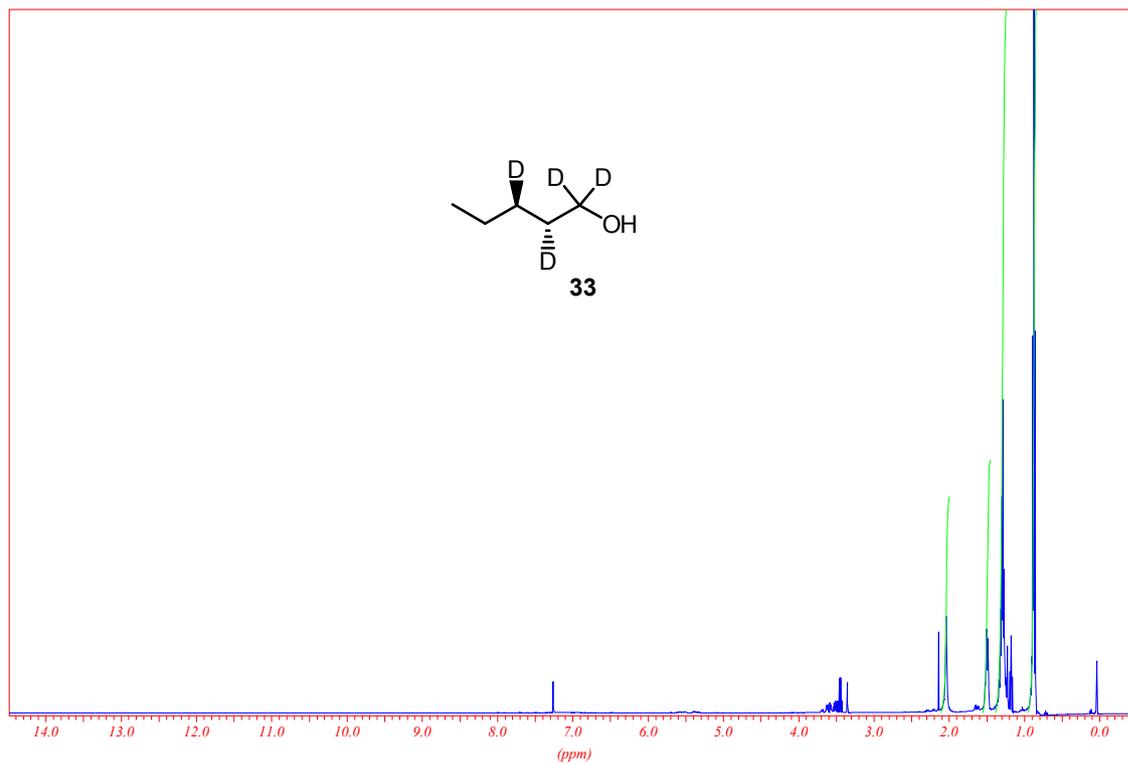
$(2R,3S)$ -[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]-Hexadecansäure (**31**)



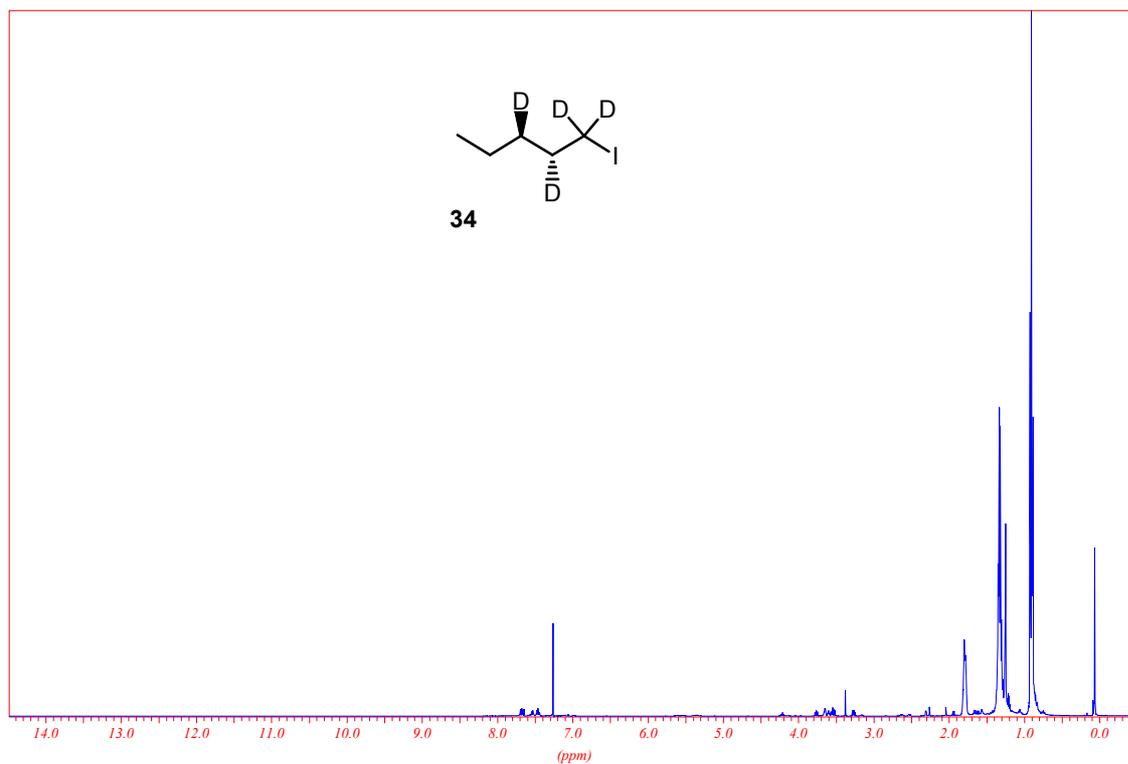
(S)-(+)-Mandelsäurediester von **31**



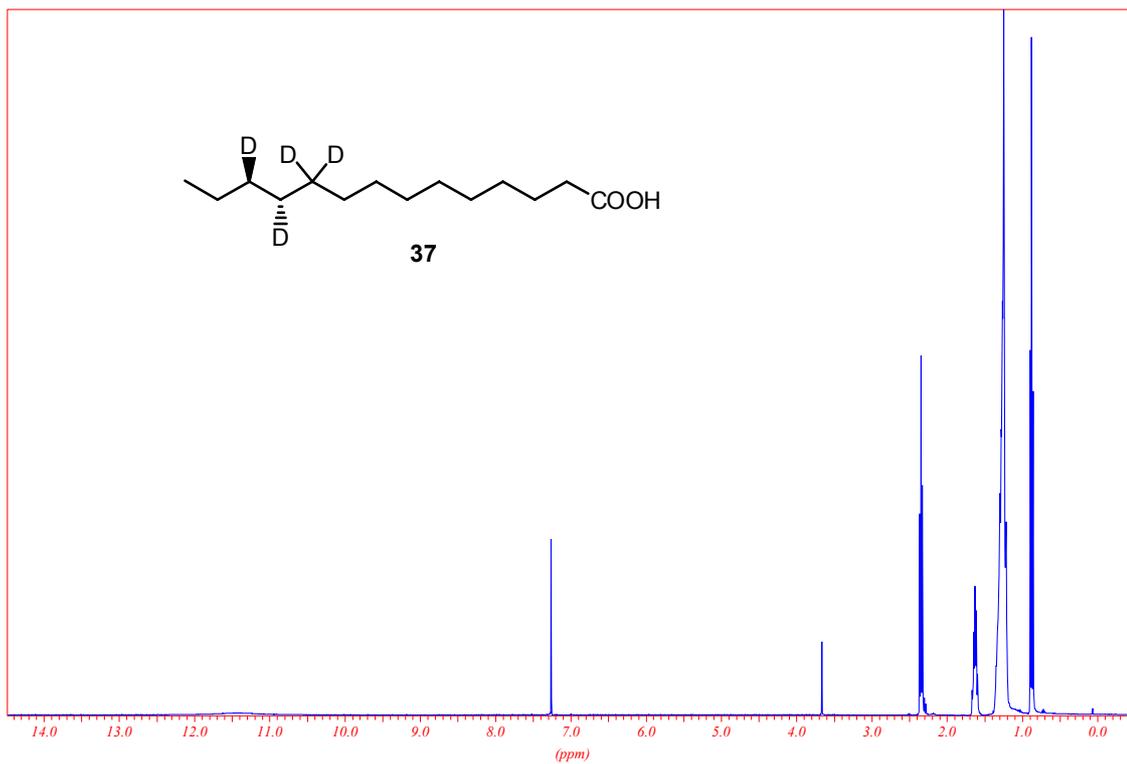
(2R,3R)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (**32**)



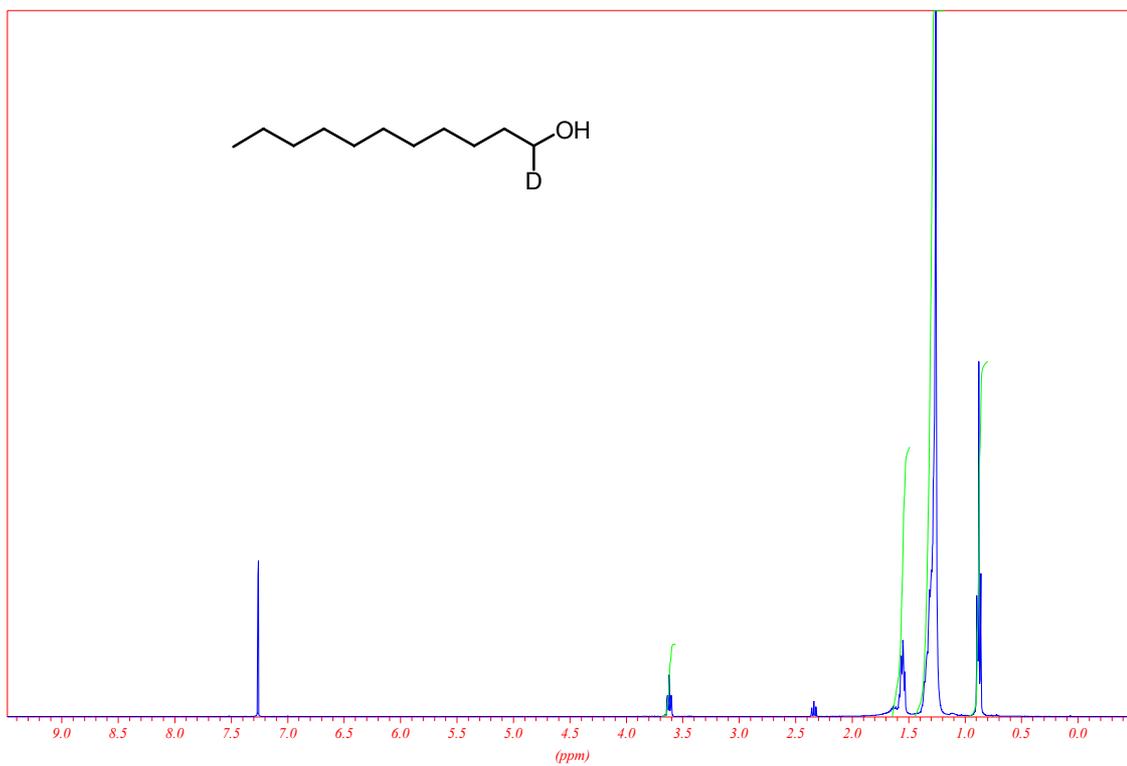
(2R, 3R)-[1,1,2,3- $^2\text{H}_4$ ]-Pentanol (**33**)



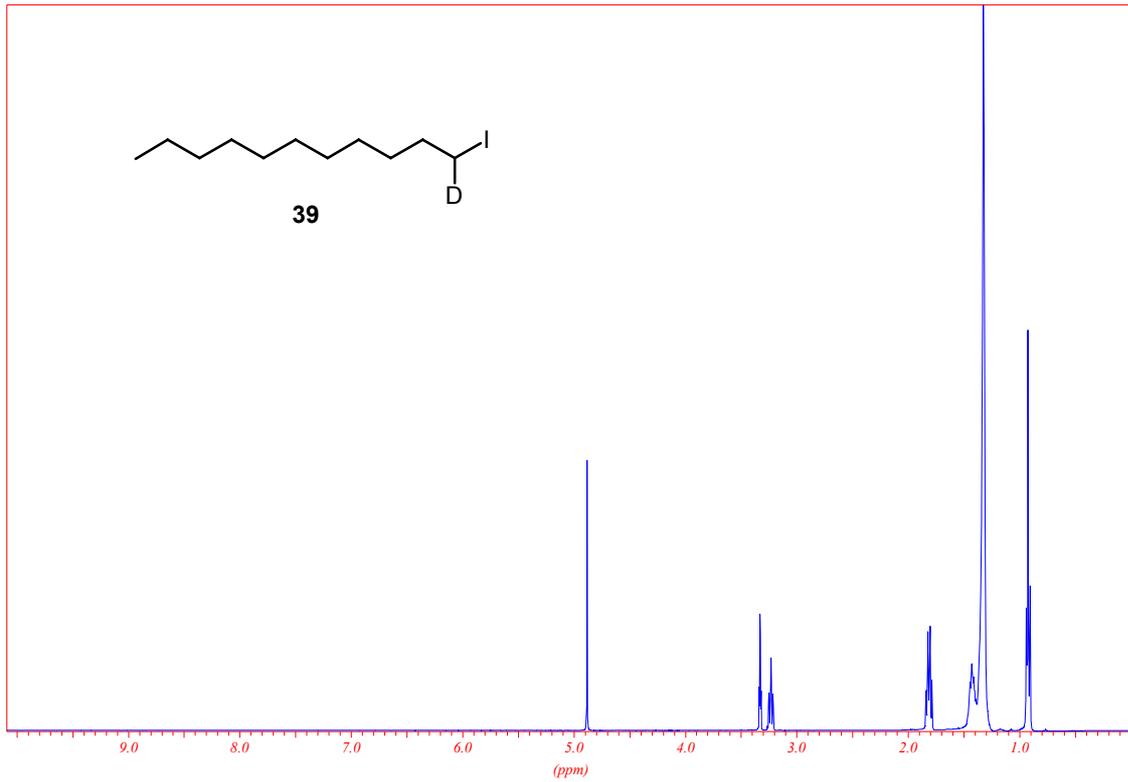
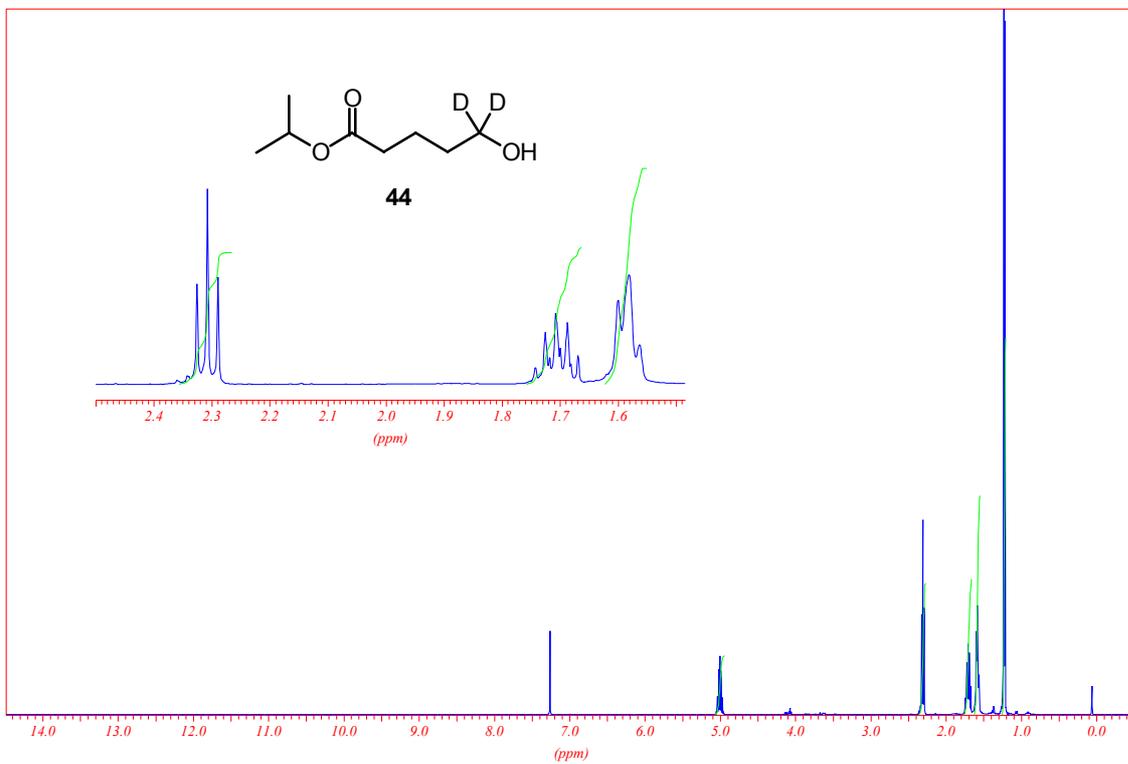
(2R,3R)-[1,1,2,3- $^2\text{H}_4$ ]-Pentyl iodid (**34**)

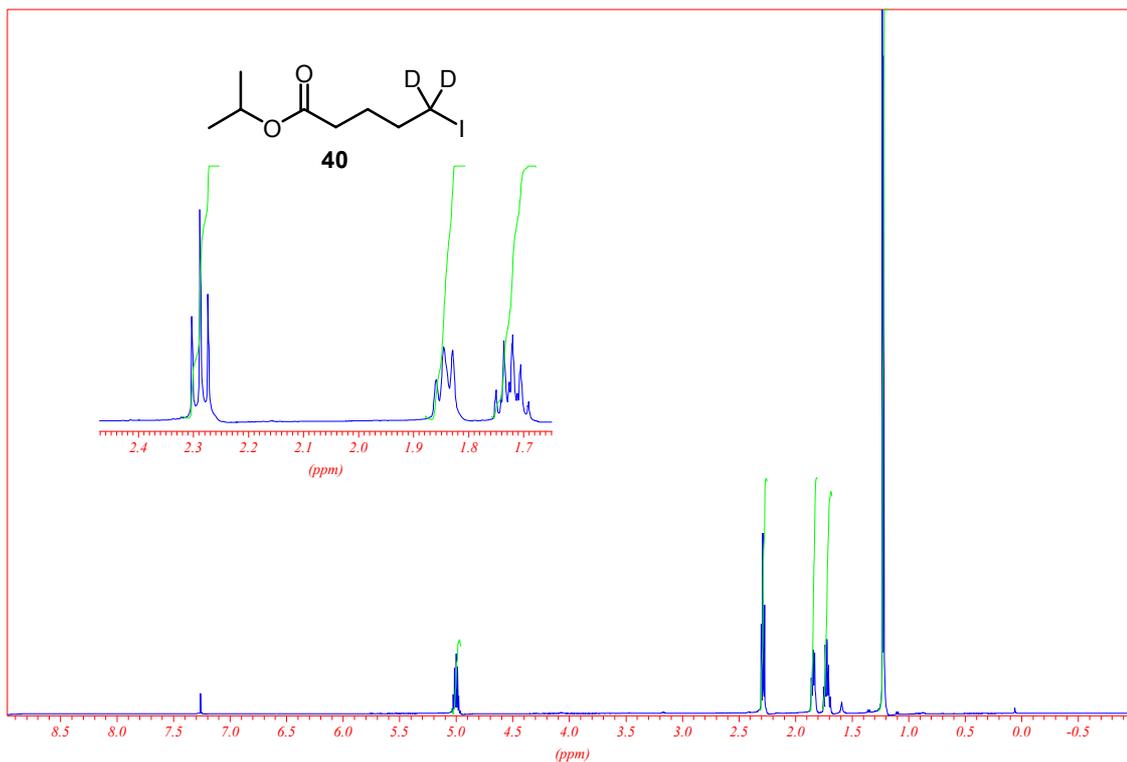


(11R,12R)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (37)

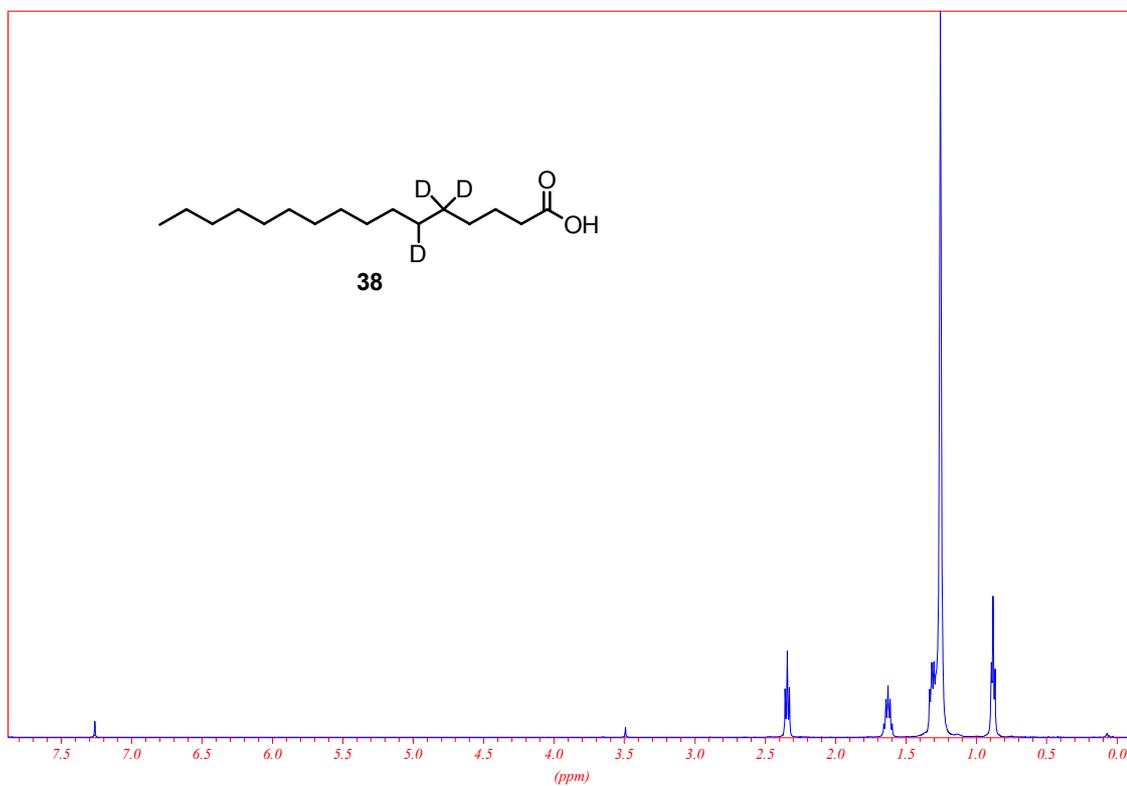


[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecan-1-ol

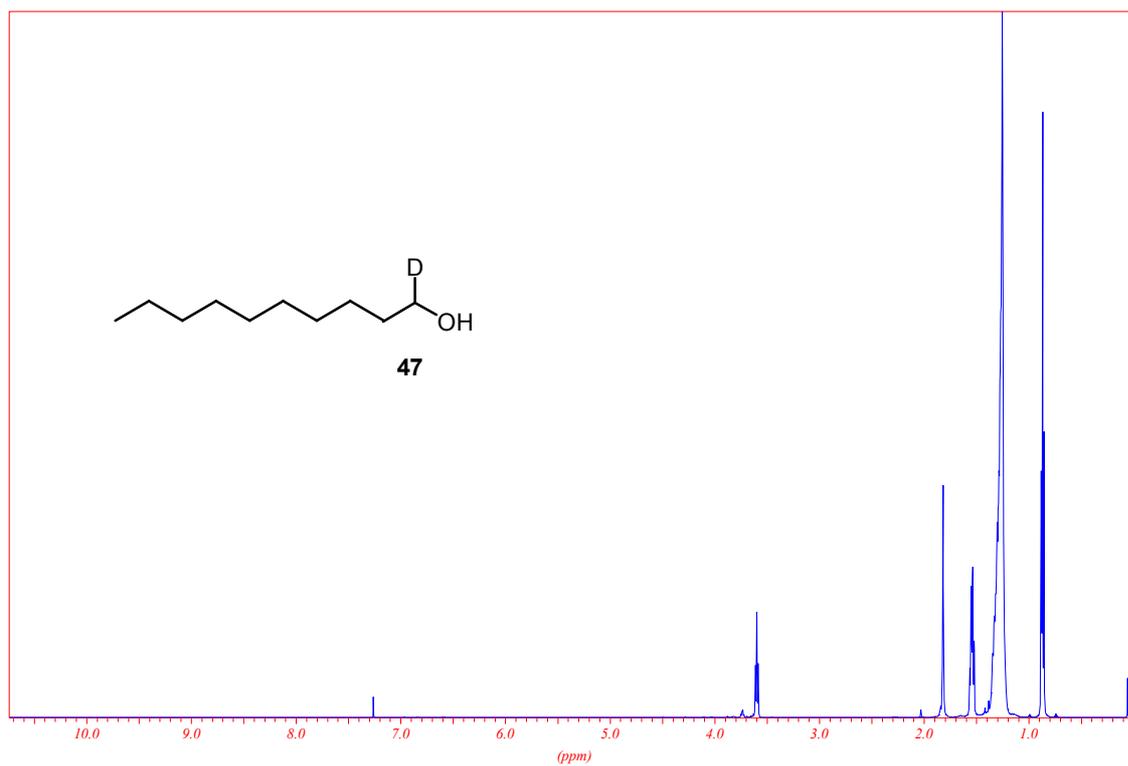
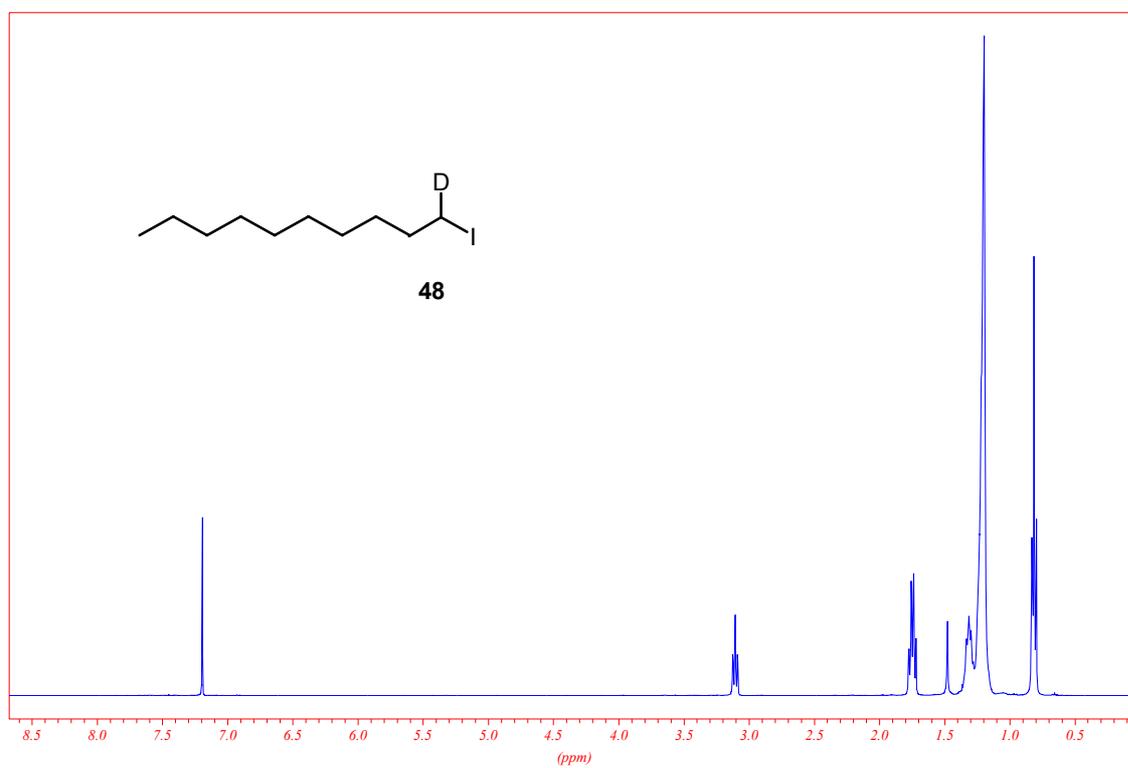
[1- $^2\text{H}_1$ ]-Undecyliodid (**39**)[5,5- $^2\text{H}_2$ ]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (**44**)

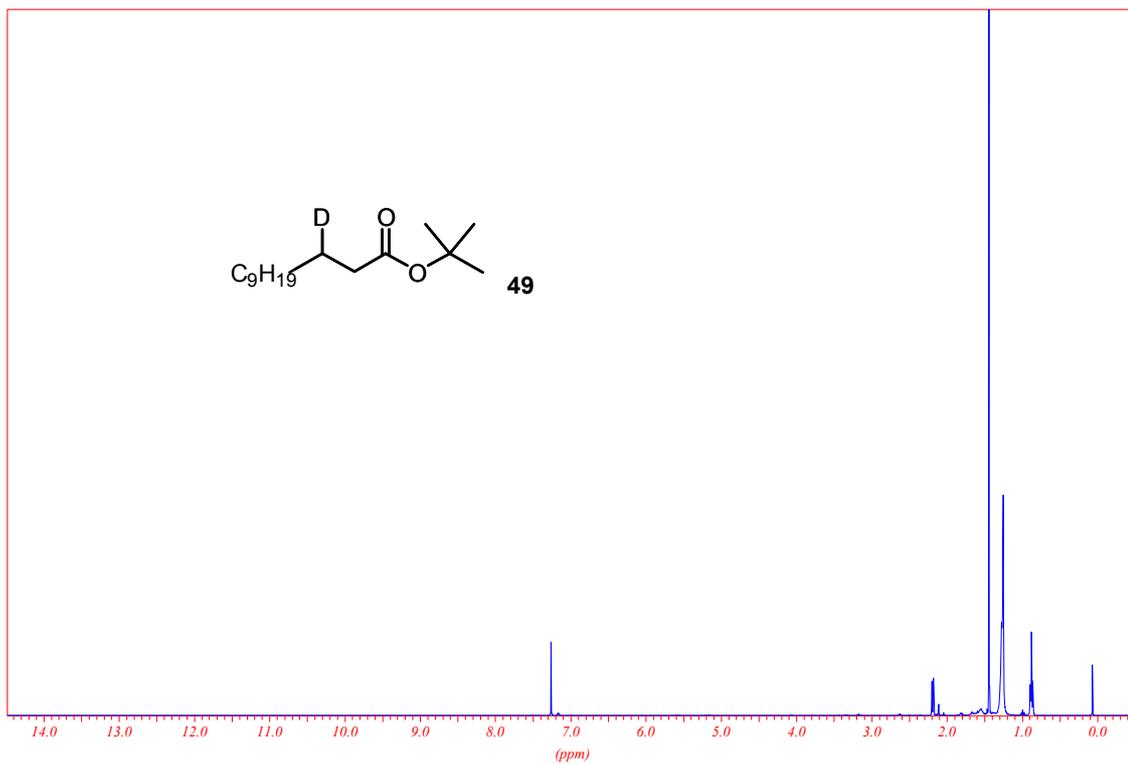


[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Iodopentansäureisopropylester (**40**)

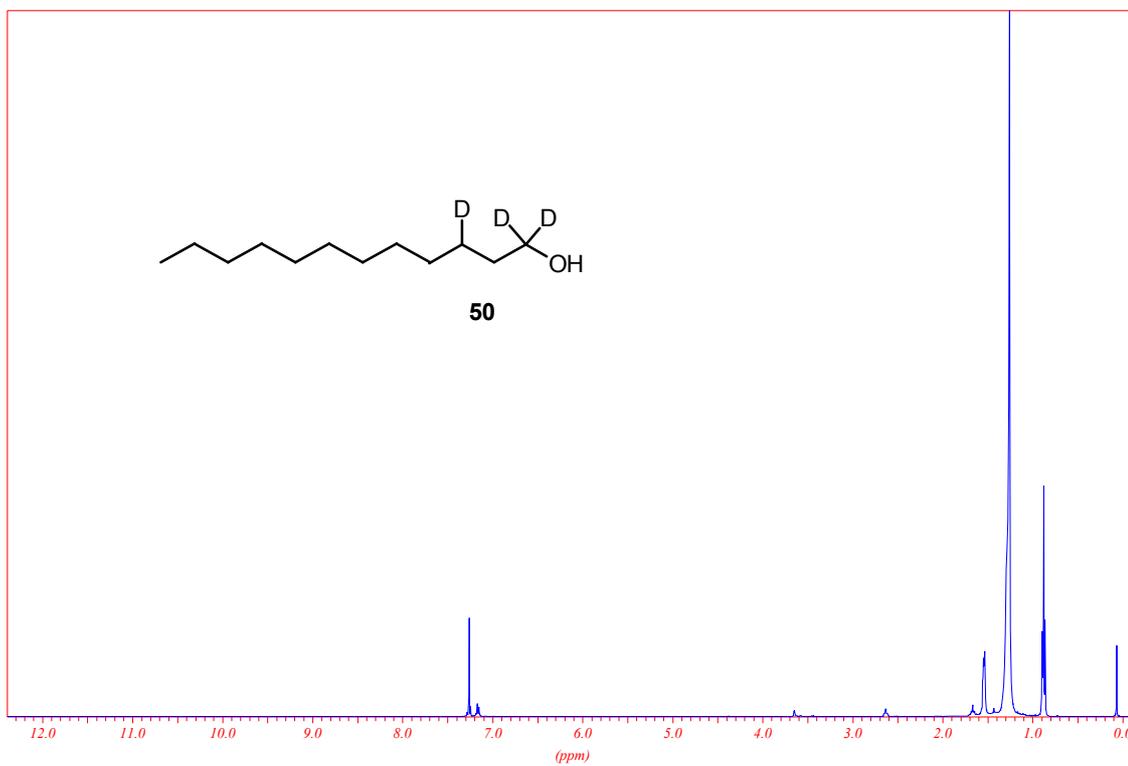


rac-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**)

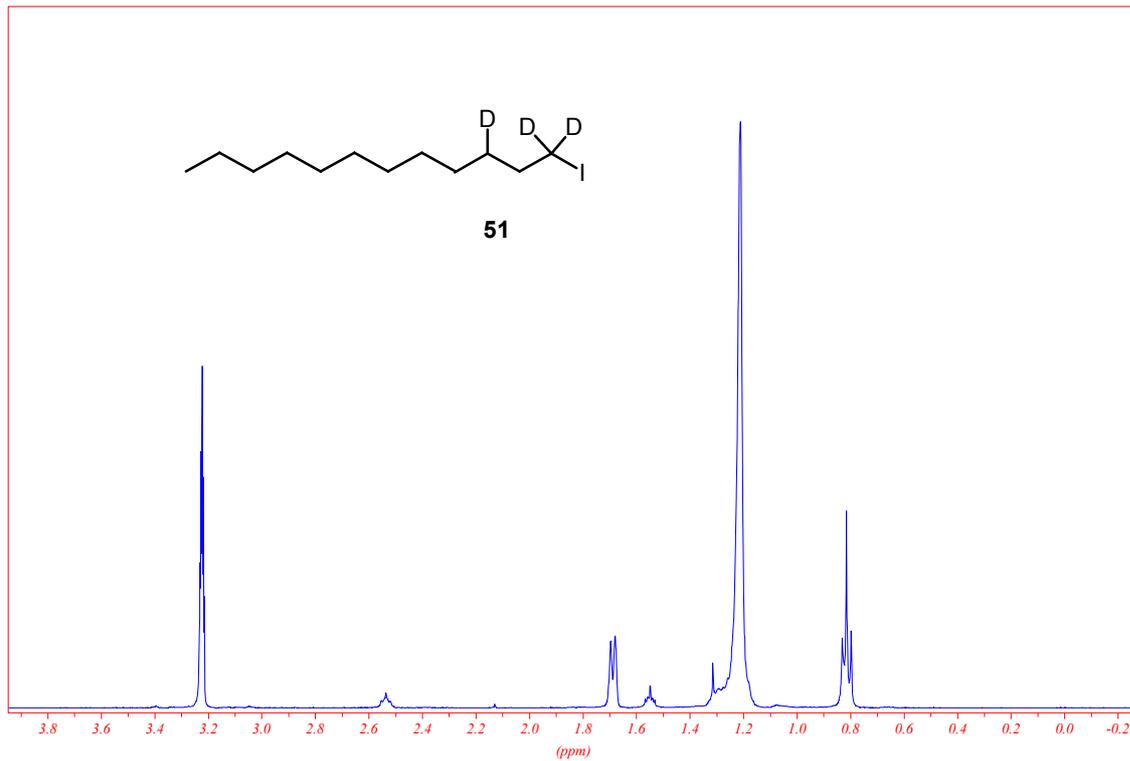
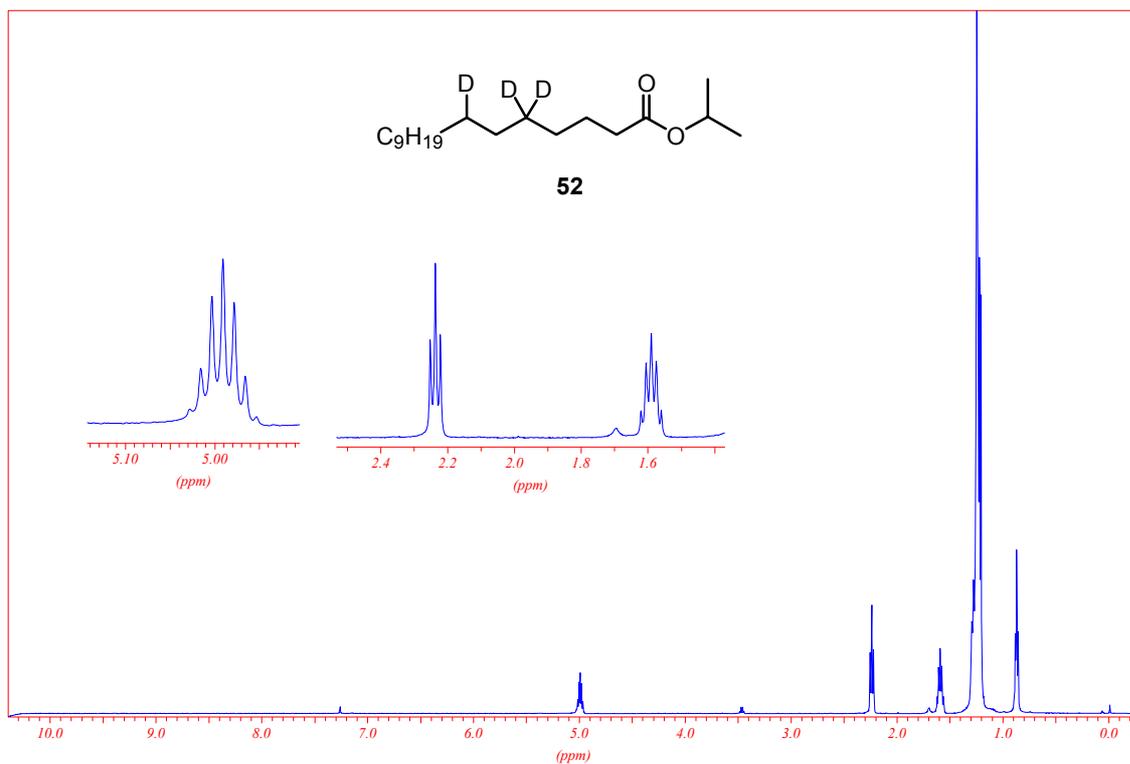
[1- $^2\text{H}_1$ ]-Decanol (47)[1- $^2\text{H}_1$ ]-Decylodid (48)

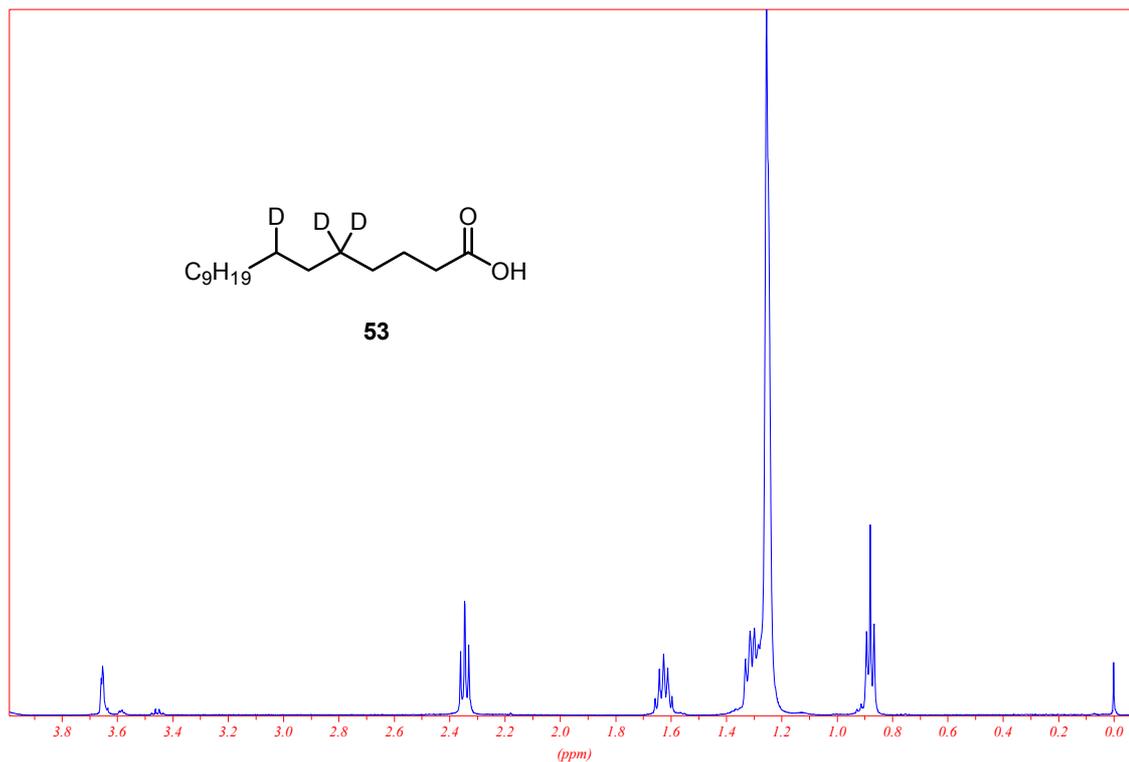


[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Dodecansäure-*tert*-butylester (**49**)

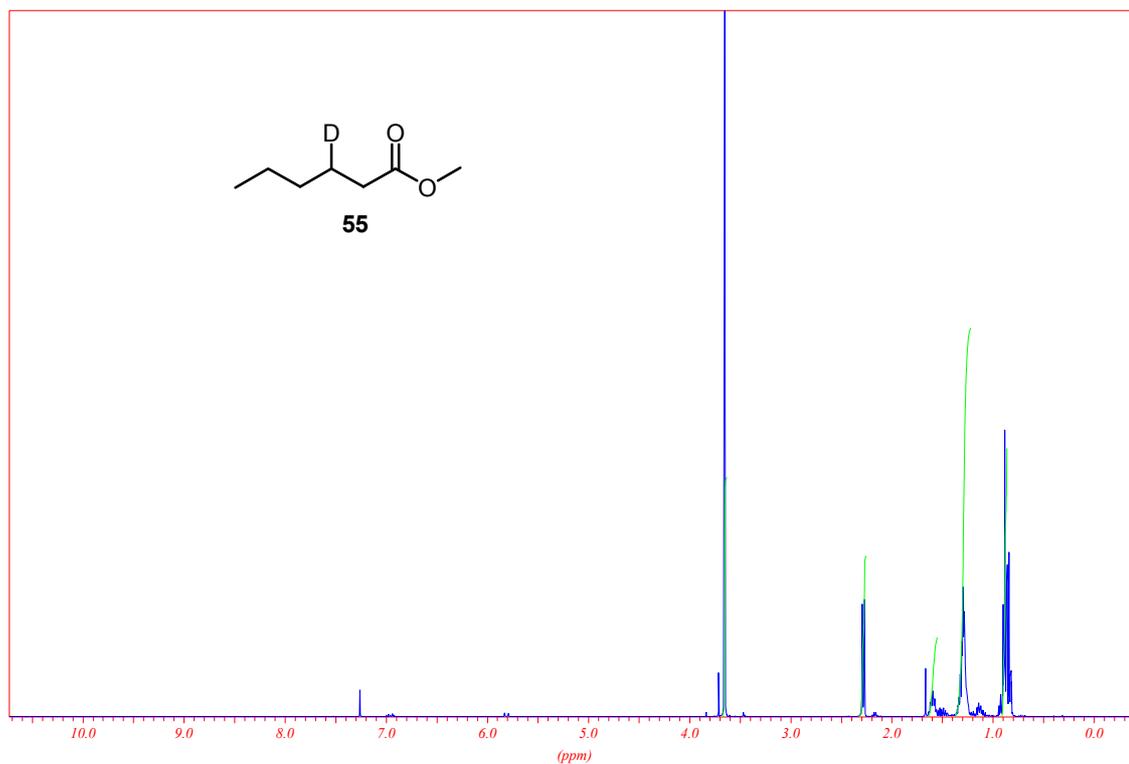


[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (**50**)

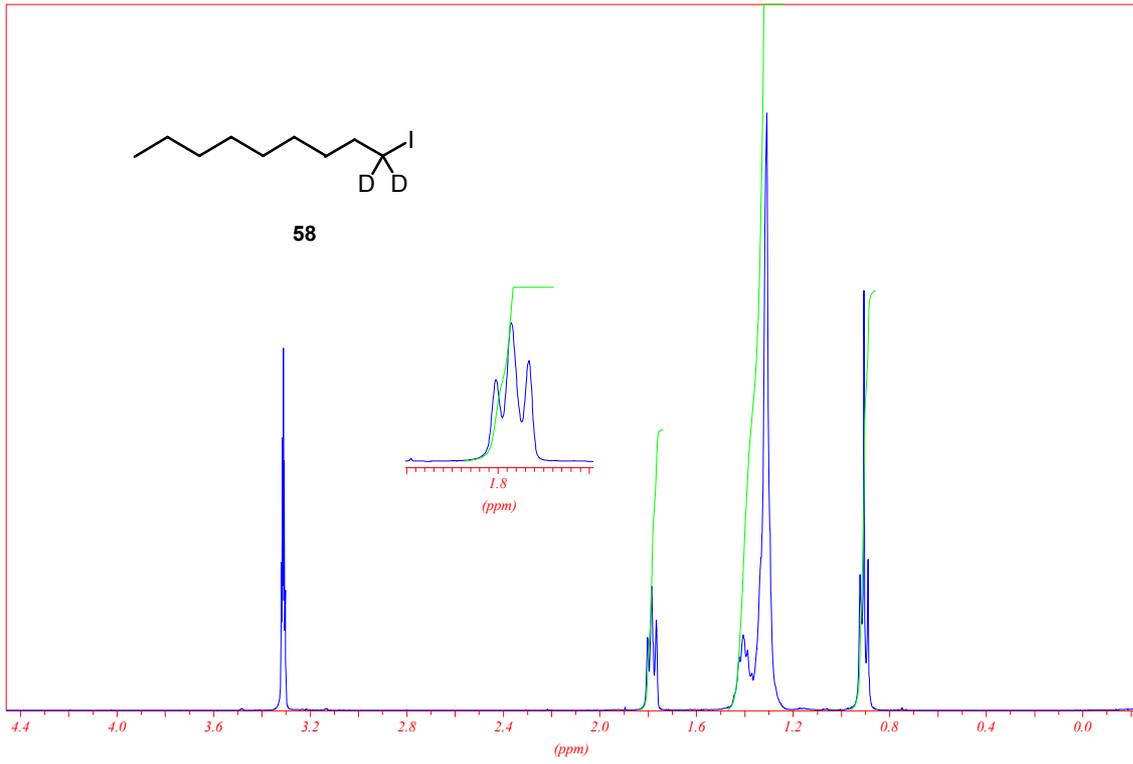
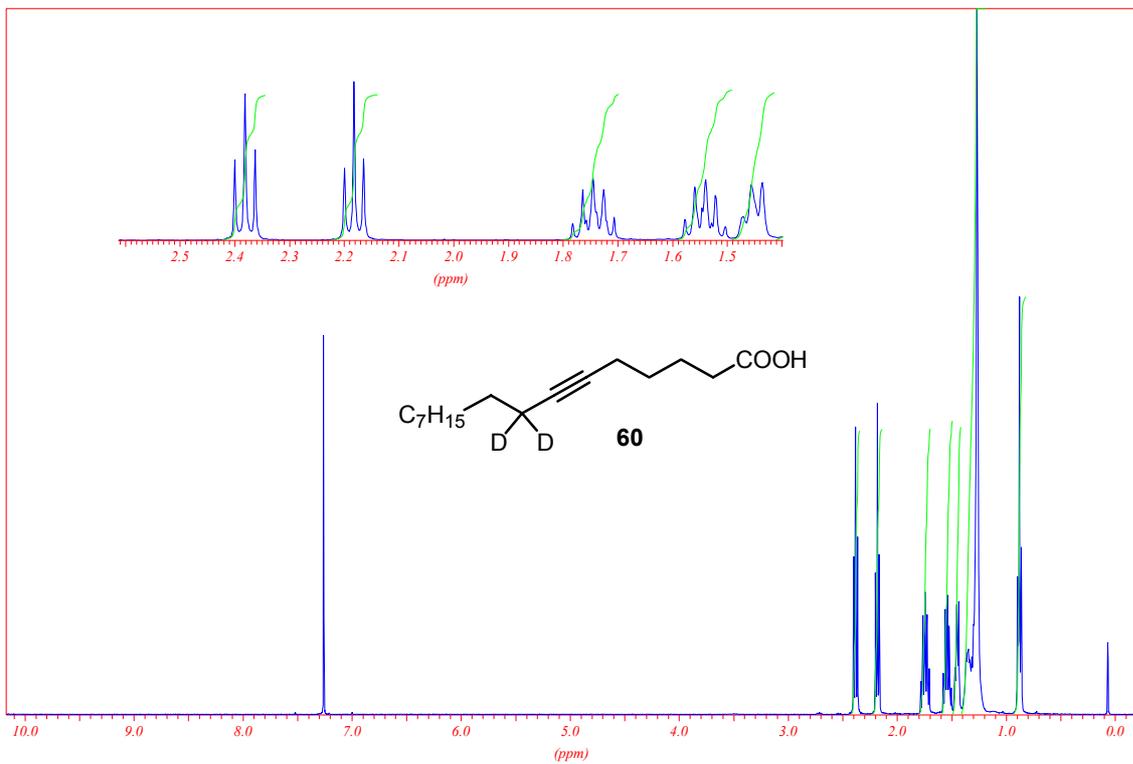
[1,1,3- $^2\text{H}_3$ ]-Dodecyl iodid (**51**)*rac*-[5,5,7- $^2\text{H}_3$ ]-Hexadecansäureisopropylester (**52**)

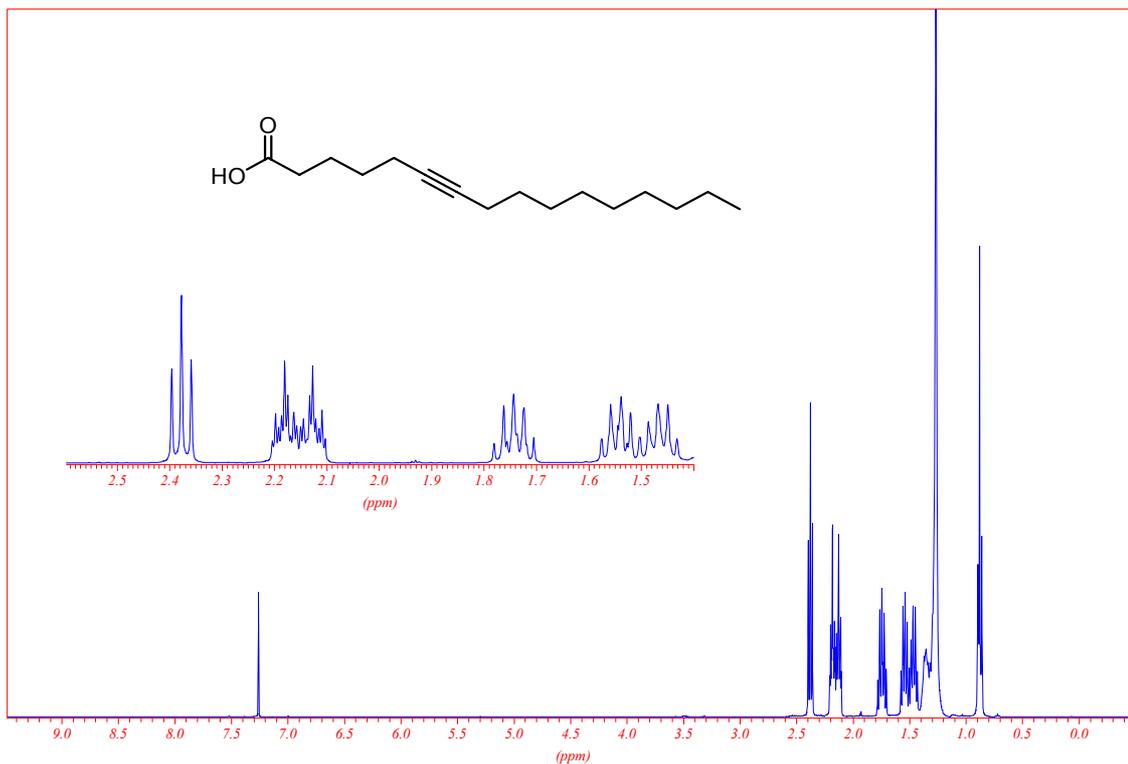


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**)

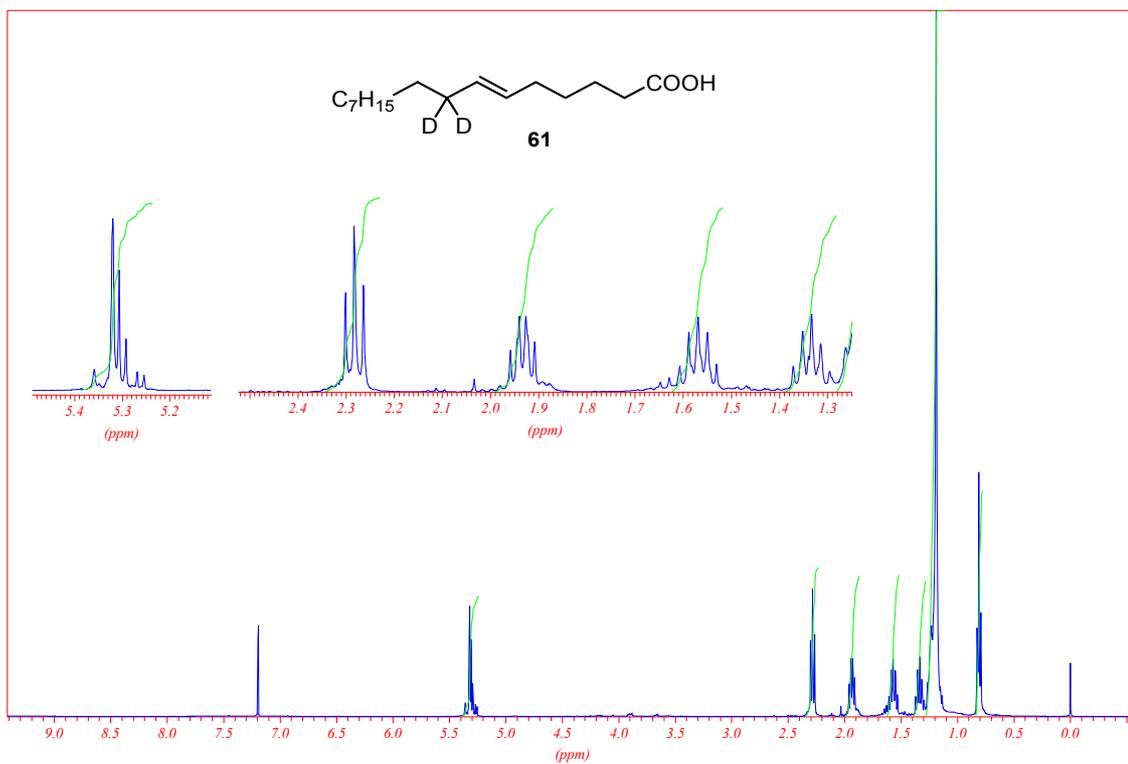


[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Hexansäuremethylester (**55**)

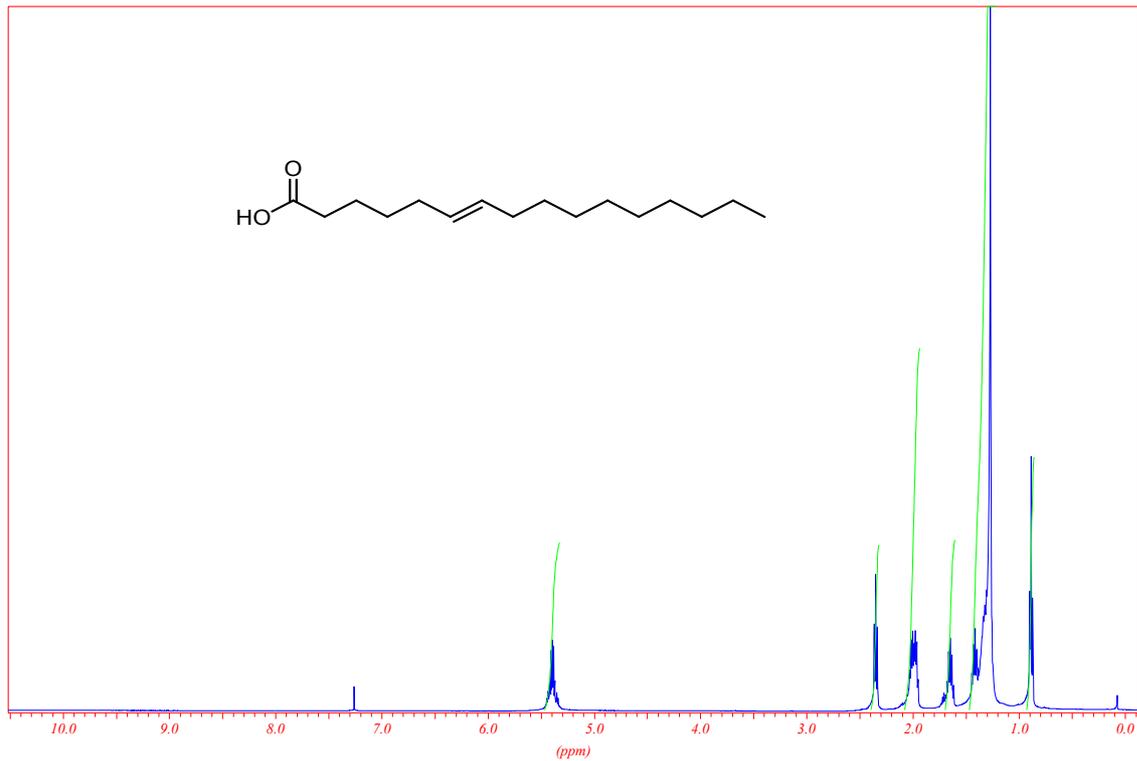
[1,1- $^2\text{H}_2$ ]-Iodnonan (**58**)[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-insäure (**60**)



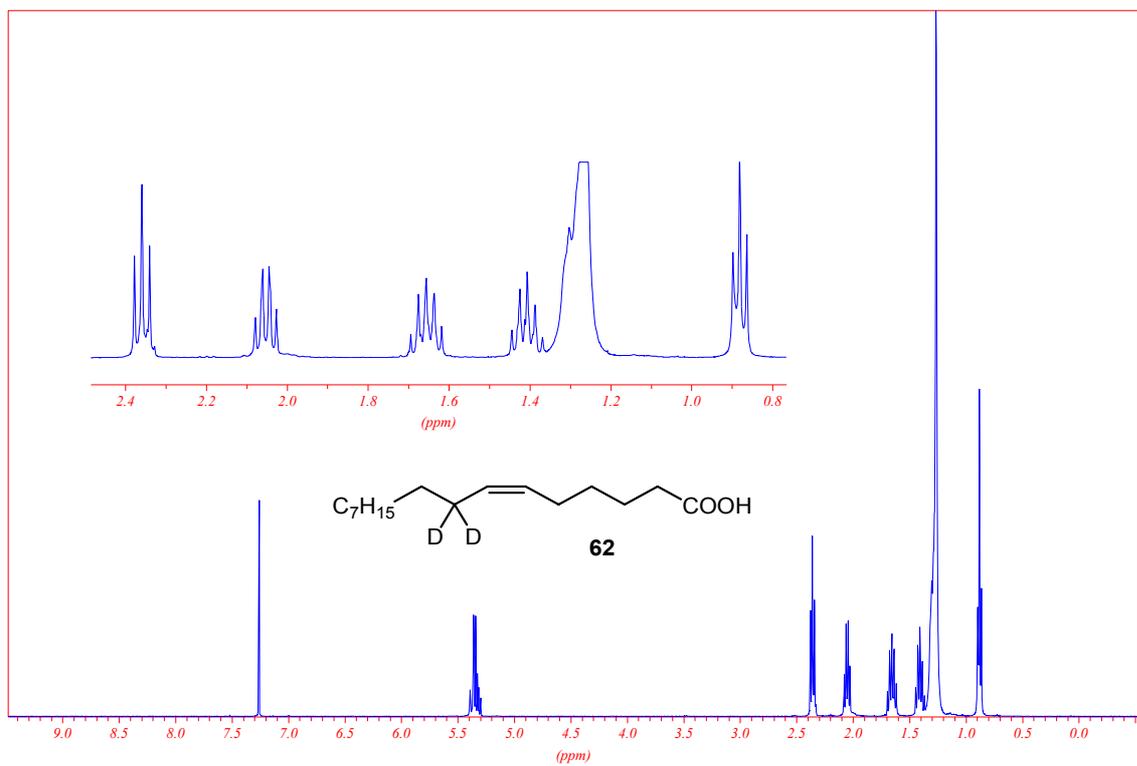
Hexadec-6-insäure



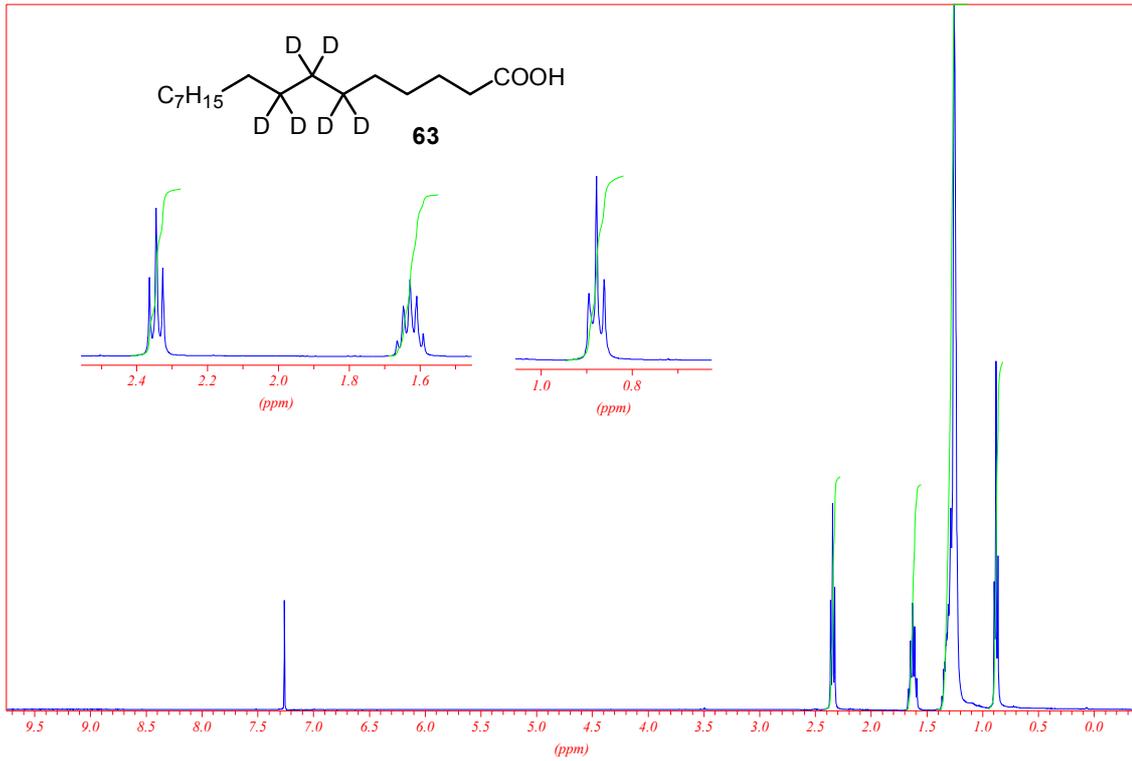
(E)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (61)



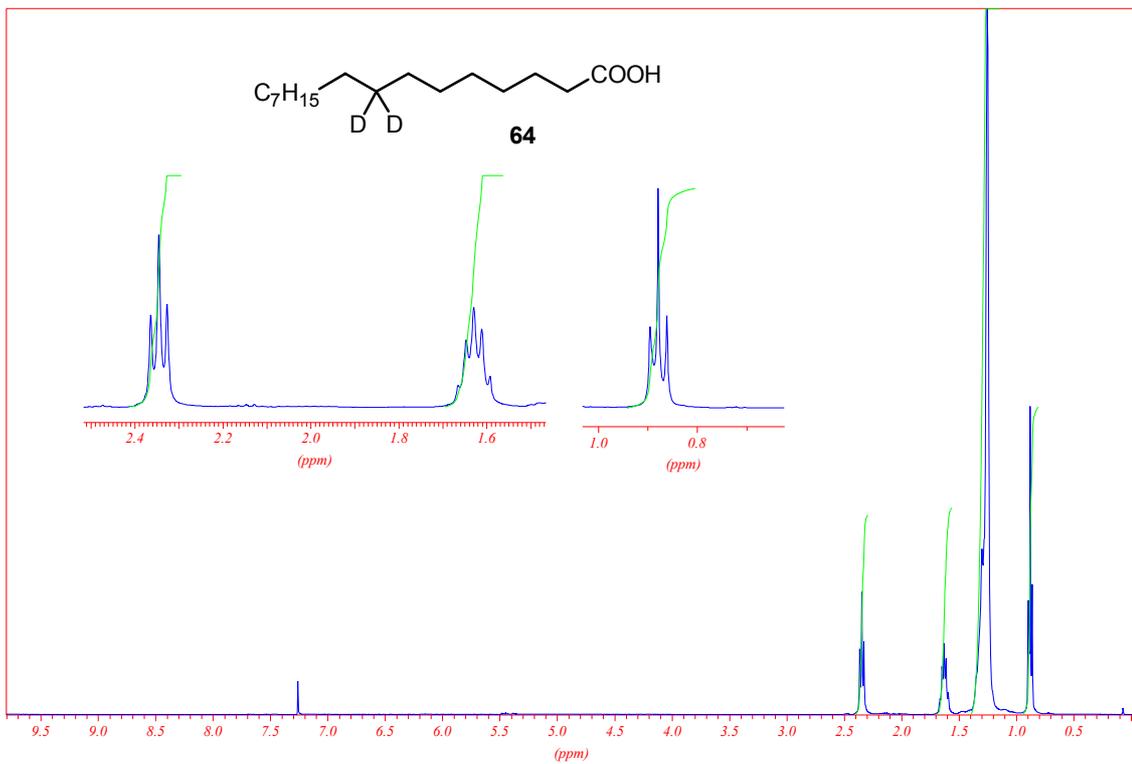
(E)-Hexadec-6-ensäure (**139**)



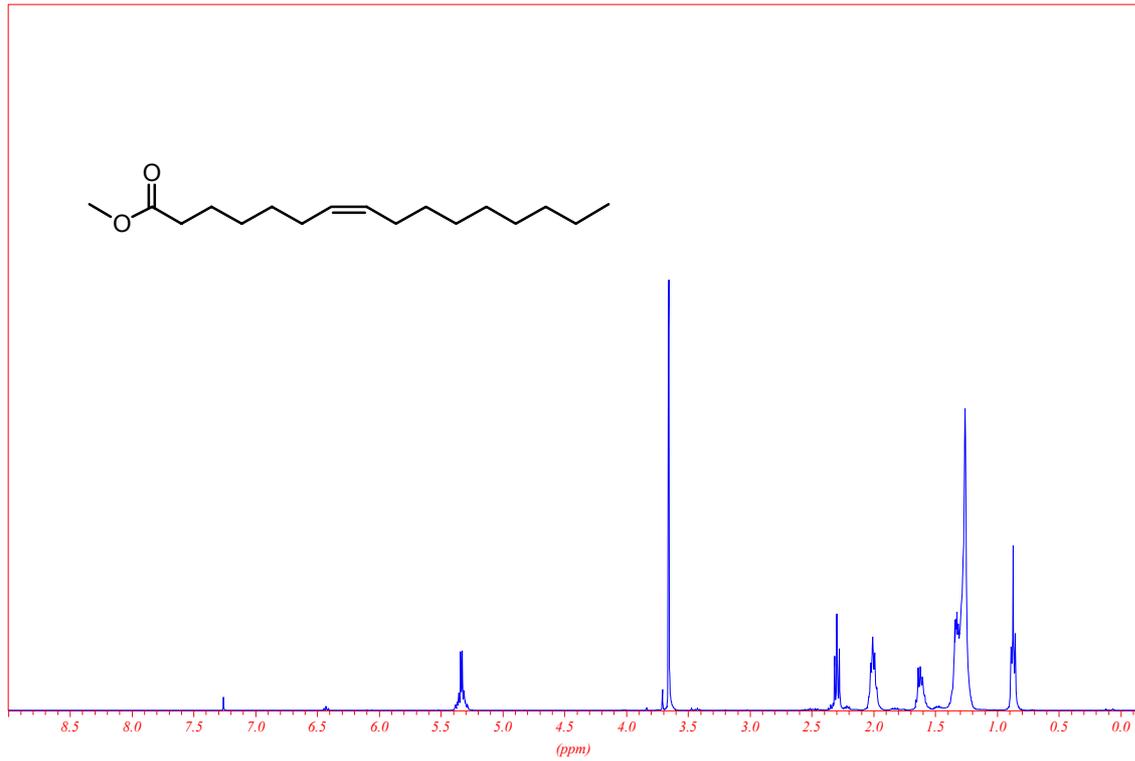
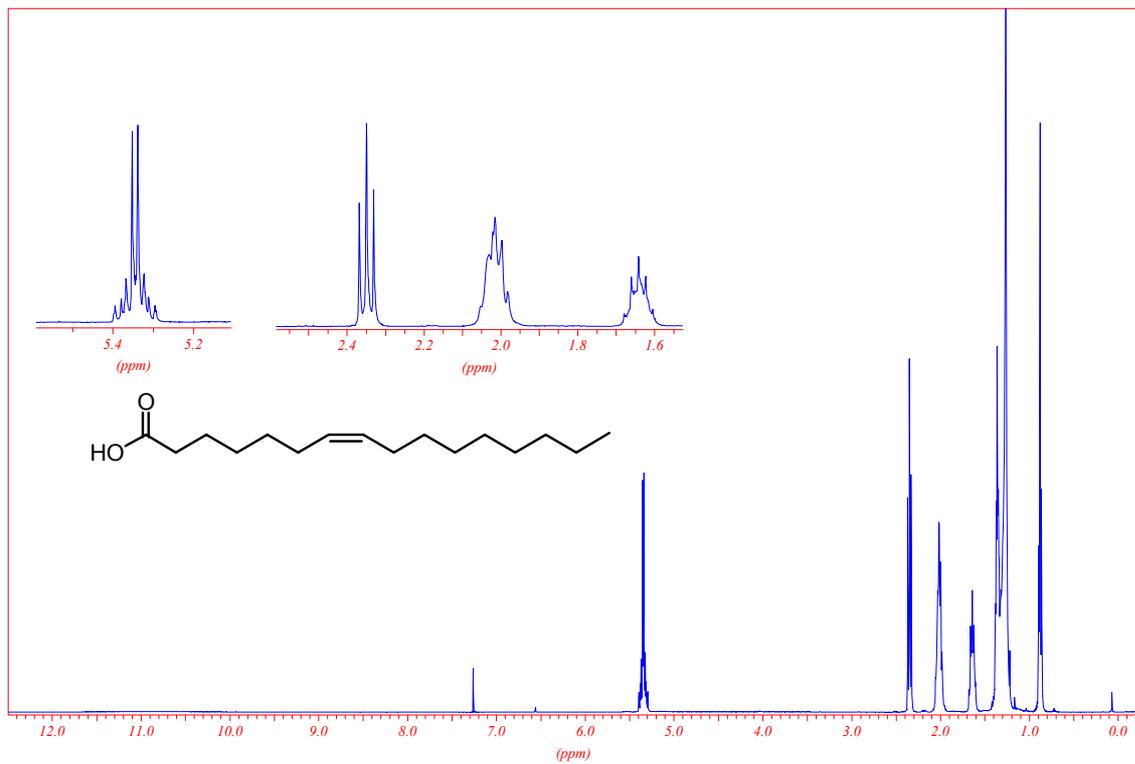
(6Z)-[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (**62**)

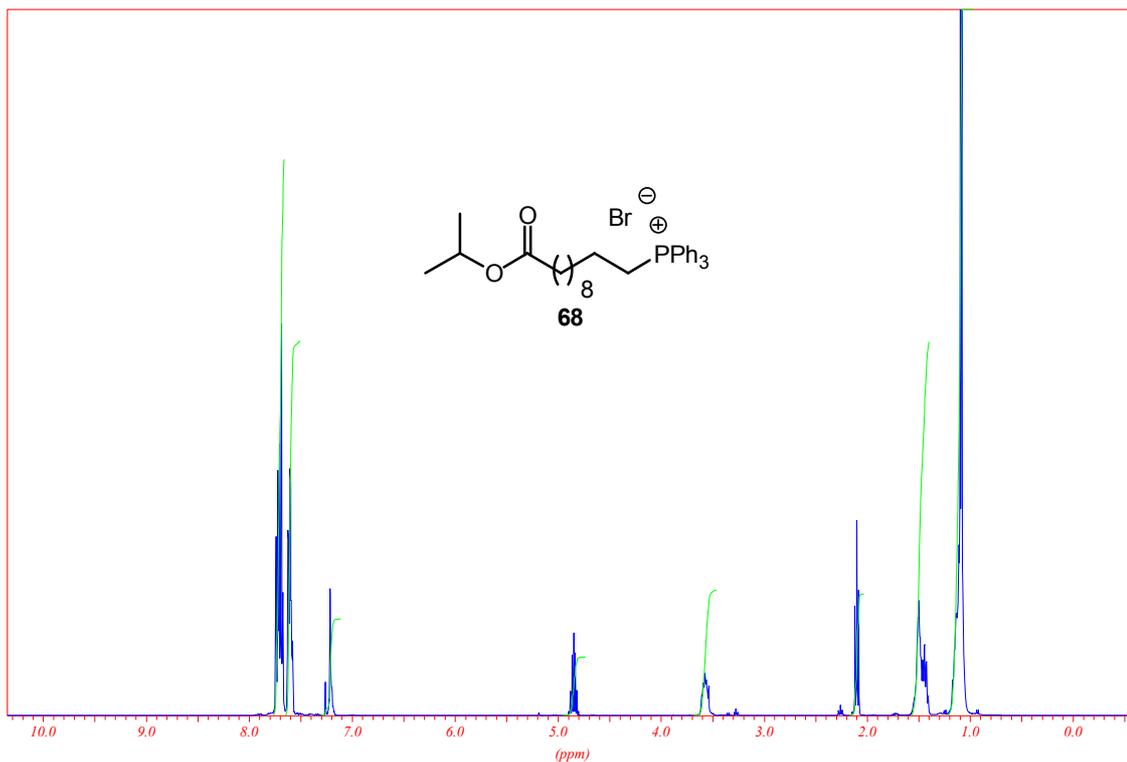


[6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecansäure (**63**)

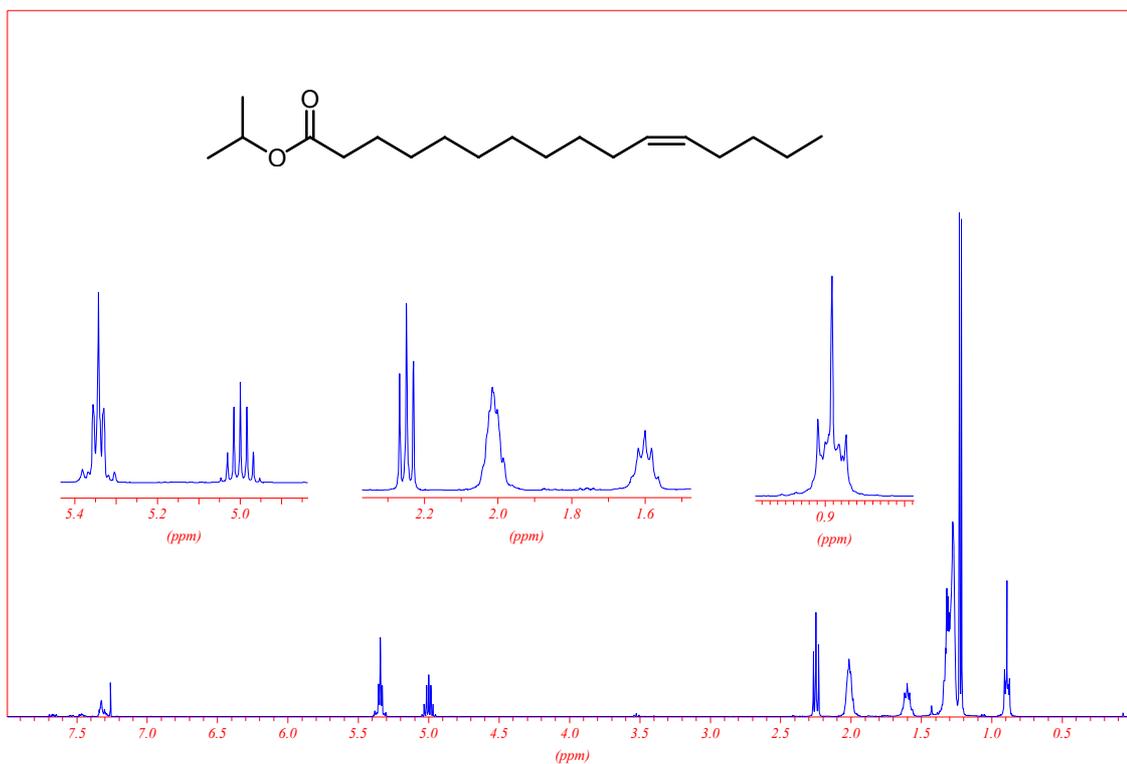


[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**64**)

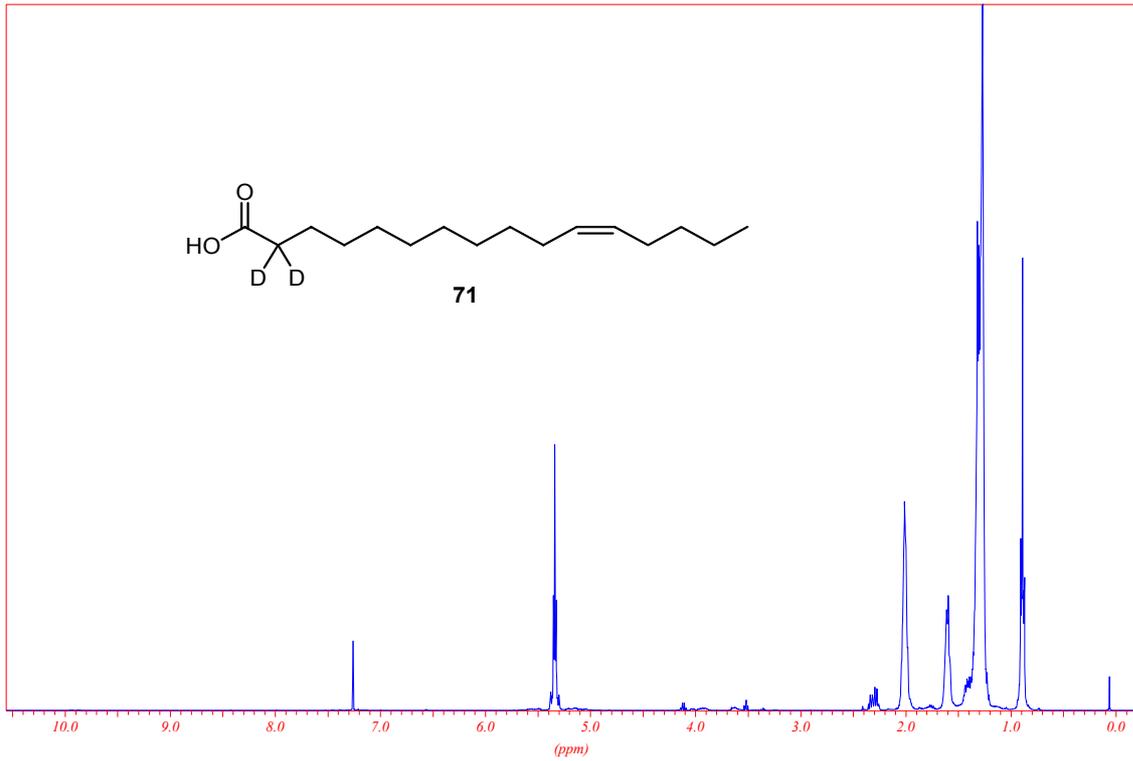
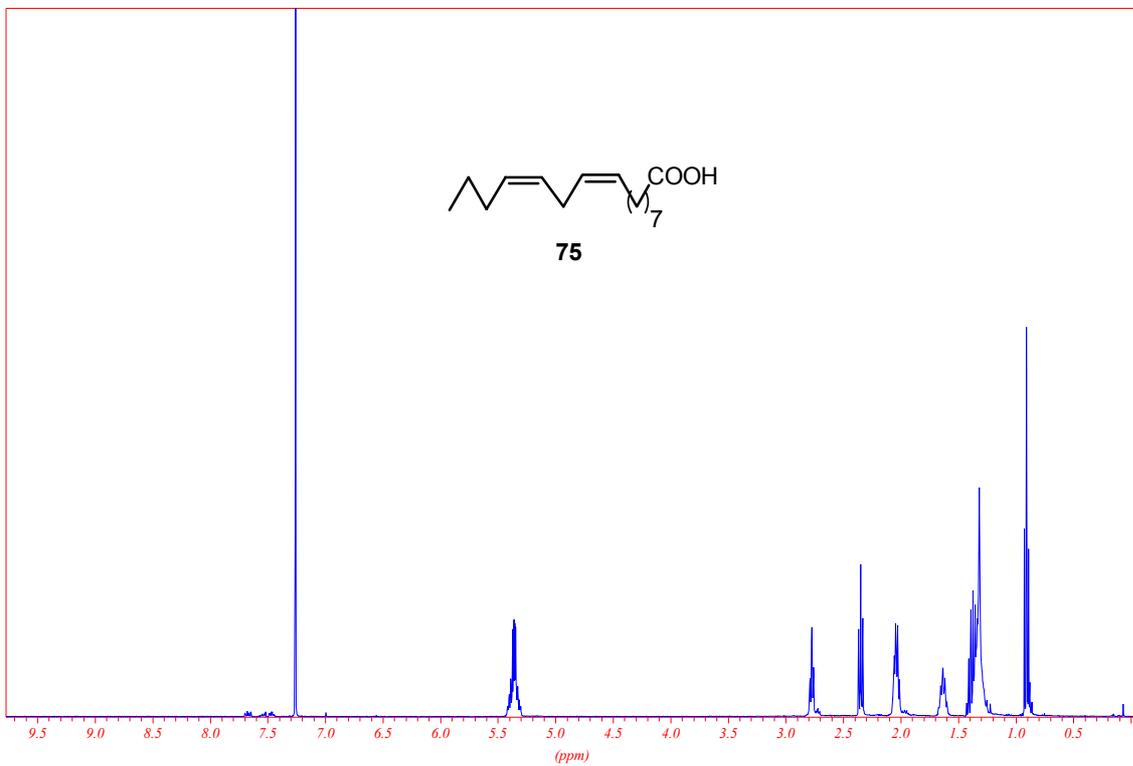
(7Z)-Hexadec-7-ensäuremethylester (**67a**)(7Z)-Hexadec-7-ensäure (**67b**)



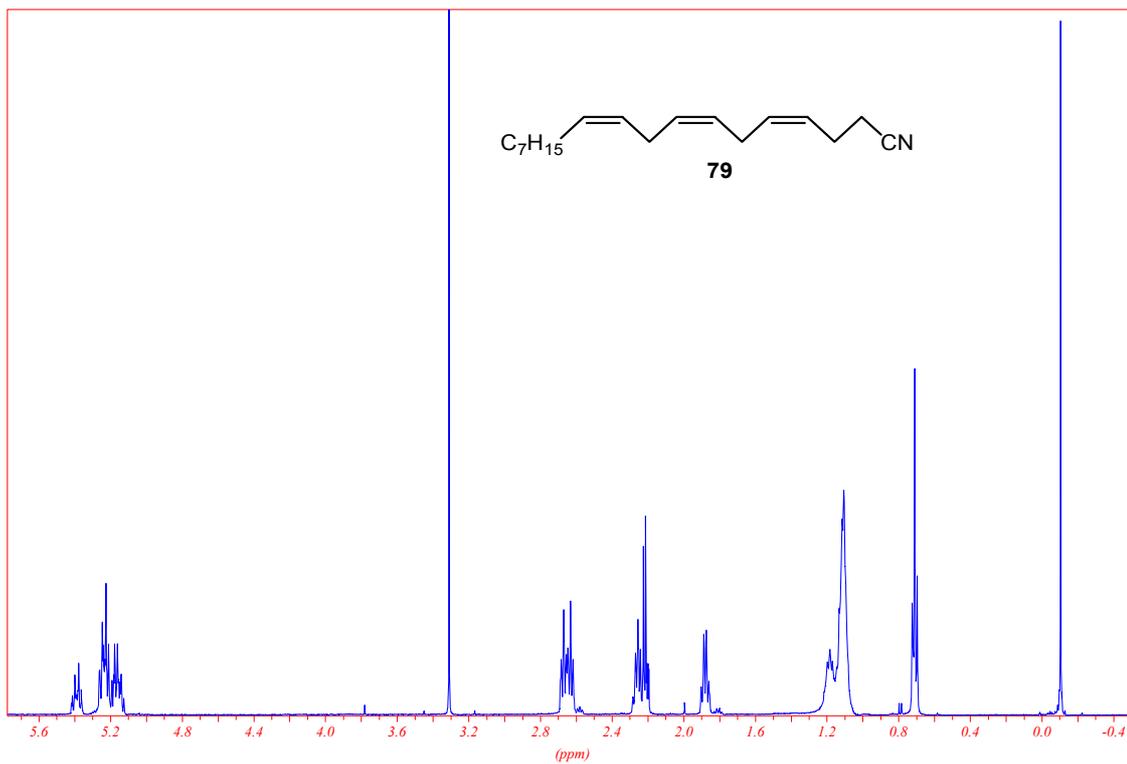
Bromundecansäuretriphenylphosphoniumsalz (**68**)



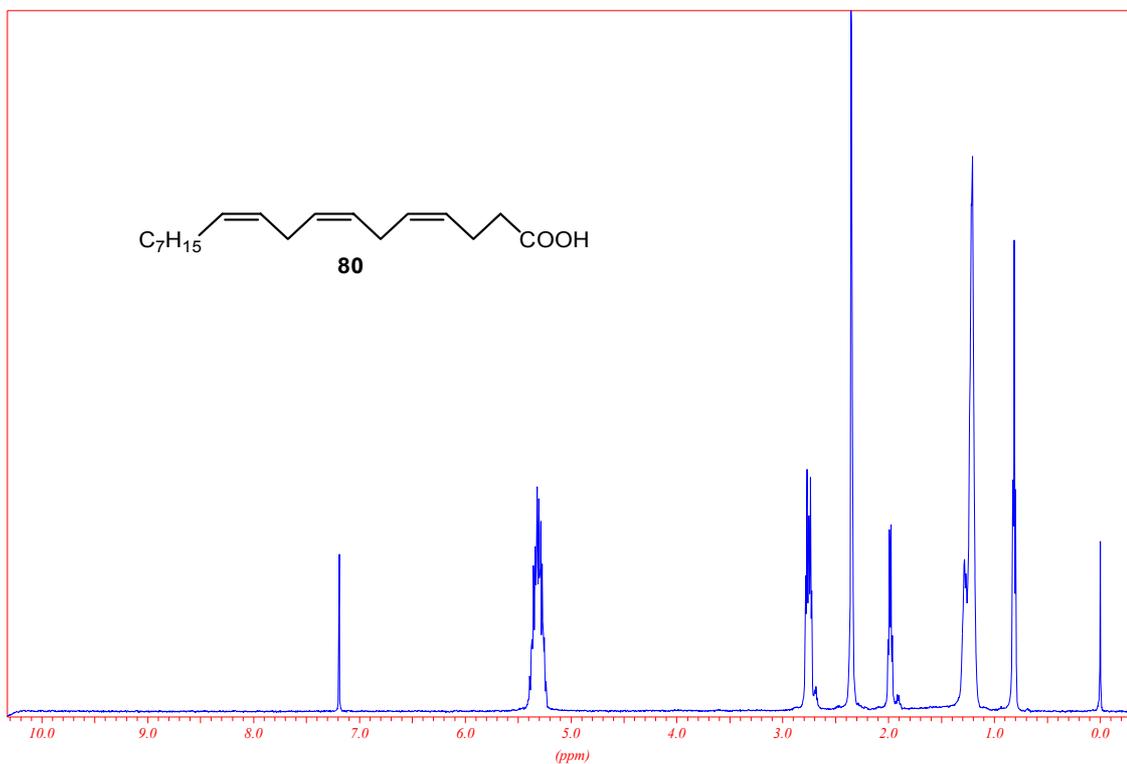
(Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (**70**)

(Z)-[2,2- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-11-ensäure (71)

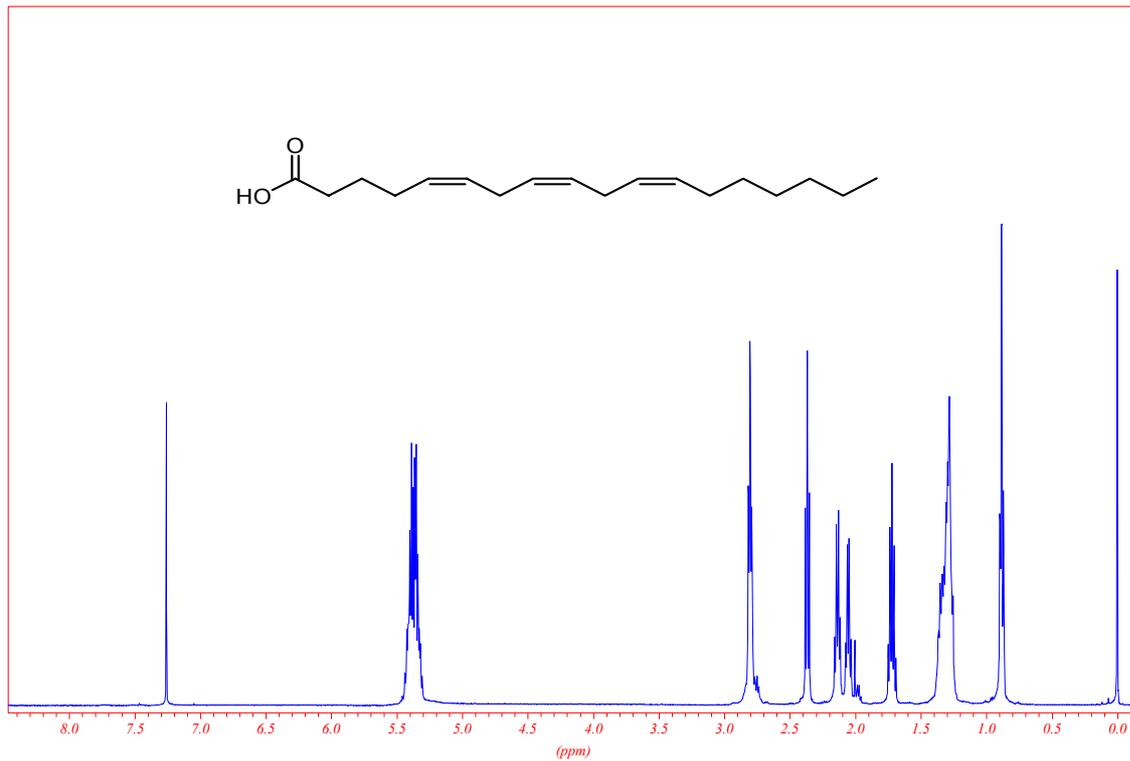
(9Z,12Z)-Hexadec-9,12-diensäure (75)



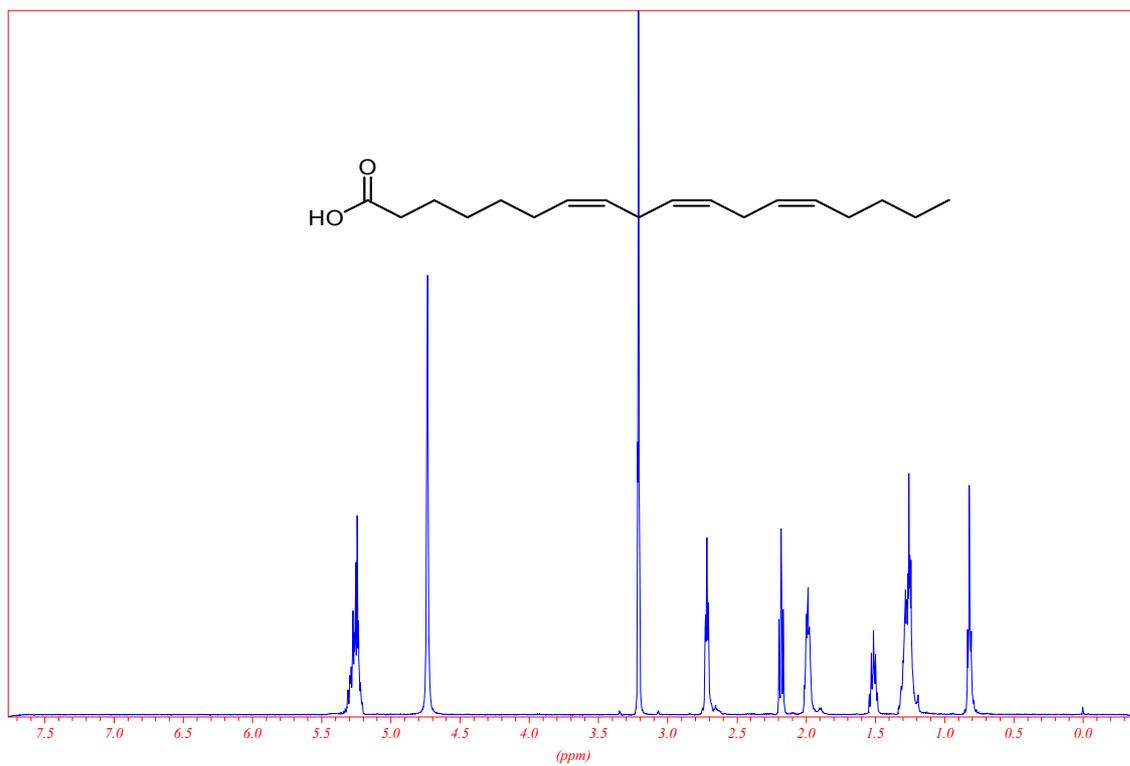
(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triennitril (**79**)



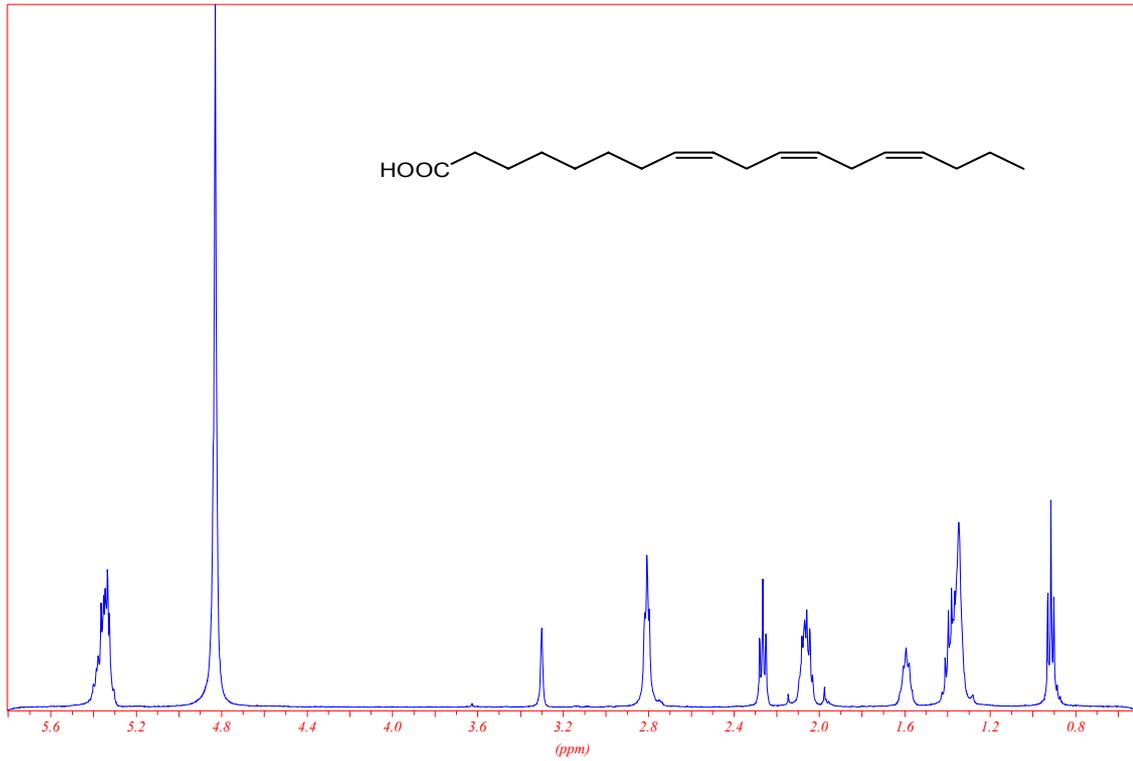
(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (**80**)



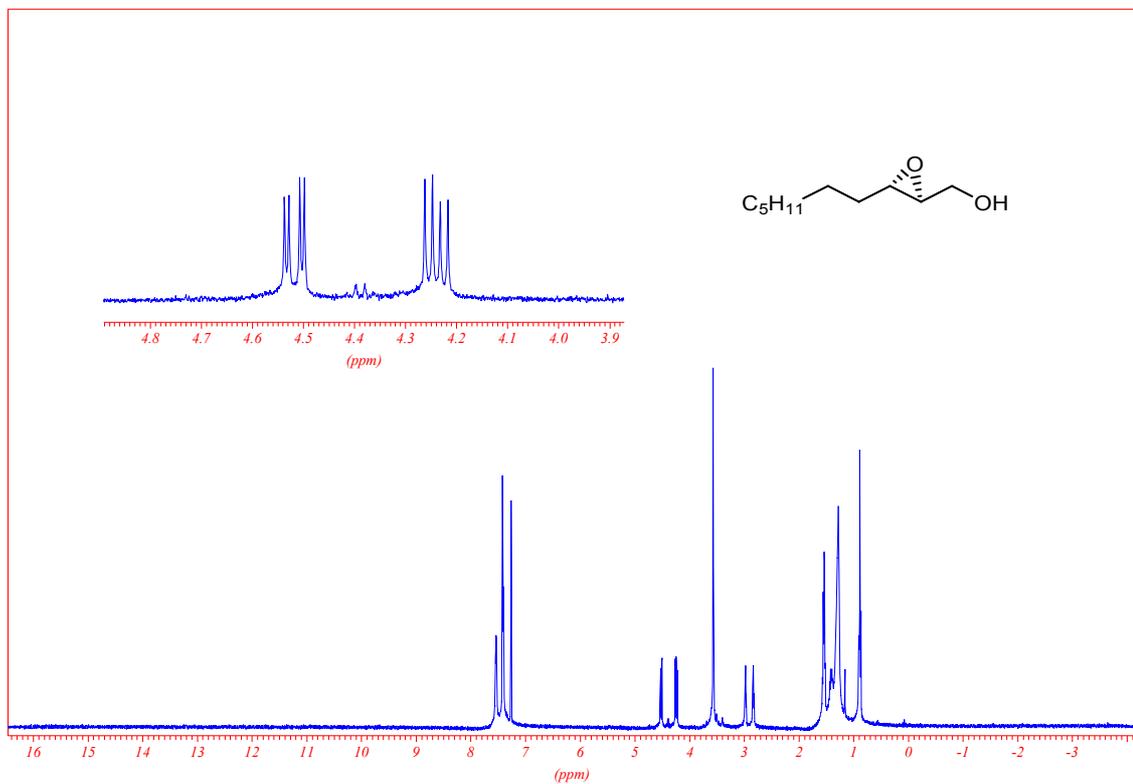
(5Z,8Z,11Z)-Octadeca-5,8,11-triensäure (**90**)



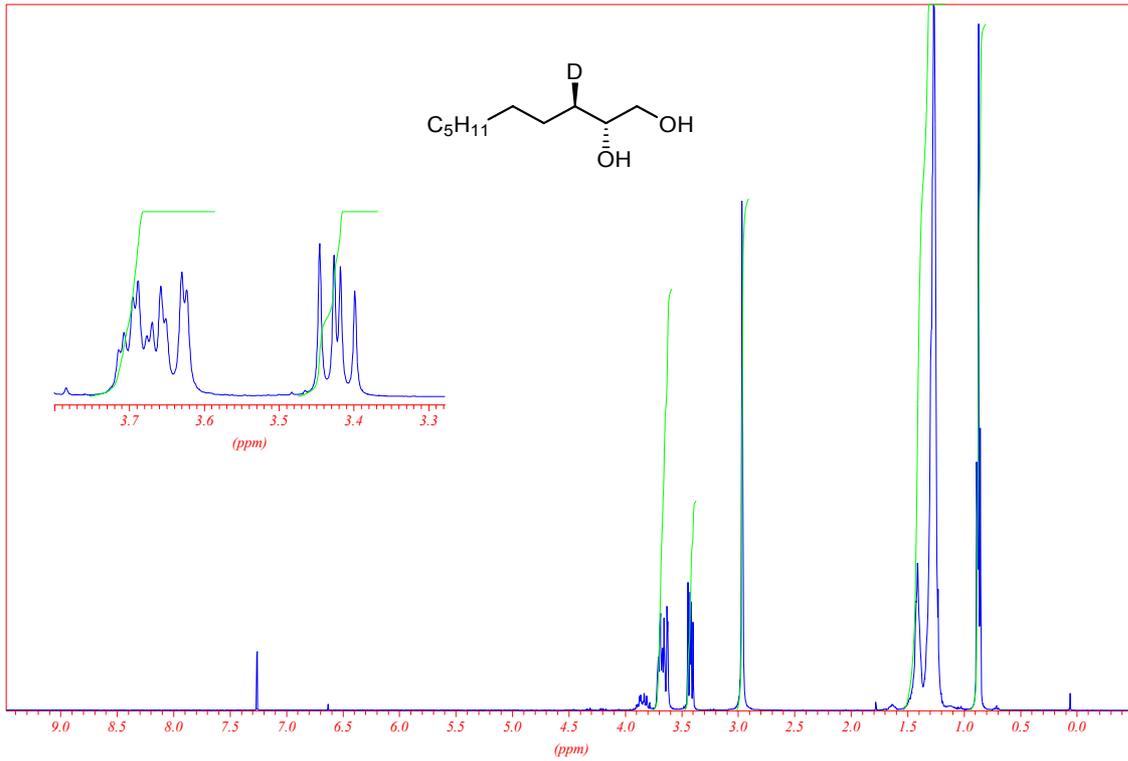
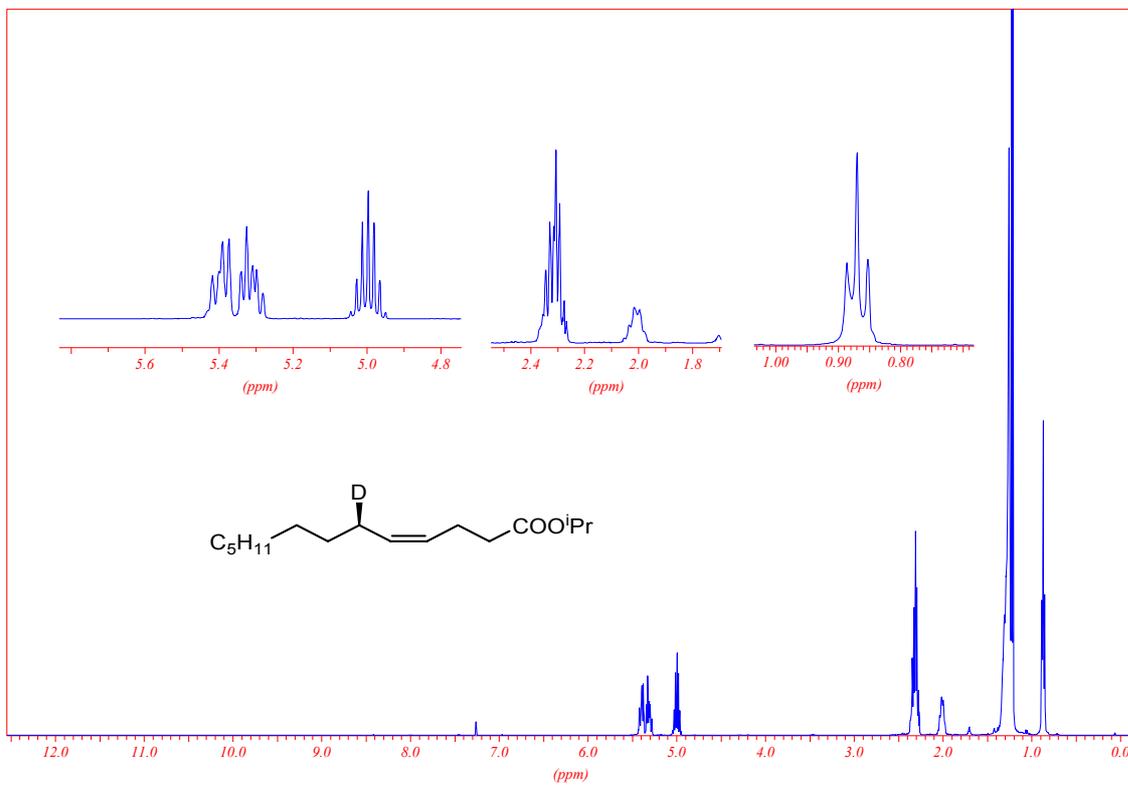
(7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (**91**)

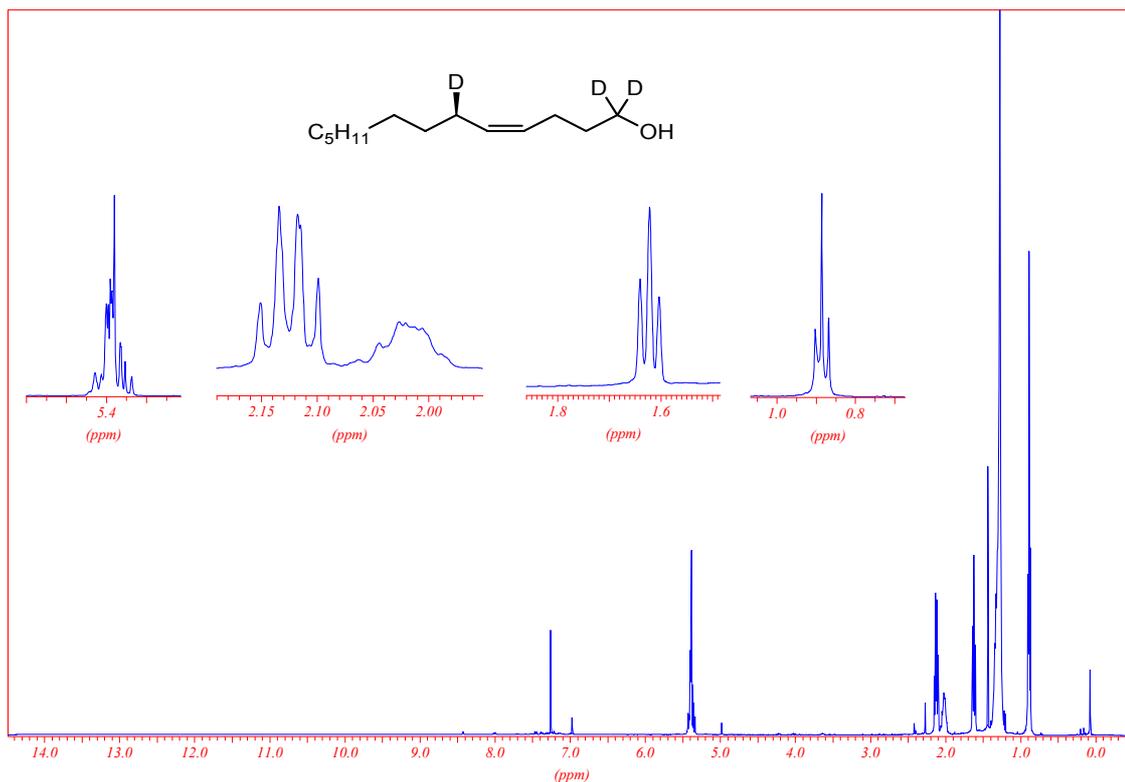


(8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (92)

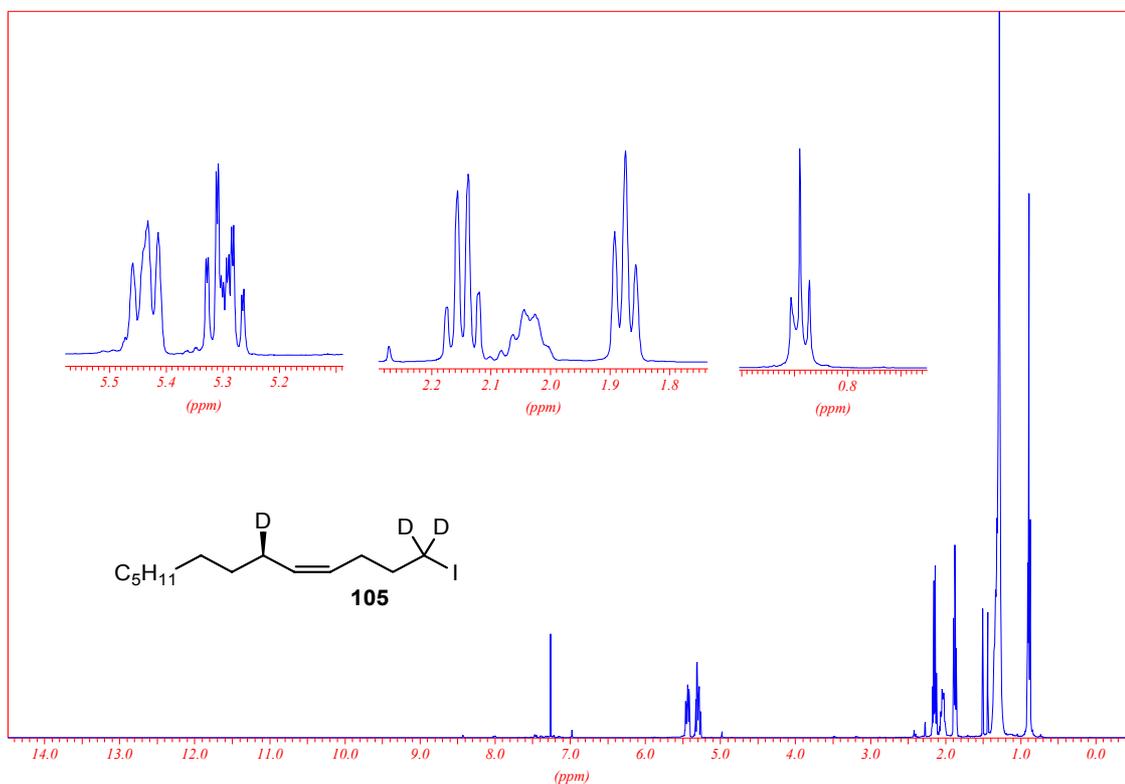


Mosherester von (2S,3S)-2,3-Epoxydecanol (100)

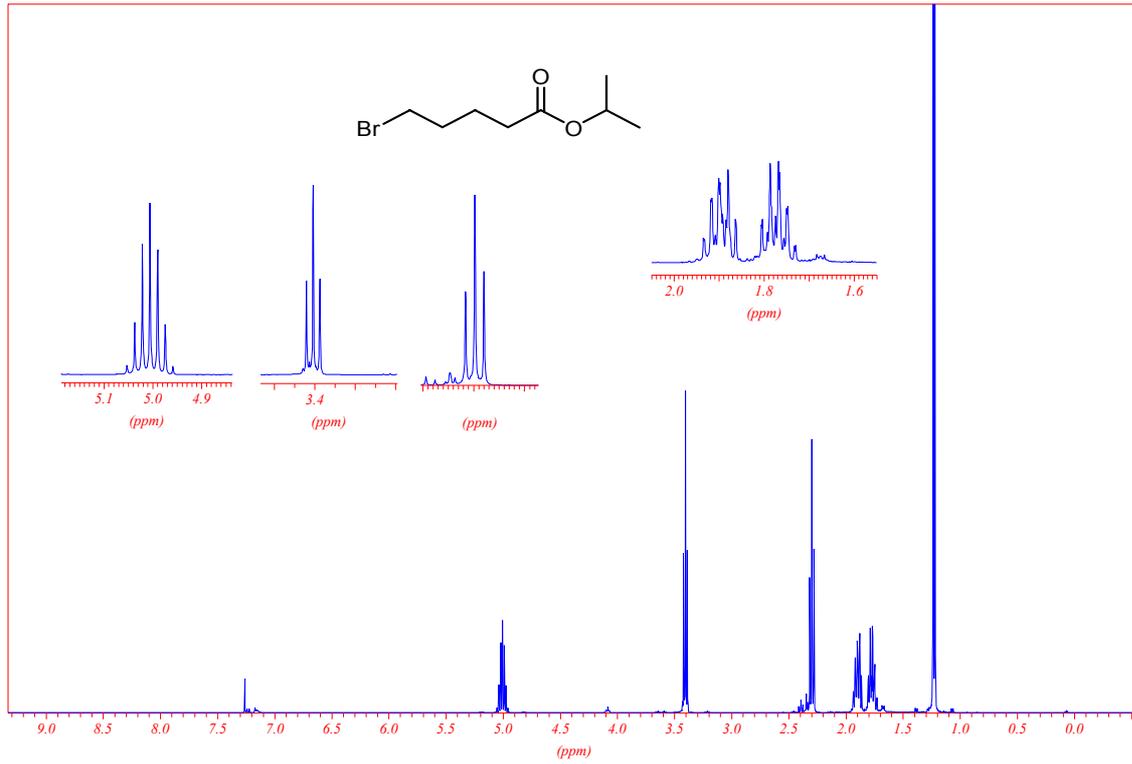
(2*R*,3*R*)-[3- $^2\text{H}_1$ ]-Decan-1,2-diol (**101**)(6*R*)-[6- $^2\text{H}_1$ ]-Tridec-4-ensäureisopropylester (**103**)



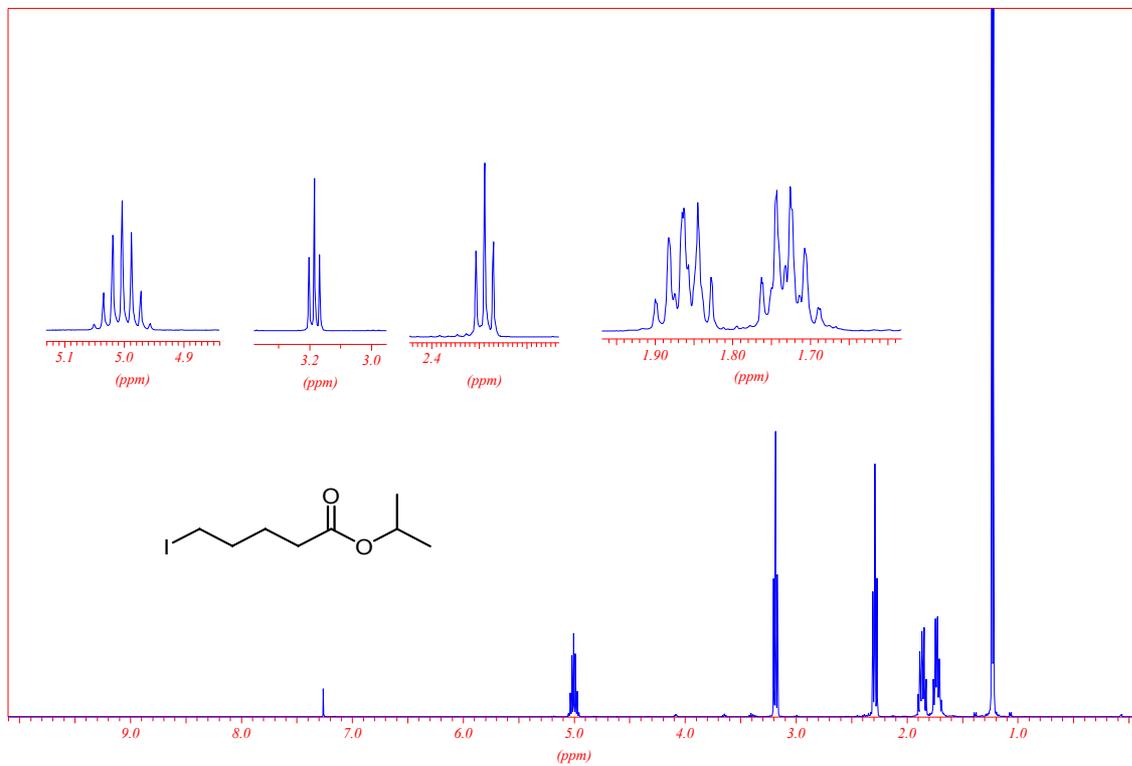
(6R)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Tridec-4-en-1-ol (**104**)



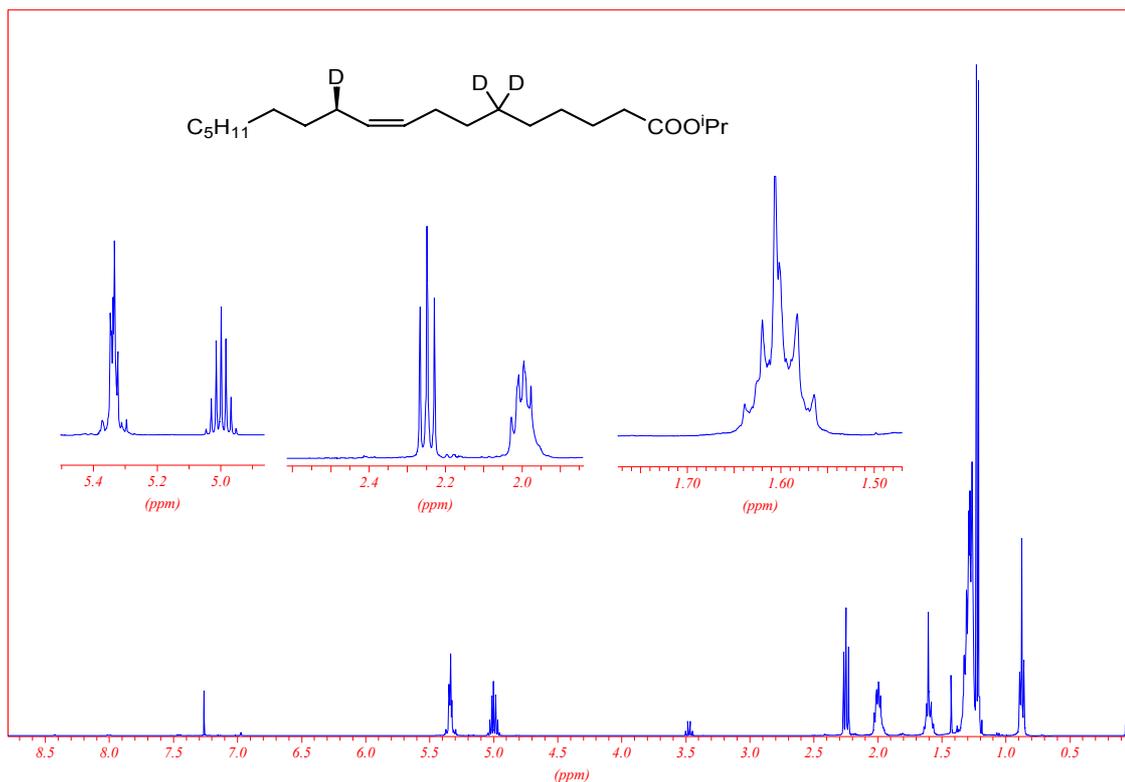
(6R)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-1-Iod-tridec-4-en (**105**)



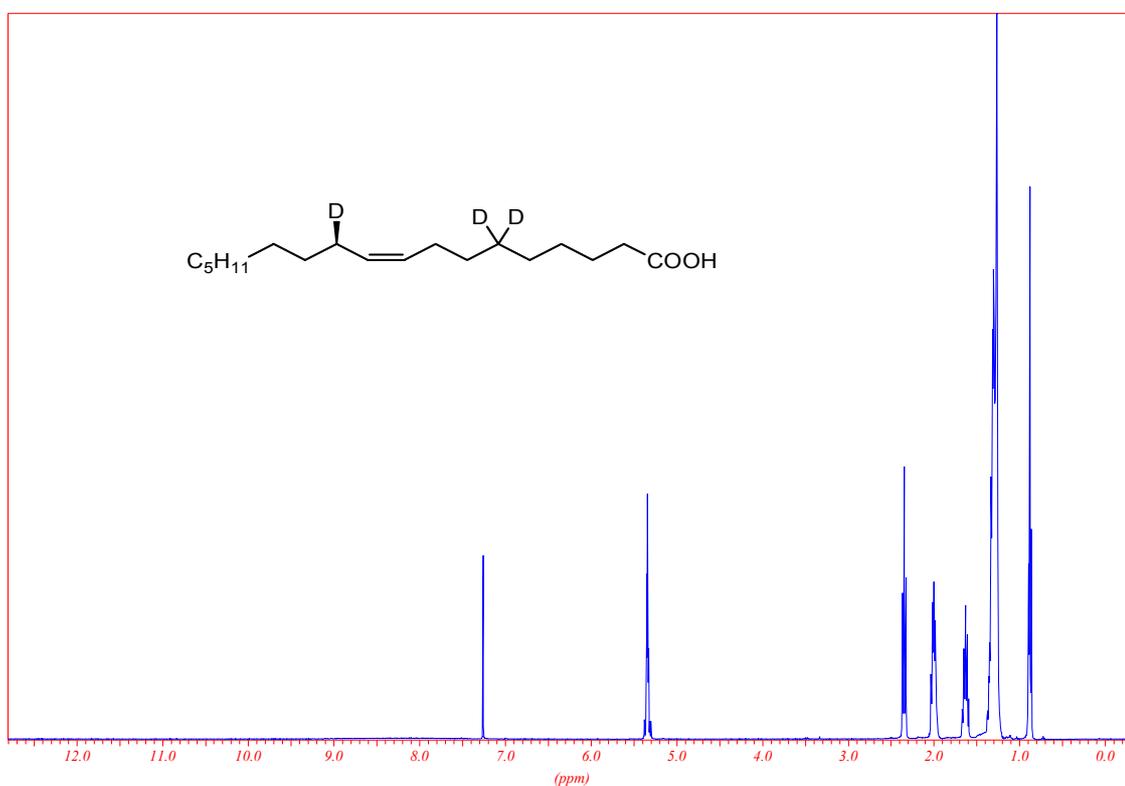
5-Bromvaleriansäureisopropylester



5-Iodvaleriansäureisopropylester

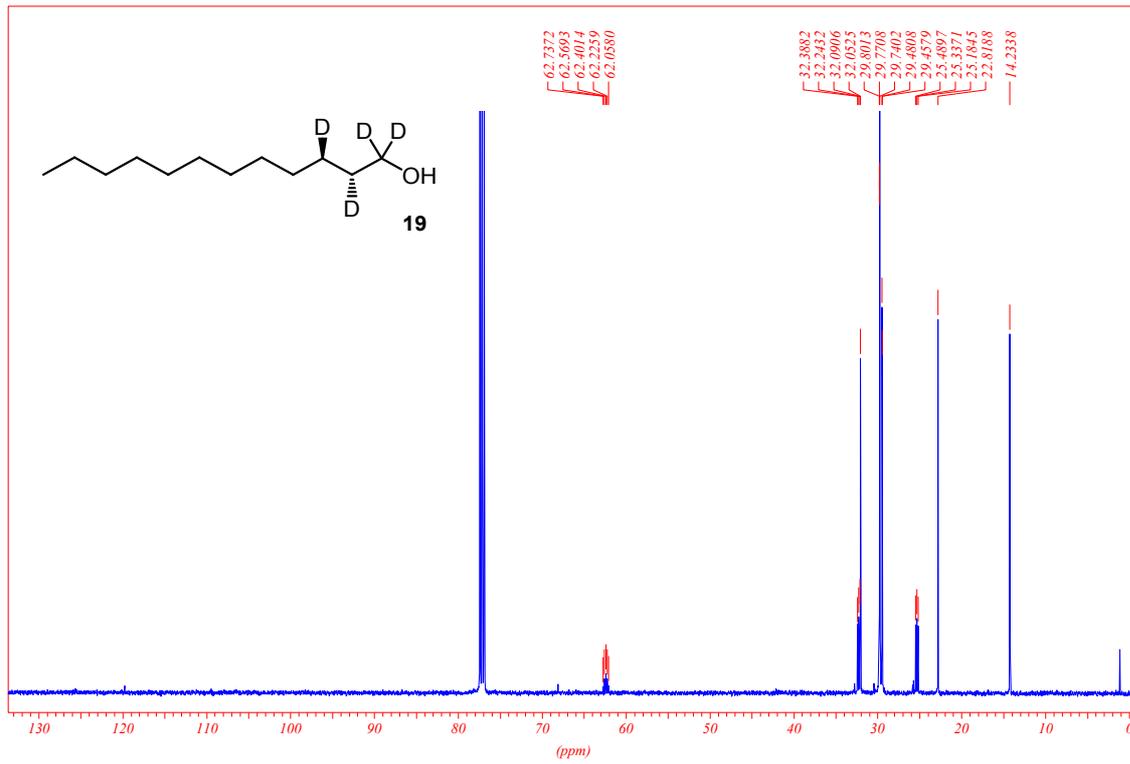


(11R)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäureisopropylester (**107**)

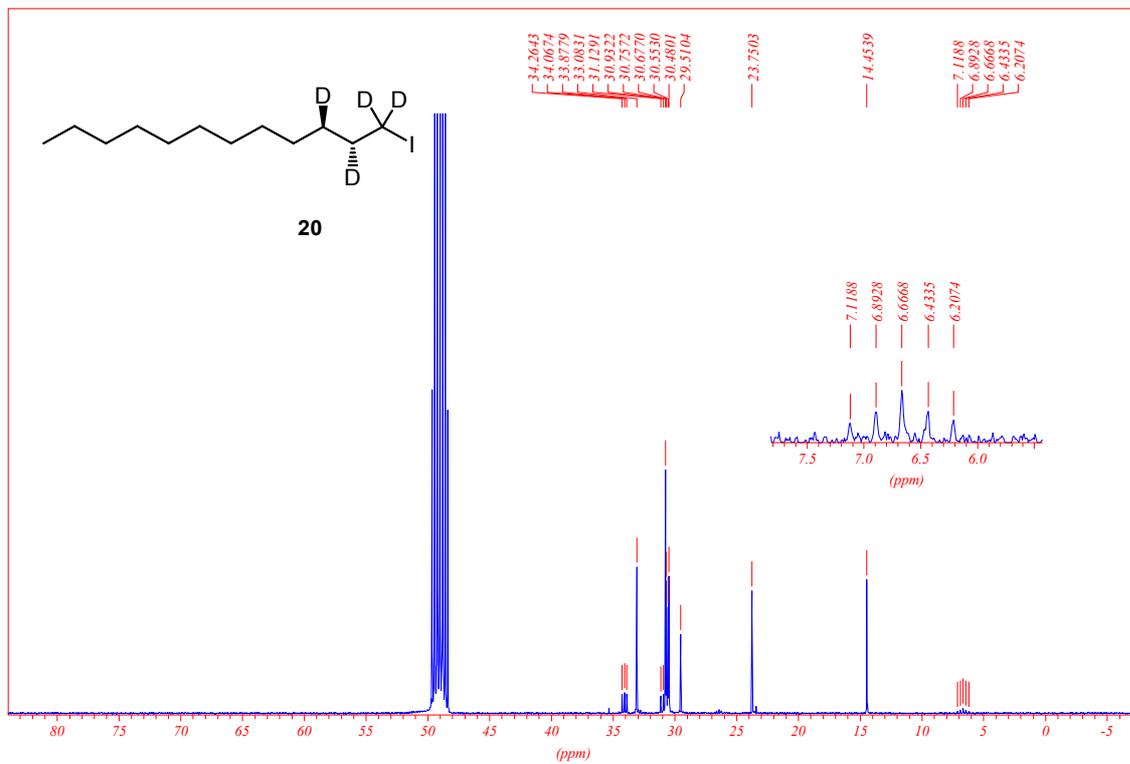


(11R)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäure (**108**)

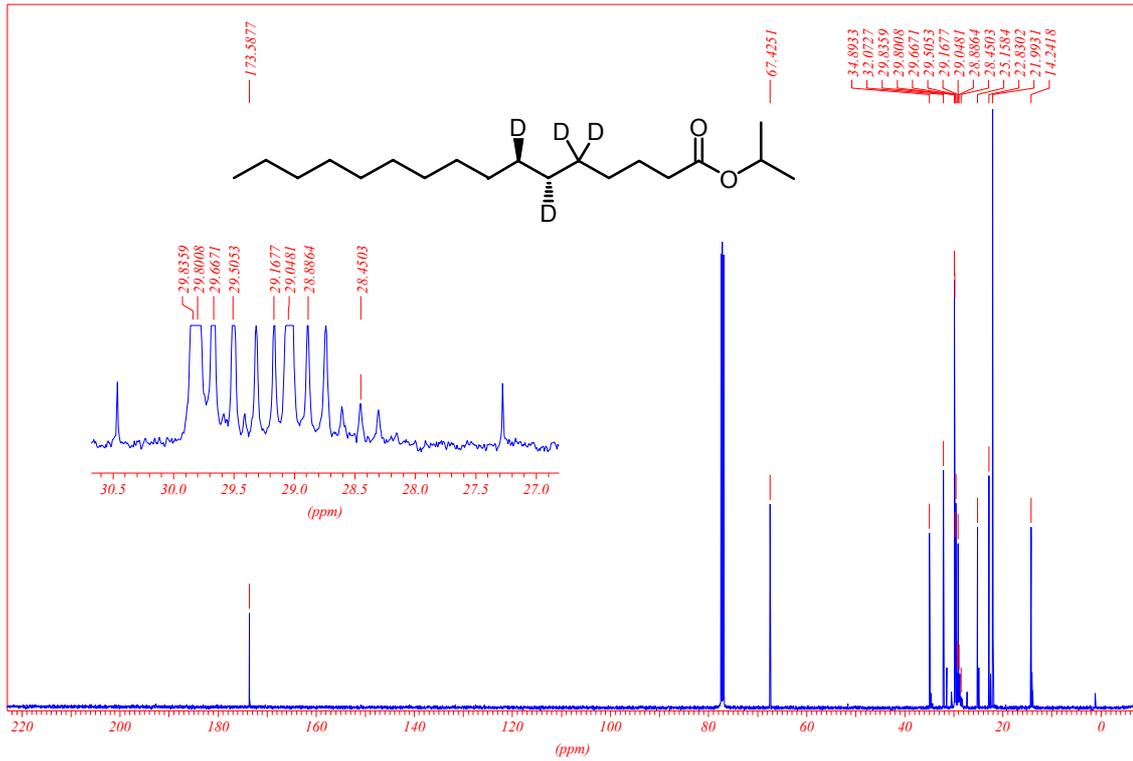
<sup>13</sup>C-Spektren



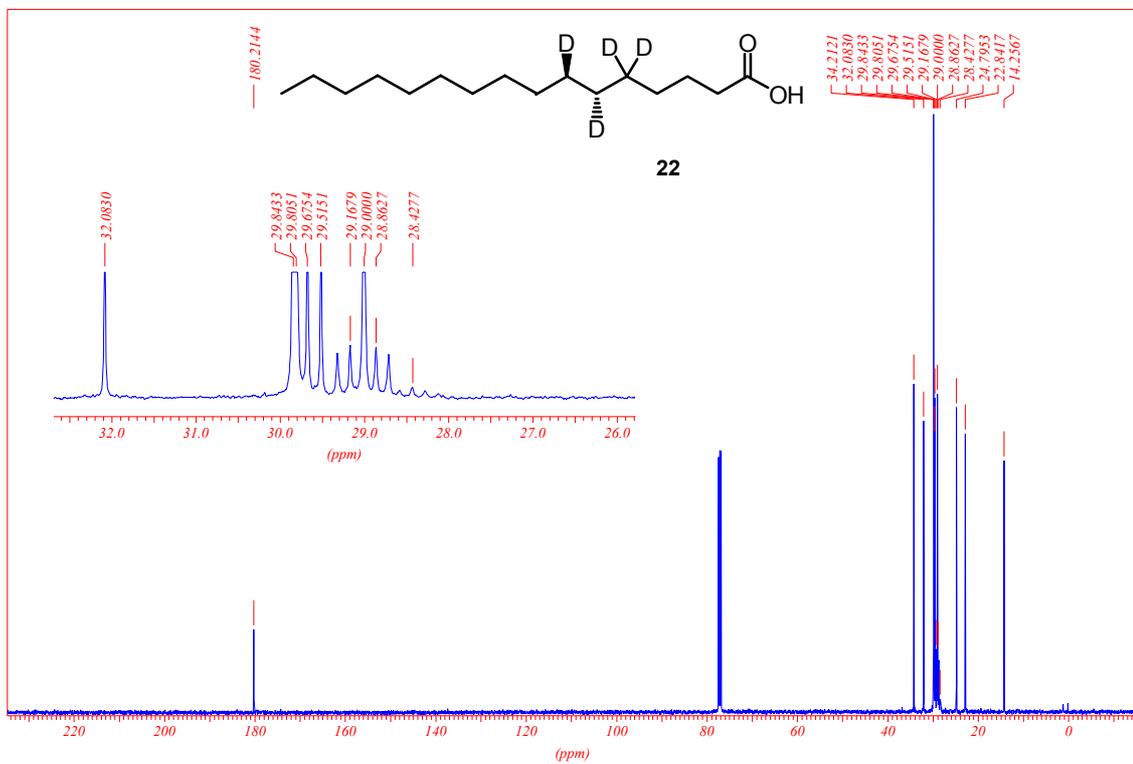
(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecanol (19)



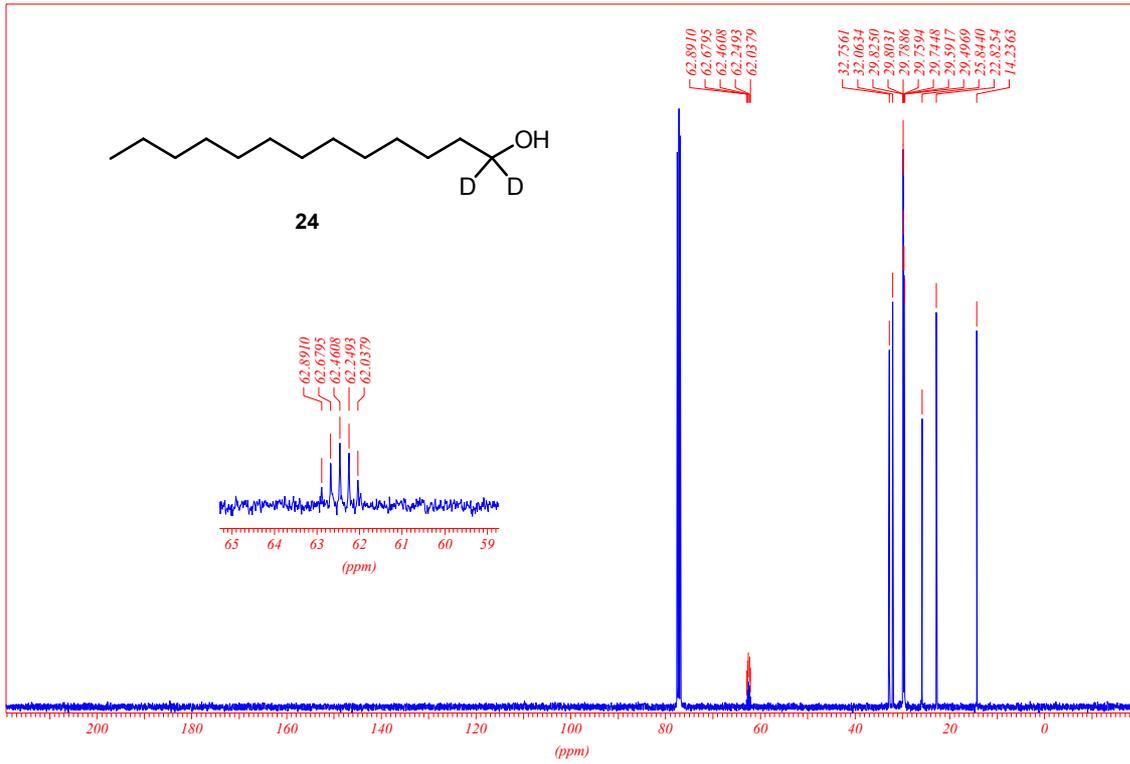
(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecylidiodid (20)



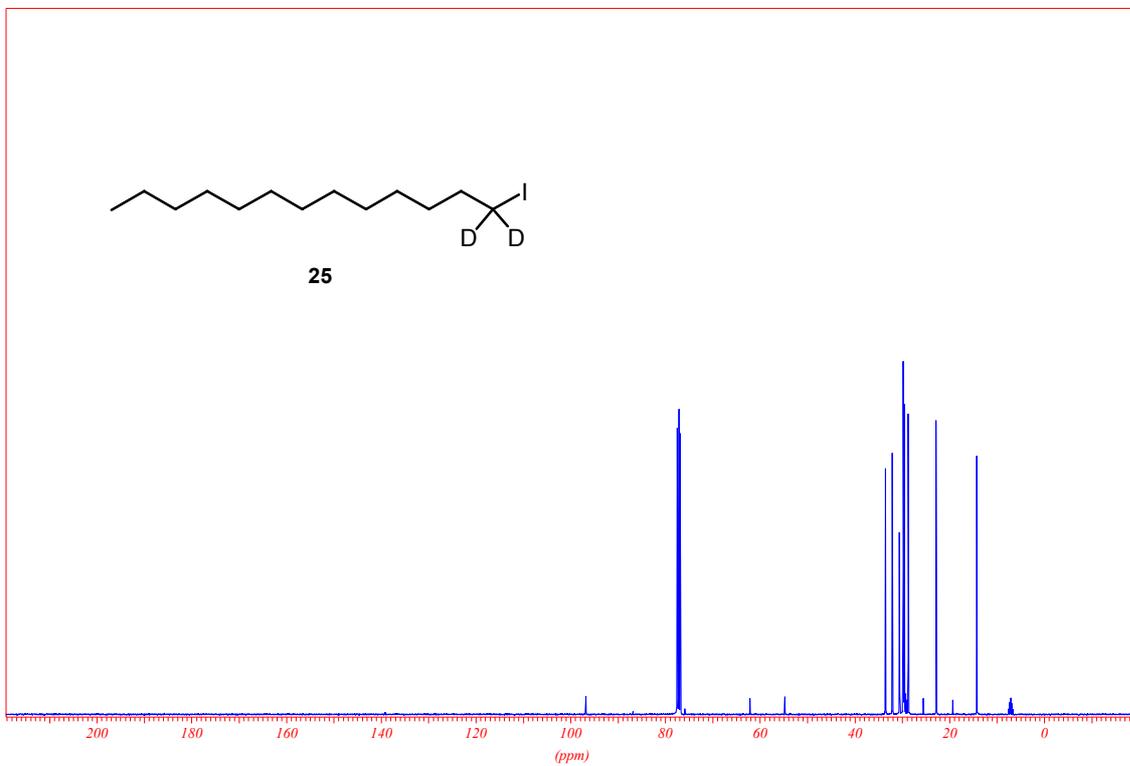
(6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäureisopropylester



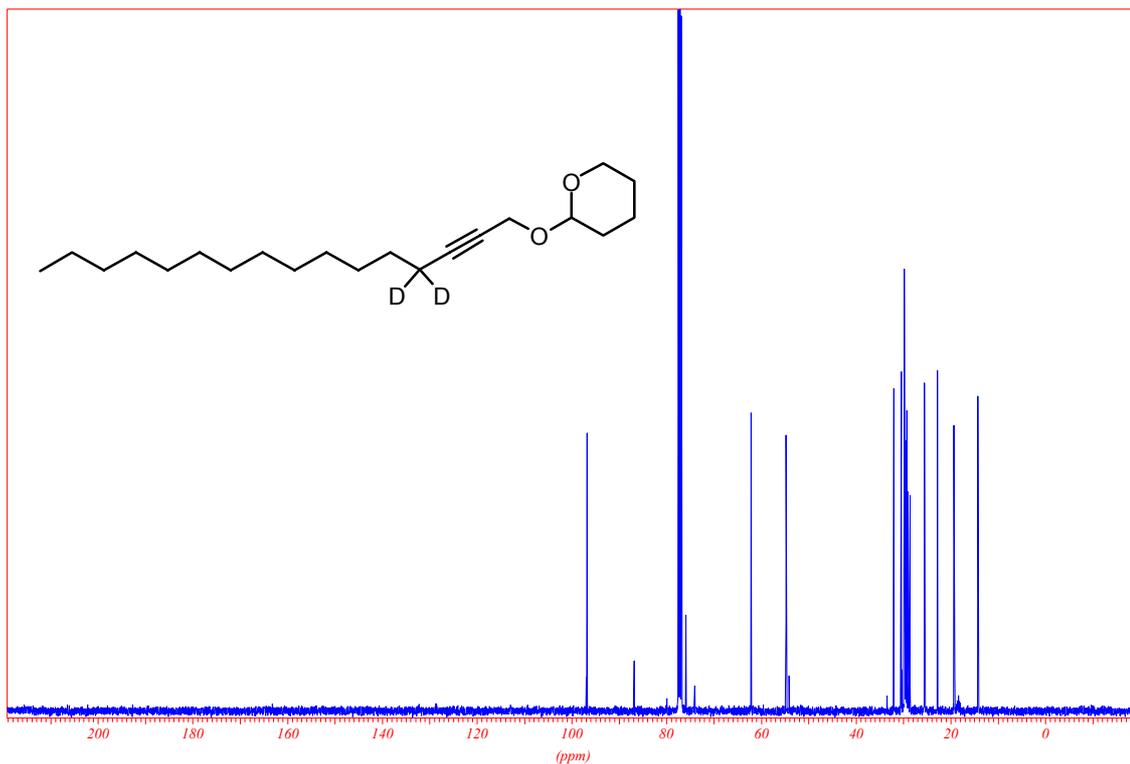
(6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (**22**)



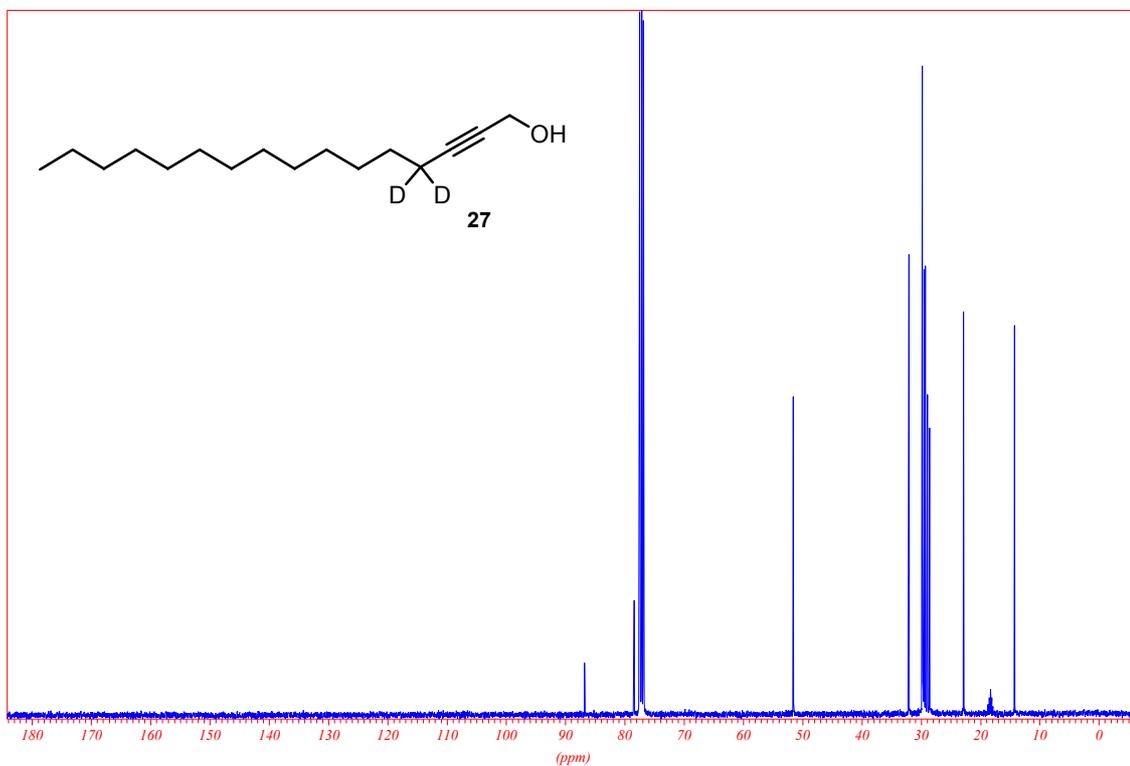
[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**)



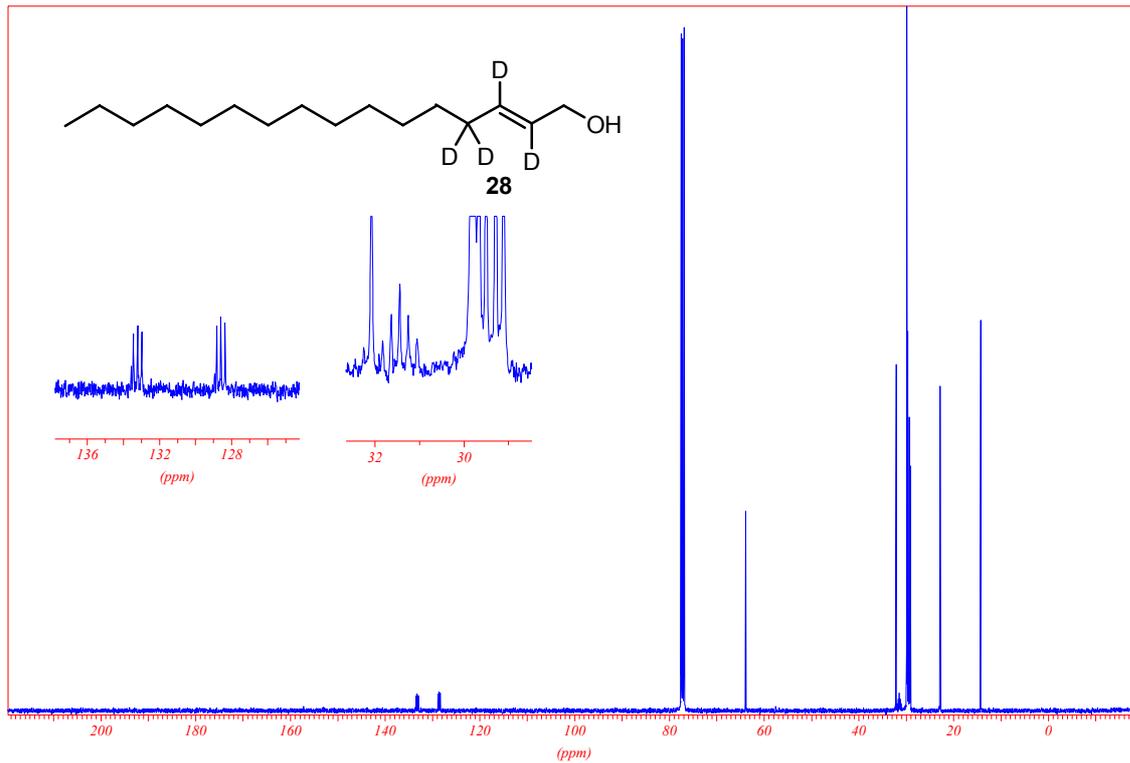
[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Iodotridecan (**25**)



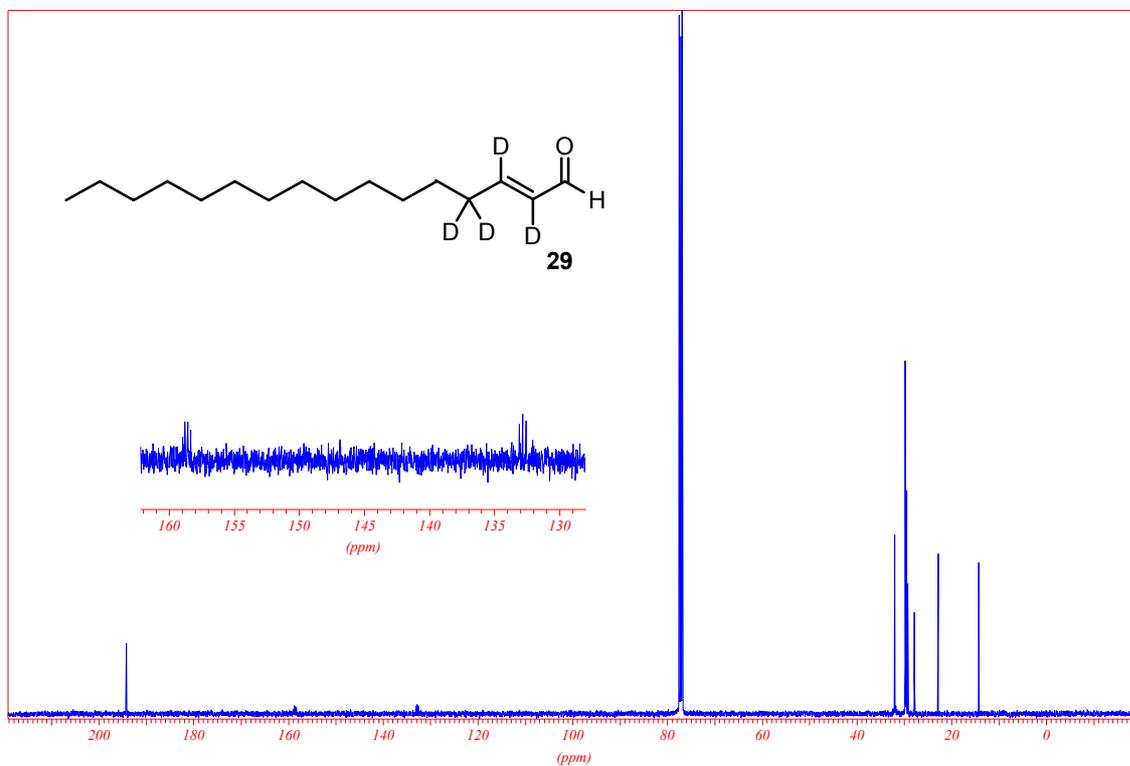
THP-Ether von [4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-2-in-1-ol (**27**)



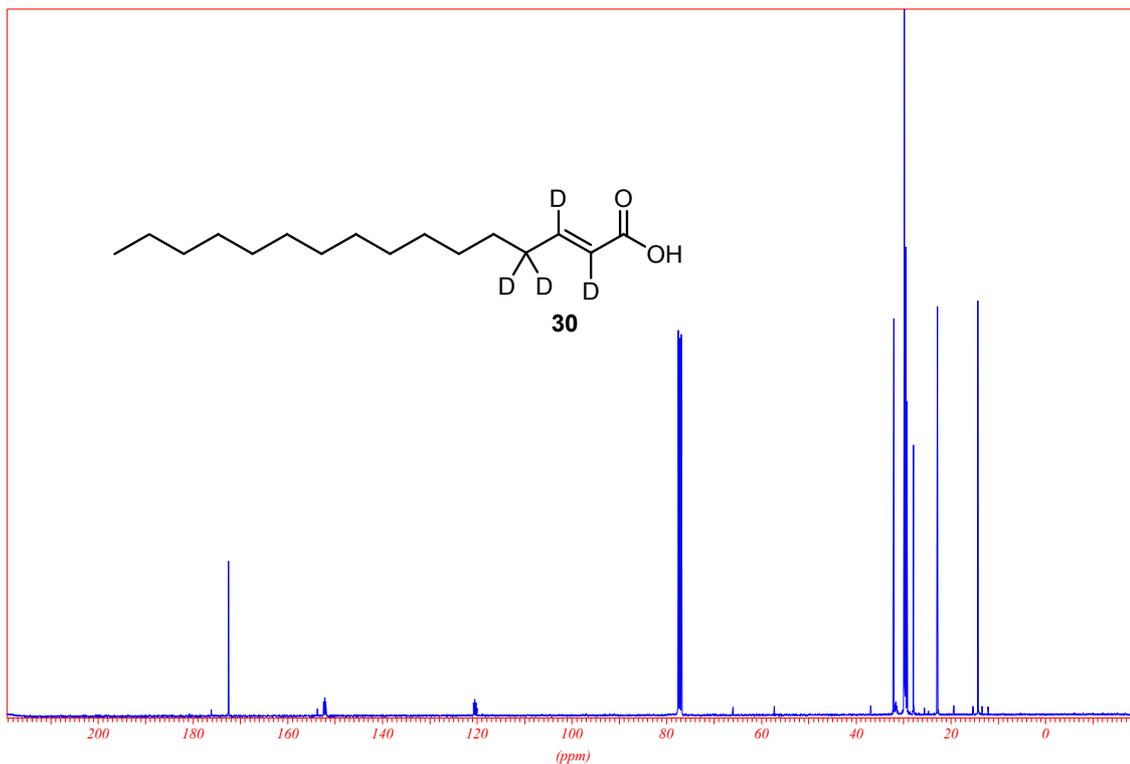
[4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-2-in-1-ol (**27**)



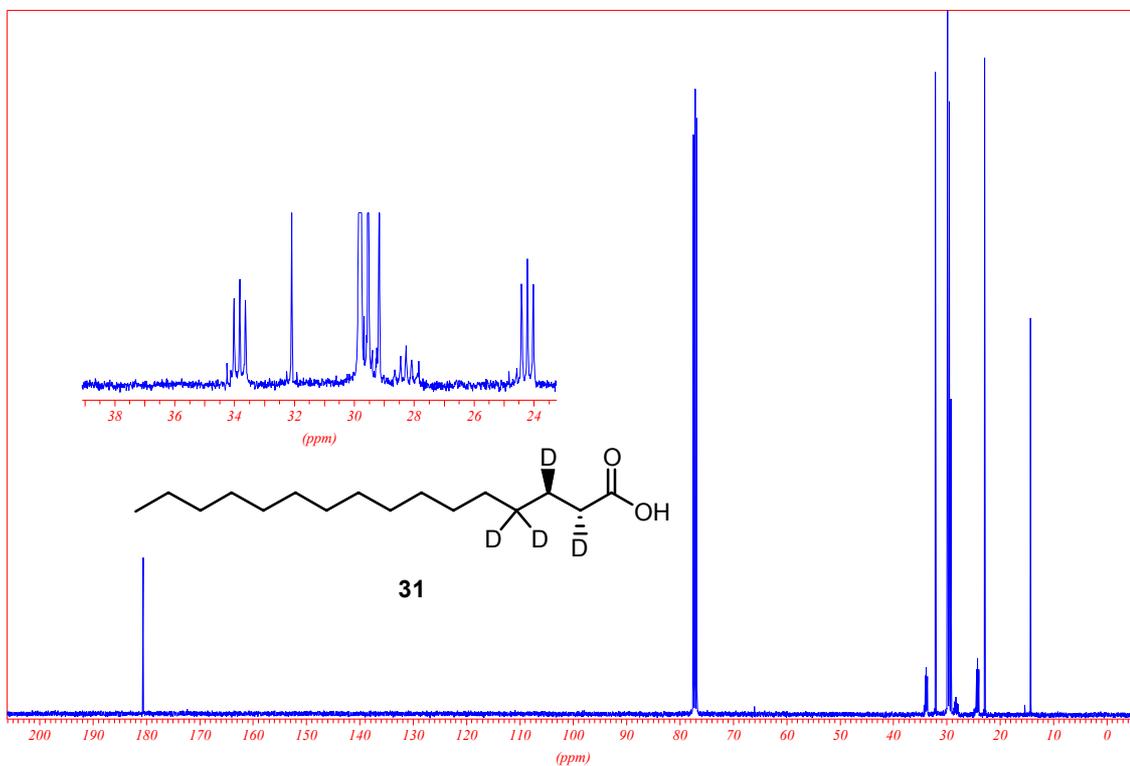
(2E)- [2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-ol (**28**)



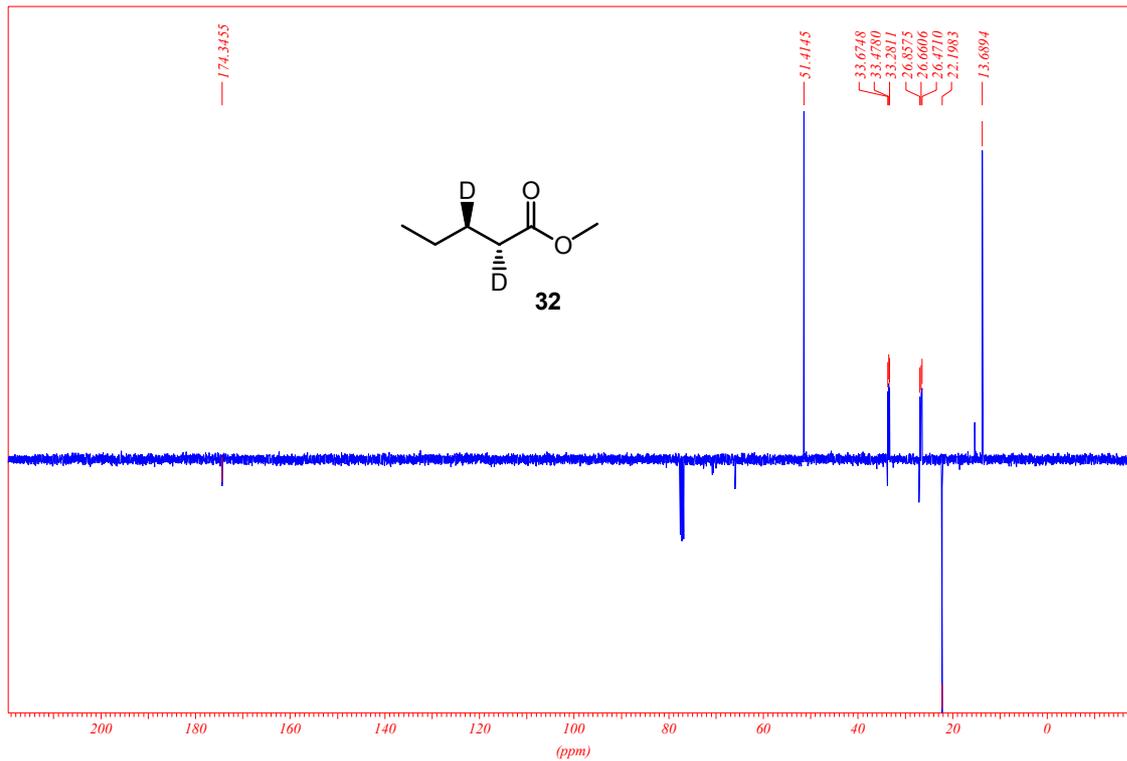
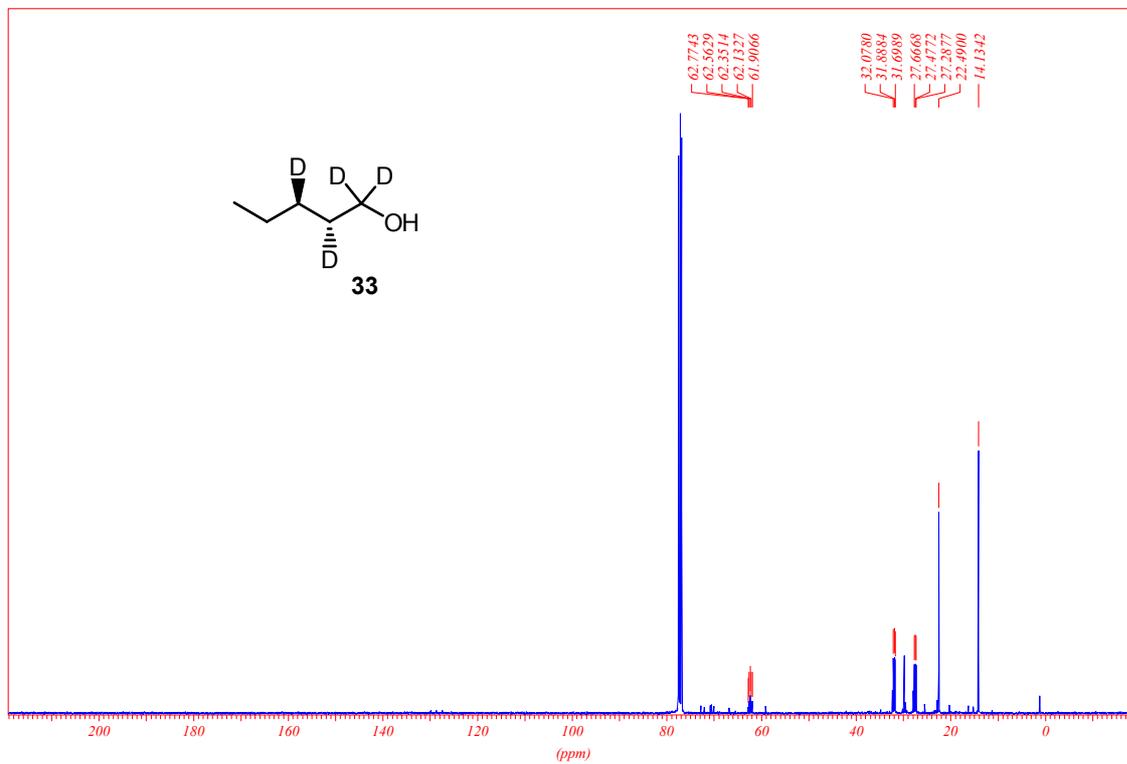
(2E)-[2,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]- Hexadec-2-en-1-al (**29**)

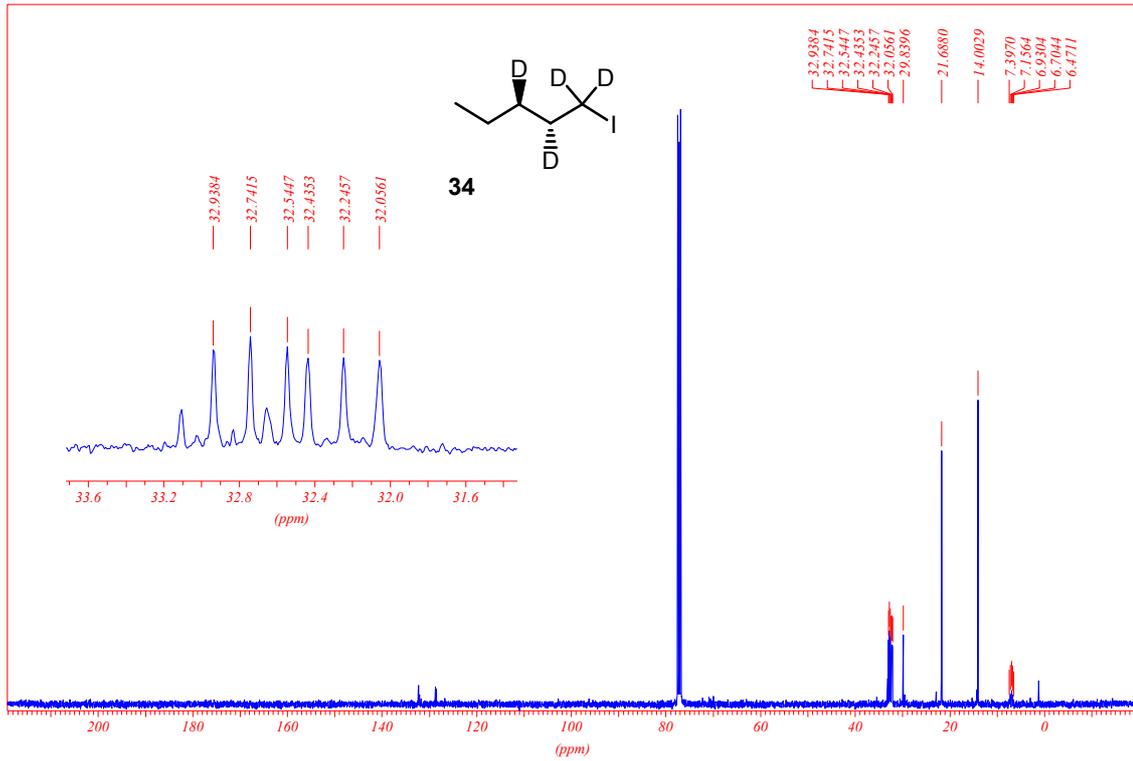


(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-ensäure (30)

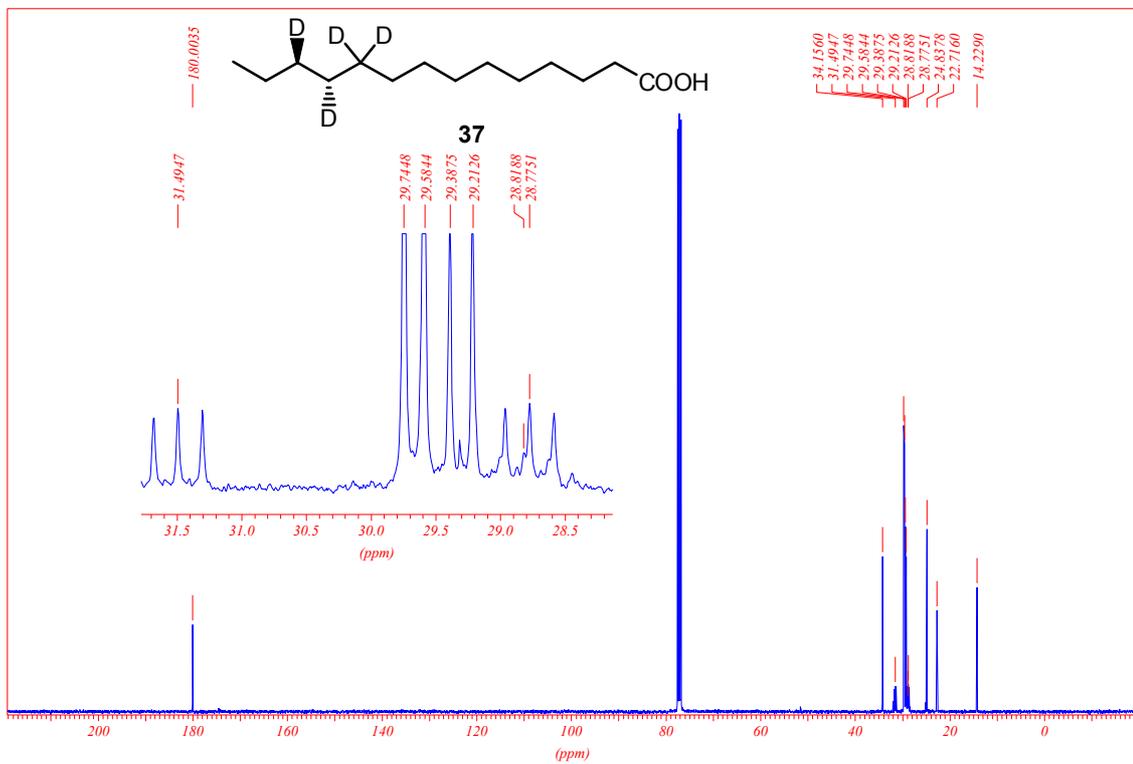


(2R,3S)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (31)

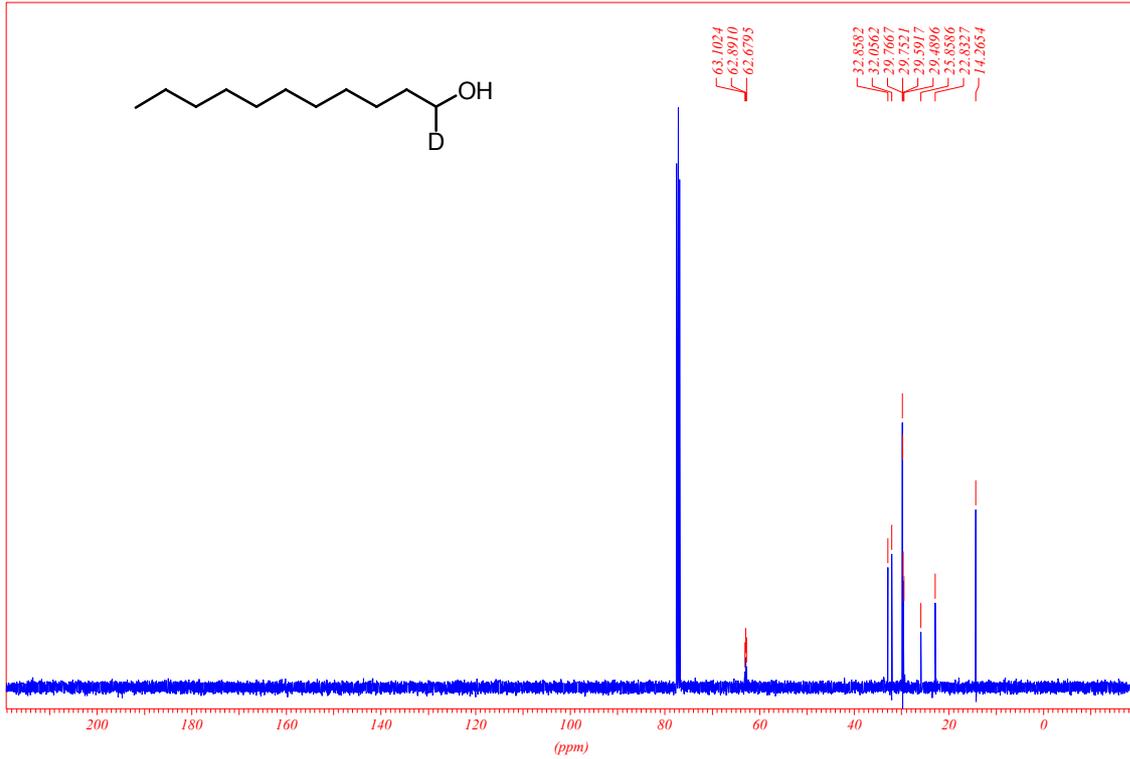
(2*R*,3*R*)-[2,3- $^2\text{H}_2$ ]-Pentansäuremethylester (**32**)(2*R*,3*R*)-[1,1,2,3- $^2\text{H}_4$ ]-Pentanol (**33**)



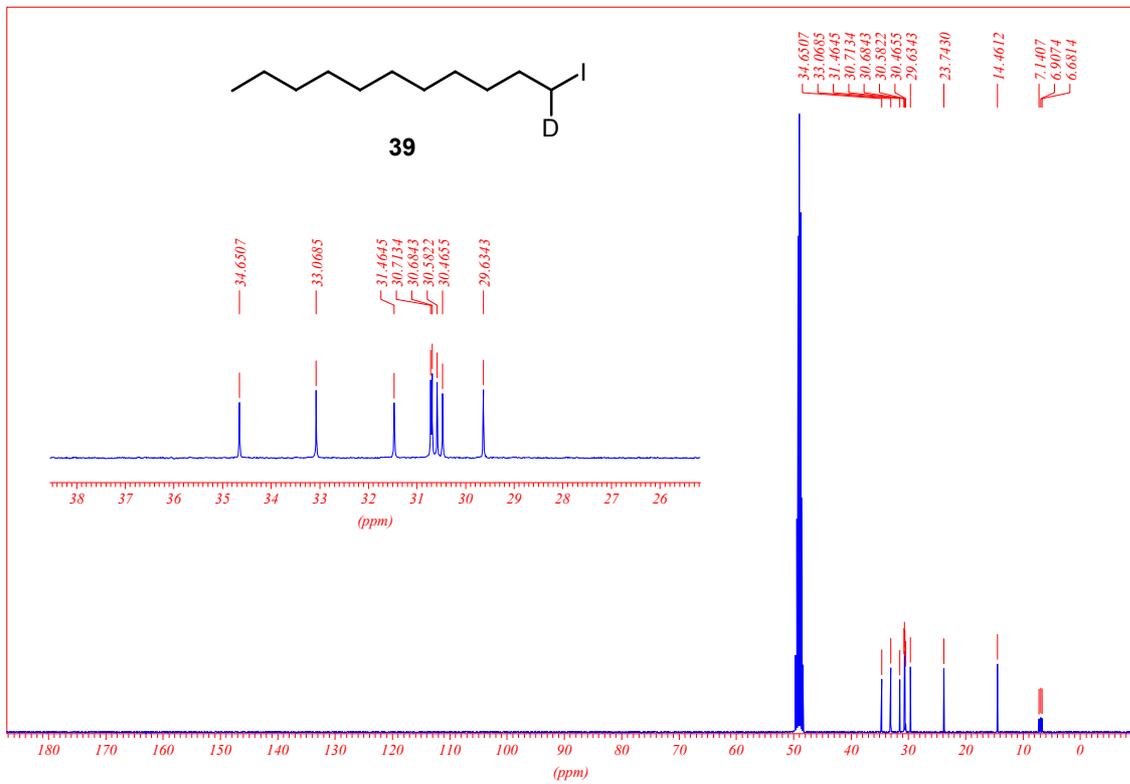
(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyl iodid (**34**)



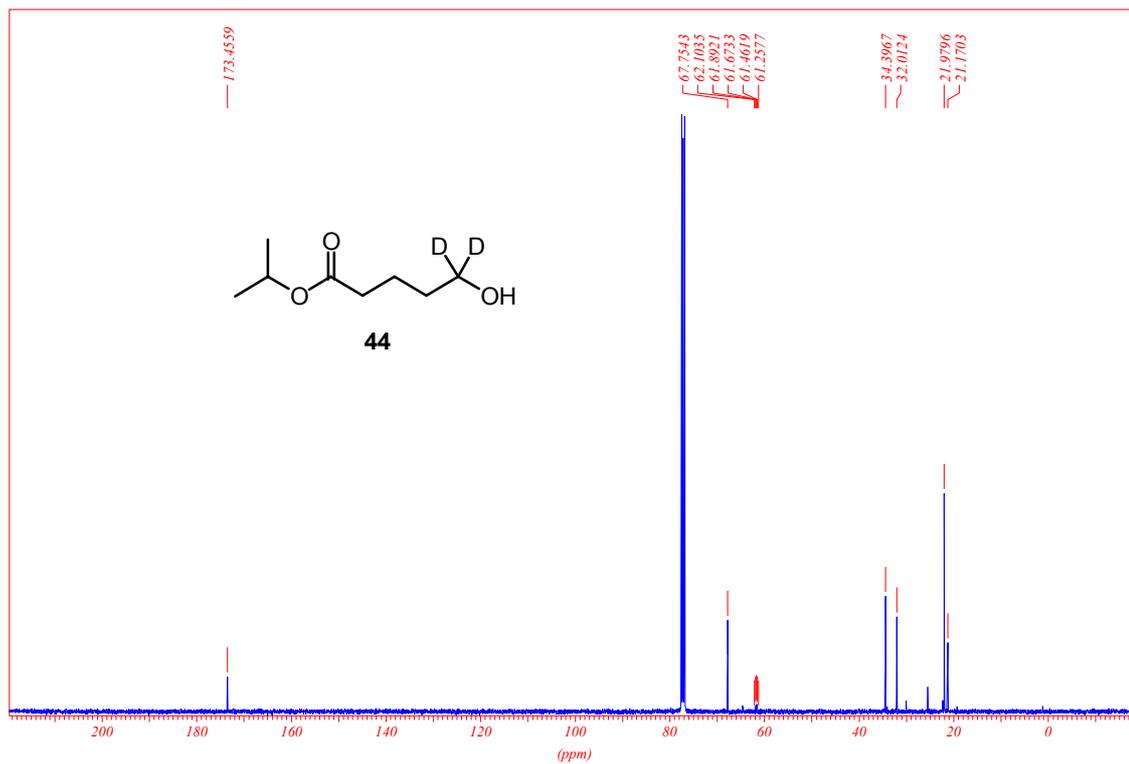
(11R,12R)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**)



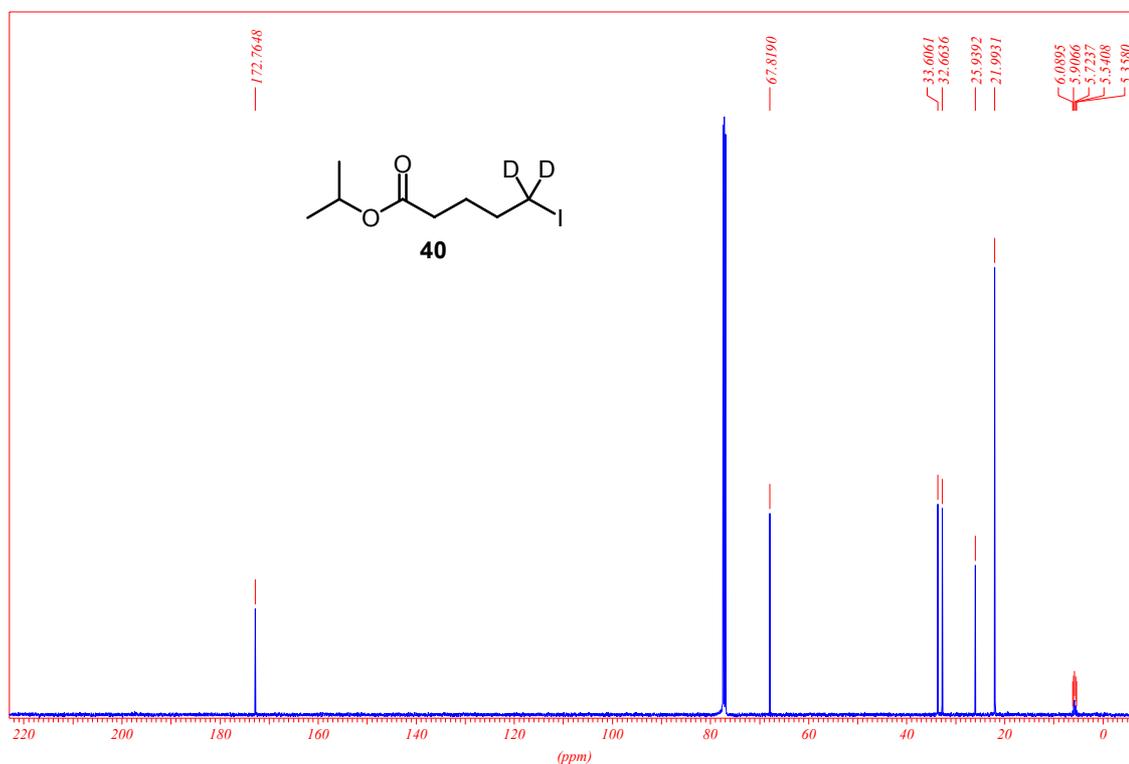
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecan-1-ol



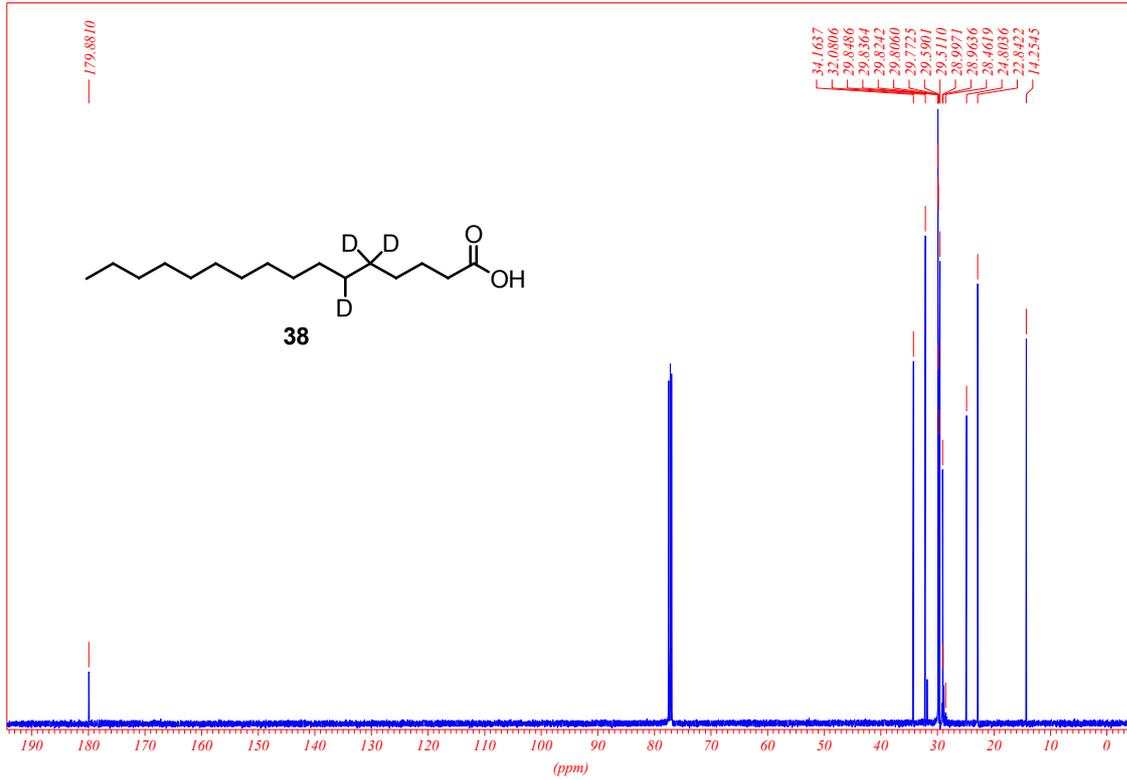
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecylidid (39)



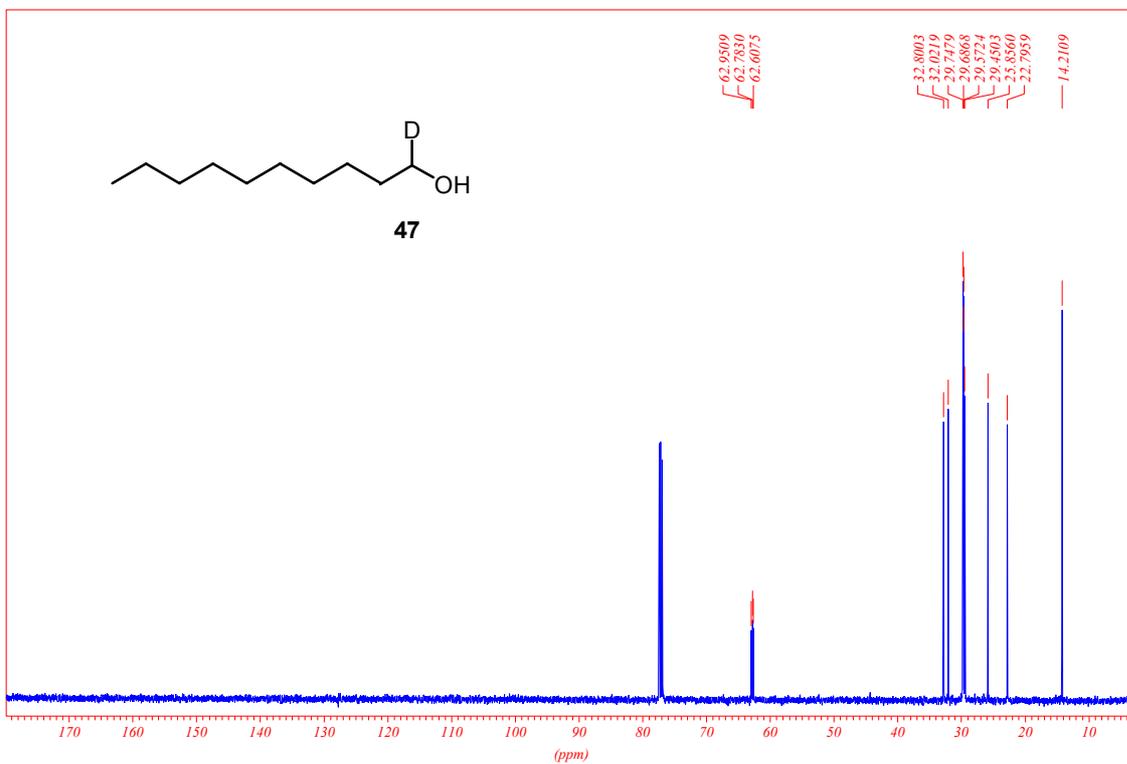
[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (**44**)



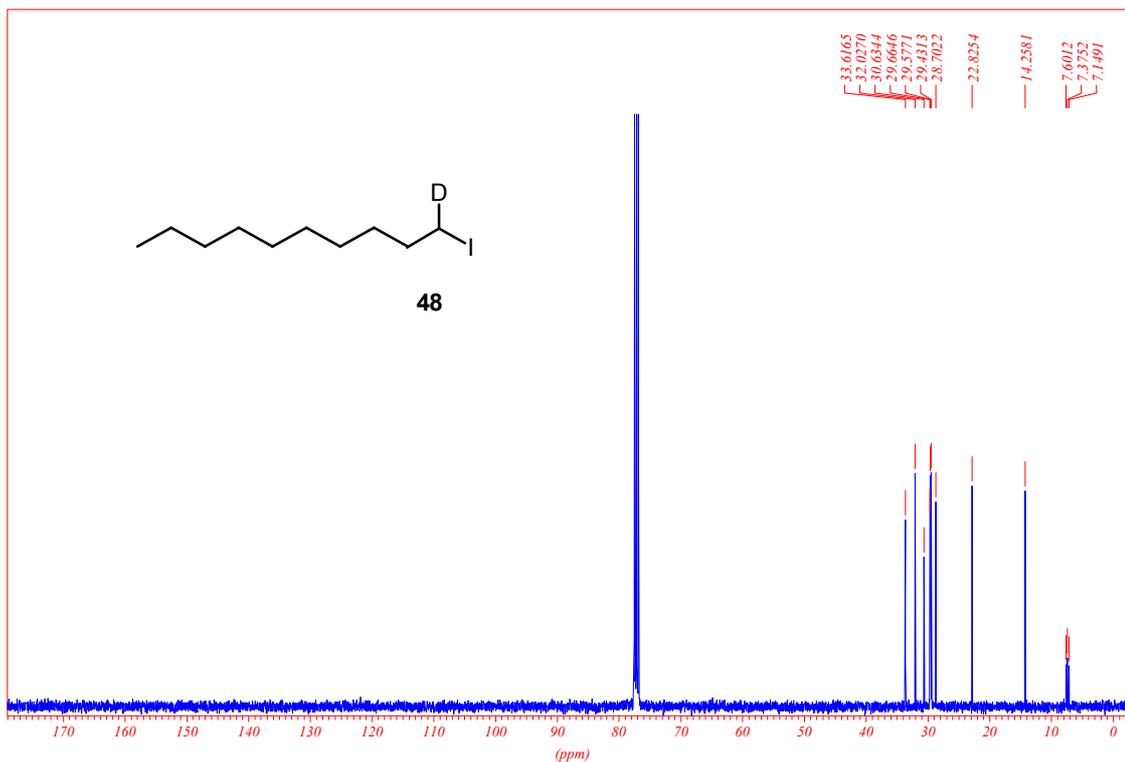
[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Iodopentansäureisopropylester (**40**)



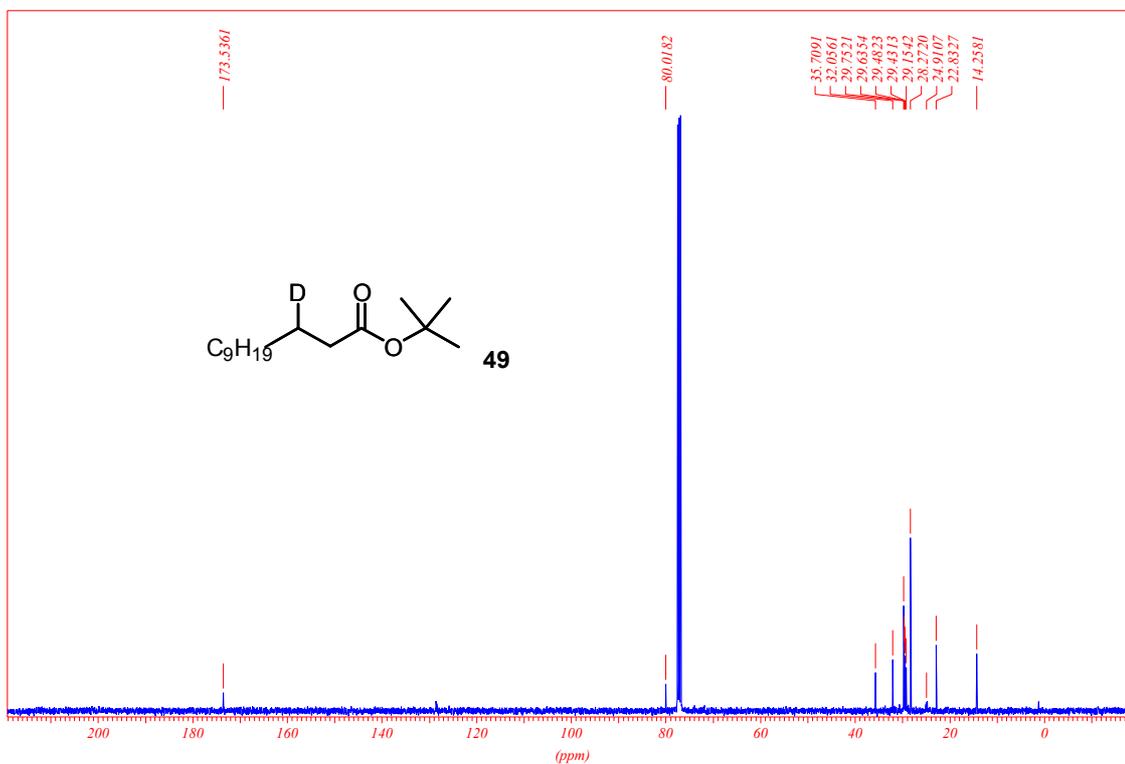
*rac*-[5,5,6- $^2\text{H}_3$ ]-Hexadecansäure (**38**)



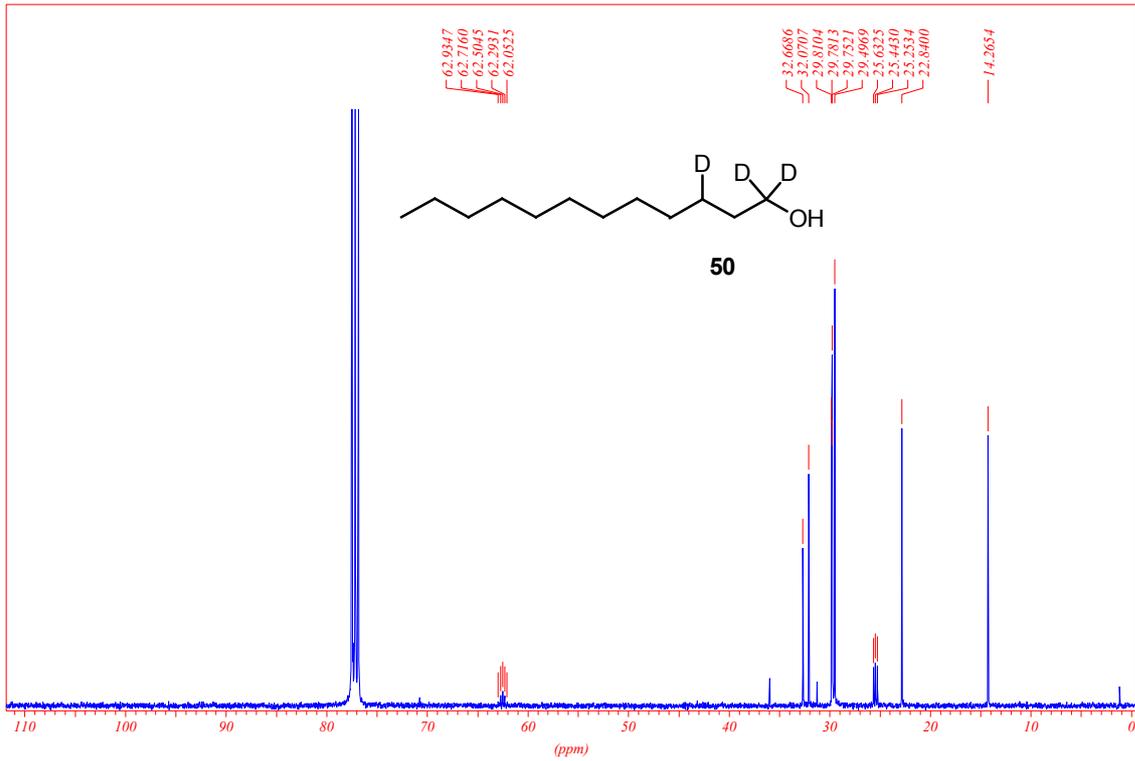
[1- $^2\text{H}_1$ ]-Decanol (**47**)



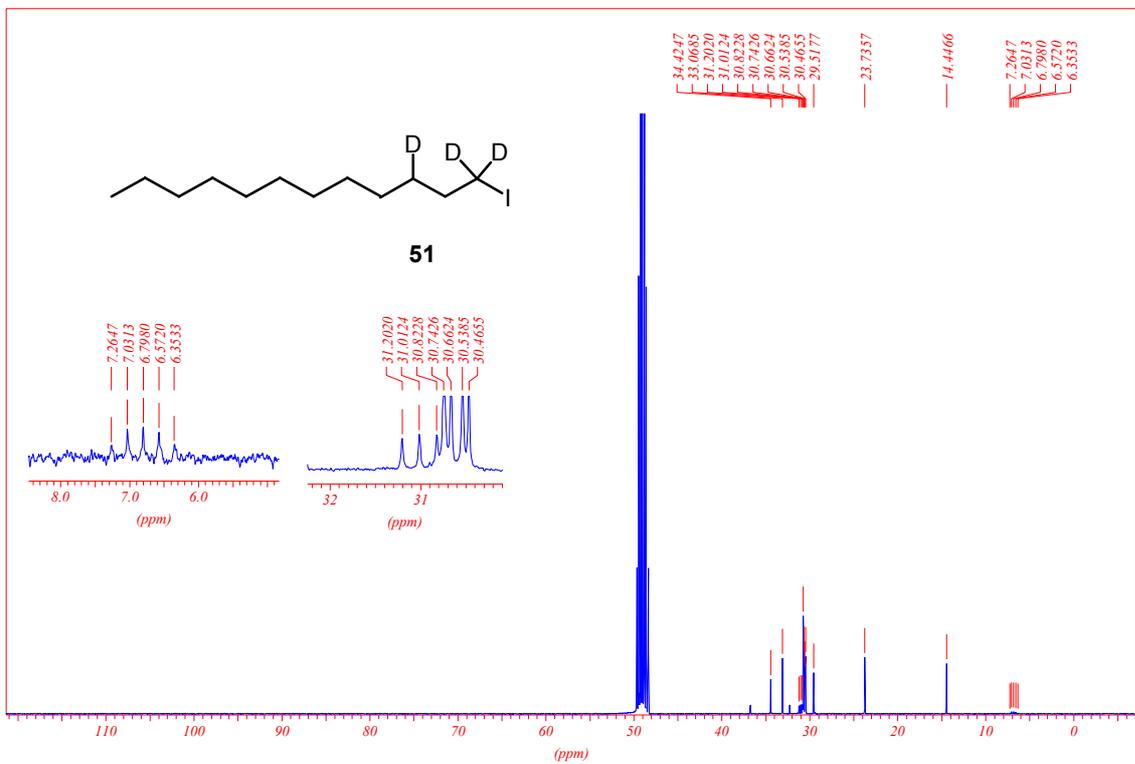
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decyliodid (48)



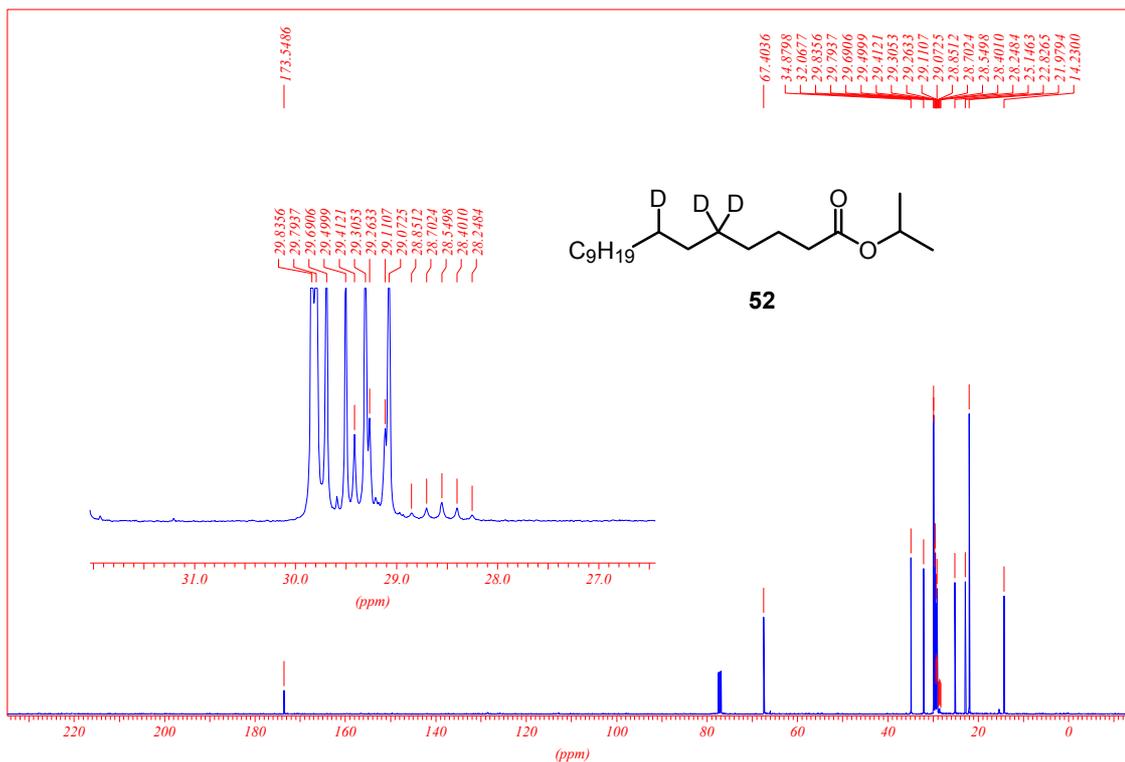
[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Dodecansäure-*tert*-butylester (49)



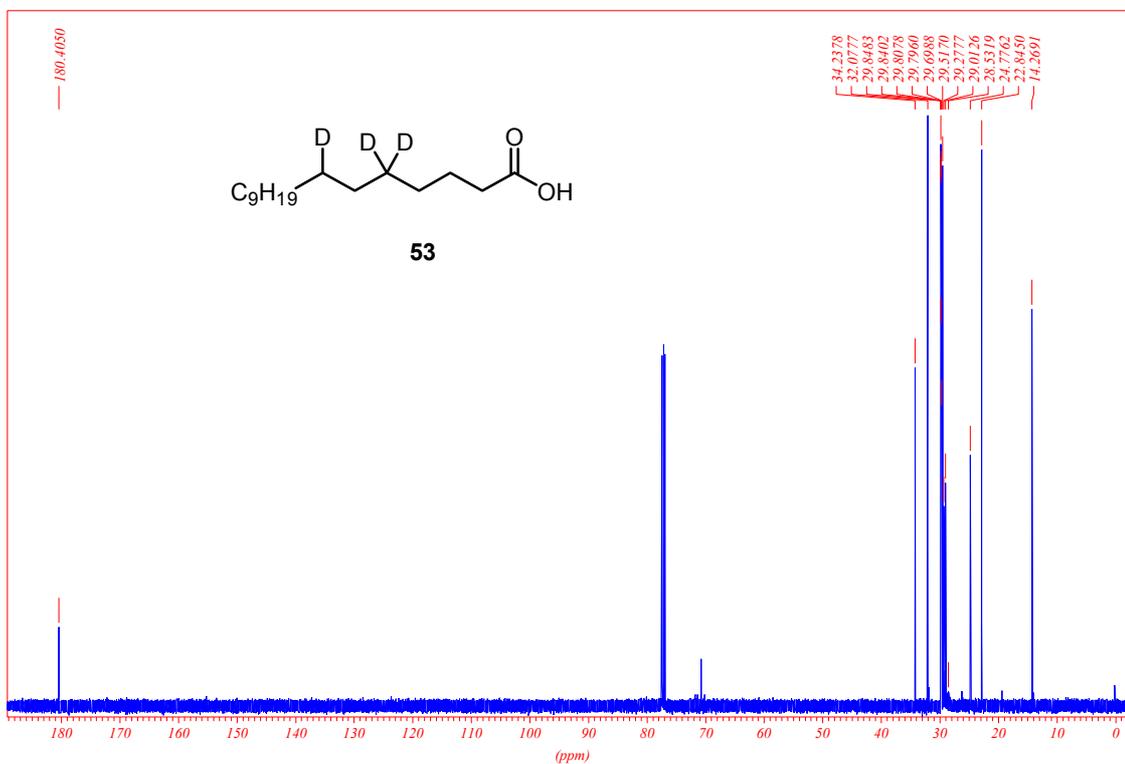
[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (50)



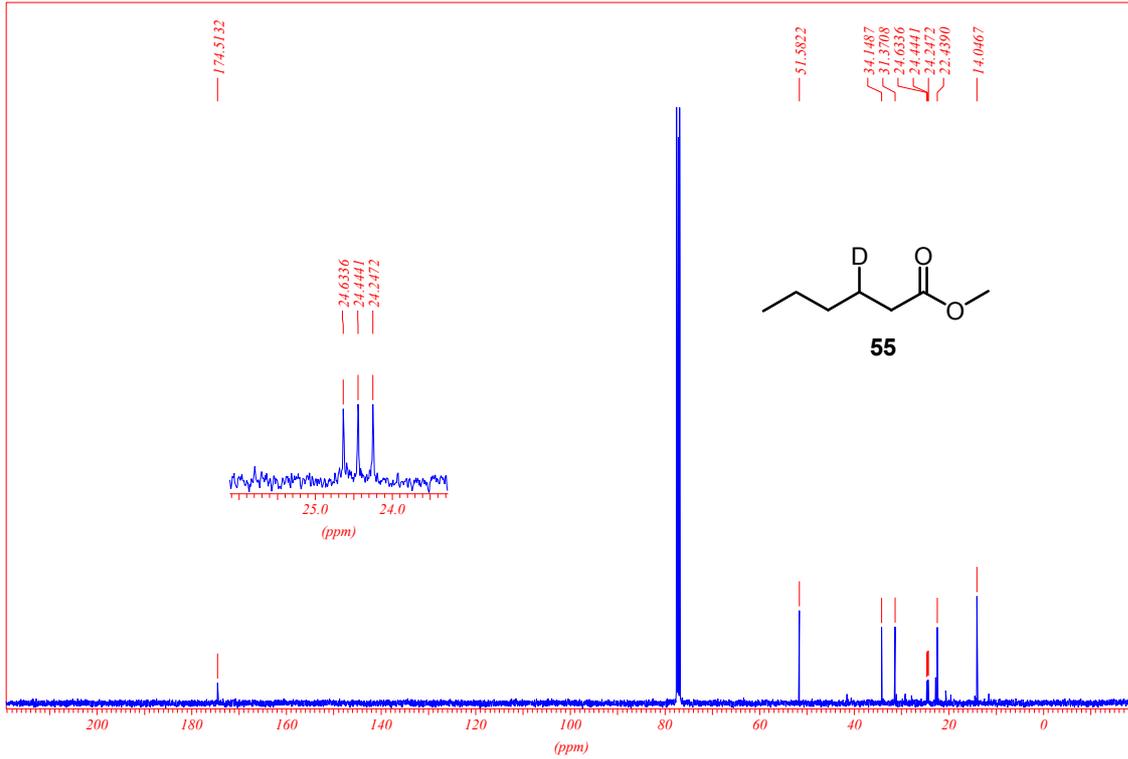
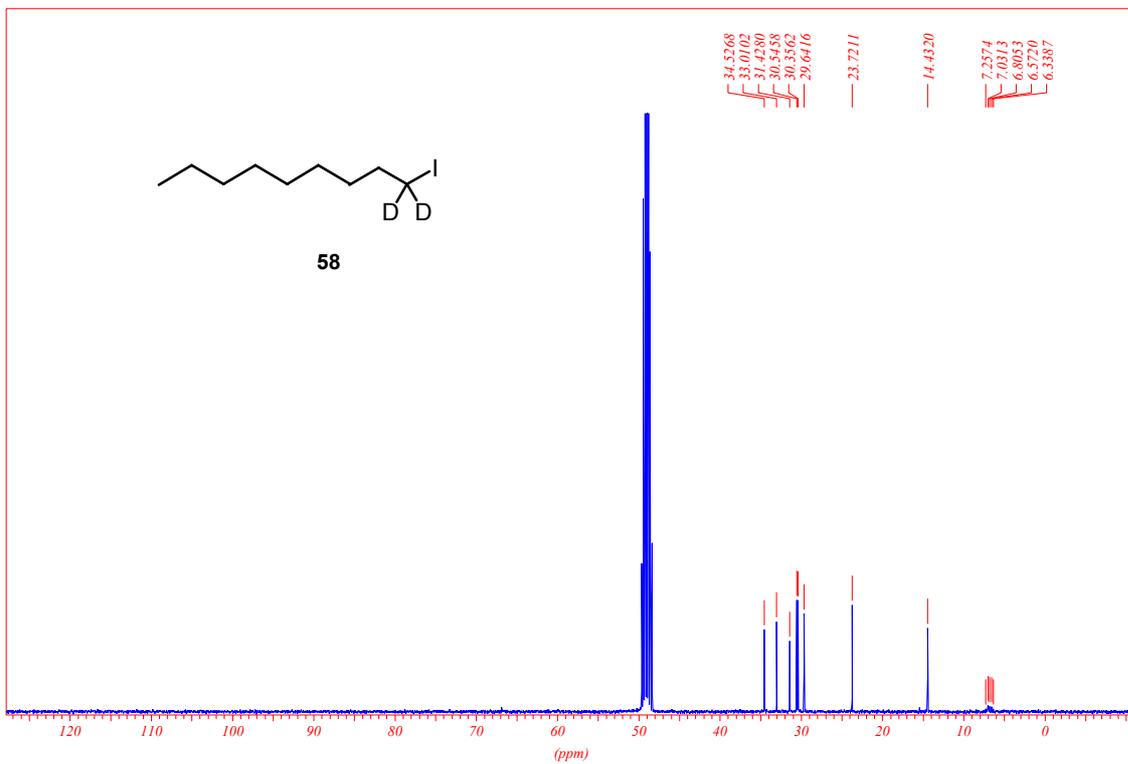
[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecyl iodid (51)

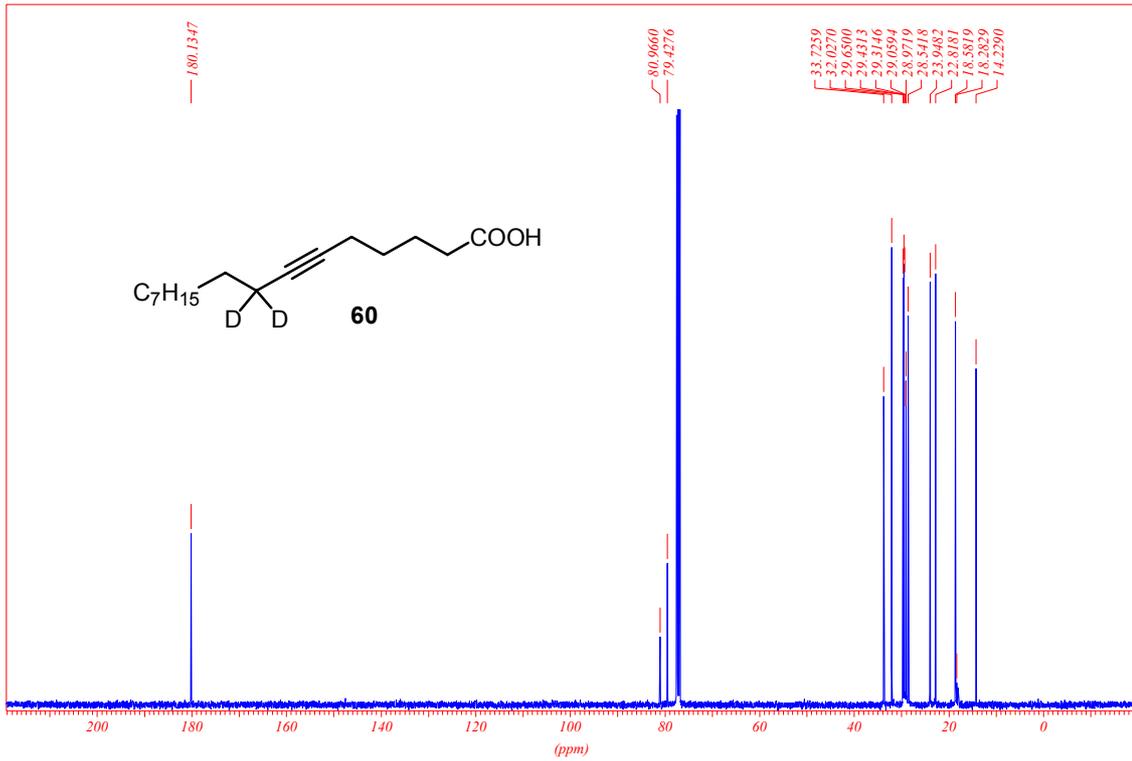


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäureisopropylester (**52**)

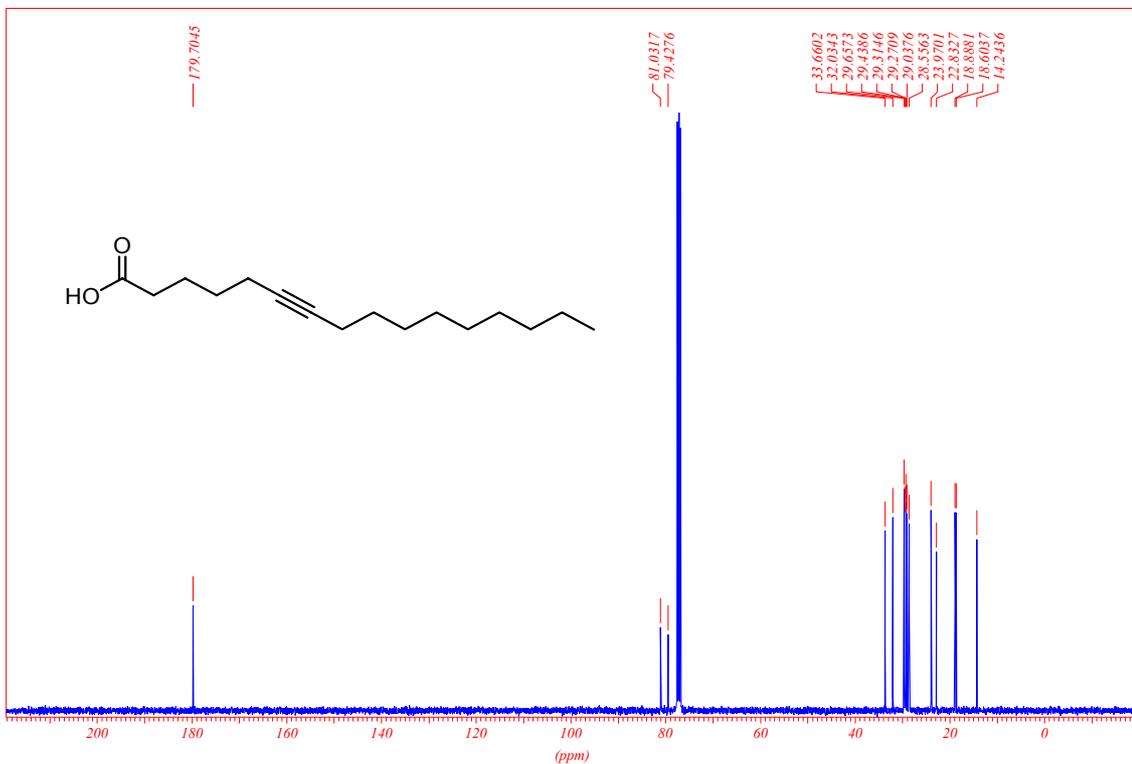


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**)

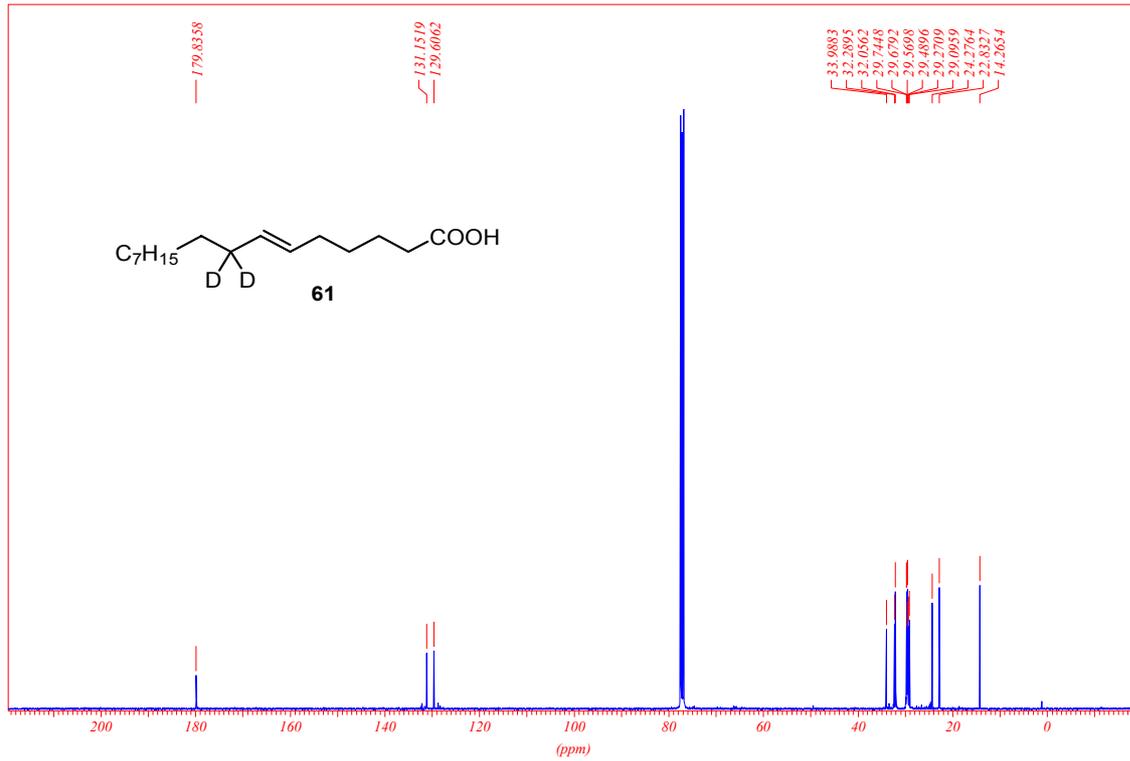
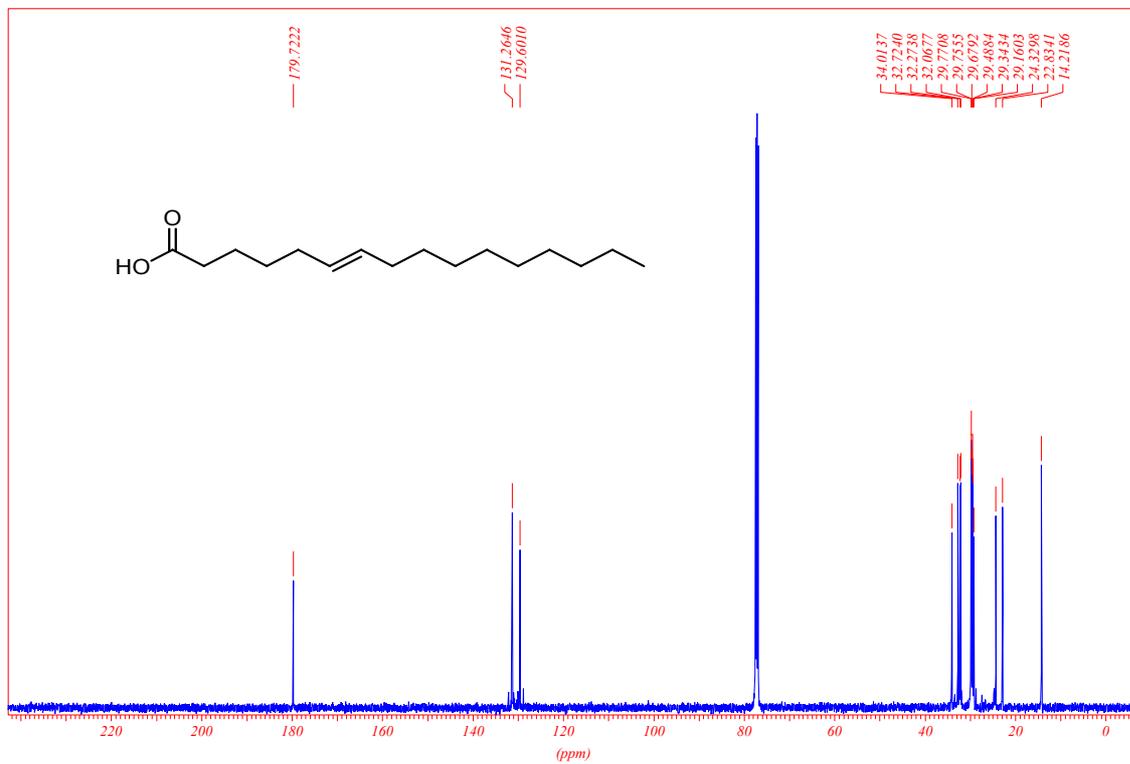
[3- $^2\text{H}_1$ ]-Hexansäuremethylester (**55**)[1,1- $^2\text{H}_2$ ]-Iodnonan (**58**)

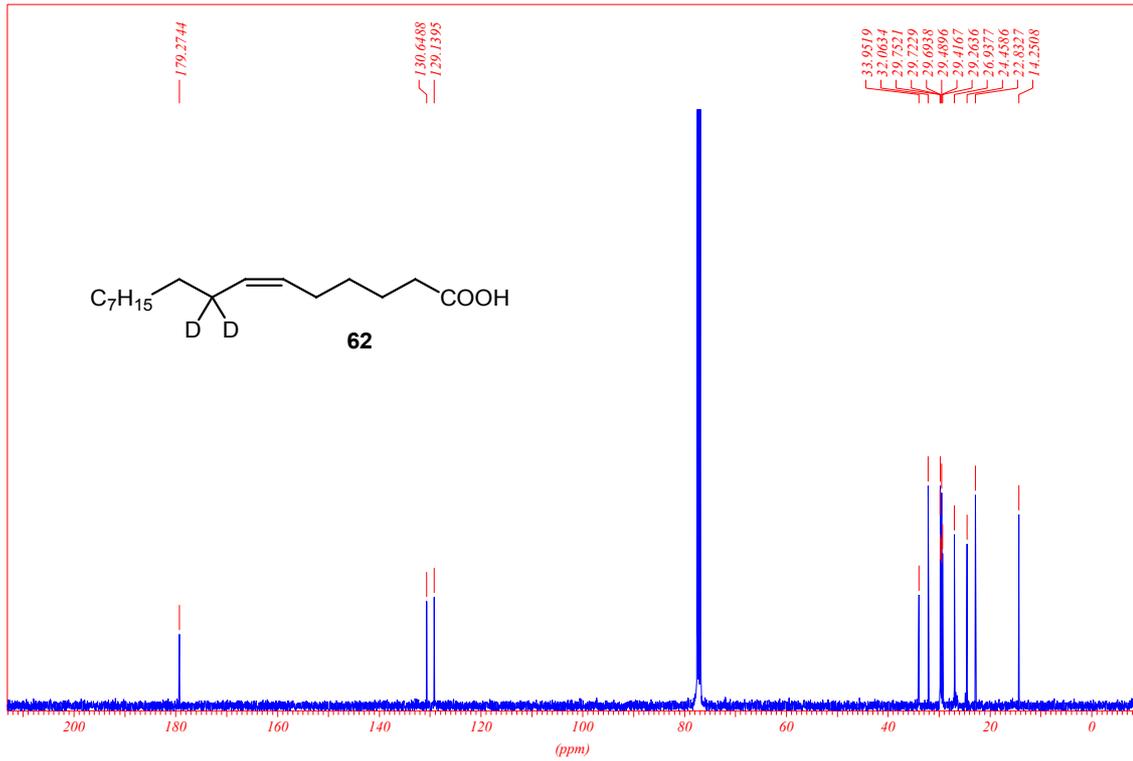


[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-insäure (60)

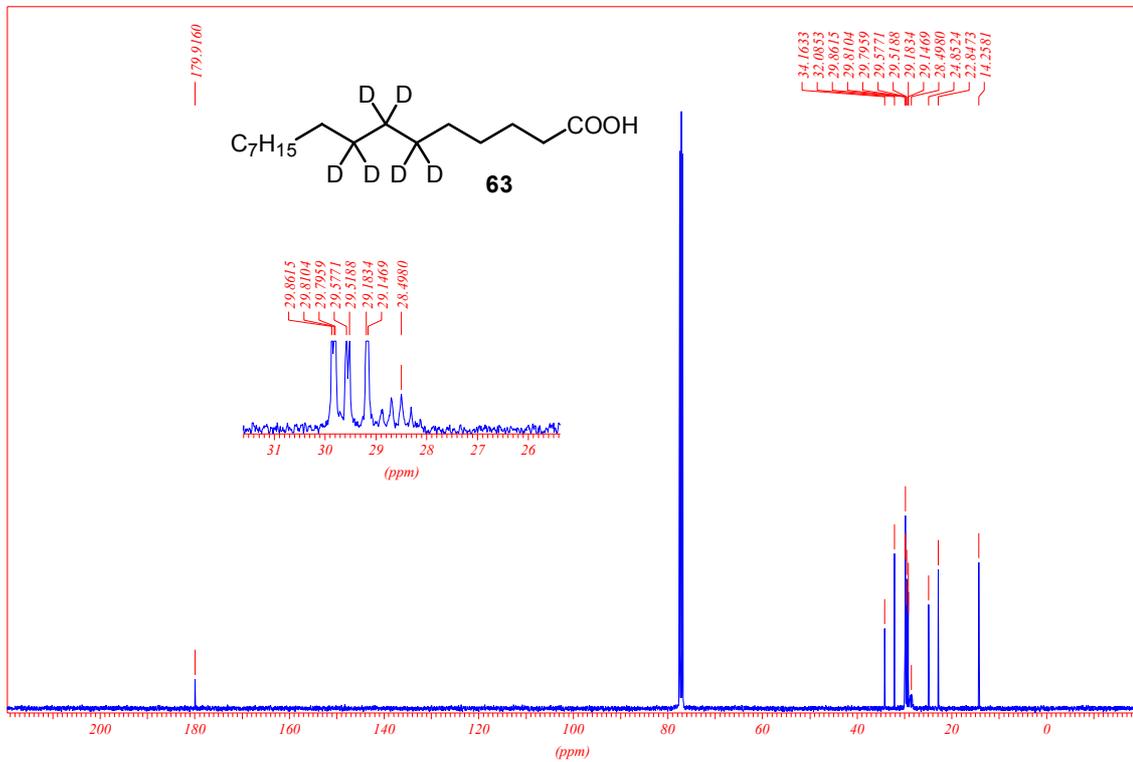


Hexadec-6-insäure

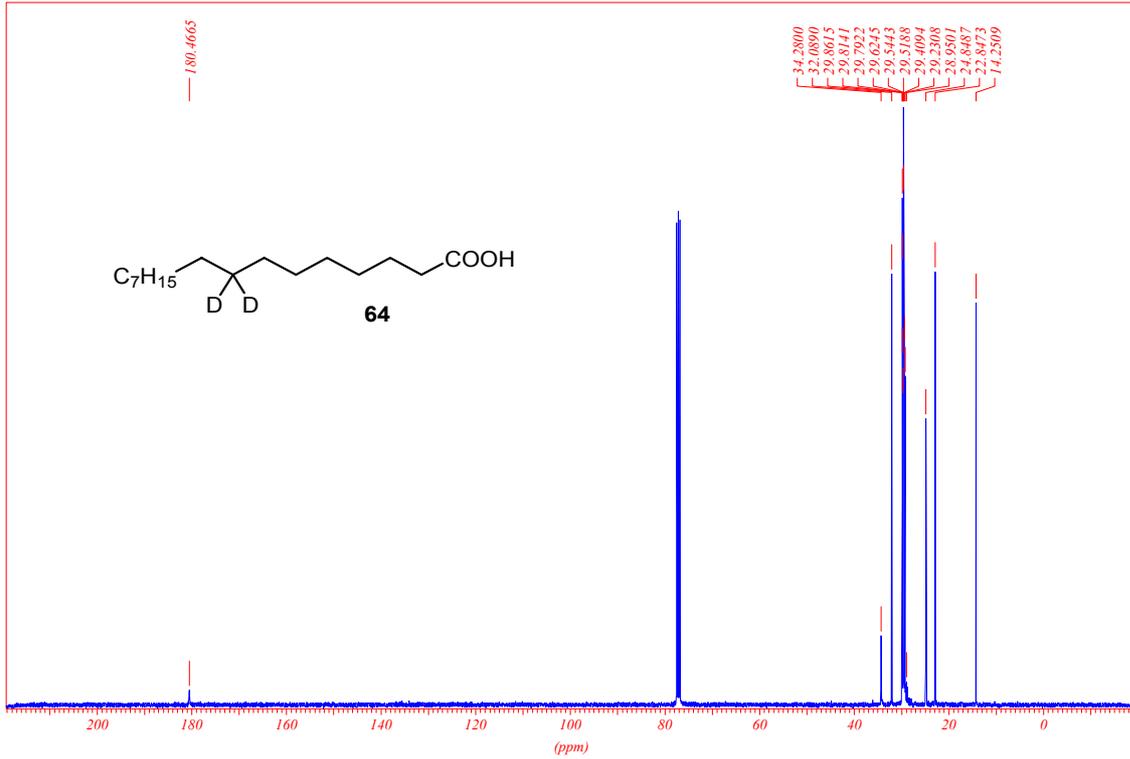
*(E)*-[8,8- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-6-ensäure (**61**)*(E)*-Hexadec-6-ensäure (**139**)



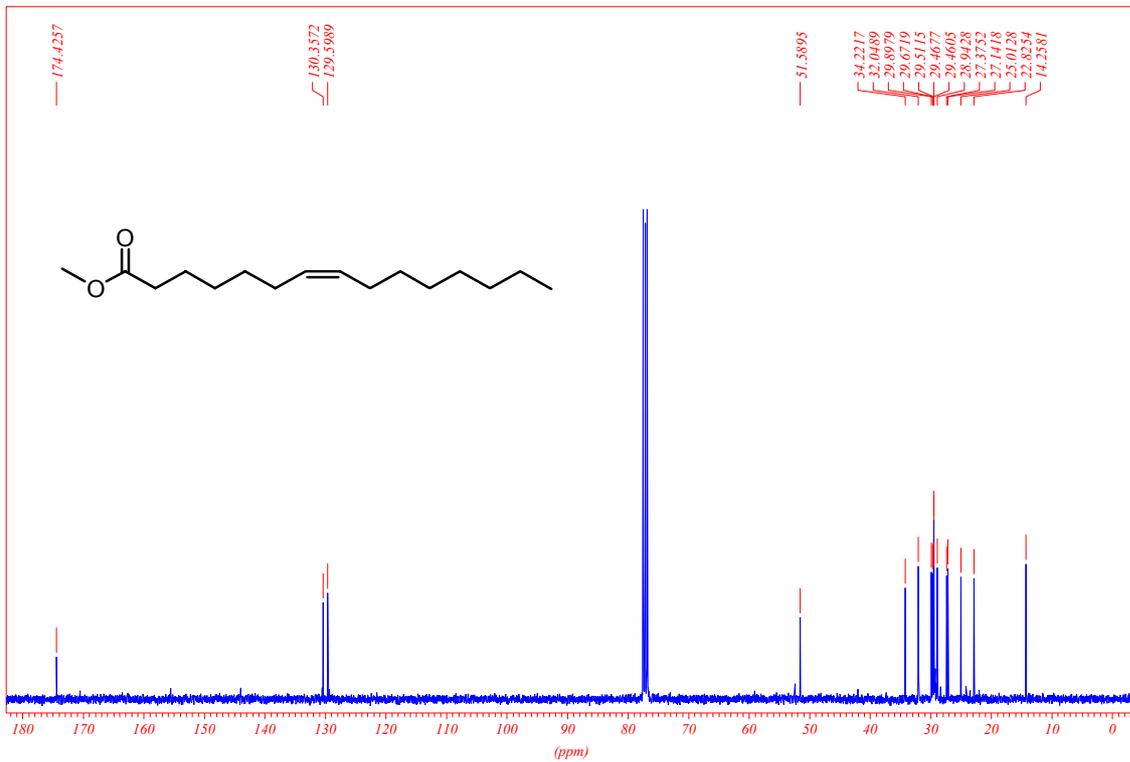
(6Z)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**)



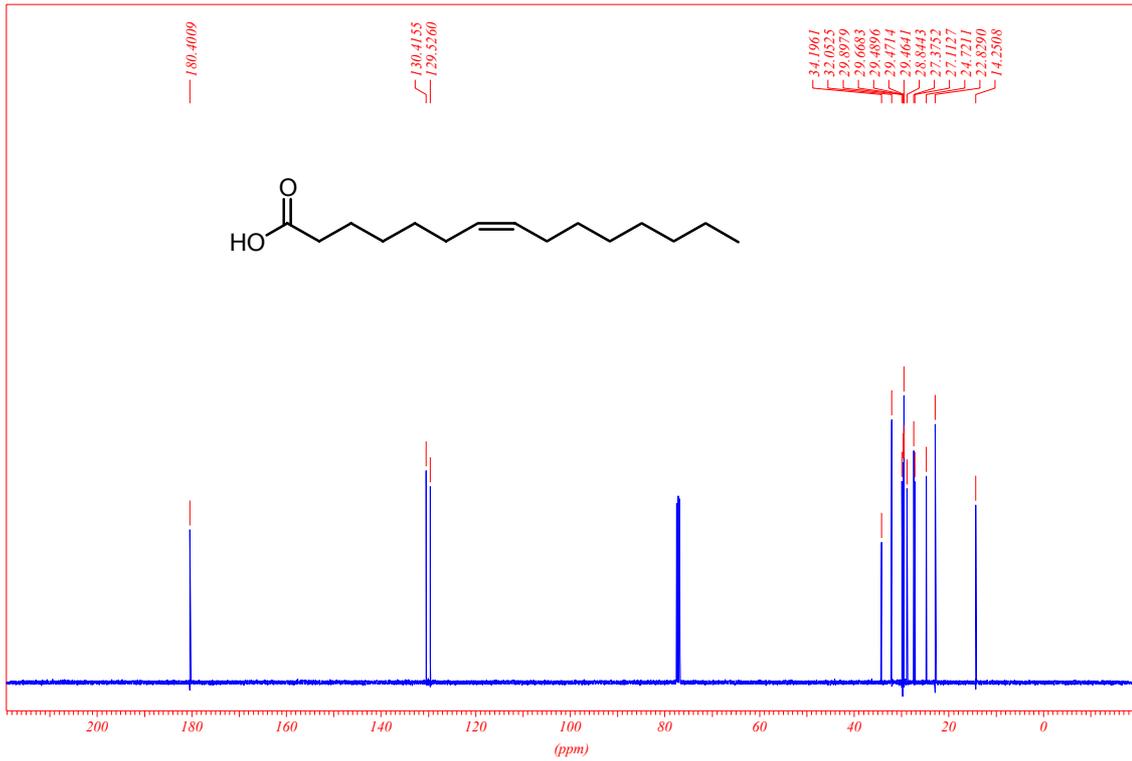
[6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecansäure (**63**)



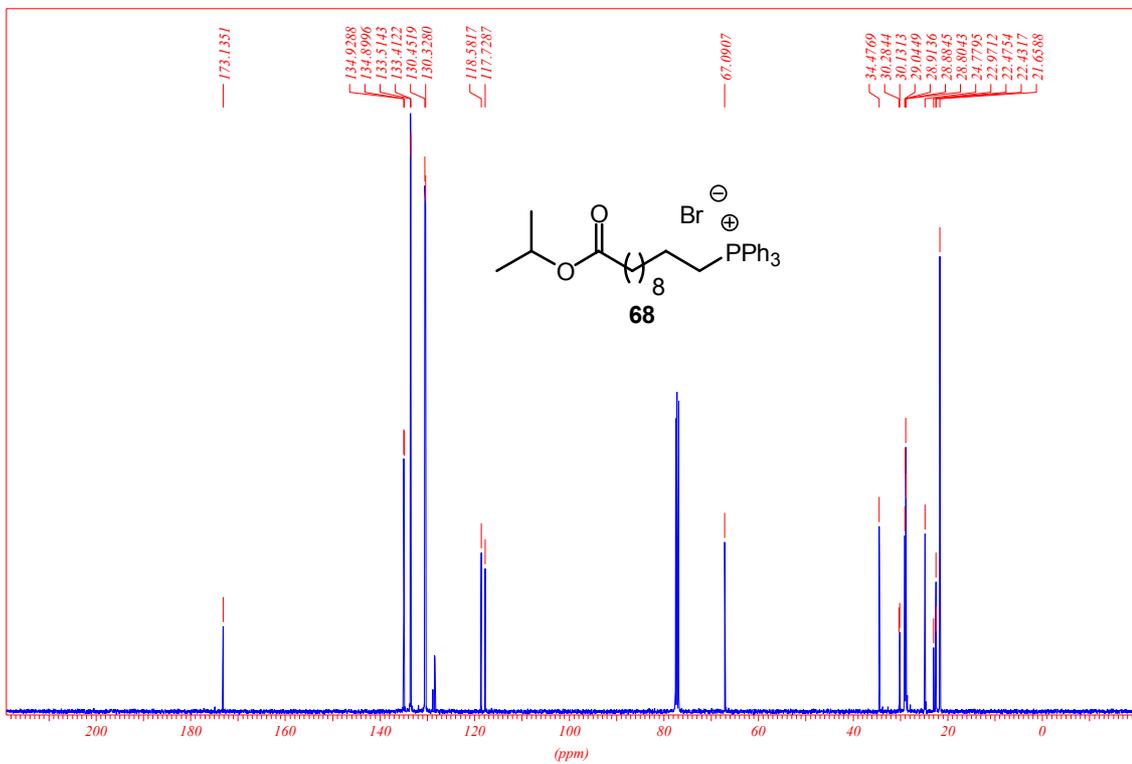
[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (64)



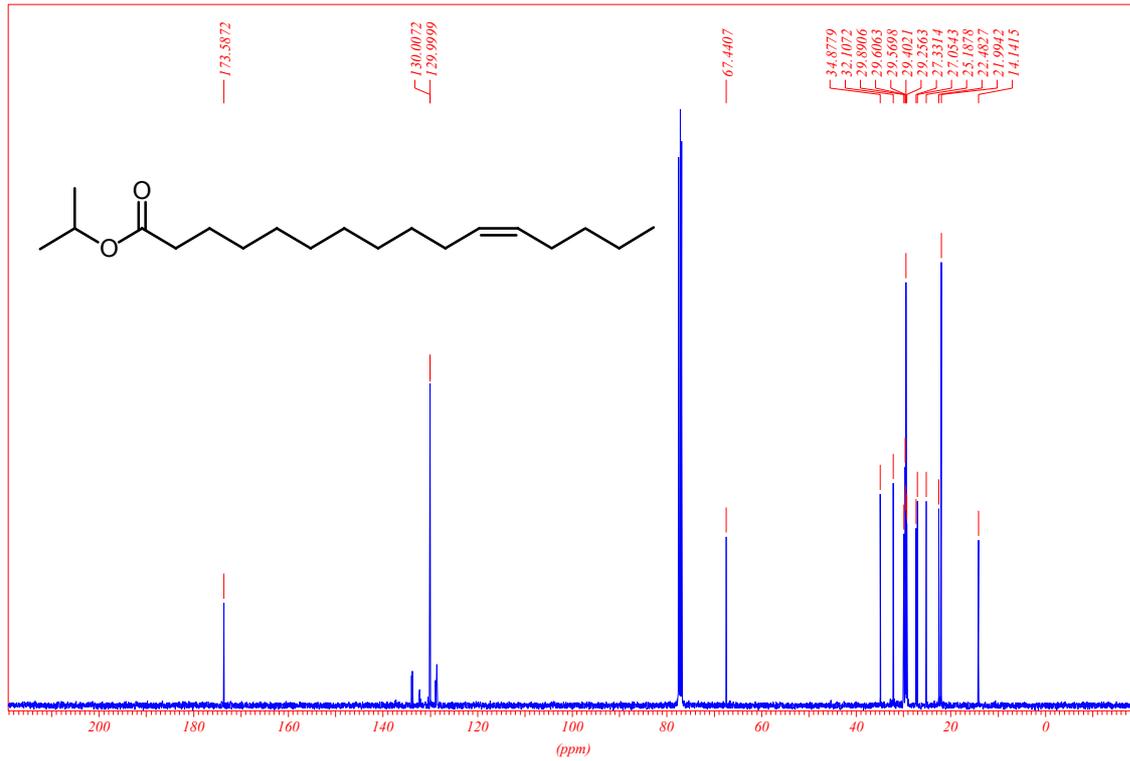
(7Z)-Hexadec-7-ensäuremethylester (67a)



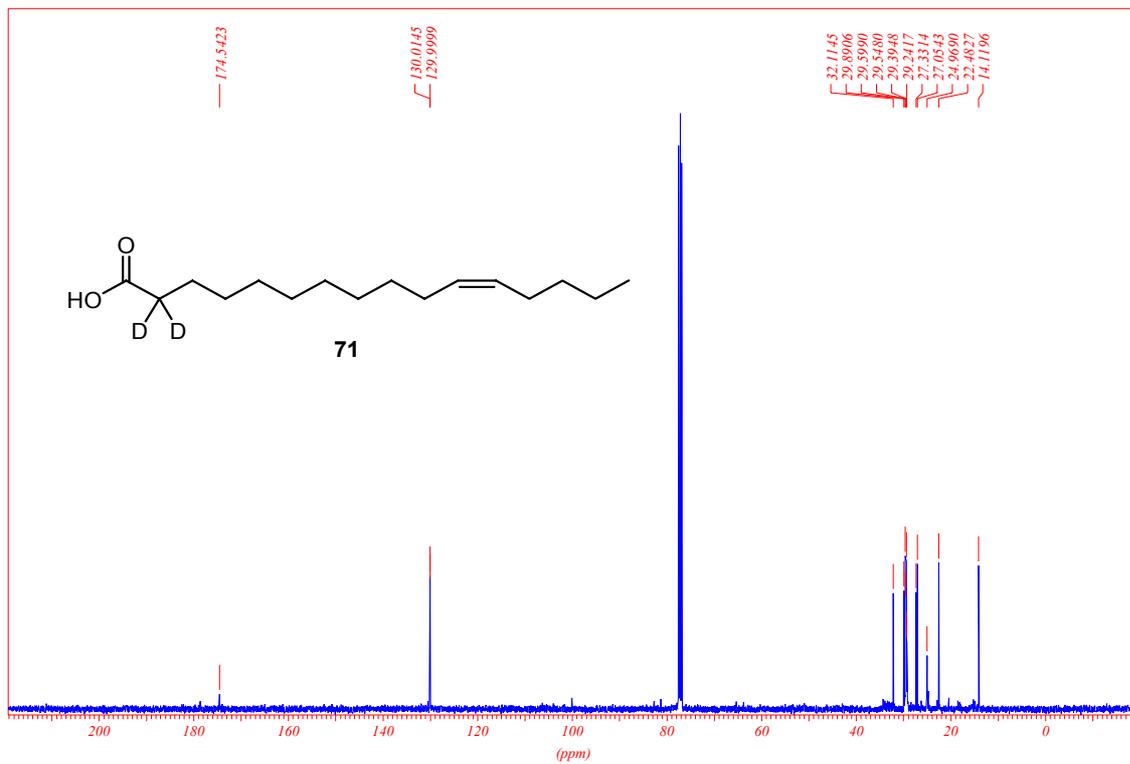
(7Z)-Hexadec-7-ensäure (67b)

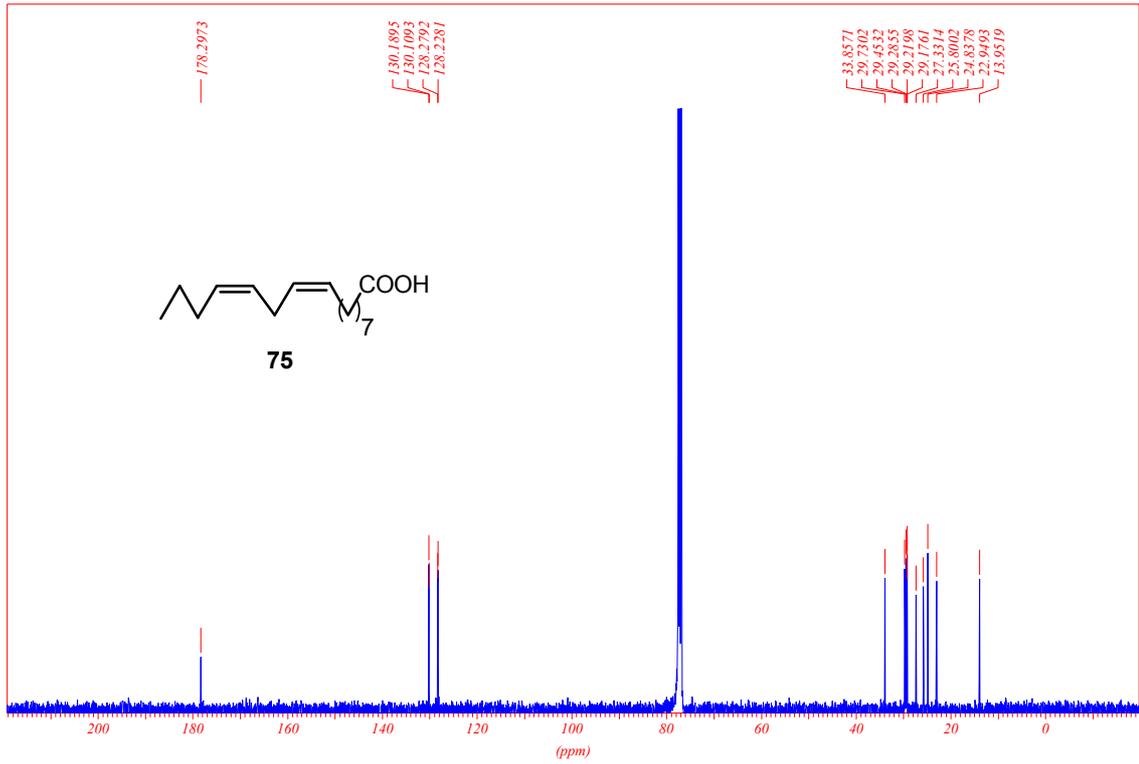


Bromundecansäuretriphenylphosphoniumsalz (68)

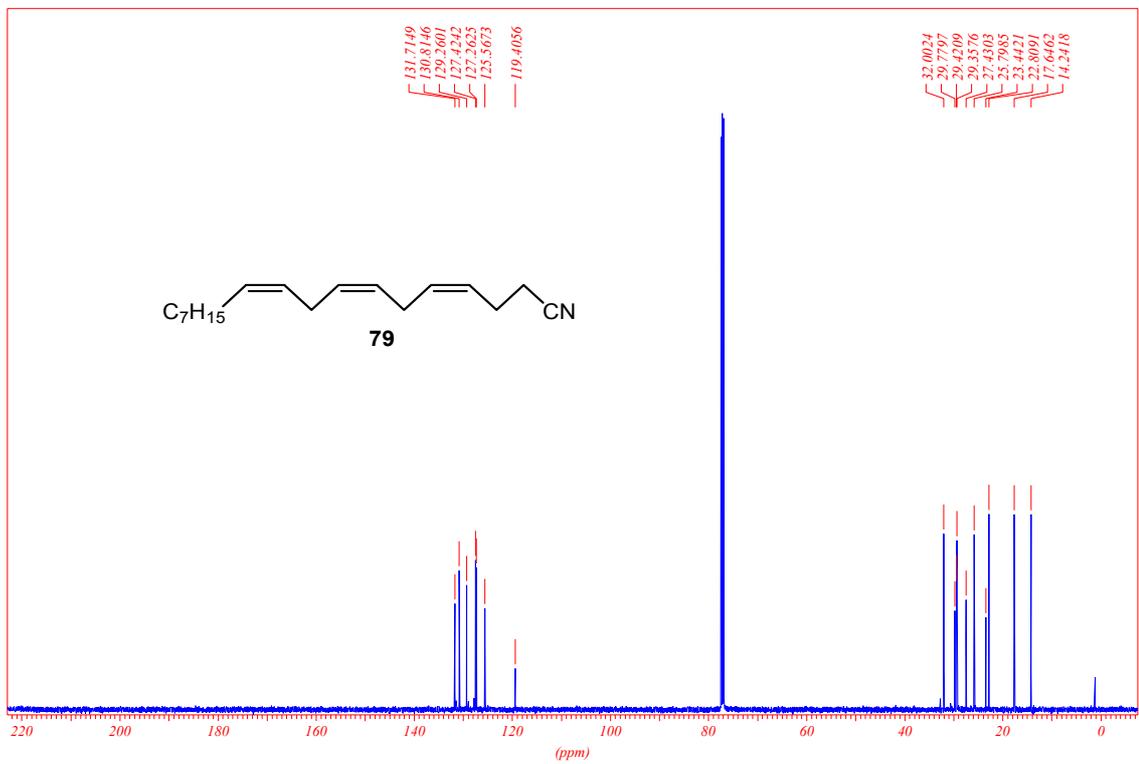


(Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (70)

(Z)-[2,2- $^2\text{H}_2$ ]-Hexadec-11-ensäure (71)

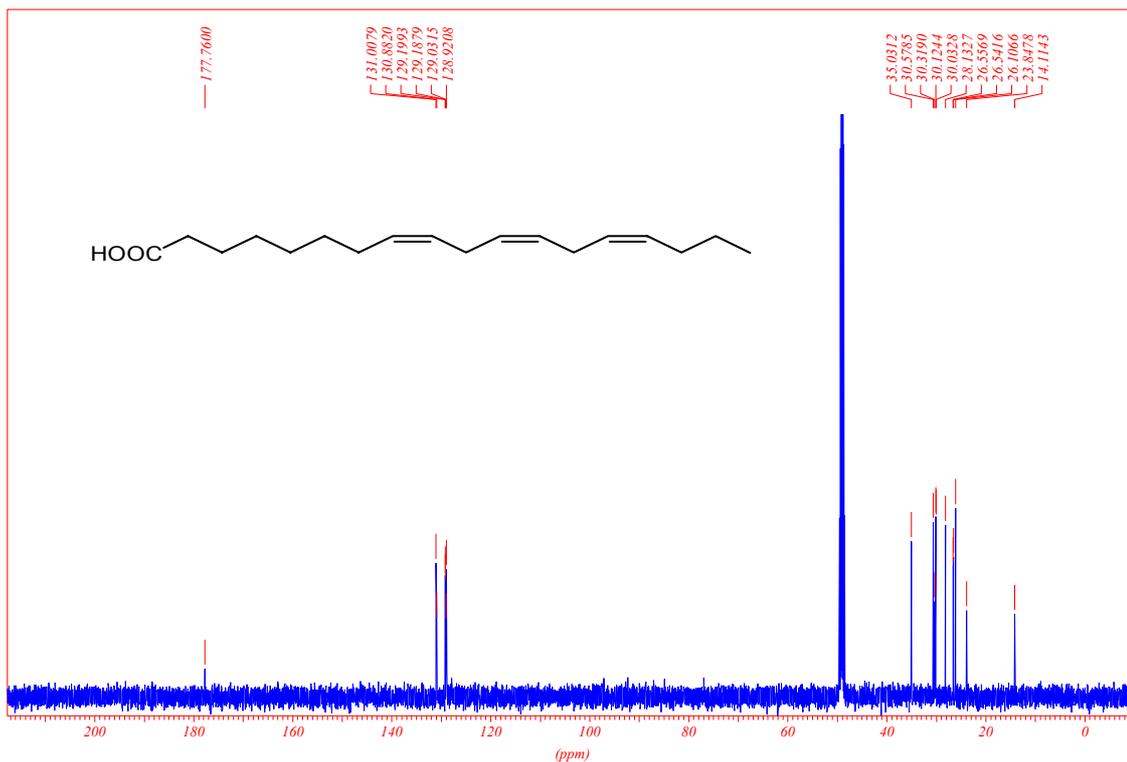


(9Z,12Z)-Hexadec-9,12-diensäure (**75**)

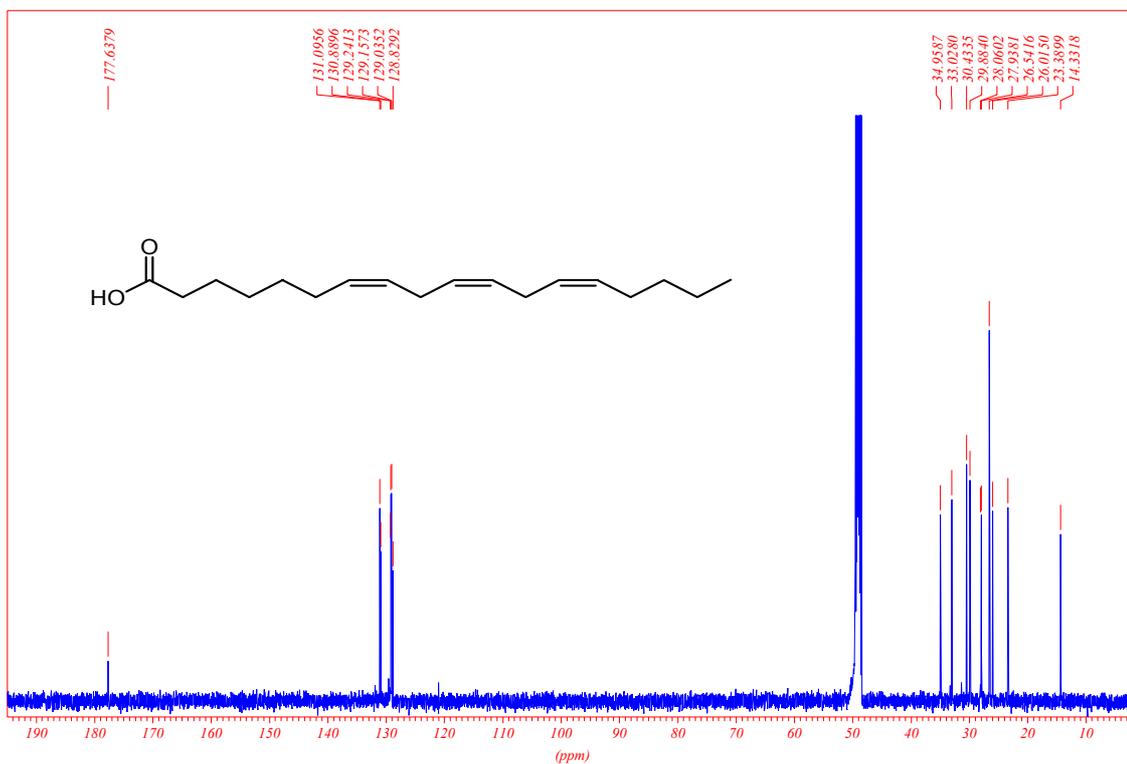


(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triennitril (**79**)

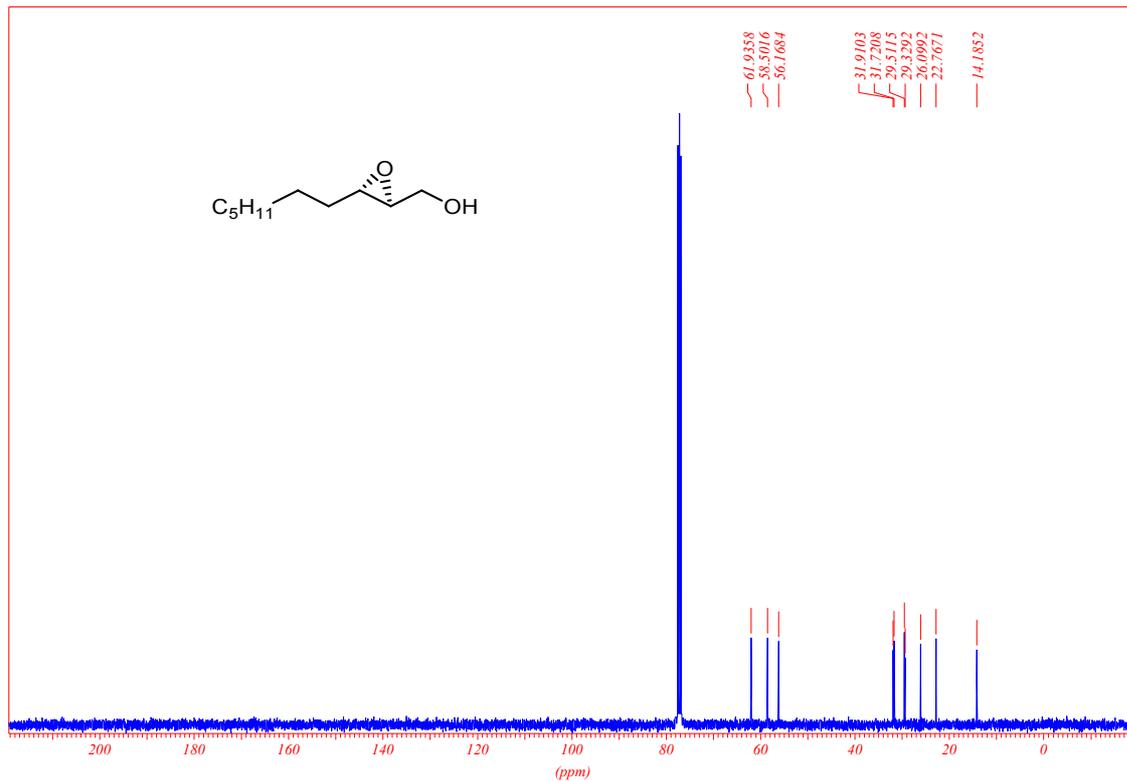
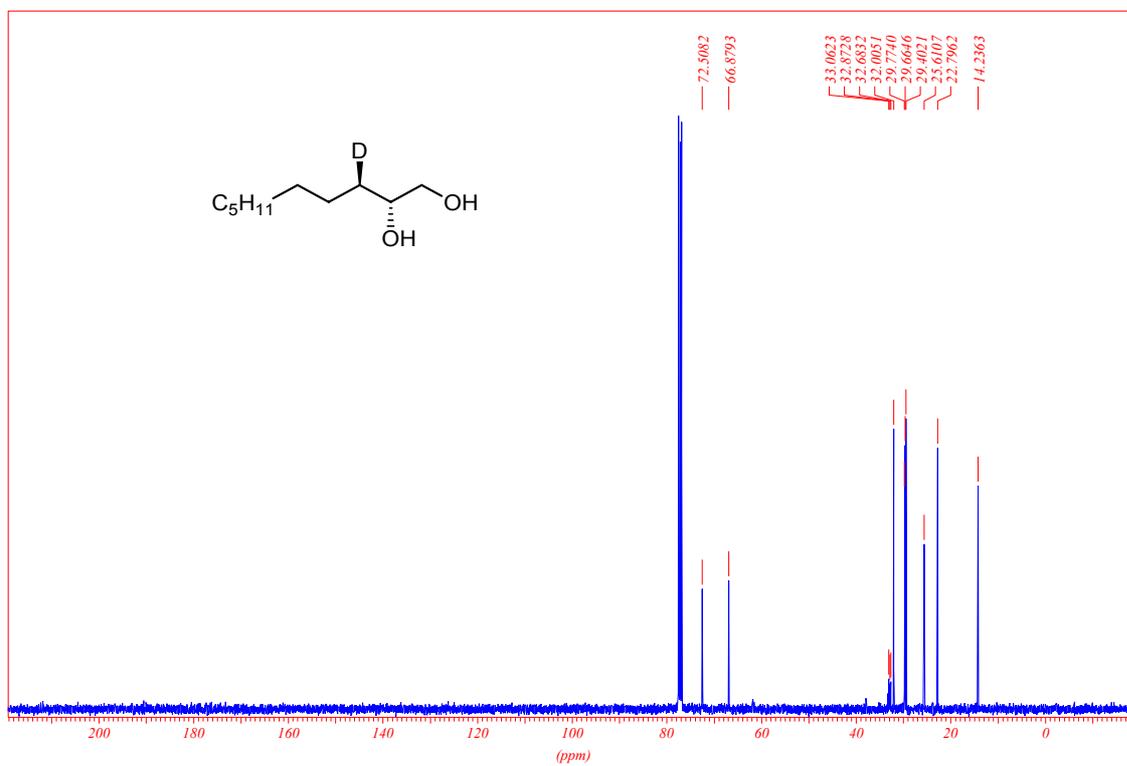


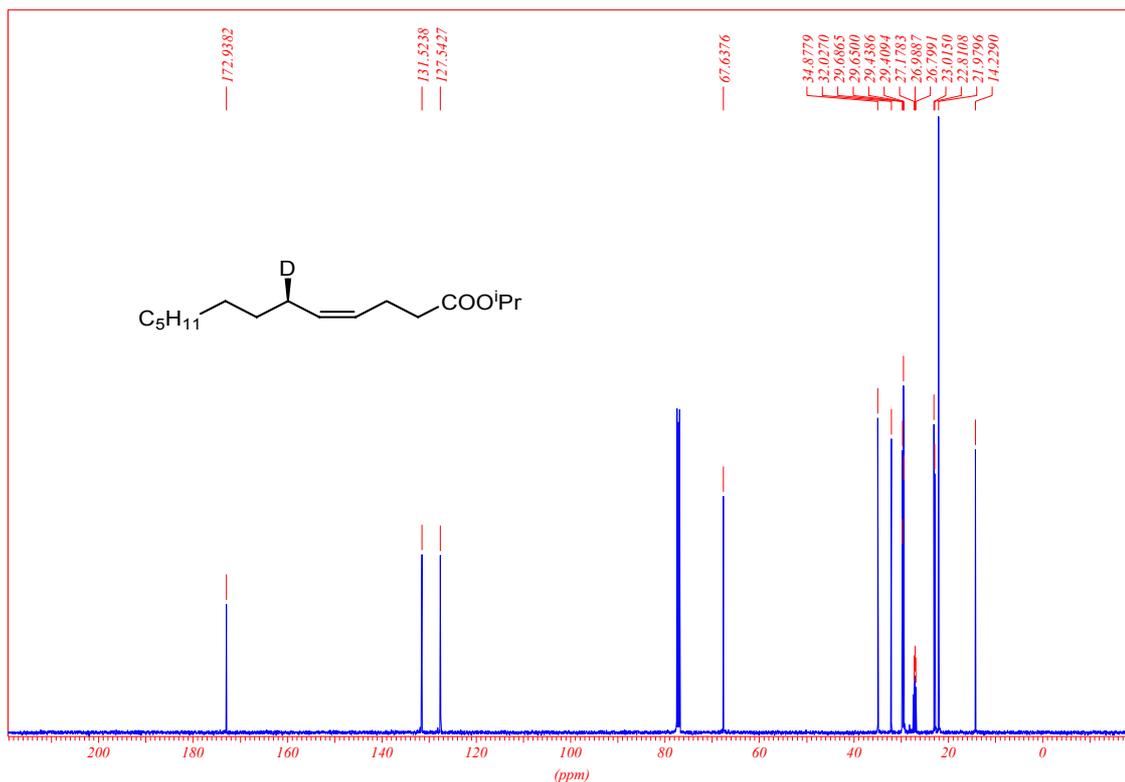


(8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (92)

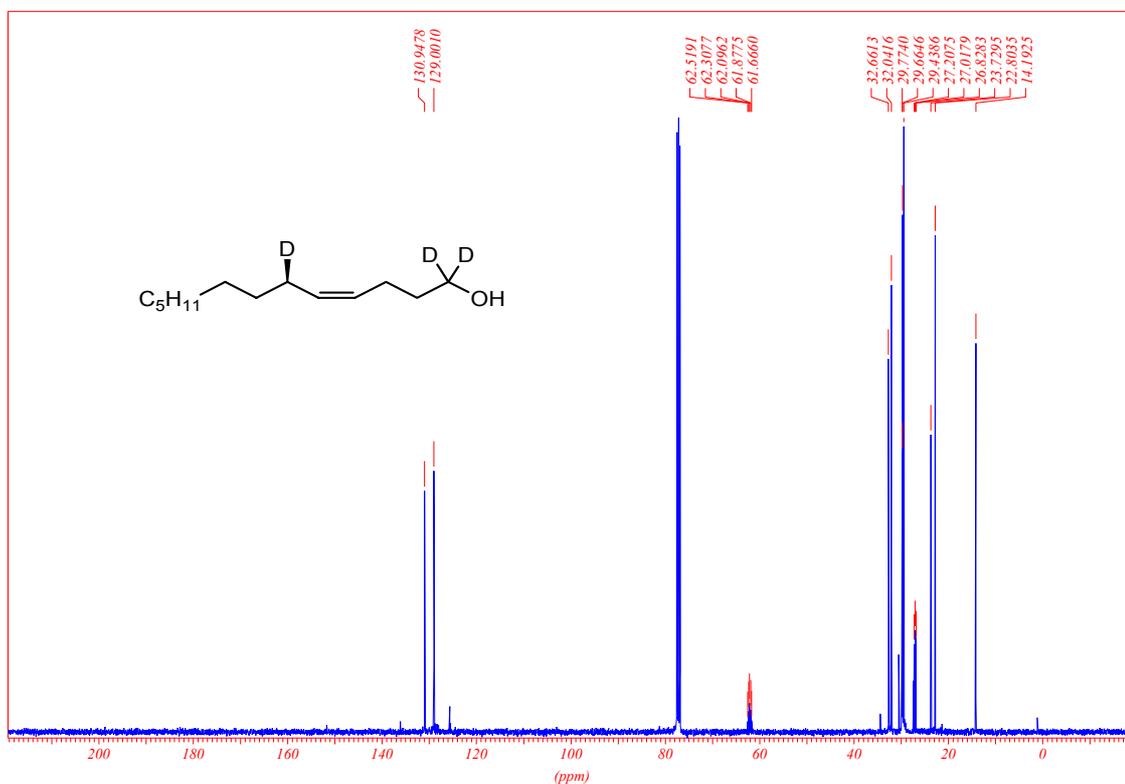


(7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (91)

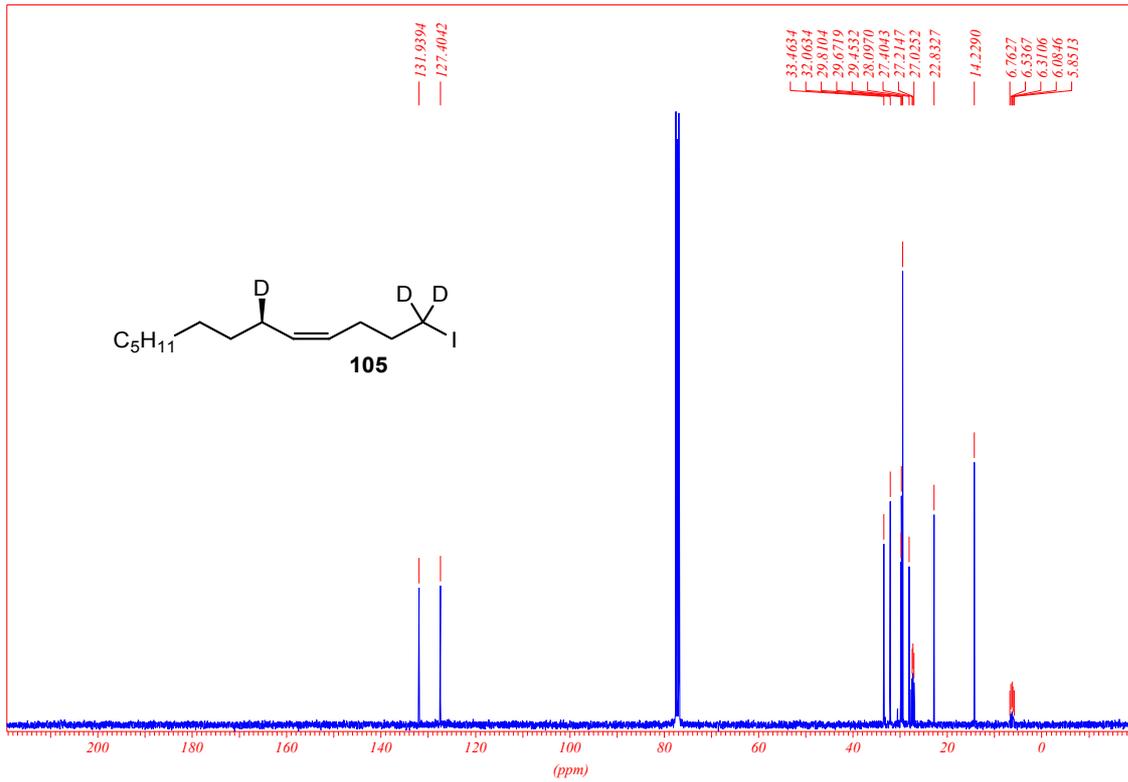
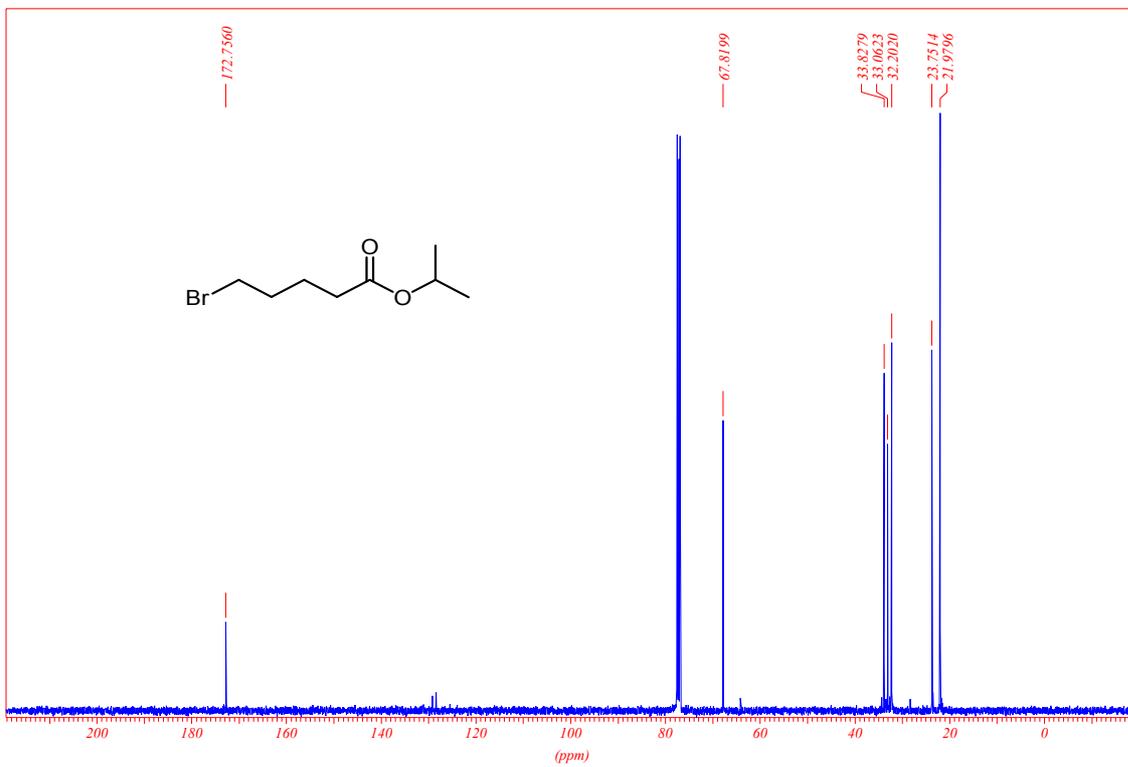
(2*S*,3*S*)-2,3-Epoxydecanol (**100**)(2*R*,3*R*)-[3- $^2\text{H}_1$ ]-Decan-1,2-diol (**101**)



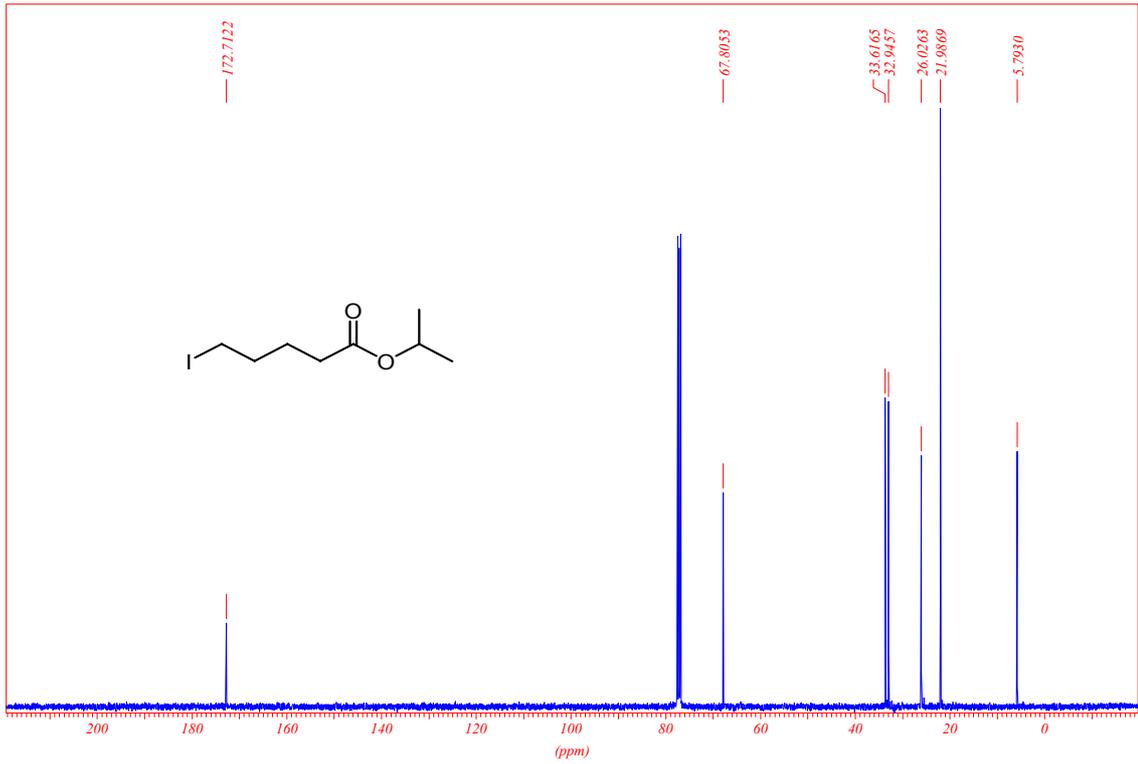
(6R)-[6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Tridec-4-ensäureisopropylester (**103**)



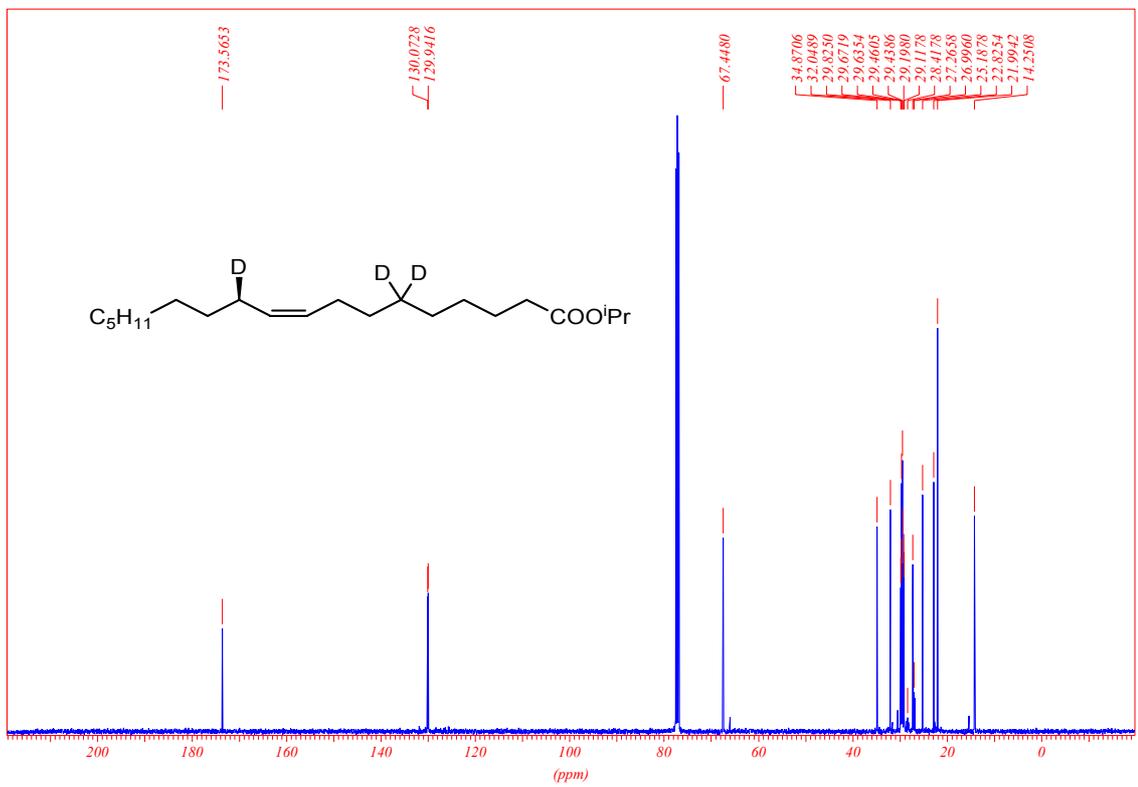
(6R)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Tridec-4-en-1-ol (**104**)

(6R)-[1,1,6- $^2\text{H}_3$ ]-1-iod-tridec-4-en (**105**)

5-Bromvaleriansäureisopropylester

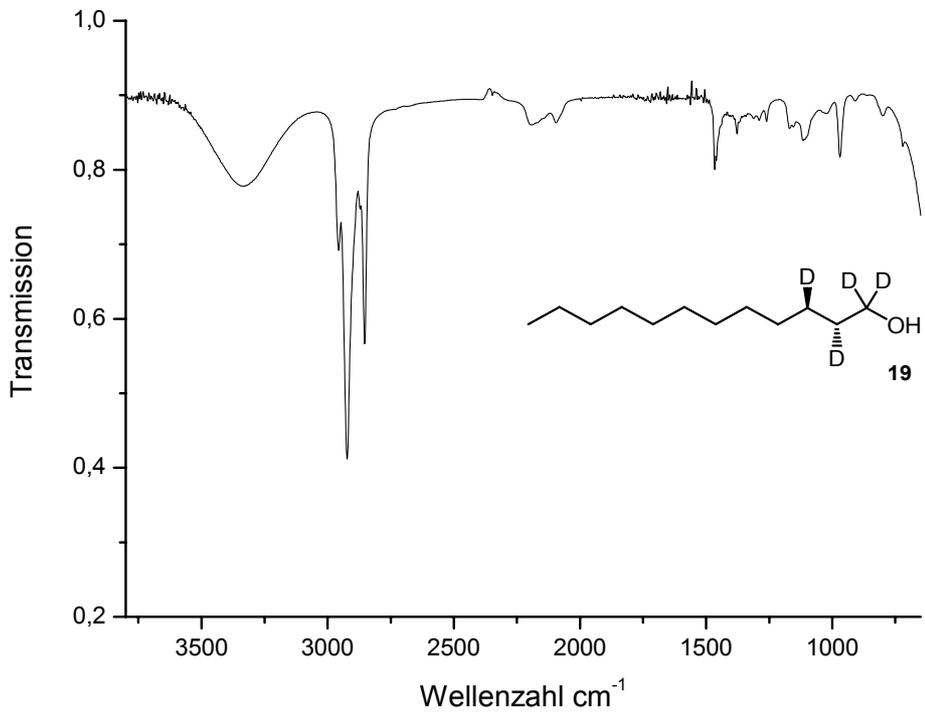
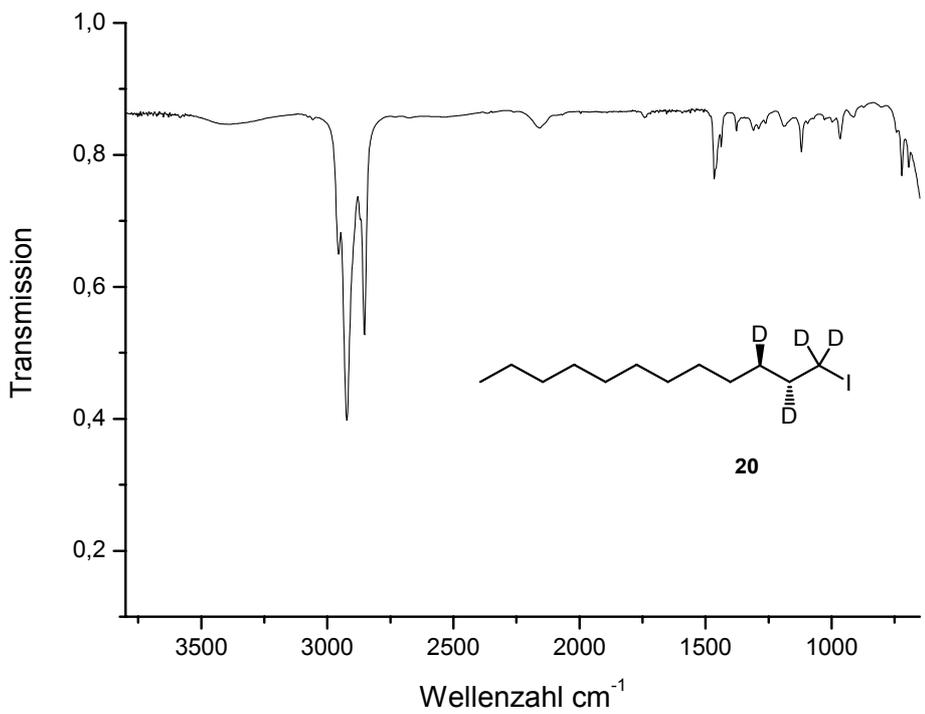


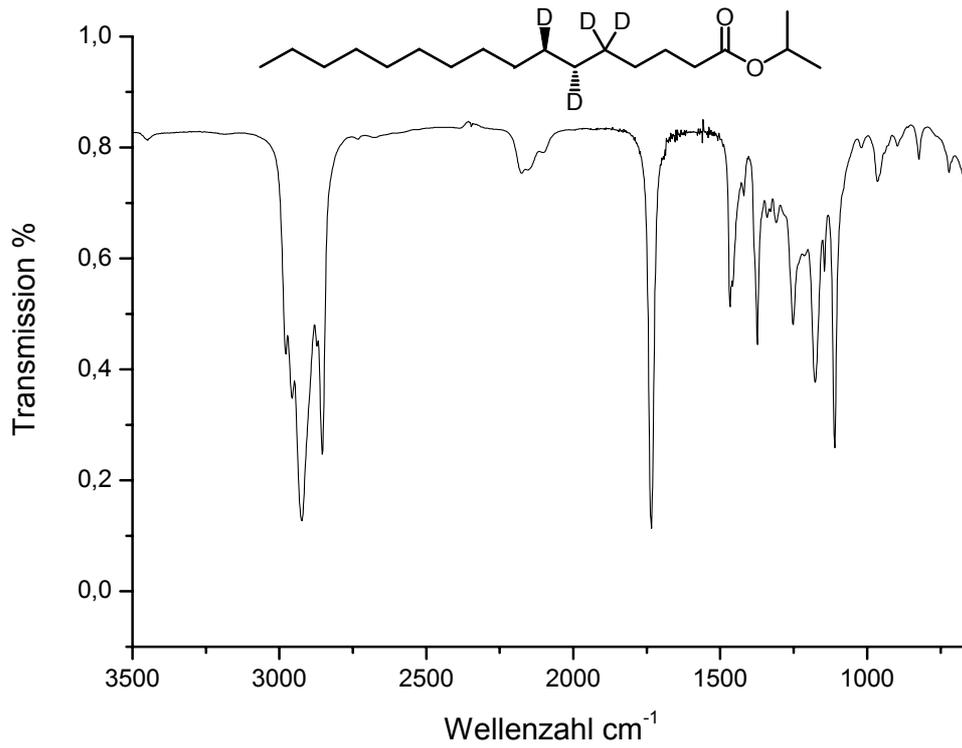
5-Iodvaleriansäureisopropylester



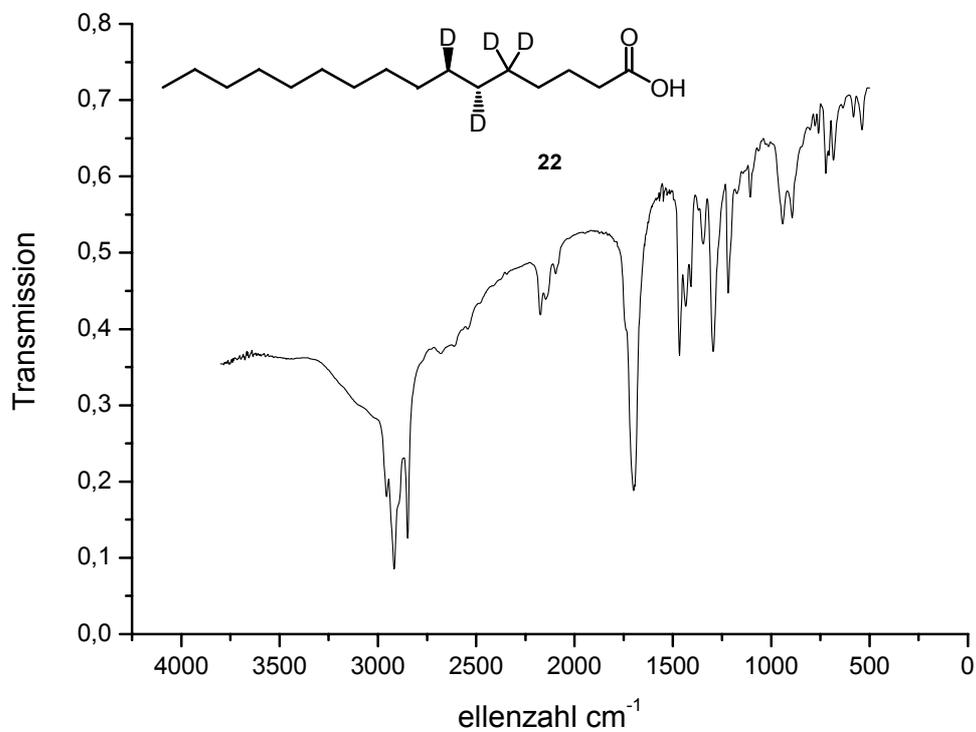
(11R)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäureisopropylester (107)



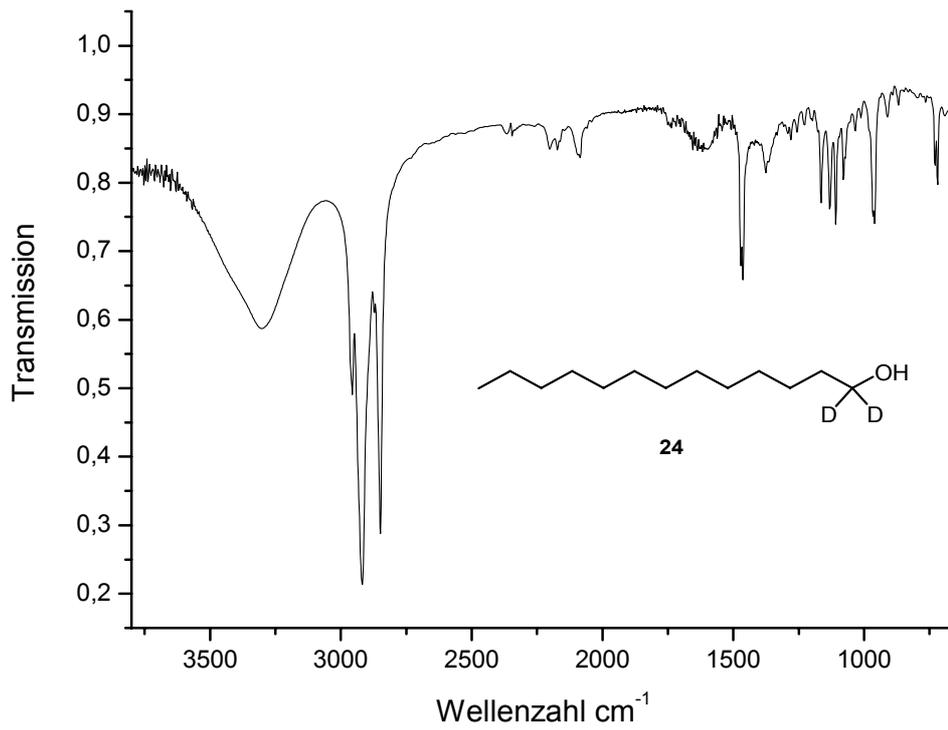
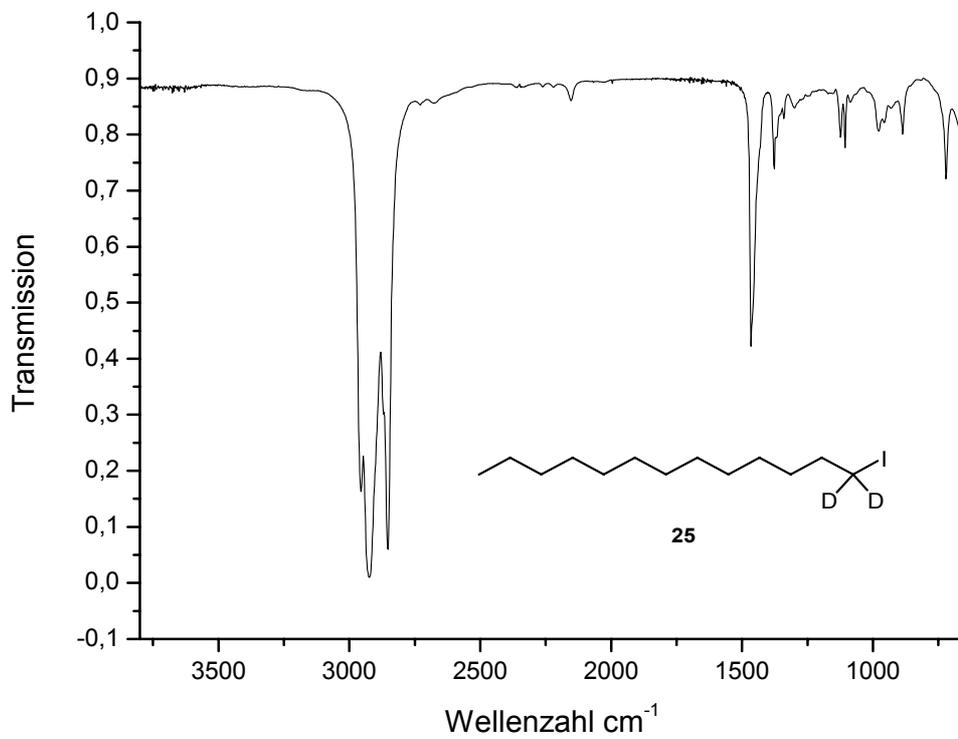
**IR-Spektren****(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecanol (19)****(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecyl iodide (20)**

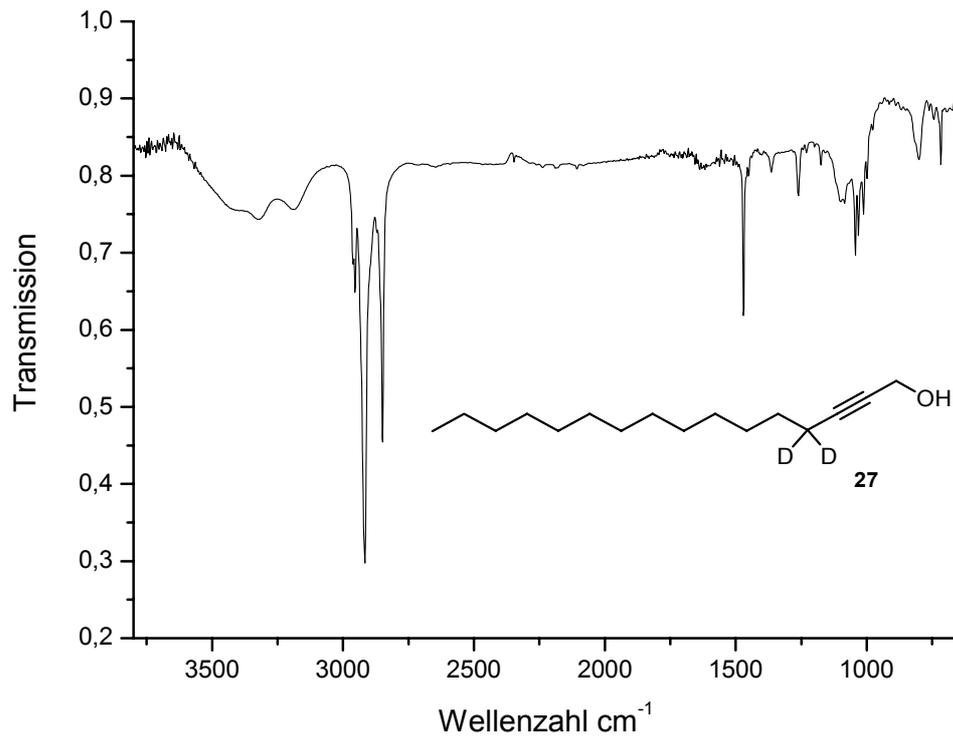


(6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäureisopropylester

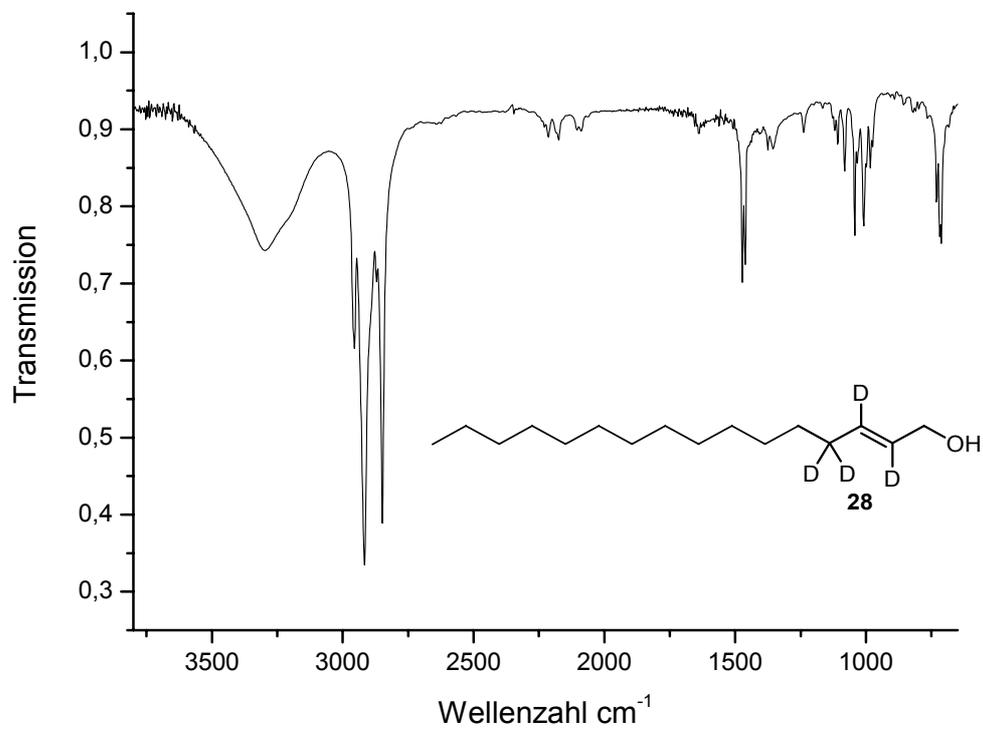


(6*R*,7*R*)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (**22**)

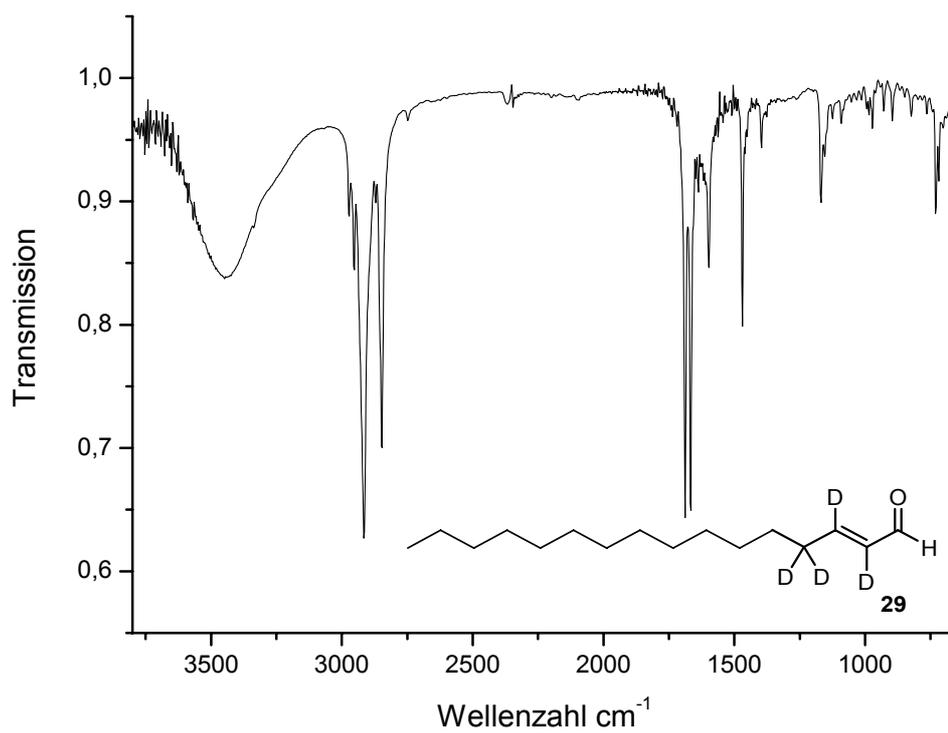
[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**)[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Iodotridecan (**25**)



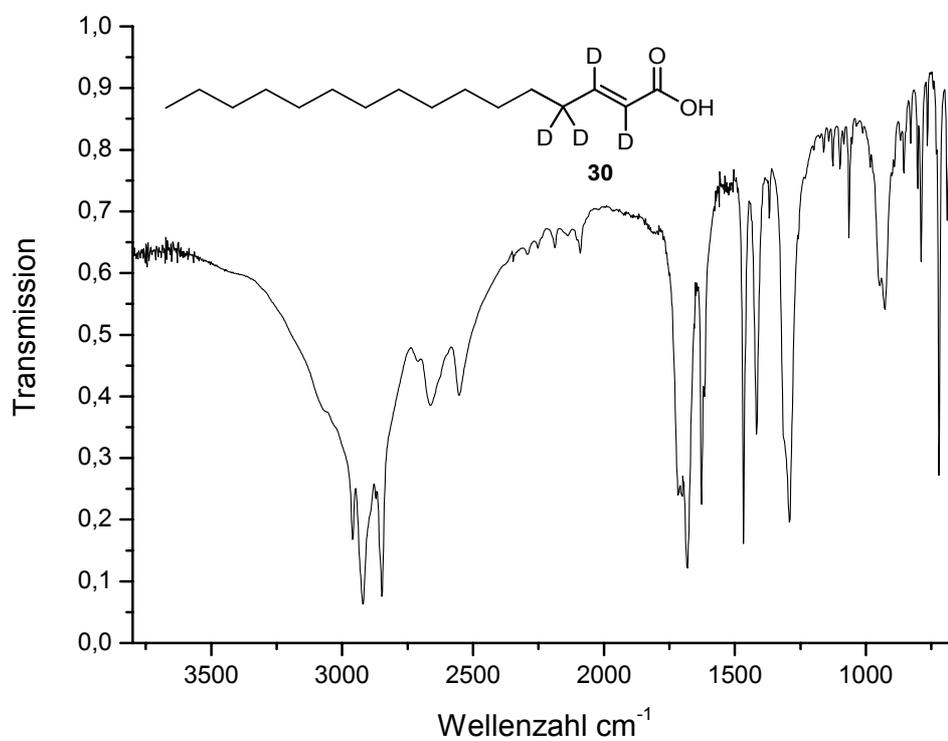
[4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-2-in-1-ol (**27**)



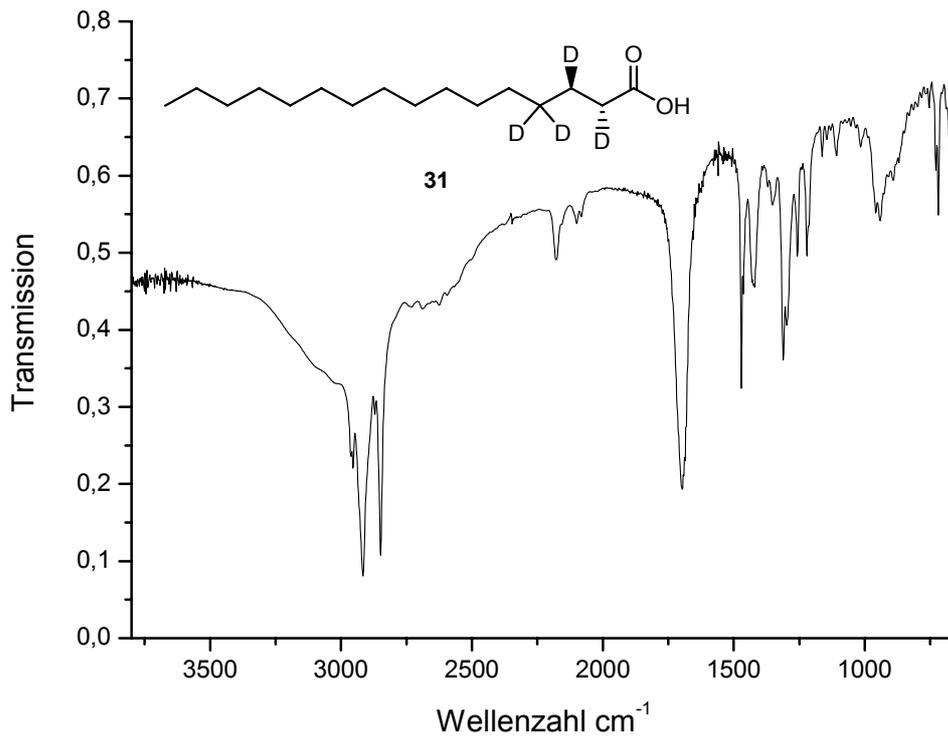
(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadec-2-en-1-ol (**28**)



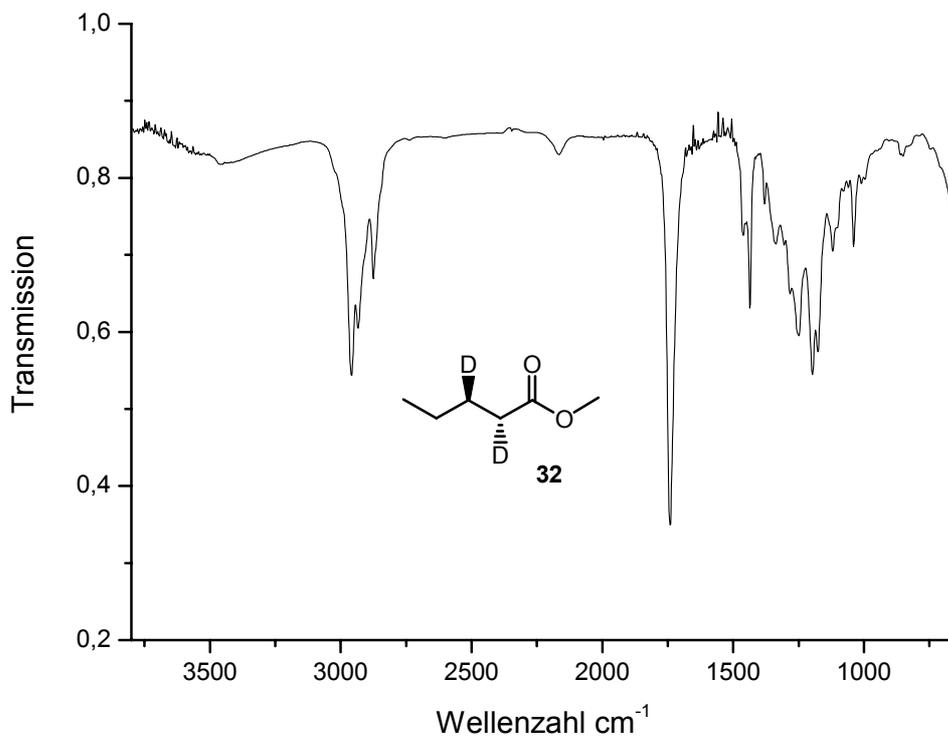
(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-en-1-al (**29**)



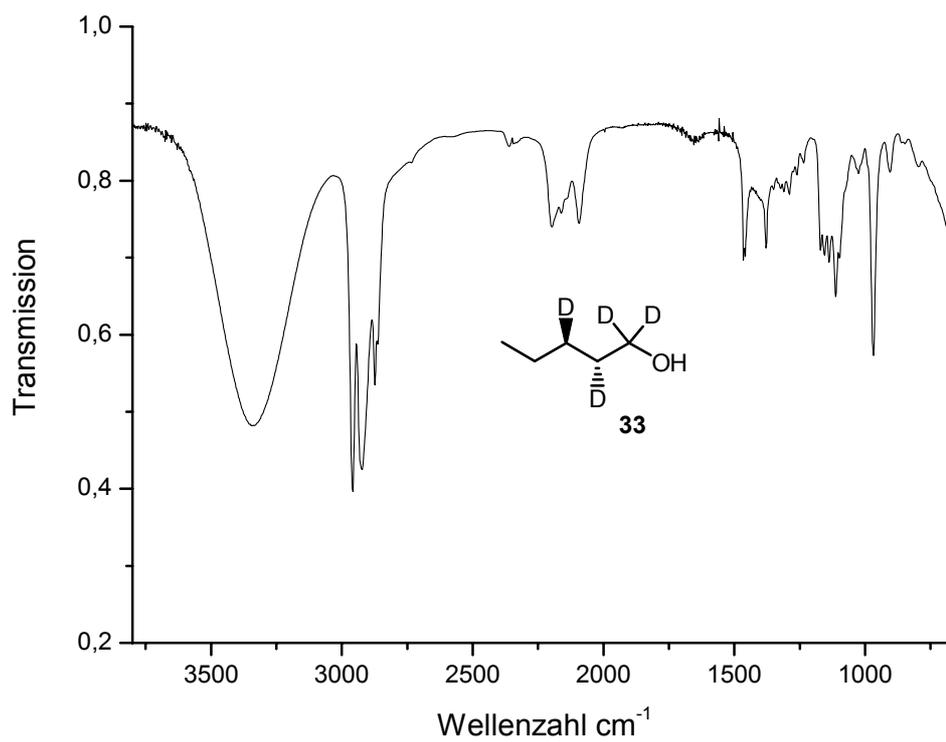
(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-ensäure (**30**)



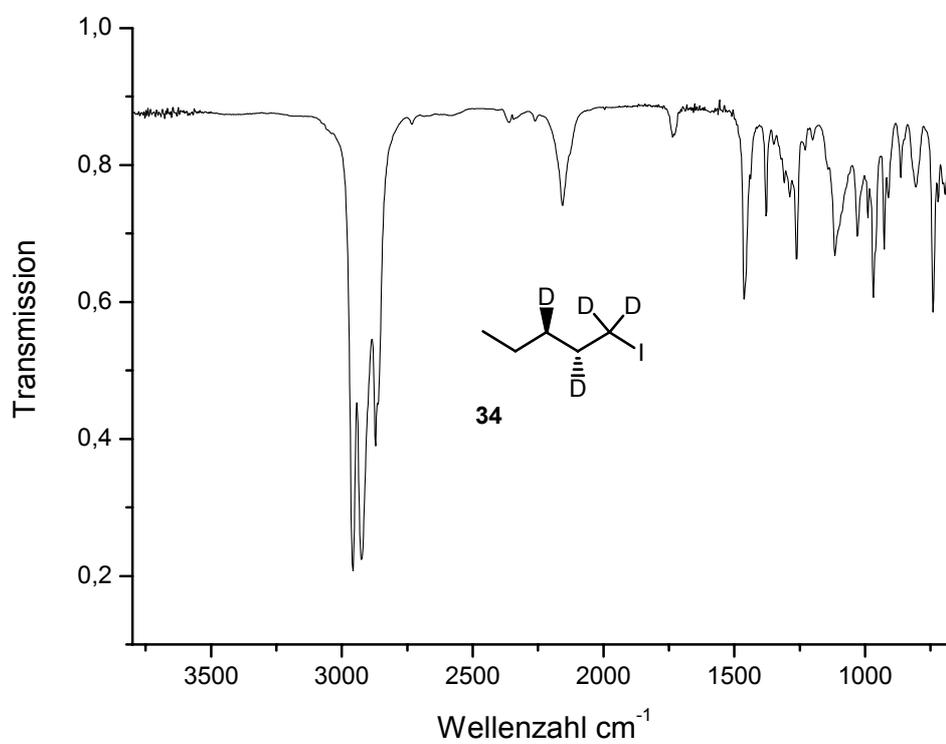
(2R,3S)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (31)



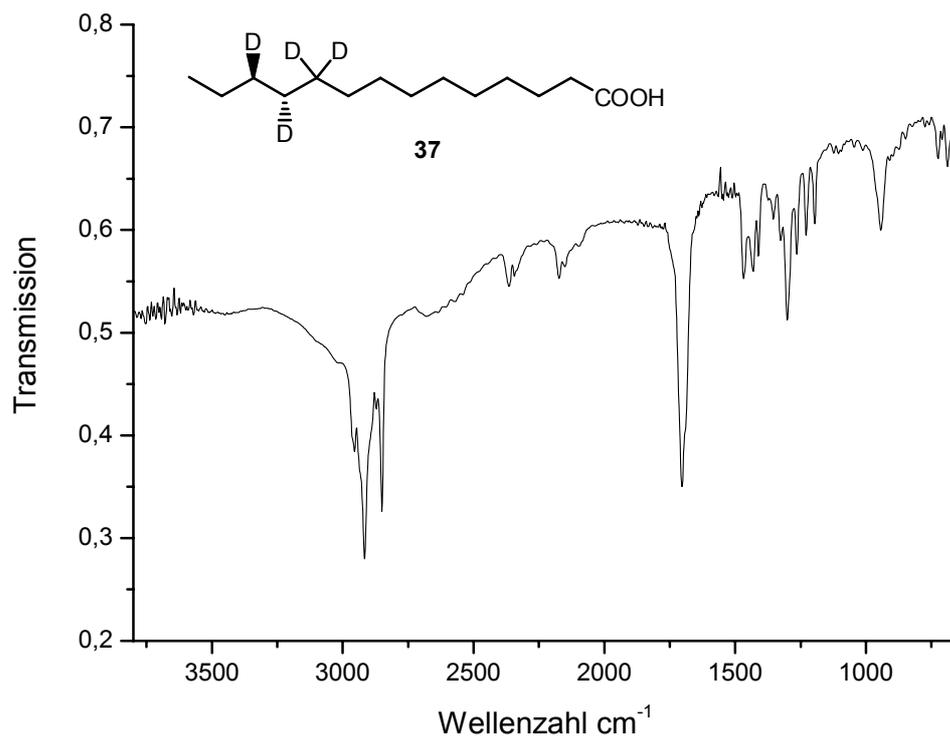
(2R,3R)-[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (32)



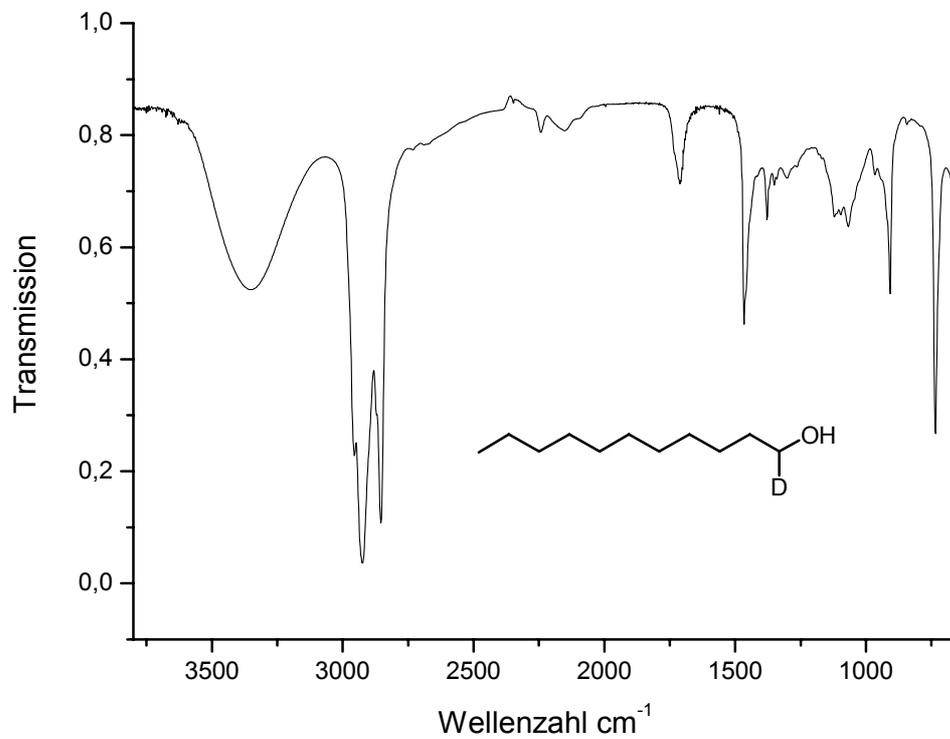
(2R, 3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**)



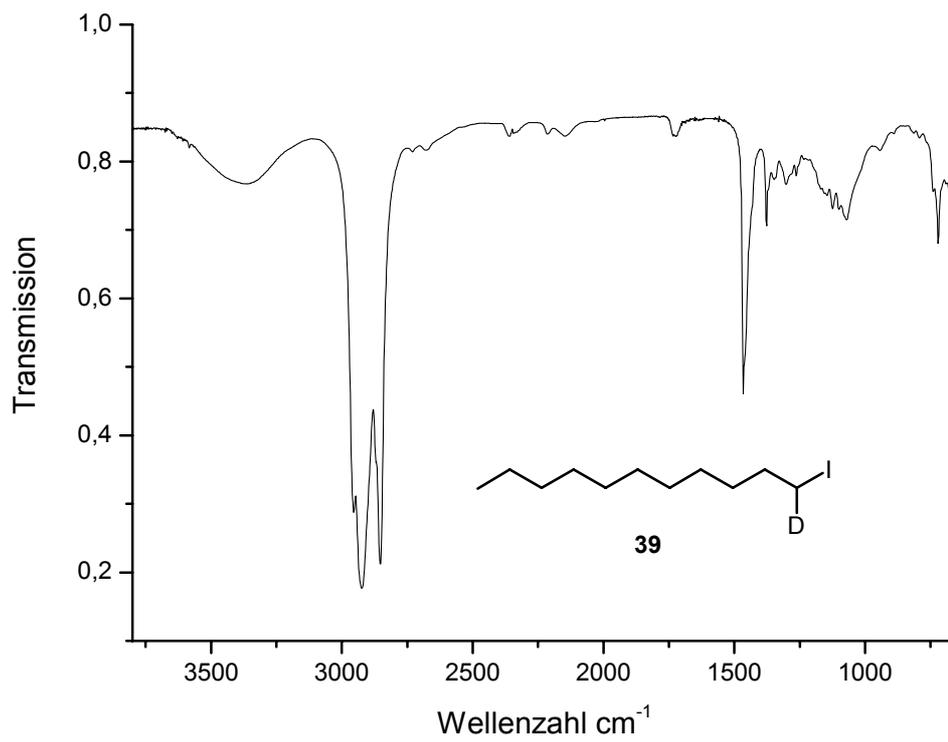
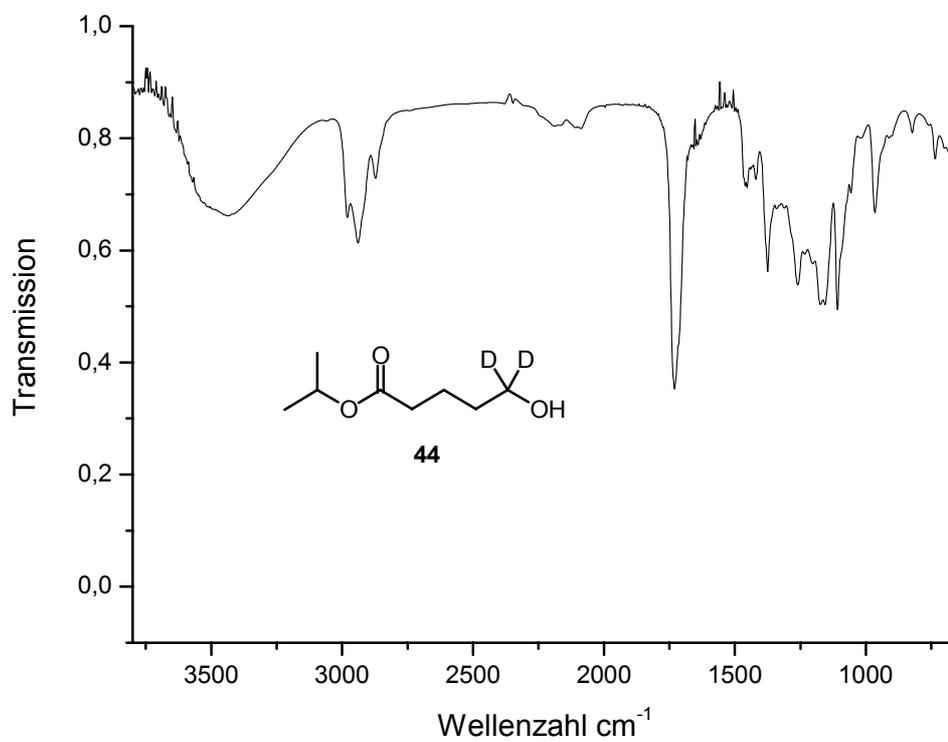
(2R, 3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyl iodid (**34**)

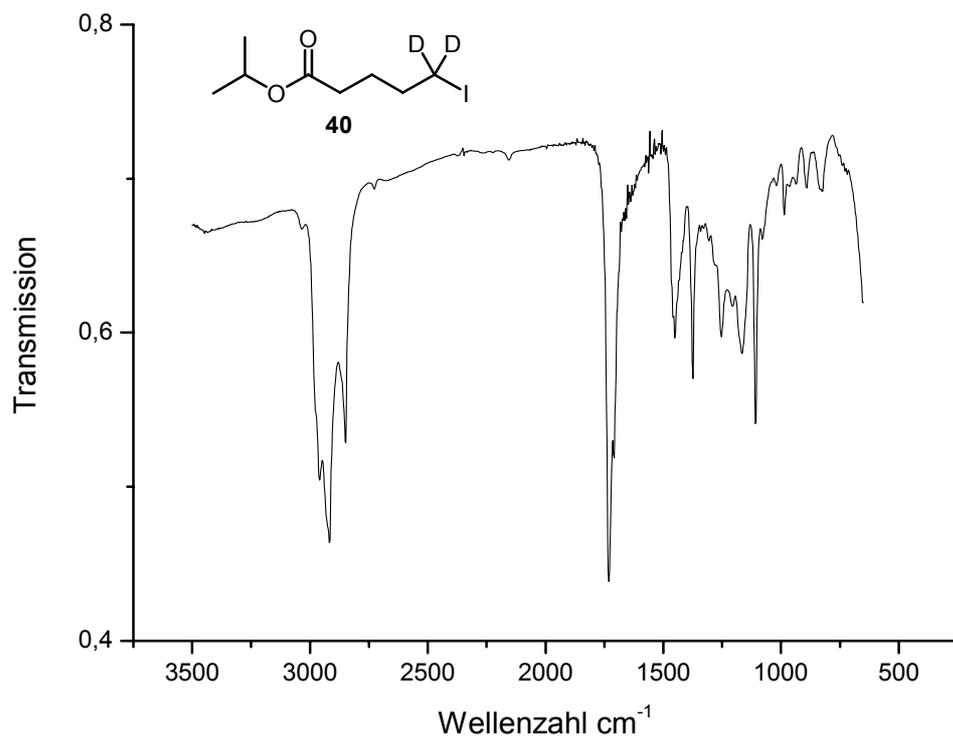


(11R,12R)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**)

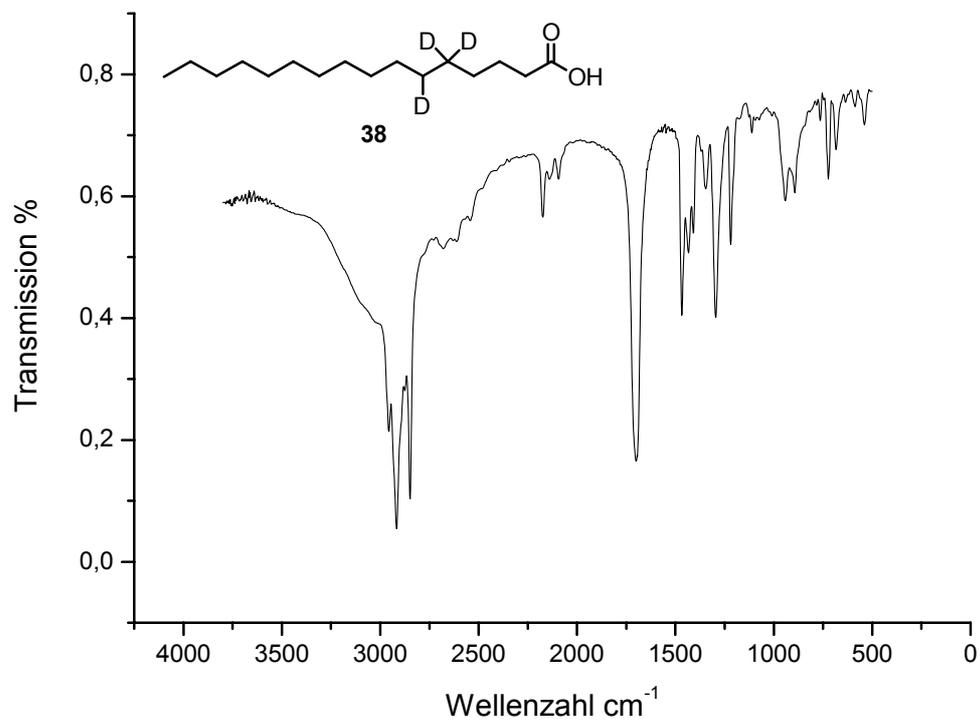


[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecanol

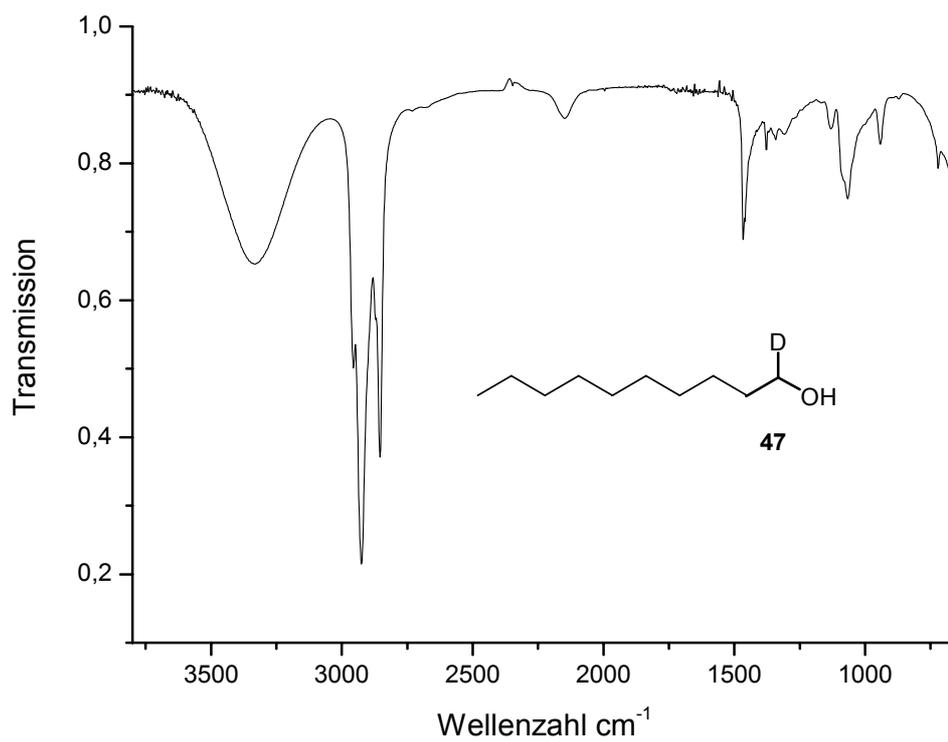
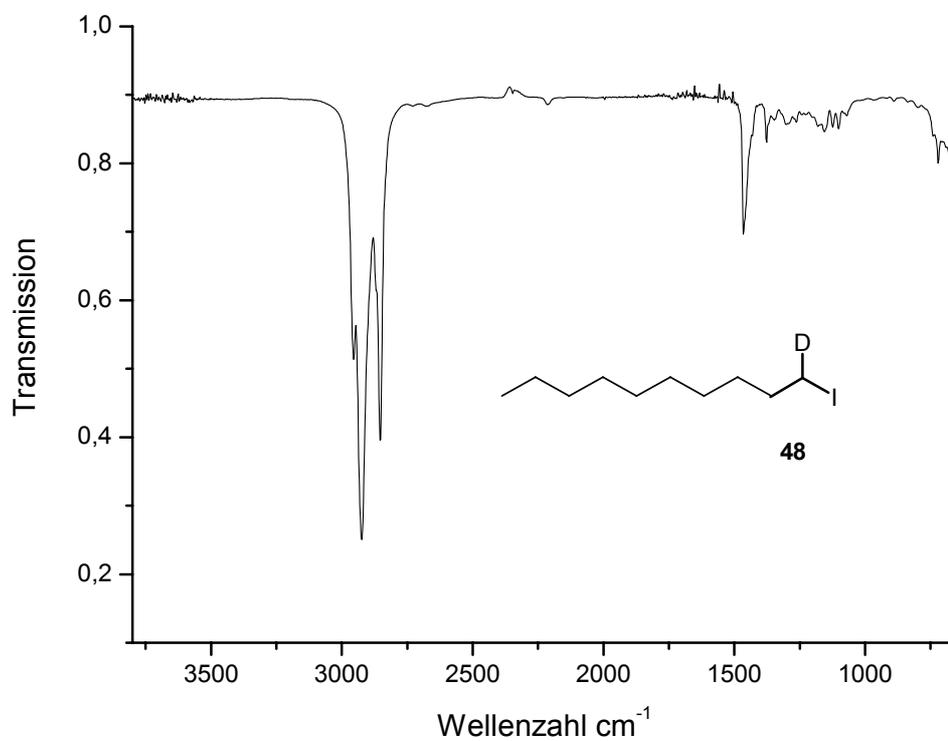
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecyliodid (**39**)[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (**44**)

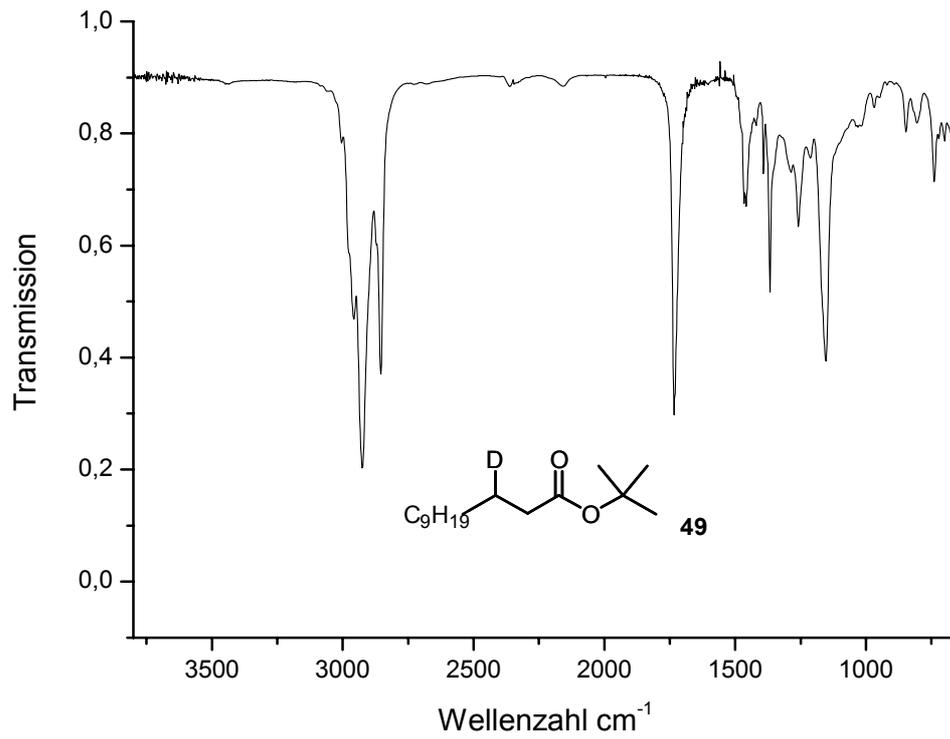
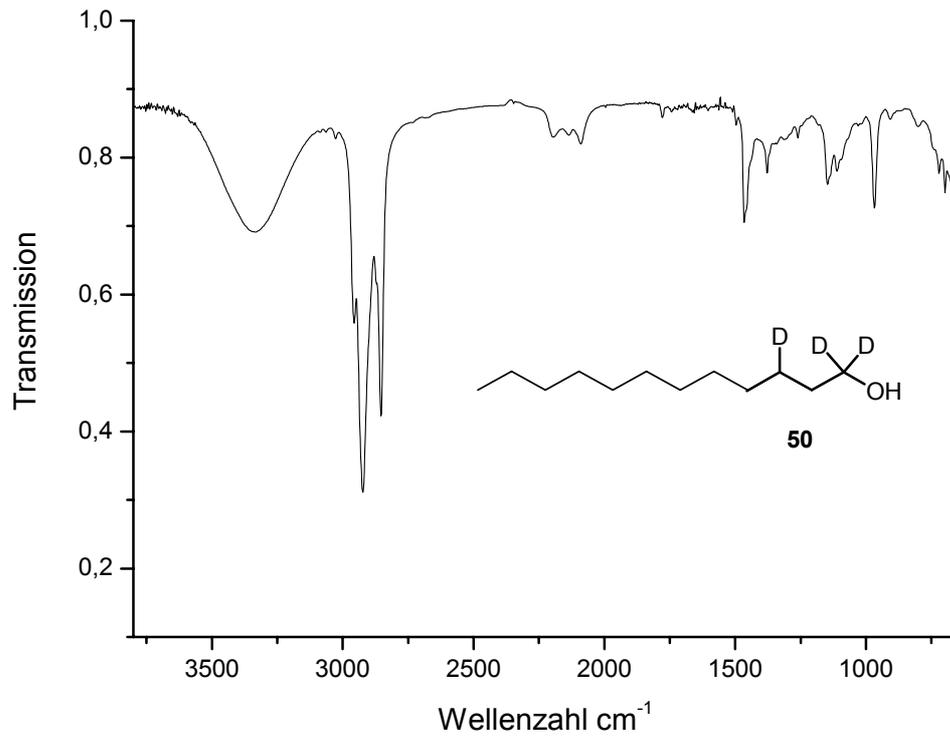


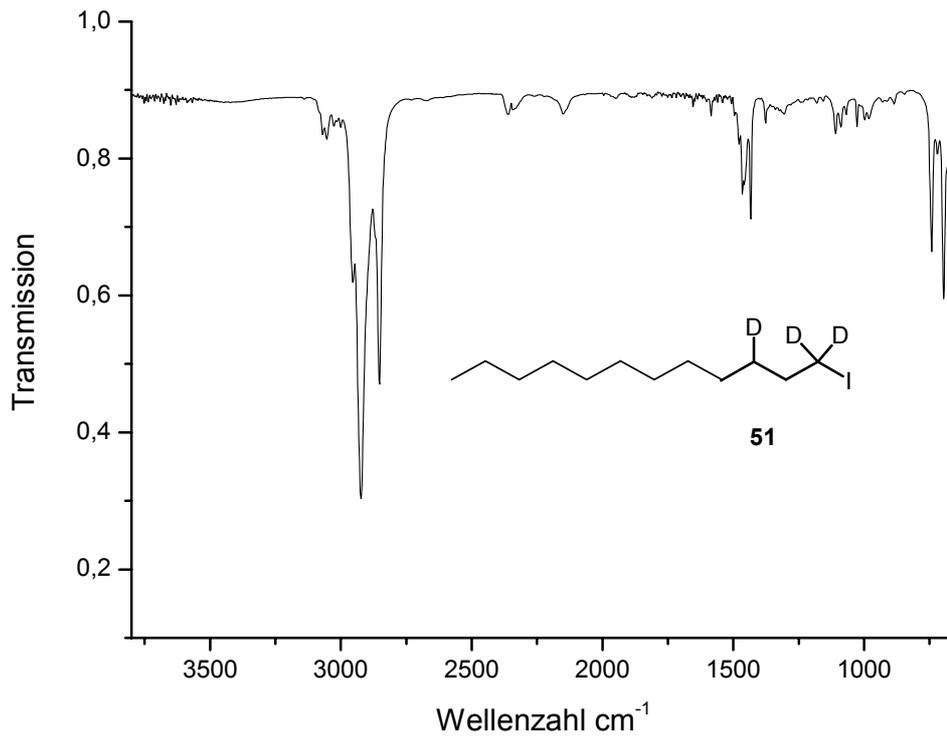
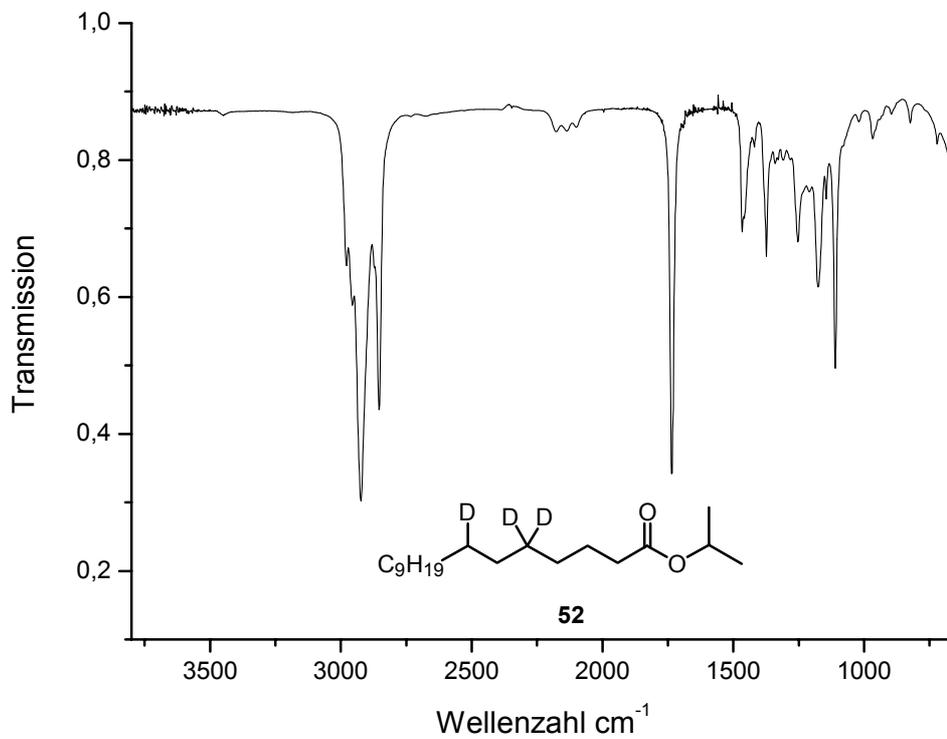
[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Iodopentansäureisopropylester (**40**)

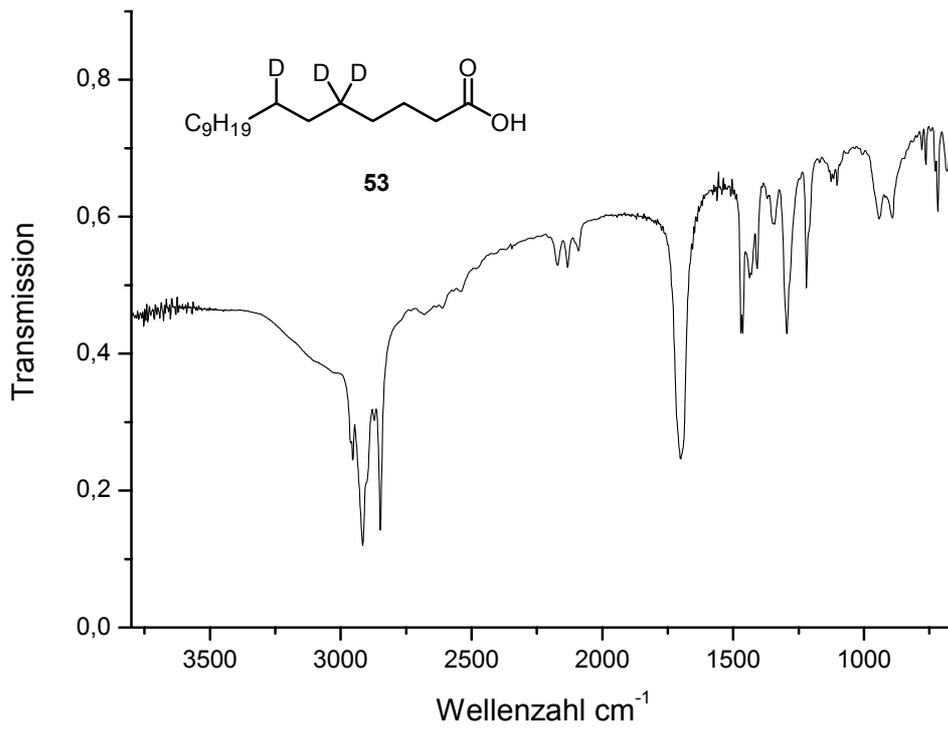


*rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**)

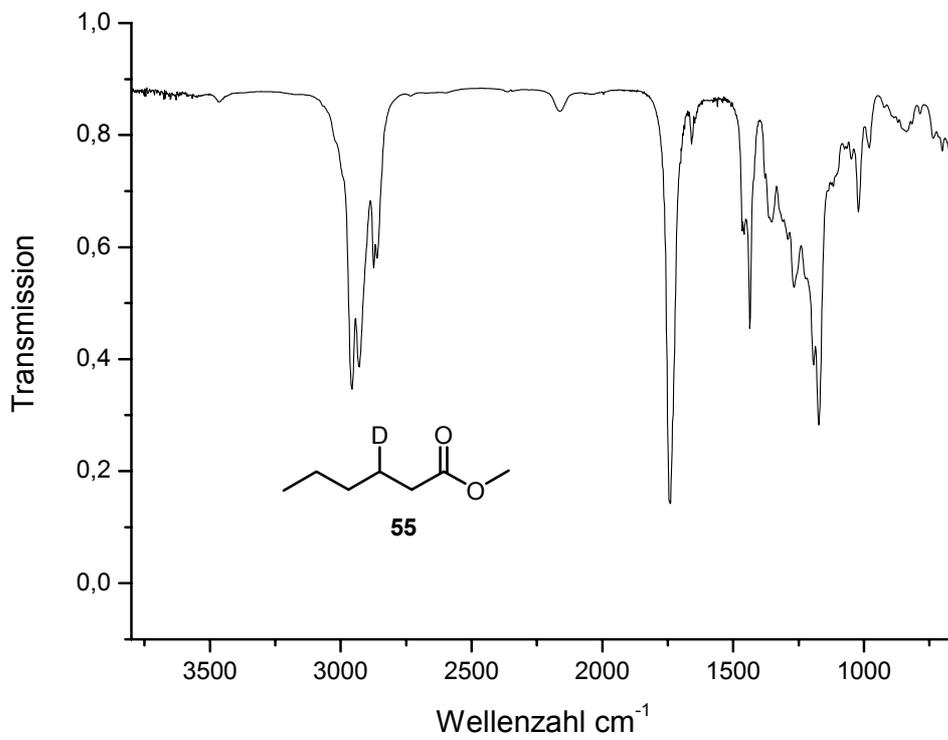
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decanol (**47**)[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decylidid (**48**)

[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Dodecansäure-*tert*-butylester (**49**)[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (**50**)

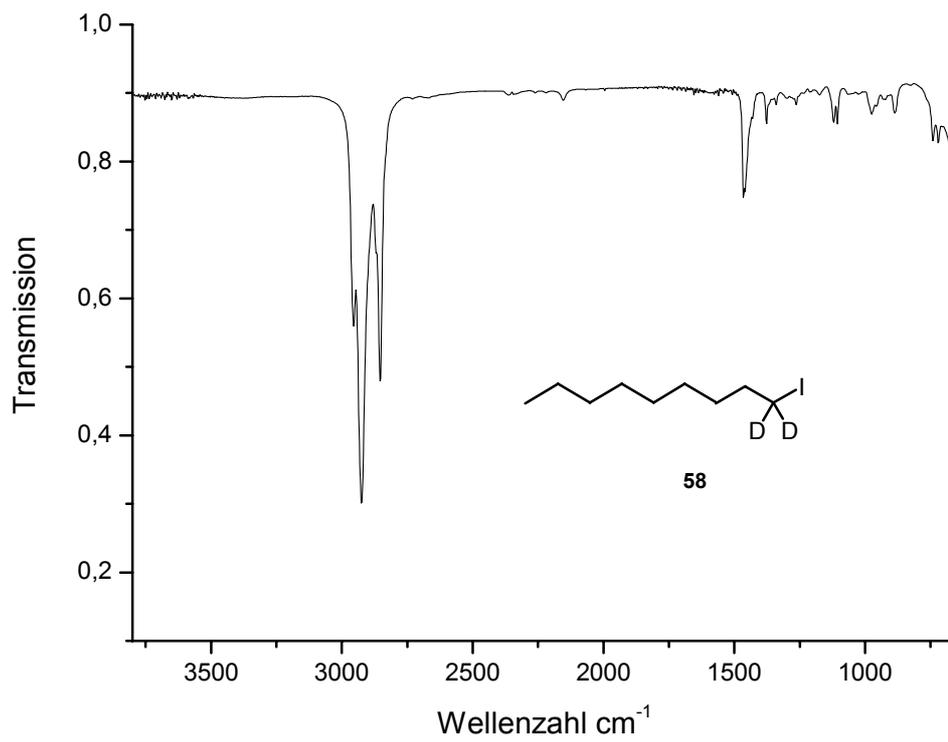
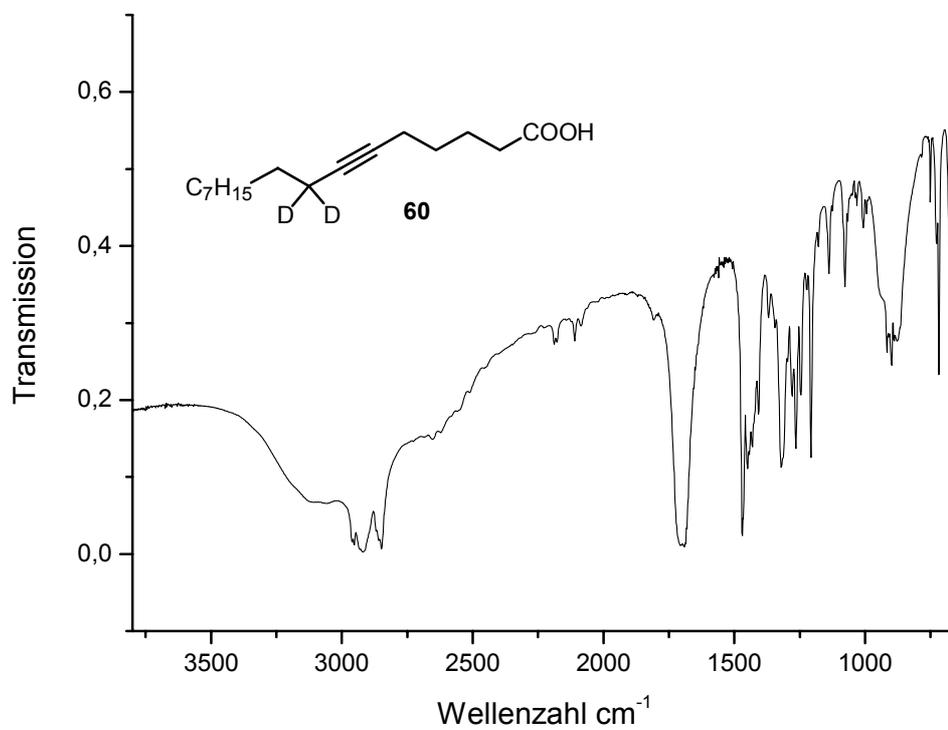
[1,1,3- $^2\text{H}_3$ ]-Dodecylidod (51)*rac*-[5,5,7- $^2\text{H}_3$ ]-Hexadecansäureisopropylester (52)

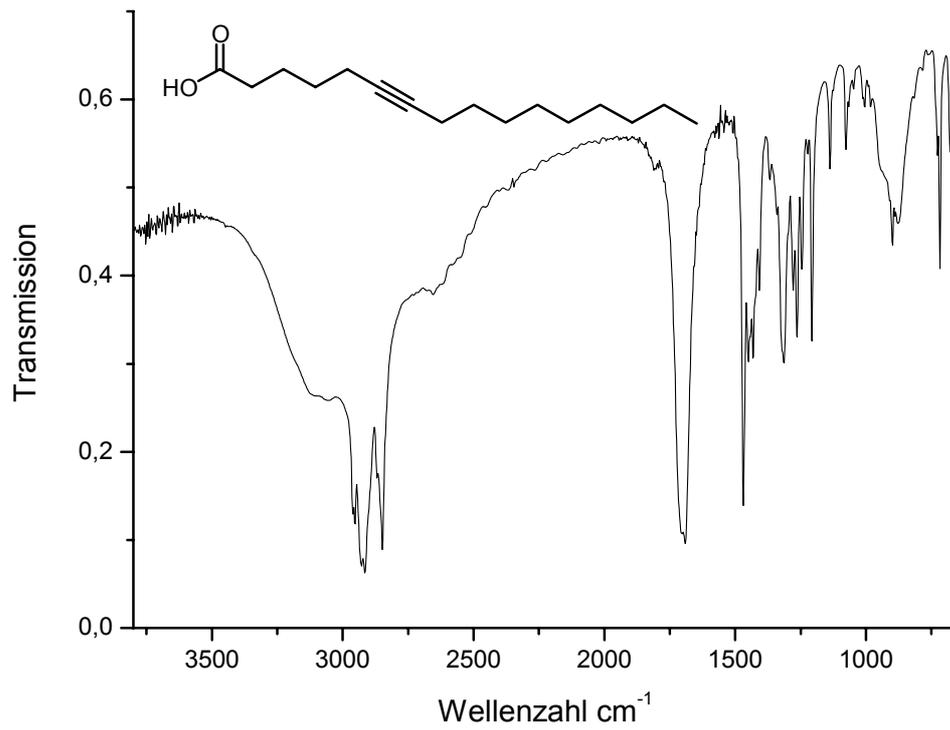


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**)

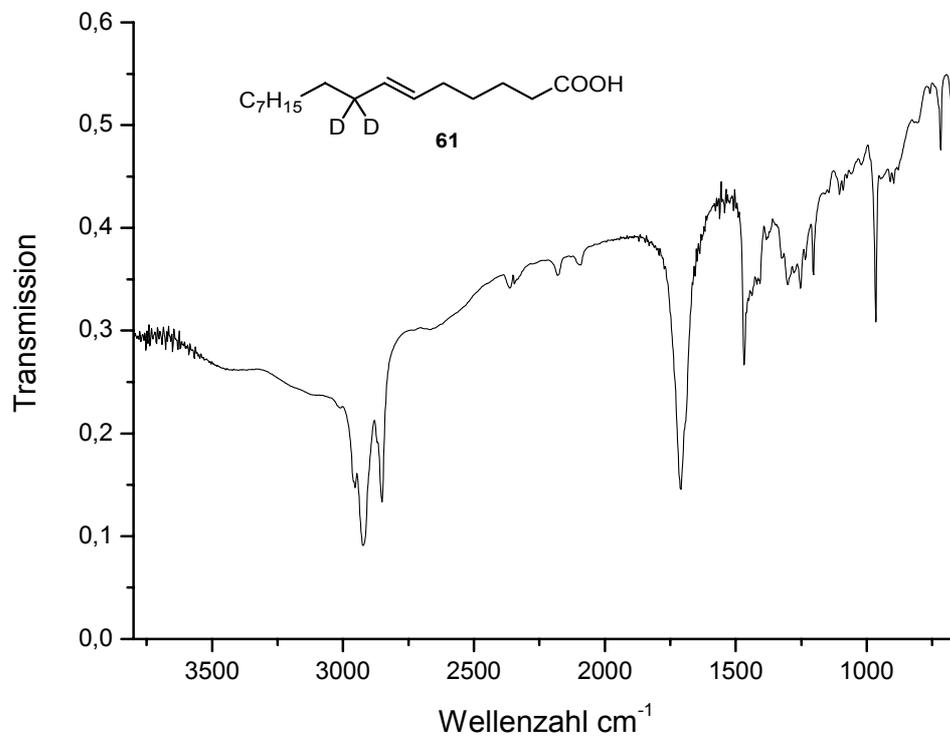


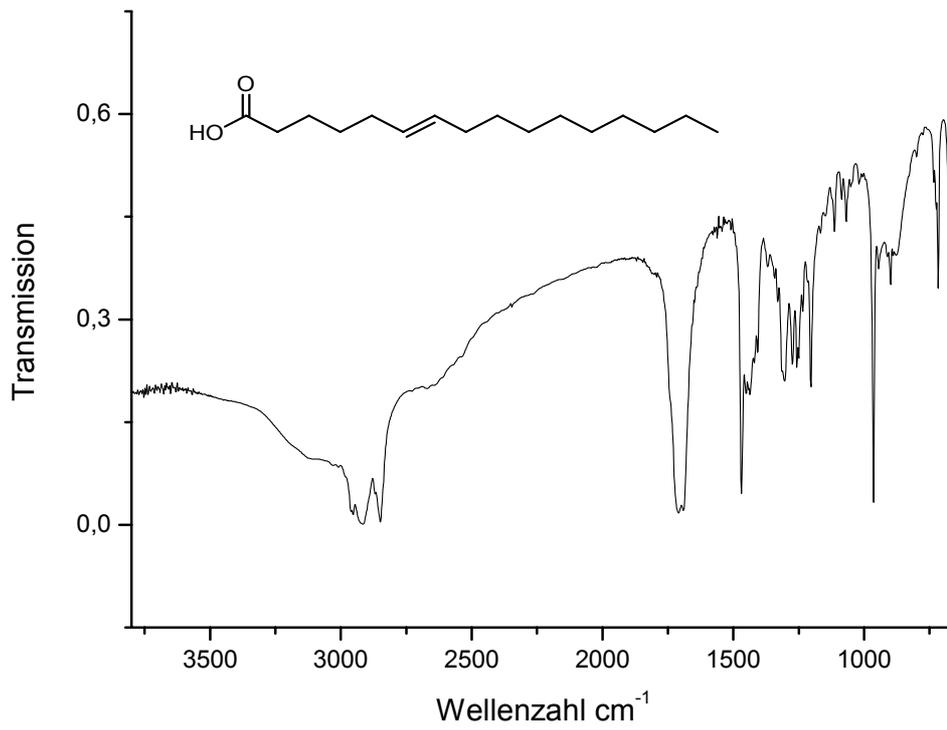
[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Hexansäuremethylester (**55**)

[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Iodnonan (**58**)[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-insäure (**60**)

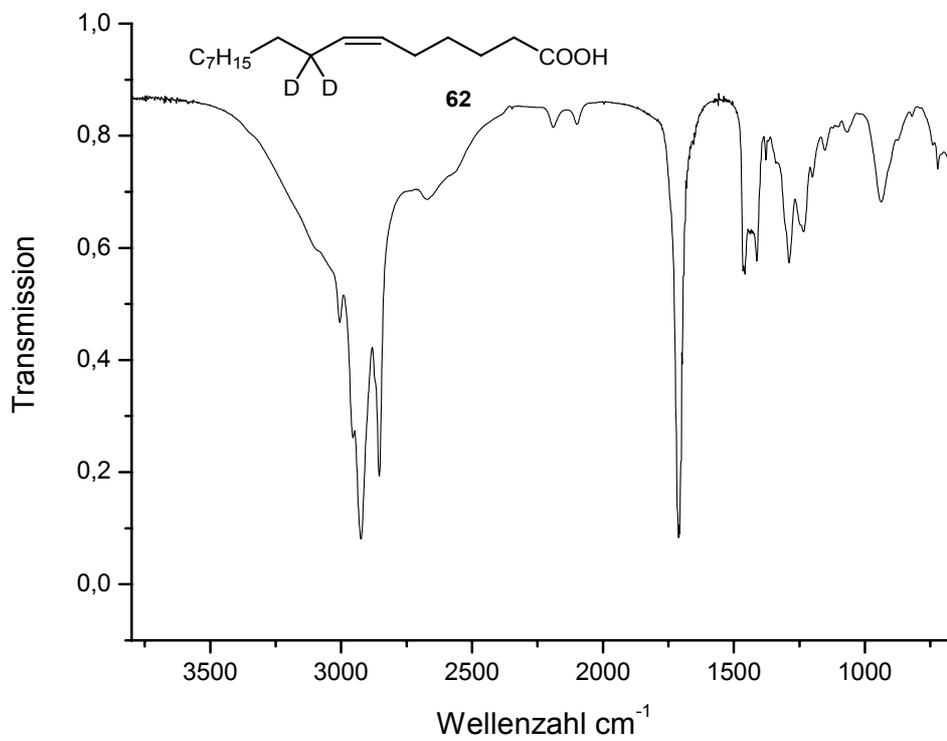


Hexadec-6-insäure

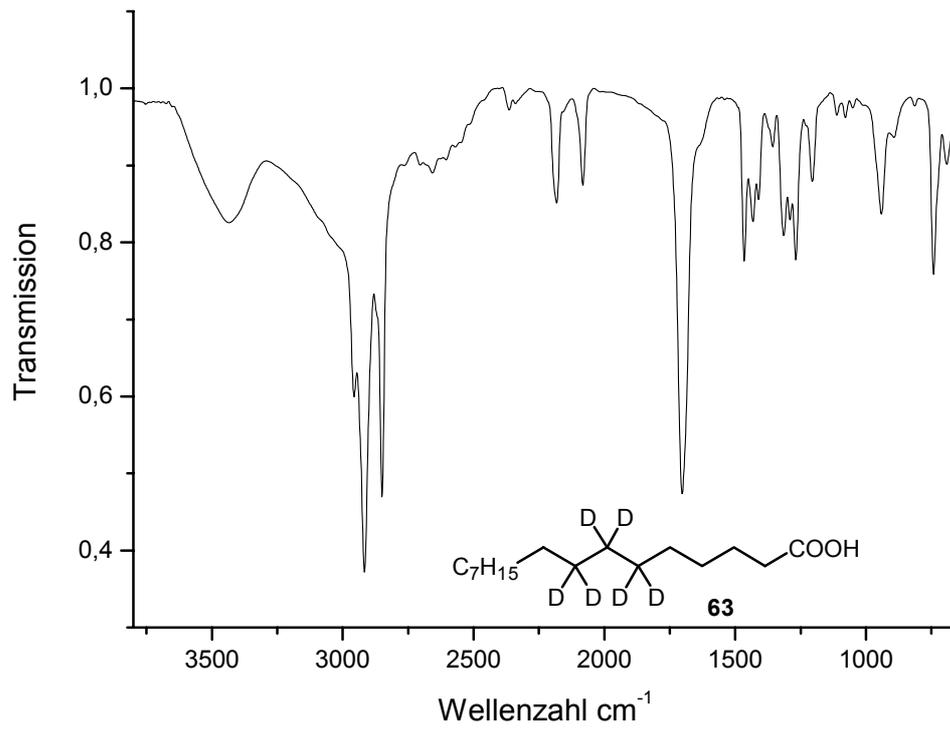
*(E)*-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**)



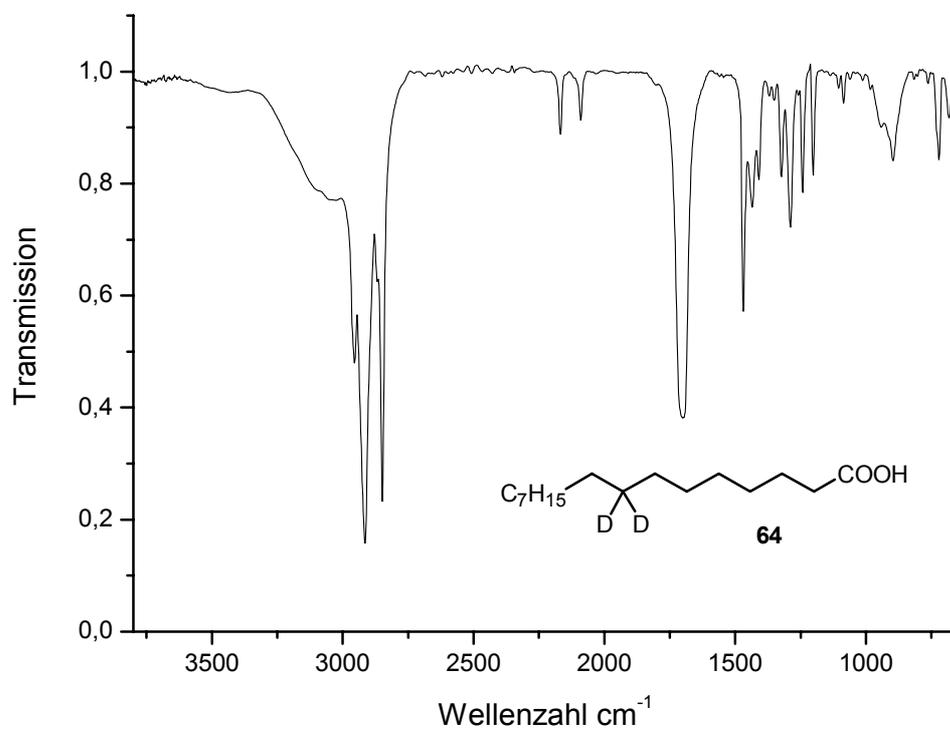
(E)-Hexadec-6-ensäure (**139**)



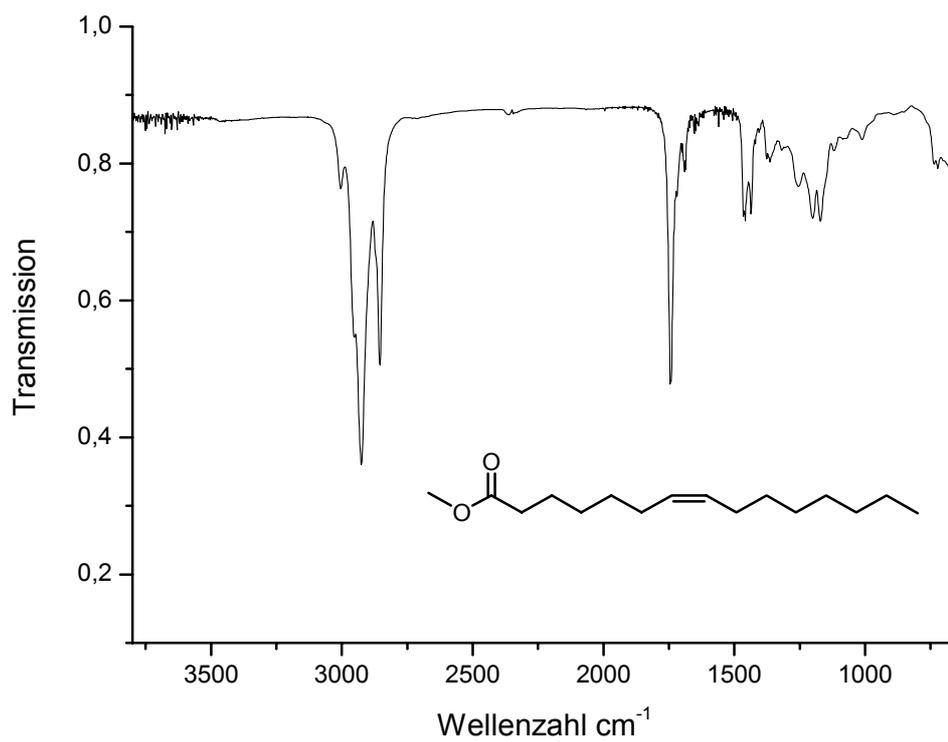
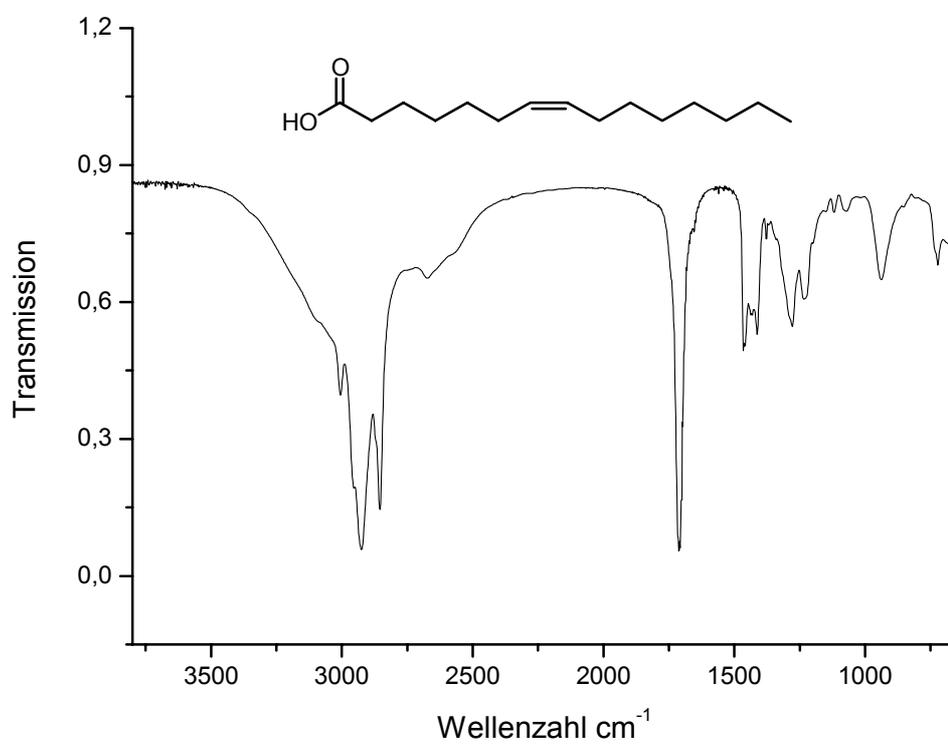
(6Z)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**)

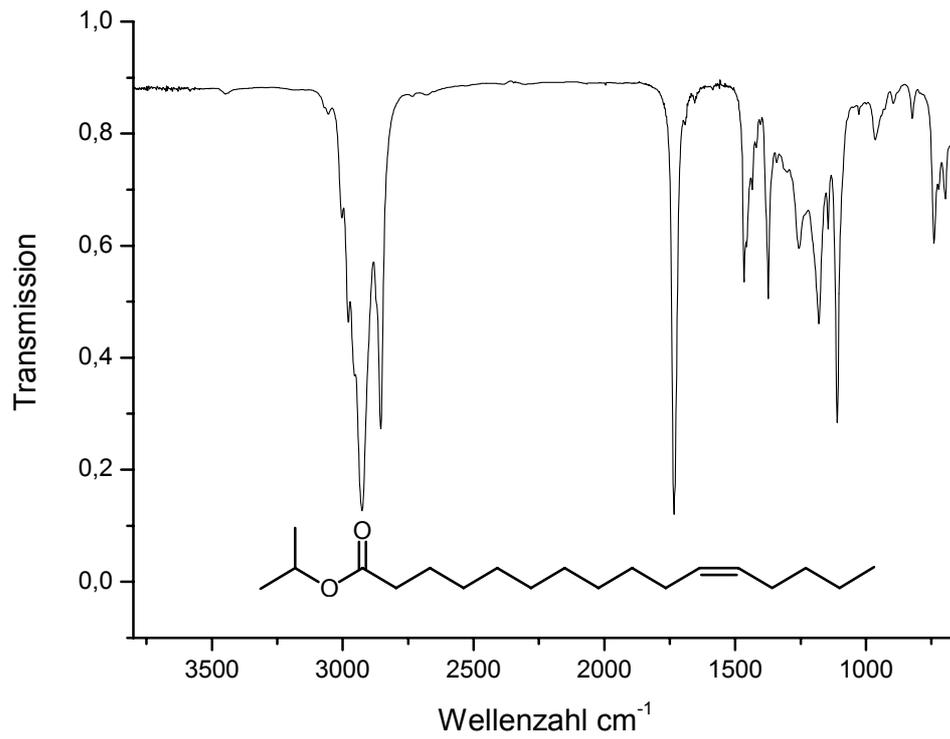


[6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecansäure (**63**)

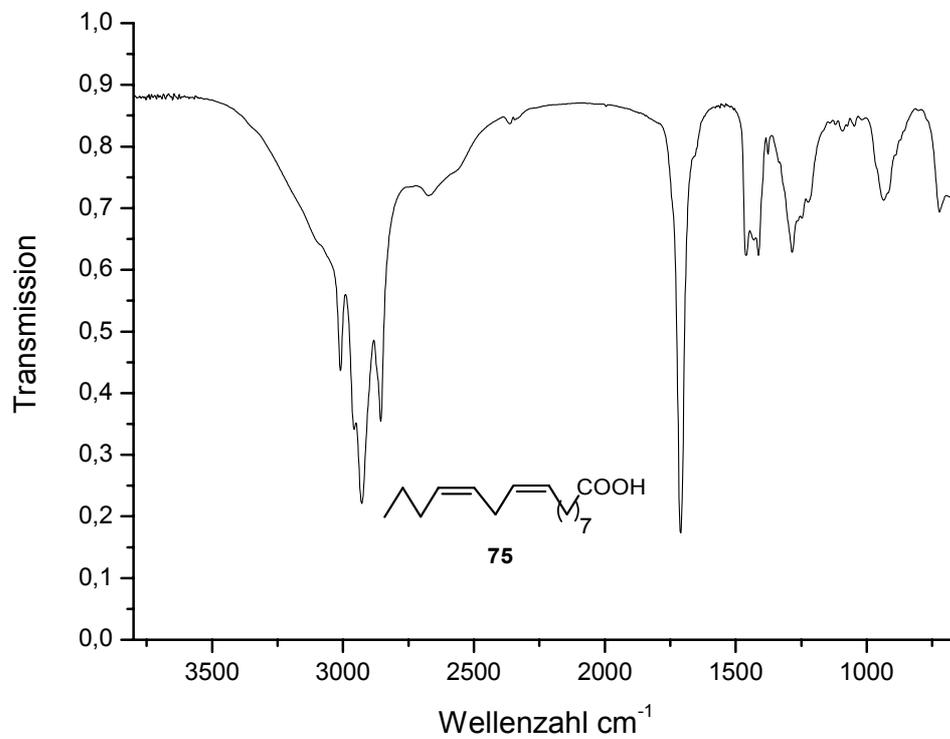


[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**64**)

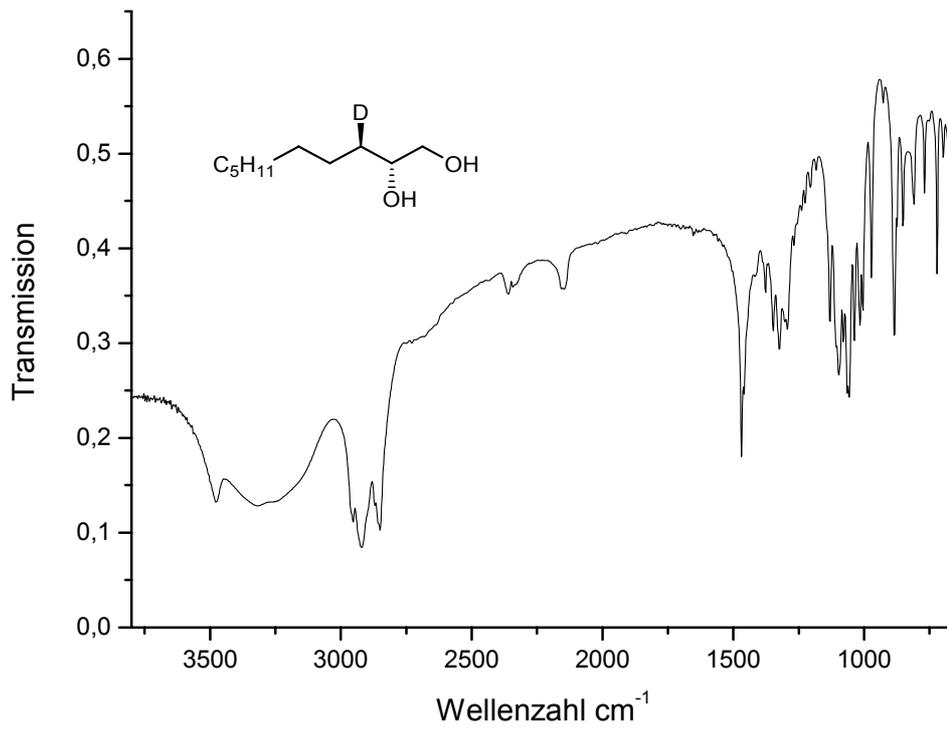
(7Z)-Hexadec-7-ensäuremethylester (**67a**)(7Z)-Hexadec-7-ensäure (**67b**)



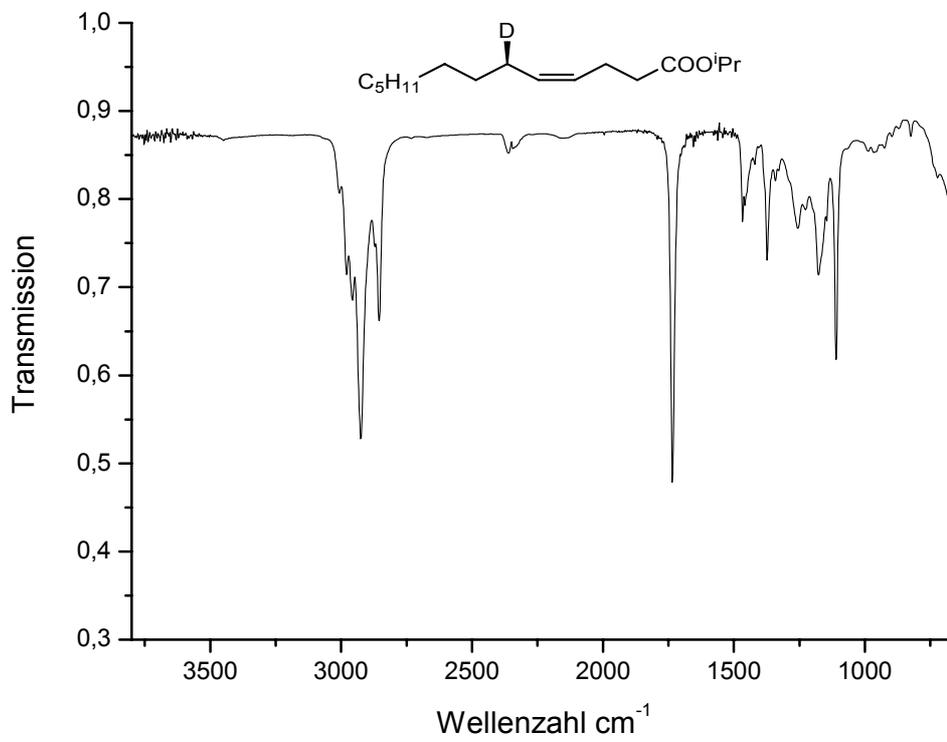
(Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (**70**)



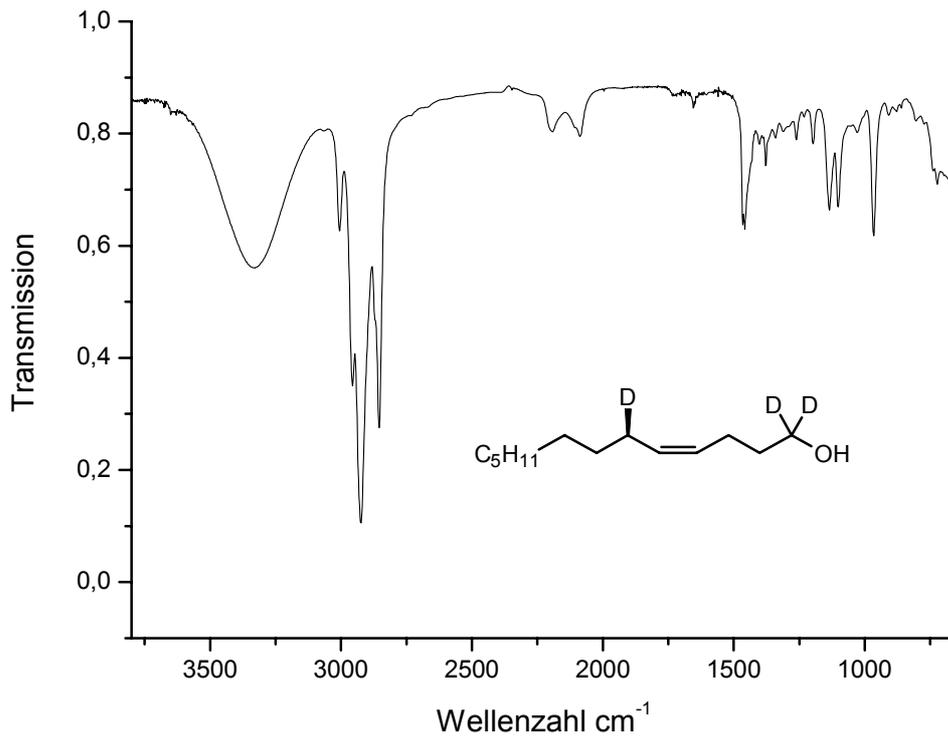
(9Z,12Z)-Hexadec-9,12-diensäure (**75**)



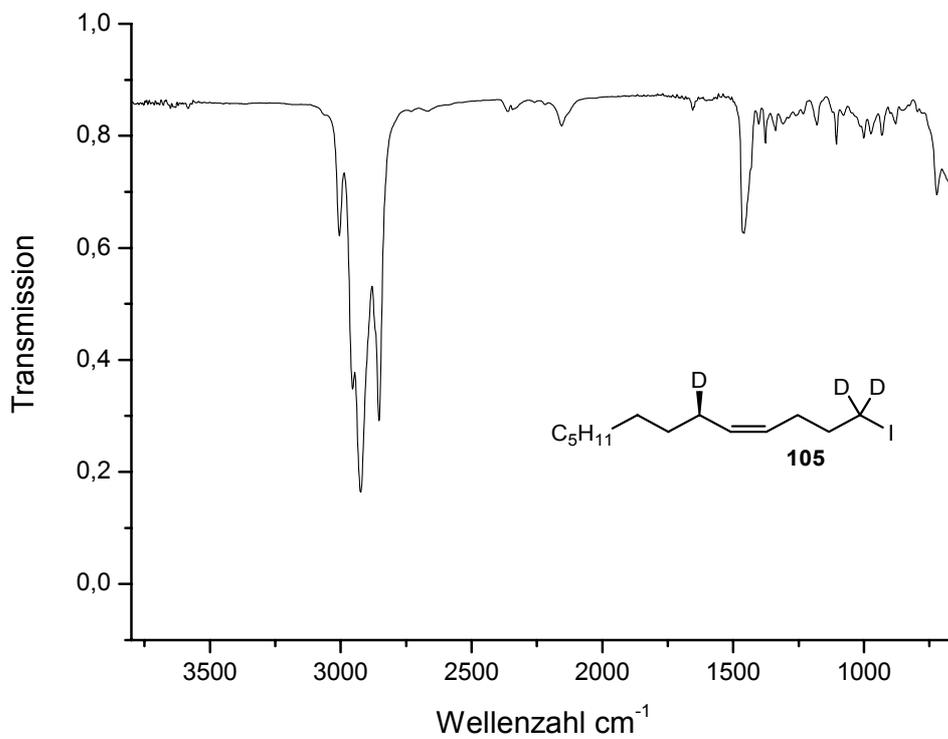
(2R,3R)-[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decan-1,2-diol (**101**)



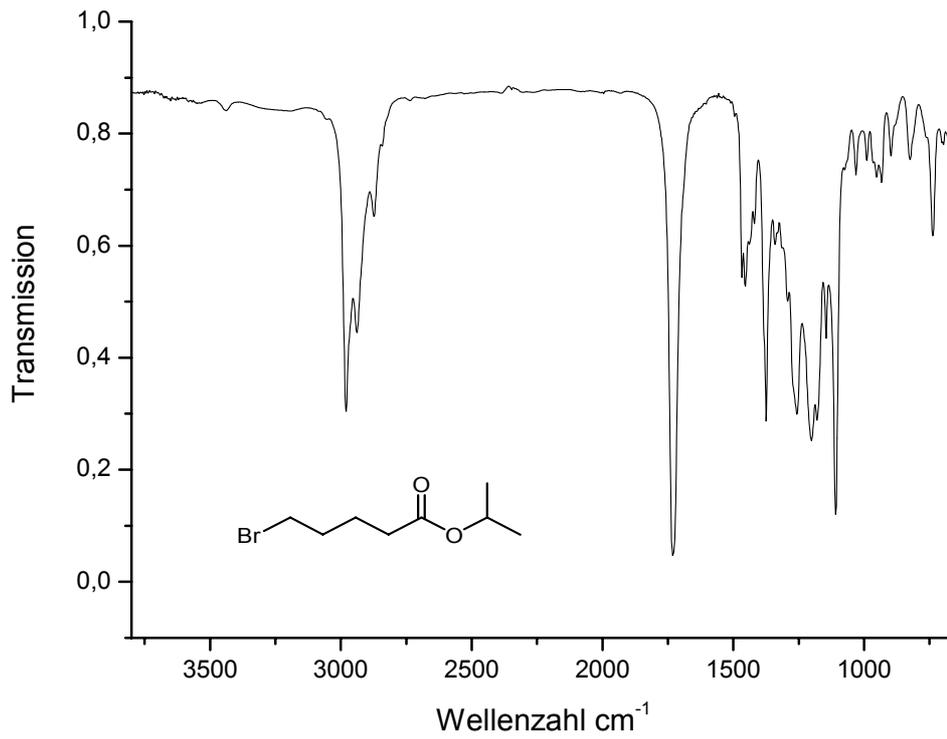
(6R)-[6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Tridec-4-ensäureisopropylester (**103**)



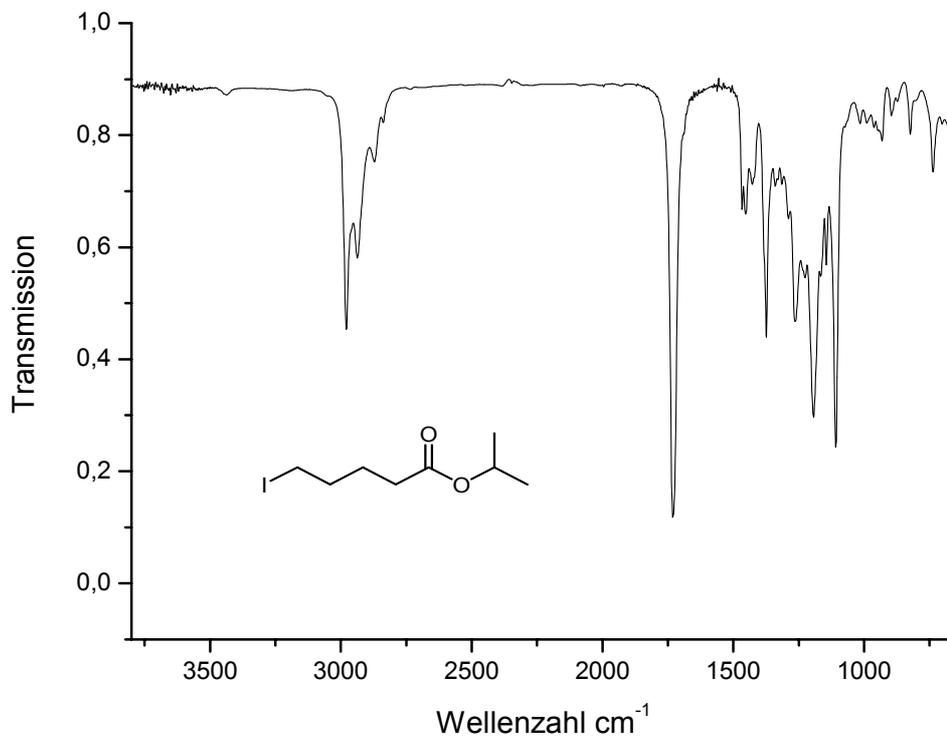
(6R)-[1,1,6- $^2\text{H}_3$ ]-Tridec-4-en-1-ol (**104**)



(6R)-[1,1,6- $^2\text{H}_3$ ]-1-iod-tridec-4-en (**105**)



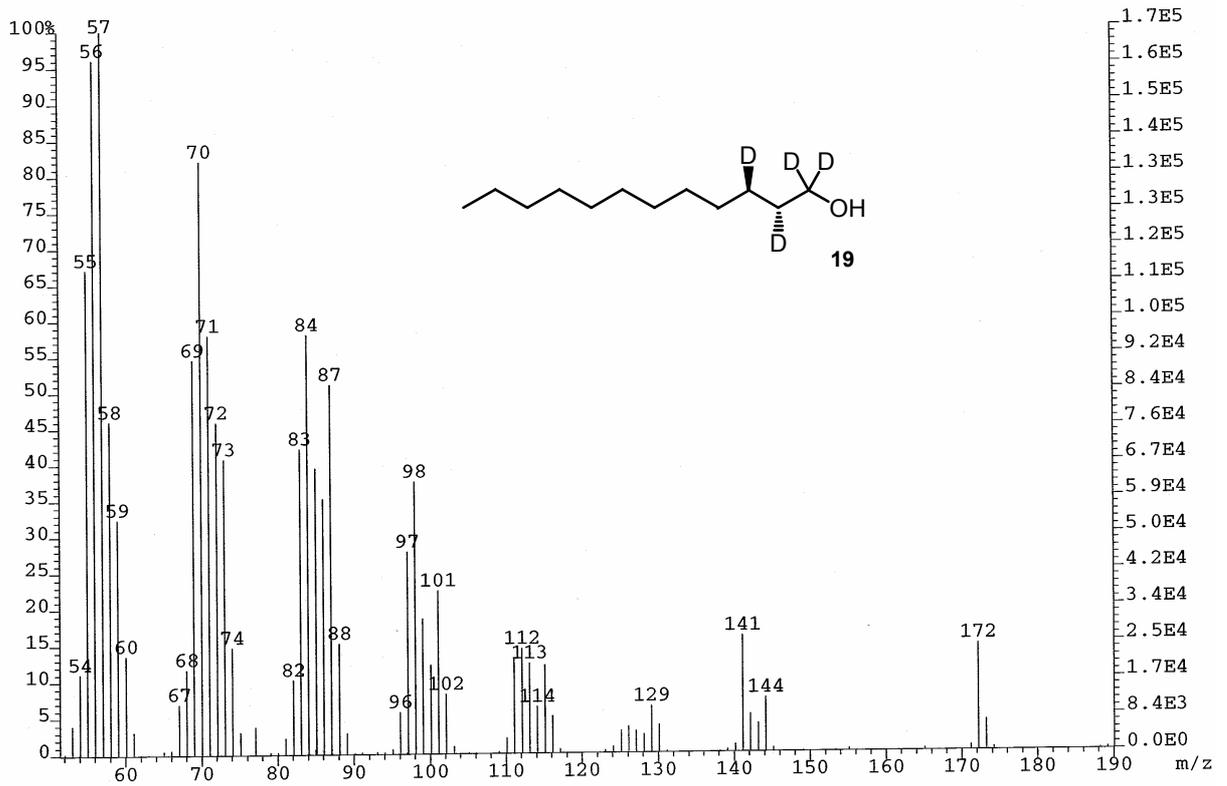
5-Bromvaleriansäureisopropylester



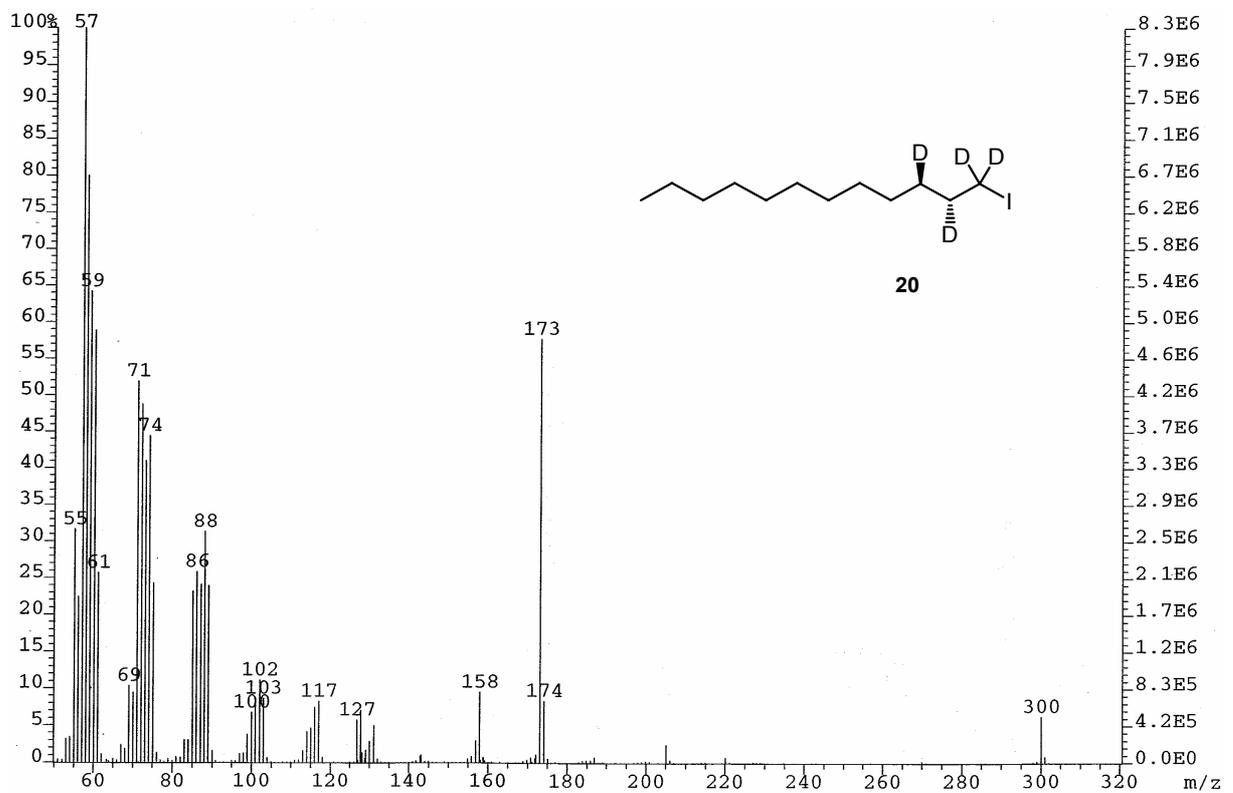
5-Iodvaleriansäureisopropylester



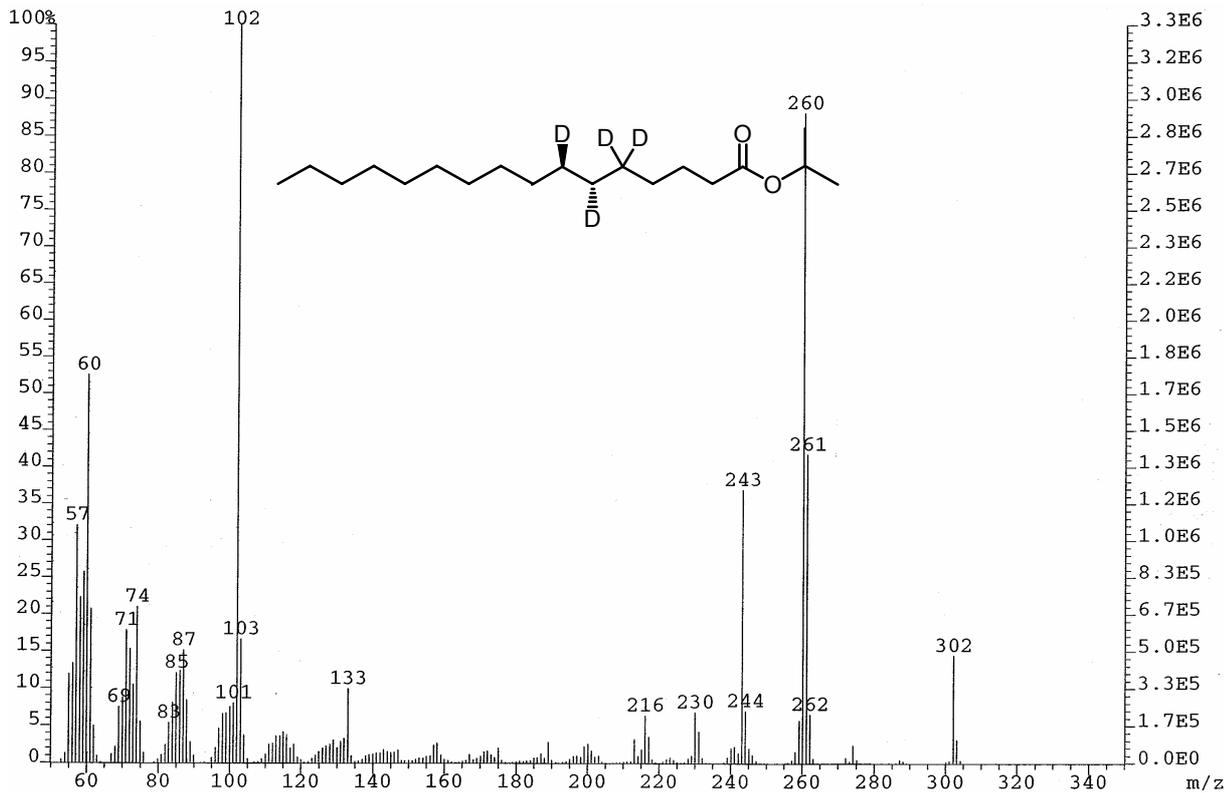
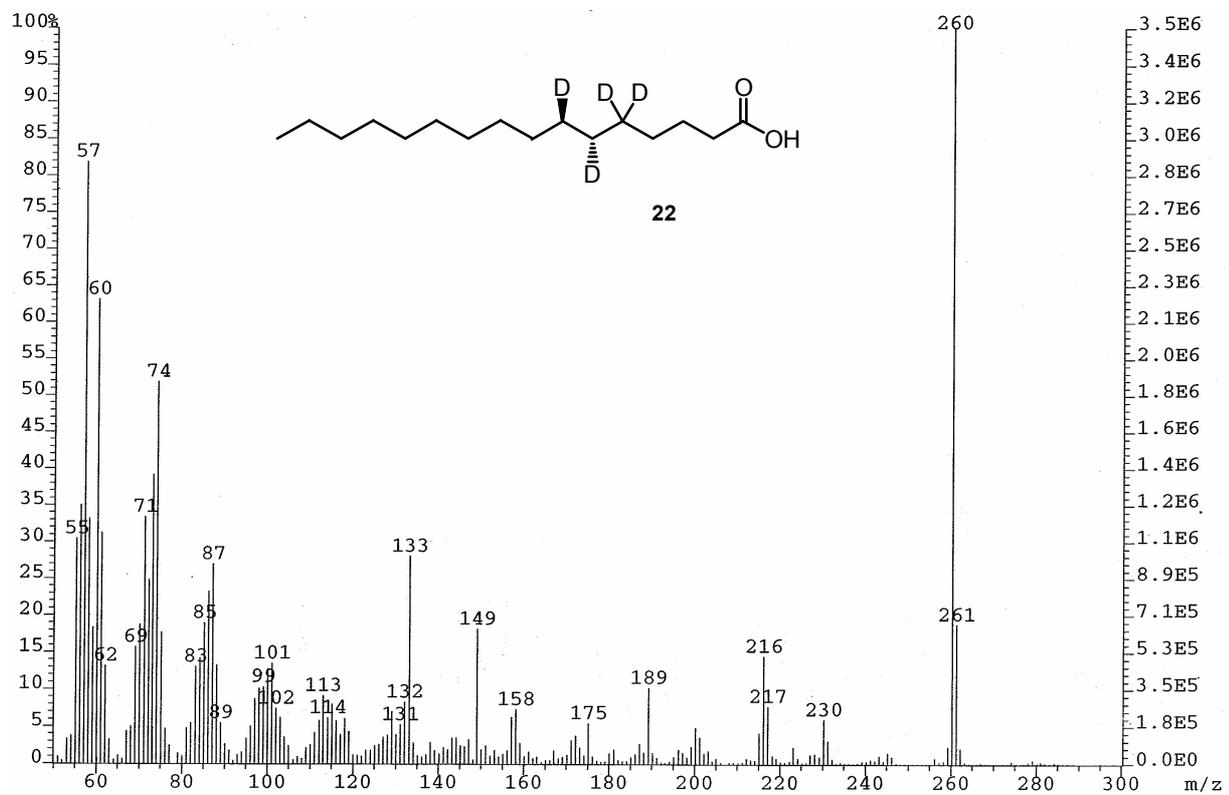
**MS-Spektren**

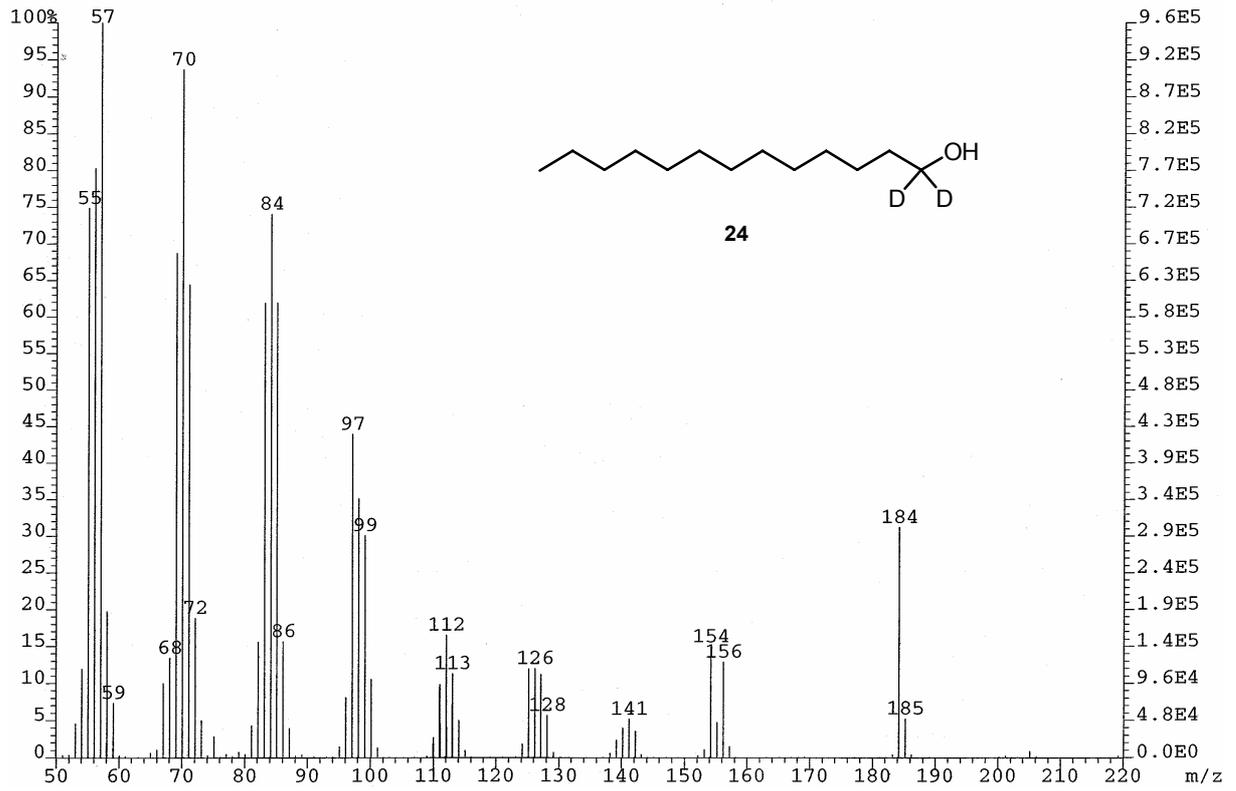


(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecanol (19)

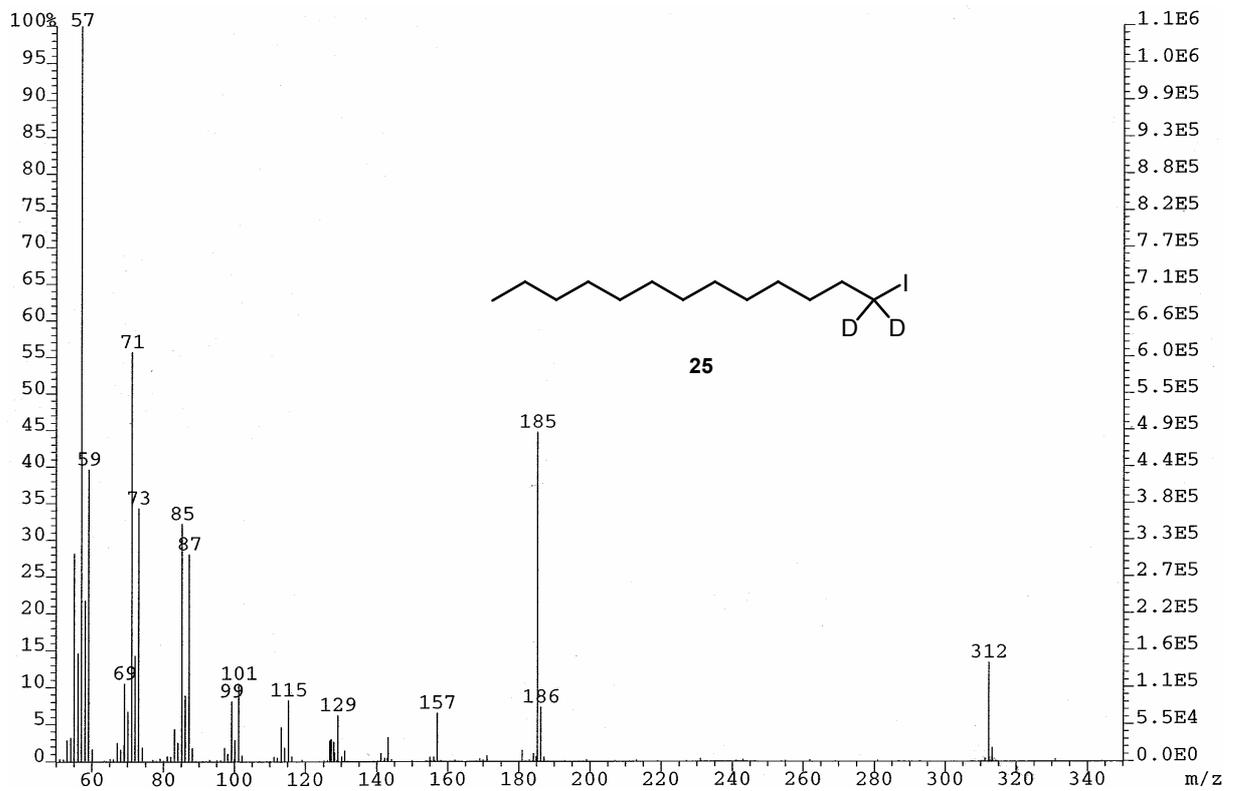


(2R,3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Dodecylidiodid (20)

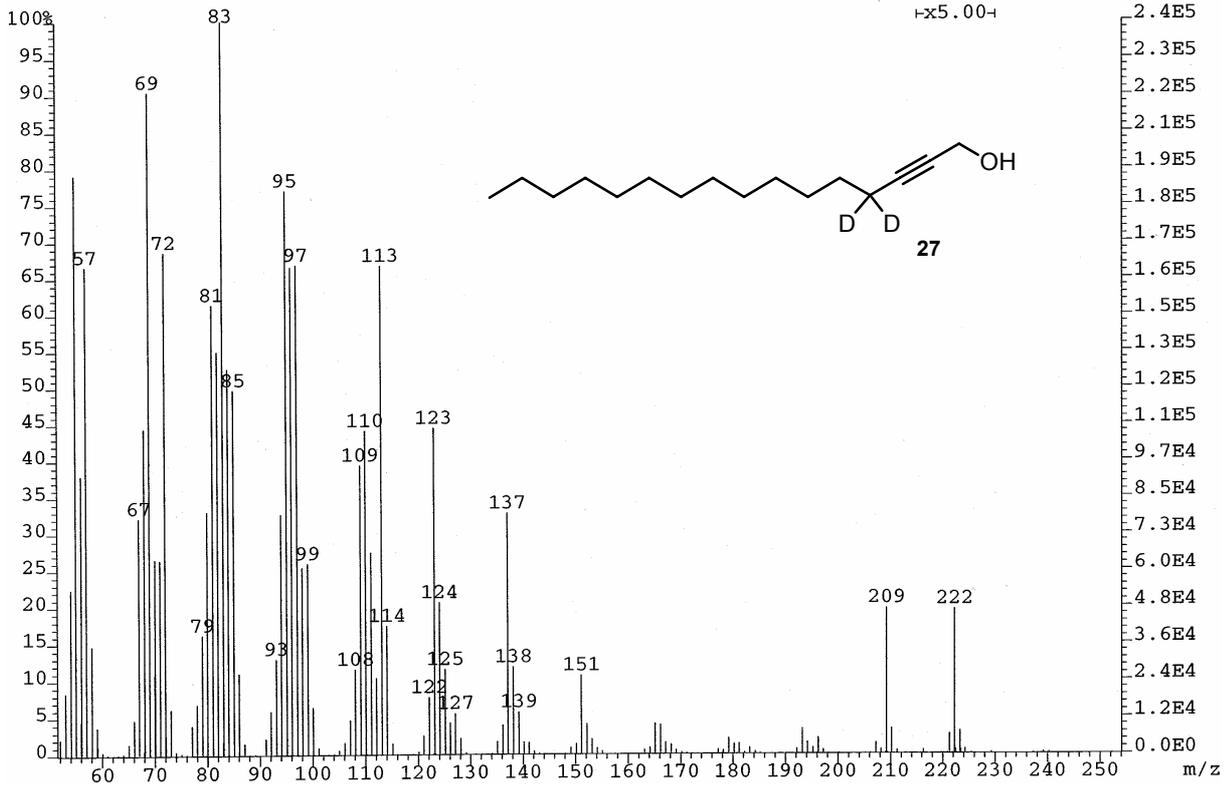
(6R,7R)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäureisopropylester(6R,7R)-[5,5,6,7-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (22)



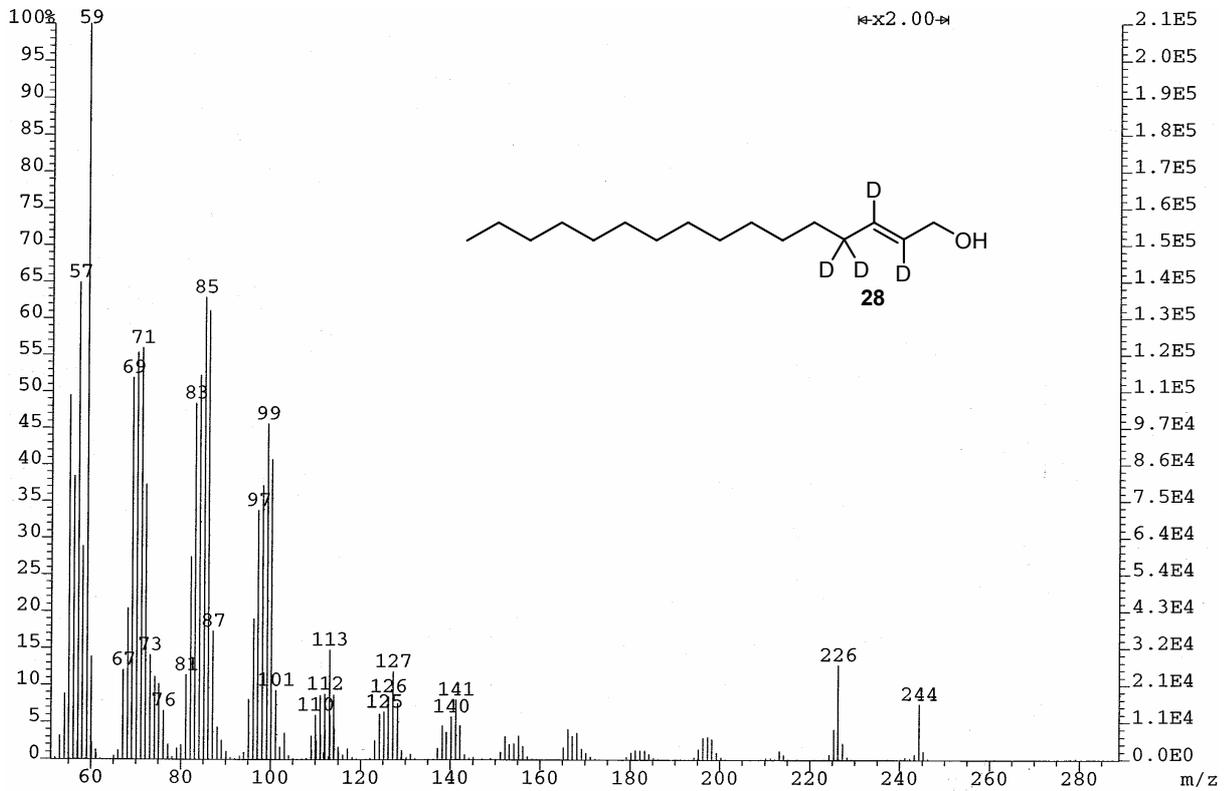
[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Tridecan-1-ol (**24**)



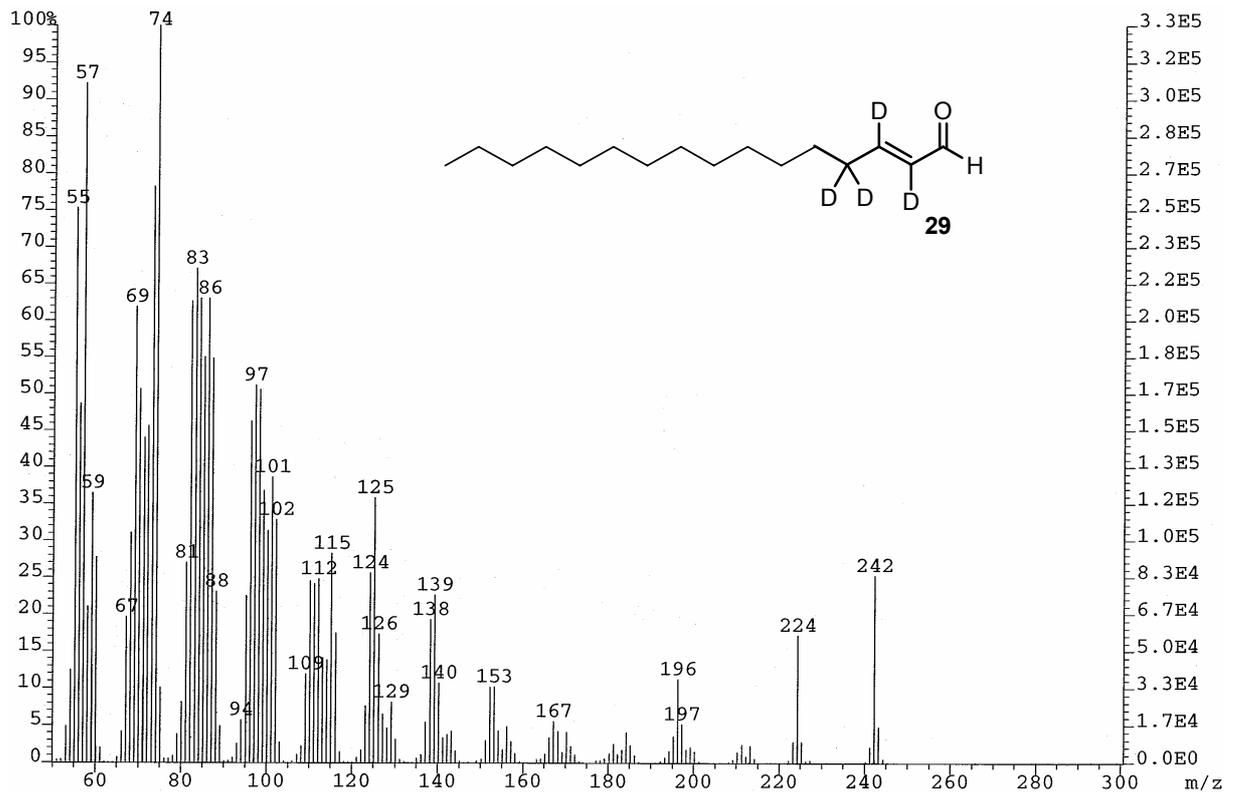
[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-1-Iodotridecan (**25**)



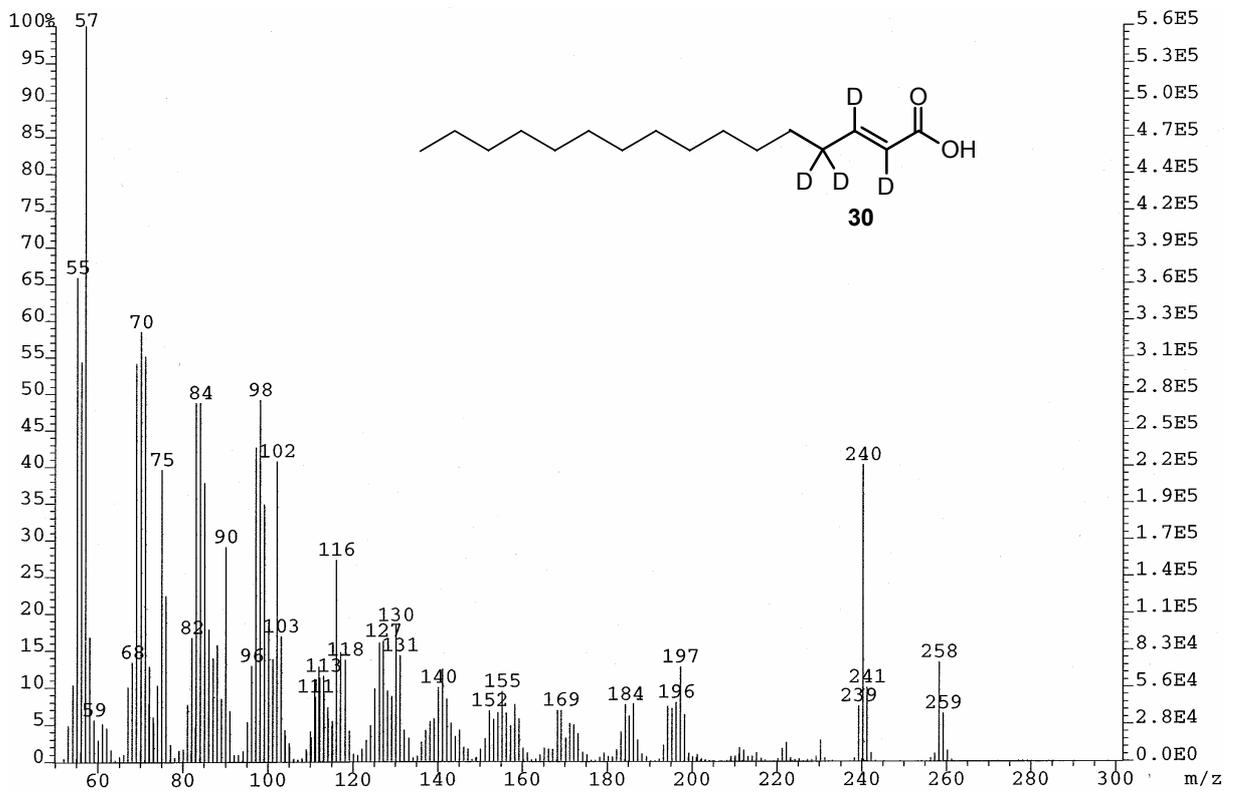
[4,4-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-2-in-1-ol (27)



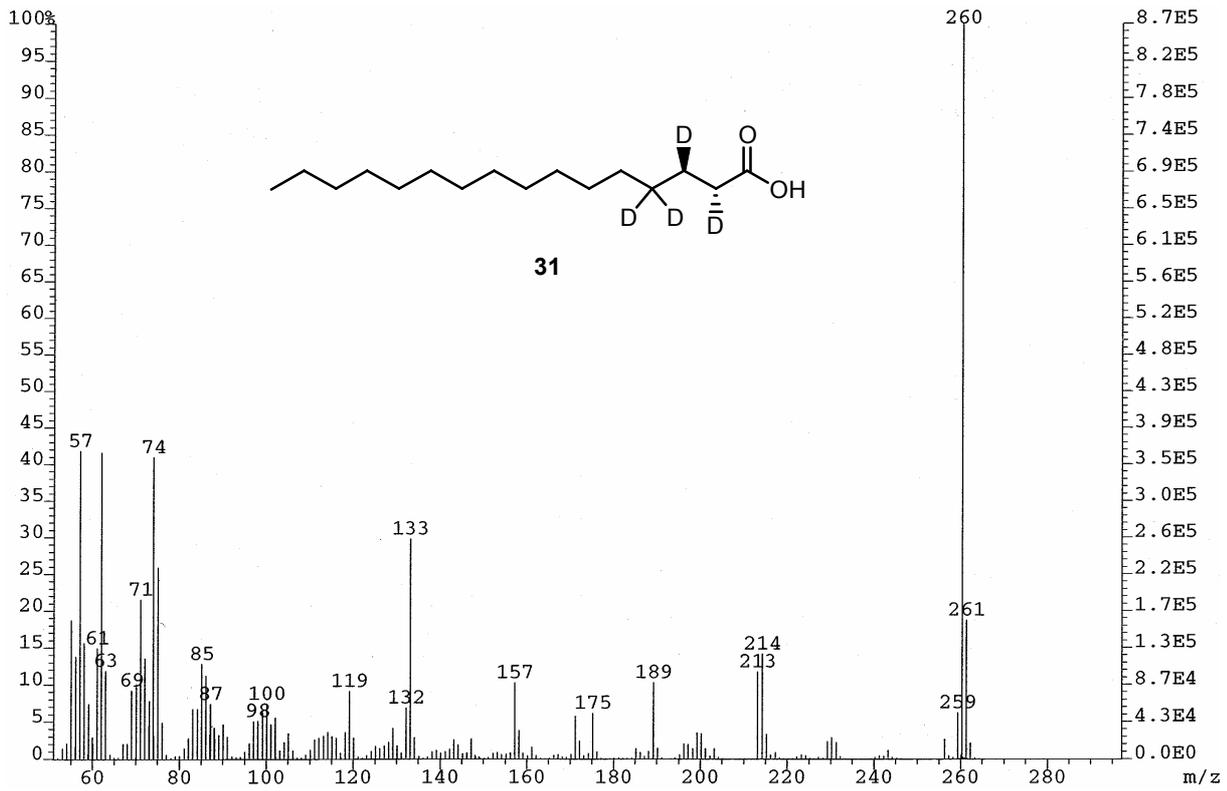
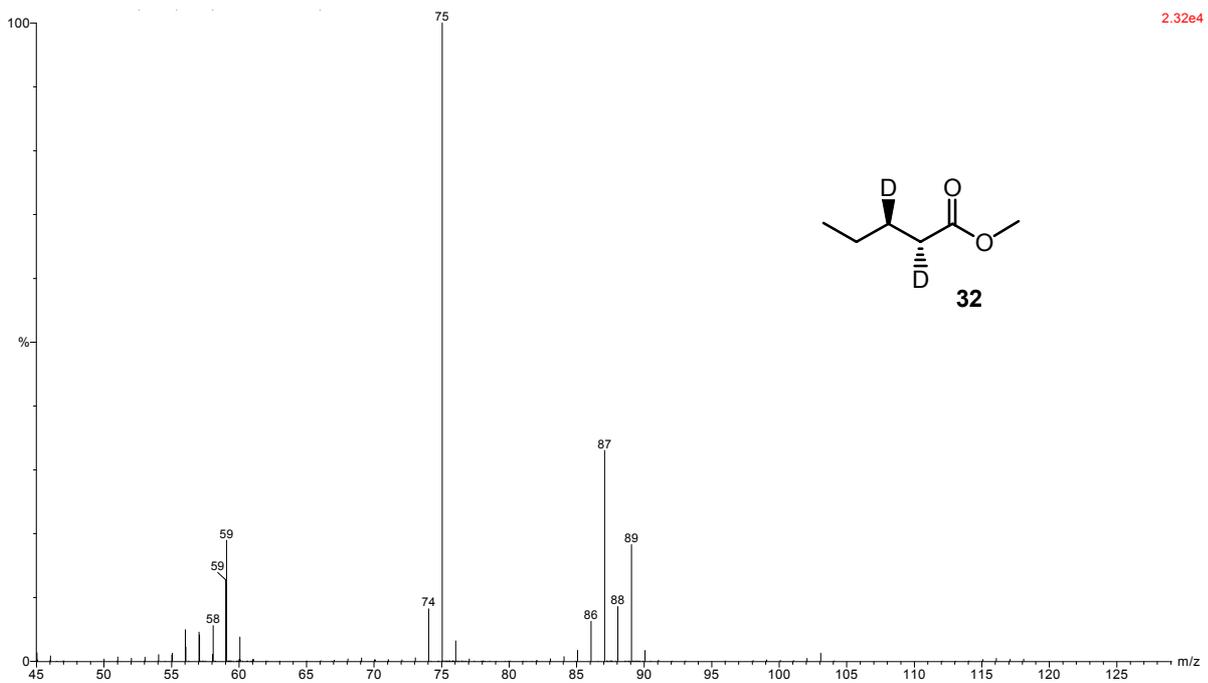
(2E)- [2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-en-1-ol (28)

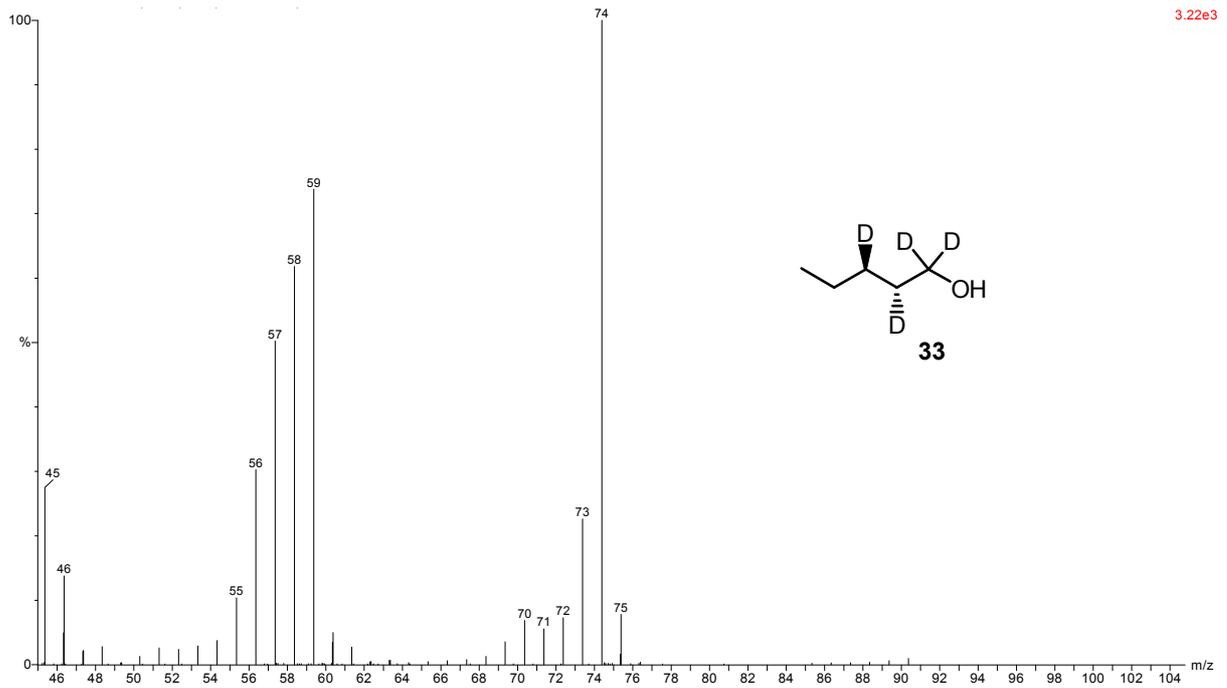
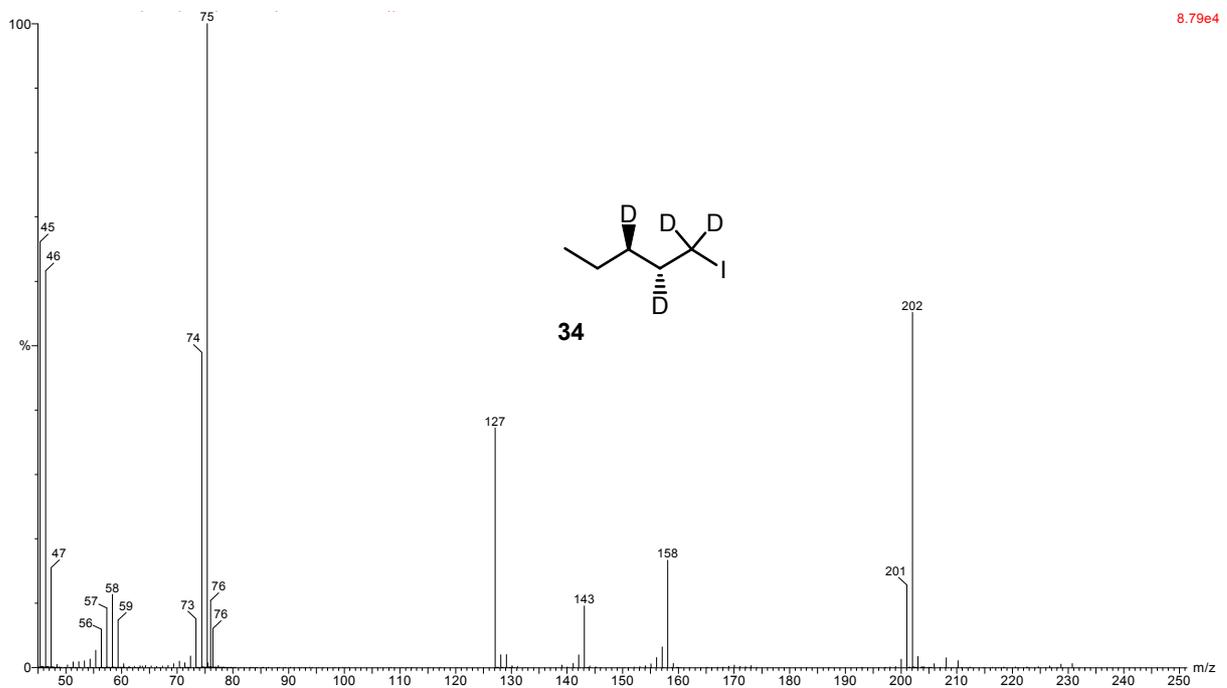


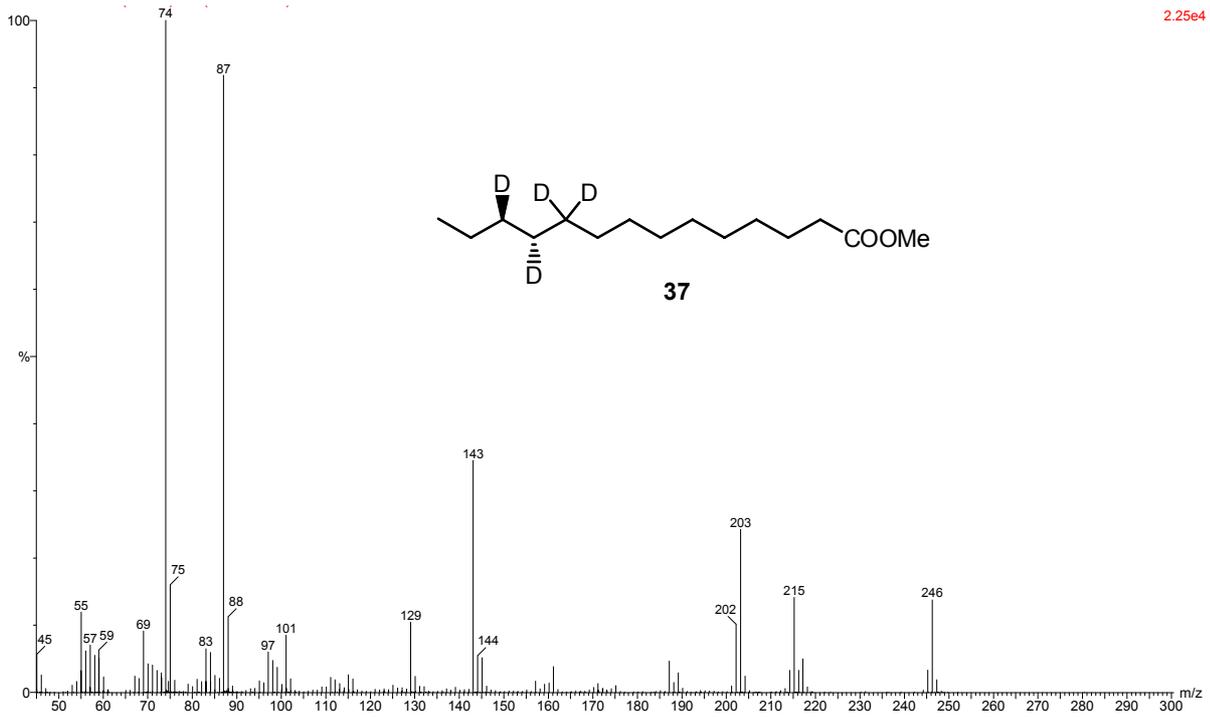
(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-en-1-al (29)



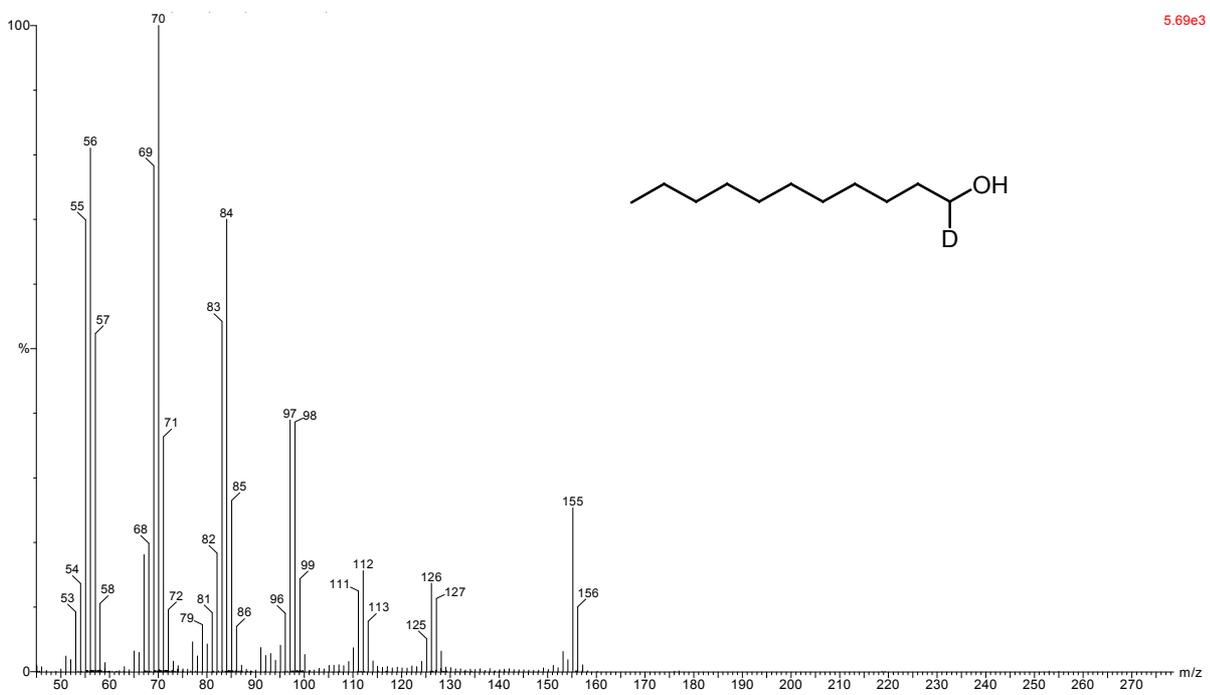
(2E)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]- Hexadec-2-ensäure (30)

(2R,3S)-[2,3,4,4-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Hexadecansäure (31)(2R,3R)-[2,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Pentansäuremethylester (32)

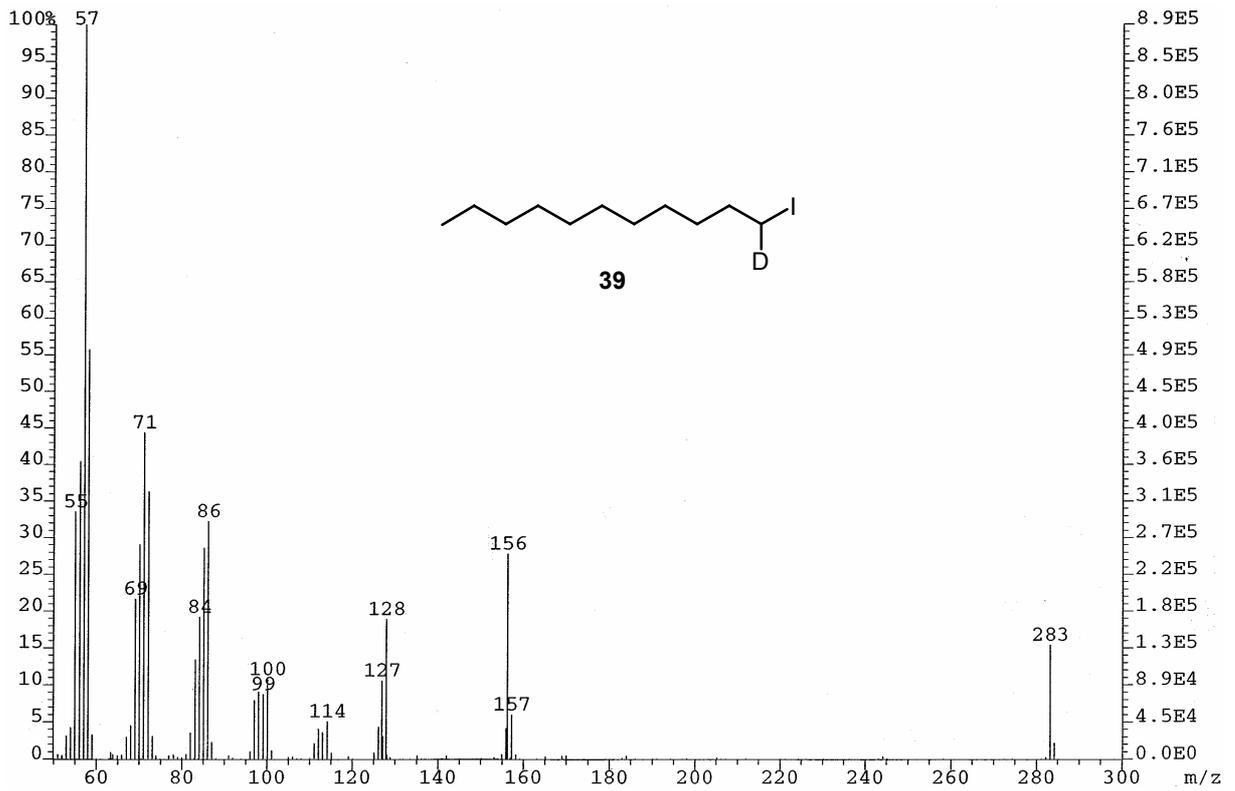
(2R, 3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentanol (**33**)(2R, 3R)-[1,1,2,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Pentyl iodide (**34**)



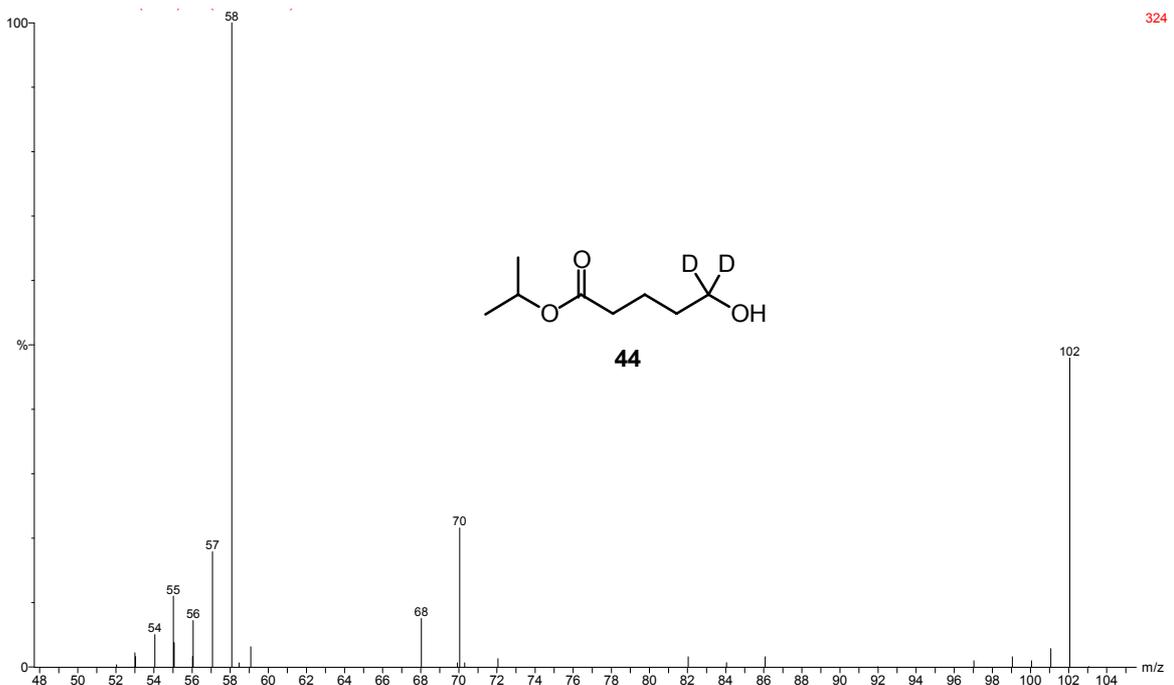
Methylester (11*R*,12*R*)-[10,10,11,12-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>]-Tetradecansäure (**37**)



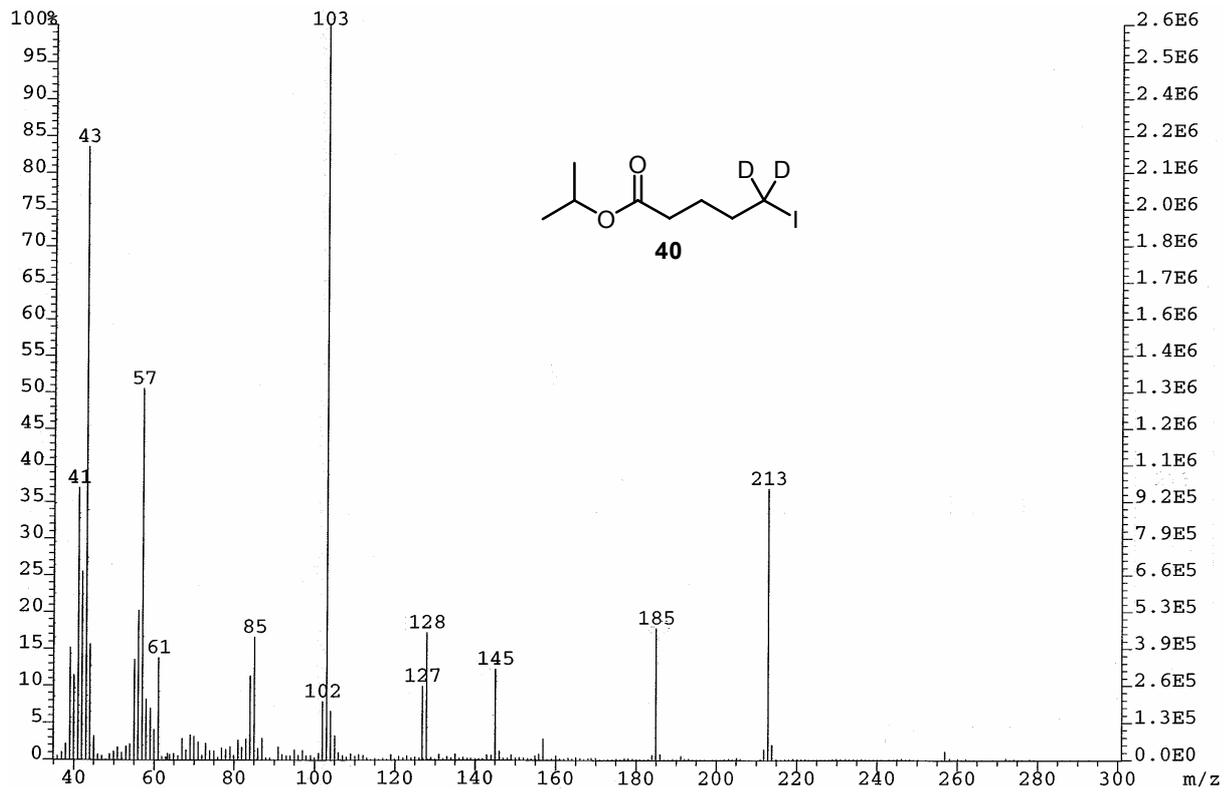
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecanol:



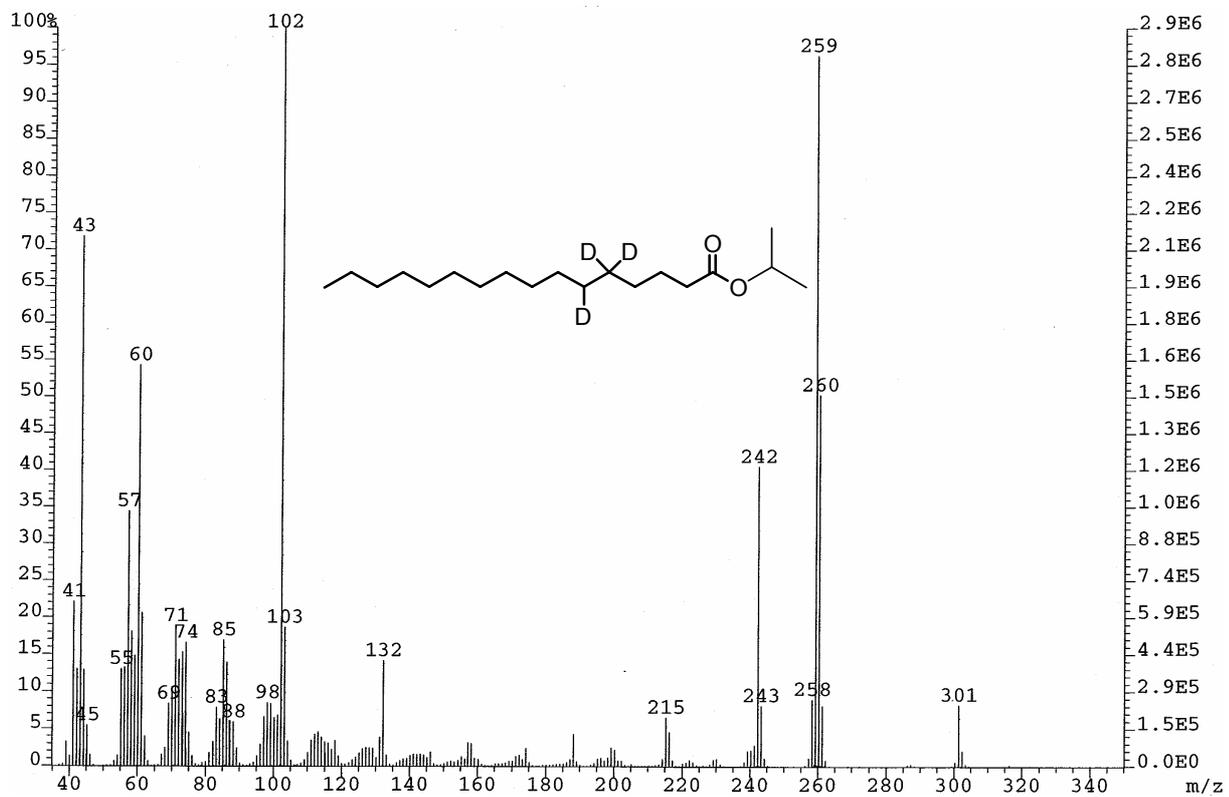
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Undecyliodid (**39**)



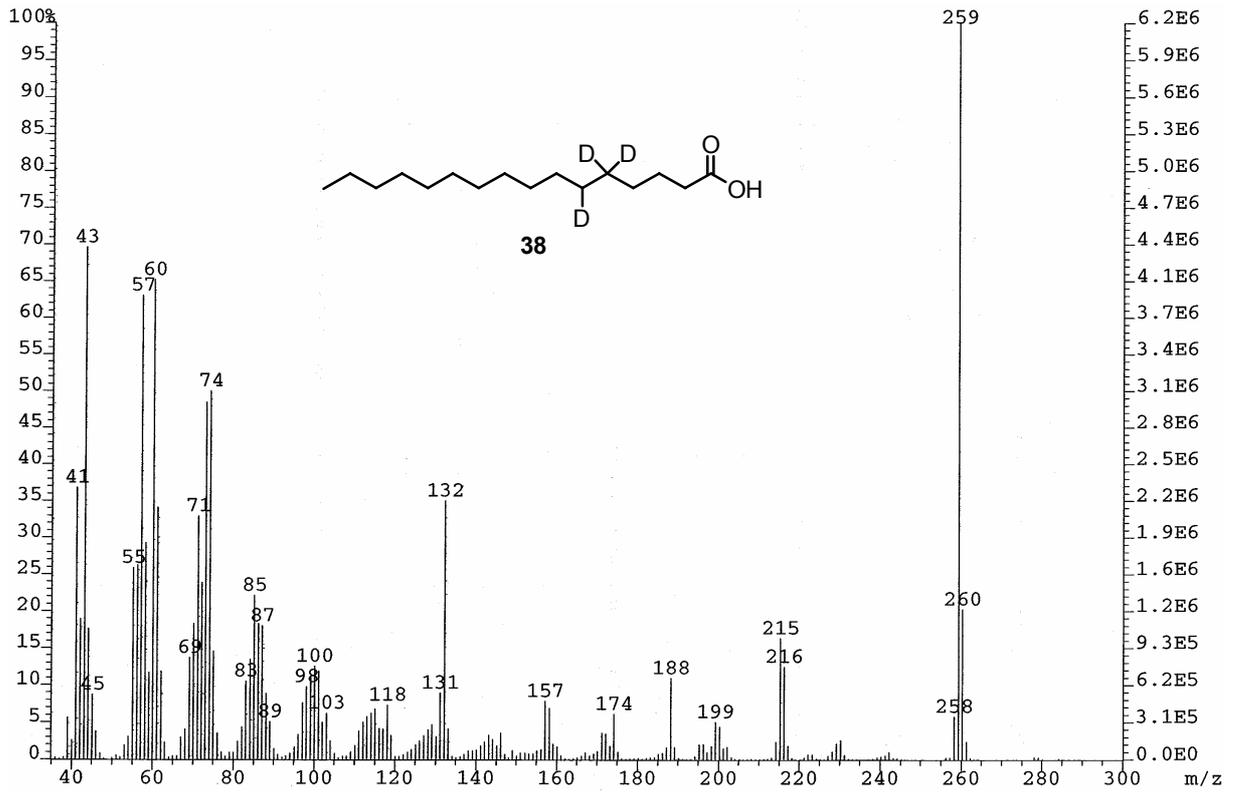
[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Hydroxypentansäureisopropylester (**44**)



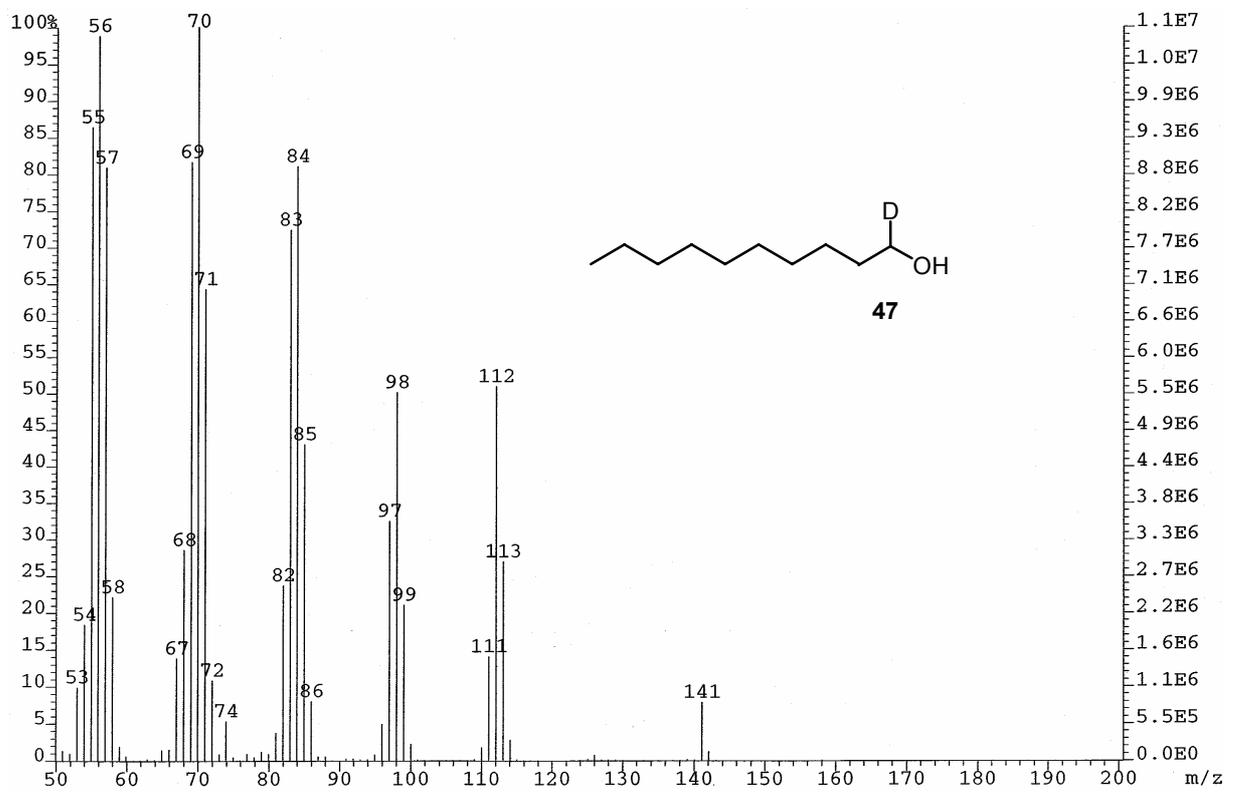
[5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-5-Iodopentansäureisopropylester (**40**)



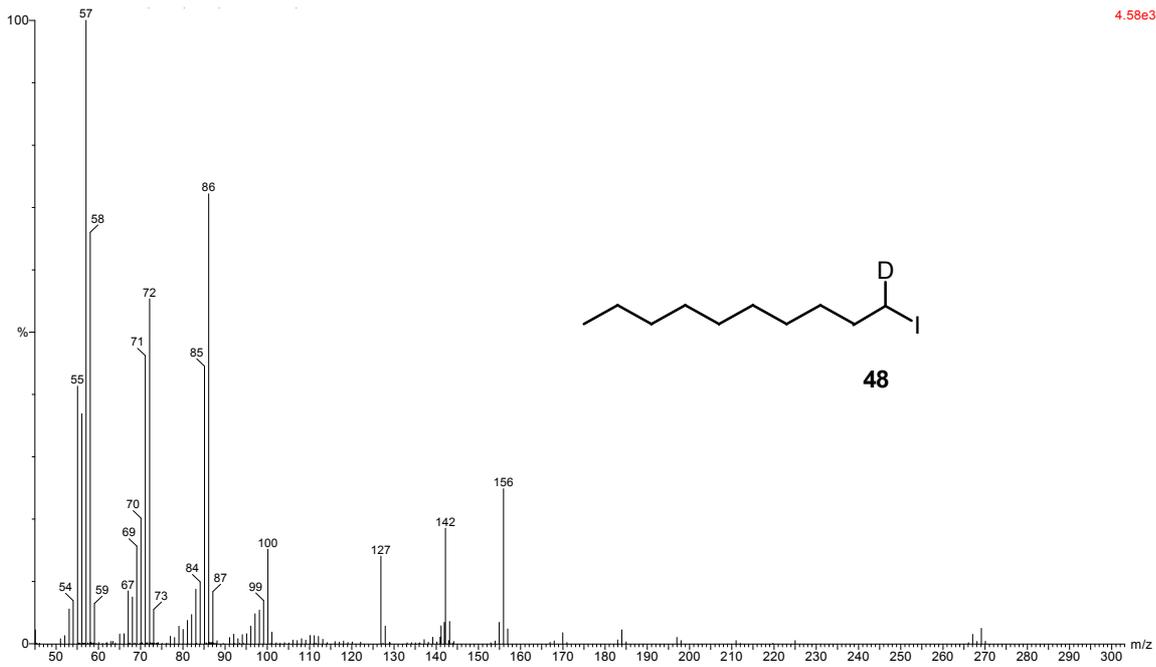
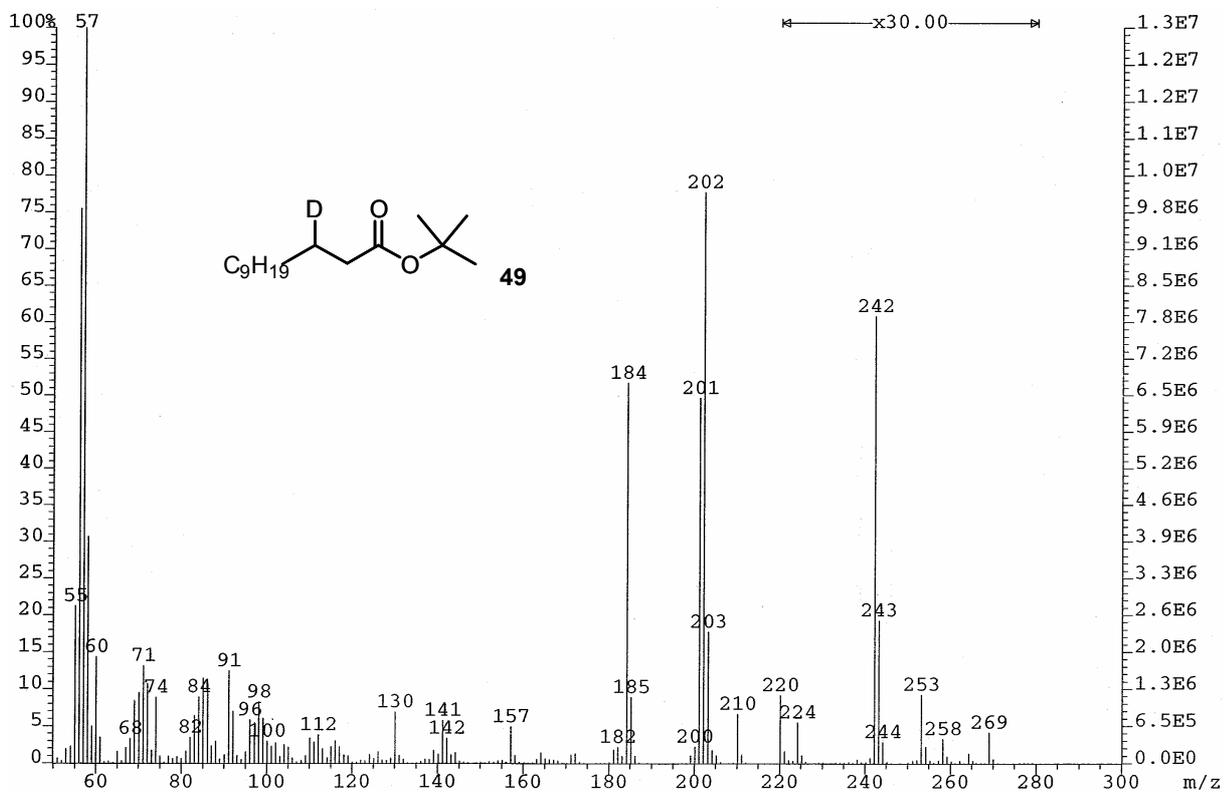
*rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäureisopropylester

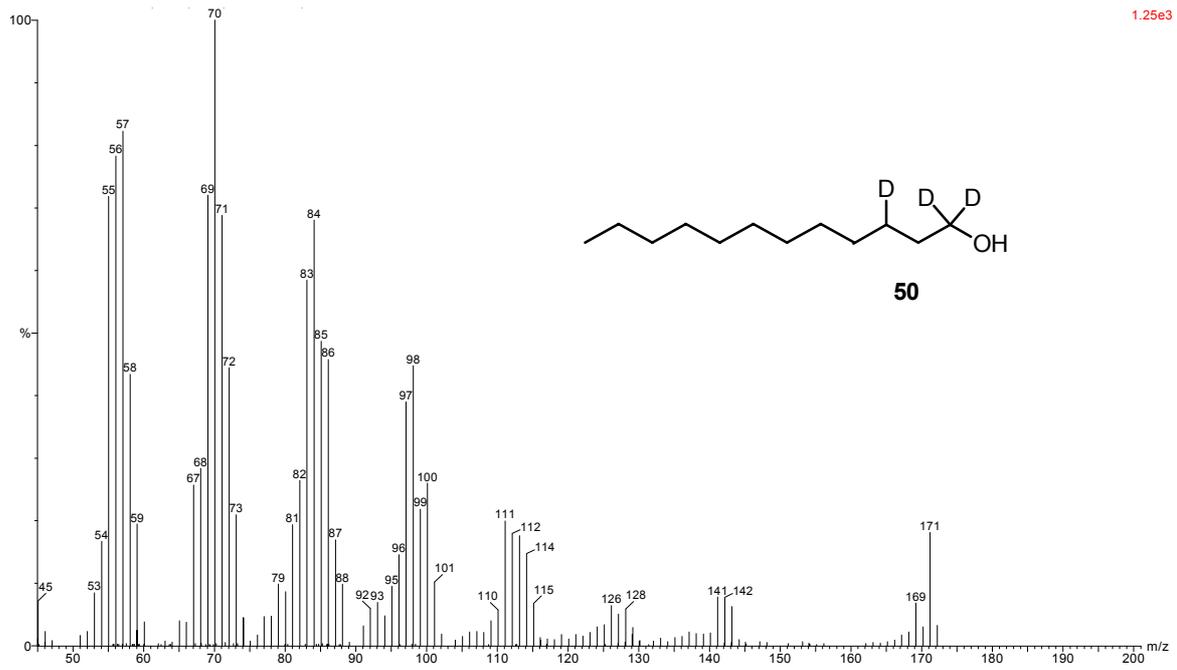


*rac*-[5,5,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**38**)

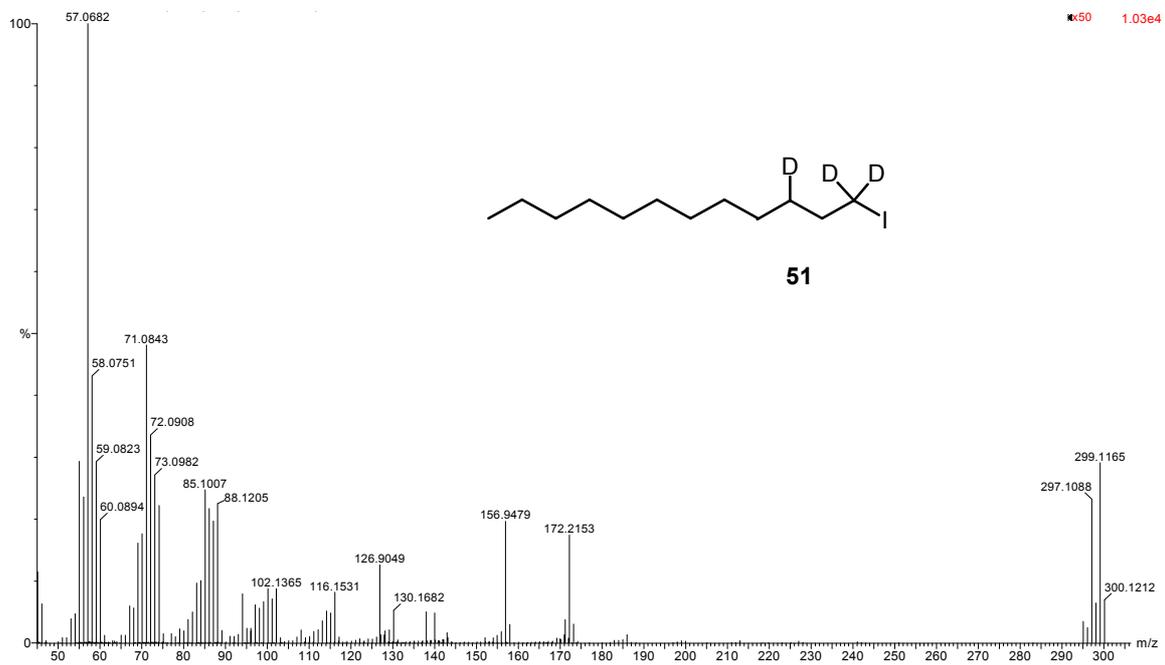


[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decanol (**47**)

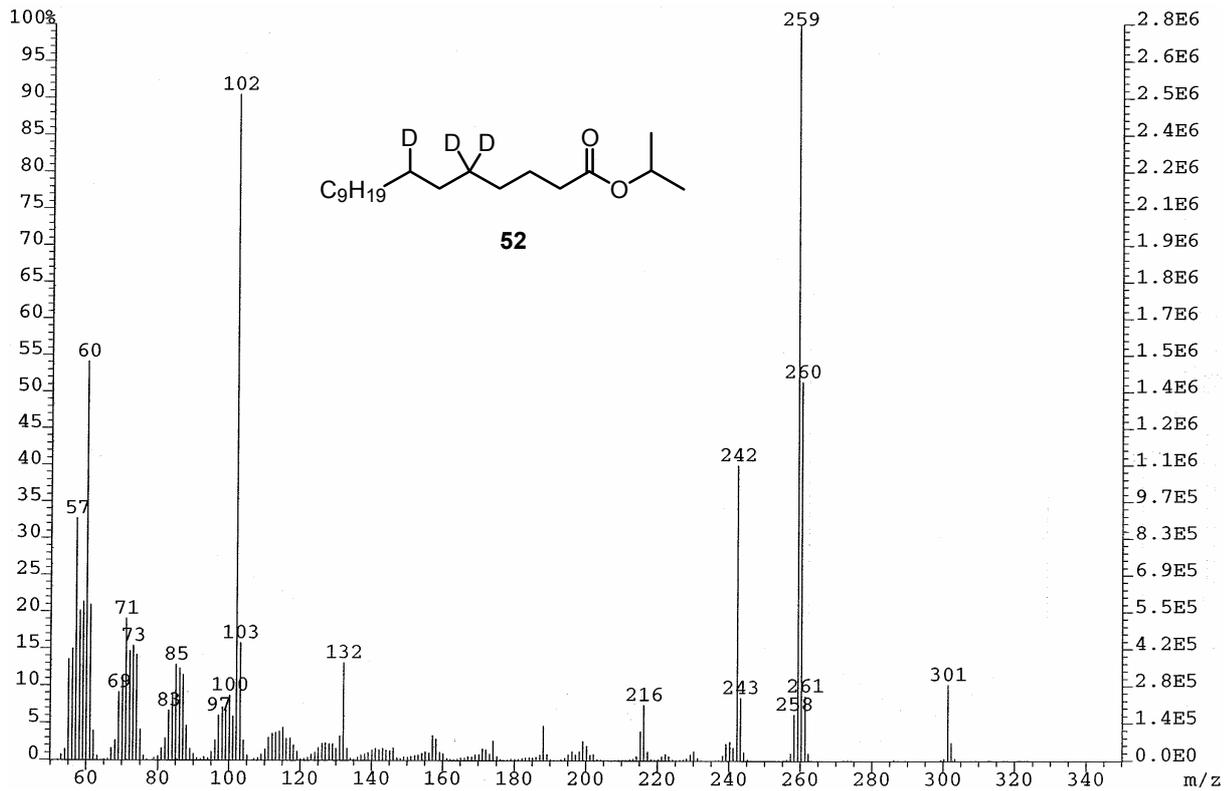
[1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decyliodid (48)[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Dodecansäure-*tert*-butylester (49)



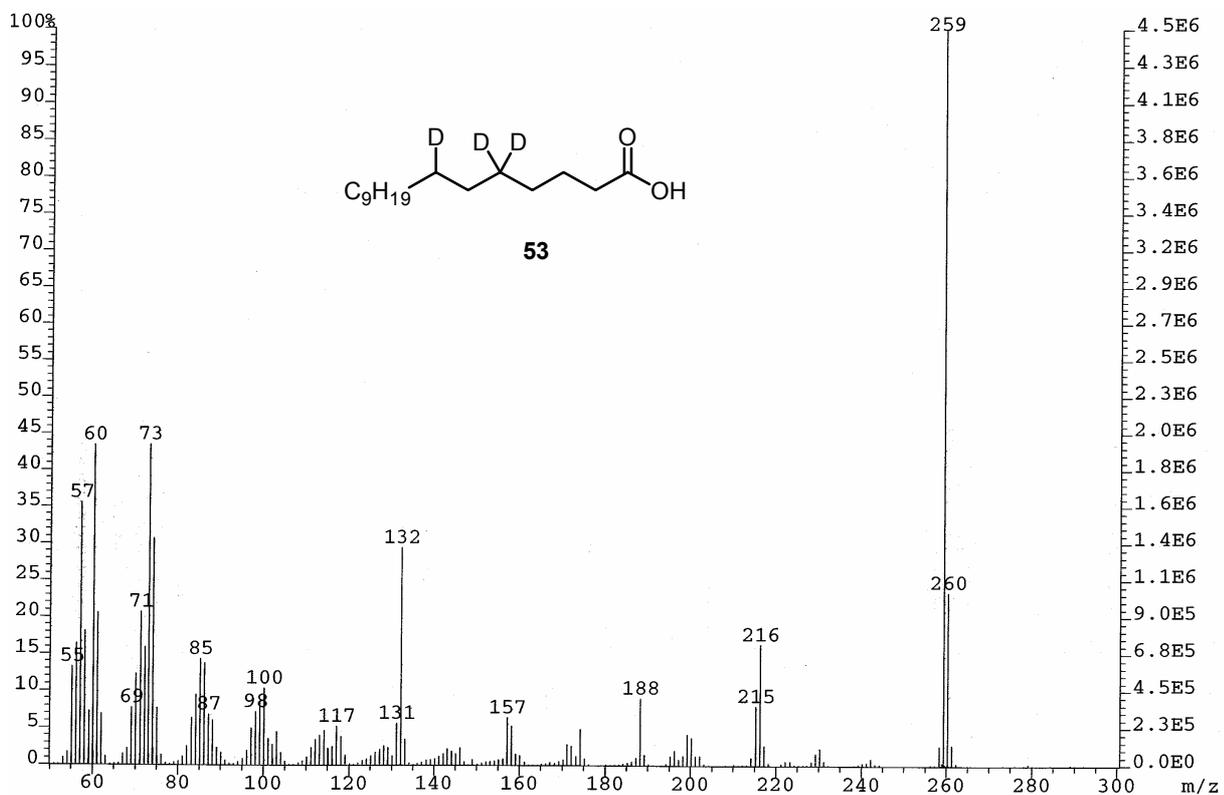
[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecanol (**50**)



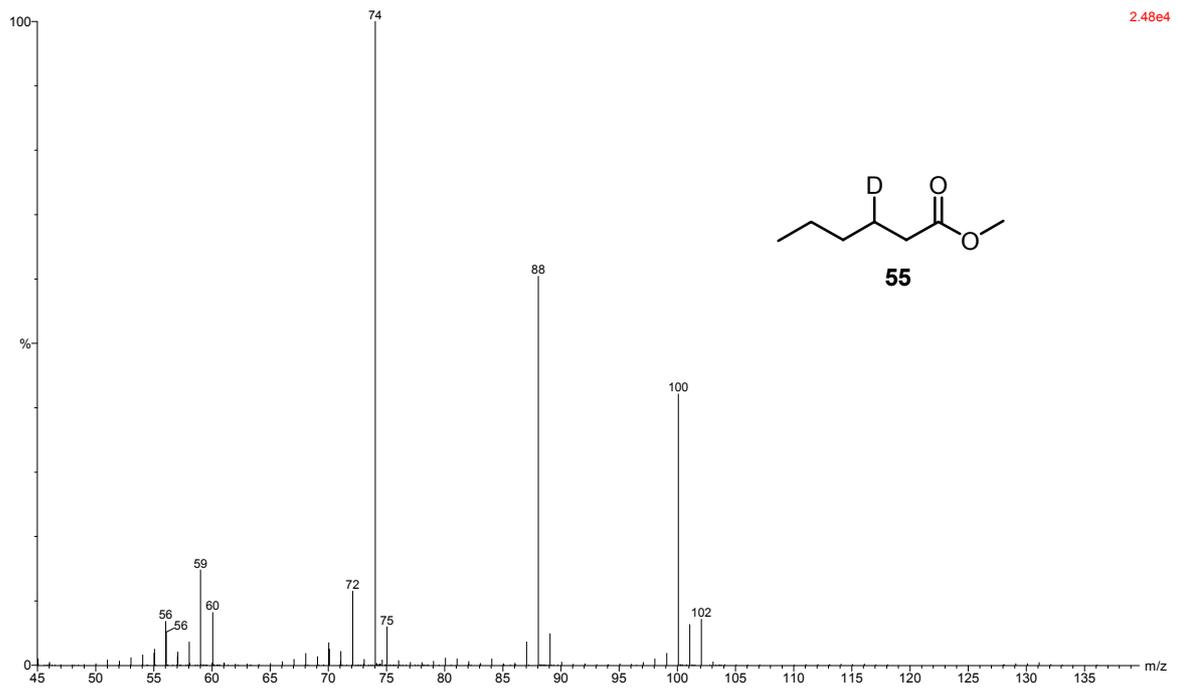
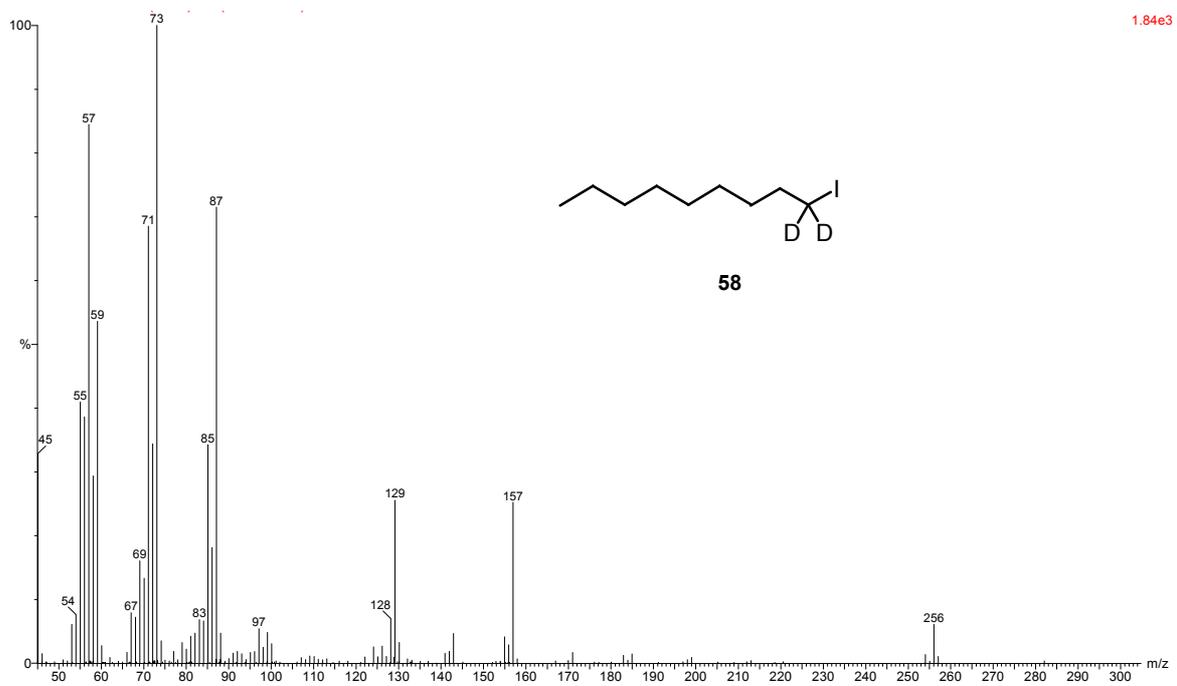
[1,1,3-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Dodecylidid (**51**)

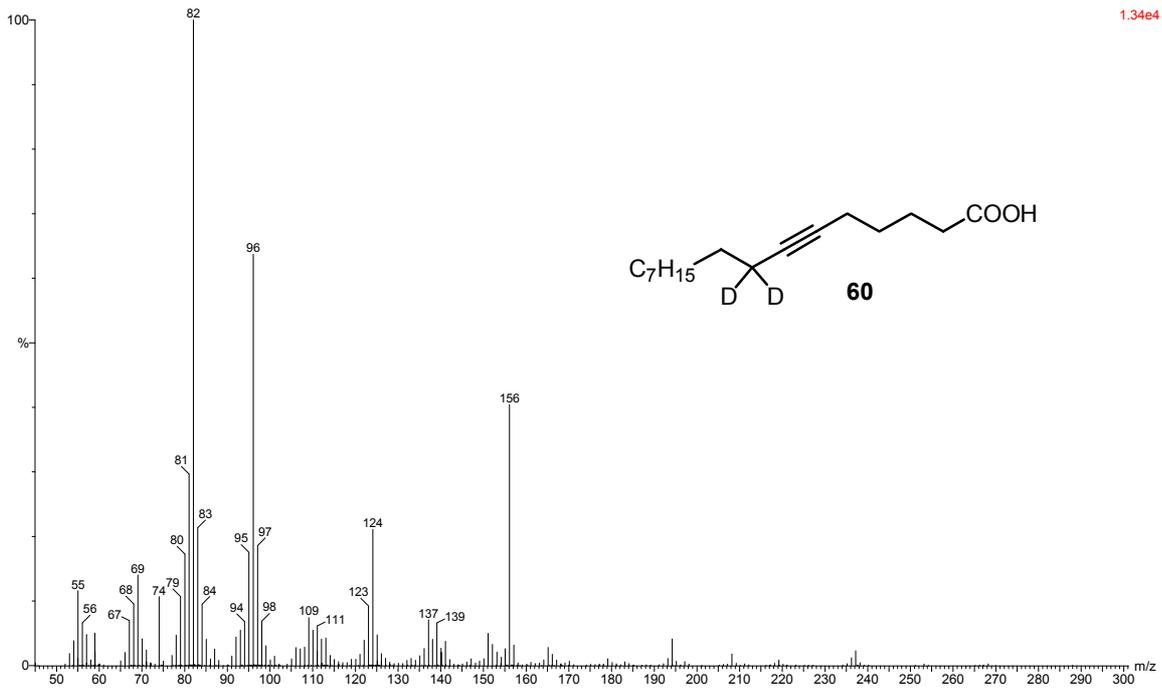
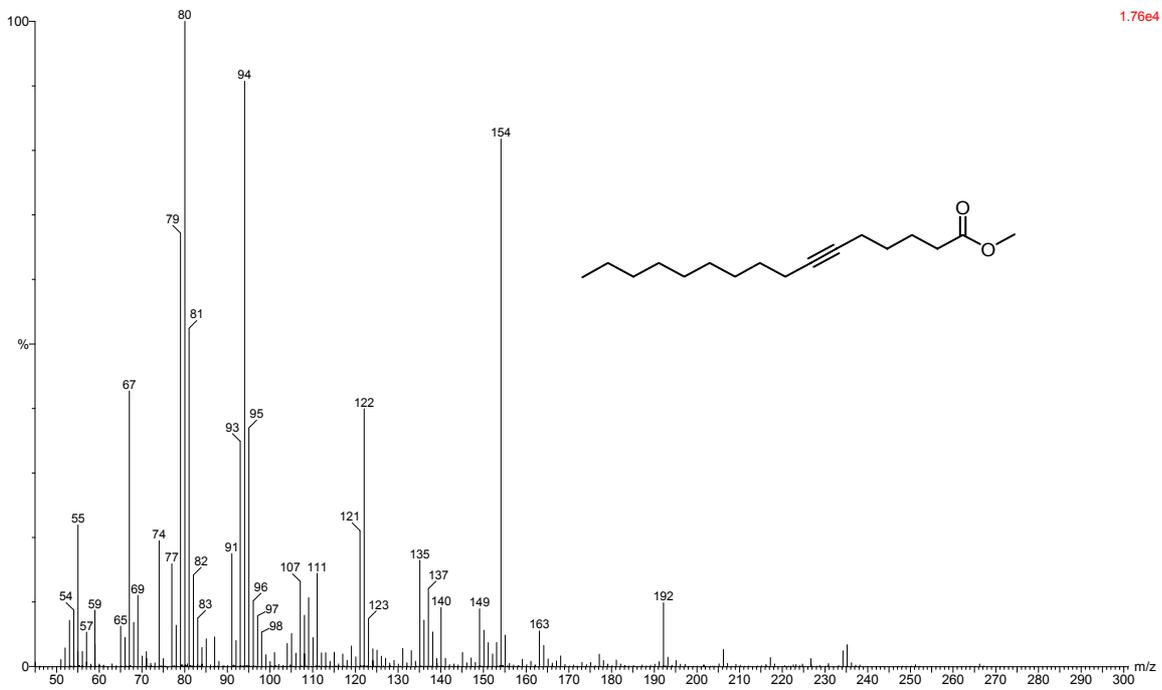


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäureisopropylester (**52**)

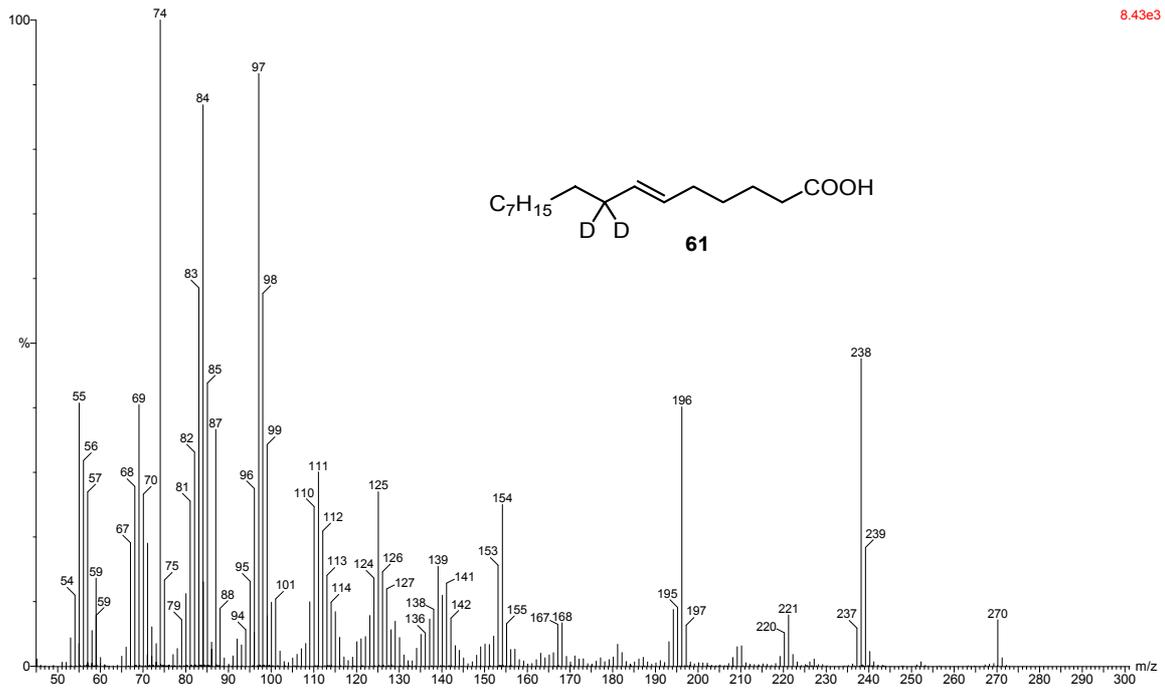


*rac*-[5,5,7-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hexadecansäure (**53**)

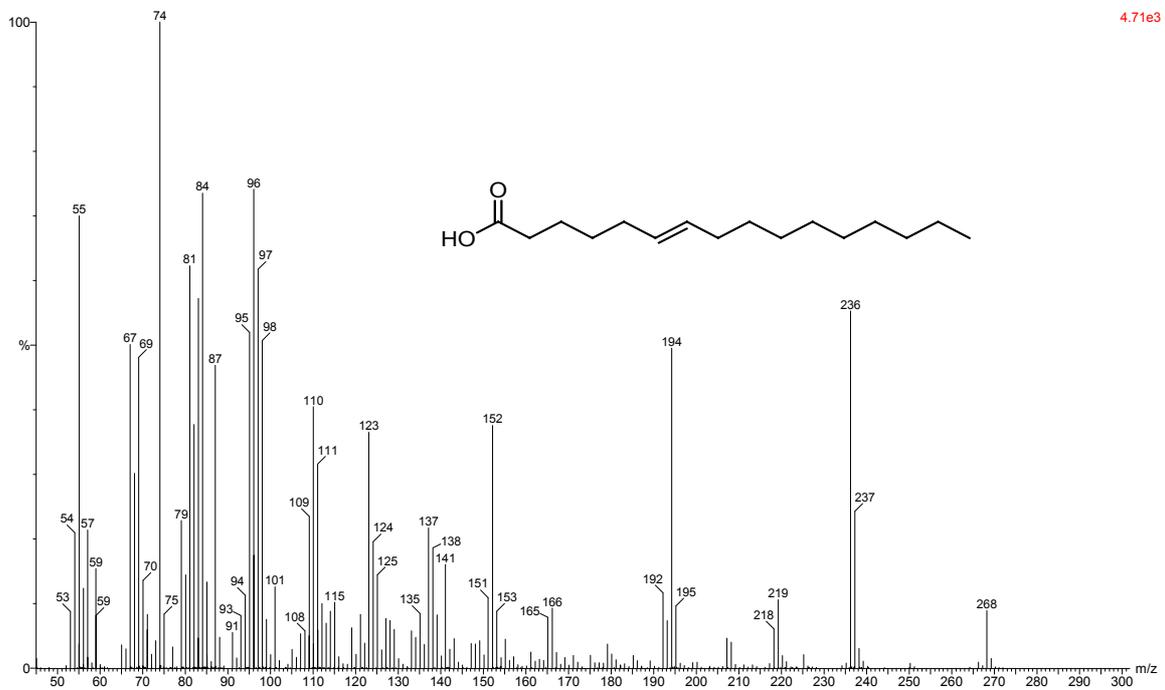
[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Hexansäuremethylester (55)[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Iodnonan (58)

[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (60) als Methylester

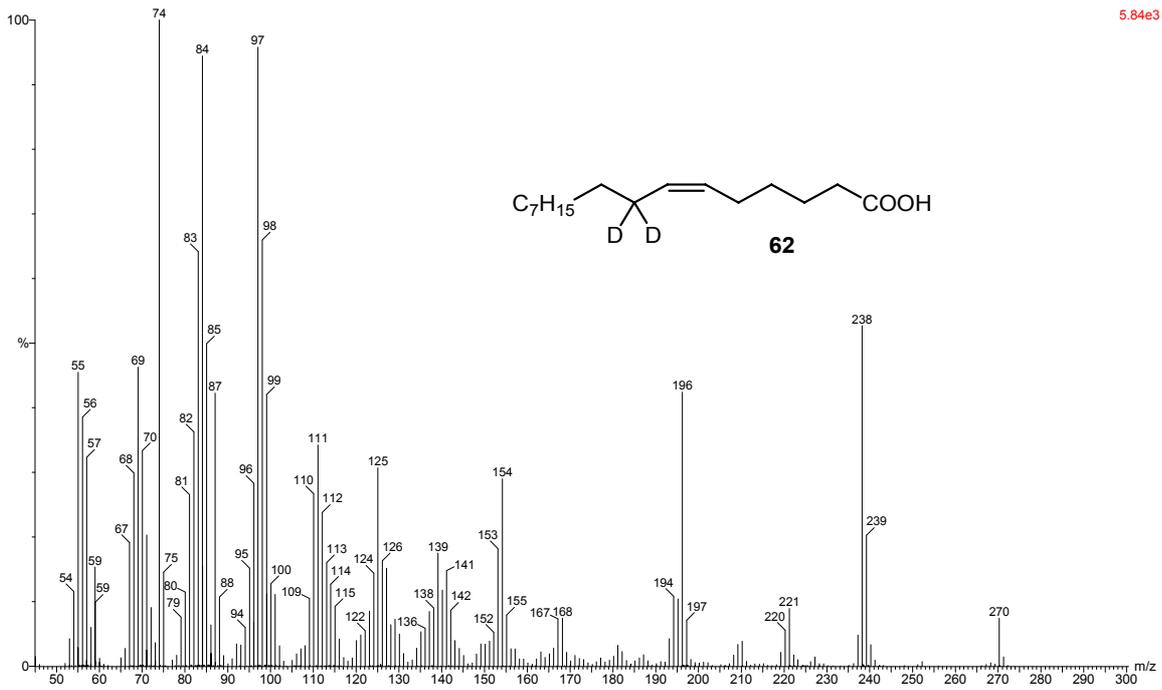
Hexadec-6-ensäure als Methylester



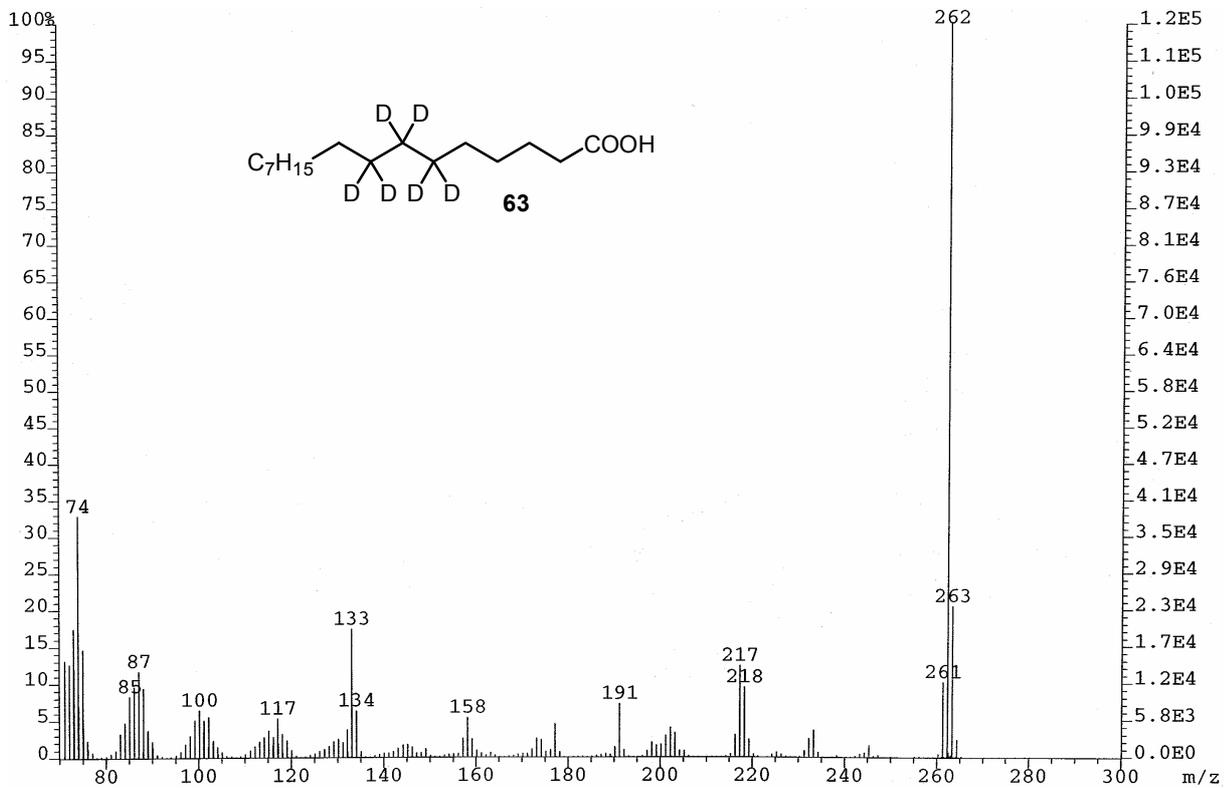
(E)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**61**) als Methylester



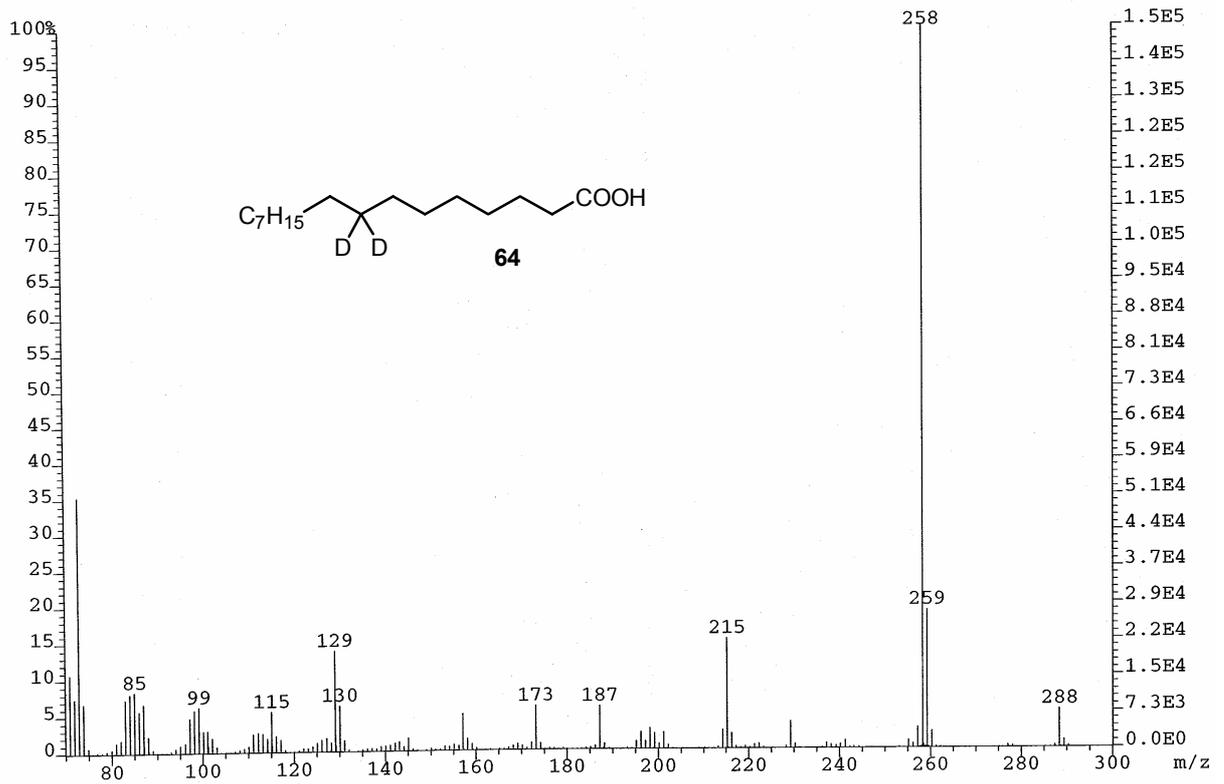
(E)-Hexadec-6-ensäure (**139**)



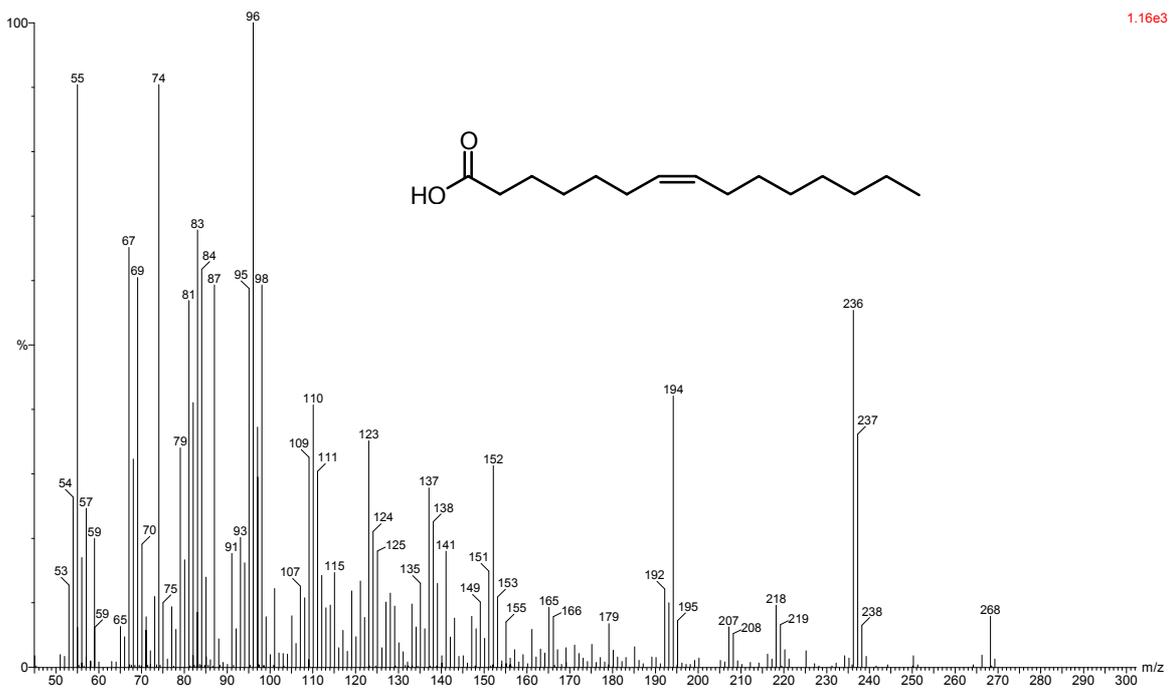
(6Z)-[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-6-ensäure (**62**) als Methylester



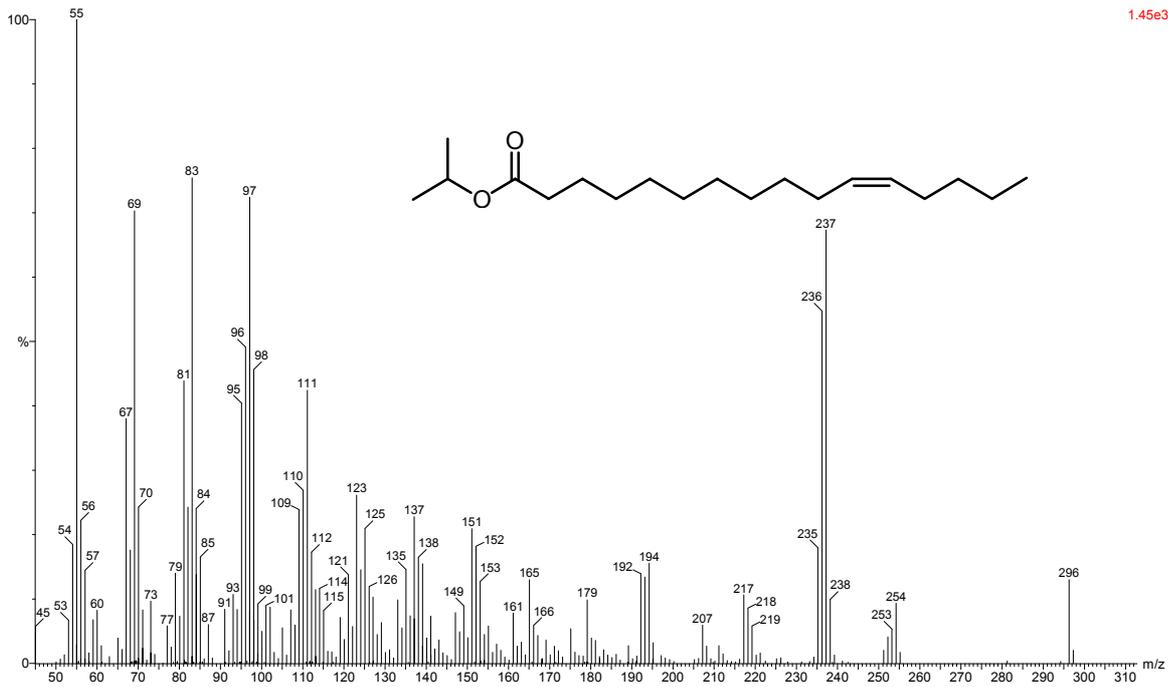
[6,6,7,7,8,8-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-Hexadecansäure (**63**)



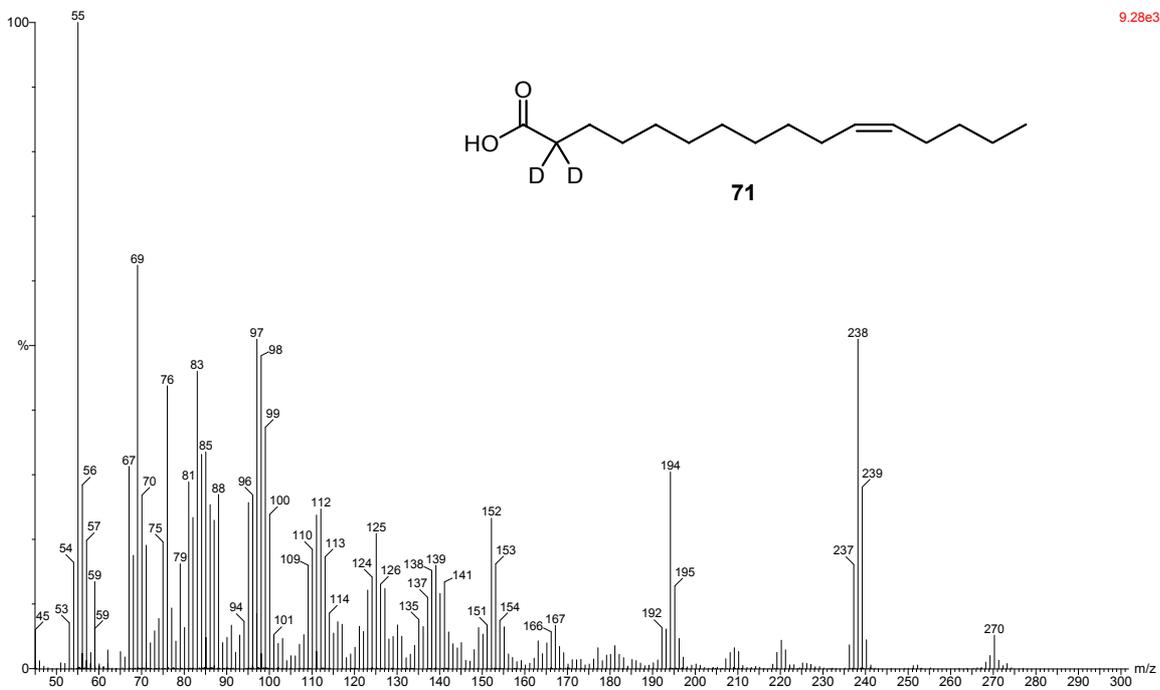
[8,8-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadecansäure (**64**)

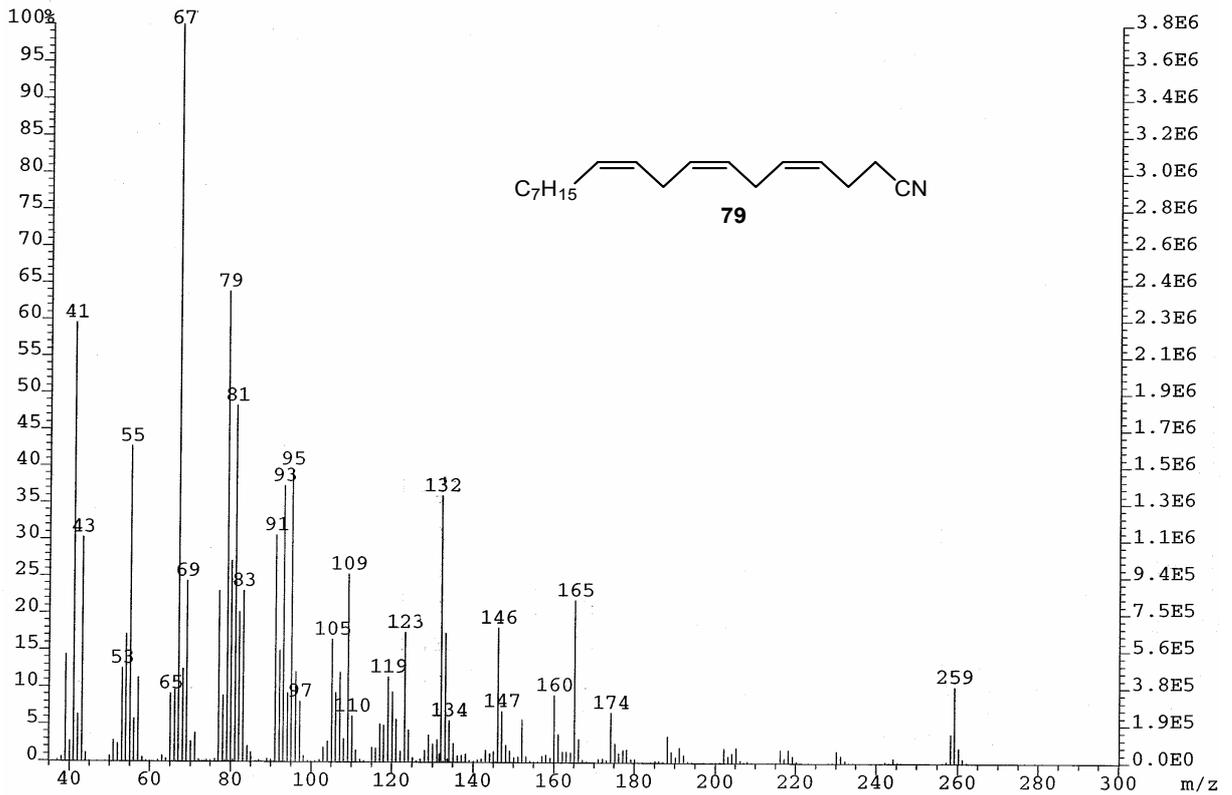


(7Z)-Hexadec-7-ensäuremethylester (**67b**) als Methylester

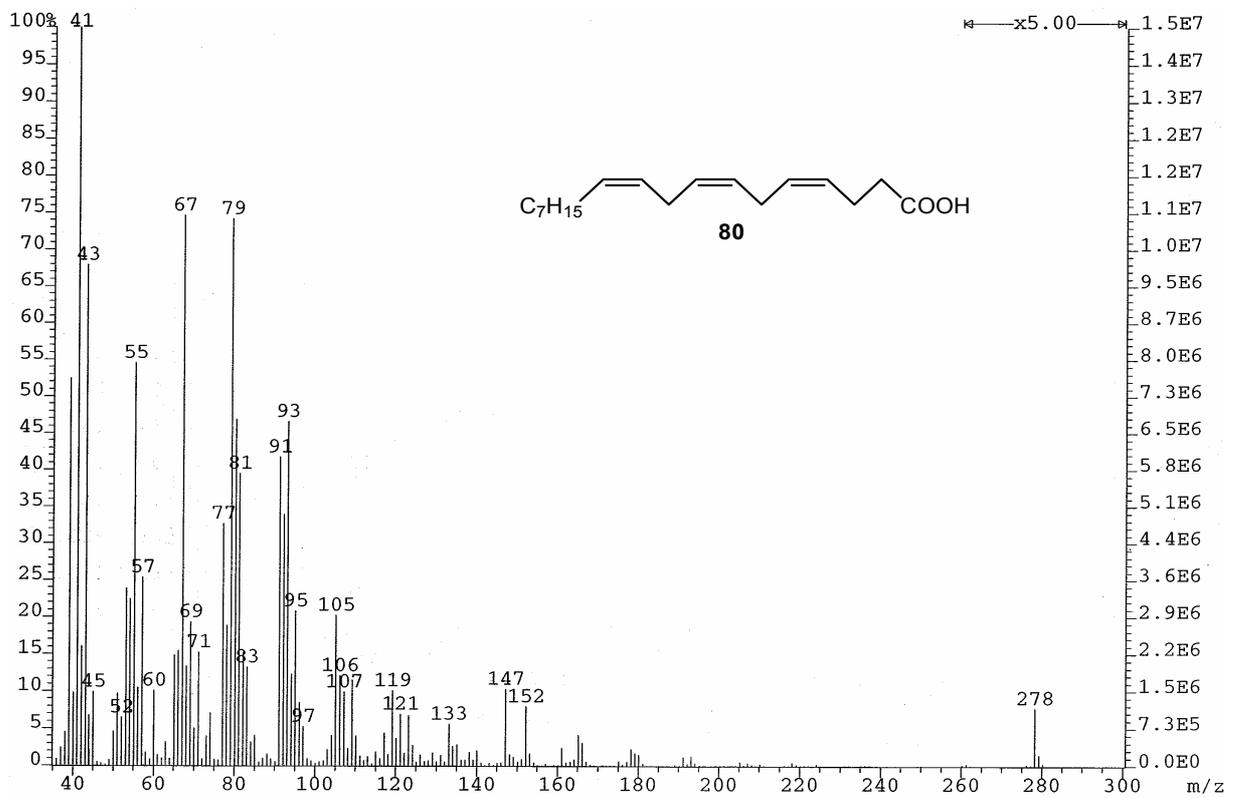


(Z)-Hexadec-11-ensäureisopropylester (70)

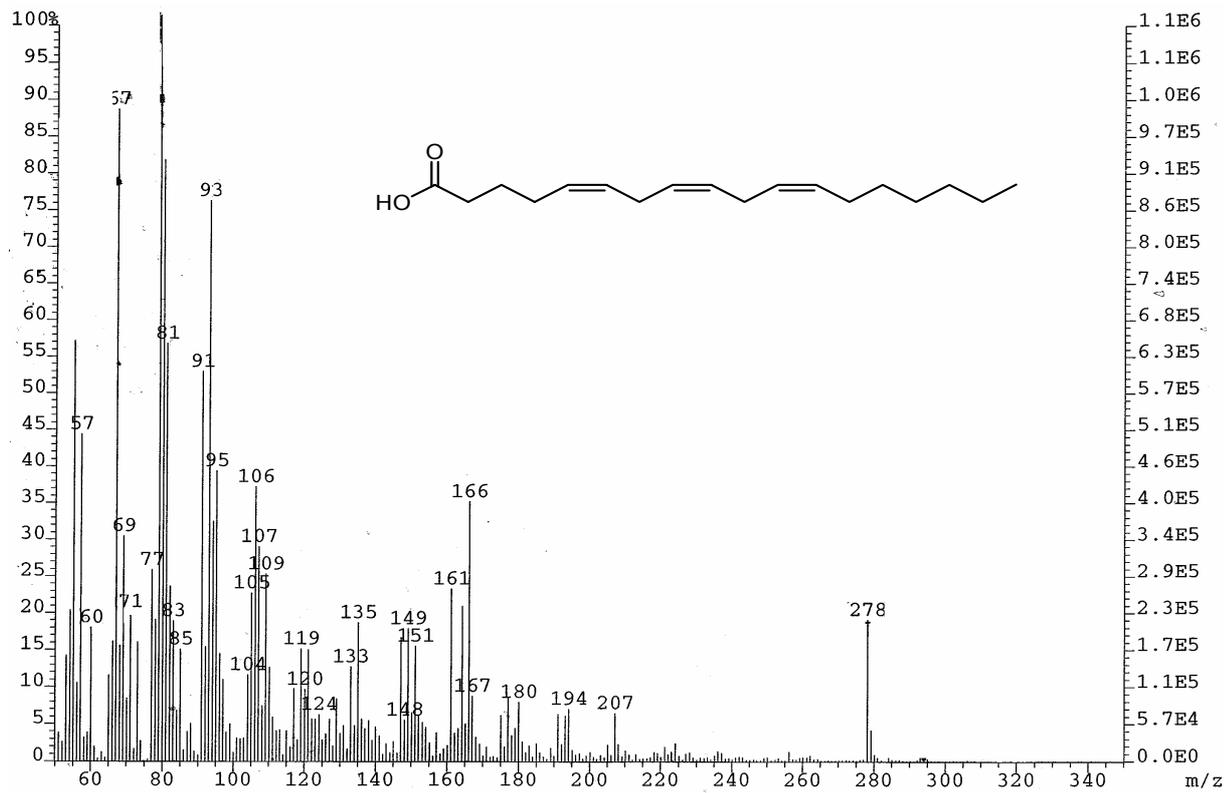
(Z)-[2,2-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Hexadec-11-ensäure(71)



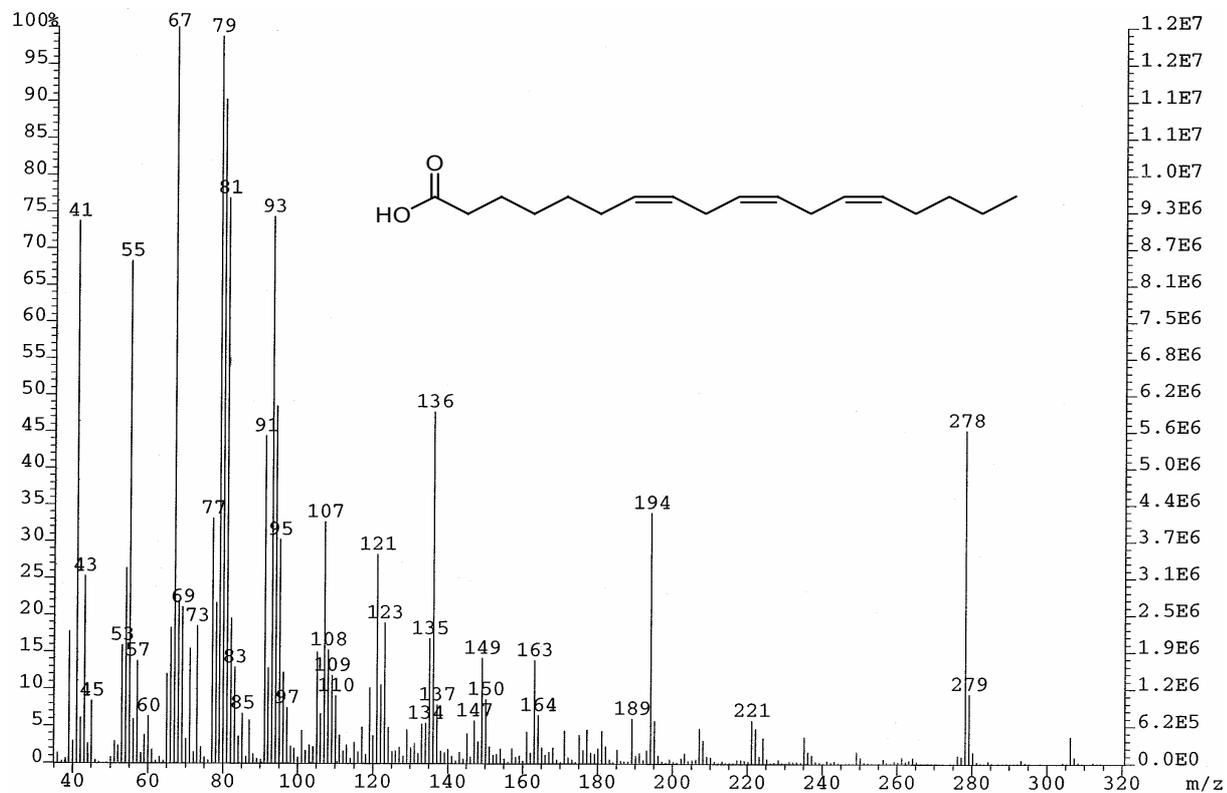
(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triennitril (**79**)



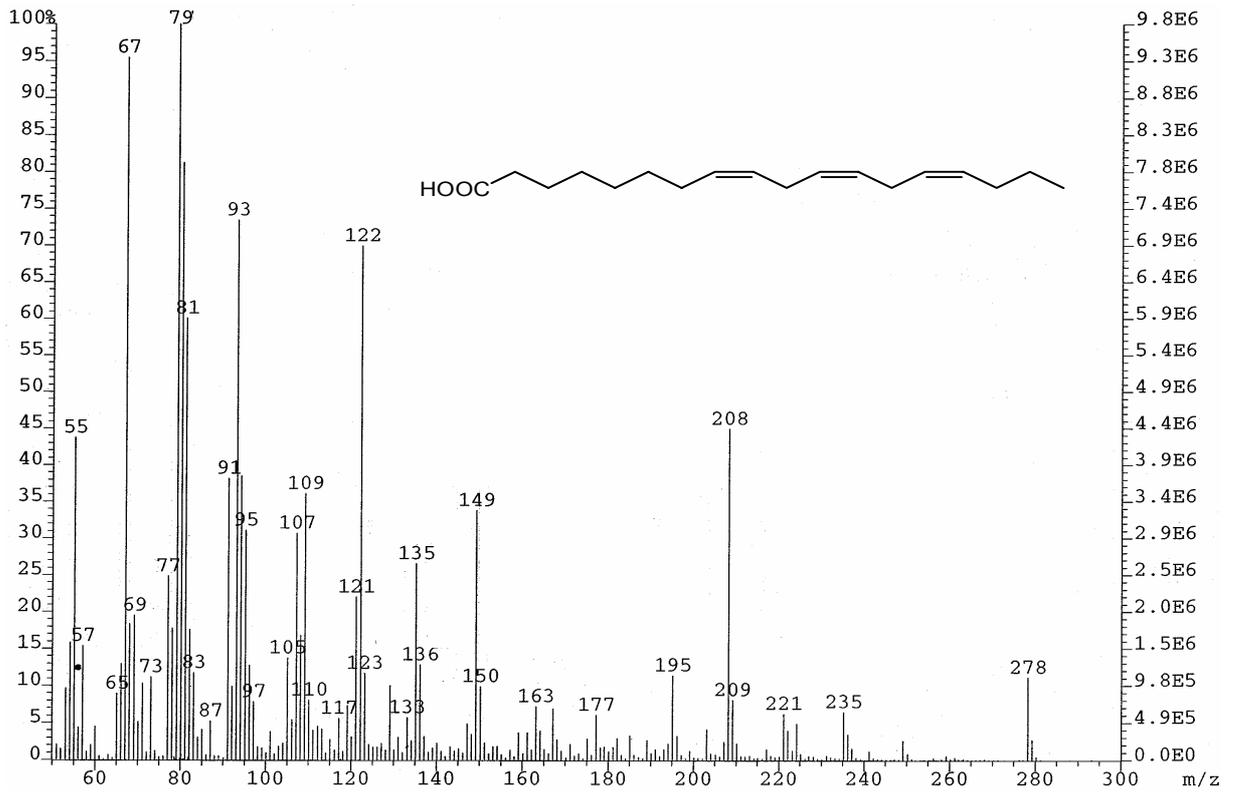
(4Z,7Z,10Z)-Octadeca-4,7,10-triensäure (**80**)



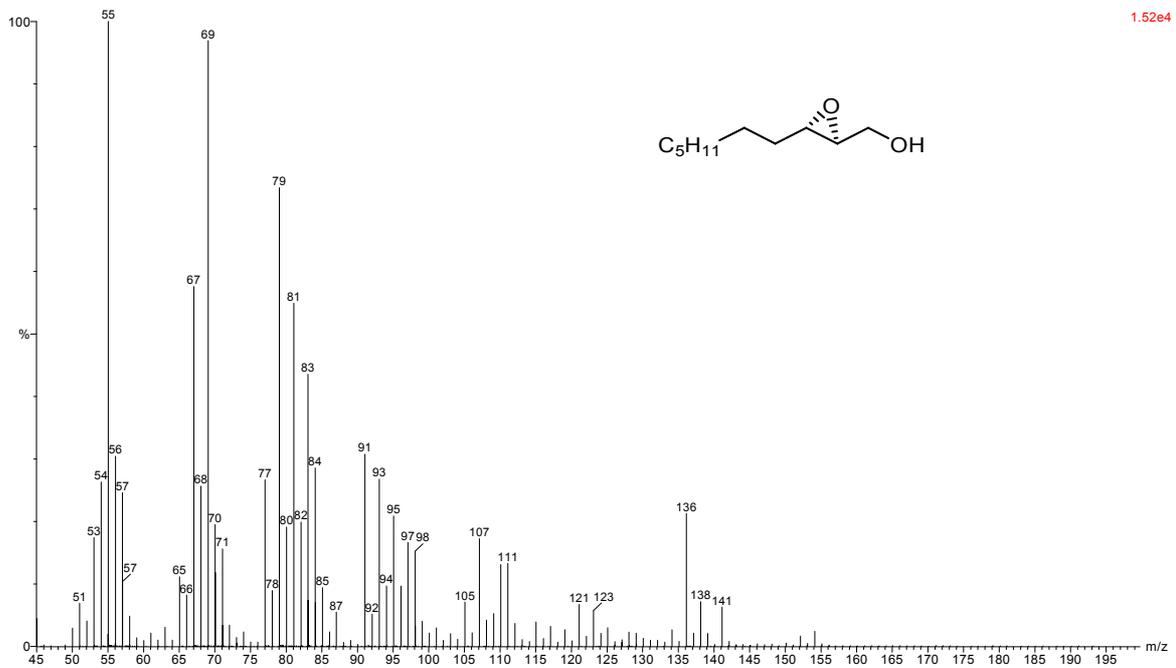
(5Z,8Z,11Z)-Octadeca-5,8,11-triensäure (90)



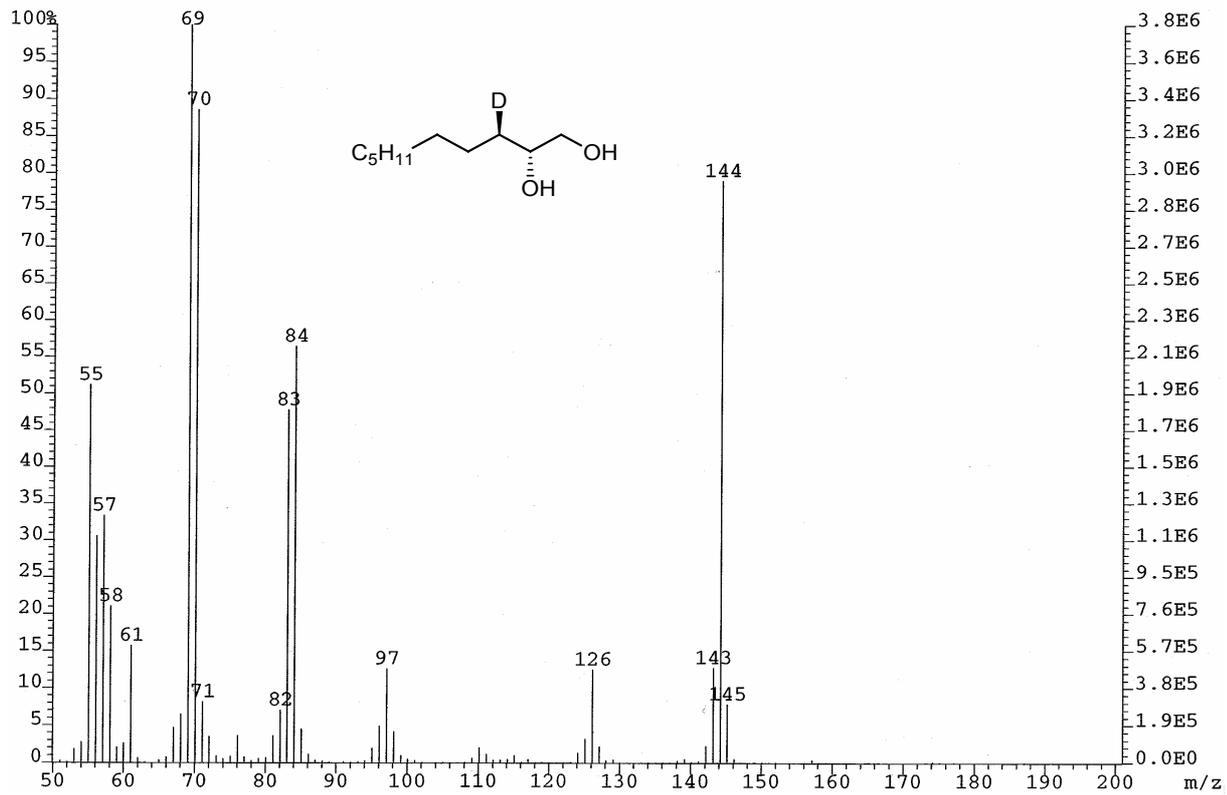
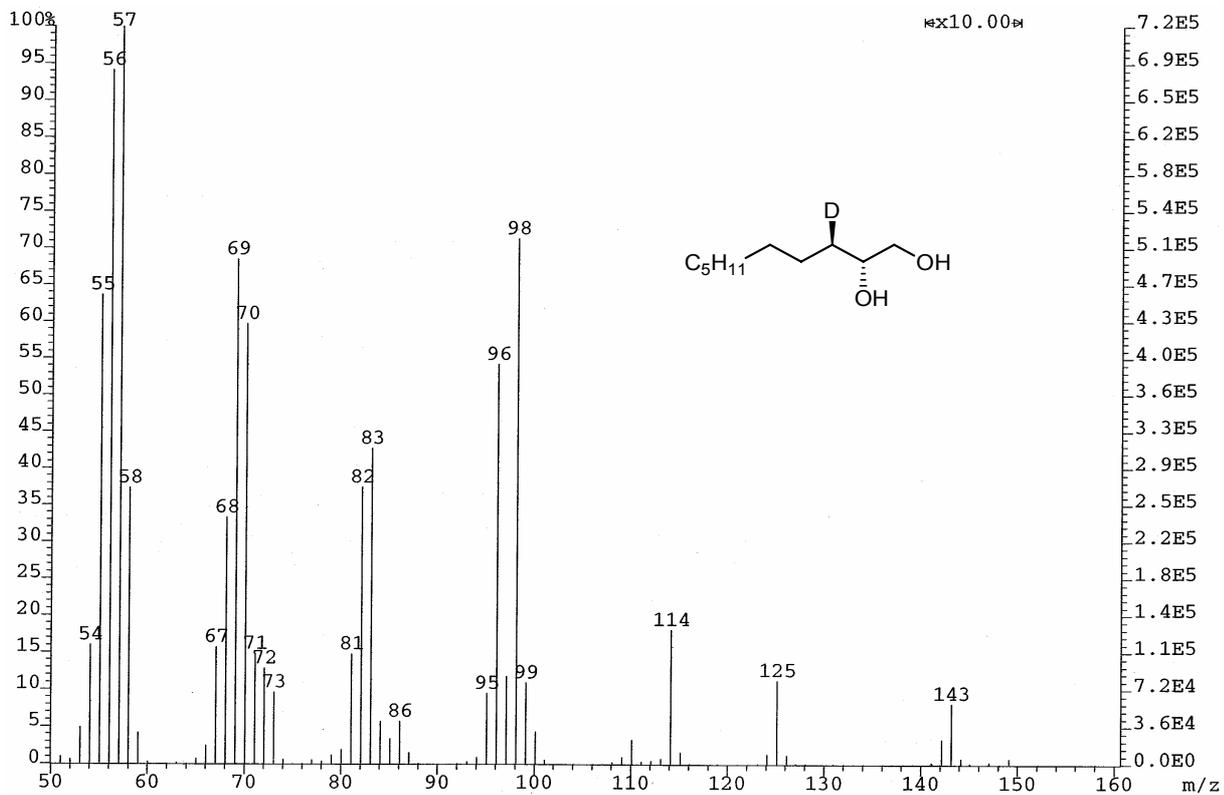
(7Z,10Z,13Z)-Octadeca-7,10,13-triensäure (91)

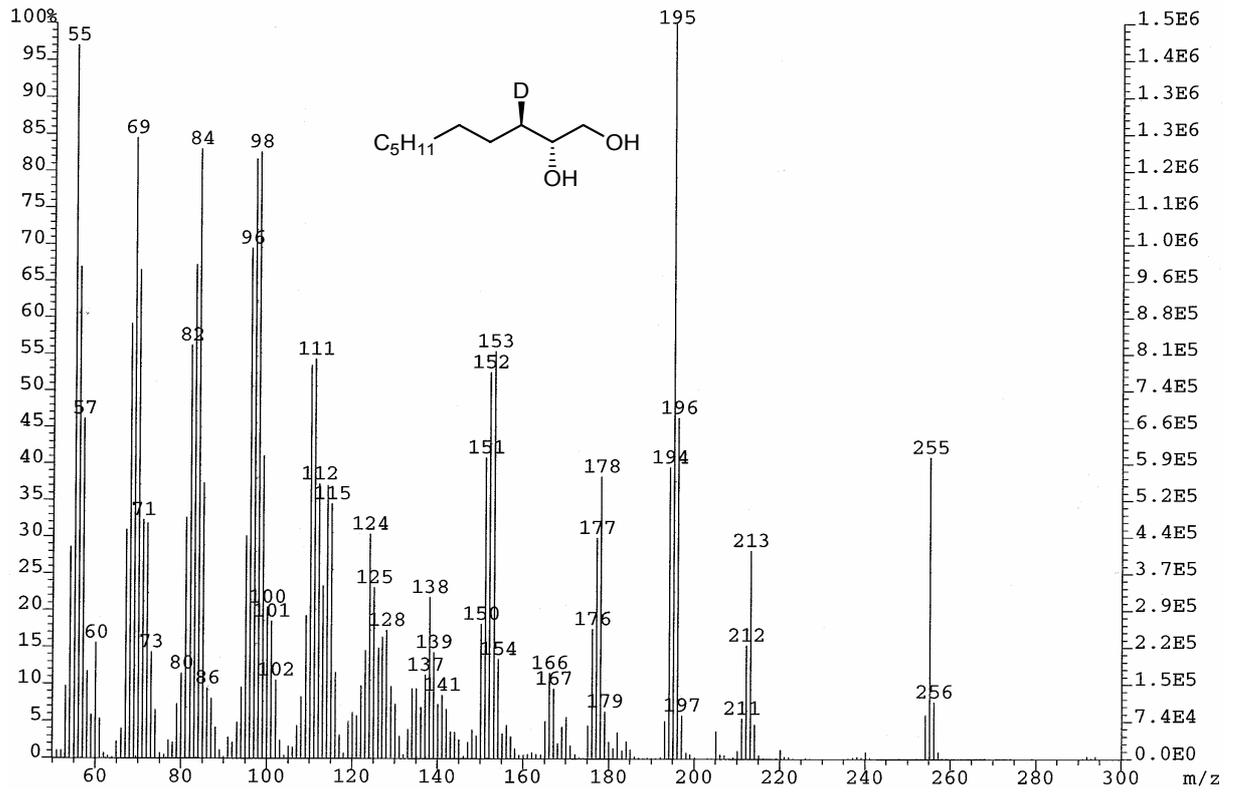


(8Z,11Z,14Z)-Octadeca-8,11,14-triensäure (92)

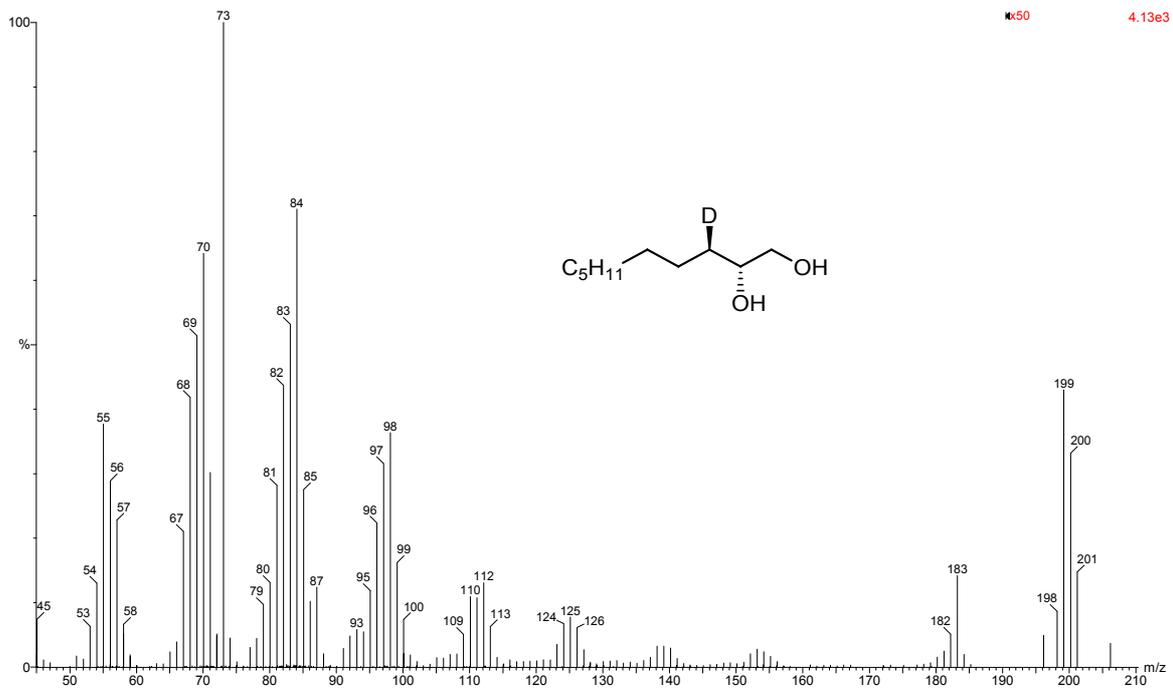


(2S,3S)-2,3-Epoxydecanol (100)

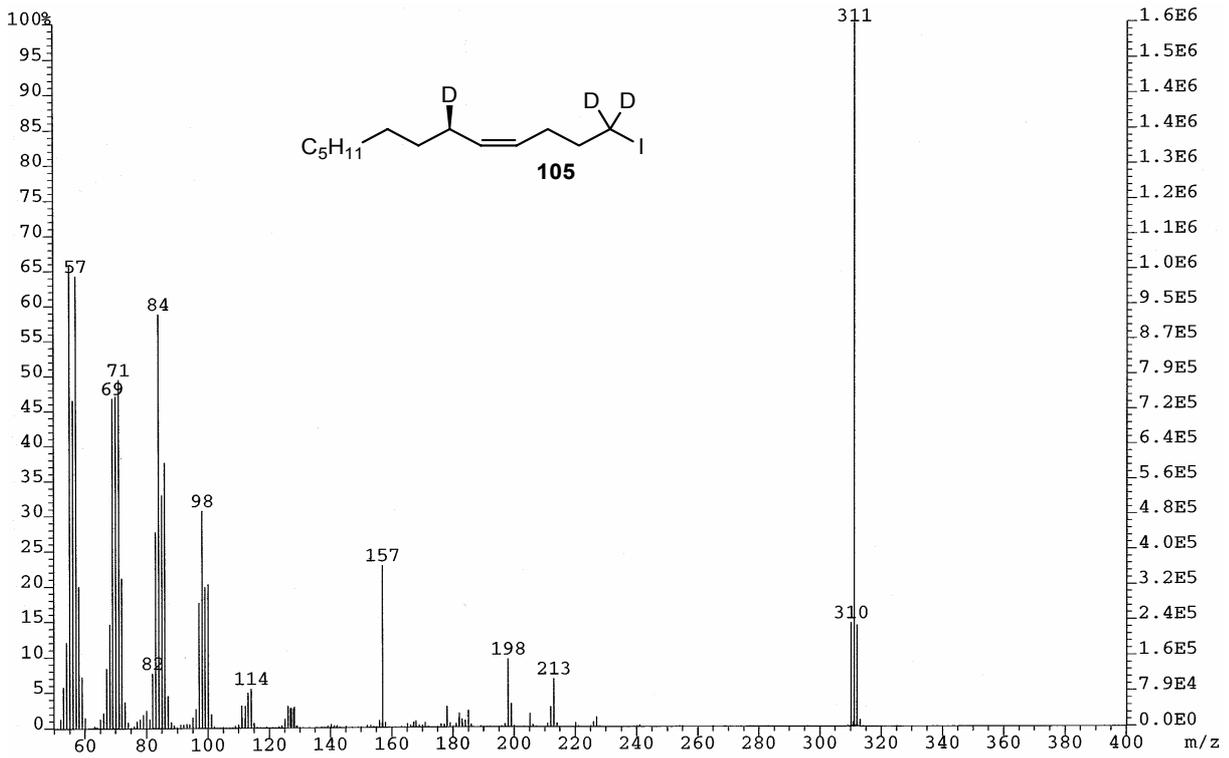
(2R,3R)-[3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Decan-1,2-diol (101)(2R)-[2-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Nonan-1-al (102)



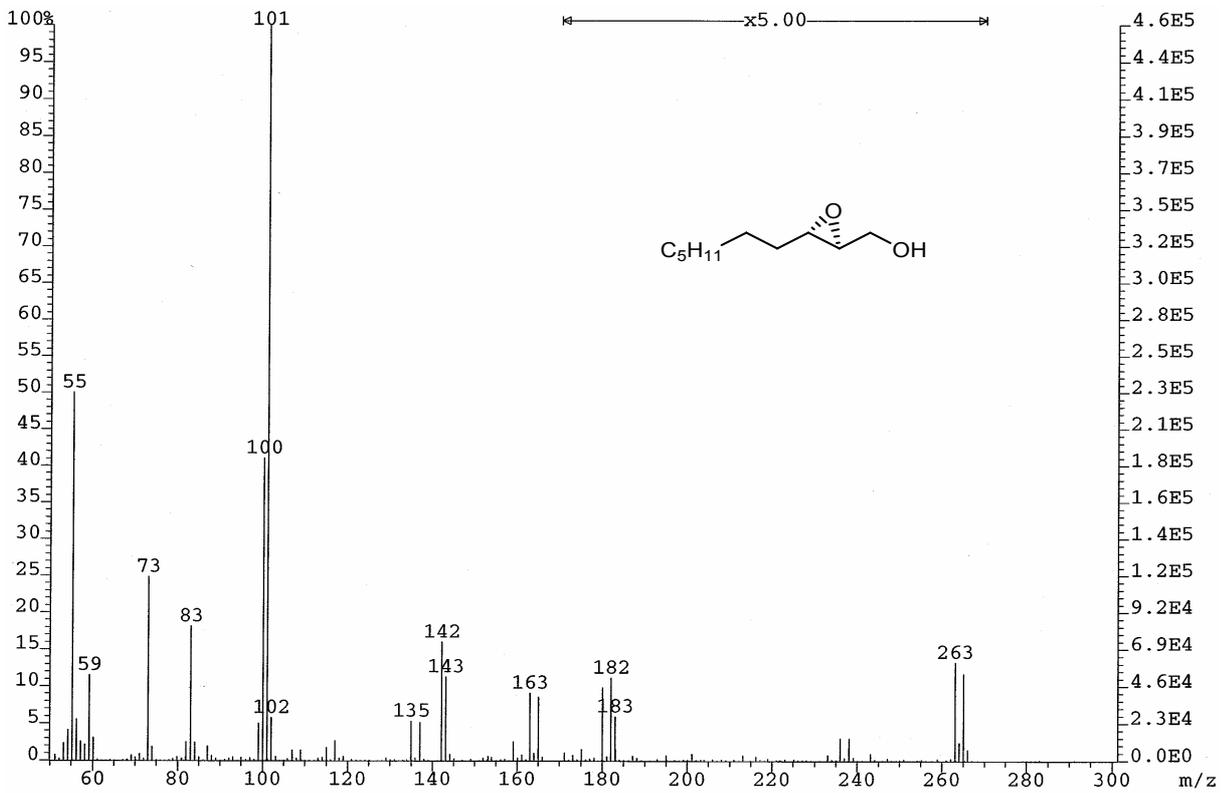
(6R)-[6-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-Tridec-4-ensäureisopropylester (103)



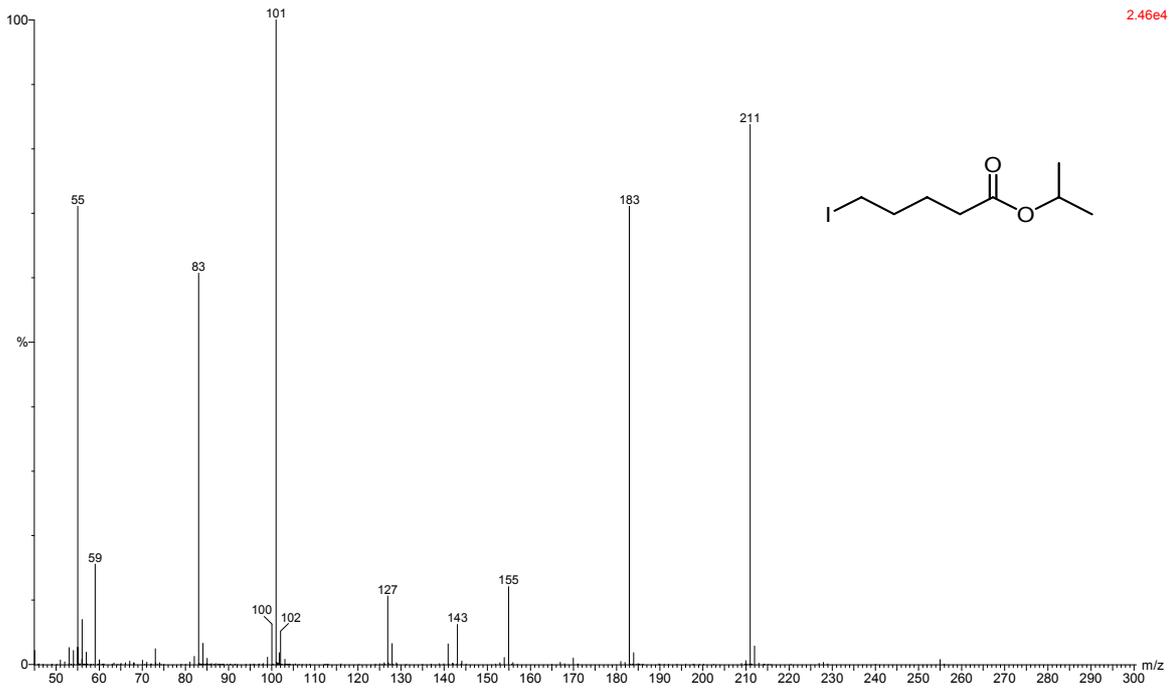
(6R)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Tridec-4-en-1-ol (104)



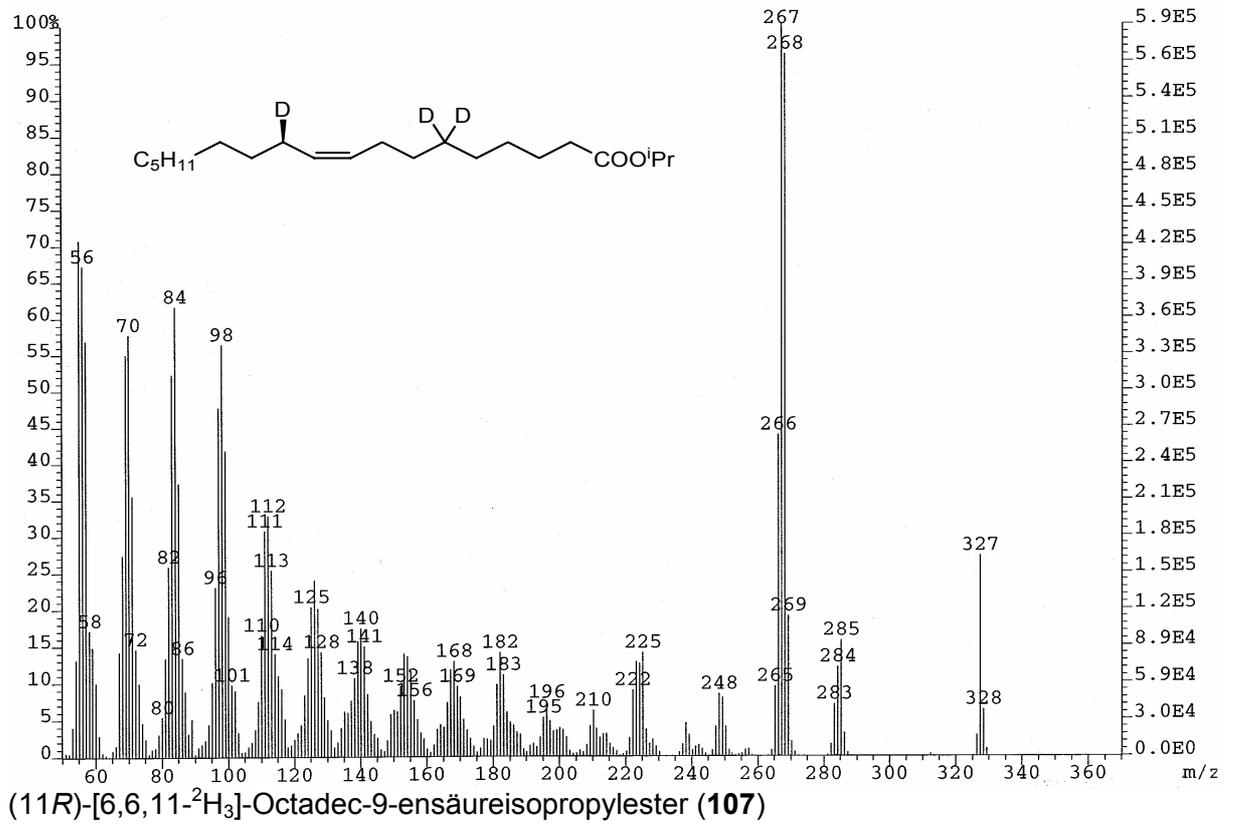
(6R)-[1,1,6-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-1-iodo-tridec-4-en (105)



5-Bromvaleriansäureisopropylester



5-Iodvaleriansäureisopropylester



(11R)-[6,6,11-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Octadec-9-ensäureisopropylester (107)

