

Die Chemie der Inositlipid-vermittelten zellulären Signalübertragung**

Barry V. L. Potter* und Dethard Lampe

Vor etwas mehr als einem Jahrzehnt berichteten Michael Berridge und seine Mitarbeiter in *Nature*: „... micromolar concentrations of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (1D-myoinositol 1,4,5-trisphosphate) release Ca^{2+} from a non-mitochondrial intracellular Ca^{2+} store in pancreatic acinar cells. Our results strongly suggest that this is the same Ca^{2+} store that is released by acetylcholine“. Mit der Entdeckung eines niedermolekularen sekundären Botenstoffs, der die räumlich getrennten Ereignisse der Aktivierung von Rezeptoren an der Zelloberfläche und der intrazellulären Ca^{2+} -Mobilisierung verbindet, wurde eine neue Ära auf

dem Gebiet der Signalvermittlung eingeleitet und eine Renaissance der Inosit- und Inositphosphatchemie stimuliert. Die Synthese von Inositolpolyphosphaten bringt mehrere Probleme mit sich: die regiospezifische Einführung von Schutzgruppen am Inositingring, die Racematspaltung der resultierenden Zwischenprodukte, die Phosphorylierung des Polyols, die Entfernung aller Phosphat-Schutzgruppen unter Vermeidung einer gleichzeitigen Wanderung von Phosphatgruppen sowie die Reinigung des wasserlöslichen Ziel-Polyanions. Mit der Lösung dieser Probleme in den letzten Jahren ist es jetzt möglich, über die

Synthese von natürlichen Inositphosphaten hinaus (von denen ständig mehr gefunden werden) zur Entwicklung von chemisch modifizierten Inositphosphat-Analoga überzugehen, mit der Aussicht, Enzyminhibitoren, zweckmäßig modifizierte Rezeptorliganden und -antagonisten sowie vielleicht sogar Therapeutika für den pharmakologischen Eingriff in Signalübertragungsbahnen zu entwickeln.

Stichworte: Inositphosphate · Sekundäre Botenstoffe · Signalübertragung

1. Transmembrane Signalübertragung

Um zusammenarbeiten zu können, müssen Zellen in mehrzelligen Organismen miteinander kommunizieren. Sie vermitteln Signale durch Substanzen wie Hormone oder Neurotransmitter (Abb. 1). Lipophile Hormone wie Steroide können die Zellmembran passieren und sich an ihre Rezeptoren im Zellinneren anlagern. Viele chemische Botenstoffe sind jedoch zu hydrophil, um Membranen passieren zu können. Zur Überbringung ihrer

Botschaft lagern sie sich an spezifische Rezeptoren an der Außenseite der Zellmembran an und aktivieren dadurch Mechanismen, die das Signal in die Zelle weitervermitteln – ein Vorgang, der als transmembrane Signalübertragung bezeichnet wird. Diverse Arten von Rezeptoren sind an der Signalübertragung beteiligt: Ist der Rezeptor mit einem Ionenkanal verbunden, kann das Öffnen dieses Kanals zum Ein- oder Ausstrom von Ionen in

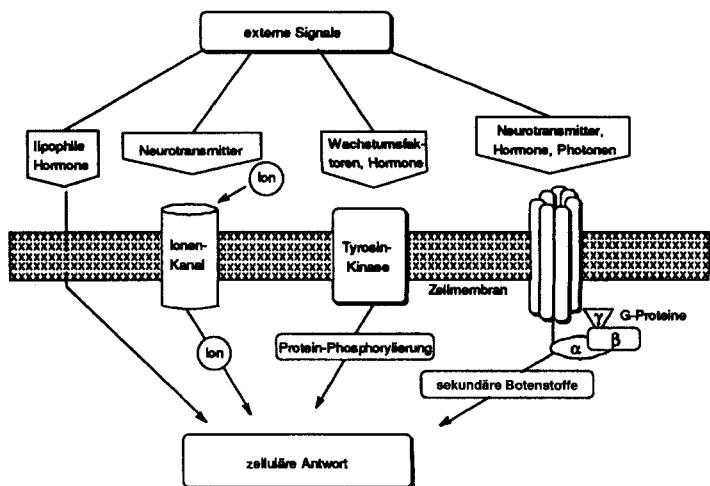


Abb. 1. Getting the message across: Signalübertragungsmechanismen.

[*] Prof. Dr. B. V. L. Potter, Dr. D. Lampe
School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath
Bath BA2 7AY (Großbritannien)
Telefax: Int. + 1225/826-114
E-mail: B. V. L. Potter@bath.ac.uk

[**] In diesem Beitrag verwendete Abkürzungen: All = Allyl, Bn = Benzyl, Bz = Benzoyl, Cb = (R)-1-Phenylethylcarbamoyl, Cbz = Benzoyloxycarbonyl, Gro = Glycero, MEM = Methoxyethoxymethyl, MOM = Methoxymethyl, Ms = Methylsulfonyl, Piv = Pivaloyl, PMB = p-Methoxybenzyl, Prop = Prop-1-enyl, Ptd = Phosphatidyl, Tf = Trifluormethansulfonyl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl. Alle Verweise auf Inositol beziehen sich auf das *myo*-Isomer, es sei denn, es wird ein anderes Präfix verwendet. Inositphosphate werden als Ins, InsP_1 , InsP_2 , InsP_3 , InsP_4 , InsP_5 und InsP_6 abgekürzt (Inositol, Inositomono-, -bis-, -tris-, -tetrakis-, -pentakis- bzw. hexakisphosphat, mit einer Anordnung der isomeren Phosphatgruppen wie in Klammern angegeben. Desoxyfluor-Analoga sind durch ein Präfix gekennzeichnet, das sich aus einer Nummer für die Position, in der die Substitution durch Fluor stattgefunden hat, sowie dem Buchstaben F zusammensetzt, z. B. 2-F- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ = 2-Desoxy-2-fluorinosit-1,4,5-trisphosphat, und Phosphorothioat-Analoga sind durch ein Suffix, das den Buchstaben S enthält, gekennzeichnet, z. B. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{-S}$ = Inositol-1,4-bisphosphat-5-phosphorothioat.

bzw. aus der Zelle führen. Eine Änderung der Ionenkonzentration im Cytosol aktiviert zelleigene Enzyme und bewirkt so eine Antwort. Eine andere Rezeptorklasse sind die Rezeptor-Tyrosinkinasen, die selbst Enzyme sind. Sie sind in die Zellmembran eingebettet und haben Bindungstellen für Agonisten an der Außenseite und aktive Zentren an der Membraninnenseite. Durch Andocken von Agonisten wird das Enzym aktiviert, was die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Zielproteinen in der Zelle zu Folge hat. Diese Art der Signalübertragung wird von vielen Wachstumsfaktoren und Hormonen einschließlich Insulin benutzt^[1]. Die Rolle von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen bei der Vermittlung des Informationsflusses von Rezeptor-Tyrosinkinasen zu ras-Proteinen ist inzwischen aufgeklärt^[2].

Viele wasserlösliche Hormone bedienen sich eines Signalübertragungssystems, bei dem der Rezeptor über einen intrazellulären Effektor mit der Produktion eines internen Signalmoleküls gekoppelt ist. Nach Anlagerung an ihr Rezeptorprotein an der Zelloberfläche wird ein membranständiges GTP-bindendes Protein (G-Protein)^[3–5] aktiviert, das mit dem Rezeptor assoziiert ist. Die Gruppe der G-Proteine umfaßt mehrere Mitglieder, die unterschiedliche intrazelluläre Prozesse regulieren. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, die nach abnehmender Masse als α -, β - und γ -Untereinheiten bezeichnet werden. Nach der Aktivierung wird an die α -Untereinheit gebundenes GDP durch GTP ersetzt, wobei die β,γ -Untereinheit von der aktivierte α -GTP-Untereinheit dissoziiert. Die freigesetzten Untereinheiten können nun andere membranständige Enzyme, die als Signalverstärker fungieren, stimulieren oder hemmen (z. B. K⁺- und Ca²⁺-Kanäle, Adenylylat-Cyclase (AC), Guany-

lat-Cyclase (GC), PtdIns(4,5)P₂-spezifische Phospholipase C (PtdIns-PLC)) und ihrerseits sekundäre Botenstoffe an der cytosolischen Seite der Zellmembran bilden. Die der α -Untereinheit eigene GTPase-Aktivität hydrolysiert dann GTP zu GDP, die α -GDP-Untereinheit und die β,γ -Untereinheit assoziieren wieder und das G-Protein kehrt zum Grundzustand zurück.

1.1. Sekundäre Botenstoffe

Als sekundäre Botenstoffe wurden bisher cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), Diacylglycerin (DAG), Ins(1,4,5)P₃ und natürlich Ca²⁺-Ionen identifiziert. Gegenwärtig zieht auch Phosphatidylinosit-3,4,5-trisphosphat als potentieller sekundärer Botenstoff beträchtliches Interesse auf sich (siehe Abschnitt 2). Neuere Studien legen nahe, daß cADP-Ribose, ein NAD⁺-Metabolit, ebenfalls Ca²⁺-mobilisierende Eigenschaften aufweisen könnte^[6–8], und das Sphingolipid-Stoffwechselprodukt Sphingosin-1-phosphat könnte als potentieller sekundärer Botenstoff an Signalübertragungen beteiligt sein, die von einigen Mitogenen aktiviert werden^[9].

1.2. Die Rolle von Ca²⁺ in der Signalübertragung

Der erste Hinweis darauf, daß Ca²⁺ eine Rolle in der Regulierung zellulärer Ereignisse spielt, war eine Beobachtung von Ringer im Jahre 1883^[10]. Bei der Untersuchung von Muskelgewebe

Barry V. L. Potter, geboren 1953 in Brighton (Großbritannien), studierte Chemie an der University of Oxford als Stipendiat des Worcester College, graduierte mit Auszeichnung und erhielt den Part-II-Thesis-Preis in Organischer Chemie. Er promovierte 1981 in Oxford in Biorganischer Chemie bei Prof. Gordon Lowe über enzymkatalysierte Phosphoryltransferreaktionen mit chiralen [¹⁶O, ¹⁷O, ¹⁸O]Phosphat-estern als Graduate Scholar und als Junior Research Fellow des Wolfson College. Nach einem Postdoktoranden-aufenthalt als European Exchange Fellow der Royal Society bei Prof. Fritz Eckstein am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen, wo er sich mit Nucleinsäurechemie und Molekularbiologie beschäftigte, nahm er 1984 eine Stelle als Dozent in Biologischer Chemie an der University of Leicester an. 1987 erhielt er ein Lister Institute Research Fellowship, 1990 folgte er als Lister Institute Research Professor einem Ruf auf den Lehrstuhl für Medizinische Chemie an der School of Pharmacy und Pharmacology an der University of Bath, und 1993 erhielt er seinen DSc von der University of Oxford. Seine Forschungsinteressen liegen in Biologischer und Medizinischer Chemie auf den Gebieten Enzymmechanismen, Nucleinsäure- und Phosphorchemie. Besondere Schwerpunkte sind die Chemie von sekundären Botenstoffen und die Synthese von Rezeptorliganden und Enzyminhibitoren.

Dethard Lampe, geboren 1963 in Delmenhorst, studierte Chemie in Hamburg und Göttingen, wo er 1989 bei Prof. H.-D. Söling in Klinischer Biochemie sein Diplom erhielt. Im gleichen Jahr schloß er sich als Wellcome-Trust-Prize-Stipendiat der Arbeitsgruppe von Dr. B. V. L. Potter in Leicester (Großbritannien) an und ging 1990 an die School of Pharmacy und Pharmacology an der University of Bath. Dort promovierte er 1993 über die Synthese von neuartigen Inositphosphat-Analoga. Anschließend war er an Projekten auf dem Gebiet der Inositpolyphosphate beteiligt. Seit Anfang 1995 ist er am Instituto de Química Orgánica General, CSIC (Prof. M. Martín-Lomas) in Madrid tätig, wo er sich mit Synthesen von bioaktiven Oligosacchariden beschäftigt.



B. V. L. Potter



D. Lampe

stellte er fest, daß er nach dem Austausch des Leitungswassers in seinem Medium durch destilliertes Wasser keine Kontraktionen mehr herbeiführen konnte. Als fehlende Komponente wurde Ca^{2+} identifiziert.

Heute wissen wir, daß viele zelluläre Abläufe durch Proteinphosphorylierungen kontrolliert werden, die durch Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beeinflußt werden, und die Freisetzung von Ca^{2+} gilt als primäre Wirkung vieler Agonisten. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration kann auf zwei Arten reguliert werden:

1. Viele Agonisten induzieren eine Änderung der Membranpotentialdifferenz, was die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Membran zur Folge hat. Da die meisten Ca^{2+} -Ionen innerhalb der Zelle an Membranen oder Proteine gebunden sind, ist der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel niedrig und es besteht deshalb ein großer Konzentrationsgradient, so daß der Einstrom von Ionen in die Zelle begünstigt und dadurch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird.

2. Andere Agonisten sind in der Lage, Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zu mobilisieren, so daß die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht und Ca^{2+} -abhängige Enzyme aktiviert werden. Die Antwort der Zelle hängt sowohl vom Zelltyp als auch vom Agonisten ab.

2. Inositol-1,4,5-trisphosphat: ein sekundärer Botenstoff

Im Jahre 1850 isolierte Scherer ein optisch inaktives Cyclohexanol-Isomer aus Muskelfleisch, das er Inositol nannte^[11]. Ein gutes Jahrhundert später und einige Jahre vor der Entdeckung des mittlerweile etablierten sekundären Botenstoffes 3',5'-cyclisches AMP durch Rall und Sutherland^[12, 13] zeigten Lowell und Mabel Hokin, daß Acetylcholin die Metabolisierung von inosithaltigen Phospholipiden in der Bauchspeicheldrüse und im Cortex stimuliert^[14]. Inosithaltige Phospholipide waren ungefähr zehn Jahre zuvor von Folch in Gehirngewebe nachgewiesen worden^[15]. Später wurde der von den Hokins beschriebene Phospholipid-Effekt auch in anderen Systemen nach Stimulierung durch Agonisten festgestellt, was auf eine Rolle dieser Lipide in der Kopplung von Stimulus und Antwort hindeutete. Neue analytische Methoden halfen Ende der fünfziger Jahre bei der Trennung der inosithaltigen Phospholipide in Phosphatidylinositol (PtdIns), Phosphatidylinosit-4-phosphat [PtdIns(4)P] und Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat [PtdIns(4,5)P₂]^[16] (Abb. 2), und die chemischen Strukturen dieser Verbindungen wurden bald darauf durch Ballou et al. aufgeklärt^[17]. Trotz dieser Fortschritte kam man in den darauf folgenden Jahren im Verständnis der physiologischen Bedeutung der stimulierten Phospholipid-Umsetzung nur wenig voran, vor allem, weil PtdIns als überwiegend vorkommenden Phospholipid zu viel Aufmerksamkeit gewidmet wurde.

Der Durchbruch kam 1975, als Michell^[18] die Verbindung zwischen dem Agonisten-stimulierten Phospholipid-Stoffwechsel und erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen erkannte, die im Hinblick auf die Regulierung vieler zellulärer Prozesse schon verstärkt untersucht wurden. Es fehlte aber immer noch das chemische Bindeglied zwischen diesen Ereignissen. Ende 1983 wurde dann schließlich von Berridge et al. in Cambridge,

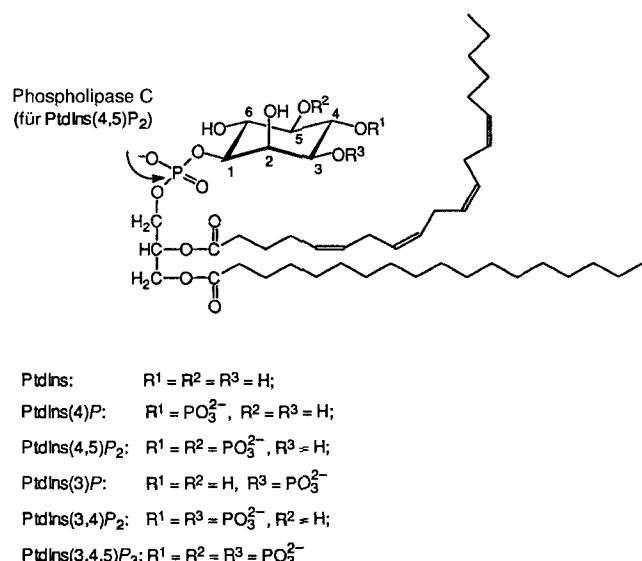


Abb. 2. Angriffsstelle der Phospholipase C bei einigen Inositphospholipiden.

Großbritannien, und Frankfurt^[19] der gesuchte sekundäre Botenstoff als ein *myo*-Inositpolyphosphat identifiziert, das sich von dem nur in geringer Menge vorkommendem Phospholipid PtdIns(4,5)P₂ ableitet: „micromolar concentrations of Ins(1,4,5)P₃ (1D-*myo*-inositol 1,4,5-trisphosphate) release Ca^{2+} from a non-mitochondrial intracellular Ca^{2+} store in pancreatic acinar cells. Our results strongly suggest that this is the same Ca^{2+} store that is released by acetylcholine“.

Mit diesen Entdeckungen wurde ein neues Kapitel in der Signalübertragung aufgeschlagen, und seitdem waren die Fortschritte auf diesem Gebiet spektakulär, wie folgender Kommentar von Hokin zeigt^[20]: „the phosphoinositide field is currently the number one field in biochemistry in the number of citations (excluding molecular biology)“. Die Forschungsaktivitäten wurden durch Auffinden eines überaus komplexen Inositphosphat-Stoffwechsels^[21, 22] unter Beteiligung von höheren Inositphosphaten wie InsP₆ und sogar pyrophosphathaltigem InsP₇ und InsP₈^[23] weiter angeregt. Noch faszinierender ist die Charakterisierung der neuen inosithaltigen Phospholipide PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (Abb. 2), die nach der Stimulierung einer 3'-Kinase durch Wachstumsfaktoren in Zellen gebildet werden^[24]. Besonders das letztgenannte Phospholipid könnte selbst ein sekundärer Botenstoff sein. Dieses Gebiet wird derzeit eingehend untersucht und scheint ein völlig neuer Zweig der Polyphosphoinositid-vermittelten Signalübertragung zu sein. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß der Zellkern einen eigenen autonomen Phosphoinositid-Signalapparat zu haben scheint^[25, 26]. Einige dieser neueren Aspekte der Polyphosphoinositid-Signalkette sind zusammengefaßt worden^[27]. Obwohl ein diskretes Molekül noch identifiziert werden muß, hat unlängst die Entdeckung eines Ca^{2+} -Einstrom-Faktors (Ca^{2+} influx factor, CIF)^[28, 29] für viel Aufregung gesorgt. CIF scheint ein diffundierender Botenstoff zu sein, der in angeregten Zellen aus aktivierten intrazellulären Bereichen freigesetzt wird und den Einstrom von Ca^{2+} durch die Plasmamembran stimuliert^[30, 31]. Es soll hier auch auf vor kurzem erschienene Berichte aufmerksam gemacht werden, in denen gezeigt wird, daß die Bindungsaffinität der *Penicillium*-

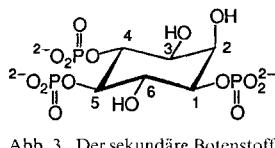


Abb. 3. Der sekundäre Botenstoff
d-myoinositol-1,4,5-trisphosphat.

brevicompactum - Stoffwechselprodukte Adenophostin A und B zum Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor höher als die von Ins(1,4,5)P₃ ist^[32–34] (Abb. 3).

Während die rapiden Fortschritte in den letzten zehn Jahren vorwiegend auf biologischem Gebiet waren, ist klar, daß gegenwärtige und zukünftige Anstrengungen auf pharmakologische Eingriffe in das Polyphosphoinositid-Signalsystem gerichtet sein werden. Die ersten Synthesen von Ins(1,4,5)P₃ wurden 1986–1987 veröffentlicht, und in der Folge wurden bedeutende Fortschritte in der Synthese gemacht, so daß heute die Schwierigkeiten bei der Herstellung von Inositphosphaten im wesentlichen ausgeräumt sind. Der komplexe, immer noch nicht vollständig aufgeklärte Inositphosphatmetabolismus bietet allerdings ständig neue Syntheseziele. Darüber hinaus sind Rezeptoren, die sekundäre Botenstoffe binden, Enzyme, die diese abbauen und die Wege, auf denen sie gebildet werden, naturgemäß potentielle Ziele für das rationale Wirkstoffdesign^[35–37]. Der Schwerpunkt der Syntheseaktivitäten verlagert sich daher in Richtung auf strukturmodifizierte Inositphosphate mit neuartigen biologischen Eigenschaften.

Im Mittelpunkt dieses Beitrags stehen neuere chemische Fortschritte auf diesem Gebiet. Obwohl versucht werden soll, die wesentlichen biologischen Zusammenhänge zu umreißen, würde eine vollständige Darstellung der Biologie der letzten zehn Jahre den Rahmen dieses Artikels sprengen. Der Leser sei auf die vielen Übersichtsartikel^[22, 38–47] und Bücher^[48–52] zu diesem Thema verwiesen. Mehrere Aufsätze und Bücher über neuere Aspekte von Inositsynthesen sind erschienen^[53–56]. Zu früheren synthetischen Ansätzen sei der Leser auf zwei weitere Veröffentlichungen hingewiesen^[57, 58].

3. Konfiguration und Nomenklatur von Inositderivaten

3.1. Konfiguration und Nomenklatur

Nach Scherers Entdeckung von „Inositol“^[11] wurde in der englischsprachigen Literatur die Nachsilbe -ol hinzugefügt, und weitere entdeckte oder synthetisierte Isomere erhielten ebenfalls den Namen Inositol. Es gibt neun isomere Inosite einschließlich eines Enantiomerenpaares^[59] mit den Präfixen: *scylo*-, *myo*-, *neo*-, *epi*-, *cis*-, *muco*-, *allo*-, *D-chiro*(+)- und *L-chiro*(−)- (Abb. 4). Die große Zahl von Inositen und ihren Derivaten hat zu Problemen in der Nomenklatur geführt, von denen noch nicht alle vollständig geklärt wurden. Die „1967 IUPAC Tentative Rules for Cyclitols“^[60] haben die Standardisierung einen beträchtlichen Schritt vorwärts gebracht, aber einige Schwierigkeiten bestehen immer noch. Einige Aspekte dieser Regeln sind in Abschnitt 3.2. für *myo*-Inositol dargelegt. Es wurde angeregt, die stereospezifische Numerierung für Inositderivate zu übernehmen^[61], doch ist dieser Vorschlag noch nicht allgemein akzeptiert. Eine Notiz zu Versuchen, Nomenklatur und Abkürzungen zu vereinfachen, ist erschienen^[62]. Für eine vereinfachte Diskussion dieses Themas sei der Leser auf einen ausgezeichneten Aufsatz^[63] aufmerksam gemacht.

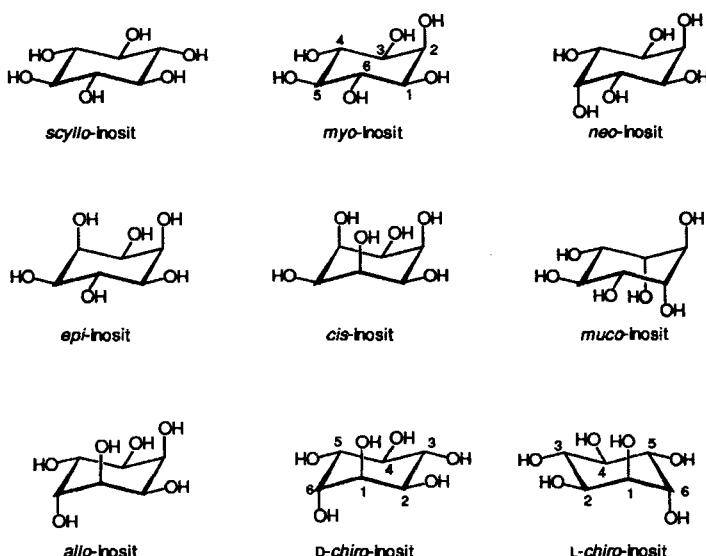


Abb. 4. Die neun Inositolisomere.

3.2. *myo*-Inositol

myo-Inositol ist ein *meso*-Cyclohexanhexol oder Cyclitol, und weist dementsprechend eine Symmetrieebene mit fünf äquatorialen und einer axialen Hydroxygruppe auf. Das Kohlenstoffatom, das die axiale Hydroxygruppe trägt, wird als C-2 bezeichnet, und die anderen Ringkohlenstoffe werden von C-1 bis C-6 im oder gegen den Uhrzeigersinn durchnummeriert, wobei sich C-1 auf einer der beiden Seiten von C-2 befindet. Vereinbarungsgemäß führt eine Numerierung gegen den Uhrzeigersinn bei einem asymmetrisch substituierten Inositol zur *D*- und eine Numerierung im Uhrzeigersinn zur *L*-Konfiguration. Es wird normalerweise dem Präfix Vorzug gegeben, das zu niedrigeren Ziffern in der Nummerierung der Substituenten führt. Die Symmetrieebene in *myo*-Inositol verläuft demzufolge durch C-2 und C-5.

Die Substitution an einem der symmetrie-verwandten Kohlenstoffatomepaare C-1, C-3 und C-4, C-6 führt zu *D*- oder *L*-Enantiomeren. Die Substitution an C-2 und/oder C-5 resultiert in einem *meso*-Produkt und ein Präfix ist hier unangebracht. In Abbildung 5 sind die Enantiomere von Ins(1,4)P₂ dargestellt.

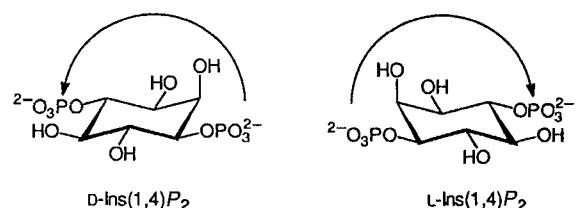


Abb. 5. Die Enantiomere von *myo*-Inositol-1,4-bisphosphat.

D-Ins(1,4)P₂ ist ein durch Phosphatase aus Ins(1,4,5)P₃ gebildetes Stoffwechselprodukt, und *L*-Ins(1,4)P₂ ist das synthetische Enantiomer. Die Numerierung wird so gewählt, weil die Alternative, *L*-Ins(3,6)P₂ bzw. *D*-Ins(3,6)P₂, zu größeren Bezifferungen führt. Striktes Einhalten der IUPAC-Regeln kann jedoch problematisch sein, besonders beim Verfolgen von Metabolis-

muswegen, wo sich verwirrende Nomenklaturänderungen ergeben können. So wird D-*myo*-Inositol-3,4-bisphosphat (Name nach der IUPAC-Konvention: L-*myo*-Inositol-1,6-bisphosphat) durch Phosphatasen zum Monophosphat L-*myo*-Inositol-1-phosphat abgebaut, obwohl der nichtkonventionelle Name D-*myo*-Inositol-3-phosphat ein schnelleres Nachvollziehen dieser Reaktion ermöglicht. In einer IUPAC-Empfehlung wurde vorgeschlagen, alle biologisch relevanten Verbindungen als D-Derivate zu kennzeichnen^[64]. Diese Konvention wird, wo möglich, in diesem Beitrag folgt.

4. Biosynthese und Metabolismus von *myo*-Inositolphosphaten

4.1. Biosynthese von *myo*-Inositol

Der größte Teil des von Menschen aufgenommenen *myo*-Inosits stammt aus Pflanzen, nur ein Bruchteil wird biosynthetisiert. Die De-novo-Synthese ist sowohl in Pflanzen als auch Tieren durch die von L-*myo*-Inositol-1-phosphat-Synthase (D-*myo*-Inositol-3-phosphat-Synthase) katalysierte Isomerisierung von D-Glucose-6-phosphat möglich. Dieses Enzym wurde aus Hefe^[65], Säugetierhoden^[66, 67] und Gehirngewebe^[68] zur Homogenität gereinigt. Der Biosyntheseweg^[69, 70] und stereochemische Aspekte sind diskutiert worden^[63]. Das D-Glucose-6-phosphat-Analogon D-Glucose-6-phosphorothioat ist überraschenderweise kein Substrat für L-*myo*-Inositol-1-phosphat-Synthetase^[71].

myo-Inositol wird dann durch Inositol-Monophosphatase aus L-*myo*-Inositol-1-phosphat gebildet. Die Monophosphatase ist ein Schlüsselenzym im Phosphatidylinositol-Cyclus, da es beide Ins(1)P-Isomere hydrolysiert, das auf obigem Weg entstandene L-Isomer und das durch die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Phospholipiden gebildete D-Isomer. Es wurde gezeigt, daß dieses Enzym auch D- und L-Ins(4)P und in vitro Ins(5)P dephosphoryliert^[72]. *myo*-Inositol-Monophosphatase wurde aus Gehirngewebe isoliert^[73–75] und eine Kristallstrukturanalyse des Enzyms ist inzwischen veröffentlicht worden^[76].

Großes Interesse wird diesem Enzym auch deswegen beigemessen, weil es durch Lithium-Kationen gehemmt werden kann. 1971 wurde bemerkt, daß die Konzentration von freiem *myo*-Inositol im Gehirn von mit Li⁺ behandelten Ratten beträchtlich erniedrigt ist^[77]. Gegenwärtig wird aktiv nach Bindegliedern zwischen den bekannten therapeutischen Wirkungen von Li⁺ bei der Behandlung von manischen Depressionen und seiner Hemmung von *myo*-Inositol-Monophosphatase gesucht. Da mit der Nahrung aufgenommenes *myo*-Inositol die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und somit das Gehirn nicht erreichen kann, muß es hier de novo aus D-Glucose-6-phosphat biosynthetisiert werden. Wird der letzte Schritt auf diesem Weg, die Dephosphorylierung von L-Ins(1)P, durch Li⁺ blockiert, kann das Gehirn seine Vorräte an Phosphatidylinositol-Lipiden nicht wieder auffüllen. Das auf diesen Lipiden basierende Botenstoff-System (siehe Abschnitt 4.2), das von Neurotransmittern in der zellulären Signalvermittlung zur Änderung der elektrischen Aktivität benutzt wird, ist dann nicht funktionsfähig. Es wird vermutet, daß dies besonders hyperaktive Zellen, wie sie in einigen Fällen von Manie vorkommen, betrifft^[78, 79]. Diese

wichtigen Aspekte sind in Übersichtsartikeln zusammengefaßt worden^[80–82].

Die Inhibierung von Inositol-1-phosphatase durch Li⁺-Ionen^[83] ist ungewöhnlich, da sie nichtkompetitiv ist. Es wird angenommen, daß Li⁺ den zweiten Schritt der Dephosphorylierung, den Zerfall der Phosphoryl-Enzym-Zwischenstufe, hemmt, möglicherweise indem es durch ein im aktiven Zentrum angreifendes Wassermolekül koordiniert wird, wodurch die Nucleophilie dieses Wassermoleküls abnimmt^[83, 84]. Ein besseres Verständnis des Mechanismus der Inhibierung durch Li⁺ auf molekularer Ebene wird zusammen mit der Kristallstrukturanalyse des Enzyms und den umfassenden gegenwärtigen Anstrengungen in medizinischer Chemie wesentlich zur rationellen Entwicklung von Mimetica mit potentiellen antimanicen Eigenschaften beitragen. Mehrere wirksame, allerdings kompetitive Enziminhibitoren sind inzwischen synthetisiert worden (siehe Abschnitt 9).

4.2. Der Phosphatidylinositol-Cyclus

Inosithaltige Phosphatide (Abb. 2) machen weniger als 10 % des gesamten Phospholipidgehaltes in Tierzellen aus. PtdIns ist das häufigste (> 90 %) und kommt vorwiegend im endoplasmatischen Reticulum (ER) vor. Die Polyphosphoinositide PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ sowie eine kleine Menge an PtdIns befinden sich an der Innenseite der Plasmamembran.

Pflanzliches PtdIns hat eine andere Struktur als PtdIns aus tierischen Quellen. (Eine Beschreibung der Phosphoinositid-vermittelten Signalübertragung in Pflanzen, die bereits von Drøbak zusammengefaßt wurde^[85], ist außerhalb des Rahmens dieses Beitrags.) In Pflanzen ist das sn-2-Glycerin-Kohlenstoffatom mit der C₁₈-Fettsäure Linolsäure (18:2) und die sn-1-Position mit (16:0)-, (18:0)- oder (18:2)-Fettsäuren verknüpft, während in Tieren an C-2 vorwiegend Arachidonsäure (20:4) und an C-1 Stearinsäure (18:0) vorkommen. PtdIns wird durch eine spezifische Kinase (PtdIns-4-Kinase) zum 4-Phosphat PtdIns(4)P und dieses durch eine andere Kinase (PtdIns-5-Kinase) zum Schlüssel-Lipid PtdIns(4,5)P₂ phosphoryliert. Darüber hinaus können spezifische Phosphomonoesterasen PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ dephosphorylieren^[86]. Nach Aktivierung des Rezeptors aktiviert das assoziierte G-Protein die membranständige Phosphodiesterase (Phosphoinositidase) Phospholipase C^[87]. Diese spaltet PtdIns(4,5)P₂ in die beiden sekundären Botenstoffe D-*myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat (Abb. 3) und 1,2-Di-O-acylglycerin (DAG), wodurch eine Gabeung des Signalübertragungsweges erreicht wird. Das hydrophile Ins(1,4,5)P₃ diffundiert ins Cytosol und aktiviert dort einen an der Oberfläche des ERs befindlichen Rezeptor eines Ca²⁺-Kanals, wodurch Ca²⁺ aus einem internen Speicher freigesetzt wird (siehe Abschnitt 5). Nishizuka et al. zeigten, daß DAG Proteinkinase C (PKC) aktiviert^[88, 89]. PKC wurde als der lange gesuchte „Rezeptor“ für tumorfördernde Phorbolester identifiziert^[90]. Ursprünglich wurde angenommen, daß es sich bei PKC nur um eine Verbindung handelt, doch ist inzwischen klar, daß es eine große Familie von Proteinkinase C-Isozytmen gibt^[91–93]. DAG ist hydrophob, bleibt in der Membranebene und kann auf zwei Wegen – durch eine Kinase oder eine Lipase – metabolisiert werden. Im ersten Fall bleiben die Fettsäurereste

erhalten und DAG wird zu Phosphatidsäure phosphoryliert, die mit Cytidin-5'-monophosphat (CMP) CMP-Phosphatidat bildet. Mit einem Inositmolekül kann daraus wieder PtdIns entstehen. Diese Reaktion wird durch PtdIns-Synthetase katalysiert. Im zweiten Fall wird DAG durch eine Lipase unter Freisetzung der in der Prostaglandin-Synthese benötigten Eicosanoid-Vorstufe Arachidonsäure^[94] zum Monoacylglycerin hydrolysiert. Der DAG-Signalübertragungsweg wurde unter Strukturaspekten mit DAG-Analoga untersucht^[95, 96]. Die Strukturvoraussetzungen für die PKC-Aktivierung durch Lipide wurden in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt^[97].

Abgesehen von den genannten, etablierten Phosphatidylinositolipiden, deren Beteiligung an der Signalvermittlung heute unbestritten ist, wurde vor kurzem ein weiteres großes Feld durch die Entdeckung von drei Phospholipiden mit einer Phosphatgruppe in der D-3-Position des Inosittringes eröffnet. Diese Lipide sind PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (Abb. 2). Ihre Herkunft wurde zunächst heftig diskutiert^[98], doch wird jetzt allgemein akzeptiert, daß die direkte Phosphorylierung von PtdIns(4,5)P₂ durch eine 3-Kinase (PtdIns-3K)^[99] der Hauptbildungsweg von PtdIns(3,4,5)P₃ in stimulierten Zellen ist. PtdIns(3)P und PtdIns(3,4)P₂ werden aus der Stammverbindung PtdIns(3,4,5)P₃ durch Phosphatase gebildet^[24, 100]. Die 3-phosphorylierten Lipide sind anders als PtdIns(4,5)P₂ keine Substrate für Phospholipase C und können deshalb nicht als Vorstufen für Inositphosphat-Signalverbindungen dienen^[101]. Die PtdIns-3K-Aktivierung ist der mitogenen Signalvermittlung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen eigen^[102], die durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden, und ist auch an der Vermittlung von Signalen durch viele Rezeptor- und Nichtrezeptor-Protein-Tyrosinkinasen beteiligt^[103, 104]. Noch ist eine eigenständige Rolle von PtdIns(3,4,5)P₃ als sekundärer Botenstoff nicht offensichtlich, und die Suche nach einem intrazellulären Effektor hält an. Möglicherweise wechseltwirkt PtdIns(3,4,5)P₃ wie PtdIns(4,5)P₂^[105] mit dem Cytoskelett.

4.3. Der *myo*-Inositol-1,4,5-trisphosphat-Metabolismus

Einmal in der Zelle freigesetzt, muß ein sekundärer Botenstoff zur Beendigung seiner Wirkung und zur Herstellung des Grundzustands der Zelle als Vorbereitung für einen neuen Stimulus effizient deaktiviert werden. Allerdings können die Metaboliten des sekundären Botenstoffs in der Zelle ebenfalls physiologisch aktiv sein. Ins(1,4,5)P₃ wurde unter diesen Gesichtspunkten in den letzten Jahren eingehend untersucht. Dabei wurde klar, daß sein Abbau zu freiem Inosit, das zur Lipidsynthese wiederverwendet wird, sehr komplex ist und viele, oft schwer voneinander trennbare Inositphosphate entstehen. Dieser PtdIns-Kreislauf soll hier nur grob umrissen werden, Einzelheiten sind in ausführlichen Übersichtsartikeln zusammengefaßt^[21, 22, 106]. Die Grundzüge des Ins(1,4,5)P₃-Stoffwechsels sind in Abbildung 6 dargestellt.

Die durch PLC bewirkte Spaltung von PtdIns(4,5)P₂ wird durch die Tatsache kompliziert, daß Ins(1,4,5)P₃ nicht das einzige hydrophile Produkt ist. Der Angriff von H₂O auf die Phosphodiesterbindung von PtdIns(4,5)P₂ liefert Ins(1,4,5)P₃ und DAG, aber die Spaltung kann auch – z. B. in thrombinstimulierten Blutplättchen^[107] – durch den Angriff der 2-Hydroxygruppe

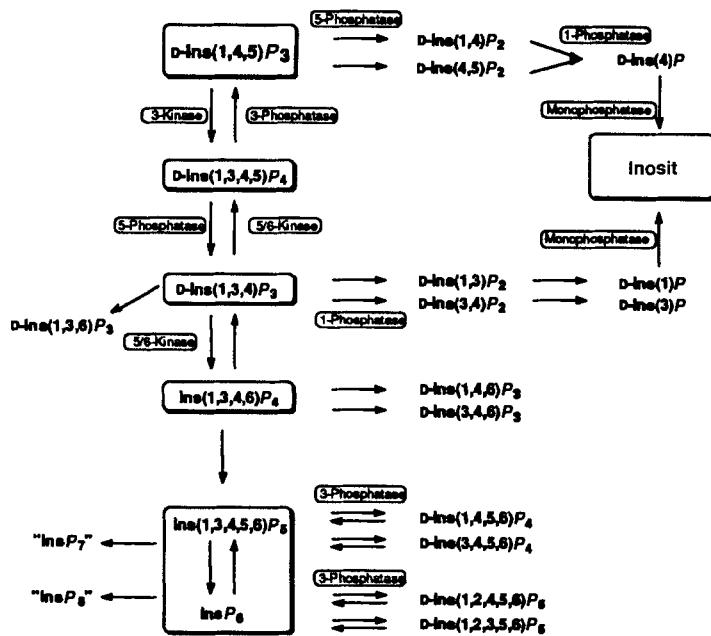


Abb. 6. Der Inositphosphat-Stoffwechsel.

am Phosphoratom herbeigeführt werden, was zu cyclischem Inositol-1:2,4,5-trisphosphat [cyclischem Ins(1:2,4,5)P₃] führt. Erste Berichte führten zu der Annahme, daß cyclisches Ins(1:2,4,5)P₃ ein sekundärer Botenstoff sei^[108], aber diese frühen Resultate konnten nicht bestätigt werden^[109]. Auch ist die lange Halbwertszeit von cyclischem Ins(1:2,4,5)P₃ in Ohrspeicheldrüsen-Zellen mit einer physiologischen Funktion bei der Ausschüttung von Ca²⁺ nicht vereinbar^[110], und seine niedrige Konzentration in einigen stimulierten Zellen spricht gegen eine wichtige Botenrolle für diese Verbindung^[111]. Die Produktion von cyclischem Ins(1:2,4,5)P₃ ist nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand lediglich eine unvermeidbare, nichtfunktionelle Konsequenz der Wirkung von Phospholipase C^[112].

Die Rolle von Ins(1,4,5)P₃ als sekundärer Botenstoff ist mittlerweile akzeptiert. Zwei Hauptabbauwege sind entdeckt worden: Es war schon länger bekannt, daß Ins(1,4,5)P₃ durch eine 5-Phosphatase abgebaut wird, wie zuerst in Erythrocyten^[113] und später in vielen anderen Zellen gezeigt wurde^[121]. Es scheint mehrere Typen dieses Enzyms zu geben, und es existieren sowohl lösliche, cytosolische Formen als auch partikelartige, membrangebundene Formen. Menschliches Blutplättchenzytosol enthält z. B. zwei als Typ I und Typ II bezeichnete 5-Phosphatasen, und die partikelartige Typ-I-5-Phosphatase aus humangen Placentamembranen ist gereinigt und charakterisiert worden^[114]. Da für das Produkt der 5-Phosphatase-Einwirkung, Ins(1,4)P₂, keine physiologische Rolle in diesem Signalübertragungsweg bekannt ist (es gibt allerdings Berichte, nach denen Ins(1,4)P₂ als Aktivator von DNA-Polymerase α ^[115] und 6-Phosphofructo-1-Kinase^[116] wirkt), scheint es klar, daß durch dieses Enzym nur das Signal zur Ca²⁺-Mobilisierung abgeschaltet wird. Ins(1,4)P₂ wird über Ins(4)P zu Inositol abgebaut, das wieder in den Kreislauf eintritt.

1985 wurde das höhere Polyphosphat Ins(1,3,4,5)P₄ entdeckt^[117], und wenig später wurde das 3-Kinase-Enzym^[118] isoliert^[119, 120], sequenziert und geklont^[121, 122]. Dies führte zu einer weiteren Komplikation des Stoffwechselweges und löste

Spekulationen über die Funktion von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ aus, die trotz heftiger Diskussion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte^[123–126]. Eine beachtliche Kontroverse wurde durch den Vorschlag herbeigeführt, $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ agiere selbst als sekundärer Botenstoff und würde den Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch Plasmamembran-Ionenkanäle vermitteln^[127]. Ein Ende dieser Debatte ist noch nicht in Sicht.

Welche Funktion $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ auch immer hat, es scheint von derselben 5-Phosphatase wie $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ abgebaut zu werden. Erschwert wird die Aufklärung des Sachverhalts allerdings dadurch, daß es mehrere lösliche Subtypen sowie partikuläre Formen des Enzyms gibt^[128]. Beide Substrate werden durch das partikuläre und das lösliche Enzym Typ I gespalten, wobei $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ das bessere Substrat ist. Das Typ-II-Enzym weist eine sehr geringe Affinität für das Tetrakisphosphat auf^[21, 128, 129]. Für das Produkt $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ wurde auf Grundlage des Befundes, daß es intrazelluläres Ca^{2+} in geringem Maße mobilisiert, ebenfalls eine physiologische Funktion vorgeschlagen^[130]. Dies wurde jedoch nicht bestätigt^[131], und derzeit gibt es keine Anhaltspunkte für eine physiologische Rolle dieser Verbindung. Der Metabolismus von $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ ist je nach Gewebe unterschiedlich. Die Produkte $\text{Ins}(1,3)\text{P}_2$ und/oder $\text{Ins}(3,4)\text{P}_2$ werden anschließend in die Monophosphate $\text{Ins}(1)\text{P}$ bzw. $\text{Ins}(3)\text{P}$ umgewandelt, und diese werden schließlich durch Inositol-Monophosphatase zu Inositol dephosphoryliert.

Untersuchungen zur Aktivität von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ werden durch die Tatsache kompliziert, daß es in vielen Geweben durch eine 3-Phosphatase in $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ umgewandelt wird^[132, 133]. Es wird jetzt angenommen, daß InsP_5 und InsP_6 die physiologischen Substrate dieses Enzyms sind, da diese Verbindungen mit sehr viel größerer Affinität als $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ angegriffen werden^[134]. $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -3-Phosphatase wurde aus Hepatocyten isoliert^[134], in denen es im ER vorkommt^[135].

Weitere Stoffwechselwege wurden entdeckt: So kann $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ durch eine 5/6-Kinase zu $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ phosphoryliert werden^[136, 137], das eine geringe Ca^{2+} -mobilisierende Eigenaktivität aufweist^[138, 139]. Die 5/6-Kinase setzt darüber hinaus $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ um. In Tierzellen wird $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ durch die 5/6-Kinase zu $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ phosphoryliert, das zu drei Verbindungen, InsP_6 (Phytinsäure) und dem normalerweise nicht trennbaren Enantiomerenpaar $\text{Ins}(3,4,5,6)\text{P}_4$ und $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$, metabolisiert wird. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -5/6-Kinase wurde aus Leber mit einer InsP_6 -Affinitätsäule gereinigt^[140].

Das Vorkommen dieser höheren Inositpolyphosphate in Pflanzen und den Erythrocyten von Vögeln, wo sie als Phosphat-Speicher und Modulatoren der Sauerstoffaffinität von Hämoglobin fungieren, war schon länger bekannt^[57, 70]. Der Nachweis von höheren Inositpolyphosphaten in Säugetierzellen sowie Befunde, nach denen diese Verbindungen intra- und extrazelluläre Signale im Gehirn übertragen könnten^[141, 142], sind für dieses Gebiet sehr vielversprechend^[143]. Es ist allerdings unwahrscheinlich, daß diese höheren Polyphosphate direkt an der Signalübertragung beteiligt sind. Für InsP_6 wurde eine physiologische Rolle als Inhibitor der Eisen-katalysierten Hy-

droxylradikalbildung vorgeschlagen^[144]. InsP_6 kann überraschenderweise weiter phosphoryliert werden: Es gibt Hinweise für die Existenz der pyrophosphathaltigen höheren Polyphosphate InsP_7 und InsP_8 ^[123], deren Strukturen bisher noch nicht eindeutig charakterisiert worden sind. Diese Verbindungen kommen im Schleimpilz *Dictyostelium* vor. Darüber hinaus können Inositpolyphosphat-Pyrophosphate auch durch Lyophilisierung von Inositpolyphosphaten in Gegenwart eines Phosphoryl-Donors gebildet werden^[123].

Zur Untersuchung des Inositpolyphosphat-Stoffwechsels in unterschiedlichen Geweben wurden zwei wichtige instrumentelle analytische Methoden entwickelt: Zum einen die Anionenaustausch-HPLC^[145] mit enzymatischer On-line-Hydrolyse der Phosphate durch alkalische Phosphatase, die in einem der Säule nachgeschalteten Reaktor immobilisiert ist, und Detektion des anorganischen Phosphats mit Molybdat^[146] sowie zum anderen ein Metall-Farbstoff-Nachweissystem, bei dem eine Dephosphorylierung nicht erforderlich ist und dreiwertige Übergangsmetall-Ionen mit großer Affinität sowohl den Farbstoff 4-(2-Pyridylazo)resorcin als auch Inositphosphat-Polyanionen binden^[147]. Diese Methode erlaubt den Nachweis von Inositphosphaten im pmol-Bereich.

Die Inositphosphate wurden auch NMR-spektroskopisch untersucht. Durch Multikern-NMR-Spektroskopie wurden die Strukturen und die Konformationen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[148, 149], $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ^[149, 150], $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ ^[151], InsP_6 ^[152] und vielen niedrigeren Inositphosphaten^[149] aufgeklärt. Die Daten von Phytinsäure deuten darauf hin, daß sich dessen Konformation mit dem Protonierungsgrad ändert. Bei hohem pH liegt das Molekül in einer Konformation mit einer axialen und fünf äquatorialen Phosphatgruppen vor und zwischen pH 2 und 5 in einer Konformation mit einem äquatorialen und fünf axialen Phosphatresten, die durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird.

5. Der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor

Der Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor (InsP_3R) ist ein ligandenregulierter Ionenkanal, der durch die Anlagerung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aktiviert wird und als Ca^{2+} -Schranke fungiert (Abb. 7). In den letzten fünf Jahren sind viele Informationen zur Molekülstruktur von InsP_3R , seiner Verteilung im Gewebe und

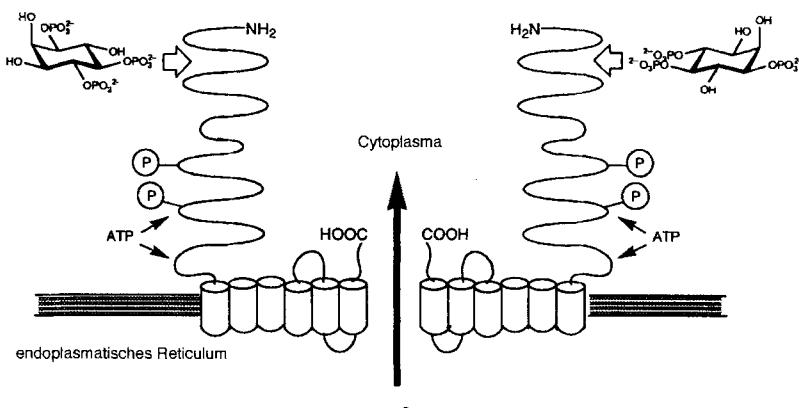


Abb. 7. Schematische Darstellung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors (Querschnitt).

in der Zelle sowie seiner Regulierung zusammengetragen worden^[153–158]. Im Gehirn werden Ins(1,4,5)P₃-Rezeptoren vor allem in Purkinje-Zellen, im Hippocampus, im Striatum und in der Hirnrinde exprimiert. Darüber hinaus kommen sie in der glatten Muskulatur von Arterien, des Uterus und von Eileitern sowie in der kontraktilen glatten Muskulatur von Eingeweiden und der Speiseröhre vor. Durch Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, daß der Rezeptor in Purkinje-Zellen meist mit dem glatten ER assoziiert ist, aber auch im rauhen ER und in der äußeren Kernmembran vorkommt.

InsP₃R wurde 1988 in Form von zwei immunologisch identischen Polypeptiden, einem Ins(1,4,5)P₃-bindenden Protein^[159] und dem in Purkinje-Zellen angereicherten Protein P₄₀₀^[160], isoliert. Seitdem ist durch Klonen der Rezeptor-cDNAs von Maus^[161, 162], Ratte^[163, 164], *Drosophila*^[165] und Mensch^[164] gezeigt worden, daß die allgemeine Rezeptorstruktur, die zuerst aus Mäuse-cDNA abgeleitet wurde, hochkonserviert ist. Das Rezeptorprotein bindet Ins(1,4,5)P₃ und aktiviert Ca²⁺-Kanäle, und durch Rekonstitution in Lipidvesikeln konnte der Ins(1,4,5)P₃-regulierte Ca²⁺-Transport nachgewiesen werden^[166]. Der Rezeptor ist ein Homotetramer, wie durch Elektronenmikroskopie^[167, 168] und Vernetzungsexperimente nachgewiesen wurde^[168]. Untersuchungen mit Deletionsmutanten^[169, 170] ergaben, daß jede Untereinheit ein Ins(1,4,5)P₃-Molekül und InsP₃R vermutlich vier Ins(1,4,5)P₃-Moleküle nichtkooperativ bindet^[159]; allerdings wurden auch anderslauende Befunde erhalten^[171].

Zwischen der Primärsequenz von InsP₃R und Ca²⁺-Kanälen in der Plasmamembran gibt es keine Homologie^[161, 172]; es besteht allerdings eine beträchtliche teilweise Homologie mit dem Ryanodin-Rezeptor des sarkoplasmatischen Retikulums von Skelett- und Herzmuskulatur^[161, 173, 174]. InsP₃R hat eine transmembrane Domäne am C-Terminus mit langen N-terminalen und kurzen C-terminalen Abschnitten, die in das Cytoplasma ragen. Untersuchungen des Hydrophilieprofils der hochkonservierten Aminosäuresequenz legen nahe, daß die transmembrane Domäne sechs^[165] oder acht^[169] membran-durchspannende Regionen aufweist. Die große N-terminale Region besteht aus ungefähr 650 Aminosäureresten, die zwischen den Spezies hochkonserviert sind^[161, 169, 170]. Es wird vermutet, daß sie die kritische Sequenz enthalten, die die dreidimensionale Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstelle bildet^[169, 170], da nach Entfernen von Sequenzen aus dieser Region keine Ins(1,4,5)P₃-bindende Aktivität mehr vorliegt. Die Region enthält viele positiv geladene Arginin- und Lysinreste, die für die Bindung der Phosphatgruppen von Ins(1,4,5)P₃ wesentlich sein könnten. Ein mit einem Ins(1,4,5)P₃-Photoaffinitätsliganden markiertes Peptid wurde isoliert, dessen Sequenz mit dem N-terminalen Fünftel der Sequenz von InsP₃R übereinstimmt^[175]. Die Anlagerung von Ins(1,4,5)P₃ muß eine beträchtliche Konformationsänderung im Rezeptor verursachen, der zwischen der Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstelle am N-Terminus und dem Ca²⁺-Kanal am C-Terminus fast 1400 Aminosäurereste aufweist^[153]. Die Kopplungsregion zwischen der Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstelle und dem Ca²⁺-Kanal enthält Stellen, die die Wirkung von Ins(1,4,5)P₃ auf das Öffnen des Kanals modulieren. Zwei in dieser Region vorhandene Serinreste können von einer cAMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden^[153, 161, 176], wodurch im Rezeptor des Kleinhirns die Bindung von Ins(1,4,5)P₃ von der

Öffnung des Ca²⁺-Kanals abgekoppelt wird. Der Rezeptor bindet außerdem äquimolare Mengen an ATP^[168]. In niedriger Konzentration hat ATP einen potenzierenden Einfluß auf die Ins(1,4,5)P₃-stimulierte Ca²⁺-Freisetzung. Auch Ca²⁺ selbst kann das Öffnen des Kanals beeinflussen, der Mechanismus ist allerdings unklar^[177].

Es ist bekannt, daß InsP₃R infolge alternativen mRNA-Spleißens eine beträchtliche Heterogenität aufweist, was zu Rezeptoren führt, die sich in der Kopplungsregion und vielleicht auch in der Ligandenbindungsdomäne unterscheiden. Der Kleinhirnrezeptor wird heute als Typ1-Rezeptor bezeichnet. Neue Rezeptortypen, die von separaten Genen kodiert werden, wurden beschrieben^[164, 178]. So weist Typ2-InsP₃R eine signifikante Homologie mit dem Typ1-Rezeptor auf, hat dabei allerdings eine größere Affinität für Ins(1,4,5)P₃ und ist 48 Aminosäuren kürzer^[164]. Ein Typ3-InsP₃R, der zu 63 und 64 % mit dem Typ1- bzw. Typ2-Rezeptor identisch ist, wurde bei Ratten^[179] und vor kurzem auch beim Menschen^[180] charakterisiert. Er wird in Nieren, im Verdauungstrakt und im Gehirn exprimiert und bindet außer Ins(1,4,5)P₃ auch Ins(1,3,4,5)P₄ und InsP₆. Eine Teilsequenz der C-terminalen Domäne eines Typ4-Rezeptors wurde ebenfalls beschrieben^[156, 164]. Möglicherweise sind die bisher identifizierten InsP₃Rs nur die ersten Beispiele einer größeren Rezeptorfamilie. Sollten sich diese Rezeptoren in ihren Ligandenbindungsaffinitäten und ihrer Spezifität unterscheiden, könnten modifizierte Analoga möglicherweise als Wirkstoffe gezielt eingesetzt werden.

6. Synthese und Aktivität von Inosit-Analoga

Inosit wird von vielen Zellen aufgenommen^[181–183] und durch PtdIns-Synthetase in PtdIns eingebaut. Der Einbau von synthetischen Analoga in Phosphatidylinositolipide bietet einen attraktiven Weg, pharmakologisch in die Signalübertragung einzutreten. Da mittlerweile bekannt ist, daß viele Wachstumsfaktoren die Hydrolyse von Inositlipiden stimulieren^[184], könnte man, indem man der Zelle „falsche“, insbesondere nicht weiter phosphorylierbare Phospholipide anbietet, Phospholipase C hemmen oder die Verfügbarkeit von PtdIns(4,5)P₂ verringern und somit unter anderem die Zellfortpflanzung beeinflussen. Dieser Ansatz hat den Vorteil, daß die mit dem Einbringen von hochgeladenen, phosphathaltigen Verbindungen in die Zelle verbundenen Probleme umgangen werden. Vor allem fluorierter Inosit-Analoga haben sich in dieser Beziehung als attraktiv erwiesen.

Kozikowski et al. stellten 1D-1-Desoxy-1-fluor-myo-inositol **1** (Abb. 8) aus 1D-3-O-Methyl-chiro-inositol in fünf Stufen über die 1,2:5,6-Di-O-isopropylidenverbindung unter Fluorierung mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST) her. Die direkte regioselektive Fluorierung von 1D-3-O-Methyl-chiro-inositol mit DAST gefolgt von Demethylierung lieferte 1D-1,5-Didesoxy-1,5-difluor-neo-inositol^[185]. In zehn Stufen gelang die Synthese der beiden Enantiomere von 1-Desoxy-1-fluor-myo-inositol^[186], wobei ein geeignet geschütztes myo-Inositol an C-2 mit DAST fluoriert und das erhaltene race-

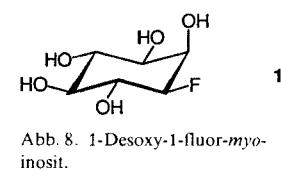


Abb. 8. 1-Desoxy-1-fluor-myo-inositol.

mische Fluor-*scyllo*-inosit in die Enantiomere getrennt wurde. Die *myo*-Inositol-Konfiguration wurde durch Swern-Oxidation der 1-Hydroxygruppe und stereospezifische Reduktion der Keto-Carbonylgruppe mit L-Selectride wiederhergestellt; durch Entschützen der enantiomeren Zwischenstufen wurden 1D- und 1L-1-Desoxy-1-fluor-*myo*-inosit erhalten.

Synthesen von 1D- und 1L-1-Desoxy-1-fluor-*myo*-inosit wurde auch von Offer et al.^[187, 188] beschrieben. Hier wurden die Probleme der Wiederherstellung der *myo*-Inositol-Konfiguration und Racematspaltung effektiv in einem Schritt durch Substitution der Tosylatgruppe eines fluorierten *scyllo*-Inosits mit (*S*)-(-)-Caesiumcamphanat gelöst. Die resultierenden Diastereomere wurden getrennt und zu den D- und L-1-Fluor-Analoga von *myo*-Inositol entschützt. Die entsprechenden 2-³H-markierten Analoga wurden durch Inositol-Dehydrogenase-katalysierten Austausch des Tritium-Radiomarkers von [2-³H]-*myo*-Inositol hergestellt^[189]. 1-Desoxy-1-fluor-*scyllo*-inosit 2 (Abb. 9) war

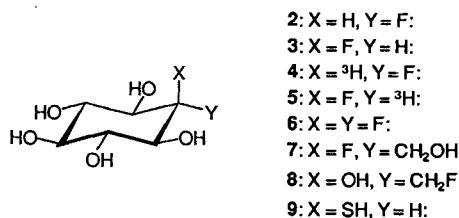


Abb. 9. C-2-modifizierte Inositol-Analoga.

das erste fluorierte Inositol-Analogon^[190]; es wurde aus 1-*O*-Benzoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit durch Umsetzung mit DAST bei erhöhter Temperatur und Abspaltung der Schutzgruppen erhalten. Die Herstellung von 2 wurde später auch von einer anderen Gruppe beschrieben^[191]. Lowe und McPhee^[192] beschrieben die Synthesen von 2 und 2-Desoxy-2-fluor-*myo*-inosit 3 sowie der 2-³H-markierten Derivate 4 und 5. Die Fluorierung von 1,3,4,5,6-Penta-*O*-benzyl-*myo*-inosit mit DAST lieferte unter Inversion der Konfiguration an C-2 das fluorierte *scyllo*-Inositol, das mit wasserfreiem HBr zu 2 debenzyliert wurde. Bei der Synthese von 3 wurde zunächst die Konfiguration an C-2 durch Umsetzung zum Triflat und Substitution des Triflatrestes mit Natriumtrifluoracetat invertiert. Esterhydrolyse, Umsetzung des Produkts mit DAST und Abspaltung der Schutzgruppen lieferte dann 3. Durch Oxidation von 1,3,4,5,6-Penta-*O*-benzyl-*myo*-inosit mit Jones-Reagens und Reduktion der resultierenden Inosose mit [³H]NaBH₄ wurde vorwiegend das tritierte *scyllo*-Inositol und etwas 1,3,4,5,6-Penta-*O*-benzyl-[2-³H]-*myo*-inosit erhalten. Reaktion mit DAST und Entschützen wie zuvor lieferte 4 und 5^[192]. Eine ähnliche Synthese von 3 und 5 wurde auch von einer anderen Gruppe beschrieben^[189].

2-Desoxy-2,2-difluor-*myo*-inosit 6 wurde durch Oxidation von 1-*O*-Allyl-3,6-di-*O*-benzyl-4,5-*O*-isopropyliden-*myo*-inosit zur entsprechenden 2-Inosose, deren Fluorierung mit DAST zur *gem*-Disfluorverbindung, Abspaltung der Allyl- und der Isopropylidengruppe sowie anschließende Hydrogenolyse hergestellt^[191]. Yang et al. synthetisierten 2-Desoxy-2_{ax}-fluor-2_{eq}-hydroxymethyl-*myo*-inosit^[193] 7 und 2-Desoxy-2-C-fluormethyl-*myo*-inosit^[194] 8 ausgehend von 1-*O*-Benzoyl-3,4,5,6-tetra-*O*-benzyl-2-oxiranyl-*myo*-inosit.

Die Synthese des 2-Sulfanyl-Analogons 9 von *myo*-Inositol wurde beschrieben^[195]: Die selektive Iodierung von racemischem 1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit in der 2-Position mit Triphenylphosphoran/Imidazol/Iod verlief unter Konfigurationsumkehr. Nach Silylierung der freien 3-Hydroxygruppe wurde das äquatoriale Iodatom mit Natriumbenzylsulfid unter Wiederherstellung der *myo*-Inositol-Konfiguration substituiert. Fluoridinduzierte Desilylierung, Debenzylierung, Acetylierung des Rohprodukts, Reinigung und Methanolysie lieferte das Thio-Analogon 9.

Kozikowski et al. synthetisierten enantiomerenreine, an C-3 modifizierte Inositol-Analoga 18–25 (Abb. 10)^[196–200]. 1D-3-Desoxy-3-fluor-*myo*-inosit 18 wurde in zwei Stufen erhalten: durch direkte selektive Fluorierung von L-Quebrachit (1L-2-*O*-Methyl-*chiro*-inosit) 10 mit DAST unter Inversion der Konfiguration an C-1 zum *myo*-konfigurierten Inositol 11 und dessen

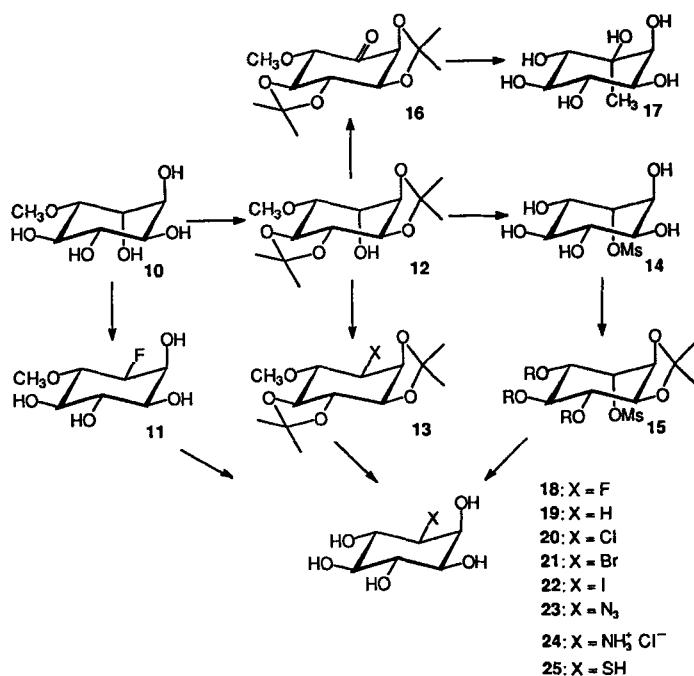


Abb. 10. C-3-modifizierte D-*myo*-Inosite aus L-Quebrachit (Kozikowski et al.).

Demethylierung^[196]. D-3-Desoxy-*myo*-inosit 19 wurde über L-3,4:5,6-Di-*O*-isopropyliden-2-*O*-methyl-*chiro*-inosit 12 durch Umsetzung mit 1,1'-Thiocarbonyldiimidazol, Tributylzinnhydrid und schließlich Bortribromid hergestellt^[198]. Das Zwischenprodukt 12 wurde auch in der Synthese der D-3-Halogeno-Analoga 20–22 eingesetzt. Die freie Hydroxygruppe in 12 wurde mit Triphenylphosphoran aktiviert und mit CCl₄, Br₂ oder I₂ als elektrophilen Halogenquellen unter Konfigurationsumkehr substituiert. Entschützen von 13 (X = Cl, Br, I) mit Bortribromid lieferte die entsprechenden D-3-Halogeninosite^[197]. Die Verbindungen 23–25 wurden aus 12 über 14 und das Mesylat 15 erhalten^[198]. Die Einführung der Azidogruppe unter Konfigurationsumkehr wurde durch Substitution der Mesylatgruppe in 15 (R = Ethoxyethyl) mit Natriumazid/Hexamethylphosphorsäureamid (HMPA) erreicht. Die saure Hydrolyse lieferte D-3-Azido-3-desoxy-*myo*-inosit 23, das durch katalytische Reduktion in verdünnter HCl in D-3-Amino-3-desoxy-*myo*-inosit-hy-

drochlorid **24** überführt wurde. Das 3-Sulfanylinosit **25** wurde aus **15** ($R = Ac$) durch Umsetzung mit $(CH_3)_2NC(S)SNa/HMPA$, Reduktion mit $LiAlH_4$ und Entfernung der Schutzgruppen erhalten. Oxidation der Hydroxygruppe in **12** und Alkylierung des erhaltenen Ketons **16** in axialer Position mit $MeMgBr$ führten zum geschützten 3-C-Methylderivat, das zu **17** entschützt wurde^[197].

Die wachstumshemmenden Eigenschaften dieser Inosit-Analoga wurden an Wildtyp-NIH-3T3-Zellen und an *v-sis*-transformierten Zellen untersucht. *v-sis*-Transformierte Zellen weisen eine erhöhte PtdIns-3'-Kinase-Aktivität auf, weshalb sie gegenüber Inhibitoren des PtdIns-3'-Kinase-Signalübertragungswege empfindlicher sein sollten als nichttransformierte Zellen. Erste Experimente^[185] ergaben, daß D-3-Desoxy-3-fluor-*myo*-inosit **18** ein wirksamer und selektiver Zellwachstumsinhibitor ist; in Gegenwart von *myo*-Inositol im Wachstumsmedium ist **18** allerdings etwa eine Größenordnung weniger wirksam. Das Fluor-Analogon ist ebenfalls ein starker kompetitiver Inhibitor bei der Aufnahme von [³H]-*myo*-Inositol, was nahelegt, daß diese Verbindung in Inositphospholipide eingebaut wird. In weiteren Studien mit an C-3 modifizierten D-*myo*-Inositol-Analoga wurde festgestellt^[197, 198], daß D-3-Azido-*myo*-inosit **23** überaus wirksam ist ($IC_{50} = 0.04 \text{ mM}$) und in inositolfreiem Medium eine hohe Selektivität für *v-sis*-transformierte Zellen aufweist (mehr als 1200fach im Vergleich zum Wildtyp). Durch Zugabe von *myo*-Inositol wurde die inhibierenden Eigenschaften dieser Verbindung allerdings beträchtlich verringert, während die Wachstumshemmung durch D-3-Amino-3-desoxy-*myo*-inosit **24** nur mäßig beeinträchtigt wurde. D-3-Desoxy-3-methylen-, -3-hydroxymethyl-, -3-iodmethyl- und -3-phosphonomethyl-*myo*-inosit sowie dessen Dimethylester weisen keine signifikante hemmende Aktivität auf^[199].

Sowohl D- als auch L-4-Desoxy-4-fluor-*myo*-inosit wurden aus DL-1,3,4,5-Tetra-O-benzyl-*myo*-inosit hergestellt: Dazu wurde zunächst die 6-OH-Gruppe selektiv tosyliert und das Produkt mit DAST an C-2 zum *scyllo*-Derivat fluoriert. Durch Umsetzung mit (S)-(–)-Caesiumcamphanat wurde unter Inversion der Konfiguration an C-6 (C-2 im Produkt) die *myo*-Inositol-Konfiguration wiederhergestellt. Das entstandene Diastereomerengemisch konnte durch HPLC oder durch Kristallisation getrennt und nach Abspaltung der Schutzgruppen D- und L-4-Desoxy-4-fluor-*myo*-inosit isoliert werden^[189]. Während in die 2-Position des L-Isomers eine ³H-Radiomarkierung mit Inositol-Dehydrogenase und [³H]-*myo*-Inositol eingeführt werden konnte, ist das D-Isomer kein Substrat für dieses Enzym, und das radiomarkierte Analogon wurde durch Oxidation von D-1,3,5,6-Tetra-O-benzyl-4-desoxy-4-fluor-*myo*-inosit, Reduktion der erhaltenen 2-Inosose mit [³H]NaBH₄ und Abspaltung der Schutzgruppen hergestellt. Synthesen von racemischem 4-Desoxy-, 4-Desoxy-4-fluor- und 4-Desoxy-4-methyl-*myo*-inosit ausgehend von einer aus Benzol durch mikrobielle Oxidation gewonnenen Vorstufe wurden ebenfalls beschrieben^[201].

6-O-Benzyl-1,2:3,4-di-O-cyclohexyliden-*myo*-inosit wurde von zwei Arbeitsgruppen zur Herstellung von 5-Desoxy-5-fluor-*myo*-inosit **26** eingesetzt (Abb. 11). Die Fluorierung mit DAST lieferte neben dem Produkt mit invertierter Konfiguration auch das Retentionsprodukt, das zu **26** entschützt wurde^[202]. Die niedrige Ausbeute wurde später durch eine der DAST-Fluorierung vorausgehende Inversion der Konfiguration an C-5 verbessert.

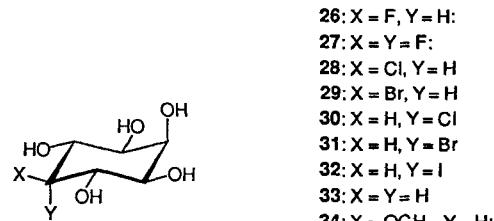


Abb. 11. C-5-modifizierte Inositol-Analoga.

So lieferte die Tosylierung^[187, 188] oder Triflierung^[203] der 5-Hydroxygruppe gefolgt von nucleophiler Verdrängung mit Caesiumpropionat das *neo*-Inositol-Derivat. Nach Verseifung und Fluorierung mit DAST lag wieder die *myo*-Inositol-Konfiguration vor, und die Entfernung der Schutzgruppen gab **26**.

Deuterierungs-Studien ergaben, daß das äquatoriale Proton H-2 in **26** am schnellsten ausgetauscht wird^[203]. Inkubation von **26** mit Inositol-Dehydrogenase und [2-³H]-*myo*-Inositol führte zu einem Austausch des Radioisotops, das somit wiederum in die 2-Position des fluorierten Analogons eingebaut wurde^[189]. Das 5-Desoxy-5,5-difluor-Analogon **27**^[203] wurde aus dem Oxiderivat von 1,4,6-Tri-O-benzyl-2,3-O-cyclohexyliden-*neo*-inositol, einem Zwischenprodukt in der Synthese von **26**, hergestellt.

Außer den Synthesen von **26** und **27** sowie von *myo*-Inositol-Analoga, die an der 1-, 4- und 5-Stellung desoxygiert sind, beschrieben Baker et al. auch die Herstellung von weiteren 5-Desoxyhalogen-*myo*- (**28**, **29**) und epimeren -*neo*-Inositen (**30**–**32**)^[202] sowie von racemischem 4-Desoxy-4-fluor-*myo*-inositol. DAST-Fluorierungen verlaufen normalerweise unter Konfigurationsumkehr^[204], aber bei der Fluorierung der Zwischenstufe 3-O-Benzyl-1,2:5,6-di-O-cyclohexyliden-*myo*-inositol entstand überraschenderweise vorwiegend das Produkt unter Retention der Konfiguration. Dies wurde auf eine sterische Hindernis des rückseitigen Fluorid-Ionen-Angriffs auf das intermediaire Addukt mit DAST zurückgeführt^[202].

Diese Inositol-Analoga^[205] wie auch einige C-3-modifizierte D-*myo*-Inosite^[206] wurden anschließend als Substrate und Inhibitoren von PtdIns-Synthetase getestet. Das Enzym stellt sehr hohe Anforderungen an das Cyclitol-Substrat. Alle untersuchten Verbindungen waren weniger effektiv als *myo*-Inositol; das beste Analogon war 5-Desoxy-5-fluor-*myo*-inosit **26**, das mit 26% der Einbaugeschwindigkeit von *myo*-Inositol ins zelluläre Phospholipid inkorporiert wird. Das Analogon **26** wurde zum entsprechenden 5-Fluor-PtdIns(4)*P*-Derivat phosphoryliert, ein Lipidbisphosphat konnte dabei wie erwartet nicht nachgewiesen werden. Andere 5-Desoxy-5-halogen-Verbindungen waren sehr schlechte oder inaktive Substrate. Das 5-Desoxy-Analogon **33** wurde hingegen gut erkannt. Unter den getesteten C-3-modifizierten Derivaten waren D-3-Amino- (**24**), D-3-Fluor- (**18**) und D-3-Desoxy-*myo*-inosit (**19**) sowie das 3-Oxo-Analogon Substrate für PtdIns-Synthetase^[206], sie werden aber im Vergleich zum natürlichen Substrat mehr als zehnmal schlechter akzeptiert. Als allgemeine Schlußfolgerung scheint sich aus diesen Befunden ableiten zu lassen, daß die Substrataktivität mit zunehmenden sterischen Anforderungen der Substituenten abnimmt. Im Inhibitionssassay entsprach die Rangfolge der Analoga der Abstufung hinsichtlich ihrer Effektivität als Substrate.

Davon ausgenommen ist 5-Desoxy-5,5-difluor-*myo*-inosit **27**, das kein PtdIns-Synthase-Substrat, aber ein wirksamer Inhibitor dieses Enzyms ist.

In einer anderen Studie^[207] wurde die Inhibition des Einbaus von [³H]Ins in PtdIns durch Inositol-Analoga untersucht, die in der 1-, 2-, 3-, 4- oder 5-Position modifiziert sind. 1-Desoxy-1-fluor-*scyllo*-inosit **2** und 5-O-Methyl-*myo*-inosit **34** waren die effektivsten kompetitiven Inhibitoren von PtdIns-Synthase und einem nucleotidunabhängigen PtdIns/Ins-Austausch-enzym. Viele andere Analoga wiesen ebenfalls beträchtliche inhibitorische Eigenschaften vor allem bezüglich der Austausch-enzym-Aktivität auf. Sowohl [1-³H]-1-Desoxy-1-fluor-*scyllo*-inosit **4** als auch [2-³H]-2-Desoxy-2-fluor-*myo*-inosit **5** waren sehr schlechte Substrate für die beiden Enzyme. Sofern **5** aber ins Phospholipid aufgenommen wurde, konnten auch die entsprechenden Analoga von PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂ nachgewiesen werden.

Offer et al. untersuchten die Aufnahme von ³H-markierten Monodesoxyfluor-*myo*-inositen^[189] in Thymozyten und ihren Einbau in das Phospholipid^[208]. Allein D-3-F-Ins **18**, 5-F-Ins **26** und in geringerem Maß auch D-6-F-Ins sind Substrate der PtdIns-Synthase, und nur **18** wurde aktiv in die Zellen aufgenommen und in das Phospholipid eingebaut. Allerdings nahm man an, daß Monodesoxyfluor-Analoga – sofern sie nicht durch die Zellmembran dringen können – wegen der Selektivität für *myo*-Inositol bei der Aufnahme und der von PtdIns-Synthase, in intakten Zellen wahrscheinlich nicht als Inhibitoren der PtdIns(4,5)P₂-Bildung oder des -Abbaus fungieren können.

Die Synthese von selektiv geschützten 3-Desoxy-*epi*-inositen und 1-Desoxy-*scyllo*-inositen gelang chemoenzymatisch mit *Candida-cylindracea*-Lipase, die (*R*)-konfigurierte Ester selektiv spaltet^[209].

7. Synthese von spezifischen *myo*-Inositphosphaten

Die Entdeckung des sekundären Botenstoffs Ins(1,4,5)P₃ hat ein erneutes Interesse an der Inositphosphat-Chemie geweckt. Viele Inositphosphate wurden schon vor dieser Renaissance synthetisiert^[57, 58]. Einige der älteren Syntheseverfahren waren allerdings nicht sehr zufriedenstellend. Dies galt besonders für die Phosphorylierung von Polyolen, in denen gleichzeitige Polyphosphorylierungen durch das Vorhandensein von vicinalen Diolen erschwert und die Bildung von fünfgliedrigen cyclischen Phosphaten begünstigt werden. (Zu Ausnahmen siehe Lit.^[210].) Dennoch wurde Ins(4,5)P₂ ursprünglich schon 1961 hergestellt^[211]. Neuere Arbeiten zu diesem Thema wurden zusammengefaßt^[56].

7.1. Allgemeine Betrachtungen zur Synthese

Inositpolyphosphat-Synthesen müssen fünf Anforderungen erfüllen (Abb. 12): 1. Um die spätere Einführung von Phosphatgruppen in ausgewählte Positionen zu erleichtern, müssen geeignete geschützte Derivate hergestellt werden. 2. Da das D-Enantiomer von Ins(1,4,5)P₃ der natürliche Botenstoff ist, müssen auch die Derivate enantiomerenrein hergestellt werden. 3. Eine effiziente Phosphorylierungsstrategie ist erforderlich,

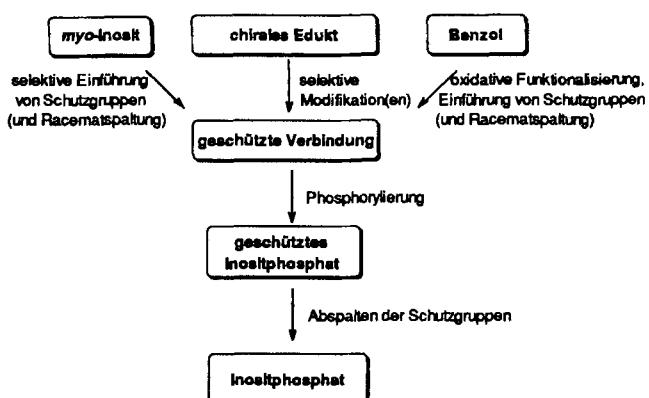


Abb. 12. Stufen in der Synthese von Inositphosphaten.

um die mit der Bildung von cyclischen Phosphaten zusammenhängenden Probleme zu vermeiden. 4. Das phosphorylierte Zwischenprodukt muß unter Bedingungen entschützt werden, unter denen die Phosphatgruppen nicht zu benachbarten Hydroxygruppen wandern können. 5. Das anionische Polyphosphat muß effektiv gereinigt und von geringen, möglicherweise regiosomeren Verunreinigungen getrennt werden, die eine Aktivität aufweisen könnten.

7.1.1. Schutzgruppenchemie

Die Entwicklung von Schutzgruppenstrategien bei Inositpolyphosphat-Synthesen begann schon sehr früh^[57, 58] und wird auch heute noch vorangetrieben, wie neuere Ansätze zeigen^[212–218]. Das Gebiet wurde in zwei Übersichtsartikeln umfassend diskutiert^[53, 54]. Die populärsten temporären und permanenten Hydroxylschutzgruppen sind Acetyl, Benzoyl, Benzyl, *p*-Methoxybenzyl, Allyl, Isopropyliden, Cyclohexyliden und Orthoformiat. Dies wird bei der Beschreibung von einigen Synthesen deutlich werden.

7.1.2. Synthesen von optisch aktiven Verbindungen

Wird Benzol oder die *meso*-Verbindung *myo*-Inositol als Ausgangsmaterial zur Synthese von Inositphosphaten verwendet, ist eine Racematspaltung zur Trennung der D- und L-Isomere der Inositphosphat-Vorstufen notwendig. Die meisten Enantiozentren trennungen in Inositphosphat-Synthesen beruhen auf der Umwandlung eines racemischen Inosits in ein Diastereomerenpaar, das durch Kristallisation oder chromatographisch getrennt wird. Die Verfahren von Shvets^[219, 220], bei denen D-Mannose-Orthoester wie **35** (Abb. 13) verwendet werden, waren bis vor

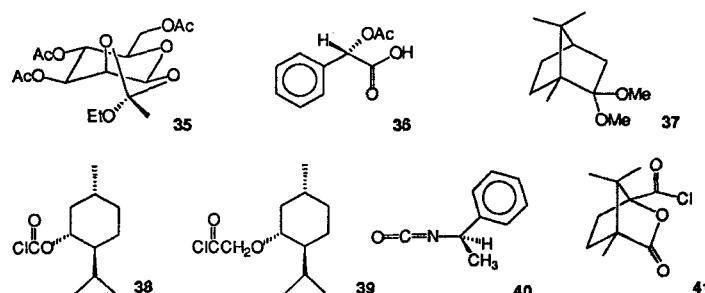


Abb. 13. In Inositphosphat-Synthesen verwendete chirale Hilfsreagentien.

kurzem die einzigen verfügbaren Methoden. In neueren Arbeiten wurden die Vorteile einiger anderer Reagentien, z. B. (*S*)-(+)-*O*-Acetylmandelsäure **36**, (*R*)-(+)-Campherdimethyl-acetal **37** und seinem (*S*)-Isomer, L-Menthylchlorformiat **38**, L-Menthoxycetylchlorid **39** sowie (*R*)-(+)-1-Phenylethylisocyanat **40**, demonstriert. Die Racematspaltung durch Bildung von Camphansäureestern scheint gegenwärtig die allgemein brauchbarste Methode zu sein, und sowohl mit (*S*)-(-)-Camphansäurechlorid **41** als auch mit dem (*R*)-(+)-Isomer wurden optisch aktive Inositderivate erhalten. Mit chiralen HPLC-Säulen wurden Zwischenprodukte in Ins(1,3,4)P₃^[221] und Ins(1,3,4,5)P₄-Synthesen^[222] in ihre Enantiomeren getrennt.

In mehreren Studien wurden Enzyme wie Esterasen, Lipasen und Proteasen auf ihre Fähigkeit untersucht, racemische oder *meso*-Carboxylester von *myo*-Inositol^[223–226], 3-Desoxy-*epi*-inositol und 1-Desoxy-*scyllo*-inositol^[209] enantio- und regioselektiv zu hydrolysieren. Eine neue Methode ist die selektive enzymatische Veresterung, die bereits zur Enantiomerentrennung von racemischem 1,2:5,6- und 1,2:3,4-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inositol^[227, 228] sowie zur Synthese von enantiomerenreinem 1*D*-1-*O*-Butyryl-4,6-di-*O*-benzoyl-*myo*-inositol^[229] eingesetzt wurde.

Das Problem der Racematspaltung kann durch die Verwendung von chiralen Ausgangsverbindungen, z. B. von Naturstoffen wie L-Quebrachit **10**, 1*D*-3-*O*-Methyl-*chiro*-inositol **42**, (–)-Chinasäure **43**, D-Glucurono-6,3-lacton **44** und das Galactosid **45** (Abb. 14), ganz umgangen werden. Durch die Ferrier-

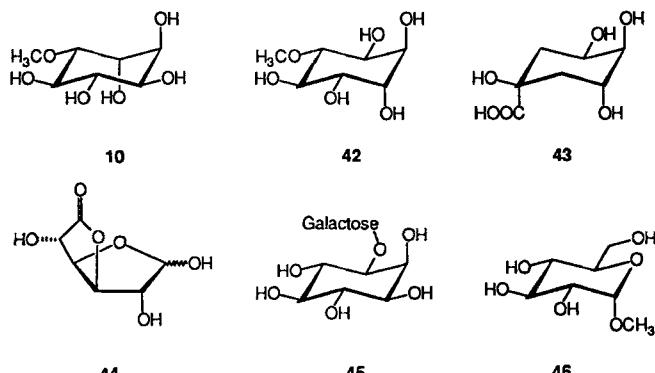


Abb. 14. Chirale Ausgangsverbindungen zur Synthese von Inositphosphaten.

Reaktion^[230] wurden *myo*-Inositderivate aus D-Galactose,^[231] D-Glucose^[232–234] und in einem biomimetischen Ansatz aus Methyl- α -D-glucopyranosid **46**^[235, 236] hergestellt. Enantiomerenreine *myo*-Inositderivate wurden durch die Samarium-diiodid-vermittelte reduktive Carbocyclisierung einer von D-Mannit abgeleiteten Zwischenstufe erhalten^[237].

7.1.3. Phosphorylierungsreagentien

Zur Phosphorylierung von freien Hydroxygruppen in einem geeignet geschützten Inositol werden hauptsächlich zwei Methoden angewendet: a) Phosphorylierung mit einem P^V-Reagens, in dem das Phosphoratom schon in der korrekten Oxidationsstufe vorliegt, und b) Phosphytylierung der Hydroxygruppe mit einem P^{III}-Reagens und anschließende Oxidation des Phosphitesters zum geschützten Phosphatester (Abb. 15).

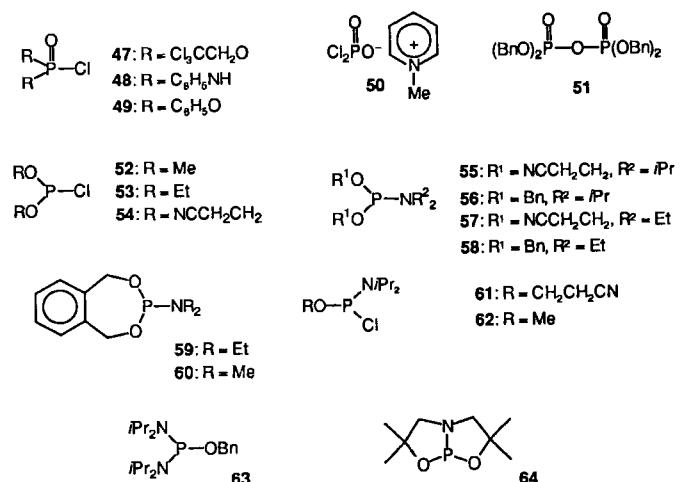


Abb. 15. Phosphorylierungs- und Phosphytylierungsreagentien.

Die Vorteile von P^V-Reagentien für Phosphorylierungen sind die relative Stabilität von Reagens und Produkt. Probleme haben sich jedoch wegen der geringen Reaktivität der sekundären Hydroxygruppen von Inositen ergeben. Darüber hinaus ist die Phosphorylierung von vicinalen Diolen besonders schwierig: Die durch Phosphorylierung der ersten freien Hydroxygruppe gebildete Phosphatriestergruppe kann durch die benachbarte, zweite Hydroxygruppe angegriffen werden. Durch die Sperrigkeit der meisten P^V-Reagentien kann der Angriff eines zweiten Reagensmoleküls auf die zweite Hydroxygruppe im Anschluß an die Monosubstitution sterisch erschwert sein. Cyclisierungen können deshalb erfolgreich mit der Substitution an der zweiten Hydroxygruppe konkurrieren, was zu 5-gliedrigen cyclischen Phosphaten statt zu den gewünschten Bisphosphaten führt.

Phosphor(V)-oxidchlorid wurde erstmals 1857 als Phosphorylierung reagens verwendet^[238]. In neuerer Zeit wurde es zur schrittweisen Phosphorylierung des vicinalen 4,5-Diols in *myo*-Inositen mit zwei P^V-Reagentien eingesetzt^[239]. Die Phosphorylierung mit Bis(2,2,2-trichlorethyl)phosphorsäurechlorid **47** lieferte, vermutlich infolge sterischer Hinderung, nur eine Mischung aus 4- und 5-monophosphorylierten Inositen, nicht aber das Bisphosphat. Mit POCl₃ konnte die Mischung allerdings zu den gemischten 4,5-Bisphosphatriestern umgesetzt werden. Mit **47** wurden auch Ins(1,4,5)P₃ und dessen 5-Phosphorothioat-Analogon hergestellt^[240–242]. Dianilidophosphoroxychlorid **48** wurde in der ersten beschriebenen Synthese von D-Ins(1,4,5)P₃ benutzt^[243]; diese Phosphorylierungsmethode und die Abspaltung der Schutzgruppen mit Isoamylnitrit in Pyridin/Essigsäure/Essigsäureanhydrid war jedoch nicht zufriedenstellend. Diphenylphosphorsäurechlorid **49** wurde in vielen Synthesen von Phosphatestern verwendet, unter anderem in einer frühen Synthese von Ins(2)P^[244] sowie in der Synthese von L-Ins(1)P^[245].

Phosphorsäuredichloride können mit zwei unterschiedlichen Partnern unter Bildung einer Phosphatbrücke zwischen diesen Einheiten reagieren. Da Phosphodiesterbindungen in vielen Naturstoffen, z. B. in Oligonucleotiden und Phospholipiden, vorkommen, wurde einige Phosphorsäuredichloride für die Synthese dieser Substanzen entwickelt. N-Methylpyridinium-phos-

phorodichloridat **50** wurde zur Synthese von cyclischem Ins(1:2)*P* verwendet^[246].

Polyphosphate und gemischte Anhydride werden trotz ihrer unspezifischen Reaktionsweise, die häufig zur Bildung von cyclischen Phosphaten oder anderen Nebenprodukten führt, vielfach eingesetzt. Phosphorsäure, Kaliumhydrogenphosphat und Pyrophosphorsäure wurden für Kohlenhydratphosphat-Synthesen genutzt; Pyrophosphorsäure wurde auch zur Phosphorylierung von *epi*- und *muco*-Inositen verwendet^[247].

Tetrabenzylpyrophosphat (TBPP) **51**^[248] ist ein kommerziell erhältlicher kristalliner Feststoff, der durch Kondensation von zwei Äquivalenten Dibenzylphosphat mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) gebildet wird. Es ist das einzige P^V-Reagens, das in der Inositphosphatchemie mit Erfolg zur Phosphorylierung von vicinalen Diolen angewendet wurde^[249–251]. Um eine effektive Phosphorylierung mit TBPP zu erreichen, ist es erforderlich, die freien Hydroxygruppen in Alkoxygruppen umzuwandeln. Die stark basischen Bedingungen können allerdings bei einigen Verbindungen zur Zersetzung führen.

P^{III}-Reagentien sind reaktiver als die meisten P^V-Reagentien. Durch Phosphitylierung und anschließende Oxidation wurden gute Resultate auch in solchen Fällen erzielt, in denen P^V-Reagentien nicht das gewünschte Produkt lieferten, z. B. bei der Phosphorylierung von vicinalen Diolen als Vorstufen von Ins(1,4,5)*P*₃. Die Bildung von unerwünschten cyclischen Phosphodiestern wird dabei vermieden. Ein weiterer Vorteil der P^{III}-Reagentien ist, daß die Phosphittriester durch elementare Schwefel in Pyridin^[252] oder durch Phenacyldisulfid^[253] sulfoxidiert werden können. Die entstehenden Phosphorothioate sind als nützliche nichthydrolysierbare Analoga von Nucleotiden^[254] und Inositphosphaten bekannt (siehe Abschnitt 8.4).

Trotz ihrer Instabilität gegenüber Feuchtigkeit werden Phosphorochloridite häufig in Inositphosphat-Synthesen eingesetzt. So wurden mit Dimethoxychlorophosphan **52** Ins(1,4,5)*P*₃, Ins(1,3,4,5)*P*₄ und Ins(1,4,5,6)*P*₄^[255], mit Diethoxychlorophosphan **53** Ins(1,2,4,5)*P*₄^[256] und mit Di(2-cyanethoxy)chlorophosphan **54** Ins(1,3,4)*P*₃^[257] synthetisiert.

Die stabileren Phosphoramidite werden unter katalytischer Aktivierung durch eine schwache Säure (1*H*-Tetrazol) eingesetzt. Beispiele für verwendete Phosphoramidite sind die Verbindungen **55–57**. Di(benzylxyloxy)(diethylamino)phosphan **58** ist im Vergleich zu **56** weniger günstig, da **56** leicht durch Säulenchromatographie gereinigt werden kann^[258].

3-Diethylamino-2,4,3-benzodioxaphosphepan **59**^[259], das aus Hexaethylphosphorsäuretriamid und 1,2-Bis(hydroxymethyl)benzol hergestellt wurde, und die entsprechende Dimethylaminoverbindung **60** kommen immer häufiger in Inositphosphat-Synthesen zum Einsatz. 2-Cyanethoxy(diisopropylamino)chlorophosphan **61** und die entsprechende Methoxyverbindung **62** fanden ebenfalls ausgedehnte Anwendung, **61** unter anderem in Synthesen von Ins(1,4,5)*P*₃ und Ins(4,5)*P*₂^[260–262]. Die zunächst erhaltenen Phosphoramidite werden vor der Oxidation normalerweise in Phosphitriester umgewandelt. Als bifunktionelle P^{III}-Reagentien sind **61** und **62** auch zur Herstellung von Phosphorothioat-Analoga von Inositphospholipiden geeignet^[263–265]. Dies gilt auch für **63**, das von van Boom et al. in Synthesen eines PtdIns(4,5)*P*₂-Analogs^[266] und eines inosithaltigen mycobakteriellen Phospholipids^[267] eingesetzt wurde.

Das vergleichsweise unkonventionelle Aminobicyclicophosphan **64** schließlich wurde zur Synthese von Inositmonophosphaten genutzt^[268].

Die Effizienz der unterschiedlichen Methoden zur Oxidation von Phosphitriestern wurde untersucht^[269]; in der Inositphosphatchemie wird diese Transformation normalerweise mit *tert*-Butylhydroperoxid (*t*BuOOH) oder *m*-Chlorperbenzoësäure (*m*-CPBA) durchgeführt.

7.1.4. Entfernung der Schutzgruppen und Reinigung

Um die Wanderung von geschützten Phosphatgruppen zu benachbarten freien Hydroxygruppen zu vermeiden, müssen die Phosphatgruppen vor den Alkoholen entschützt werden. Werden Benzylschutzgruppen sowohl für die Hydroxy- als auch für die Phosphatgruppen verwendet, ist die Abspaltung der Schutzgruppen in einem Schritt möglich, da die Benzylphosphatester wesentlich schneller gespalten werden^[270]. Nach der Entfernung der Schutzgruppen mit Natrium in flüssigem Ammoniak müssen die Produkte gewöhnlich durch Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt werden. Es ist allerdings auch möglich, das Endprodukt durch katalytische Hydrogenolyse und ohne weitere Reinigung zu erhalten.

7.2. Inositmonophosphate

Es gibt vier *myo*-Inositmonophosphate: die symmetrischen 2- und 5-Phosphate und die beiden Enantiomerenpaare Inosit-4(6)-phosphat und Inosit-1(3)-phosphat. Bevor und nachdem entdeckt wurde, daß die Hydrolyse von Gehirn-Phosphoinosiden D-Ins(1)*P* liefert^[271, 272], wurden viele Synthesen von racemischen und enantiomerenreinen *myo*- und anderen Inositmonophosphaten beschrieben^[53, 57].

D-^[273, 274] und L-Ins(1)*P*^[273] wurden aus 1L-Quebrachit **10** über 1L-3,4:5,6-Di-*O*-cyclohexyliden-2-*O*-methyl-*chiro*-inosit hergestellt. Zur Synthese von D-Ins(1)*P* wurde diese Verbindung zur Inosose oxidiert, die dann stereoselektiv zu D-1,2:5,6-Di-*O*-cyclohexyliden-4-*O*-methyl-*myo*-inosit reduziert wurde. In einer sechsstufigen Sequenz wurde dieses Zwischenprodukt in das 1-Silylpentabenzoylinositol überführt. Desilylierung, Phosphorylierung und schrittweises Entfernen der Schutzgruppen lieferte D-Ins(1)*P*. Darüber hinaus wurde L-Ins(1)*P* [= D-Ins(3)*P*] über das 1-Tosylat erhalten. Ein eleganter Zugang zu D-Ins(1)*P*^[275, 276] beinhaltete die Enantiomerentrennung über das 2,3-*myo*-Inositol-D-campheracetal und die selektive Phosphorylierung der 1-OH-Gruppe mit Dibenzylphosphorsäurechlorid. L-Ins(1)*P* war über das L-Campherdimethylacetal zugänglich^[276]. Optisch aktives Ins(1)*P* wurde auch aus 1,2,4,5,6-Penta-*O*-benzyl-*myo*-inositol (Enantiomerentrennung über das (R)-(-)-Camphanat)^[270] und dem entsprechenden Pentaacetat (Enantiomerentrennung über das saure Oxalat)^[277] hergestellt, das auch zur Synthese von racemischem Ins(1)*P*^[278] verwendet wurde. Die beiden Ins(1)*P*-Enantiomere wurden nach Persilylierung auf einer chiralen GC-Säule getrennt^[279].

Ins(2)*P* wurde zuerst unter Nutzung der hochselektiven Oxidation von *myo*-Inositol zu *scyllo*-Inosose durch *Acetobacter suboxydans* synthetisiert^[244]. Ein neuerer Ansatz beruht auf der selektiven Dibenzylierung der 4- sowie der 6-OH-Gruppe von

myo-Inositorhoformiat und der Phosphorylierung der freien 2-OH-Gruppe mit TBPP^[280].

Die Synthese von Ins(4)P gelang durch selektive Benzoylierung der 3-OH-Gruppe von 1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit, Phosphorylierung der verbliebenen freien Hydroxygruppe und Abspaltung der Schutzgruppen^[211, 220]. Aus der entsprechenden 3-*O*-Benzylverbindung wurde ebenfalls racemisches und nach Racematspaltung über das Camphanat auch optisch aktives Ins(4)P erhalten^[270]. Eine kurze DL-Ins(4)P-Synthese durch chelatkontrollierte selektive Phosphorylierung des Monoanions von *myo*-Inositorhoformiat^[281] mit TBPP wurde beschrieben^[280, 282]. Die Reaktion von 1,2-*O*-Cyclohexyliden-*myo*-inosit mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxan lieferte selektiv das entsprechende 3,4-*O*-Disiloxan-Inosit, dessen 6-OH-Gruppe selektiv benzoyliert wurde. Mit TBPP wurde infolge der Wanderung des Benzoylrestes die 6-Position phosphoryliert, so daß nach Entfernung der Schutzgruppen racemisches Ins(4)P erhalten wurde. Die Phosphitylierung mit PCl_3 und Benzylalkohol gefolgt von Oxidation und Entschützen lieferte dagegen Ins(5)P^[283], das erstmals aus durch Hydrolyse von Hygromycin A erhältlichem 2-Amino-2-desoxy-*neo*-inosit hergestellt wurde^[211].

Cyclisches D-Ins(1:2)P wurde aus D-3,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit mit **50** synthetisiert^[246]. Durch direkte Phosphorylierung von Inosit mit dem bicyclischen Aminophosphoran **64**, Oxidation des resultierenden bicyclischen Phosphorans mit fünffach koordiniertem P-Atom und saure Hydrolyse wurde eine Mischung aus Ins(1)P, Ins(2)P und cyclischem Ins(1:2)P erhalten^[268], die durch HPLC getrennt wurden.

7.3. Inositbisphosphate

Synthesen von racemischen Inosit-1,4-, -1,6- und -4,5-bisphosphaten über Phosphorsäurechlorid-Phosphorylierung von Di-*O*-cyclohexylideninositen wurden bereits 1961 erstmals beschrieben^[211]. Enantiomerenreine Bisphosphate wurden aus den optisch aktiven Diacetalen hergestellt, die durch Racematspaltung mit D-Mannose-Orthoestern erhalten wurden^[284].

Ins(1,3)P₂ wurde durch regioselektive Phosphorylierung von 2,4,6-Tri-*O*-benzyl-*myo*-inosit mit dem Phosphorsäurechlorid **49** hergestellt^[270, 280]. Das 1,3-bisphosphorylierte Produkt kristallisiert aus der Mischung aus 1,3- und 1,5-bisphosphoryliertem Produkt aus. Die Abspaltung der Schutzgruppen mit Lithium in flüssigem Ammoniak lieferte Ins(1,3)P₂. Racemisches Ins(1,4)P₂ wurde durch Phosphitylierung von 1,2:4,5-Di-*O*-isopropyliden-*myo*-inosit mit dem Chlorphosphoran **61**, Umwandlung des Produktes in einen Bisphosphitester, Oxidation und Entschützen erhalten^[285]. Alternativ zur Racematspaltung von 1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit über Orthoacetate^[286] sind die Enantiomeren von Ins(1,4)P₂ durch die Bildung der chromatographisch trennbaren Dicamphanate zugänglich^[251]. D-Ins(1,4)P₂ kann in einer kurzen Synthese aus *myo*-Inosit-D-campher-2,3-acetal^[276, 287] oder auch halbsynthetisch durch Periodat-Behandlung von desacylierten Phosphoinositiden erhalten werden^[288]. Die beiden Ins(1,5)P₂-Enantiomere^[289] wurden aus D- bzw. L-1,2,4,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit und **57** synthetisiert. Die Racematspaltung der durch selektive Benzylierung von 2,4,6-Tri-*O*-benzyl-*myo*-inosit erhaltenen Tetraben-

zylderungen wurde über deren Mono(-)-camphansäureester erreicht. DL-Ins(4,5)P₂ wurde aus 1,2,3,4-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inosit mit einem P^{III}-Reagens hergestellt^[262, 290]. Aus Benzol erhaltene Condurit B-Derivate sind ebenfalls verwendet worden^[291].

7.4. Inosittriphosphate

7.4.1. Inosit-1,4,5-trisphosphat

Es überrascht kaum, daß sich das Interesse hauptsächlich auf die Synthese von Ins(1,4,5)P₃, dem biologisch immer noch bei weitem wichtigsten Inositphosphat, konzentriert. Die erste Synthese von D-Ins(1,4,5)P₃ wurde 1986 von Ozaki et al. beschrieben (Abb. 16)^[243]. DL-1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit

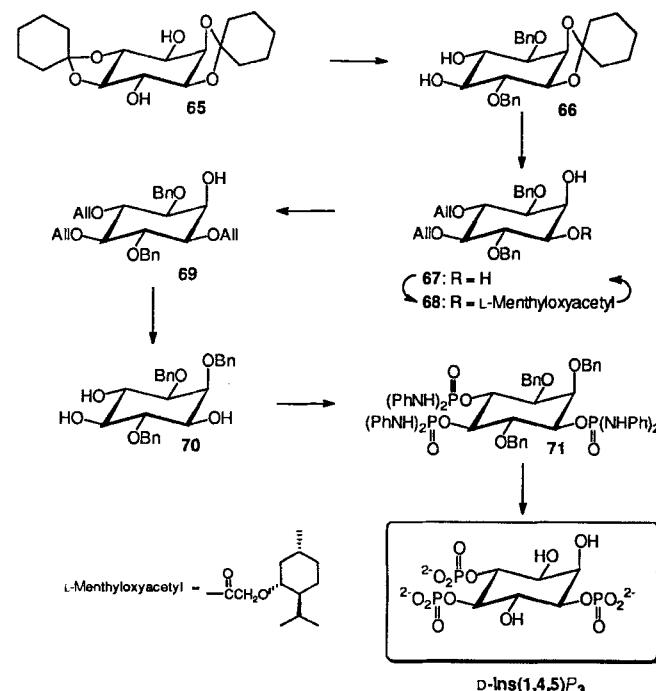


Abb. 16. Die erste D-Ins(1,4,5)P₃-Synthese (Ozaki et al.).

65 wurde benzyliert und das *trans*-4,5-Acetal unter Bildung von **66** selektiv gespalten. Allylierung und saure Hydrolyse des verbliebenen *cis*-Acetals lieferte das 1,2-Diol **67**, das über die Diastereomeren Ester **68** in die Enantiomeren getrennt wurde. D-**67** wurde regioselektiv zu **69** allyliert, das benzyliert und zu **70** desalysiert wurde. Phosphorylierung mit **48** lieferte **71**, und durch Entschützen der Phosphat- und Hydroxygruppen mit Isoamylnitrit bzw. $\text{H}_2/5\% \text{Pd-C}$ erhielt man D-Ins(1,4,5)P₃. Mit TBPP **51** oder dem Phosphoramidit **59** konnte diese Synthese beträchtlich verbessert werden^[292]. Racemisches Ins(1,4,5)P₃ wurde später über modifizierte Routen zum Triol **70**^[213, 214] und durch dessen Umsetzung mit einem P^{III}-Reagens synthetisiert^[260, 261] (Abb. 17): Dabei wurde zunächst **72** dibenzyliert und die Acetalschutzgruppen entfernt. Das Zwischenprodukt **73** wurde durch zinnvermittelte Allylierung der 1-OH-Gruppe, Bildung des 4,5-Acetals und Benzylierung der 2-OH-Gruppe zur

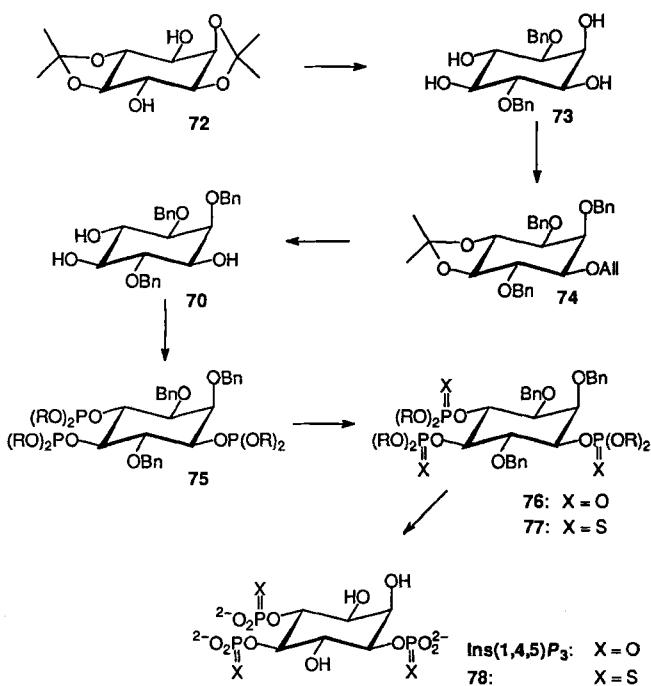


Abb. 17. Synthesen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ mit P^{III} -Reagentien; $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ (Cooke et al.).

vollständig geschützten Verbindung 74 umgesetzt. Isomerisierung der Allylgruppe in 74 zur Prop-1-enylgruppe und Hydrolyse der säurelabilen Schutzgruppen lieferte das Triol 70, das mit 61 phosphoryliert, in 75 umgewandelt und zu 76 oxidiert wurde. Die Schutzgruppen wurden anschließend mit Natrium in flüssigem Ammoniak in einem Schritt unter Bildung von DL- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entfernt. L- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[261] und D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[293] wurden analog aus enantiomerenreinem D-^[214] und L-1,2,4-Tri-O-benzyl-*myo*-inosit gewonnen. D- und L- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurden auch aus 79 (Abb. 18) durch Phosphorylierung mit 48 zu 80, Spaltung des Acetals und Racematspaltung des resultierenden Zwischenproduktes über 81 hergestellt. Die 1-Hydroxygruppe des so erhaltenen enantiomeren 1,2-Diols wurde dann mit 48

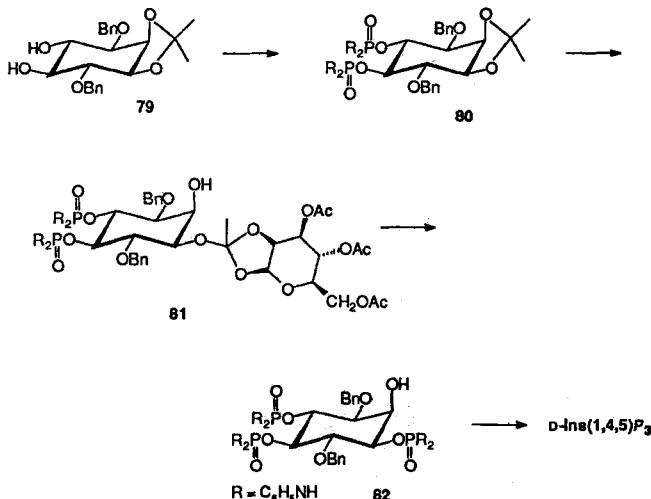


Abb. 18. Synthese von D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch Racematspaltung der Mannoseorthester (Shvets et al.).

selektiv zu 82 phosphoryliert. Die N-Phenyl- und Benzylschutzgruppen wurden unter Bildung der jeweiligen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Enantiomere schrittweise abgespalten^[294]. Mittlerweile werden allerdings andere Phosphorylierungsmethoden bevorzugt^[295].

Das aus 83 zugängliche Cyclopentylidenacetals 84 (Abb. 19) wurde bei einem anderen Ansatz verwendet. Durch Silylierung

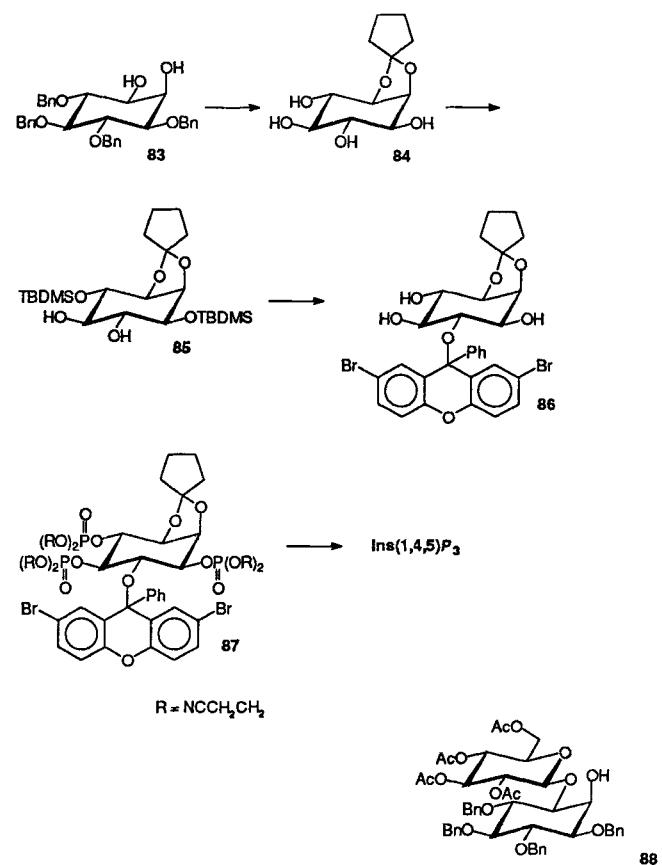


Abb. 19. Synthese von D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ unter Verwendung einer Xanthenylschutzgruppe (Reese und Ward).

der 1- und der 4-OH-Gruppe unter Bildung von 85 und dessen Umsetzung mit 2,7-Dibrom-9-phenyl-9-xanthenylchlorid wurde nach Desilylierung das Triol 86 erhalten. Phosphitylierung mit dem Phosphan 57, Oxidation und Entschützen lieferten DL- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[296]. Dieser Weg wurde auch zur Synthese von D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[296] genutzt, wobei das Diol 83 über die Glucopyranosylverbindung 88 in die Enantiomeren getrennt wurde^[286]. Ausgehend von den diastereomeren Camphansäurederivaten von 6-O-Benzyl-2,3:4,5-di-O-cyclohexyliden-*myo*-inosit, das durch selektive Benzylierung des entsprechenden racemischen 1,6-Diols erhalten wurde^[216], wurden D- und L-6-O-Benzyl-2,3-O-cyclohexyliden-*myo*-inosit hergestellt. Die Trikaliumsalze dieser Zwischenstufen wurden mit TBPP 51^[249, 270, 280] phosphoryliert und zu den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Enantiomeren entschützt^[251, 297].

Eine kurze Synthese von racemischem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus 3,6-Di-O-benzoyl-*myo*-inosit wurde beschrieben^[255]. Partielle Phosphitylierung mit dem Chlorophosphoran 52, Acetylierung der 2-OH-Gruppe und Oxidation lieferten das 1,4,5-Tris(dimethylphosphat) als Hauptprodukt, das durch Demethylierung und

Verseifung zu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ umgesetzt wurde. Das Phosphan **56** wurde zur Synthese von Inositphosphaten vorgeschlagen^[258] und ebenfalls zur Herstellung von $\text{DL-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus dem Triol **70** verwendet. Die Phosphitester-Zwischenstufen wurden dabei mit *m*-CPBA oxidiert.

$\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde aus 3,6-Di-*O*-allyl-1,2-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit synthetisiert, das dazu an der 4-OH-Gruppe benzyliert und an der 5-OH-Gruppe allyliert wurde, was 3,5,6-Tri-*O*-allyl-4-*O*-benzyl-1,2-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit gab. Hydrolyse des 1,2-Acetals, Racematspaltung der Monomethoxyacetylterivate, Entfernung der chiralen Hilfsgruppe, Dibenzylierung und Desallylierung lieferten enantiomerreines **70**. Dieses wurde mit dem Phosphan **58** und *t*BuOOH umgesetzt und anschließend zu $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ hydrogenoliert^[298].

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde auch über einen gemischten $\text{P}^{\text{III}}/\text{P}^{\text{V}}$ -Ansatz synthetisiert^[240, 242]. Durch Phosphorylierung von 2,3,6-Tri-*O*-benzyl-4,5-*O*-isopropyliden-*myo*-inosit^[213] mit **47**, Acetalspaltung und Phosphorylierung des freigelegten vicinalen Diols wurden eine Mischung aus 1,4- und 1,5-Bisphosphaten erhalten. Das 1,4-Produkt kristallisierte aus der Reaktionsmischung aus und wurde mit dem Chlorophosphan **61** phosphoryliert; das dabei gebildete Phosphoramidit wurde zum Phosphatetriester umgesetzt^[260] und dieser zu $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entschützt.

Ausgehend von 3,6-Di-*O*-benzyl-4,5-bis(dibenzylphosphoryl)-*myo*-inosit wurde $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ hergestellt^[246]. Die Enantiomeren wurden dabei entweder durch Racematspaltung über die 1-*O*-Monomethoxyacetylverbindungen oder an einer chiralen HPLC-Säule getrennt. Regioselektive Silylierung der äquatorialen OH-Gruppe, Benzoylierung der 2-OH-Gruppe und Desilylierung legten die 1-OH-Gruppe frei, die mit PCl_3 /Benzylalkohol phosphyliert wurde. Oxidation, Hydrogenolyse und Behandlung mit Base lieferten $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. In einer weiteren Synthese von $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[224, 226] wurde das Zwischenprodukt 1,2:5,6-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit über die diastereomeren Di(*L*-menthyloxyessigsäure)ester oder durch Umsetzung zum Diacetat oder Dibutyryl und regio- sowie enantiospezifische enzymatische Desacylierung enantiomerrein erhalten.

Die selektive Blockierung der 1-OH-Gruppe von 2,3-*O*-Cyclohexyliden-*myo*-inosit mit 2-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)phenylacetylchlorid war der entscheidende Schritt in einer weiteren Synthese von enantiomerreinem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[299]. Die resultierende Mischung aus den diastereomeren Estern wurde dabei mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan zur 4,5-O-silylgeschützten Verbindung umgesetzt. Methoxymethylierung der freien 6-OH-Gruppe, chromatographische Trennung der vollständig geschützten Diastereomere, Entfernung der Acyl- und Silylgruppen der jeweiligen Isomere sowie Phosphorylierung mit **56**/*m*-CPBA und Hydrogenolyse lieferten D - bzw. $\text{L-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Die regioselektive 1-*O*-Acylierung von Inositol wurde durch Perborylierung, Transmetallierung mit Bis(acetylacetato)-di-*n*-butylzinn und Umsetzung der Dibutylzinn-Zwischenstufe mit (*-*)-Menthylchlorformiat erzielt^[300]. Die Diastereomere wurden durch Kristallisation getrennt und das D -Isomer mit 2,2-Dimethoxypropan zu $\text{D-1-O-Menthylxycarbonyl-2,3:4,5-di-}O\text{-isopropyliden-}myo\text{-inosit}$ umgesetzt. Benzylierung der 6-OH-Gruppe, Verseifung des Esters und selektive Spaltung des 4,5-

Acetals lieferten nach Phosphorylierung und Hydrogenolyse $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$.

Eine elegante kurze Synthese von $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[287] gelang über 2,3-*O*-(*D*-1,7,7-Trimethyl[2.2.1]bicyclohept-2-yliden)-*myo*-inosit **89** (Abb. 20)^[301], das aus Inositol und *D*-Campherdiacetaldurch eine durch Ausfällung getriebene Gleichgewichtsreaktion erhalten wurde^[275]. Die Umsetzung von **89** mit fünf Äquivalenten Pivaloylchlorid lieferte **90**, das zu **91** benzyliert wurde. Der Pivaloylester wurde anschließend verseift, das Produkt mit dem Phosphepan **60** phosphoryliert und dann zu **92** oxidiert, das zu $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entschützt wurde.

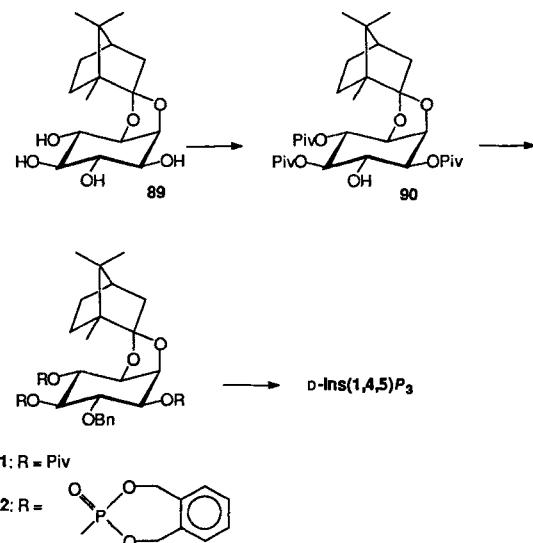


Abb. 20. Eine kurze Route zu $\text{D-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ über das Campheracetal **90** (Salamonczyk und Pietrusiewicz).

Ein konzeptionell ganz anderer Ansatz wurde von Ley et al. entwickelt^[201, 302]. Sie nutzten die Tatsache, daß Benzol durch *Pseudomonas putida* mikrobiell zu *cis*-1,2-Dihydroxycyclohexa-3,5-dien **93** oxidiert wird (Abb. 21 a)^[303]. Das aus diesem Diol abgeleitete cyclische Carbonat **94** wurde stereoselektiv zum α -Epoxid **95** oxidiert. Die regioselektive Ringöffnung von **95** mit Benzylalkohol lieferte **96**, das zu **97** benzyliert wurde. Das 1,2-Carbonat wurde hydrolysiert, die Doppelbindung epoxidiert und die *cis*-1,2-Diolgruppe als Isopropylidenacetal erneut geschützt. Die β -Epoxidgruppe im so erhaltenen **98** wurde mit **99** zum geschützten Inositol **100** geöffnet. Debenzylierung und Phosphorylierung mit TBPP lieferten **101**, das zu racemischen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entschützt wurde. Zur Synthese von D - und $\text{L-Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[201] wurde die Epoxidgruppe in **95** mit (*R*)-(+)*sec*-Phenylethylalkohol geöffnet, wodurch die HPLC-trennbaren Diastereomere **102a** und **102b** entstanden (Abb. 21 b). Auch in einer anderen Synthese von racemischem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde Benzol als Ausgangsmaterial verwendet (Abb. 22)^[291]. *trans*-1,2-Dihydroxycyclohexa-3,5-dien **103** wurde in 40 % Gesamtausbeute durch Birch-Reduktion, Bromierung, *trans*-Hydroxylierung, Acetylierung und Dehydrobromierung hergestellt. Blockierung der Hydroxygruppen als Methoxyethoxymethyl-(MEM)-Ether und [4 + 2]-Addition von Singuletteinsauerstoff lieferten das Endoperoxid **104**, das stereospezifisch zu **105** reduziert wurde^[304]. Inversion der Konfiguration an C-1 durch eine

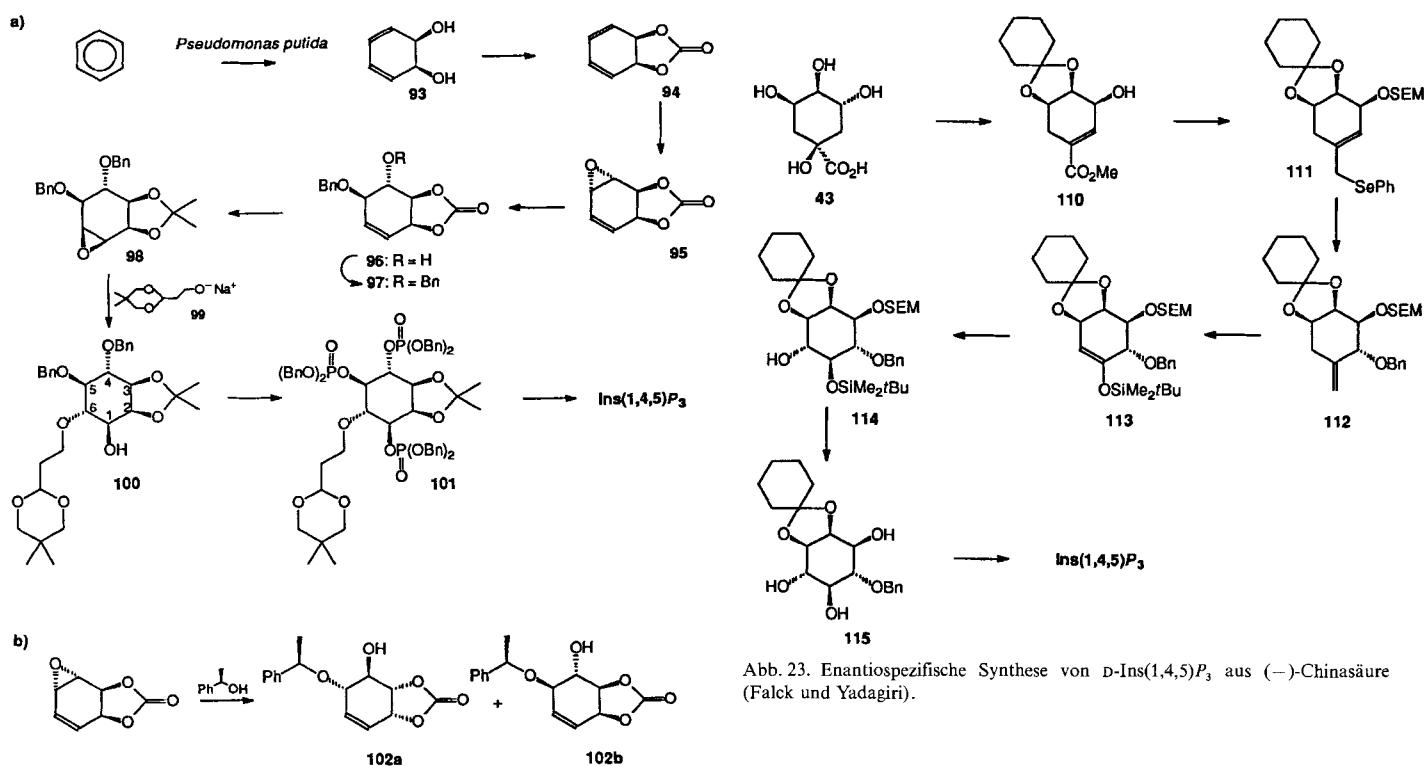


Abb. 21. Zugang zu D-Ins(1,4,5) P_3 durch mikrobielle Oxidation von Benzol (Ley et al.); a) Synthese von Ins(1,4,5) P_3 , b) Umsetzung des Zwischenprodukts 95 aus HPLC-trennbaren Diastereomeren.

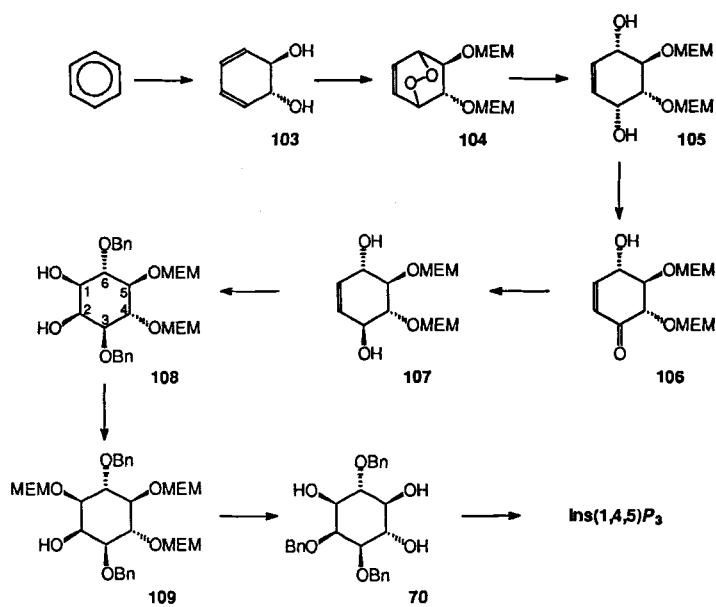


Abb. 22. Synthese von Ins(1,4,5) P_3 aus Benzol. Sie beinhaltet die Photooxidation von 103 sowie das Condurit B-Derivat 107 als Zwischenprodukt (Carless und Bussia).

Oxidations-Reduktions-Sequenz lieferte das Condurit B-Derivat 107, das benzyliert, unter Bildung von 108 *cis*-hydroxyliert und regioselektiv zu 109 methoxyethoxymethyliert wurde. Benzylierung und Abspaltung der MEM-Gruppen gab 70, das mit TBPP phosphoryliert und anschließend zu Ins(1,4,5) P_3 hydrolysiert wurde. Falck und Yadagiri verwendeten zur Synthese von D-Ins(1,4,5) P_3 (–)-Chinasäure 43 (Abb. 23)^[305]. In vier

Stufen wurde der Ester 110 erhalten, der durch Schützen der 1-OH-Gruppe als β -(Trimethylsilyl)ethoxymethyl(SEM)-Ester, Reduktion der Esterfunktion und Selenylierung des so erhaltenen primären Alkohols zu 111 umgesetzt wurde. Aus dem von 111 abgeleiteten Allyl-Selenoxid wurde durch eine stereoselektive [2,3]-sigmatrope Umlagerung und Benzylierung 112 als einziges Stereoisomer erhalten. Dieses wurde durch Ozonolyse und Umsetzung mit TBDMs-Triflat mit nahezu vollständiger Regiospezifität in den Silylenolether 113 überführt. Hydroborierung des Enolethers und Oxidation lieferten den Alkohol 114, der zu 115 desilyliert wurde. TBPP-Phosphorylierung und Hydrogenolyse gaben D-Ins(1,4,5) P_3 . Tegge und Ballou setzten D- und L-chiro-Inositol, die aus 1D-3-O-Methyl-chiro-inositol 42 bzw. L-Quebrachit 10 durch Demethylierung erhalten wurden, ein, um beide Ins(1,4,5) P_3 -Enantiomere herzustellen (Abb. 24)^[306]. Dazu synthetisierten sie das *cis,cis*-Dicyclohexylidenacetal 116

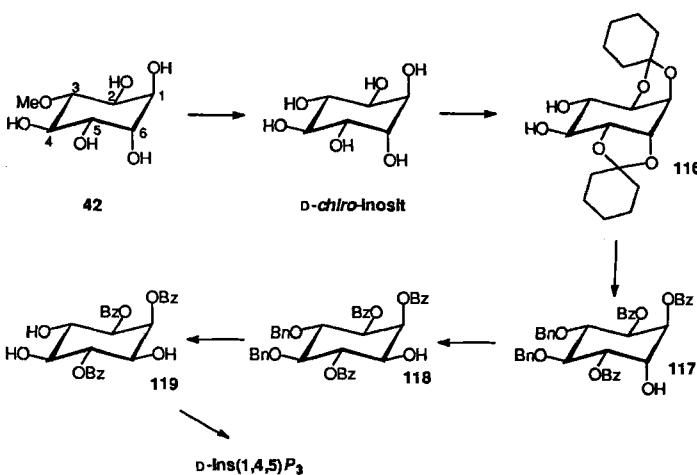


Abb. 24. Synthese von D-Ins(1,4,5) P_3 aus 1D-3-O-Methyl-chiro-inositol (Tegge und Ballou).

aus *D*-*chiro*-Inosit. Durch Benzylierung, Hydrolyse und Benzoylierung von **116** entstand vorwiegend **117**. Die Inversion der Konfiguration an C-1 gelang über das entsprechende Triflat. Das Produkt **118** wurde zu **119** debenzyliert, das dann mit dem Phosphan **56** zu *D*-Ins(1,4,5)*P*₃ phosphoryliert wurde. Das *L*-Isomer wurde ähnlich ausgehend von *L*-*chiro*-Inosit synthetisiert. Weitere Synthesen von optisch aktivem Ins(1,4,5)*P*₃ sind veröffentlicht worden^[307, 308], einschließlich der Herstellung von ³H-markiertem *D*- und *L*-Ins(1,4,5)*P*₃ durch Reduktion einer geschützten Inosose mit ³H]NaBH₄^[309].

7.4.2. Weitere Inosittrisphosphate

Cyclisches *D*-Ins(1:2,4,5)*P*₃ wurde durch Phosphorylierung von *D*-3,6-Di-*O*-benzyl-4,5-bis(dibenzylphospho)-*myo*-inosit mit **50**^[246] und (in niedriger Ausbeute) aus *D*-Ins(1,4,5)*P*₃ mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid^[310] synthetisiert. In dieser Reaktion wurde das Produkt durch HPLC isoliert und gezeigt, daß es mit Säure zu Ins(1,4,5)*P*₃ umgesetzt wird.

Racemisches Ins(2,4,5)*P*₃ wurde aus 4,5-Di-*O*-allyl-3,6-di-*O*-benzyl-*myo*-inosit hergestellt, das selektiv in der 1-Stellung benzyliert, desallyliert und mit TBPP phosphoryliert wurde^[250, 251]. *DL*-Ins(2,4,5)*P*₃ wurde auch aus Benzol über Condurit B-Derivate erhalten^[291]. Die Synthese einer vollständig geschützten, phosphorylierten und enantiomerenreinen *D*-Ins(2,4,5)*P*₃-Vorstufe wurde beschrieben, der letzte Schritt zur Entschützung wurde allerdings nicht verwirklicht^[311]. Denselben Autoren gelang jedoch die Synthese von *D*-Ins(2,4,5)*P*₃: Dazu wurde 3,6-Di-*O*-benzyl-1,2-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit mit TBPP phosphoryliert, das Acetal gespalten und die Enantiomere über die diastereomeren 1-Methoxyessigsäureester getrennt. Die äquatoriale Hydroxygruppe wurde regiospezifisch silyliert und die 2-OH-Gruppe mit PCl₃/Benzylalkohol und durch *t*BuOOH-Oxidation phosphoryliert^[246]. Sowohl *D*- als auch *L*-Ins(2,4,5)*P*₃ wurden aus *L*- bzw. *D*-1,3,4-Tri-*O*-benzoyl-*myo*-inosit hergestellt^[312], die aus *D*- bzw. *L*-*chiro*-Inosit erhalten wurden^[306].

Racemisches Ins(1,3,4)*P*₃ wurde durch Phosphitylierung mit dem Chlorphosphan **54**, Oxidation und Entschützen ausgehend von 2,4,5-Tri-*O*-benzyl-*myo*-inosit synthetisiert^[257], das aus der entsprechenden 1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexylidenverbindung gebildet wurde. Darüber hinaus ist es aus derselben Vorstufe auch mit TBPP **51**^[250, 251] und dem Phosphan **56**^[258] zugänglich. *D*-Ins(1,3,4)*P*₃ wurde durch Trennung der 5,6-Di-*O*-benzyl-3,4-di-*O*-*p*-methoxybenzyl-*myo*-inosit-Enantiomere an einer chiralen HPLC-Säule oder durch deren Racematspaltung über die diastereomeren 1-Methoxyacetate hergestellt^[221]. Enzymatisch oder durch Racematspaltung über die Di(*L*-menthylcarbonate) erhaltenes optisch aktives 1,2:5,6-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit^[224] war die Ausgangsverbindung in einer weiteren Synthese von *D*-Ins(1,3,4)*P*₃ über *D*-2,5,6-Tri-*O*-benzyl-*myo*-inosit^[225, 226]. Boehm und Prestwich synthetisierten beide Ins(1,3,4)*P*₃-Enantiomere sowie radiomarkiertes [³H]Ins(1,3,4)*P*₃^[313]: 2,4,5-Tri-*O*-benzylinosit wurde dabei zum Isopropylidenacetal umgesetzt und dieses über die diastereomeren (–)-Camphansäureester in die Enantiomere getrennt. Verseifung des Esters und Oxidation des Alkohols lieferten die 1-Inosose, die mit ³H]NaBH₄ zum Alkohol mit äquatoria-

ler OH-Gruppe als Hauptprodukt reduziert wurde. Durch Phosphorylierung mit TBPP und Entschützen wurde *D*-[1-³H]Ins(1,3,4)*P*₃ erhalten. Trotz der Verfügbarkeit von Ins(1,3,4)*P*₃ ist seine Ca²⁺-freisetzenden Aktivität noch umstritten. Eine eindeutige Synthese der Enantiomere dieser Verbindung ist jetzt publiziert worden^[314].

Die Synthese von Ins(1,4,6)*P*₃^[315] gelang durch Diallylierung von 1,2:4,5-Di-*O*-isopropyliden-*myo*-inosit, Spaltung des *trans*-Acetals und zinnvermittelte *p*-Methoxybenzylierung des 4,5-Diols, die vorwiegend die gewünschte 6-Alkylverbindung ließ. Benzylierung der 5-OH-Gruppe, saure Hydrolyse des *cis*-Acetals, Benzylierung der 1- und der 2-OH-Gruppe, Isomerisierung der Allylether und Entfernen der resultierenden Prop-1-enyl- sowie der *p*-Methoxybenzylgruppe lieferten das 1,4,6-Triol, das mit **56**/*t*BuOOH phosphoryliert wurde. Von einer weiteren Gruppe wurde Ins(1,4,6)*P*₃ sowohl als Racemat als auch in optisch aktiver Form hergestellt^[316].

7.5. Inosittetrakisphosphate

7.5.1. Inosit-1,3,4,5-tetrakisphosphat

Ins(1,3,4,5)*P*₄ wurde zuerst in racemischer Form aus dem symmetrischen Inositorthoformiat **120** synthetisiert (Abb. 25). Chelatkontrollierte Monoallylierung von **120** gab **121**, das zu

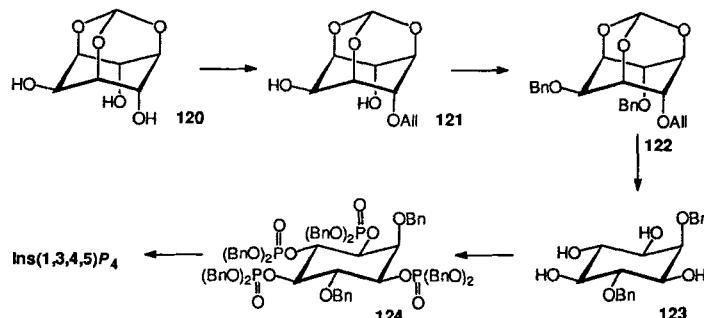


Abb. 25. Synthese von Ins(1,3,4,5)*P*₄ über die chelatkontrollierte Monoallylierung von *myo*-Inositorthoformiat **120** (Billington et al.).

122 benzyliert wurde. Nach Abspaltung der Allyl- und Orthoformiatgruppen wurde das Tetraol **123** erhalten, das mit TBPP zu **124** phosphoryliert wurde. Die katalytische Hydrogenierung von **124** lieferte Ins(1,3,4,5)*P*₄^[282]. Ein ähnlicher Weg wurde von einer anderen Gruppe eingeschlagen^[250], wobei im ersten Schritt statt der Allyl- die Benzyloxymethylschutzgruppe eingeführt wurde^[280]. 2,6-Di-*O*-benzyl-*myo*-inosit **123** wurde auch in zwei Synthesen von Ins(1,3,4,5)*P*₄ mit den Phosphitylierungsreagentien **60**^[317] bzw. **56**^[258] verwendet.

Die Orthoformiatester-Blockierung von *myo*-Inosit war auch in einer Synthese der beiden Ins(1,3,4,5)*P*₄-Enantiomere von Vasella et al. ein entscheidender Schritt (Abb. 26)^[223]. Dazu wurde zunächst der silylierte Orthoester **125**^[281] zur racemischen Monobenzylverbindung **126** benzyliert. Diese wurde mit (*R*)-(+)-1-Phenylethylisocyanat zu den entsprechenden diastereomeren Carbamaten umgesetzt, die nach Entfernen der Silylgruppe als **127a** und **b** getrennt wurden. Die Diastereomere

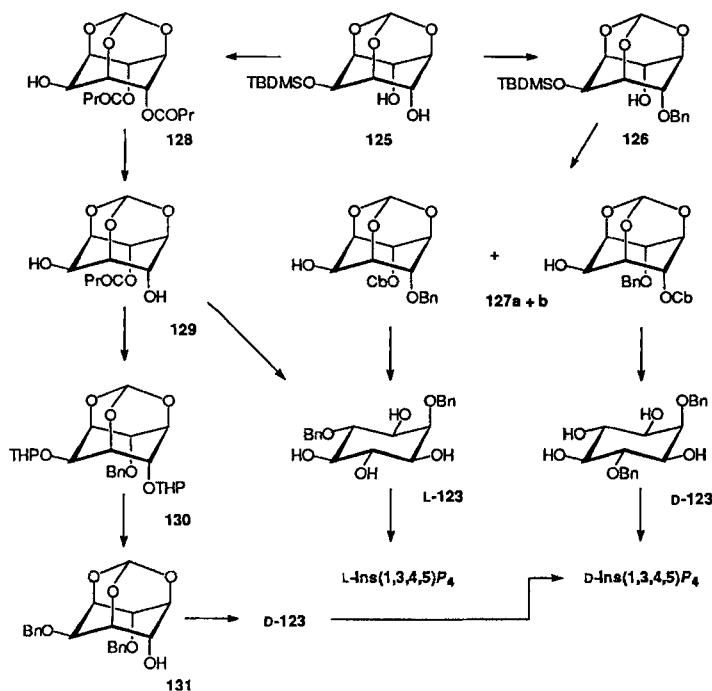


Abb. 26. Chemoenzymatische Route zu den $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Enantiomeren (Vasella et al.).

wurden jeweils benzyliert, und nach der Entfernung der Carbamat- und der Orthoformiatgruppe wurden die Enantiomere von **123** erhalten, die mit **56**/*m*-CPBA phosphoryliert und zu **D-** bzw. **L- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** hydrogenolierte. Die enantiomeren Dibenzylinosite **123** konnten auch durch enantioselektive Monodesacylierung des durch Acylierung und Desilylierung aus **125** gebildeten symmetrischen Dibutyrate **128** gewonnen werden. So gab die Inkubation von **128** mit Schweineleber-Esterase (PLE) das Monobutyrat **129** mit >95% Enantiomerenüberschuss. Benzylierung, Desacylierung und Spaltung des Orthoesters gab die **L- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Vorstufe L-**123****. Das **D**-Isomer konnte durch eine Blockierungs-Deblockierungs-Sequenz aus **129** über **130** und **131** erhalten werden. Überraschenderweise ist **L- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** im Vergleich zu **D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** ein Ligand mit höherer Affinität zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Bindungsstellen in Schweinekleinhirn, wobei dieser Affinitätsunterschied größer ist als der zwischen **L**- und **D- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$** hinsichtlich des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors^[318].

Meek et al.^[255] nutzten die basenkatalysierte Wanderung der 1-Benzoylgruppe im leicht zugänglichen *myo*-Inositol-1,4-dibenzoat, um unter anderem das 2,4-Dibenzoat zu erhalten. Phosphitylierung mit dem Chlorphosphoran **52**, Oxidation, Demethylierung und alkalische Hydrolyse lieferten racemisches $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$.

D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wurde durch Racematspaltung von 3,4,5-Tri-*O*-benzoyl-6-*O*-benzyl-*myo*-inosit synthetisiert, das aus der entsprechenden 1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexylidenverbindung durch selektive Benzoylierung der 3-OH-Gruppe, Benzylierung der 6-OH-Gruppe, Spaltung des *trans*-Acetals, Benzoylierung der 4- sowie der 5-OH-Gruppe und Hydrolyse des *cis*-1,2-Acetals hergestellt wurde. Racematspaltung über die Monomenthyoxy-acetylverbindungen, Benzylierung des gewünschten Diastereomers und Desacylierung gab **D-123**, das mit TBPP phosphoryliert und zu **D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** entschützt wurde^[319].

D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ wurde auch aus 1,4,5-Tri-*O*-allyl-6-*O*-benzyl-*myo*-inosit hergestellt, das durch Racematspaltung enantiomerenrein erhalten wurde. Chemoselektive zinnvermittelte Allylierung der äquatorialen Hydroxygruppe, Benzylierung der 2-OH-Gruppe und Desallylierung lieferten das Tetraol **123**, das mit dem Phosphoran **58** phosphoryliert wurde^[298]. Auf chemoenzymatischem Wege erhaltenes **D-1,2:5,6-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit** diente als Ausgangsmaterial in einer weiteren Synthese von **D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** über **D-123**^[225, 226].

Eine kurze, von Ozaki et al.^[222] entwickelte Route zu $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ beruht auf der selektiven Benzoylierung von Inositol zum 1,3,4,5-Tetrabenzoat, das als Hauptprodukt in 34% Ausbeute isoliert wurde. Benzylierung mit Benzyltrichloracetimidat und Debenzoylierung lieferte das 2,6-geschützte Inositol, das mit dem Phosphoramidit **59** phosphoryliert wurde. Enantiomerenreines $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ist durch chromatographische Trennung des Tetrabenzoat-Racemates an einer chiralen Säule zugänglich. Die gleiche Gruppe beschrieb die enantioselektive Acylierung von Inositen mit Weinsäuremonoester^[320]. So wurde 1,3,5-Tri-*O*-benzoyl-*myo*-inosit, das durch direkte Benzoylierung von Inositol erhalten wurde, enantioselektiv zum 4-Tartrat umgesetzt und die 2- und die 6-OH-Gruppe silyliert. Trennung der vollständig geschützten Diastereomere, Desacylierung mit Ethylmagnesiumbromid, Phosphorylierung und Hydrogenolyse lieferten **D- $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$** ^[308].

7.5.2. Weitere Inosittetrakisphosphate

Racemisches $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$ wurde aus dem 1,2-*O*-Isopropylidenacetal von *myo*-Inositol durch Phosphitylierung mit **52** und Wasserstoffperoxid-Oxidation synthetisiert. Die erforderliche Demethylierung wurde mit Bromtrimethylsilan durchgeführt, da HBr in Essigsäure zur vorzeitigen Hydrolyse des Acetals und zur Wanderung der Phosphatgruppe führte^[255]. **DL- $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$** wurde darüber hinaus durch Phosphitylierung des entsprechenden 1,2-Acetals mit dem Chlorphosphoran **61** hergestellt^[321]. **D- $\text{Ins}(1,4,5,6)\text{P}_4$** wurde durch Racematspaltung über die *O*-Camphanyliden-*myo*-inosit-*cis*-Monoacetale erhalten^[276].

Zur Synthese von $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ wurde Inositol mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxyan regioselektiv zum symmetrischen 1,6:3,4-*O*-Bis(disiloxanylidene)inosit umgesetzt. Benzoylierung und Entfernung der Siloxane mit HF lieferten das 2,5-Dibenzoat, das mit dem Phosphoramidit **59** phosphoryliert wurde^[283].

DL- $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ wurde zuerst durch Benzoylierung von 1,2:4,5-Di-*O*-cyclohexyliden-*myo*-inosit, Acetalhydrolyse, Phosphorylierung mit **52**/Wasserstoffperoxid und stufenweises Entschützen synthetisiert^[255]. Ähnlich wurden in einer neueren Synthese das entsprechende Isopropylidenacetal und **53** als Phosphitylierungsmittel verwendet^[256]. Auch ausgehend von Benzol zugängliche Condurit B-Derivate wurden zur Herstellung von $\text{Ins}(1,2,4,5)\text{P}_4$ genutzt^[291], und **L**-Quebrachit wurde als Ausgangsverbindung in einer Synthese von **L-chiro- $\text{Ins}(1,2,3,5)\text{P}_4$** eingesetzt^[322].

8. Inositphosphat-Analoga

Nachdem Ins(1,4,5)P₃ heute allgemein als sekundärer Botenstoff akzeptiert ist, hat man sich der Synthese von Inositphosphat-Analoga zugewendet, von denen man sich neuartige biologische Eigenschaften verspricht. Es besteht gegenwärtig beträchtliches Interesse an Konzepten für pharmakologische Eintritte in zelluläre Signalübertragungswege. Erst wenn geeignete Rezeptorantagonisten und Enzyminhibitoren, die die Zellmembran passieren können, auch synthetisch zugänglich sind, kann in umfassenden Untersuchungen festgestellt werden, ob diese Verbindungen therapeutischen Nutzen haben.

8.1. Desoxy-Analoga

Auf der Suche nach Inosit-Monophosphatase-Inhibitoren^[323] (siehe Abschnitt 9) wurden die racemischen 2- und 6-Desoxy-Analoga von Ins(1)P synthetisiert. D-2-Desoxy-Ins(1)P wurde ausgehend von D-3,4,5,6-Tetra-O-benzyl-*myo*-inosit hergestellt, das in den entsprechenden 1-Tetrahydropyranyl(THP)-Ether überführt und nach der Barton-McCombie-Methode an C-2 desoxygeniert wurde. Spaltung des THP-Ethers, Phosphorylierung und Hydrogenolyse lieferten D-2-Desoxy-Ins(1)P^[276].

DL-2-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ wurde aus 4,5-Di-O-benzoyl-3,6-di-O-benzyl-1,2-O-cyclohexyliden-*myo*-inosit hergestellt^[324]. Der Acetalhydrolyse folgte die zinnvermittelte Monomethoxy-methylierung der 1-OH-Gruppe. Die Desoxygenierung an C-2 wurde in vier Stufen erreicht: Zunächst wurde die 2-Hydroxygruppe oxidiert; die entstandene Inosose wurde zum Tosylhydrazon umgesetzt, das zum Hydrazin reduziert wurde. Die Hydrazingruppe wurde mit Natriumacetat entfernt. Abspaltung der MOM- und Benzoylschutzgruppen lieferte das 1,4,5-Triol, das mit TBPP phosphoryliert und anschließend entschützt wurde.

Sowohl D-3-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ als auch D-3-Desoxy-Ins(1,5,6)P₃^[325, 326] wurden aus D-3-Desoxy-*myo*-inosit (Viburnit) hergestellt. Diese Verbindung wurde aus O-Diisopropyliden-L-quebrachit durch Barton-Desoxygenierung der freien Hydroxygruppe und Entfernung aller Schutzgruppen mit Bortribromid erhalten und mit 2-Methoxypropen/Säure zu einer Mischung aus den entsprechenden 1,2:4,5- und 1,2:5,6-Di-O-isopropylidenverbindungen umgesetzt. Diese wurden benziliert, unter Spaltung der *trans*-Acetale hydrolysiert und nach Benzoylierung die gebildeten beiden Regioisomere chromatographisch getrennt. Spaltung des Acetals von 4,5-Di-O-benzoyl-6-O-benzyl-3-desoxy-1,2-O-isopropyliden-*myo*-inosit, Benzoylierung der 1-OH-Gruppe, Schützen der axialen OH-Gruppe als Ethoxyethylether und Spaltung des Benzoesäureesters gab das 1,4,5-Triol, das mit TBPP phosphoryliert und zu D-3-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ entschützt wurde. D-3-Desoxy-Ins(1,5,6)P₃ wurde analog aus dem zweiten Regioisomer hergestellt.

DL-6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ **133** (Abb. 27) wurde aus Vorstufen synthetisiert, die durch mikrobielle Oxidation von Benzol zugänglich sind^[201, 327]. Der entscheidende Schritt war die selektive Ringöffnung der Epoxy-Zwischenstufe **98** mit LiAlH₄, die vorwiegend das 6-Desoxy-*myo*-inosit **132** lieferte. D-6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ wurde aus D-Galactose durch die Ferrier-Reaktion hergestellt; Einzelheiten dieser Synthese wurde bislang aller-

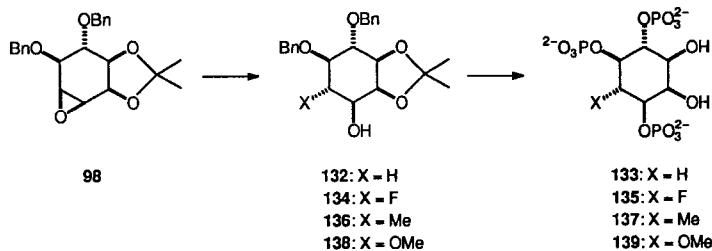


Abb. 27. Zugang zu C-6-modifizierten Ins(1,4,5)P₃-Analoga über das Epoxid **98** (Ley et al.).

dings noch nicht veröffentlicht. Die Wechselwirkungen von D-6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ mit dem Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor sowie metabolischen Enzymen wurden bereits untersucht^[231].

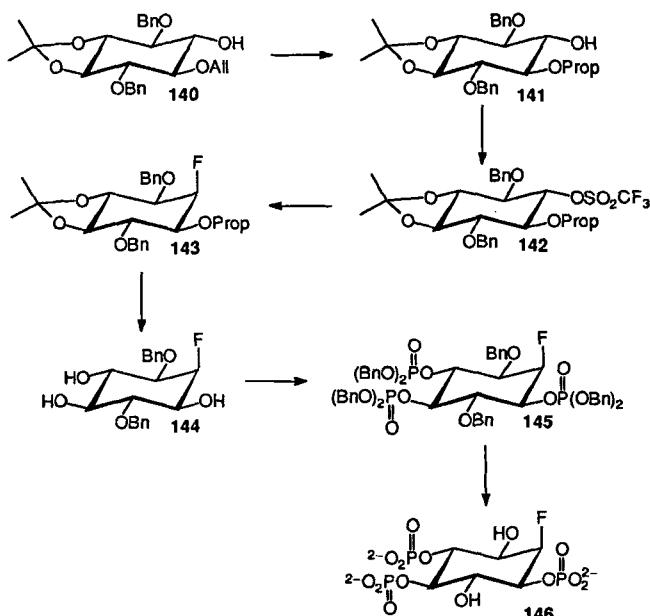
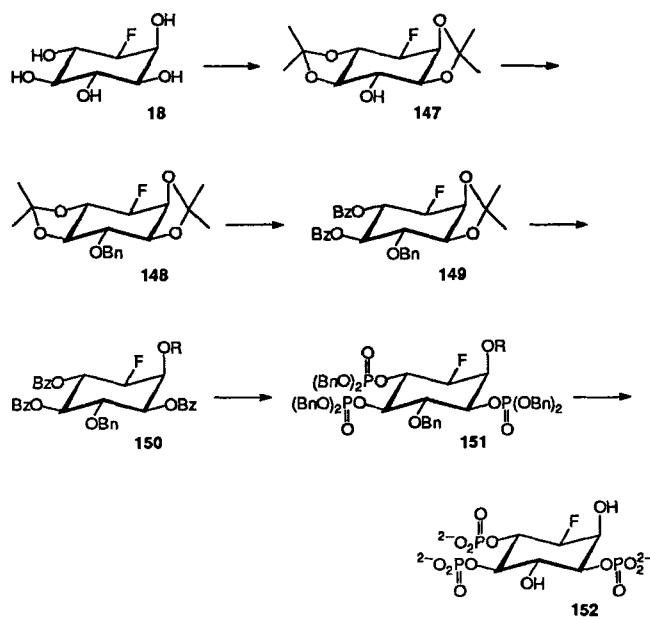
Die Synthesen von 1D-2,3-Didesoxy- und 1D-2,3,6-Tridesoxy-Ins(1,4,5)P₃ aus 1D-1,4,5-Tri-O-benzoyl-6-O-benzyl-3-desoxy-*myo*-inosit, einem Zwischenprodukt bei der Herstellung von 1D-3-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃, sind beschrieben worden^[326]. Racemisches 2,3,6-Tridesoxy-Ins(1,4,5)P₃ (= DL-Cyclohexan-1,2,4-trisphosphat) war zuvor von einer anderen Gruppe hergestellt worden^[328].

8.2. Fluorierte Inositphosphat-Analoga

2-F-*scyllo*-Ins(1,4,5)P₃ und 2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ wurden ausgehend von 1-O-Allyl-3,6-di-O-benzyl-4,5-O-isopropyliden-*myo*-inosit synthetisiert. Diese Verbindung wurde mit DAST unter Inversion der Konfiguration an C-2 monofluoriert, und die *gem*-Difluorverbindung wurde nach Oxidation zur 2-Inosose erhalten. Entschützen der 1-, 4- und 5-OH-Gruppen, Phosphorylierung mit TBPP und Hydrogenolyse lieferten 2-F-*scyllo*-Ins(1,4,5)P₃ bzw. 2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃^[329]. Weitere, ähnliche Synthesen dieser Verbindungen sind veröffentlicht worden^[191, 330]. Die Enantiomere von 3,6-Di-O-benzyl-2-desoxy-2,2-difluor-4,5-isopropyliden-*myo*-inosit wurden durch Racematspaltung der entsprechenden Camphansäureester erhalten, wodurch D- und L-2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ zugänglich sind^[191, 331, 332].

2-F-Ins(1,4,5)P₃ **146** wurde aus dem geschützten *scyllo*-Inositol **140** hergestellt (Abb. 28)^[333]: Die Allylgruppe in **140** wurde zur Prop-1-enylgruppe isomerisiert (**141**) und die freie 2-Hydroxygruppe unter Bildung von **142** triflirt. Substitution des Sulfonatrestes mit Tetrabutylammoniumfluorid lieferte das Fluorinositol **143**. Die säurelabilen Schutzgruppen wurden abgespalten und das resultierende Triol **144** mit 56/tBuOOH zu **145** phosphoryliert, das nach Entschützen **146** gab. Ein früherer Versuch, 2-F-Ins(1,4,5)P₃ aus **140** mit DAST zu synthetisieren, scheiterte, da die Reaktion unerwarteterweise unter Retention der Konfiguration verlief^[329].

Die Umsetzung von D-3-Desoxy-3-fluor-*myo*-inosit **18** (das wie bereits beschrieben aus L-Quebrachit hergestellt wurde) mit 2-Methoxypropen in Gegenwart einer katalytischen Menge an Camphersulfonsäure lieferte eine Mischung aus der 1,2:5,6- und der gewünschten 1,2:4,5-Di-O-isopropylidenverbindung **147** (Abb. 29). Dieses wurde zu **148** benziliert, das *trans*-Acetal gespalten und das entstandene Diol zu **149** benzoyliert. Hydrolyse des verbliebenen Acetals, selektive Benzoylierung der äquato-

Abb. 28. Synthese von 2-F-Ins(1,4,5)P₃ (Lampe und Potter).Abb. 29. Synthese von optisch aktivem 3-F-Ins(1,4,5)P₃ (Kozikowski et al.).

rialen Hydroxygruppe und Schutz der freien axialen Hydroxygruppe mit dem Ethoxyethylrest lieferten 150. Die Benzoylgruppen wurden abgespalten und das so gebildete Triol mit TBPP zu 151 phosphoryliert, das dann schrittweise zu D-3-F-Ins(1,4,5)P₃ 152 entschützt wurde^[334]. Die Synthese von D-3-C-(Trifluormethyl)-Ins(1,4,5)P₃ wurde vor kurzem von derselben Arbeitsgruppe beschrieben^[322].

Racemisches 6-F-Ins(1,4,5)P₃ 135 ist durch mikrobielle Oxidation von Benzol über das Epoxid 98 zugänglich (Abb. 27)^[201, 327]. Die Ringöffnung mit LiAlH₄ lieferte dabei vorwiegend 134. Debenzylierung, Phosphorylierung mit TBPP und Entfernen der Schutzgruppen mit Trimethylsilylbromid liefern 135.

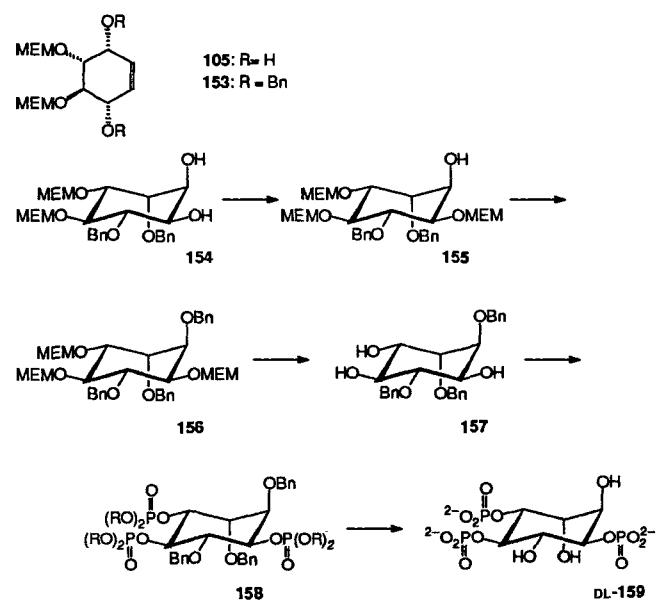
Aus 1,3,4-Tri-O-allyl-5,6-di-O-benzyl-myoinositol wurden 2-F-*scyllo*-Ins(1,3,4)P₃ und 2,2-F₂-Ins(1,3,4)P₃ synthetisiert^[313]. Die Umsetzung mit DAST verlief dabei unter Konfigurationsumkehr, so daß das Fluoratom in äquatorialer Position einge führt wurde. Desallylierung, TBPP-Phosphorylierung und Hydrogenolyse lieferten 2-F-*scyllo*-Ins(1,3,4)P₃. Die Difluorverbindung wurde entsprechend durch Fluorierung der 2-Inosose gewonnen. Durch Inversion der Konfiguration an C-2 vor der Fluorierung wurde versucht, auch das *myo*-Inositol-Zwischenstufe konnte dabei allerdings nicht selektiv desallyliert werden^[313].

8.3. Ringmodifizierte Inositphosphat-Analoga

Das vielseitige, aus Benzol gewonnene Epoxid 98 (Abb. 27) wurde zur Synthese von racemischem 6-Desoxy-6-methyl-Ins(1,4,5)P₃ 137 und 6-O-Methyl-Ins(1,4,5)P₃ 139 verwendet^[201, 302, 327]. Während die Ringöffnung mit Natriummethylat/Methanol vorwiegend 136, die Vorstufe für 137, lieferte, gab die Reaktion von 98 mit Lithium-cyano(dimethyl)cuprat(I) die Methoxyverbindung 138, aus der 139 hergestellt werden kann. DL-6-O-Methyl-Ins(1,4,5)P₃ 139 wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe synthetisiert und charakterisiert^[328].

Ein Ins(1,4,5)P₃-Analogon mit einer äquatorialen 2-Hydroxygruppe, DL-*scyllo*-Ins(1,2,4)P₃, wurde aus 1-O-Allyl-3,6-di-O-benzyl-4,5-O-isopropyliden-myoinositol^[333] durch Triflierung der 2-Hydroxygruppe und Substitution der Triflatgruppe mit Caesiumacetat erhalten.

Synthesen von *chiro*-Ins(2,3,5)P₃ 159, einem Ins(1,4,5)P₃-Analogon mit invertierter Konfiguration an C-3, wurden von zwei Gruppen beschrieben: racemisches 159 (Abb. 30) wurde aus dem Condurit F-Derivat 105 (erhältlich aus Benzol, siehe Abb. 22) hergestellt, das zu 153 benzyliert und dann zum *chiro*-Inositol 154 cis-hydroxyliert wurde. Durch selektives Schützen der äquatorialen Hydroxygruppe als Methoxymethylether (155)

Abb. 30. Photooxidationsansatz zur Herstellung von DL-*chiro*-Inositol-2,3,5-trisphosphat (Carless und Busia).

und Benzylierung wurde das vollständig geschützte **156** erhalten. Dessen saure Hydrolyse lieferte **157**, das mit TBPP zu **158** phosphoryliert wurde. Die anschließende Hydrogenolyse gab **DL-159**^[304]. **L-chiro-Inos(2,3,5)P₃**^[335, 336] wurde ausgehend von **L-chiro-Inositol** synthetisiert (Abb. 31). Die selektive zinnvermittelte Benzylierung lieferte die Schlüsselzwischenstufe **160** als

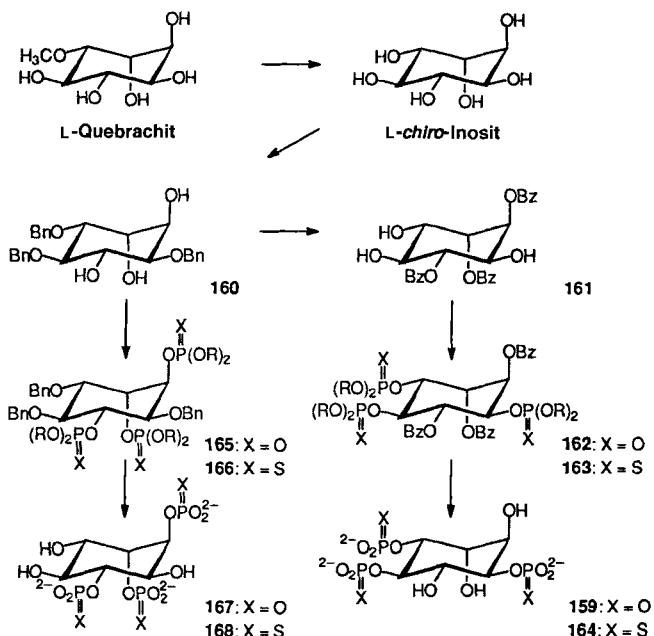


Abb. 31. Synthese von *L-chiro-Inos(1,4,6)P₃* und *L-chiro-Inos(2,3,5)P₃* sowie ihrer Trisphosphorothioat-Analoga aus *L*-Quebrachit (Liu und Potter).

Hauptprodukt. Nach Perbenzoylierung und Spaltung der Benzylerther wurde **161** erhalten, das mit dem Chlorphosphan **53** oder mit dem Phosphan **55** phosphityliert und nach Oxidation zu **162** unter Bildung von **159** entschützt wurde. Das entsprechende Thiophosphat **164** wurde durch Sulfoxidation des Trisphosphitesters von **161** zu **163** und Entschützen hergestellt. Phosphitylierung der Zwischenstufe **160** und Oxidation oder Sulfoxidation des resultierenden Trisphosphitesters lieferten **165** bzw. **166**, die zu *L-chiro-Inos(1,4,6)P₃* **167** bzw. seinem Trisphosphorothioat-Analogon *L-chiro-Inos(1,4,6)PS₃* **168** entschützt wurden^[337].

Carless und Busia^[271] beschrieben die Synthese von *DL-6-F-chiro-Inos(2,3,5)P₃* ausgehend vom *cis*-1,4-Diol **105** (siehe Abb. 21). Benzylierung und *cis*-Hydroxylierung lieferten 1,4-Di-*O*-benzyl-2,3-di-*O*-methoxymethyl-*chiro*-inositol. Selektive Methoxymethylierung der äquatorialen Hydroxygruppe und DAST-Fluorierung unter Retention der Konfiguration führten zum vollständig geschützten, fluorierten *chiro*-Inositol. Hydrolyse der MOM-Ether, TBPP-Phosphorylierung und Hydrogenolyse lieferten *DL-6-F-chiro-Inos(2,3,5)P₃*.

Weitere an C-3 modifizierte Analoga, wie *D*-3-Chlor-, *D*-3-Brom-, und *D*-3-*O*-Methyl-*Inos(1,4,5)P₃*, wurden beschrieben^[338]. Vor kurzem wurde über die erste Synthese eines Amino-Analogs von *Inos(1,4,5)P₃*, *D*-3-Amino-3-desoxy-*Inos(1,4,5)P₃*, berichtet^[339].

8.4. Phosphorothioate

Phosphorothioat-Analoga von Nucleotiden haben sich als sehr wertvoll für Untersuchungen von enzymologischen und molekularbiologischen Mechanismen^[340] sowie von enzymatischen Phosphoryltransferreaktionen erwiesen^[254, 341], und Phosphorothioat-Analoga der etablierten sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP sind schon seit geraumer Zeit verfügbar. Die einzigen bekannten kompetitiven cAMP-Antagonisten (aus vielen hundert cAMP-Analoga), cyclisches (*R_P*)-Adenosin-3',5'-monophosphorothioat und das entsprechende Phosphordithioat, wurden bemerkenswerterweise durch Substitution mit dem Phosphorothioatrest erhalten. Solche Analoga sind deshalb so nützlich, weil sie nicht durch Phosphatasen abgebaut werden^[285]. Inositphosphorothioate werden bereits als erste partielle Agonisten des *Ins(1,4,5)P₃*-Rezeptors diskutiert (siehe Abschnitt 11.1). Durch die Synthese von Phosphorothioat-Analoga können darüber hinaus ³⁵S-Radiomarkierungen ausgezeichnet eingeführt werden. Da die Sulfoxidation gewöhnlich der letzte Syntheseschritt vor der Entfernung der Schutzgruppen ist und mit elementarem Schwefel durchgeführt werden kann, kann die Zahl der Syntheseschritte mit radioaktivem Material auf ein Minimum beschränkt werden. So wurde *D*-[³⁵S]Ins(1,4,5)PS₃ synthetisiert und in Enzym-^[342] und Rezeptorbindungsstudien^[343] untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß es zwei Bindungsstellen markiert: die *Ins(1,4,5)P₃*-Bindungsstelle sowie eine Bindungsstelle des möglicherweise in einer anderen Konformation vorliegenden Rezeptors. Darüber hinaus ist Schwefel ein besseres Nucleophil als Sauerstoff, weshalb die selektive Markierungen von Phosphorothioaten in Gegenwart von Phosphaten z. B. mit Fluoreszenzmarkern möglich ist^[344].

8.4.1. Phosphorothioat-Analoga von Inositmono- und -bisphosphaten

DL-*myo*-Inositol-1-phosphorothioat [*Ins(1)PS*] wurde erstmals durch Umsetzung von Inositol-1,2,4,5,6-pentaacetat mit Thiophosphorylchlorid und nachfolgenden Esterhydrolyse erhalten^[278]. Zur Synthese von racemischem sowie enantiomerenreinem *Ins(1)PS*^[71, 345] wird das entsprechende Penta-*O*-benzyl-inositol, das durch Racematspaltung über die Camphanate in die Enantiomeren getrennt werden konnte, mit dem Phosphoramidit **61** phosphityliert und anschließend sulfoxidiert. Eine Synthese von *L*-*Ins(1)PS* wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben^[346].

Die direkte Thiophosphorylierung beispielsweise von *DL*-1,4,5,6-Tetra-*O*-acetyl-*myo*-inositol mit Thiophosphorylchlorid führt zu einer 1:1-Mischung aus dem *endo*- und dem *exo*-Diastereomer des geschützten cyclischen 1:2-Phosphorothioates, die durch Umkehrphasen-Flash-Chromatographie getrennt wurde. Desacylierung und Ausfällung mit Kaliumchlorid lieferte cyclisches *endo*- und *exo*-*DL*-*myo*-Inositol-1:2-phosphorothioat^[347]. In einem anderen Ansatz wurde die 1- oder die 2-OH-Gruppe von 1,4,5,6-Tetra-*O*-benzyl-*myo*-inositol mit **61** phosphityliert und die gebildeten Monophosphoramidite mit Tetrazol zum *exo*- und *endo*-Methoxyphosphit cyclisiert. Diese wurden unter Bildung einer Mischung der entsprechenden geschützten Diastereomeren Phosphorothioate sulfoxidiert, die

chromatographisch getrennt und entschützt wurden^[263]. Ins(1,4)PS₂^[285] und Ins(4,5)PS₂^[262] wurden aus DL-1,2:4,5-Di-O-isopropyliden- bzw. 1,2,3,4-Tetra-O-benzyl-*myo*-inosit erhalten.

8.4.2. Phosphorothioat-Analoga von Inositoltrisphosphaten

myo-Inosit-1,4,5-trisphosphorothioat [Ins(1,4,5)PS₃] 78 (Abb. 17)^[348] war das erste beschriebene Ins(1,4,5)P₃-Analogon und hat sich als wertvolles Hilfsmittel bei der Aufklärung der biochemischen Rolle von Ins(1,4,5)P₃ erwiesen (siehe Abschnitt 12). Ins(1,4,5)PS₃ wurde aus dem Triol 70 hergestellt, das mit dem Chlorophosphan 55 zum Trisphosphoramidit und weiter mit Tetrazol und 2-Cyanethanol zum Phosphan 75 umgesetzt wurde. Sulfoxidation zu 77 und Entschützen lieferten das Trisphosphorothioat 78. Eine zweite Synthese^[253] ausgehend vom Triol 70 beinhaltet die Phosphitylierung mit 56 zum Trisphosphitriester-Zwischenprodukt und die Sulfurisierung mit Phenacyldisulfid zum Phosphorothioat, das zu Ins(1,4,5)PS₃ entschützt wurde.

2,3,6-Tri-O-benzyl-4,5-O-isopropyliden-*myo*-inosit wurde in Synthesen der 5-Phosphorothioat- und der 4,5-Bisphosphorothioat-Analoga von Ins(1,4,5)P₃, Ins(1,4,5)P₃-5-S^[240, 242] und Ins(1,4,5)P₃-4,5-S₂ verwendet. Mit 47 wurde die 1-OH-Gruppe dieser Zwischenstufe phosphoryliert. Nach Acetalspaltung wurde mit 47 phosphoryliert, wobei eine Mischung aus dem 1,4- und dem 1,5-Bisphosphatetriester erhalten wurde, aus der das 1,4-Produkt auskristallisierte. Phosphitylierung der freien 5-Hydroxygruppe mit dem Chlorophosphan 61, Sulfoxidation und Entschützen lieferten Ins(1,4,5)P₃-5-S. Alternativ konnte das nach der Acetalhydrolyse erhaltene 4,5-Diol mit 55 oder 56 phosphityliert, anschließend sulfoxidiert und zu Ins(1,4,5)P₃-4,5-S₂ entschützt werden. Aus dem 4,5-Bisphosphorothioat wurde das cyclische 4,5-Pyrophosphat durch Desulfurierung mit N-Bromsuccinimid (NBS) erhalten^[349]. In einer weiteren Synthese von Ins(1,4,5)P₃-5-S wurde ein benzylgeschütztes Inosit-1,4-bisphosphat mit freier 5-Hydroxygruppe mit 56 phosphityliert und anschließend mit Phenacyldisulfid umgesetzt^[253].

Ins(1,4,5)P₃-1-S wurde aus 1-O-Allyl-2,3,6-tri-O-benzyl-*myo*-inosit durch Isomerisierung der Allylgruppe zur entsprechenden Prop-1-enylverbindung und deren 4,5-Bisphosphorylierung mit einem P^{III}-Reagens synthetisiert. Entfernen der Prop-1-enylgruppe, Phosphitylierung der 1-Hydroxygruppe und Sulfoxidation lieferten nach Entfernung der Schutzgruppen Ins(1,4,5)P₃-1-S^[350]. Ins(1,4,5)P₃-1-S, das zur Herstellung eines Ins(1,4,5)P₃-Analogons mit einem Fluoreszenzmarker verwendet wurde, wurde aus 1D-1-O-Allyl-2,3,6-tri-O-benzyl-*myo*-inosit in optisch aktiver Form erhalten^[344]. Darüber hinaus wurde DL-Ins(1,4,5)P₃-1-S durch Phosphitylierung mit 56 und Sulfoxidation mit Phenacyldisulfid hergestellt^[253].

Auch die Trisphosphorothioate D-6-Desoxy-Ins(1,4,5)PS₃ und L-chiro-Ins(2,3,5)PS₃^[351, 352] sowie Ins(1,3,5)PS₃, L-Ins(1,4,5)PS₃ und L-chiro-Ins(1,4,6)PS₃^[353] wurden beschrieben.

Ein anderer Weg zur Herstellung von Phosphorothioat-Analoga von Ins(1,4,5)P₃ wurde mit der Thiophosphorylierung von PtdIns und PtdIns(4)P durch Kinasen in menschlichen Erythrocytegeisterzellen und ATPγS beschriftet^[354]. Diese Methode

ist hervorragend zur Synthese der überaus begehrswerten entsprechenden ³⁵S-markierten Verbindungen geeignet. So lieferte die Inkubation von [³⁵S]ATPγS mit Erythrocytegeisterzellen ³⁵S-markierte PtdIns(4,5)P₂-Analoga mit dem ³⁵S-Isotop entweder in der 4- und der 5-Position oder nur in der 5-Position. Phospholipase C spaltete dieses modifizierte Lipid nach Aktivierung mit Ca²⁺ in eine Mischung aus Inosit-1,4-bisphosphat-5-[³⁵S]phosphorothioat und Inosit-1-phosphat-4,5-[³⁵S]bisphosphorothioat, die gegenüber 5-Phosphatase resistent sind.

8.4.3. Phosphorothioat-Analoga von Inosittetrakisphosphaten

Ins(1,3,4,5)P₄-5-S wurde durch Phosphitylierung von 2,6-Di-O-benzyl-1,3,4-tris[(dibenzoxy)phospho]-*myo*-inosit mit 56 und In-situ-Sulfurisierung zum vollständig geschützten Ins(1,3,4,5)P₄-5-S-Analogon erhalten, das zum entsprechenden 5-Phosphorothioat debenzyliert wurde^[253].

Ins(1,3,4,5)P₄-3-S 176 (Abb. 32) wurde aus 169 hergestellt. Acetalhydrolyse und zinnvermittelte para-Methoxybenzylierung der 1-OH-Gruppe lieferten 170, das durch gleichzeitige

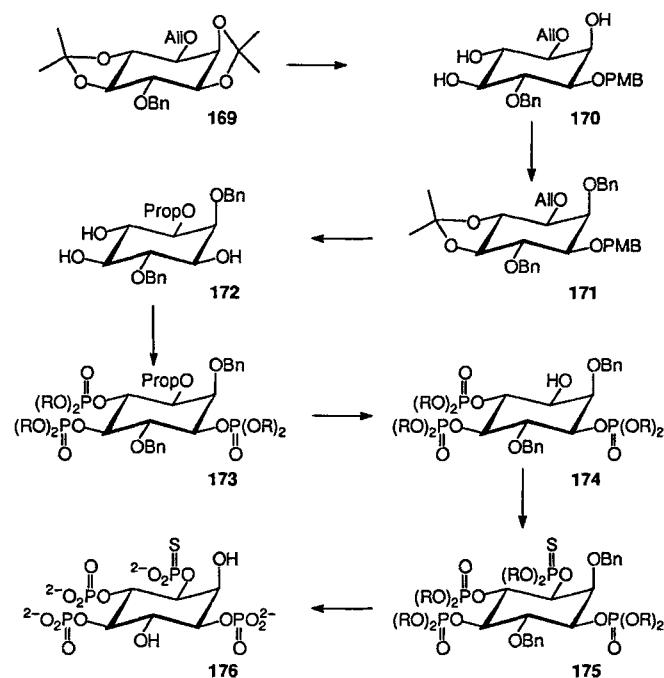


Abb. 32. Synthese von Ins(1,3,4,5)P₄-3-S (Liu und Potter).

Blockierung der 4- und 5-OH-Gruppe als Isopropylidenacetal und Benzylierung der 2-OH-Gruppe in 171 umgewandelt wurde. Die säurelabilen Schutzgruppen wurden abgespalten und die Allylgruppe unter Bildung von 172 isomerisiert. Der 1,4,5-Trisphosphat-Triester 173 wurde dann durch Phosphorylierung erhalten. Der Prop-1-enylether wurde hydrolysiert (→ 174) und die freie 3-OH-Gruppe thiophosphoryliert (→ 175). Entschützen mit Natrium in flüssigem Ammoniak lieferte Ins(1,3,4,5)P₄-3-S 176^[355], einen wirksamen Inhibitor der Ins(1,3,4,5)P₄-3-Phosphatase^[356]. Die Synthese von enantiomerenreinem D-Ins(1,3,4,5)P₄-3S aus L-Quebrachit wurde ebenfalls beschrieben^[357].

8.5. Phosphonat-Analoga

Ausgehend von dem Monoammoniumsalz der Benzylphosphonsäure wurde Inosit-1,4,5-tris(hydrogenphosphonat) synthetisiert. So wurde durch Phosphorylierung von **70** mit dem Salz der aktivierte Säure und Debenzylierung des Produkts mit Base das racemische 1,4,5-Tris(hydrogenphosphonat) erhalten^[358].

Das 5-Methylenphosphonat-Analogon von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, **180**, wurde ebenfalls hergestellt (Abb. 33)^[359]. Verbindung **112**, ein

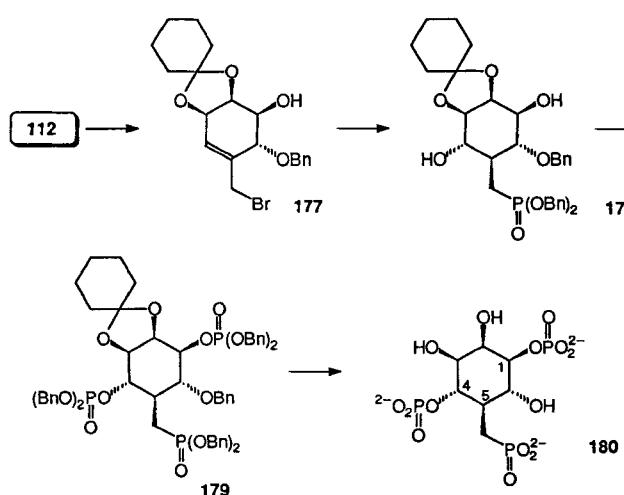


Abb. 33. Synthese des 5-Methylenphosphonat-Analogons von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus Chinasäure (Falck et al.).

Zwischenprodukt in der Synthese von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus (–)-Chinasäure (siehe Abb. 23), wurde dazu desilyliert, und die kinetisch kontrollierte Addition von Phenylselenylbromid an die exocyclische Doppelbindung lieferten überwiegend das anti-Markownikow-Addukt. Durch oxidative Eliminierung wurde das Allylbromid **177** erhalten, das durch Michaelis-Becker-Phosphorylierung und Hydroborierung mit oxidativer Aufarbeitung zu **178** umgesetzt wurde. Die 1- und die 4-Hydroxygruppe wurde unter Bildung von **179** phosphoryliert, das zu **180** entschützt wurde.

Gleichfalls synthetisiert wurden die 5-Methylphosphonat- und die 5-(Difluormethyl)phosphonat-Analoga von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Abb. 34) und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$. Dazu wurde die neuen bifunktionalen Phosphorylierungsreagentien Bis[6-(trifluormethyl)benzotriazol-1-yl]methylphosphonat **185** bzw. Bis(1,2,4-triazolyl)difluormethylphosphonat verwendet^[360, 361]. So wurde **181** regioselektiv zum 6-Benzylether als Hauptprodukt benzyliert und die freie 5-Hydroxygruppe durch *p*-Methoxybenzylierung geschützt. Spaltung des *cis*-Acetals lieferte **182**, das benzyliert und weiter zu **183** desallyliert wurde. Die 1- und die 4-OH-Gruppe wurden mit **56** phosphoryliert und die *p*-Methoxybenzylgruppe unter sauren Bedingungen abgespalten (→**184**). Die OH-Gruppe in **184** wurde mit **185** und Benzylalkohol phosphonyliert, und die Hydrogenolyse von **186** lieferte das 5-Methylphosphonat-Analogon **187**. Synthesen von racemischen 3-Methylphosphonat-Analoga von $\text{Ins}(3,4)\text{P}_2$ und $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ wurden ebenfalls beschrieben^[362]. Das Phosphorylierungsreagens **185** wurde auch zur Herstellung des Methylphospho-

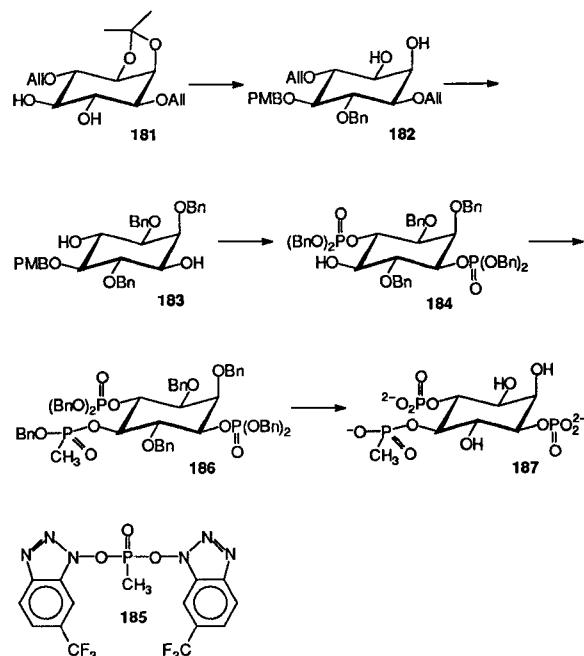


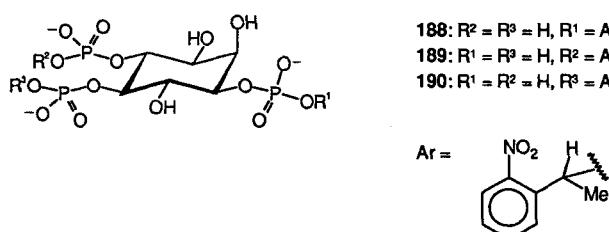
Abb. 34. Herstellung des 5-Methylphosphonat-Analogons von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit dem Phosphorylierungsreagens **185** (van Boom et al.).

nat-Analogous von *D*- $\text{Ins}(1)\text{P}$ ^[363] und zu der von *DL*-*myo*-Inositol-1-*O*-methylphosphonat-4,5-bisphosphat^[364] verwendet.

Racemisches *myo*-Inositol-5-methylphosphonat, -4,5-bis(methylphosphonat) und -1,4,5-tris(methylphosphonat) wurden mit P^{III} -Reagentien über die entsprechenden Phosphinate synthetisiert^[365, 366].

8.6. „Maskierte“ Analoga

Die photochemisch induzierte Freisetzung von aktiven, physiologisch interessanten Verbindungen wie ATP, GTP und sekundären Botenstoffen sowie sogar von Ionen aus einer inaktiven Vorstufe ist für zellphysiologische Untersuchungen außerordentlich interessant, besonders in kinetischer Hinsicht, da die Aufnahme von Agentien ins Gewebe häufig durch langsame Diffusion begrenzt wird. Inaktive Vorstufen, die bei Bestrahlung z. B. einen freien sekundären Botenstoff geben, werden als „maskierte“ Verbindungen^[367, 368] bezeichnet. Mit ihnen sind zeitabhängige Messungen möglich. Durch Veresterung der drei Phosphatmonoestergruppen in $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit 1(2-Nitrophenyl)diazoethan^[369] wurde das maskierte Inositol-1,4,5-trisphosphat^[370] als Mischung aus ein- und mehrfach maskierten Verbindungen erhalten. Die einfach maskierten Verbindungen wurde durch HPLC in die P-1-, P-4- und P-5-Isomeren **188**, **189** und **190** (Abb. 35) getrennt. Aus allen drei Verbindungen ließ sich durch Bestrahlung $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ freisetzen. Anders als **188**, das Ca^{2+} effizient freisetzt und ein 5-Phosphatase-Substrat ist, sind **189** und **190** inaktiv hinsichtlich einer Ca^{2+} -Freisetzung und 5-Phosphatase-resistent. **190** ist darüber hinaus ein 3-Kinase-Inhibitor. Mit den Analoga **189** und **190** wurde die Rolle von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ in der Kopplung von Anregung und Kontraktion in Muskeln untersucht^[371, 372]. Die Ergebnisse deuten auf eine essentielle Rolle dieser Verbindung in der pharmako-

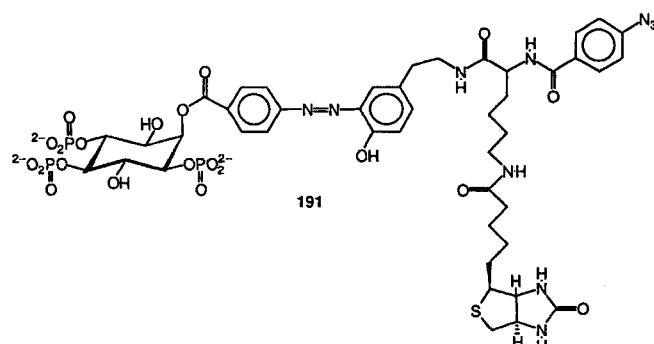
Abb. 35. Regioisomere des maskierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Trentham et al.).

mechanischen Kopplung in glatter, nicht aber gestreifter Muskulatur. Studien mit Stoma-Wächterzellen haben ergeben, daß K^+ -Kanäle nach Photolyse von maskiertem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 190 reversibel inaktiviert werden^[373].

8.7. Photoaffinitäts-Analoga und Affinitätsmatrizen

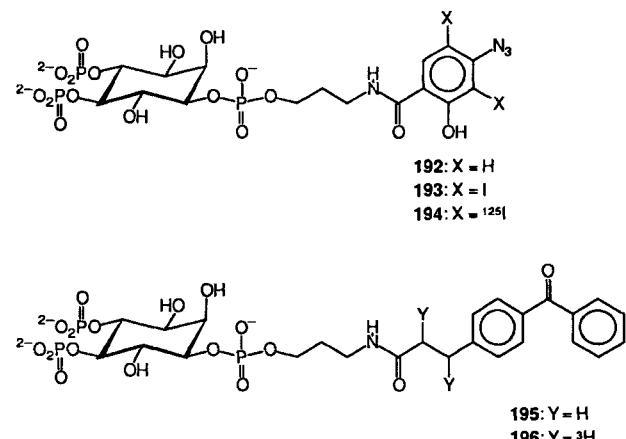
Photoaffinitäts-Analoga von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ sind begehrte Verbindungen für Lokalisierungstudien und zur Reinigung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren. Zunächst wurde ein Arylazidderivat von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ hergestellt^[374]: Dazu wurde $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol an *p*-Azidobenzoësäure gebunden, wobei allerdings die Anknüpfungsstelle der *p*-Azidobenzoësäuregruppe nicht bestimmt und Hydroxygruppen-Substitution angenommen wurde. Mit der so erhaltenen Mischung aus den Arylaziden konnte eine irreversible Inhibierung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung in Saponin-permeabilisierten, lichtbestrahlten Makrophagen festgestellt werden, die in Gegenwart eines großen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Überschusses verhindert wurde. Es wurde gezeigt, daß dieser Photoaffinitätsmarker drei Proteine in den Makrophagen markiert^[375].

Die Acylierung der 2-OH-Gruppe von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ lieferte Analoga^[376], mit denen Affinitätsmatrizen durch Immobilisierung der Derivate auf Sepharose präpariert wurden^[377]. Aus 2-*O*-*p*-Aminobenzoyl- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde die Photoaffinitätssonde 191 synthetisiert, die einen Biotinrest als nichtradioaktive Markierung trägt (Abb. 36). Diese Verbindung wurde erfolgreich zur Markierung der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -5-Phosphatase in Erythrocytengesteierzellen eingesetzt^[378]. Vor kurzem wurde über die Herstellung von Affinitätssäulen mit 2-substituierten $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ - und $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -Analoga und über deren Anwendung zur Isolierung von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -bindenden Proteinen berichtet^[379].

Abb. 36. An C-2 biotinyliertes $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Ozaki et al.).

(\pm)-(1*R*,3*R*,4*R*)-*trans*-*N*-(2-Aminoethyl)-3,4-bis(phosphonyloxy)cyclohexan-1-carboxamid wurde zur Herstellung einer Affinitätsmatrix und eines Photoaffinitätsmarkers verwendet^[380], ein Beweis der Nützlichkeit solcher Derivate steht allerdings noch aus. 6-*O*-Substituierte D - $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analoga wurden hingegen mit Erfolg zur Bildung und Reinigung von Antikörpern gegen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ eingesetzt, indem auf $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ basierende Immunogene sowie eine Affinitätsmatrix hergestellt wurden^[381].

Reaktive, an der 1-Phosphatgruppe ω -Aminoalkyl-substituierte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[382], $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ^[383] und InsP_6 ^[384] wurden zur Herstellung von Affinitätsmatrizen für die Reinigung von Bindungsproteinen^[382, 385] sowie [¹²⁵I]-markierten Photoaffinitäts-Analoga verwendet^[175, 386, 387]. So wurde mit [¹²⁵I](Azidosalicyl)aminopropyl- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 194 (Abb. 37) das

Abb. 37. Photoaffinitätsmarker durch Modifikation der 1-Position von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ (Prestwich et al.).

bedeutendste $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Bindungsprotein in olfaktorischen Cilien identifiziert^[387]. Mit dem neuen Photoaffinitätsmarker [³H](Benzoyldihydrocinnamyl)aminopropyl- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ 196, der wesentlich besser als 194 in den Kleinhirnrezeptor von Ratten inkorporiert wird, gelang es, ein Peptid zu reinigen und zu sequenzieren, das spezifischen Sequenzen der N-terminalen Region des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors entspricht^[175], die wahrscheinlich die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Erkennungsstelle enthält. Ein auf diese Weise isolierter InsP_6 -Rezeptor wurde später als das Clathrin-Assembly-Protein AP-2 identifiziert^[388]. Synthesen von reaktiven $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ - und $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ -Verbindungen sowie deren Verwendung zur Herstellung von Bioaffinitätsmatrizen sind ebenfalls beschrieben worden^[389].

Reaktives D - $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ^[235, 236] wurde in einer biomimetischen Synthese über die Ferrier-Umlagerung einer geeignet geschützten D -Glucose hergestellt (Abb. 38). Dabei wurde die primäre Hydroxygruppe in 46 trityliert, die sekundären Hydroxygruppen wurden *p*-methoxybenzyliert und die Tritylgruppe unter Bildung von 197 entfernt. Swern-Oxidation und Umsetzung des erhaltenen Aldehyds mit Essigsäureanhydrid und Base lieferten das (*Z*)-Enolacetat 198, das in einer Ferrier-Umlagerung zur Inosose 199 umgesetzt wurde. Die Keto-Carbonylgruppe wurde mit Natriumtriacetoxyborhydrid unter Bildung des Inosits 200 stereoselektiv reduziert. Die 6- und die 2-Hydroxy-

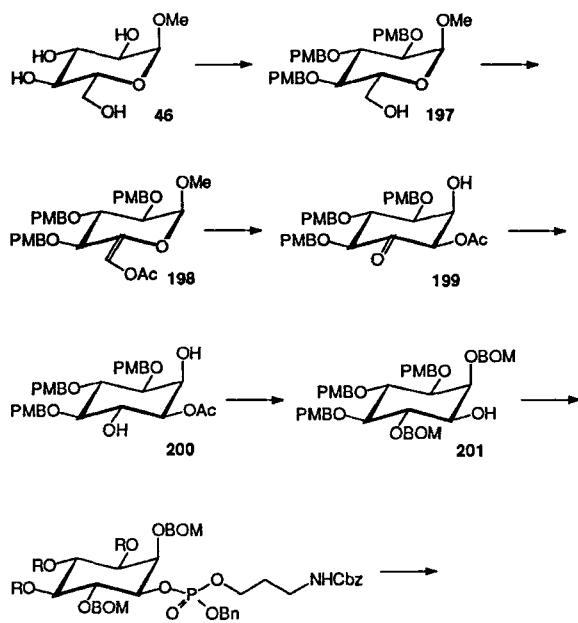


Abb. 38. Biomimetische Synthese einer Vorstufe eines $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Affinitätsmarkers (Estevez und Prestwich).

gruppe wurden dann schrittweise als Benzyloxymethylether geschützt, um eine Acetylwanderung zu verhindern. Das Produkt der anschließenden basischen Methanolysen, **201**, wurde mit Benzyloxy{[3-(*N*-carbobenzyloxyamino)propyl]oxy}(diisopropylamino)phosphoran/Tetrazol zum Phosphat kondensiert, das zu **202** oxidiert wurde. Durch Spaltung der PMB-Ether und Phosphorylierung wurde **203** erhalten, das zum an der 1-Phosphatgruppe substituierten reaktiven $\text{D-Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ **204** hydrogenoliert wurde. Aus **204** wurde ein ^{125}I -markierter, zu **192** analoger Affinitätsmarker hergestellt.

8.8. Lipophile Analoga

Daß zellpermeable Inositphosphat-Analoga für viele Anwendungen wichtig werden würden, war offensichtlich. Deshalb wurde die Synthese von racemischem 2,3,6-Tributryryl-Inositol-1,4,5-P₃ durch Phosphorylierung von 1,2,4-Tri-O-butyryl-myoinositol mit Dianilidophosphorochloridat und Entfernung der Phosphatschutzgruppen angegangen^[390]. Die Brauchbarkeit dieses Tributryrylinosits muß sich allerdings erst noch erweisen.

Die Maskierung der negativen Ladungen von anionischen Biomolekülen ist eine andere Strategie und wurde schon erfolgreich in der Synthese eines lipophilen cAMP-Analogons angewendet^[391]. In diesem Fall wurden die Phosphatgruppen mit Acetoxymethylbromid verestert. Die Acetoxymethylester werden in der Zelle schnell unter Freisetzung des sekundären Botenstoffs gespalten. Über die Synthese von membran durchgängigen $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ -Analoga wurde berichtet^[392].

8.9. Verschiedenes

Mehrere C-1-modifizierte $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analoga wurden durch chemische Modifikation des desacylierten Lipids 1-(*sn*-Glycero-3-phospho)-D-*myo*-inositol-4,5-bisphosphat erhalten^[393]. Synthesen von racemischen Sulfonamid-, Sulfat- und Carboxymethyl-Analoga^[366, 394], des enantiomerenreinen Hexadesoxy-1,4,5-tris(methylensulfonsäure)-Analogons von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[395] sowie des 3-Methylencarboxylat-Analogons von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ ^[396] wurden ebenfalls beschrieben.

9. Inosit-Monophosphatase-Inhibitoren

Bemühungen in Richtung auf die Synthese von Inosit-Monophosphatase-Inhibitoren durch Forscher bei Merck, Sharpe and Dohme^[323, 397–404] haben ermutigende Resultate geliefert. Einige aktive Verbindungen sind hergestellt worden, die allerdings anders als Lithium auf kompetitive Art wechselwirken (Abb. 39).

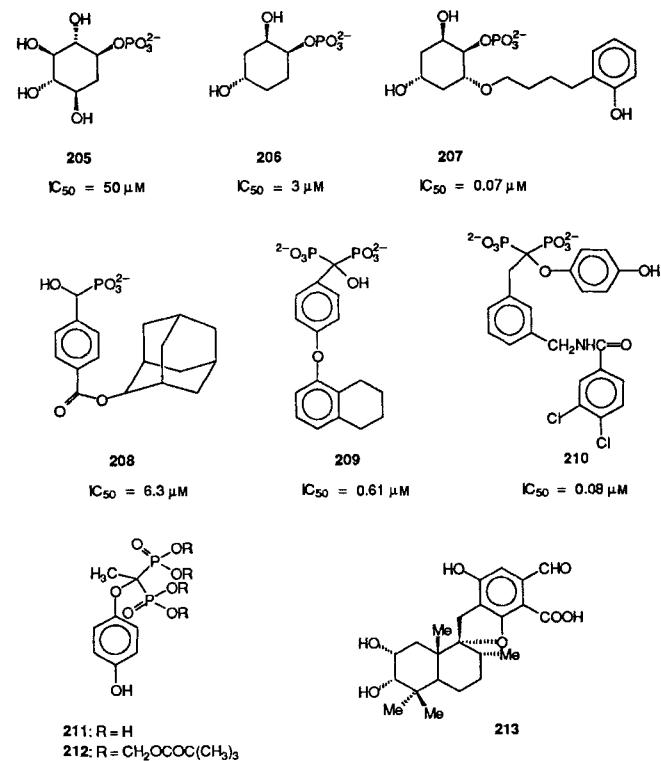


Abb. 39. Inhibitoren der Inosit-Monophosphatase.

Die beiden α -Hydroxygruppen in der 2- und der 6-Position spielen bei der Hydrolyse von $\text{Ins}(1)\text{P}$ durch Inosit-Monophosphatase sehr unterschiedliche Rollen: Während die 2-Hydroxygruppe wichtig für die Substraterkennung durch das Enzym ist – 2-Desoxy- $\text{Ins}(1)\text{P}$ ist nur ein schwaches Substrat –, ist die 6-Hydroxygruppe an der Phosphathydrolyse beteiligt (demzufolge haben 6-Desoxyverbindungen wie **205** inhibierende Eigenschaften). Der erste Ansatz zur Herstellung von Inhibitoren basierte auf diesem Befund, und in einer Hydroxygruppeneliminierungs-Strategie wurde D-3,5,6-Tridesoxy- $\text{Ins}(1)\text{P}$ **206** synthetisiert und als wirksamer Inhibitor identifiziert^[397], was darauf hindeutet,

daß die 3- und die 5-Hydroxygruppe für eine Erkennung durch das Enzym nicht nötig sind.

Inosit-Monophosphatase ist sehr unspezifisch, und das Enzym kann außer Inositmonophosphaten auch 2'-Nucleotide wie Adenosin-2'-monophosphat (2'-AMP)^[74] hydrolysieren. Durch Überlagerung der Molekülstrukturen von 2'-AMP und D-3,5,6-Tridesoxy-Ins(1)P **206** kam man zu dem Schluß, daß Substituenten in der 6-Position (der Purin-Heterocyclus in 2'-AMP) vom Enzym toleriert werden würden. Dies führte zur Synthese von 6-substituierten 3,5-Didesoxy-Ins(1)P-Derivaten wie **207**, dem bis heute wirksamsten bekannten Monophosphatase-Inhibitor^[398].

Phosphatester sind allerdings biologisch labil und haben wegen der Hydrolyse durch unspezifische Phosphatasen häufig kurze Halbwertszeiten. Es wurde deshalb versucht, die Stabilität der Inhibitoren durch Ersetzen des Phosphatesters mit einer isosteren, aber stabilen Monophosphonatgruppe zu erhöhen. Da *myo*-Inosit-1-methylenphosphonat nicht inhibierend wirkt, wurde in der Suche nach Inhibitoren von Hydroxymethylenphosphonat ausgegangen, das ein schwacher Inhibitor ist. Unter mehreren Analoga war der Adamantylester **208** der wirksamste Inhibitor mit $K_i = 6.3 \mu\text{M}$. Weitere Studien mit Hydroxymethylenbisphosphonsäuren^[400, 403, 404] ergaben, daß auch Verbindungen wie das Tetralin **209**, die sich nicht vom natürlichen Substrat des Enzyms ableiten, sehr wirksame Monophosphatase-Inhibitoren sein können. Die 3-(3,4-Dichlorbenzamido)benzylverbindung **210** ist der wirksamste, nicht-hydrolysierbare Inhibitor der Inosit-Monophosphatase, der bisher beschrieben wurde^[402]. Der Befund, daß das wirksame Bisphosphonat **211**^[403] nur schlecht resorbiert wurde, führte zur Entwicklung des weniger polaren Prodrugs **212**^[404]. Die Forscher von Merck, Sharpe and Dohme haben ihre Synthese-Anstrengungen nun auf Derivate und Analoga von Adenosin-2'-monophosphat ausgeweitet^[405], und Molecular-modeling-, kinetische und Mutagenese-Untersuchungen^[406] sollen zur weiteren Aufklärung des Enzymmechanismus beitragen. Es sollte hier auch auf einen Bericht über die nichtkompetitive Hemmung von Inosit-Monophosphatase durch den Pilzmetaboliten K-76-Monocarbonsäure **213**^[407] hingewiesen werden.

10. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen mit Ins(1,4,5)P₃-Analoga

In diesem Abschnitt werden die Konsequenzen von Strukturmodifikationen von Ins(1,4,5)P₃ im Hinblick auf die drei Bindungsproteine, d. h. den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor und die beiden metabolischen Enzyme 5-Phosphatase und 3-Kinase, besprochen.

10.1. Strukturvoraussetzungen für die Freisetzung von Ca²⁺

Die Ins(1,4,5)P₃-Analoga müssen zur Auslösung der Ca²⁺-Freisetzung durch den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor beträchtlichen stereo- und regiospezifischen Anforderungen genügen. Von den drei bedeutendsten Bindungsproteinen scheint die Ins(1,4,5)P₃-3-Kinase das spezifischste in der Erkennung von Ins(1,4,5)P₃ zu sein, während die Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase wesentlich weni-

ger spezifisch ist. Die Spezifität des Ins(1,4,5)P₃-Rezeptors liegt offensichtlich zwischen diesen beiden Extremen. Die Stereospezifität des Rezeptors wird durch die Tatsache belegt, daß L-Ins(1,4,5)P₃ [= D-Ins(3,5,6)P₃] nicht in der Lage ist, Ca²⁺ zu mobilisieren^[131, 408]. Die Rezeptorbindung dieses synthetischen Enantiomers ist ca. 2000mal schwächer als die von natürlichem D-Ins(1,4,5)P₃^[328, 409]. Die Enantiomere von 2-Desoxy-2,2-difluor-Ins(1,4,5)P₃ weisen gleichfalls sehr unterschiedliche Agonisteneigenschaften auf^[331, 332]. D-2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ ist ein voller Agonist und nur etwas weniger wirksam als Ins(1,4,5)P₃, während das L-Isomer ein sehr schlechter Agonist ist.

Ins(1,2,4,5)P₃, Ins(4,5)P₂ und GroPtdIns(4,5)P₂ waren um den Faktor 13–15^[109, 410], 650^[411] bzw. 3–10^[109, 393] schwächer als Ins(1,4,5)P₃; die meisten anderen natürlich vorkommenden Inositphosphate einschließlich Ins(1)P, Ins(1:2)P, Ins(1,4)P₂^[19], Ins(1,3,4)P₃^[131, 328], Ins(1,3,4,5,6)P₅^[138, 412] und InsP₆ (Phytinsäure)^[131] sind als Agonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor unwirksam. Zwar ist die genaue Rolle von Ins(1,3,4,5)P₄ noch umstritten, doch wurde nachgewiesen, daß es Ca²⁺ mobilisiert^[138] und zwar wahrscheinlich über den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor^[413]. Ins(1,4,6)P₃ ist überraschenderweise ein voller Agonist des Ins(1,4,5)P₃-Rezeptors^[315, 414]. Auf eindeutigem Wege hergestelltes D-Ins(1,3,6)P₃ [= L-Ins(1,3,4)P₃], das in *Limulus*-Photorezeptoren Ca²⁺-mobilisierend wirkt^[314], und andere Befunde^[414] halfen schließlich, eine lange herrschende Unklarheit zu beseitigen.

Mit einigen halbsynthetischen, 1-substituierten Ins(1,4,5)P₃-Analoga^[393], die Ca²⁺ freisetzen, wurde nachgewiesen, daß sterisch anspruchsvolle Gruppen an C-1 die Aktivität nicht wesentlich vermindern. Ähnliche Ergebnisse wurden mit diesen Verbindungen als Inhibitoren von Aldolase A erhalten, einem Enzym, das Inositpolyphosphate wirksam und isomerenselektiv bindet^[415]. Mit dem 1-O-(3-Aminopropyl)ester von Ins(1,4,5)P₃ und mit einem davon abgeleiteten Photoaffinitäts-Analogen^[382] konnte ebenfalls die Freisetzung von Ca²⁺ hervorgerufen werden, wobei beide Verbindungen etwa um den Faktor 8 schwächer waren als Ins(1,4,5)P₃. Auch die Rezeptorbindung dieser Ester war gut, und mit dem Photoaffinitätsderivat wurden Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstellen erfolgreich markiert^[175]. Das 1-Phosphorothioat-Analogon von Ins(1,4,5)P₃ wie auch fluoreszenzmarkiertes Ins(1,4,5)P₃-1-S sind ebenfalls wirksame Ca²⁺-mobilisierende Agonisten^[344].

Wie in der 1-Position werden auch in der axialen 2-Position große Substituenten toleriert, ohne daß die Fähigkeit der Analoga, als volle Agonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor zu agieren, beeinträchtigt wird^[410]. Die Desoxygenierung führt zu einem nur geringen Aktivitätsverlust^[410], und die Inversion am hydroxysubstituierten C-Atom [*scylo*-Ins(1,2,4)P₃^[333]] liefert einen hochwirksamen Agonisten^[416]. DL-2-F-Ins(1,4,5)P₃^[333] ist hinsichtlich der Mobilisierung von gespeichertem Ca²⁺ ebenso wirksam wie Ins(1,4,5)P₃. Der Vergleich mit 2-F-*scylo*-Ins(1,4,5)P₃ und 2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ (die ebenfalls volle Agonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor sind)^[330, 417] zeigt, daß sich die größere Ähnlichkeit der Strukturen von 2-F-Ins(1,4,5)P₃ und Ins(1,4,5)P₃ in der biologischen Aktivität widerspiegelt. Die Vermutung, daß die 2-Hydroxygruppe von Ins(1,4,5)P₃ eher als Wasserstoffbrückenbindungsacceptor denn als -donor mit dem Rezeptor wechselwirkt^[330, 417], wird dadurch gestützt, daß das Fluoratom in 2-F-Ins(1,4,5)P₃ zwar keine Wasserstoffbrücken-

bindung mehr bilden kann, das Analogon aber immer noch so wirksam ist wie $\text{Ins}(1,4,5)P_3$. DL- $\text{Ins}(1,2,4,5)P_4$ wurde pharmakologisch untersucht und ist das wirksamste bisher beschriebene Inosittetrakisphosphat^[256].

D-3-Desoxy- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[325], D-3-F- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[334] und D-3-C-(Trifluormethyl)- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[322] mobilisieren Ca^{2+} als volle Agonisten. Diese Verbindungen sind ähnlich wirksam wie $\text{Ins}(1,4,5)P_3$. Analoga mit zunehmend sterisch anspruchsvollen Substituenten an C-3 (Cl, Br und MeO) weisen eine abnehmende Aktivität in Hinblick auf Rezeptorbindung und Ca^{2+} -Freisetzung auf^[200, 338]. L-chiro- $\text{Ins}(2,3,5)P_3$ ^[335, 336], ein $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Analogon mit einer axialen statt einer äquatorialen 3-Hydroxygruppe, ist ein wirksamer Agonist zur Mobilisierung von gespeichertem Ca^{2+} mit einem im Vergleich zu $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ nur etwa 5- bis 10fach höherem EC₅₀-Wert^[335, 417]. Die pharmakologischen Eigenschaften von DL-6-F-chiro- $\text{Ins}(2,3,5)P_3$ ^[271] wurden noch nicht bestimmt. $\text{Ins}(1,3,4,5)P_4$, das durch 3-Kinase aus $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ entsteht, hemmt die Bindung von [³H] $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ an Membranen im Kleinhirn. Die Rezeptoraffinität dieses Tetrakisphosphates ist jedoch etwa um den Faktor 60 niedriger als die von $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[418]. Ähnlich verringert ist die Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung^[328]. Darüber hinaus wird auch eine axiale Phosphatgruppe an C-3 nicht toleriert^[322]. Diese Resultate zeigen, daß die 3-Hydroxygruppe überraschenderweise eine relativ unbedeutende Rolle in der Rezeptorbindung und der Ca^{2+} -Freisetzung spielt. Erhöhte sterische Anforderungen von Substituenten (wie einer zusätzlichen Phosphatgruppe) in dieser Position verringern die Rezeptorbindungseigenschaften allerdings erheblich. Es wurde daher vorgeschlagen, daß die Phosphorylierung zu $\text{Ins}(1,3,4,5)P_4$ der Hauptmechanismus zur Regulation der $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Rezeptorbindung sei^[417]. Wie eine vor kurzem veröffentlichte Studie über D-3-Amino-3-desoxy- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ergab, ist diese Verbindung offensichtlich ein pH-abhängiger partieller Agonist^[339].

Seit den frühen Arbeiten von Berridge und Irvine^[419] hielt man das 4,5-Bisphosphatmotiv als entscheidend für die Ca^{2+} -mobilisierende Aktivität. Die Phosphatgruppe an C-4 scheint für die Erkennung durch den $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Rezeptor wesentlich zu sein: Alle Inositphosphate, denen diese Einheit fehlt, sind inaktiv (für Ausnahmen von diesem Verhalten siehe Jastorff et al.^[420]). $\text{Ins}(1,4,5)P_3\text{-}4,5\text{-S}_2$ ist ein wirksamer Ca^{2+} -mobilisierender Agonist, was nahelegt, daß zumindest der Phosphorothioat-substituent an C-4 toleriert wird^[349]. Selektiv an C-4 modifizierte $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Analoga sind allerdings bisher nicht untersucht worden; hier bietet sich ein Feld für zukünftige Synthese-Aktivitäten.

$\text{Ins}(1,4,5)P_3\text{-}5\text{-S}$ ^[241, 242] wird mit hoher Affinität vom $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Rezeptor gebunden. Es ist ein voller Agonist zur Mobilisierung von gespeichertem Ca^{2+} und dabei nur etwa um den Faktor 7 weniger wirksam als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$. Wie das Trisphosphorothioat $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ wird $\text{Ins}(1,4,5)P_3\text{-}5\text{-S}$ nicht durch 5-Phosphatase dephosphoryliert und kann daher eine anhaltende Freisetzung von Ca^{2+} bewirken. Erste Studien mit dem 5-Methylenphosphonat-Analogon **180** ergaben, daß diese Verbindung wie andere nichthydrolysierbare $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Analoga aus Rindernebennierendrüsen-Mikrosomen anhaltend Ca^{2+} freisetzt^[359]. Das 5-Methylphosphonat **187** ist ein pH-abhängiger Antagonist bei der $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -stimulierten Ca^{2+} -Freisetzung und ein kompetitiver Inhibitor bei der Bindung von

[³H] $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ an Mikrosomen aus Rindernebennierenrinden^[360, 361]. Die vollständige Beschreibung der biologischen Eigenschaften dieser Verbindung und des 5-Difluormethylphosphonat-Analogons, das auch ein schwacher Antagonist sein sollte^[360, 361], werden mit Interesse erwartet, da dies die ersten niedermolekularen Antagonisten des $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Rezeptors wären. Durch eine Bestätigung dieser Ergebnisse wäre dann eindeutig nachgewiesen, daß die Phosphatgruppe an C-5 für die Aktivität von $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ entscheidend ist.

D-6-Desoxy- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ist ein voller Agonist zur Freisetzung von Ca^{2+} in permeabilisierten menschlichen SH-SY5Y-Neuroblasten und etwa um den Faktor 70 weniger wirksam als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[231]. Andere an C-6 modifizierte $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -Analoga einschließlich der Fluor-, Methyl- und Methoxyverbindungen wurden synthetisiert^[201, 302, 327, 421]. Die biologischen Eigenschaften dieser Verbindungen sind allerdings mit Ausnahme von DL-6-O-Methyl- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ noch nicht beschrieben worden. Diese Verbindung mobilisiert Ca^{2+} mit einem EC₅₀-Wert, der mehr als 200fach höher war als der von $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[328]; ähnliche Ergebnisse wurden für andere 6-O-substituierte Analoga erhalten^[381]. DL- $\text{Ins}(1,4,5,6)P_4$ aktiviert die Ca^{2+} -Freisetzung nicht und beeinflußt bei Konzentrationen von bis zu 10 μM auch nicht die $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung^[138]. Die 6-OH-Gruppe spielt also eindeutig eine wichtige Rolle bei der Rezeptorbindung oder bei der Stabilisierung der Konformation der 5-Phosphatgruppe durch Wasserstoffbrückenbindungen. Die Substitution dieser Hydroxygruppe sowohl durch geladene als auch durch ungeladene Gruppen hebt die Aktivität vollständig auf. Untersuchungen zur Wirksamkeit von 6-F- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ stehen noch aus.

Die nichtnatürlichen Inositphosphate $\text{Ins}(2)P$ ^[422], $\text{Ins}(2,4)P_2$, $\text{Ins}(1,2,6)P_3$ ^[423], $\text{Ins}(1,3,5)P_3$ ^[328] und 3-Desoxy- $\text{Ins}(1,5,6)P_3$ ^[325] sind wie Inosit nicht in der Lage, Ca^{2+} freizusetzen. Cyclisches $\text{Ins}(1:2,4,5)P_3$ wurde zunächst als ebenso wirksam wie $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ beschrieben^[130, 424], und es gab Spekulationen, daß dieses cyclische Inositphosphat ein sekundärer Botenstoff sein könnte^[424]. Weitergehende Untersuchungen^[109] ergaben allerdings, daß cyclisches $\text{Ins}(1:2,4,5)P_3$ nur ein schwacher Agonist und um mehr als eine Größenordnung weniger wirksam ist als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$. $\text{Ins}(2,4,5)P_3$ bewirkt die Ca^{2+} -Freisetzung und ist etwa um den Faktor 12–68 weniger wirksam als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[109, 328, 410, 411, 425]. Für D- $\text{Ins}(2,4,5)P_3$ und D-chiro- $\text{Ins}(1,3,4)P_3$, einem $\text{Ins}(2,4,5)P_3$ -Analogon mit einer axialen 1-Hydroxygruppe, wurden ähnlich große EC₅₀-Werte bestimmt^[312, 425], die etwa 30mal größer sind als der für $\text{Ins}(1,4,5)P_3$. Der Unterschied zwischen den beiden Verbindungen, die Konfiguration an C-1, scheint daher in bezug auf die Ca^{2+} -mobilisierende Aktivität unbedeutend zu sein. Die L-Enantiomere der beiden Verbindungen sind deutlich weniger aktiv als die D-Isomere und etwa um den Faktor 800–960 weniger wirksam als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[312, 425]. D-3-Azido-3-desoxy- $\text{Ins}(2,4,5)P_3$ ist bei der Ca^{2+} -Freisetzung beträchtlich weniger wirksam als $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ ^[426] und wird mit einer etwa um den Faktor 2000 verminderten Affinität an den Rezeptor gebunden. Diese Verbindung mobilisiert in einer Konzentration von 100 μM 21 % des gespeicherten Ca^{2+} , während $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ bei 10 μM 53 % freigesetzt. Die Bindungsaffinität von D-2,3-Didesoxy- $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ gegenüber Rindernebennierenrinden-Rezeptoren ist nur um den Faktor 6 niedriger als die von

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und seine Wirksamkeit bezüglich der Ca^{2+} -Freisetzung nur um den Faktor 3.5. Wird darüber hinaus allerdings die 6-Hydroxygruppe entfernt, führt dies zu einer Verringerung der Bindungssaffinität um den Faktor 100. D-2,3,6-Tridesoxy- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist ebenfalls ein schlechter Rezeptoragonist: Der zugehörige EC_{50} -Wert ist mehr als 200mal höher als der von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[326]. Dies bestätigt Ergebnisse einer früheren Untersuchung, in der gezeigt worden war, daß das Tridesoxy-Analogon, allerdings in racemischer Form, aus permeabilisierten Zellen der glatten Muskulatur Ca^{2+} mit einem EC_{50} -Wert freigesetzt, der ca. 130mal höher ist als der mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[328].

Benzol-1,2,4-trisphosphat blockiert die Bindung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ an Mikrosomen der Nebennierenrinde kompetitiv mit einem IC_{50} -Wert von 34 μM . Die Affinität für den Rezeptor ist etwa um den Faktor 10000 niedriger als die von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, und eine Ca^{2+} -Freisetzung kann nicht ausgelöst werden^[427]. Benzol-1,2,4-tris(methylenphosphonat) sowie (1R,2R,4R)-Cyclohexan-1,2,4-trismethylenphosphat, -tris(methylenphosphonat), -tris(methylensulfonat) und dessen (4S)-Isomer sind in Bindungs- und Ca^{2+} -Freisetzungssassays ebenfalls inaktiv^[428]. Racemische Trissulfat-, Trissulfonamid-, Triscarboxymethyl- und Trismethylphosphonat-Analoga von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[365, 366] wie auch das 4,5-Dimethylenphosphonat-Analogon von $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ ^[429] weisen keine biologische Aktivität auf. Inositol-phosphat-4,5-pyrophosphat^[349] und das enantiomerenreine Hexadesoxy-1,4,5-tris(methylensulfonsäure)-Analogon von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[395] sind ebenfalls inaktiv.

Ein Bericht von Schultz et al.^[420], daß *cis,cis*-Cyclohexan-1,3,5-trisphosphat und verwandte Analoga mit einer 1,5-Bisphosphateinheit die Ca^{2+} -Freisetzung aus isolierten *Neurospora-crassa*-Vacuolen auslösen können, ist fragwürdig, da gezeigt wurde, daß $\text{Ins}(1,3,5)\text{P}_3$ in Zellen aus der glatten Muskulatur der Aorta von Rindern nicht als Agonist wirkt^[328]. Wenn diese Ergebnisse bestätigt werden sollten, würde das bedeuten, daß sich der Rezeptor aus *Neurospora-crassa*-Vacuolen von Säugetierrezeptoren unterscheidet. Dies wäre bemerkenswert, da sich $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren in unterschiedlichen Spezies nach bisherigen Ergebnissen überaus ähnlich sind. Möglicherweise ist aber auch eine Verunreinigung der synthetischen Verbindung mit Ca^{2+} für diesen Effekt verantwortlich.

Diese Ergebnisse legen nahe, daß die vicinale 4,5-Bisphosphateinheit für die Rezeptorerkennung wesentlich ist und eine zusätzliche Phosphatgruppe an C-1 die Ca^{2+} -mobilisierende Wirkung außerordentlich steigert. Die Tatsache, daß auch $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ ein voller und relativ wirksamer Agonist ist, kann möglicherweise mit einer Wechselwirkung zwischen der axialen 2-Phosphatgruppe und der Rezeptorstelle erklärt werden, die normalerweise von der äquatorialen 1-Phosphatgruppe von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ besetzt wird. Allerdings sind Analoga mit raumfüllenden Substituenten an der 2-Hydroxy- und der 1-Phosphatgruppe ebenfalls Agonisten, was darauf hindeutet, daß dieser Bereich dem Lösungsmittel zugewandt ist. Bleibt zu untersuchen, welche Gruppen in der 3-Position toleriert werden; doch ist diese Position wegen der geringen Aktivität von $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ für chemische Modifikationen wahrscheinlich nicht von großem Interesse (Abb. 40).

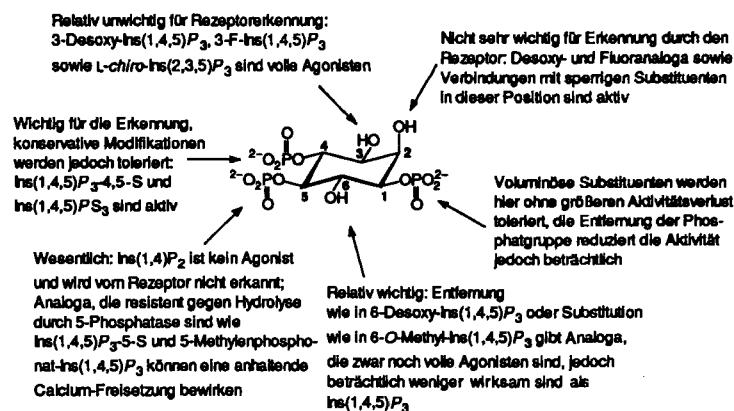


Abb. 40. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor.

10.2. Strukturerkennungs-Untersuchungen mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase

Die Spezifität der 3-Kinase ist in vielerlei Hinsicht größer als die des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptors^[46], wobei $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ und $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ die einzigen bekannten natürlichen Inositolpolyphosphate sind, die mit hoher Affinität erkannt werden^[328].

Die Entfernung der 1-Phosphatgruppe vermindert die Affinität zur 3-Kinase erheblich, $\text{Ins}(4,5)\text{P}_2$ und $\text{Ins}(2,4,5)\text{P}_3$ sind sehr schlechte Substrate für das Enzym^[328, 430], und cyclisches $\text{Ins}(1:2,4,5)\text{P}_3$ wird nicht phosphoryliert^[431]. Die 1-Phosphatgruppe scheint daher für die Substraterkennung wesentlich zu sein, was mit dem Befund übereinstimmt, daß zwar $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -5-S^[241, 432] und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -4,5-S₂^[433] Substrate der 3-Kinase sind, ein zusätzlicher Phosphorothioat-substituent an C-1 aber nicht toleriert wird: $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ ist kein Substrat^[434, 435].

DL-2-Desoxy- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ inhibiert effektiv die Phosphorylierung von [³H] $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch 3-Kinase^[410], die scheinbare Inhibierungskonstante K_i entspricht der von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$. Andere Analoga mit sterisch anspruchsvollen Substituenten an C-2 werden ebenfalls gut vom Enzym erkannt. Es gibt allerdings keine Angaben darüber, ob diese Analoga als Substrate oder als Inhibitoren wirken. Sowohl DL-2-F-scyllo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ als auch DL-2,2-F₂- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ sind Substrate der 3-Kinase^[430]. Die Substrateneigenschaften von D- und L-2,2-F₂- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, die durch Racematspaltung des gem-Difluorids erhalten wurden, sind allerdings sehr unterschiedlich: Das D-Isomer ist ein Substrat und das L-Isomer ein wirksamer Inhibitor dieses Enzyms^[332]. Die Ursache für die hemmende Aktivität ist noch nicht geklärt; L-2,2-F₂- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ weist jedoch eine neuartige Leitstruktur für die Entwicklung von weiteren effektiven Inhibitoren zur pharmakologischen Intervention im Polyphosphoinositidweg auf und hat den Vorteil, daß es kein intrazelluläres Ca^{2+} mobilisiert. 2-F- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ist ebenfalls ein gutes Substrat für 3-Kinase^[416] und ein wirksamer kompetitiver Inhibitor bei der Phosphorylierung von [³H] $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch dieses Enzym (scheinbare Inhibierungskonstante $K_i = 3.0 \mu\text{M}$; zum Vergleich: 2-F-scyllo- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$: $K_i = 8.8 \mu\text{M}$, 2,2-F₂- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$: $K_i = 11.0 \mu\text{M}$).

Wie von C-3-modifizierten $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Analoga erwartet werden kann, sind sowohl D-3-F- $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ^[325, 334] als auch

L-chiro-Ins(2,3,5)P₃^[335, 336], ein *D*-Ins(1,4,5)P₃ Analogon mit invertierter Konfiguration an C-3, resistent gegenüber der Phosphorylierung durch die 3-Kinase und wirksame Inhibitoren dieses Enzyms^[436]. Ins(1,3,4,5)P₄, das Produkt der Ins(1,4,5)P₃-Phosphorylierung durch 3-Kinase, ist ein schwacher Inhibitor ($IC_{50} = 90 \mu\text{M}$). Mit Blick auf die IC_{50} -Daten ist es jedoch unwahrscheinlich, daß sich genügend Ins(1,3,4,5)P₄ anreichern kann, um die Ins(1,4,5)P₃-Phosphorylierungsgeschwindigkeit signifikant zu beeinträchtigen, was nahelegt, daß es keine Rolle in möglichen Rückkopplungsmechanismen spielt^[328]. Durch die Phosphorylierung der 3-OH-Gruppe wird die Bindung an den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor effektiv verhindert; dies könnte ein Regulationsmechanismus zur Modulation der Ins(1,4,5)P₃-Bindung sein^[417]. So ist Ins(1,3,4,5)P₄-5-S ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor der 3-Kinase^[253].

Verbindungen mit selektiv modifizierter 4-Position sind bislang noch nicht pharmakologisch untersucht worden. Die Affinität von Ins(1,4,5)P₃-4-S für 3-Kinase ist im Vergleich zu der von Ins(1,4,5)P₃-5-S etwa um den Faktor 10 niedriger^[433], was darauf hindeutet, daß die 4-Phosphatgruppe wichtig für die Substraterkennung ist.

Anders als Ins(1,4,5)PS₃ ist *DL*-Ins(1,4,5)P₃-5-S ein Substrat der 3-Kinase^[253, 432], aber die Phosphorylierung dieser Verbindung verläuft beträchtlich langsamer als die des natürlichen Substrates. Das 5-Methylenphosphonat-Analogon von Ins(1,4,5)P₃, das eine anhaltende Freisetzung von Ca²⁺ auslöst^[360, 361], ist daher vermutlich kein Substrat der 3-Kinase; die vollständigen biologischen Eigenschaften dieser Verbindung müssen allerdings noch bestimmt werden. Wahrscheinlich werden in der 5-Position nur konservative Modifikationen toleriert.

6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ ist eine der wenigen Verbindungen, die von der hochselektiven 3-Kinase erkannt werden^[231]. Die Kinetik ihres Metabolismus deutet darauf hin, daß sie ein Substrat für dieses Enzym ist, und die Phosphorylierung von Ins(1,4,5)P₃ wird durch 6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ kompetitiv gehemmt. Die Entfernung einer von der Angriffsstelle der 3-Kinase entfernten Hydroxygruppe hat offensichtlich keinen großen Einfluß auf die Bindungseigenschaften des Substrates. Anders als das 6-Desoxy-Analogon ist die Affinität von *DL*-6-Methoxy-Ins(1,4,5)P₃ zur 3-Kinase deutlich vermindert (etwa um den Faktor 120)^[328]. Da in beiden Analogen keine Wasserstoffbrückenbindungen zur 6-Position gebildet werden können, ist möglicherweise der erhöhte sterische Anspruch des 6-Substituenten von *DL*-6-Methoxy-Ins(1,4,5)P₃ der Grund für die niedrige Affinität dieses Analogons. Auch in diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung mit 6-Fluor-Ins(1,4,5)P₃ wünschenswert.

D,L-Cyclohexan-1,2,4-trisphosphat inhibiert die Phosphorylierung von [³H]Ins(1,4,5)P₃ nur schwach ($IC_{50} = 327 \mu\text{M}$)^[328]. Benzol-1,2,4-trisphosphat wird mit einer im Vergleich zu Ins(1,4,5)P₃ etwa um den Faktor 10 niedrigeren Affinität überraschenderweise gut von der 3-Kinase erkannt ($IC_{50} = 6.1 \mu\text{M}$)^[427]. *D*-2,3-Didesoxy- und *D*-2,3,6-Tridesoxy-Ins(1,4,5)P₃ weisen K_i -Werte von 19 bzw. 36 μM auf, während mehrere andere mehrfach desoxygenierte Analoga nicht mit dem Enzym wechselwirken^[428] (Abb. 41). Interessanterweise wird 3-Kinase auch durch Adriamycin gehemmt^[437].

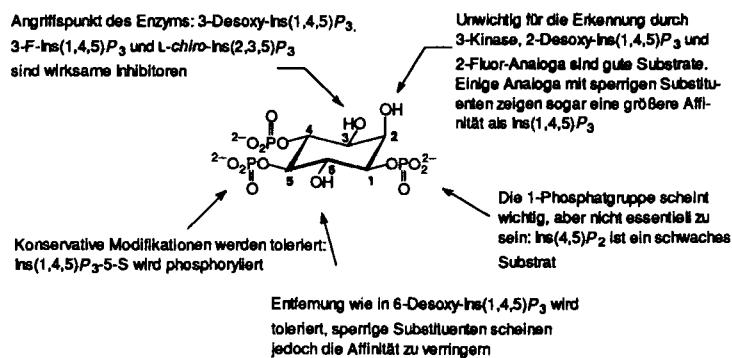


Abb. 41. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für Ins(1,4,5)P₃-3-Kinase.

10.3. Strukterkennungs-Untersuchungen mit Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase

Im Unterschied zum Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor und der 3-Kinase ist die Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase relativ unspezifisch. Doch obwohl viele Analoga an die Phosphatase binden, sind nur wenige von ihnen Substrate des Enzyms.

Die 1-Phosphatgruppe ist wesentlich für die Substraterkennung durch 5-Phosphatase, da Ins(4,5)P₂ ein sehr schlechtes Substrat ist^[433]. Einige racemische, an der 2-Hydroxygruppe modifizierte Ins(1,4,5)P₃-Analoga wurden auf ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit 5-Phosphatase aus Erythrocytenzellen und aus Hirncytosol untersucht^[410]. Die Verbindungen sind kompetitive Inhibitoren des Enzyms und Substrate für die 5-Phosphatase, wobei die Hydrolyseeffizienz allerdings variiert. 2-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ und die meisten der anderen an C-2 modifizierten Analoga weisen überraschenderweise eine größere Affinität für 5-Phosphatase auf als Ins(1,4,5)P₃. 2-F-scyllo-Ins(1,4,5)P₃ wird vom Enzym erkannt, ist jedoch ein schwächeres Substrat als Ins(1,4,5)P₃^[330]. Die 5-Phosphatase-Substrat-eigenschaften von *D*- und *L*-2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ unterscheiden sich deutlich. Während *D*-2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ ein gutes Substrat ist, inhibiert das *L*-Enantiomer das Enzym sehr wirksam^[332]. Da die 5-Phosphatase eine hohe Spezifität für das *D*-Isomer von Ins(1,4,5)P₃ aufweist und Analoga des *L*-Enantiomers normalerweise nicht sehr gut von diesem Enzym erkannt werden [z. B. *L*-Ins(1,4,5)P₃^[438]], überrascht dieses Resultat. Einige 2-substituierte Analoga sind allerdings ebenfalls 5-Phosphatase-resistent^[439], und das *L*-Isomer von 2-Aminobenzoyl-Ins(1,4,5)P₃ ist überraschenderweise ein wirksamer Inhibitor. *DL*-2-F-Ins(1,4,5)P₃ ist ein mäßig wirksamer kompetitiver Inhibitor von 5-Phosphatase. Dabei kann vorläufig angenommen werden, daß wie beim Difluor-Analogon 2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ der hemmende Effekt von *DL*-2-F-Ins(1,4,5)P₃ auf das *L*-Isomer zurückzuführen ist, während das *D*-Isomer wie *D*-2,2-F₂-Ins(1,4,5)P₃ wahrscheinlich ein Substrat dieses Enzyms ist. Dies bedeutet, daß die 2-Hydroxygruppe an der Substraterkennung durch Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase zwar beteiligt ist, aber keine wesentliche Rolle spielt.

3-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ ist ein gutes Substrat, das mit einer etwas höheren Affinität als Ins(1,4,5)P₃ gebunden wird^[433], und 3-F-Ins(1,4,5)P₃ ist ebenfalls ein Substrat der Erythrocyten-5-Phosphatase^[436]. *L-chiro*-Ins(2,3,5)P₃, das man als Ins(1,4,5)P₃ mit invertierter Konfiguration an C-3 beschreiben kann, ist hingegen ein wirksamer Inhibitor^[335, 336, 436]. Dies

überrascht, da die Hydroxygruppe an C-3 in diesem Molekül weit von der Angriffsstelle des Enzyms entfernt ist. Zwei Erklärungen wurden für diesen Befund angeführt: Entweder sind die Konformationen von L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ in Lösung und/oder gebunden an die 5-Phosphatase und von Ins(1,4,5)P₃ so unterschiedlich, daß das Analogon zwar wie Ins(1,4,5)P₃ vom Enzym gebunden wird, die katalytische Aktivität des Enzyms durch das Analogon aber erheblich beeinträchtigt wird, oder die Inhibition ist das Resultat einer unproduktiven Anlagerung des invertierten L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ in einer gedrehten Orientierung. In dieser Anordnung würde das Analogon drei Elemente von Ins(1,4,5)P₃ korrekt wiedergeben: die Ringkonformation, die wichtige vicinale 4,5-Bisphosphateinheit (in Form des 2,3-Bisphosphats) und die 3-Hydroxygruppe (in Form der 4-Hydroxygruppe). Die 5-Phosphatgruppe von L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ ahmt dabei die äquatoriale 2-Phosphatgruppe eines Ins(1,4,5)P₃-Analogs nach, und solch ein Phosphatrest paßt vermutlich immer noch relativ gut in die hydrophile Tasche des Enzyms, die gewöhnlich mit der äquatorialen 1-Phosphatgruppe von Ins(1,4,5)P₃ wechselt. In dieser invertierten Bindungsweise imitiert die axiale 1-Hydroxygruppe von L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ die axiale 6-Hydroxygruppe eines Ins(1,4,5)P₃-Analogs. Wie im folgenden besprochen, könnte die äquatoriale 6-Hydroxygruppe von Ins(1,4,5)P₃ eine wichtige Rolle bei der 5-Phosphatase-katalysierten Hydrolyse spielen. Die hemmenden Eigenschaften von L-chiro-Ins(2,3,5)P₃ können möglicherweise der pseudo-axialen 6-Hydroxygruppe in der invertierten Bindungskonformation zugeschrieben werden.

Durch C-5-Substitution mit Phosphorothioatgruppen wird ein wirksamer Inhibitor der Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase, Ins(1,4,5)P₃-5-S, erhalten^[241, 242]. Das 5-Methylenephosphonat-Analogon von D-Ins(1,4,5)P₃ ist ein weiterer langlebiger Ca²⁺-mobilisierender Agonist^[359]. Die anhaltende Freisetzung von Ca²⁺ durch diese Verbindung deutet darauf hin, daß sie nicht durch die 5-Phosphatase dephosphoryliert und somit deaktiviert wird. Eine vollständige Untersuchung sowie Einzelheiten zu den Wechselwirkungen der 5-Methylphosphonat- und 5-Difluormethylphosphonat-Analoga von Ins(1,4,5)P₃^[360, 361] mit dem Enzym werden mit Interesse erwartet.

D-6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃^[231] hemmt die Dephosphorylierung von [³²P]Ins(1,4,5)P₃ durch Erythrocyten-5-Phosphatase und ist ein mäßig wirksamer Inhibitor des Enzyms. Sowohl die im Vergleich zum natürlichen Substrat Ins(1,4,5)P₃ nur auf etwa die Hälfte verringerte Affinität von D-6-Desoxy-Ins(1,4,5)P₃ als auch die um etwa den Faktor 4 niedrigere Affinität von DL-6-Methoxy-Ins(1,4,5)P₃ für die 5-Phosphatase aus den glatten Muskeln der Aorta^[328] unterstreichen die Nichtselektivität dieses Enzyms. Die Resistenz dieser beiden Analoga gegenüber der Dephosphorylierung bestätigt, daß als Strukturvoraussetzungen für die Substrathydrolyse durch die 5-Phosphatase nur die vicinale 4,5-Bisphosphateinheit und eine freie 6-Hydroxygruppe erforderlich sind. Möglicherweise ähnelt die Funktion der 6-Hydroxygruppe von Ins(1,4,5)P₃ der 6-Hydroxygruppe von Ins(1)P in dessen Dephosphorylierung durch Inositol-Monophosphatase, d. h. diese Gruppe hat keinen wesentlichen Effekt auf die Anlagerung, ist aber notwendig, damit das Enzym mit dem Substrat reagieren kann.

Während Ins(2,4,5)P₃^[410] und cyclisches Ins(1:2,4,5)P₃^[310] 5-Phosphatase-Substrate sind, ist DL-Ins(1,4,5)PS₃ gegenüber dem Abbau durch das Enzym resistent^[440]. DL-Cyclohexan-1,2,4-trisphosphat ist ein schwacher, kompetitiver Inhibitor ($K_i = 124 \text{ mM}$), und eine auf die Hydrolyse durch dieses Enzym zurückzuführende Freisetzung von anorganischem Phosphat konnte nicht festgestellt werden^[328]. Benzol-1,2,4-trisphosphat^[427] und (1R,2R,4S)-Cyclohexan-1,2,4-tris(methylensulfonat)^[428] hemmen den [³H]Ins(1,4,5)P₃-Abbau durch 5-Phosphatase überraschend gut, was darauf hinweist, daß das Enzym sogar drastische Strukturänderungen toleriert. Die Trisphosphorothioate L-Ins(1,4,5)PS₃, Ins(1,3,5)PS₃ und L-chiro-Ins(1,4,6)PS₃ sind hochwirksame 5-Phosphatase-Inhibitoren mit submikromolaren K_i -Werten von 0.50, 0.43 bzw. 0.3 μM^[353]. Da die beiden letzteren Verbindungen nicht mit 3-Kinase wechselwirken und auch kein Ca²⁺ mobilisieren^[441, 442], eignen sie sich hervorragend als selektive Inhibitoren der 5-Phosphatase (Abb. 42).

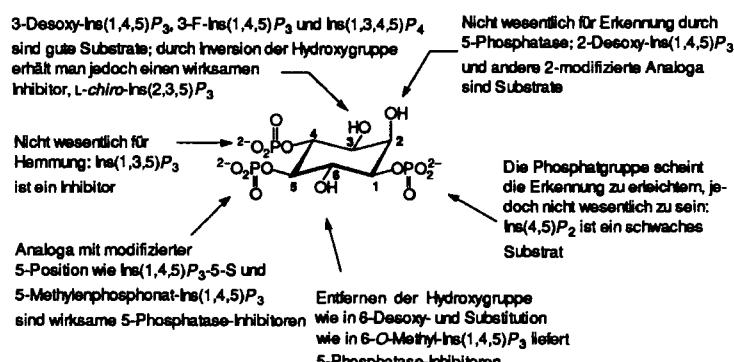


Abb. 42. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase.

11. Partielle Agonisten und Antagonisten von Ins(1,4,5)P₃

Nur wenige chemische Substanzen stehen für Eingriffe in den Phosphatidylinosit-Signalübertragungsweg zur Verfügung und bislang ist kein einfacher niedermolekularer Ins(1,4,5)P₃-Antagonist bekannt. Für die Entwicklung eines solchen Antagonisten sind umfangreiche Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen erforderlich. Bei der planmäßigen Suche nach einer Verbindung, die eine große Rezeptor-Affinität aufweist, aber kein Ca²⁺ freisetzt, ist es notwendig, die Struktur-Eigenschaften von Ins(1,4,5)P₃, die die Bindungsaffinität bestimmen, von denen zu trennen, die zur Öffnung des Ca²⁺-Ionen-Kanals führen. Viele natürliche und synthetische Inositphosphate weisen eine geringere Rezeptor-Bindungsaffinität auf als Ins(1,4,5)P₃; dies korreliert mit einer entsprechend niedrigeren Fähigkeit zur Freisetzung von Ca²⁺. Es ist jedoch noch keine D-konfigurierte Verbindung ohne vicinale 4,5-Bisphosphatgruppe beschrieben worden, die Ca²⁺ freisetzt. Modifikationen an dieser Stelle könnten zur Entwicklung eines niedermolekularen Moleküls führen, das bei gleichbleibend hoher Bindungaffinität zum Enzym die Öffnung des Kanals direkt beeinflußt.

11.1. Partielle Agonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor

Einige partielle Agonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor sind identifiziert worden: Ins(1,3,4,6)P₄ weist eine mäßige Affinität zum Rezeptor auf und führt zu einer maximalen Ca²⁺-Freisetzung, die rund 80 % der durch Ins(1,4,5)P₃ bewirkten entspricht. Wenn Ins(1,3,4,6)P₄ in der für die Ca²⁺-Mobilisierung effektivsten Konzentration zusammen mit Ins(1,4,5)P₃ verabreicht wird, erhöht sich dessen EC₅₀-Wert^[138]. Dies führt zu der Schlußfolgerung, daß das freigesetzte Ca²⁺ aus dem gleichen intrazellulären Speicher stammt, und es ist zudem ein starkes Indiz dafür, daß Ins(1,3,4,6)P₄ und Ins(1,4,5)P₃ um dieselbe Rezeptorstelle konkurrieren^[138, 139]. Da Ins(1,3,4,6)P₄ nominell nicht die normalerweise für Agonistenaktivität erforderliche vicinale 4,5-Bisphosphateinheit aufweist, ist es nicht offensichtlich, warum dieses Tetrakisphosphat Ca²⁺ freisetzen sollte. Es gibt zwei alternative Bindungskonformationen von Ins(1,3,4,6)P₄ am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor, in denen es die wichtigsten Erkennungsmerkmale nachahmt, einschließlich der 4,5-Bisphosphateinheit und der 1-Phosphatgruppe. Möglicherweise sind eine oder beide dieser Bindungskonformationen der Grund für die von Ins(1,3,4,6)P₄ gezeigten Eigenschaften als partieller Agonist. Die chemische Modifikation von Ins(1,3,4,6)P₄ könnte hier zur Aufklärung beitragen.

Schwächere partielle Agonisten sind 6-Desoxy-Ins(1,4,5)PS₃ und L-chiro-Ins(2,3,5)PS₃^[351, 352]. Sie mobilisieren nur 42 bzw. 34 % der Ca²⁺-Menge, die durch Ins(1,4,5)P₃ freigesetzt wird. Als schwache partielle Agonisten können sie – allerdings nur in relativ hohen Konzentrationen – verwendet werden, um einer Ins(1,4,5)P₃-induzierten Ca²⁺-Freisetzung entgegenzuwirken. Beide Verbindungen sind C-3- bzw. C-6-modifizierte Ins(1,4,5)P₃-Analoga und tragen statt Phosphat- Phosphorothioatgruppen an C-1, C-4 und C-5. Als schwächste partielle Agonisten weisen diese Verbindungen, besonders aber L-chiro-Ins(2,3,5)PS₃, Leitstrukturen für die Suche nach einem niedermolekularen Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor-Antagonisten auf. Ein weiterer partieller Agonist ist scyllo-Ins(1,2,4,5)PS₄^[416].

11.2. Antagonisten am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor

Gegenwärtig weist keines der synthetisierten Ins(1,4,5)P₃-Analoga, mit Ausnahme des 5-Methylphosphonat-Analogons von Ins(1,4,5)P₃^[360, 361] und L-chiro-Ins(2,3,5)PS₃^[433], antagonistische Eigenschaften auf. L-chiro-Ins(2,3,5)PS₃ hat allerdings beträchtliche intrinsische Aktivität. Die einzigen Verbindungen, von denen eindeutig nachgewiesen wurde, daß sie die Ins(1,4,5)P₃-Rezeptorbindung wirksam hemmen, sind Heparin^[443–449] und Decavanadat^[19, 450–452]; sie weisen jedoch keine Spezifität für den Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor auf^[418, 453] und sind daher in pharmakologischer Hinsicht nur von begrenztem Nutzen.

11.2.1. Heparin

Heparin ist ein mehrfach mit Schwefelsäure verestertes Polysaccharid mit einem von Herkunft und Gewinnung abhängigen relativen Molekulargewicht zwischen 6000 und 20000. Erste Anzeichen auf eine Wechselwirkung von Heparin mit

Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstellen lieferte der Befund, daß die zuerst von Worley et al.^[454] beschriebene Bindungsstelle im Kleinhirnrezeptor heparinunempfindlich ist^[443]. Das diese Bindungsstelle bildende Protein konnte durch Heparin-Agarose-Affinitätschromatographie weitgehend gereinigt werden^[159]. Heparin inhibiert auch die Ins(1,4,5)P₃-induzierte Ca²⁺-Freisetzung in Hepatocyten^[447], in β-Zellen der Bauchspeicheldrüse^[448] und in Rattenleber-Mikrosomen^[449]. Der effiziente Antagonismus von Heparin gegen die Ins(1,4,5)P₃-aktivierte Ca²⁺-Freisetzung ist sowohl kompetitiv als auch reversibel; die Affinität von Heparin zur Bindungsstelle beträgt ca. 3 nM^[444]. Das Heparinfragment TV 84558-51 (durchschnittliches $M_r = 5100$) inhibiert die Bindung von [³H]Ins(1,4,5)P₃ ebenso wirksam wie Heparin, während kleinere Heparinfragmente und weniger oder nicht mit Schwefelsäure veresterte Glycosaminoglycane (z. B. Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure) die Bindung nicht beeinflussen^[443]. Dies ist auch bei O- und N-desulfonierte, N-acetyliertem Heparin der Fall. N-Desulfonierte Heparin weist eine verminderte hemmende Aktivität am Ins(1,4,5)P₃-Rezeptor, aber nicht an der Ins(1,3,4,5)P₄-Bindungsstelle auf, während Pento-sanpolyphosphat ein weiterer wirksamer, aber unselektiver Inhibitor sowohl an Ins(1,4,5)P₃- als auch Ins(1,3,4,5)P₄-Bindungsstellen ist^[418]. Während Heparin und verwandte Substanzen in vielen Tier- und Pflanzenzellen inhibierend wirken, ist die Ins(1,4,5)P₃-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung in Pilzen heparin-unempfindlich^[455]. Heparin inhibiert auch Ins(1,4,5)P₃-3-Kinase (aber nicht Ins(1,4,5)P₃-5-Phosphatase)^[445] sowie die spezifische Anlagerung von Ins(1,3,4,5)P₄ an Membranen im Kleinhirn^[418] und die Ins(1,3,4,5)P₄-vermittelte Freisetzung von Ca²⁺ aus Kleinhirnmikrosomen^[412].

Wahrscheinlich wechselwirken die negativ geladenen Sulfatgruppen des Heparins mit den hydrophilen Taschen der Rezeptorbindungsstelle, die normalerweise die Phosphatgruppen von Ins(1,4,5)P₃ aufnehmen. Es ist allerdings interessant, daß myo-Inositol-1,4,5-trisulfat, obwohl es Sulfatgruppen an den Positionen trägt, die bei Ins(1,4,5)P₃ von den Phosphatgruppen besetzt werden, keine antagonistischen Eigenschaften zu haben scheint^[366]. Zwar weisen einige niedermolekulare Heparinfragmente Inhibitor-Eigenschaften auf^[456], doch ist ihre Effizienz noch eine Größenordnung von der herkömmlicher Ins(1,4,5)P₃-Analoga entfernt. Eine genauere Untersuchung der Heparin-Rezeptor-Wechselwirkung ist erforderlich, um die wesentlichen Struktur-Besonderheiten zu bestimmen und dementsprechend einen niedermolekularen Antagonisten zu konzipieren.

11.2.2. Decavanadat

Unterschiedliche Vanadate wurden auf ihre Eignung zur Inhibition von Ins(1,4,5)P₃-Rezeptorbindung und Ca²⁺-Freisetzung untersucht. Dabei wurden festgestellt, daß Decavanadat (V₁₀O₂₈⁶⁻ bei pH 7)^[457] die Ins(1,4,5)P₃-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung in permeabilisierten Ratten-Insulinoma und PC12-Zellen ($IC_{50} = 5 \mu\text{M}$)^[310] sowie in SH-SY5Y-Zellen ($K_i = 1.2 \mu\text{M}$)^[451] und auch die Anlagerung von [³H]Ins(1,4,5)P₃ an seinen Rezeptor in Kleinhirn- und Nebennierenrinden-Membranen hemmt^[451]. Orthovanadat und Oligovanadat hingegen inhibieren die Ins(1,4,5)P₃-Rezeptorbindung nicht^[450], wahrscheinlich weil sie die von Meyer et al.^[458] vorgeschlagenen multiplen Ins(1,4,5)P₃-Bindungsstellen nicht überbrücken kön-

nen. Decavanadat unterdrückt auch die Ins(1,3,4,5) P_4 -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus permeabilisierten SH-SY5Y-Zellen und inhibiert Ins(1,4,5) P_3 -5-Phosphatase, Ins(1,4,5) P_3 -3-Kinase und Ins(1,3,4,5) P_4 -5-Phosphatase^[451].

Obwohl Decavanadat ein wirksamer und kompetitiver Ins(1,4,5) P_3 -Rezeptor-Antagonist ist, ist es wegen seiner geringen Spezifität wahrscheinlich wenig brauchbar, um die Rolle von Ins(1,4,5) P_3 als sekundärer Botenstoff zu untersuchen. Allerdings könnten Molecular-modeling-Untersuchungen mit Decavanadat und auch mit Heparin wichtige Leitstrukturen liefern.

12. Anwendungen von Inositphosphat-Analoga

Außer maskierten und Photoaffinitäts-Analoga von Ins(1,4,5) P_3 mit naheliegenden Anwendungen ist Ins(1,4,5) PS_3 das bisher vielseitigste Ins(1,4,5) P_3 -Analogon. Ins(1,4,5) P_3 -Rezeptoren in Hirn^[409, 440] und Leber^[459] erkennen Ins(1,4,5) PS_3 mit hoher Affinität. Das Analogon ist ein voller intrazellulärer Ca^{2+} -freisetzender Agonist, der in einer Reihe von Zellen, wie *Xenopus*-Oocyten^[408, 460], permeabilisierten Swiss-3T3-Zellen^[131, 408], GH₃-Zellen^[131], Hepatocyten^[435], Acinuszellen der Bauch-^[461–463] und der Ohrspeicheldrüse^[464], Skelettmuskel-Triaden^[465], Mäuse-Tränendrüsenzellen^[466] und SH-SY5Y-Neuroblasten^[461], nur etwa um den Faktor 3-4 weniger effektiv ist als Ins(1,4,5) P_3 . Ins(1,4,5) PS_3 ist resistent gegenüber Dephosphorylierung durch 5-Phosphatase^[435, 440] und kann einen anhaltenden zellulären Ca^{2+} -Ausstrom hervorrufen^[46, 435]. Ins(1,4,5) PS_3 war der erste beschriebene kompetitive 5-Phosphatase-Inhibitor^[432, 438]; es wird jedoch von 3-Kinase nicht gebunden und konkurriert nicht mit Ins(1,4,5) P_3 um dieses Enzym^[432, 435]. Ins(1,4,5) PS_3 , das gegenüber allen bekannten Ins(1,4,5) P_3 -abbauenden Enzymen resistent ist, ist inzwischen kommerziell erhältlich und wird zunehmend biologisch angewendet, wie im folgenden illustriert wird.

Die Möglichkeit synergistischer Wechselwirkungen zwischen Ins(1,4,5) P_3 und seinem Metaboliten Ins(1,3,4,5) P_4 bei der Vermittlung des Einstroms von Ca^{2+} durch die Plasmamembran war vor kurzem Gegenstand einer heftigen Debatte^[123, 124, 126]. Bei der Aufzeichnung eines Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Stromes in einfach intern perfusierten Acinuszellen der Mäuse-Tränendrüse unter Messung des Zellgesamtstromes mit einer Patch-clamp-Technik führte die Zugabe von Ins(1,4,5) PS_3 zu einer einzelnen, vorübergehenden Antwort, die unabhängig von externem Ca^{2+} und typisch für Ins(1,4,5) P_3 war. In Gegenwart von Ins(1,3,4,5) P_4 gab dieses Analogon jedoch eine anhaltende, von externem Ca^{2+} abhängige Reaktion. Es wird daher angenommen, daß die vorübergehende Antwort auf Ins(1,4,5) P_3 nicht die Folge eines schnellen Abbaus ist und daß Ins(1,3,4,5) P_4 nicht wirkt, indem es Ins(1,4,5) P_3 vor einer Dephosphorylierung durch 5-Phosphatase schützt, für die es ebenfalls ein Substrat ist^[466].

Intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen treten häufig in Zellen auf, die durch extrazelluläre Agonisten, die die Hydrolyse von Inositphospholipiden bewirken, stimuliert wurden. Funktion und Bildungsmechanismen solcher Oszillationen sind gegenwärtig von beträchtlichem Interesse und werden kontrovers diskutiert^[47, 467]. Modelle für die diesen Oszillationen zugrunde-

liegenden Prozesse sind entwickelt worden^[467, 468]. Bei der Zugabe von Ins(1,4,5) PS_3 [oder Ins(1,4,5) P_3] zu einfach perfusierten Mäusepankreas-Acinuszellen mit einer Patch-Pipette wurden wiederholte Stöße eines Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Stroms festgestellt, die in Amplitude und Frequenz der Antwort von muskarinischen Rezeptoren auf Acetylcholin ähneln. Die stoßweise Ca^{2+} -Freisetzung ist somit auch bei einer konstanten Konzentration des Analogons – und daher vermutlich auch von Ins(1,4,5) P_3 – möglich, was gegen eine rezeptorkontrollierte Oszillation und auch gegen eine periodische Phosphorylierung oder Abbau von Ins(1,4,5) P_3 spricht^[462]. Unterschiedliche Fluktuationsmuster der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die den durch den natürlichen Agonisten hervorgerufenen ähneln, können mit Ins(1,4,5) PS_3 in Abhängigkeit von dessen Konzentration erzeugt werden^[463]. Niedrige Ins(1,4,5) PS_3 -Konzentrationen führen zu wiederholten lokalen Ca^{2+} -Konzentrationsmaxima, während bei hohen Konzentrationen repetitive Ca^{2+} -Konzentrationswellen erzeugt werden.

In den Photorezeptoren der Mikrovilli von wirbellosen Tieren wird bei Bestrahlung mit Licht durch die Vermittlung von Ins(1,4,5) P_3 über einen Ins(1,4,5) P_3 -Rezeptor Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt. Mit Ins(1,4,5) PS_3 wurden die Mechanismen untersucht, die in den ventralen Photorezeptoren des Zyklopentekrebses *Limulus* die Ins(1,4,5) P_3 -induzierte Ca^{2+} -Mobilisierung beenden. In diesen Zellen ist nur das D-Isomer von Ins(1,4,5) P_3 wirksam, und der sekundäre Botenstoff wird normalerweise schnell metabolisch deaktiviert. Im *Limulus*-Photorezeptor führt Ins(1,4,5) PS_3 zu wiederholten Oszillationen des Ca^{2+} -abhängigen Membranpotentials, die zehn Minuten und länger anhalten können^[469]. Oszillationen des Membranpotentials^[408] und ein Ca^{2+} -abhängiger Cl^- -Strom^[460] können durch Mikroinjektion von Ins(1,4,5) PS_3 in *Xenopus*-Oocyten hervorgerufen werden. In diesem Fall treten die Oszillationen allerdings nicht über einen längeren Zeitraum auf, was darauf hindeutet, daß außer metabolischen noch andere Faktoren für das Abschalten der Antwort wichtig sind. Die durch Ins(1,4,5) PS_3 ausgelösten Oszillationen des Membranpotentials unterscheiden sich von denen mit Ins(1,4,5) P_3 und ähneln denen mit Ins(2,4,5) P_3 . Der Grund hierfür ist nicht klar; möglicherweise gibt es unterschiedliche Mechanismen zur Auslösung der Ca^{2+} -Oszillationen^[126]. Die Ins(1,4,5) PS_3 -induzierten Oszillationen des Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Stroms entsprechen eher den durch Ins(1,3,4,5) P_4 als den durch Ins(1,4,5) P_3 hervorgerufenen^[470].

Die durch stimulusinduziertes Ins(1,4,5) P_3 örtlich erhöhte intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration kann zur Entstehung von sich aktiv ausbreitenden Ca^{2+} -Konzentrationswellen führen, wodurch dieses Signal in andere Bereiche der Zelle übermittelt wird. Mit Ins(1,4,5) PS_3 wurde die Ausbreitung der Ca^{2+} -Wellen im Cytoplasma von *Xenopus*-Oocyten untersucht^[471]. Die Ins(1,4,5) PS_3 -induzierten Ca^{2+} -Wellen sind den durch Stimulation des Acetylcholin-Rezeptors hervorgerufenen sehr ähnlich und daher wahrscheinlich eine Folge desselben intrazellulären Mechanismus. Da Ins(1,4,5) PS_3 nicht hydrolysierbar ist und in *Xenopus*-Oocyten nicht unmittelbar abgebaut wird^[460], ist anzunehmen, daß die Ca^{2+} -Wellen nicht durch Fluktuationen der Ins(1,4,5) P_3 -Konzentration, sondern durch eine Ca^{2+} -Stimulation der Ins(1,4,5) P_3 -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung hervorgerufen werden.

In *Xenopus*-Oocyten können nach der Aktivierung des Rezeptors komplexe räumliche und zeitliche Muster der Ca^{2+} -Freisetzung in Form von regenerativen kreis- und spiralförmigen Wellen festgestellt werden. Solche spiralförmigen Wellen konnten durch Injektion von nichtmetabolisierbarem $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ hervorgerufen werden und waren von rezeptorinduzierten Ca^{2+} -Mustern nicht zu unterscheiden^[472]. Die Stimulation der Ca^{2+} -Freisetzung durch eine solche Verbindung resultierte allerdings nicht in einer Änderung des Ca^{2+} -Freisetzungsweges. Dieses und ähnliches Verhalten deutet darauf hin, daß das Nachlassen der Ca^{2+} -Aktivität nicht auf den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Stoffwechsel zurückzuführen ist. Die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration bleibt während der regenerativen Wellenstimulation weitgehend konstant. Die regenerative Aktivität ist wahrscheinlich auf die cyclische, durch die cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration regulierte Stimulierung und Inhibition des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptor-Kanals zurückzuführen. Mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ wurde ferner der Einfluß des Zustroms von Ca^{2+} auf Ca^{2+} -Wellen untersucht, die durch Mikroinjektion dieses Analogons hervorgerufen werden. Dabei wurde festgestellt, daß der rezeptoraktivierte Ca^{2+} -Zstrom die Frequenz und Geschwindigkeit von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -abhängigen Ca^{2+} -Wellen in *Xenopus*-Oocyten moduliert^[473].

Die Mikroinjektion von cGMP in unbefruchtete Seeigeleier führt zu einer Aktivierung, indem die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration durch einen unbekannten Mechanismus erhöht wird. Die Ca^{2+} -Freisetzung und die Aktivierung sind in Eiern, in denen die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -empfindlichen Ca^{2+} -Speicher durch vorherige Injektion von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ geleert wurden, nicht möglich. Injektionen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ in Seeigeleieren führen tatsächlich zu einem Ca^{2+} -Strom, der dem durch $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ ausgelösten in Größe und Dauer ähnelt. Weitere Injektionen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ resultieren allerdings nur in geringen nachfolgenden sich wiederholenden Ca^{2+} -Strömen, im Unterschied zu den sehr viel größeren, die mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ erhalten werden. Der Grund hierfür ist, daß die Ca^{2+} -Ruhekonzentration in Eiern, in die $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ injiziert wurde, höher ist, da $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ nicht hydrolysiert werden kann, und die Ca^{2+} -Speicher somit durch aufeinanderfolgende $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ -Injektionen fortschreitend geleert werden^[474].

Mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ wurden die $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -empfindlichen und -unempfindlichen nichtmitochondrialen Mg/ATP -abhängigen Ca^{2+} -Speicher in den Pankreas-Acinuszellen von Ratten hinsichtlich ihrer Funktion unterschieden^[461]. Der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -empfindliche Ca^{2+} -Speicher wird dabei mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ leer gehalten, und das Ca^{2+} in den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -unempfindlichen Speicher aufgenommen.

$\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ und das verwandte Monophosphorothioat-Analogon $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{-5-S}$ sind wirksame 5-Phosphatase-Hemmer^[432, 438]. Sie wurden eingesetzt, um den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Abbau in elektrisch permeabilisierten menschlichen SH-SY5Y-Neuroblasten zu inhibieren^[475]. Die Inhibition des Abbaus von exogen zugefügtem [$5\text{-}{}^3\text{P}$] $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch 5-Phosphatase war ca. zehnmal größer als die von [${}^3\text{H}$] $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aus der Zellmembran. Dies deutet auf eine Aufteilung des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ auf Kompartimente hin, so daß eine homogene Durchmischung von exogen zugefügtem und endogen gebildetem $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ nicht eintritt. $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3\text{-5-S}$ ist ein $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -3-Kinase-Substrat und hemmt die Phosphorylierung von [${}^3\text{H}$] $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ durch dieses Enzym^[432].

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung kann portionsweise erfolgen, wobei die Größe des $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -empfindlichen Ca^{2+} -Speichers von der $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Konzentration abhängt^[124]. Mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ wurde die portionsweise Ca^{2+} -Freisetzung in permeabilisierten Hepatocyten untersucht^[476]. Daß die Ca^{2+} -Speicher bei submaximalen Konzentrationen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ oder $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ nicht vollständig geleert werden, ist nicht auf eine Stimulus-Desaktivierung oder eine Rezeptor-Desensibilisierung zurückzuführen. Mit metabolisch stabilem $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ wurden Ca^{2+} -Ausstrom-Experimente bei hohen Zelldichten durchgeführt, bei denen der metabolische $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Abbau normalerweise beträchtliche Probleme bereitet hätte.

$\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ aktiviert eine neuartige, spannungsabhängige K^+ -Leitfähigkeit in CA1 Hippocampus-Pyramidenzellen von Ratten^[477]. In diese Zellen injiziert, hemmt $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ die Auslösung des Aktionspotentialpulses. Die metabolische Stabilität von $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ ist hierbei wesentlich. Mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ wurde die Leitfähigkeit vermutlich wegen seines schnellen enzymatischen Abbaus nicht hervorgerufen. So kann man mit $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ Wirkungen von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ entdecken, die mit dem natürlichen Botenstoff wegen dessen schnellen Abbaus oder wegen der langsam verteilten extern zugefügtem Agonisten experimentell nicht erfaßt werden können.

In Kaninchenskelettmuskel-Triaden führt $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ zur Freisetzung von bis zu 20 % des Ca^{2+} aus einem aktiv geladenen Speicher, obwohl die Ca^{2+} -Kanäle des Ryanodin-Rezeptors nicht oder nur minimal aktiviert waren^[465]. Demzufolge könnte die Ca^{2+} -mobilisierende Aktivität über andere Kanäle oder durch andere Mechanismen vermittelt werden. Es gibt Hinweise für zwei Arten von intrazellulären Ca^{2+} -empfindlichen Kanälen, die schnell aktiviert werden können: $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - und Ca^{2+} -empfindliche Kanäle. In Kaninchenskelettmuskel SR wird Ca^{2+} durch $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ überraschend schnell freigesetzt (20–150 ms, in Abhängigkeit von der Agonistenkonzentration), was darauf hindeutet, daß $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren im Skelettmuskel kinetisch in der Lage sein könnten, die rasante Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die einer Muskelkontraktion vorausgeht, zu signalisieren^[478].

Die Umsetzung von Polyphosphoinositiden in roten Blutkörperchen ist bekannt; die genaue Funktion von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ muß allerdings noch geklärt werden. In permeabilisierten menschlichen Erythrozyten führt $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ zu einer vorübergehenden Freisetzung von Ca^{2+} , zur Auflösung des Spektrin-Netzes und zu reversiblen Formänderungen^[479], die durch Immunfluoreszenz gemessen werden können. $\text{Ins}(1,4,5)\text{PS}_3$ induziert eine anhaltende Freisetzung von Ca^{2+} sowie irreversible Gestaltsänderungen und die Auflösung des Spektrin-Netzes. Der Polyphosphoinositid-Signalübertragungsweg spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Form von roten Blutkörperchen.

13. Synthesen von Inositlipiden und Analoga

Die meisten früheren Arbeiten über Synthesen von Phosphatidylinositolipiden und deren Analoga sind in einem Übersichtsartikel zusammengefaßt worden^[480]. Die vier Stereoisomere von Dipalmitoylphosphatidylinosit wurden für Untersuchun-

gen zur Substratstereospezifität von PtdIns-4-Kinase hergestellt^[481, 482]. Das PtdIns(4,5)P₂-Phospholipid-Analogon 1-O-(1,2-Di-O-palmitoyl-sn-glycero-3-phospho)-D-Ins(4,5)P₂ wurde über die P^{III}-Verbindungen synthetisiert^[266]. (Das Di-O-stearoylphospholipid ist zuvor von einer russischen Arbeitsgruppe hergestellt worden^[219, 483, 484]; die Arbeiten dieser Gruppe auf diesem Gebiet wurden zusammengefaßt^[480, 485].) Über eine Synthese von optisch aktivem 1-O-(1,2-Di-O-stearoyl-sn-glycero-3-phospho)-D-Ins(3,4,5)P₃ aus (–)-Chinasäure^[486] und eine kurze Synthese dieses PtdIns(3,4,5)P₃-Analogs in racemischer Form wurde berichtet^[487].

Die erste Synthese eines Fluor-Analogs eines Inositlipids wurde bereits 1982 beschrieben^[190]. 2-Desoxy-2-fluor-1-phosphatidyl-scyllo-inosit wurde durch Kondensation von 3,4,5,6-Tetra-O-benzyl-2-desoxy-2-fluor-scyllo-inosit mit dem Natriumsalz der Dipalmitoyl-L- α -phosphatidsäure und anschließende Hydrolyse erhalten. Später wurden Synthesen von D-3-Desoxy-3-fluor-1-phosphatidyl-myoinosit, das cytostatische Eigenschaften aufweist und das Wachstum von NIH-3T3-Zellen in Konzentrationen von ca. 100 μM hemmt, sowie der entsprechenden 3-Chlorverbindung veröffentlicht^[488–490].

Zur Synthese von 2-Desoxy-PtdIns^[491] wurde racemisches 3,4,5,6-Tetra-O-benzyl-myoinosit selektiv an der 1-OH-Gruppe acetyliert. Die anschließende Desoxygenierung wurde durch die Robins-Variante der Barton-McCombie-Sequenz – Thioxocarbonatbildung und radikalische Reduktion – erreicht. Verseifung und Racematspaltung des resultierenden Alkohols über den Camphansäureester lieferten D-3,4,5,6-Tetra-O-benzyl-2-desoxy-myoinosit, das mit dem neuen Kupplungsreagens Bis(disopropylamino)(2-trimethylsilylethoxy)phosphoran phosphityliert wurde. Reaktion mit Dipalmitoylglycerin und Oxidation des Phosphitriester lieferten das geschützte Desoxy-PtdIns-Analogon als Diastereomerengemisch. Durch stufenweises Entschützen wurde 2-Desoxy-PtdIns erhalten, das zur Untersuchung der Spezifität von Phospholipase C (PLC) verwendet wurde.

Synthesen des PtdIns-Analogons 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-thiophospho-myoinosit (DPPSI) wurden von zwei Arbeitsgruppen beschrieben^[263–265]: Im ersten Ansatz^[263, 264] wurde 1D-2,3:5,6-Di-O-cyclohexyliden-4-O-methoxymethyl-myoinosit mit Methoxy(diisopropylamino)chlorphosphoran **61** phosphityiert und dann mit 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerin und durch Sulfoxidation direkt zum geschützten 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-thiophospho-myoinosit umgesetzt. Entschützen mit Säure und Demethylierung mit Trimethylamin lieferten ($R_p + S_p$)-DPPSI als Diastereomerengemisch, das zur Untersuchung des stereochemischen Verlaufs der Substratspaltung durch PtdIns-spezifische PLCs verwendet wurde. Im zweiten Ansatz^[265] wurde 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerin mit **61** zum Phosphoramidit umgesetzt, das mit 1D-2,3,4,5,6-Penta-O-benzyl-myoinosit kondensiert wurde. Das Produkt wurde zu den Phosphorothioat-Diastereomeren sulfoxidiert, die chromatographisch getrennt und zu den 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-thiophospho-1-myoinosit-Diastereomeren entschützt wurden. Die Synthesen von PtdIns-Analoga, die Thiophosphoesterbindungen enthalten und zur Inhibition von PtdIns-PLC verwendet wurden, wurden ebenfalls beschrieben^[492].

Mit dem Phosphorylierungsreagens **185** wurden optisch aktive Phosphonat-Analoga von PtdIns und PtdIns(4)P^[493] sowie

die diastereomeren, ungeladenen Methylphosphonat-Analoga von PtdIns synthetisiert^[363]. Das Phosphonat-Analogon von PtdIns ist ein wirksames entzündungshemmendes Analgetikum^[494]. Phosphonatderivate von PtdIns mit einer Alkylkette statt der Diacylglycerineinheit wurden ebenso beschrieben^[495] wie isostere Methylenphosphonat- und isopolare Difluormethylenphosphonat-Analoga, die zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit an den sn-1- und sn-2-O-Atomen der Glycerineinheit statt mit langen Acylketten mit kurzketigen Alkylketten substituiert sind^[496].

14. Glycosyl-Phosphatidylinosit-Anker

Viele Proteine sind an biologische Membranen gebunden. Während integrierte Membranproteine eine oder mehrere hydrophobe Domänen haben und größtenteils in die Lipiddoppelenschicht eingebettet sind, sind andere Proteine kovalent an Lipide gebunden, die sie so in der Zellmembran verankern. Es wurde gezeigt, daß viele dieser Proteine durch Phosphatidylinosit-Anker, die über ein Glycan [Glycosyl-Phosphatidylinosit(GPI)-Anker]^[497–500] mit der C-terminalen Aminosäure des Proteins verknüpft sind, an die Membran gebunden sind. Mehr als dreißig Zelloberflächen-Proteine mit einem GPI-Anker sind identifiziert worden (zur Biosynthese von GPI-Ankern siehe Lit.^[501]), darunter hydrolytische Enzyme (z. B. alkalische Phosphatase und Acetylcholin-Esterase^[502]), Säugetier-Antigene (z. B. Thy-1^[503]) und Zelladhäsionsproteine. Die allgemeine Struktur von GPI-Ankern ist PtdIns-Glucosamin-Mannose₃-Phosphoethanolamin-Protein; Modifikationen der Mannosyleinheit durch zusätzliche Seitenketten sind jedoch nicht ungewöhnlich, und andere Variationen (z. B. in der Fettsäurezusammensetzung von PtdIns) treten ebenfalls auf.

Die Entdeckung von GPI-Ankern weckte das Interesse von Bioorganikern, und schon bald wurde der GPI-Anker des variablen Oberflächen-Glycoproteins (variant surface glycoprotein, VSG) des parasitären Protozoans *Trypanosoma brucei*^[504] synthetisiert (Abb. 43)^[505, 506]. Das Überleben der afrikanischen Trypanosomen hängt von der Unversehrtheit der Oberfläche

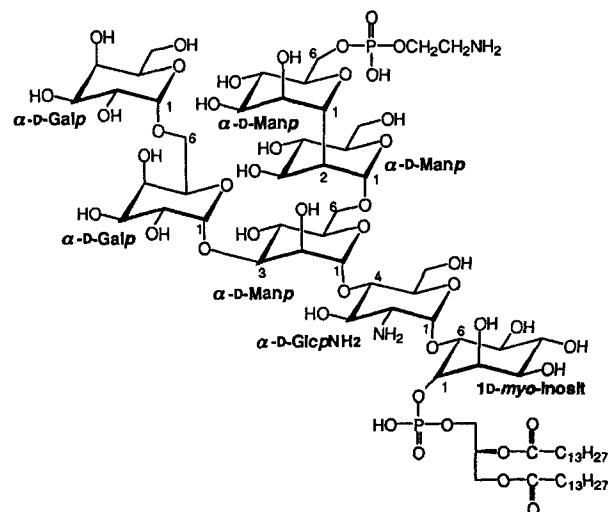


Abb. 43. Der GPI-Anker des variablen Oberflächenglycoproteins von *Trypanosoma brucei*.

ihrer Zellhülle ab, die aus dicht gepackten Monoschichten von VSGs besteht und die den Parasiten vor lysierenden Faktoren im Serum des Wirtorganismus schützt. Dadurch, daß zu verschiedenen Zeiten unterschiedliche VSGs exprimiert werden, kann der Parasit der Immunantwort des Wirtorganismus ausweichen. Diese Antigen-Variation erschwert es dem Immunsystem, die richtigen Antikörper zur rechten Zeit bereitzustellen, und macht darüber hinaus Wirkstoffe gegen spezifische VSGs nutzlos. Wirkstoffe, die die Biosynthese des VSG-GPI-Ankers inhibieren oder die auf spezifische Merkmale dieses GPI-Ankers zielen, könnten hingegen Erfolg versprechen. Dies erklärt das Interesse, das dieser GPI-Anker auf sich gezogen hat. Während die Struktur des Rückgrats des VSG-GPI-Ankers dem anderer GPI-Anker ähnelt, scheint die α -Galactose-Seitenkette des VSG-GPI-Ankers parasitenspezifisch zu sein, weshalb die Entwicklung von Wirkstoffen, die auf diese Seitenkette zielen, erfolgversprechend ist.

Einige metabolische Fragmente des Protein-GPI-Komplexes, die durch spezifische endogene Proteasen und einer Glycosyl-Phosphatidylinosit-spezifischen Phospholipase C (GPI-PLC) gebildet werden, weisen biochemische Eigenschaften auf, die zuvor nur bei Rohpräparaten von mutmaßlichen Insulin-Mediatoren (putative insulin mediators, PIMs) festgestellt worden sind. GPI-PLC unterscheidet sich von PtdIns-PLC, die PtdIns, PtdIns(4)P sowie PtdIns(4,5)P₂ hydrolysiert und nicht an der Zelloberfläche, sondern an der inneren Membran lokalisiert ist. PIMs sind phosphorylierte Inosit-Glycane, die nach der Stimulation von Zelloberflächenrezeptoren durch Insulin gebildet werden und einige der biochemischen Wirkungen von Insulin in vitro hervorrufen können^[500, 507, 508]. Es ist allerdings verfrüht, Inositphosphat-Glycane als sekundäre Botenstoffe der Insulinaktion zu bezeichnen. Synthesen von PIMs^[234, 509–512] und verwandten GPIs sowie von Fragmenten mycobakterieller Inositphospholipide wurden beschrieben^[267, 513].

15. Zusammenfassung und Ausblick

Die ersten Hinweise auf eine Rolle von Ins(1,4,5)P₃ als sekundärer Botenstoff^[19, 419] machten die Forschung zum Polyphosphoinositid-Stoffwechsel und zu dessen Konsequenzen zu einem der am intensivsten bearbeiteten Gebiete der modernen Biologie. Der daraus resultierende Aufschwung in der Cyclitol- und Inositphosphatchemie läßt auch gegenwärtig noch nicht nach. Im Gegenteil, es ist wahrscheinlich, daß ein bedeutender Anteil des zukünftigen Fortschritts in der Biologie der Inositphosphate auf die gegenwärtigen Anstrengungen in der Inositphosphatchemie zurückzuführen sein wird. Weitere Entwicklungen von synthetischen Inositphosphat-Analoga mit neuartigen biologischen Eigenschaften können vorausgesehen werden, darunter Rezeptor-Antagonisten, maskierte Derivate, zellpermeable Verbindungen, Affinitäts-, Photoaffinitäts- und spinmarkierte Inositphosphat-Analoga, Fluoreszenzsonden und an Affinitätssäulen gebundene Inositphosphate zur Reinigung von Rezeptoren und Enzymen. Die Aussicht auf einen vollständig neuen, auf PtdIns(3,4,5)P₃ basierenden Signalübertragungsweg, auf die Charakterisierung der Struktur des noch nicht erfaßten Ca²⁺-Einstrom-Faktors (CIF), die Entdeckung von neuen, wirksamen Ins(1,4,5)P₃-Rezeptorliganden, die sich wie die Adenopho-

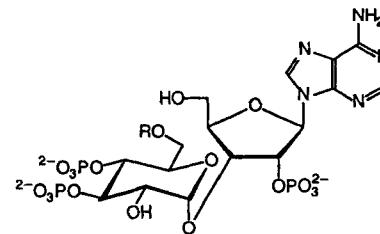


Abb. 44. Adenophostin A (R = H) und B (R = COCH₃).

stine (Abb. 44) nicht von Ins(1,4,5)P₃ ableiten, sowie die greifbare Möglichkeit, moderne Wirkstoffe für pharmakologische Interventionen in Signalübertragungswege zu entwickeln, bedeutet, daß die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Chemikern, Zellbiologen, Biochemikern und Pharmakologen entscheidend sein wird, um sich diesen neuen Herausforderungen zu stellen und die Ergebnisse zu nutzen.

Wir danken dem Wellcome Trust für ein Prize Fellowship (für D. L.) und S. J. Mills für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. B. V. L. P. ist ein Lister Institute Research Professor.

Eingegangen am 10. Juni 1994 [A 69]

- [1] D. J. Takemoto, J. M. Cunnick, *Cell Signalling* **1990**, *2*, 99–104.
- [2] F. McCormick, *Nature (London)* **1993**, *363*, 15–16. zit. Lit.
- [3] E. J. Neer, D. Clapham, *Nature (London)* **1988**, *333*, 129–134.
- [4] A. G. Gilman, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 615–649.
- [5] L. Stryer, H. R. Bourne, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1986**, *2*, 391–419.
- [6] A. Galione, *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, *13*, 304–306.
- [7] A. Galione, A. White, N. Willmott, M. Turner, B. V. L. Potter, S. P. Watson, *Nature (London)* **1993**, *365*, 456–459.
- [8] M. J. Berridge, *Nature (London)* **1993**, *365*, 388–389.
- [9] A. Olivera, S. Spiegel, *Nature (London)* **1993**, *365*, 557–560.
- [10] S. Ringer, *J. Physiol. (London)* **1883**, *4*, 29–42.
- [11] J. Scherer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1850**, *73*, 322–328.
- [12] T. W. Rall, E. W. Sutherland, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1065–1076.
- [13] E. W. Sutherland, T. W. Rall, *J. Biol. Chem.* **1958**, *232*, 1077–1091.
- [14] L. E. Hokin, M. Hokin-Neaverson, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1000*, 465–469.
- [15] J. Folch, *J. Biol. Chem.* **1942**, *146*, 35–44.
- [16] R. M. C. Dawson, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, *1000*, 459–461.
- [17] H. Brockerhoff, C. E. Ballou, *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1907–1911.
- [18] R. H. Michell, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *415*, 81–147.
- [19] H. Streb, R. F. Irvine, M. J. Berridge, I. Schulz, *Nature (London)* **1983**, *306*, 67–69.
- [20] R. S. Rana, L. E. Hokin, *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 115–164.
- [21] S. B. Shears, *Biochem. J.* **1989**, *260*, 313–324.
- [22] S. B. Shears in *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* (Hrsg.: J. W. Putney, Jr.), Raven, New York, **1992**, S. 63–92.
- [23] G. W. Mayr, T. Radenberg, U. Thiel, G. Vogel, L. R. Stephens, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 247–262.
- [24] L. R. Stephens, K. T. Hughes, R. F. Irvine, *Nature (London)* **1991**, *351*, 33–39.
- [25] N. Divecha, H. Banfic, R. F. Irvine, *EMBO J.* **1991**, *10*, 3707–3714.
- [26] R. H. Michell, *Curr. Biol.* **1992**, *2*, 20–202.
- [27] P. J. Hughes, R. H. Michell, *Curr. Opin. Neurobiol.* **1993**, *3*, 383–400.
- [28] C. Randriamampita, R. Y. Tsien, *Nature (London)* **1993**, *364*, 809–814.
- [29] A. B. Parekh, H. Terlau, W. Stühmer, *Nature (London)* **1993**, *364*, 814–818.
- [30] J. W. Putney, Jr., G. S. J. Bird, *Cell* **1993**, *75*, 199–201.
- [31] J. W. Putney, Jr., *Science* **1993**, *262*, 676–678.
- [32] M. Takahashi, T. Kagaasaki, T. Hosoya, S. Takahashi, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1643–1647.
- [33] M. Takahashi, K. Tanzawa, S. Takahashi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 369–372.
- [34] S. Takahashi, T. Kinoshita, M. Takahashi, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 95–100.
- [35] R. C. Young, C. P. Downes, *Drug Des. Delivery* **1990**, *6*, 1–13.
- [36] P. Workman, *Annal. Oncol.* **1990**, *1*, 10–111.
- [37] B. V. L. Potter, *Pharmacochem. Libr.* **1993**, *20*, 185–214.
- [38] A. A. Abdel-Latif, *Pharmacol. Rev.* **1986**, *38*, 227–272.
- [39] M. J. Berridge, *J. Exp. Biol.* **1986**, *124*, 323–335.
- [40] K. Muraki, Y. Imaizumi, M. Watanabe, *Pflügers Arch.* **1992**, *420*, 461–469.

- [41] J. Altman, *Nature (London)* **1988**, *331*, 119–120.
- [42] P. W. Majerus, T. M. Connolly, V. S. Bansal, R. C. Inhorn, T. S. Ross, D. L. Lips, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3051–3054.
- [43] L. E. Hokin, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 205–235.
- [44] S. R. Nahorski, *Trends Neurosci.* **1988**, *11*, 444–448.
- [45] G. W. Mayr, *Topics in Biochemistry-Boehringer Mannheim* **1987**, 1–18.
- [46] S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, *10*, 139–144.
- [47] M. J. Berridge, *Nature (London)* **1993**, *361*, 315–325.
- [48] *Inositol and Phosphoinositides: Metabolism and Regulation* (Hrsg.: J. E. Bleasdale, J. Eichberg, G. Hauser), Humana, Clifton, NJ, **1985**.
- [49] *Molecular Mechanisms of Transmembrane Signalling* (Hrsg.: P. Cohen, M. D. Houslay), Elsevier, Amsterdam, **1985**.
- [50] J. W. Putney, Jr., *Phosphoinositides and Receptor Mechanisms*, Liss, New York, **1986**.
- [51] *Inositol Lipids and Transmembrane Signalling* (Hrsg.: M. J. Berridge, R. H. Michell), The Royal Society, London, **1988**.
- [52] *Inositol Lipids and Cell Signalling* (Hrsg.: R. H. Michell, A. H. Drummond, C. P. Downes), Academic Press, London, **1989**.
- [53] D. C. Billington, *Chem. Soc. Rev.* **1989**, *18*, 83–122.
- [54] B. V. L. Potter, *Nat. Prod. Rep.* **1990**, *7*, 1–24.
- [55] *Inositol Phosphates and Derivatives - Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential* (Hrsg.: A. B. Reitz), American Chemical Society, Washington, DC, **1991**.
- [56] D. C. Billington, *The Inositol Phosphates: Chemical Synthesis and Biological Significance*, VCH, Weinheim, **1993**.
- [57] D. J. Cosgrove, *Inositol Phosphates, their Chemistry, Biochemistry and Physiology*, Elsevier, Amsterdam, **1980**.
- [58] T. Posternak, *The Cyclitols*, Holden-Day, San Francisco, **1965**.
- [59] L. Bouveault, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1894**, *11*, 144.
- [60] *Inf. Bull. IUPAC* **1968**, *32*, 51.
- [61] B. A. Klyashchitskii, V. I. Shvets, N. A. Preobrazhenskii, *Chem. Phys. Lipids* **1969**, *3*, 393.
- [62] R. H. Michell, M. J. Berridge, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, *320*, 237–238.
- [63] R. Parthasarathy, F. Eisenberg, Jr., *Biochem. J.* **1986**, *235*, 313–322.
- [64] Nomenclature Committee-IUB, *Biochem. J.* **1989**, *258*, 1–2.
- [65] T. F. Donahue, S. A. Henry, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7077–7085.
- [66] T. Maeda, F. Eisenberg, Jr., *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8458–8461.
- [67] L. A. Mauck, Y.-H. Wong, W. R. Sherman, *Biochemistry* **1980**, *19*, 3623–3629.
- [68] F. Eisenberg, Jr., T. Maeda in *Inositol and Phosphoinositides: Metabolism and Regulation* (Hrsg.: J. E. Bleasdale, J. Eichberg, G. Hauser), Humana, Clifton, NJ, **1985**, S. 3–11.
- [69] F. A. Loewus, *Recent Adv. Phytochem.* **1974**, *8*, 179.
- [70] F. A. Loewus, M. W. Loewus, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1983**, *34*, 137–161.
- [71] G. R. Baker, D. C. Billington, D. Gani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 17–20.
- [72] N. S. Gee, C. I. Ragan, K. J. Watling, S. Aspley, R. G. Jackson, G. G. Reid, D. Gani, J. K. Shute, *Biochem. J.* **1988**, *249*, 883–889.
- [73] K. Takimoto, M. Okada, Y. Matsuda, H. Nakagawa, *J. Biochem. (Tokyo)* **1985**, *98*, 363.
- [74] P. V. Attwood, J.-B. Ducep, M.-C. Chanal, *Biochem. J.* **1988**, *253*, 387–394.
- [75] J. L. Meek, T. J. Rice, E. Anton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 143–148.
- [76] R. Bone, J. P. Springer, J. R. Atack, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 10031–10035.
- [77] J. H. Allison, M. A. Stewart, *Nature (London)*, *New Biol.* **1971**, *233*, 267–268.
- [78] M. J. Berridge, C. P. Downes, M. R. Hanley, *Biochem. J.* **1982**, *206*, 587–595.
- [79] W. R. Sherman, L. Y. Munsell, B. G. Gish, M. P. Honchar, *J. Neurochem.* **1985**, *44*, 798–807.
- [80] W. R. Sherman in *Inositol Lipids in Cell Signalling* (Hrsg.: R. H. Michell, A. H. Drummond, C. P. Downes), Academic Press, London, **1989**, S. 39–79.
- [81] A. H. Drummond, *Trends Pharmacol. Sci.* **1987**, *8*, 129–133.
- [82] S. R. Nahorski, C. I. Ragan, R. A. J. Challiss, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, *12*, 297–303.
- [83] J. K. Shute, R. Baker, D. C. Billington, D. Gani, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 626–628.
- [84] G. R. Baker, D. Gani, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 193–196.
- [85] B. J. Dröbak, *Biochem. J.* **1992**, *288*, 697–712.
- [86] Y. Uemura, M. Sakon, J. Kambayashi, T. Tsujinaka, T. Mori, *Biochem. Int.* **1988**, *16*, 639–646.
- [87] S. Cockcroft, G. M. H. Thomas, *Biochem. J.* **1992**, *288*, 1–14.
- [88] Y. Nishizuka, *Nature (London)* **1984**, *308*, 693–698.
- [89] U. Kikkawa, Y. Nishizuka, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1986**, *2*, 149–178.
- [90] M. Castagna, Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa, Y. Nishizuka, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7847–7851.
- [91] Y. Nishizuka, *Science* **1986**, *233*, 305–312.
- [92] Y. Nishizuka, *Nature (London)* **1988**, *334*, 661–665.
- [93] H. Hug, T. F. Sarre, *Biochem. J.* **1993**, *291*, 329–343.
- [94] W. L. Smith, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 315–324.
- [95] B. R. Ganong, C. R. Loomis, Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 1184–1188.
- [96] J. C. Briggs, A. H. Haines, R. J. K. Taylor, A. P. Dawson, I. Gibson, J. Hook, A. Lloyd, S. Meiners, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 23–35.
- [97] R. R. Rando, *FASEB J.* **1988**, *2*, 2348–2355.
- [98] R. F. Irvine, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1992**, *4*, 212–219.
- [99] P. J. Parker, M. D. Waterfield, *Cell Growth Differ.* **1993**, *3*, 747–752.
- [100] T. R. Jackson, L. R. Stephens, P. T. Hawkins, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16627–16636.
- [101] D. L. Lips, P. W. Majerus, F. R. Gorgia, A. T. Young, T. L. Benjamin, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8759–8763.
- [102] M. J. Pazin, L. T. Williams, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 374–378.
- [103] L. C. Cantley, K. R. Auger, C. Carpenter, B. Duckworth, A. Graziani, R. Kapeller, S. Soltoff, *Cell* **1991**, *64*, 281–302.
- [104] P. C. Downes, A. W. Carter, *Cell. Signalling* **1991**, *3*, 501–513.
- [105] K. Fukami, K. Furuhashi, M. Inagaki, T. Endo, S. Hatano, T. Takenawa, *Nature (London)* **1992**, *359*, 15–15.
- [106] P. W. Majerus, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 225–250.
- [107] H. Ishii, T. M. Connolly, T. E. Bross, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6397–6401.
- [108] P. W. Majerus, T. M. Connolly, H. Deckmyn, T. S. Ross, T. E. Bross, H. Ishii, V. S. Bansal, D. B. Wilson, *Science* **1986**, *234*, 1519–1526.
- [109] A. L. Wilcockson, J. Strupish, R. F. Irvine, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1989**, *257*, 297–300.
- [110] A. R. Hughes, T. Takemura, J. W. Putney, Jr., *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10314–10319.
- [111] N. S. Wong, C. J. Barker, S. B. Shears, C. J. Kirk, R. H. Michell, *Biochem. J.* **1988**, *252*, 1–5.
- [112] M. J. Berridge, R. F. Irvine, *Nature (London)* **1989**, *341*, 197–205.
- [113] C. P. Downes, M. C. Mussat, R. H. Michell, *Biochem. J.* **1982**, *203*, 169–177.
- [114] K. M. Laxminarayan, M. Matzaris, C. J. Speed, C. A. Mitchell, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4968–4974.
- [115] V. Sylvia, G. Curtin, J. Norman, J. Stec, D. Busbee, *Cell* **1988**, *54*, 651–658.
- [116] G. W. Mayr, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 463–470.
- [117] I. H. Batty, S. R. Nahorski, R. F. Irvine, *Biochem. J.* **1985**, *232*, 211–215.
- [118] R. F. Irvine, A. J. Letcher, J. P. Heslop, M. J. Berridge, *Nature (London)* **1986**, *320*, 631–634.
- [119] R. A. Johanson, C. A. Hansen, J. R. Williamson, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7465–7471.
- [120] S. Y. Lee, S. S. Sim, J. W. Kim, K. H. Moon, J. H. Kim, S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9434–9440.
- [121] K. Y. Choi, H. K. Kim, S. Y. Lee, K. H. Moon, S. S. Sim, J. W. Kim, H. K. Chung, S. G. Rhee, *Science* **1990**, *248*, 64–66.
- [122] K. Takazawa, J. Vandekerck, J. E. Dumont, C. Erneux, *Biochem. J.* **1990**, *272*, 107–112.
- [123] R. F. Irvine, *Bioessays* **1991**, *13*, 419–427.
- [124] R. F. Irvine, *FEBS Lett.* **1990**, *263*, 5–9.
- [125] E. Neher, *Nature (London)* **1992**, *355*, 298–299.
- [126] A. Lückhoff, D. E. Clapham, *Nature (London)* **1992**, *355*, 356–358.
- [127] R. F. Irvine in *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* (Hrsg.: J. W. Putney, Jr.), Raven, New York, **1992**, S. 161–186.
- [128] C. Erneux, M. Lemos, B. Verjans, P. Vanderhaeghen, A. Delvaux, J. E. Dumont, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 317–322.
- [129] C. A. Hansen, R. A. Johanson, M. T. Williamson, J. R. Williamson, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17319–17326.
- [130] R. F. Irvine, A. J. Letcher, D. J. Lander, M. J. Berridge, *Biochem. J.* **1986**, *240*, 301–304.
- [131] J. Strupish, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, R. Gigg, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1988**, *253*, 901–905.
- [132] C. Doughney, M. A. McPherson, R. L. Dormer, *Biochem. J.* **1988**, *251*, 927–929.
- [133] A. Höer, D. Höer, E. Oberdisse, *Biochem. J.* **1990**, *270*, 715–719.
- [134] K. Nogimori, P. J. Hughes, M. C. Glennon, M. E. Hodgson, J. W. Putney, Jr., S. B. Shears, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 16499–16506.
- [135] N. Ali, A. Craxton, S. B. Shears, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6161–6167.
- [136] S. B. Shears, J. B. Parry, E. K. Y. Tang, R. F. Irvine, R. H. Michell, C. J. Kirk, *Biochem. J.* **1987**, *246*, 139–147.
- [137] T. Balla, G. Guillemette, A. J. Baukal, K. J. Catt, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 9952–9955.
- [138] D. J. Gawler, B. V. L. Potter, R. Gigg, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1991**, *276*, 163–167.
- [139] I. Ivorra, R. Gigg, R. F. Irvine, I. Parker, *Biochem. J.* **1991**, *273*, 317–321.
- [140] M. Abdullah, P. J. Hughes, A. Craxton, R. Gigg, T. Desai, J. F. Marecek, G. D. Prestwich, S. B. Shears, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2234–22345.
- [141] M. Vallejo, T. Jackson, S. Lightman, M. R. Hanley, *Nature (London)* **1987**, *330*, 656.
- [142] M. R. Hanley, T. R. Jackson, M. Vallejo, S. I. Patterson, O. Thastrup, S. Lightman, J. Rogers, G. Henderson, A. Pini, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, *320*, 381–398.
- [143] D. Carpenter, M. R. Hanley, P. T. Hawkins, T. R. Jackson, L. R. Stephens, M. Vallejo, *Biochem. Soc. Trans.* **1989**, *17*, 3–5.

- [144] P. T. Hawkins, D. R. Poyner, T. R. Jackson, A. J. Letcher, D. J. Lander, R. F. Irvine, *Biochem. J.* **1993**, *294*, 929–934.
- [145] J. L. Meek, F. Nicoletti, *J. Chromatogr.* **1986**, *351*, 303–311.
- [146] J. L. Meek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 4162–4166.
- [147] G. W. Mayr, *Biochem. J.* **1988**, *254*, 585–591.
- [148] J. C. Lindon, D. J. Baker, R. D. Farrant, J. M. Williams, *Biochem. J.* **1986**, *233*, 275–277.
- [149] S. Cerdan, C. A. Hansen, R. Johanson, T. Inubushi, J. R. Williamson, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14676–14680.
- [150] J. C. Lindon, D. J. Baker, J. M. Williams, R. F. Irvine, *Biochem. J.* **1987**, *244*, 591–595.
- [151] G. W. Mayr, W. Dietrich, *FEBS Lett.* **1987**, *213*, 278–282.
- [152] J. Emsley, S. Niazi, *Phosphorus Sulfur Relat. Elem.* **1981**, *10*, 401.
- [153] C. D. Ferris, S. H. Snyder, *Annu. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 469–488.
- [154] C. D. Ferris, S. H. Snyder, *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 1567–1574.
- [155] S. K. Joseph, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1992**, *27*, 261–270.
- [156] K. Mikoshiba, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 86–89.
- [157] K. Mikoshiba, T. Furuchi, A. Miyawaki, S. Yoshikawa, T. Nakagawa, N. Yamada, Y. Hamanaka, I. Fujino, T. Michikawa, Y. Ryo, H. Okano, S. Fujii, S. Nakade, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1993**, *340*, 345–349.
- [158] C. W. Taylor, A. Richardson, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *51*, 97–137.
- [159] S. Supattapone, P. F. Worley, J. M. Baraban, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 153–1534.
- [160] N. Maeda, M. Niinobe, K. Nakahira, K. Mikoshiba, *J. Neurochem.* **1988**, *51*, 1724–1730.
- [161] T. Furuchi, S. Yoshikawa, A. Miyawaki, K. Wada, N. Maeda, K. Mikoshiba, *Nature (London)* **1989**, *342*, 32–38.
- [162] M. C. Glennon, S. B. Shears, *Biochem. J.* **1993**, *293*, 583–590.
- [163] G. A. Mignery, C. L. Newton, B. T. Archer III, T. C. Südhof, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12679–12685.
- [164] T. C. Südhof, C. L. Newton, B. T. Archer III, Y. A. Ushkaryov, G. A. Mignery, *EMBO J.* **1991**, *10*, 3199–3206.
- [165] S. Yoshikawa, T. Tanimura, A. Miyawaki, M. Nakamura, M. Yuzaki, T. Furuchi, K. Mikoshiba, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16613–16619.
- [166] C. D. Ferris, R. L. Huganir, S. Supattapone, S. H. Snyder, *Nature (London)* **1989**, *342*, 87–89.
- [167] N. Maeda, M. Niinobe, K. Mikoshiba, *EMBO J.* **1990**, *9*, 61–67.
- [168] N. Maeda, T. Kawasaki, S. Nakade, N. Yokota, T. Taguchi, M. Kasai, K. Mikoshiba, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1109–1116.
- [169] G. A. Mignery, T. C. Südhof, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3893–3898.
- [170] A. Miyawaki, T. Furuchi, Y. Ryou, S. Yoshikawa, T. Nakagawa, T. Saitoh, K. Mikoshiba, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4911–4915.
- [171] T. Meyer, T. Wenzel, L. Stryer, *Biochemistry* **1990**, *29*, 32.
- [172] Y. Mori, T. Friedrich, M.-S. Kim, A. Mikami, J. Nakai, P. Ruth, E. Bosse, F. Hofmann, V. Flockerzi, T. Furuchi, K. Mikoshiba, K. Imoto, T. Tanabe, S. Numa, *Nature (London)* **1989**, *350*, 398–402.
- [173] G. A. Mignery, T. C. Südhof, K. Takei, P. De Camilli, *Nature (London)* **1989**, *342*, 192–195.
- [174] H. Takeshima, S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose, S. Numa, *Nature (London)* **1989**, *339*, 439–445.
- [175] R. J. Mourey, V. A. Estevez, J. F. Marecek, R. K. Barrow, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1719–1726.
- [176] S. K. Danoff, C. D. Ferris, C. Donath, G. A. Fischer, S. Munemitsu, A. Ullrich, S. H. Snyder, C. A. Ross, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 2951–2955.
- [177] I. Bezprozvanny, J. Watras, B. E. Ehrlich, *Nature (London)* **1991**, *351*, 751–754.
- [178] C. A. Ross, S. K. Danoff, M. J. Schell, S. H. Snyder, A. Ullrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4265–4269.
- [179] O. Blondel, J. Takeda, H. Janssen, S. Seino, G. I. Bell, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11356–11363.
- [180] A. R. Maranto, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 1222–1230.
- [181] J. D. Moyer, N. Mahinowski, E. A. Napier, J. Strong, *Biochem. J.* **1988**, *254*, 95–100.
- [182] R. Spector, *Neurochem. Res.* **1988**, *13*, 785.
- [183] M. D. Tuersley, L. Best, S. Tomlinson, *J. Neurochem.* **1988**, *51*, 1610.
- [184] M. J. Berridge, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *907*, 33–45.
- [185] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, G. Powis, D. C. Melder, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4528–4531.
- [186] A. P. Kozikowski, Y. Xia, J. M. Rusnak, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1301–1303.
- [187] J. L. Offer, G. A. Smith, J. C. Metcalfe, *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 590–591.
- [188] J. L. Offer, J. C. Metcalfe, G. A. Smith, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1312–1313.
- [189] J. L. Offer, H. P. Voorheis, J. C. Metcalfe, G. A. Smith, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, *953*, 960.
- [190] S. S. Yang, T. R. Beattie, T. Y. Shen, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5517–5520.
- [191] D. A. Sawyer, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, *923*, 932.
- [192] G. Lowe, F. McPhee, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, *1249*–1253.
- [193] S. S. Yang, T. R. Beattie, T. Y. Shen, *Synth. Commun.* **1986**, *16*, 131–138.
- [194] S. S. Yang, J. M. Min, T. R. Beattie, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 899–905.
- [195] J. P. Guidot, T. Le Gall, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 4647–4650.
- [196] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, J. M. Rusnak, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3365–3368.
- [197] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, G. Powis, D. C. Melder, *Med. Chem. Res.* **1991**, *1*, 277–282.
- [198] G. Powis, I. A. Aksoy, D. C. Melder, S. Aksoy, H. Eichinger, A. H. Fauq, A. P. Kozikowski, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1991**, *29*, 95–104.
- [199] A. P. Kozikowski, G. Powis, A. Gallegos, W. Tückmantel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1323–1326.
- [200] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, M. J. Malaska, W. Tückmantel, V. I. Ognyanov, G. Powis, *Curr. Med. Chem.* **1994**, *1*, 1–12.
- [201] S. V. Ley, M. Parra, A. J. Redgrave, F. Sternfeld, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 4995–5026.
- [202] C. Jiang, J. D. Moyer, D. C. Baker, *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, *6*, 319–355.
- [203] C. Jiang, D. J. A. Scheider, P. E. Morris, Jr., A. A. Zayed, D. C. Baker, *Carbohydr. Res.* **1990**, *207*, 277–285.
- [204] G. Lowe, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1980**, 2029.
- [205] J. D. Moyer, O. Reizes, A. Surender, C. Jiang, N. Malinowski, D. C. Baker, *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33*, 683–689.
- [206] S. C. Johnson, J. Dahl, T. -L. Shih, D. J. A. Scheider, L. Anderson, T. L. Benjamin, D. C. Baker, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3628–3635.
- [207] F. McPhee, C. P. Downes, G. Lowe, *Biochem. J.* **1991**, *277*, 407–412.
- [208] J. L. Offer, J. C. Metcalfe, G. A. Smith, *Biochem. J.* **1993**, *291*, 553–560.
- [209] H. Höning, P. Seufer-Wasserthal, A. E. Stütz, E. Zenz, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 811–812.
- [210] K. -L. Yu, K. -Y. Ko, B. Fraser-Reid, *Synth. Commun.* **1988**, *18*, 465–468.
- [211] S. J. Angyal, M. E. Tate, *J. Chem. Soc.* **1961**, 4122–4128.
- [212] J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, R. Conant, *Carbohydr. Res.* **1985**, *142*, 132–134.
- [213] J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, R. Conant, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 423–429.
- [214] J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, R. Conant, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 1757–1762.
- [215] J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, R. Conant, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1987**, 2411–2414.
- [216] P. J. Garegg, T. Iversen, R. Johansson, B. Lindberg, *Carbohydr. Res.* **1984**, *130*, 322–326.
- [217] P. J. Garegg, B. Lindberg, I. Kvarnström, S. C. T. Svensson, *Carbohydr. Res.* **1985**, *139*, 209–215.
- [218] P. J. Garegg, B. Lindberg, I. Kvarnström, S. C. T. Svensson, *Carbohydr. Res.* **1988**, *173*, 205–216.
- [219] V. I. Shvets, A. E. Stepanov, V. N. Krylova, P. V. Gulak, *myo-Inositol and Phosphoinositides*, Nauka, Moskau, 1987.
- [220] A. E. Stepanov, V. I. Shvets, *Chem. Phys. Lipids* **1979**, *25*, 247–263.
- [221] S. Ozaki, M. Kohno, H. Nakahira, M. Bunya, Y. Watanabe, *Chem. Lett.* **1988**, 77–80.
- [222] Y. Watanabe, T. Shinohara, T. Fujimoto, S. Ozaki, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 562–563.
- [223] G. Baudin, B. I. Gläntzer, K. S. Swaminathan, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1367–1378.
- [224] Y. -C. Liu, C. -S. Chen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1617–1620.
- [225] D. -M. Gou, C. -S. Chen, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 721–724.
- [226] D. -M. Gou, Y. -C. Liu, C. -S. Chen, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 51–64.
- [227] L. Ling, Y. Watanabe, T. Akiyama, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1911–1914.
- [228] L. Ling, X. Li, Y. Watanabe, T. Akiyama, S. Ozaki, *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 155–159.
- [229] P. Andersch, M. P. Schneider, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 2135–2138.
- [230] R. J. Ferrier, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1979**, 1455–1458.
- [231] S. T. Safrany, R. J. H. Wojciechowicz, J. Strupish, S. R. Nahorski, D. Dubreuil, J. Cleophax, S. D. Gero, B. V. L. Potter, *FEBS Lett.* **1991**, *278*, 252–256.
- [232] K. Sato, S. Sakuma, S. Muramatsu, M. Bokura, *Chem. Lett.* **1991**, *1473*–1474.
- [233] K. Sato, M. Bokura, M. Taniguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 1633–1640.
- [234] C. Jaramillo, J. -L. Chiara, M. Martin-Lomas, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3135–3141.
- [235] S. L. Bender, R. J. Budhu, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9883–9885.
- [236] V. A. Estevez, G. D. Prestwich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9885–9887.
- [237] J. L. Chiara, M. Martin-Lomas, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2969–2972.
- [238] H. Schiff, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1857**, *102*, 334–339.
- [239] T. Desai, A. Fernandez-Mayoralas, J. Gigg, R. Gigg, S. Payne, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 157–175.
- [240] A. M. Cooke, N. J. Noble, S. Payne, R. Gigg, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 269–271.
- [241] A. M. Cooke, N. J. Noble, R. Gigg, A. L. Willcocks, J. Strupish, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 992–993.
- [242] N. J. Noble, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 177–187.

- [243] S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Ogasawara, Y. Kondo, N. Shiotani, H. Nishii, T. Matsuki, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3157–3160.
- [244] B. M. Iselin, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 3822–3825.
- [245] D. Mercier, J. E. G. Barnett, S. D. Gero, *Tetrahedron* **1969**, 25, 5681–5687.
- [246] Y. Watanabe, T. Ogasawara, H. Nakahira, T. Matsuki, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5259–5262.
- [247] D. J. Cosgrove, *Carbohydr. Res.* **1975**, 40, 38–384.
- [248] H. G. Khorana, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1953**, 2257–2260.
- [249] Y. Watanabe, H. Nahahira, M. Bunya, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4179–4180.
- [250] S. J. DeSolms, J. P. Vacca, J. R. Huff, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4503–4506.
- [251] J. P. Vacca, S. J. DeSolms, J. R. Huff, D. C. Billington, R. Baker, J. J. Kulagowski, I. M. Mawer, *Tetrahedron* **1989**, 45, 5679–5702.
- [252] P. M. J. Burgers, F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 40, 3835–3838.
- [253] C. E. Dreef, G. W. Mayr, J.-P. Jansze, H. C. P. F. Roelen, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 239–242.
- [254] F. Eckstein, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 431–514; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, 22, 423–506.
- [255] J. L. Meek, F. Davidson, F. W. Hobbs Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2317–2318.
- [256] S. J. Mills, S. T. Safrany, R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 1505–1510.
- [257] C. E. Dreef, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, 106, 161–162.
- [258] K. L. Yu, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 979–982.
- [259] Y. Watanabe, Y. Komoda, K. Ebisuya, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 255–256.
- [260] A. M. Cooke, B. V. L. Potter, R. Gigg, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2305–2308.
- [261] A. M. Cooke, R. Gigg, B. V. L. Potter, *Biochem. Soc. Trans.* **1987**, 15, 904–906.
- [262] M. R. Hamblin, B. V. L. Potter, R. Gigg, *Biochem. Soc. Trans.* **1987**, 15, 415–416.
- [263] G. Lin, M. D. Tsai, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3099–3101.
- [264] G. Lin, F. Bennett, M. D. Tsai, *Biochemistry* **1990**, 29, 2747–2757.
- [265] G. M. Salamonczyk, K. S. Bruzik, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2015–2016.
- [266] C. E. Dreef, C. J. J. Elie, P. Hoogerhout, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6513–6516.
- [267] C. J. J. Elie, C. E. Dreef, R. Verduyn, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **1989**, 45, 3477–3486.
- [268] B. Duthu, D. Houalla, R. Wolf, *Can. J. Chem.* **1988**, 66, 2965–2974.
- [269] W. Bannwarth, A. Trzeciaik, *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 175–186.
- [270] D. C. Billington, R. Baker, J. J. Kulagowski, I. M. Mawer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 314–316.
- [271] H. A. J. Carless, K. Busia, *Carbohydr. Res.* **1992**, 234, 207–215.
- [272] C. E. Ballou, L. I. Pizer, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3333–3335.
- [273] T. Akiyama, N. Takechi, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1433–1434.
- [274] T. Akiyama, N. Takechi, S. Ozaki, K. Shiota, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, 65, 366–372.
- [275] G. M. Salamonczyk, K. M. Pietrusiewicz, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4031–4032.
- [276] K. M. Pietrusiewicz, G. M. Salamonczyk, K. S. Bruzik, W. Wieczorek, *Tetrahedron* **1992**, 48, 5523–5542; *ibid.* **1994**, 50, 573.
- [277] J. G. Molotkovsky, L. D. Bergelson, *Tetrahedron Lett.* **1971**, 50, 4791–4794.
- [278] T. Metsches, C. Schultz, B. Jastorff, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 3921–3922.
- [279] A. L. Leavitt, W. R. Sherman, *Carbohydr. Res.* **1982**, 103, 203–212.
- [280] D. C. Billington, R. Baker, J. J. Kulagowski, I. M. Mawer, J. P. Vacca, S. J. DeSolms, J. R. Huff, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1423–1429.
- [281] H. W. Lee, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 4402–4404.
- [282] D. C. Billington, R. Baker, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1011–1013.
- [283] Y. Watanabe, M. Mitani, T. Morita, S. Ozaki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 482–483.
- [284] V. N. Krylova, N. I. Kobelkova, G. F. Oleinik, V. I. Shvets, *Zhur. Org. Khim.* **1980**, 16, 62–68.
- [285] M. R. Hamblin, J. S. Flora, B. V. L. Potter, *Biochem. J.* **1987**, 246, 771–774.
- [286] A. E. Stepanov, B. A. Klyashchitskii, V. I. Shvets, R. P. Evstigneeva, *Bioorg. Khim.* **1976**, 2, 1627.
- [287] G. M. Salamonczyk, K. M. Pietrusiewicz, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6167–6170.
- [288] I. M. Bird, I. H. Sadler, B. C. Williams, S. W. Walker, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1989**, 66, 215–229.
- [289] P. Westerduin, H. A. M. Willems, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6915–6918.
- [290] M. R. Hamblin, B. V. L. Potter, R. Gigg, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 626–627.
- [291] H. A. J. Carless, K. Busia, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 3449–3452.
- [292] S. Ozaki, Y. Kondo, N. Shiotani, T. Ogasawara, Y. Watanabe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 729–737.
- [293] A. M. Cooke, Dissertation, University of Leicester, **1991**.
- [294] A. E. Stepanov, O. B. Runova, V. N. Krylova, V. I. Shvets, V. N. Bochkov, G. Schlewer, B. Spiess, *Bioorg. Khim.* **1991**, 17, 258–267.
- [295] V. I. Shvets, A. E. Stepanov, L. Schmitt, B. Spiess, G. Schlewer in *Inositol Phosphates and Derivatives -Synthesis, Biochemistry, and Therapeutic Potential* (Hrsg.: A. B. Reitz), American Chemical Society, Washington, DC, **1991**, S. 155–171.
- [296] C. B. Reese, J. G. Ward, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2309–2312.
- [297] J. P. Vacca, S. J. DeSolms, J. R. Huff, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3478–3479.
- [298] C. E. Dreef, R. J. Tuinman, C. J. J. Elie, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1988**, 107, 395–397.
- [299] K. S. Bruzik, J. Myers, M. D. Tsai, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 1009–1012.
- [300] A. Aguiló, M. Martin-Lomas, S. Penades, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 401–404.
- [301] K. S. Bruzik, G. M. Salamonczyk, *Carbohydr. Res.* **1989**, 195, 67–73.
- [302] S. V. Ley, F. Sternfeld, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5305–5308.
- [303] S. V. Ley, F. Sternfeld, S. Taylor, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 225–226.
- [304] H. A. J. Carless, K. Busia, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 1617–1620.
- [305] J. R. Falck, P. Yadagiri, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 5851–5852.
- [306] W. Tegge, C. E. Ballou, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 94–98.
- [307] A. E. Stepanov, O. B. Runova, G. Schlewer, B. Spiess, V. I. Shvets, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5125–5128.
- [308] Y. Watanabe, T. Fujimoto, T. Shinohara, S. Ozaki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 428–429.
- [309] J. F. Marecek, G. D. Prestwich, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1989**, 27, 917–925.
- [310] R. J. Auchus, S. L. Kaiser, P. W. Majerus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 1206–1209.
- [311] Y. Watanabe, T. Ogasawara, N. Shiotani, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2607–2610.
- [312] W. Tegge, G. V. Denis, C. E. Ballou, *Carbohydr. Res.* **1991**, 217, 107–116.
- [313] M. F. Boehm, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5217–5220.
- [314] A. M. Riley, R. Payne, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3918–3927.
- [315] S. J. Mills, J. Al-Hafidh, J. Westwick, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 2599–2604.
- [316] Y. Watanabe, T. Ogasawara, S. Ozaki, M. Hirata, *Carbohydr. Res.* **1994**, 258, 87–92.
- [317] A. M. Cooke, D. C. Billington, B. V. L. Potter, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [318] R. A. Wilcox, R. A. J. Challiss, G. Baudin, A. Vasella, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1993**, 294, 191–194.
- [319] S. Ozaki, Y. Kondo, H. Nakahira, S. Yamaoka, Y. Watanabe, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 4691–4694.
- [320] Y. Watanabe, A. Oka, Y. Shimizu, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2613–2616.
- [321] M. R. Hamblin, L. R. Stephens, B. V. L. Potter, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [322] A. P. Kozikowski, V. I. Ognyanov, A. H. Fauq, R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 599–600.
- [323] R. Baker, J. J. Kulagowski, D. C. Billington, P. D. Leeson, I. C. Lennon, N. J. Liverton, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1383–1385.
- [324] S. Ozaki, Y. Watanabe in *Inositol Phosphates and Derivatives - Synthesis, Biochemistry, and Therapeutic Potential* (Hrsg.: A. B. Reitz), American Chemical Society, Washington, DC, **1991**, S. 43–65.
- [325] M. J. Seewald, I. A. Aksoy, G. Powis, A. H. Fauq, A. P. Kozikowski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1638–1639.
- [326] A. P. Kozikowski, V. I. Ognyanov, A. H. Fauq, S. R. Nahorski, R. A. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4429–4434.
- [327] S. V. Ley, M. Parra, A. J. Redgrave, F. Sternfeld, A. Vidal, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 3557–3560.
- [328] M. A. Polokoff, G. H. Bencen, J. P. Vacca, S. J. DeSolms, S. D. Young, J. R. Huff, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 11922–11927.
- [329] J. F. Marecek, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5401–5404.
- [330] S. T. Safrany, D. Sawyer, R. J. H. Wojcikiewicz, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *FEBS Lett.* **1990**, 276, 91–94.
- [331] D. A. Sawyer, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 705–710.
- [332] S. T. Safrany, D. A. Sawyer, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Chirality* **1992**, 4, 415–422.
- [333] D. Lampe, B. V. L. Potter, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 2365–2368.
- [334] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, I. A. Aksoy, M. J. Seewald, G. Powis, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 7403–7404.
- [335] C. Liu, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1014–1016.
- [336] C. Liu, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Carbohydr. Res.* **1992**, 234, 107–115.
- [337] C. Liu, S. T. Safrany, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 1523–1528.
- [338] A. H. Fauq, A. P. Kozikowski, V. I. Ognyanov, R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1301–1302.
- [339] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, R. A. Wilcox, R. A. J. Challiss, S. R. Nahorski, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 868–872.
- [340] F. Eckstein, G. Gish, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 14, 97–100.
- [341] F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 367–402.
- [342] R. A. J. Challiss, E. R. Chivers, A. L. Willcocks, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1990**, 265, 421–427.

- [343] R. A. J. Challiss, S. M. Smith, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *FEBS Lett.* **1991**, *281*, 101–104.
- [344] D. Lampe, S. J. Mills, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2899–2906.
- [345] G. R. Baker, D. C. Billington, D. Gani, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3895–3908.
- [346] A. M. Cooke, L. James, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1990**, *51/52*, 19–22.
- [347] C. Schultz, T. Metschies, B. Jastorff, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3919–3920.
- [348] A. M. Cooke, R. Gigg, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 1525–1526.
- [349] N. J. Noble, D. Dubreuil, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 471–476.
- [350] D. Lampe, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 150–1501.
- [351] S. T. Safrany, R. A. Wilcox, C. Liu, D. Dubreuil, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *43*, 499–503.
- [352] C. Liu, J. Al-Hafidh, J. Westwick, B. V. L. Potter, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *2*, 253–257.
- [353] D. Lampe, C. Liu, B. V. L. Potter, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 907–912.
- [354] P. Folk, E. Kmonickova, L. Krpejsova, A. Strunecka, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1988**, *25*, 793–803.
- [355] C. Liu, B. V. L. Potter, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1605–1608.
- [356] R. A. Wilcox, E. M. Whitham, C. Liu, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 267–271.
- [357] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2279–2281.
- [358] C. E. Dreef, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, *106*, 512–513.
- [359] J. R. Falck, A. Abdali, S. J. Wittenberger, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 953–955.
- [360] C. E. Dreef, W. Schiebler, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 6021–6024.
- [361] C. E. Dreef, J.-P. Jansze, C. J. J. Elie, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 37–50.
- [362] C. E. Dreef, R. J. Tuinman, A. W. M. Lefeber, C. J. J. Elie, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 4709–4722.
- [363] C. E. Dreef, M. Douwes, C. J. J. Elie, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Synthesis* **1991**, 443–447.
- [364] L. Schmitt, B. Spiess, G. Schlewer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7059–7060.
- [365] H. A. M. Willems, G. H. Veeneman, P. Westerduin, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2075–2078.
- [366] P. Westerduin, H. A. M. Willems, C. A. A. van Boeckel, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 131–140.
- [367] J. H. Kaplan, A. P. Somlyo, *Trends Neurosci.* **1989**, *12*, 54–59.
- [368] J. A. McCray, D. R. Trentham, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 239.
- [369] J. W. Walker, G. P. Reid, J. A. McCray, D. R. Trentham, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 717–7177.
- [370] J. W. Walker, J. Feeney, D. R. Trentham, *Biochemistry* **1989**, *28*, 3272–3280.
- [371] J. W. Walker, A. V. Somlyo, Y. E. Goldman, A. P. Somlyo, D. R. Trentham, *Nature (London)* **1987**, *327*, 249–252.
- [372] A. V. Somlyo, K. Horiuti, D. R. Trentham, T. Kitazawa, A. P. Somlyo, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 22316–22322.
- [373] M. R. Blatt, G. Thiel, D. R. Trentham, *Nature (London)* **1990**, *346*, 766–769.
- [374] M. Hirata, T. Sasaguri, T. Hamachi, T. Hashimoto, M. Kukita, T. Koga, *Nature (London)* **1985**, *317*, 723–725.
- [375] T. Ishimatsu, Y. Kimura, T. Ikebe, K. Yamaguchi, T. Koga, M. Hirata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *155*, 1173–1180.
- [376] S. Ozaki, Y. Watanabe, T. Ogasawara, M. Hirata, T. Kanematsu, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 189–206.
- [377] M. Hirata, Y. Watanabe, T. Ishimatsu, F. Yanaga, T. Koga, S. Ozaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *168*, 379–386.
- [378] Y. Watanabe, M. Hirata, T. Ogasawara, T. Koga, S. Ozaki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, *1*, 399–402.
- [379] S. Ozaki, Y. Koga, L. Ling, Y. Watanabe, Y. Kimura, M. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 1058–1063.
- [380] A. N. Jina, J. Ralph, C. E. Ballou, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5203–5209.
- [381] D. -M. Gou, W. -R. Shieh, P. -J. Lu, C. -S. Chen, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 7–13.
- [382] G. D. Prestwich, J. F. Marecek, R. J. Mourey, A. B. Theibert, C. D. Ferris, S. K. Danoff, S. H. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1822–1825.
- [383] G. D. Prestwich, V. A. Estevez, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1623–1626.
- [384] J. F. Marecek, G. D. Prestwich, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1863–1866.
- [385] A. B. Theibert, V. A. Estevez, C. D. Ferris, S. K. Danoff, R. K. Barrow, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 3165–3169.
- [386] A. B. Theibert, V. A. Estevez, R. J. Mourey, J. F. Marecek, R. K. Barrow, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9071–9079.
- [387] D. L. Kalinoski, S. B. Aldinger, A. G. Boyle, T. Huque, J. F. Marecek, G. D. Prestwich, D. Restrepo, *Biochem. J.* **1992**, *281*, 449–456.
- [388] S. M. Voglmaier, J. H. Keen, J. -E. Murphy, C. D. Ferris, G. D. Prestwich, S. H. Snyder, A. B. Theibert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 158–163.
- [389] J. F. Marecek, V. A. Estevez, G. D. Prestwich, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 65–73.
- [390] W. Tegge, Dissertation, Universität Bremen, **1986**.
- [391] C. Schultz, M. Vajanaphanich, A. T. Harootunian, P. J. Sammak, K. E. Barrett, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6316–6322.
- [392] C. Schultz, R. Y. Tsien, *FASEB J.* **1992**, *6*, A1924.
- [393] V. Henne, G. W. Mayr, B. Grabowski, B. Koppitz, H. -D. Söling, *Eur. J. Biochem.* **1988**, *174*, 95–101.
- [394] P. Westerduin, H. A. M. Willems, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6919–6922.
- [395] A. P. Kozikowski, V. I. Ognyanov, C. Chen, P. Kurian, F. T. Crews, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 219–222.
- [396] C. Liu, N. F. Thomas, B. V. L. Potter, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1687–1689.
- [397] R. Baker, P. D. Leeson, N. J. Liverton, J. J. Kulagowski, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 462–464.
- [398] R. Baker, C. Carrick, P. D. Leeson, I. C. Lennon, N. J. Liverton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 298–300.
- [399] A. M. MacLeod, R. Baker, M. Hudson, K. James, M. B. Roe, M. Knowles, G. MacAllister, *Med. Chem. Res.* **1992**, *2*, 96–101.
- [400] S. R. Fletcher, R. Baker, P. D. Leeson, M. Teall, E. A. Harley, C. I. Ragan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 627–630.
- [401] R. Baker, J. J. Kulagowski, P. D. Leeson, N. J. Liverton in *Trends in Medicinal Chemistry '90* (Hrsg.: S. Sarel, R. Mechoulam, I. Agranat), Blackwell, Oxford, **1992**, S. 199–205.
- [402] S. R. Fletcher, R. Baker, T. Ladduwahetty, A. Sharpe, M. Teall, J. R. Atack, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 141–146.
- [403] J. R. Atack, S. M. Cook, A. P. Watt, S. R. Fletcher, C. I. Ragan, *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 652–658.
- [404] J. R. Atack, A. M. Prior, S. R. Fletcher, K. Quirk, R. McKernan, C. I. Ragan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, *270*, 7–76.
- [405] P. D. Leeson, K. James, I. C. Lennon, N. J. Liverton, S. Aspley, R. G. Jackson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1925–1930.
- [406] S. J. Pollack, J. R. Atack, M. R. Knowles, G. McAllister, C. I. Ragan, R. Baker, S. R. Fletcher, L. L. Iversen, H. B. Broughton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5766–5770.
- [407] J. A. Pachter, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *40*, 107–111.
- [408] C. W. Taylor, M. J. Berridge, K. D. Brown, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *150*, 626–632.
- [409] A. L. Wilcock, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *146*, 1071–1078.
- [410] M. Hirata, Y. Watanabe, T. Ishimatsu, T. Ikebe, Y. Kimura, K. Yamaguchi, S. Ozaki, T. Koga, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20303–20308.
- [411] D. L. Nunn, C. W. Taylor, *Biochem. J.* **1990**, *270*, 227–232.
- [412] S. K. Joseph, C. A. Hansen, J. R. Williamson, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *36*, 391–397.
- [413] R. A. Wilcox, R. A. J. Challiss, C. Liu, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 81–817.
- [414] M. Hirata, Y. Watanabe, M. Yoshida, T. Koga, S. Ozaki, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 19260–19266.
- [415] B. Kopitz, F. Vogel, G. W. Mayr, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *161*, 421–433.
- [416] R. A. Wilcox, S. T. Safrany, D. Lampe, S. J. Mills, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *223*, 115–124.
- [417] R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, D. A. Sawyer, C. Liu, B. V. L. Potter, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 237–246.
- [418] R. A. J. Challiss, A. L. Wilcock, B. Mulloy, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1991**, *274*, 861–867.
- [419] M. J. Berridge, R. F. Irvine, *Nature (London)* **1984**, *312*, 315–321.
- [420] C. Schultz, G. Gebauer, T. Metschies, L. Rensing, B. Jastorff, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166*, 1319–1327.
- [421] S. V. Ley, *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 2031–2034.
- [422] G. M. Burgess, R. F. Irvine, M. J. Berridge, J. S. McKinney, J. W. Putney, Jr., *Biochem. J.* **1984**, *224*, 741–746.
- [423] K. S. Authi, T. O. Gustafsson, N. Crawford, *Thromb. Haemostasis* **1989**, *62*, 250.
- [424] D. B. Wilson, T. M. Connolly, T. E. Bross, P. W. Majerus, W. R. Sherman, A. N. Tyler, L. J. Rubin, J. E. Brown, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13496–13501.
- [425] G. V. Denis, C. E. Ballou, *Cell Calcium* **1991**, *12*, 395–401.
- [426] A. P. Kozikowski, A. H. Fauq, G. Powis, P. Kurian, F. T. Crews, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 362–364.
- [427] M. Poitras, S. Bernier, G. Boulay, A. Fournier, G. Guillemette, *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *244*, 203–210.
- [428] A. P. Kozikowski, V. I. Ognyanov, C. Chen, A. H. Fauq, S. T. Safrany, R. A. Wilcox, S. R. Nahorski, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3035–3038.
- [429] J. P. Lyssikatos, M. D. Bednarski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 685–688.
- [430] A. J. Morris, K. J. Murray, P. J. England, C. P. Downes, R. H. Michell, *Biochem. J.* **1988**, *251*, 157–163.

- [431] T. M. Connolly, V. S. Bansal, T. E. Bross, R. F. Irvine, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 2146–2149.
- [432] S. T. Safrany, R. J. H. Wojcikiewicz, J. Strupish, J. McBain, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *39*, 754–761.
- [433] S. T. Safrany, Dissertation, University of Leicester, **1993**.
- [434] C. W. Taylor, M. J. Berridge, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 995–996.
- [435] C. W. Taylor, M. J. Berridge, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 645.
- [436] S. T. Safrany, R. A. Wilcox, C. Liu, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *226*, 265–272.
- [437] C. P. da Silva, F. Emmrich, A. H. Guse, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12521–12526.
- [438] A. M. Cooke, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *FEBS Lett.* **1989**, *242*, 373–377.
- [439] M. Hirata, F. Yanaga, T. Koga, T. Ogasawara, Y. Watanabe, S. Ozaki, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 8404–8407.
- [440] A. L. Wilcock, B. V. L. Potter, A. M. Cooke, S. R. Nahorski, *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *155*, 181–183.
- [441] S. G. Ward, D. Lampe, C. Liu, B. V. L. Potter, J. Westwick, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 515–523.
- [442] S. T. Safrany, S. J. Mills, C. Liu, D. Lampe, N. J. Noble, S. R. Nahorski, B. V. L. Potter, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10763–10769.
- [443] P. F. Worley, J. M. Baraban, S. Supattapone, V. S. Wilson, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12132–12136.
- [444] T. K. Ghosh, P. S. Eis, J. M. Mullaney, C. L. Ebert, D. L. Gill, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11075–11079.
- [445] G. Guillemette, S. LaMontagne, G. Boulay, B. Mouillac, *Mol. Pharmacol.* **1989**, *35*, 339–344.
- [446] M. A. Tones, M. D. Bootman, B. F. Higgins, D. A. Lane, G. F. Pay, *FEBS Lett.* **1989**, *252*, 105–108.
- [447] T. D. Hill, P.-O. Berggren, A. L. Boynton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *149*, 897–901.
- [448] T. Nilsson, J. Zwiller, A. L. Boynton, P.-O. Berggren, *FEBS Lett.* **1988**, *229*, 211–214.
- [449] P. J. Cullen, J. G. Comerford, A. P. Dawson, *FEBS Lett.* **1988**, *228*, 57–59.
- [450] K. J. Föhr, J. Scott, G. Ahnert-Hilger, M. Gratzl, *Biochem. J.* **1989**, *262*, 83–89.
- [451] J. Strupish, R. J. H. Wojcikiewicz, R. A. J. Challiss, S. T. Safrany, A. L. Willcocks, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Biochem. J.* **1991**, *277*, 294.
- [452] M. Bencherif, R. J. Lukas, *Neurosci. Lett.* **1992**, *134*, 157–160.
- [453] R. A. J. Challiss, S. T. Safrany, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, *19*, 888–893.
- [454] P. F. Worley, J. M. Baraban, J. S. Colvin, S. H. Snyder, *Nature (London)* **1987**, *325*, 159–161.
- [455] G. Cornelius, G. Gebauer, D. Techel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *162*, 852–856.
- [456] M. J. Bamford, P. L. Coe, R. T. Walker, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2488–2494.
- [457] L. Petterson, B. Hedman, I. Andersson, N. Ngri, *Chem. Scr.* **1983**, *22*, 254–264.
- [458] T. Meyer, D. Holowka, L. Stryer, *Science* **1988**, *240*, 653–656.
- [459] D. L. Nunn, B. V. L. Potter, C. W. Taylor, *Biochem. J.* **1990**, *265*, 393–398.
- [460] S. DeLisle, K. H. Krause, G. Denning, B. V. L. Potter, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 11726–11730.
- [461] F. Thevenod, M. Dehlinger-Kremer, T. P. Kemmer, A. L. Christian, B. V. L. Potter, I. Schulz, *J. Membr. Biol.* **1989**, *109*, 173–186.
- [462] M. Wakui, B. V. L. Potter, O. H. Petersen, *Nature (London)* **1989**, *339*, 317–320.
- [463] C. H. Petersen, E. C. Toescu, B. V. L. Potter, O. H. Petersen, *FEBS Lett.* **1991**, *293*, 179–182.
- [464] F. S. Menniti, G. S. J. Bird, H. Takemura, O. Thastrup, B. V. L. Potter, J. W. Putney, Jr., *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 13646–13653.
- [465] C. Valdivia, H. H. Valdivia, B. V. L. Potter, R. Coronado, *Biophys. J.* **1990**, *57*, 1233–1243.
- [466] L. Changya, D. V. Gallacher, R. F. Irvine, B. V. L. Potter, O. H. Petersen, *J. Membr. Biol.* **1989**, *109*, 85–93.
- [467] M. J. Berridge, P. H. Cobbold, K. S. R. Cuthbertson, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, *320*, 325–343.
- [468] O. H. Petersen, *J. Physiol. (London)* **1992**, *448*, 1–51.
- [469] R. Payne, B. V. L. Potter, *J. Gen. Physiol.* **1991**, *97*, 1165–1186.
- [470] J. E. Ferguson, B. V. L. Potter, R. Nuccitelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *172*, 229–236.
- [471] S. DeLisle, M. J. Welsh, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 7963–7966.
- [472] J. D. Lechleiter, D. E. Clapham, *Cell* **1992**, *69*, 283–294.
- [473] D. Clapham, S. Girard, *Science* **1993**, *260*, 229–232.
- [474] T. Whalley, A. McDougall, I. Crossley, K. Swann, M. Whitaker, *Mol. Biol. Cell* **1992**, *3*, 373–383.
- [475] R. J. H. Wojcikiewicz, A. M. Cooke, B. V. L. Potter, S. R. Nahorski, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 459–467.
- [476] C. W. Taylor, B. V. L. Potter, *Biochem. J.* **1990**, *266*, 189–194.
- [477] M. McCarren, B. V. L. Potter, R. Miller, *Neuron* **1989**, *3*, 461–471.
- [478] C. Valdivia, D. Vaughan, B. V. L. Potter, R. Coronado, *Biophys. J.* **1992**, *61*, 1184–1193.
- [479] A. Strunecka, E. Kmoneckova, N. El Desouki, L. Krpejsova, J. Palacek, B. V. L. Potter, *Receptor* **1991**, *1*, 141–153.
- [480] R. Gigg, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *26*, 287–404.
- [481] J. G. Ward, R. C. Young, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6013–6016.
- [482] R. C. Young, C. P. Downes, D. S. Eggleston, M. Jones, C. H. Macphee, K. K. Rana, J. G. Ward, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 641–646.
- [483] V. N. Krylova, N. P. Gornaeva, V. I. Shvets, R. P. Evstigneeva, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1979**, *246*, 339.
- [484] V. N. Krylova, A. I. Lyutik, N. P. Gornaeva, V. I. Shvets, *Zh. Obshch. Khim.* **1981**, *51*, 210.
- [485] A. E. Stepanov, V. I. Shvets, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, *41*, 1–51.
- [486] J. R. Falck, A. Abdali in *Inositol Phosphates and Derivatives – Synthesis, Biochemistry and Therapeutic Potential* (Hrsg.: A. B. Reitz), American Chemical Society, Washington, DC, **1991**, S. 145–154.
- [487] Y. Watanabe, H. Hirofumi, S. Ozaki, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 123–124.
- [488] A. P. Kozikowski, W. Tückmantel, G. Powis, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1408–1410; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1381–1383.
- [489] A. H. Fauq, A. P. Kozikowski, A. Gallegos, G. Powis, *Med. Chem. Res.* **1993**, *3*, 17–23.
- [490] A. P. Kozikowski, G. Powis, A. H. Fauq, W. Tückmantel, A. Gallegos, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 963–971.
- [491] S. P. Seitz, R. F. Kaltenbach, R. H. Vreekamp, J. C. Calabrese, F. W. Perrella, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 171–174.
- [492] M. A. Alisi, M. Brufani, L. Filocamo, G. Gostoli, S. Maiorana, M. C. Cesta, E. Ferrari, S. Lappa, P. Pageila, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7793–7796.
- [493] C. E. Dreef, C. J. J. Elie, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 955–958.
- [494] S. S. Yang, T. R. Beattie, P. L. Durette, T. F. Gallagher, T. Y. Shen, US-A 4 515 722, **1985**.
- [495] M. S. Shashidhar, J. F. W. Keana, J. J. Volwerk, O. H. Griffith, *Chem. Phys. Lipids* **1990**, *53*, 103–113.
- [496] T. K. Vinod, O. H. Griffith, J. F. W. Keana, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7193–7196.
- [497] M. A. J. Ferguson, A. F. Williams, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 285–320.
- [498] M. G. Low, M. A. J. Ferguson, A. H. Futerman, I. Silman, *Trends Biochem. Sci.* **1986**, *11*, 212–215.
- [499] M. G. Low, *Biochem. J.* **1987**, *244*, 1–13.
- [500] M. G. Low, A. R. Saltiel, *Science* **1988**, *239*, 268–275.
- [501] T. L. Doering, W. J. Masterson, G. W. Hart, P. T. Englund, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 611–614.
- [502] W. L. Roberts, S. Santikarn, V. N. Reinhold, T. L. Rosenberry, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 18776–18784.
- [503] S. W. Homans, M. A. J. Ferguson, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, R. Anand, A. F. Williams, *Nature (London)* **1988**, *333*, 269–272.
- [504] M. A. J. Ferguson, S. W. Homans, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Science* **1988**, *239*, 753–759.
- [505] C. Murakata, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 75–91.
- [506] C. Murakata, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 671–674.
- [507] A. R. Saltiel, D. G. Osterman, J. C. Darnell, L. R. Sorbara-Cazan, B. L. Chan, M. G. Low, P. Cuatrecasas, *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1988**, *320*, 345–358.
- [508] M. P. Czech, J. K. Karlund, K. A. Yagaloff, A. P. Bradford, R. F. Lewis, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11017–11020.
- [509] W. K. Berlin, W. S. Zhang, T. Y. Shen, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1–20.
- [510] A. Zapata, M. Martin-Lomas, *Carbohydr. Res.* **1992**, *234*, 93–106.
- [511] R. Plourde, M. D'Alarcao, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2693–2696.
- [512] R. Verduyn, C. J. J. Elie, C. E. Dreef, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1990**, *109*, 591–593.
- [513] C. J. J. Elie, R. Verduyn, C. E. Dreef, D. M. Broutns, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 8243–8254.