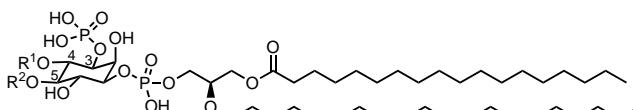


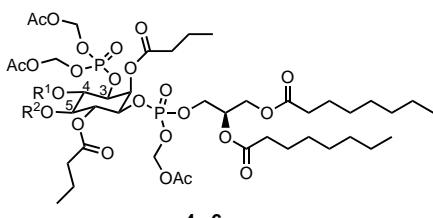
Membranpermeable 3-OH-phosphorylierte Phosphoinositidderivate**

Carlo Dinkel, Mark Moody, Alexis Traynor-Kaplan und Carsten Schultz*

Phosphoinositide, die an der 3-Hydroxygruppe phosphoryliert sind (Schema 1), stellen wichtige Signalmoleküle in eukaryontischen Zellen dar. Sie sind insbesondere an der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von Proteinkinasen und



1-3



4-6

Schema 1. Die Phosphoinositide PtdIns(3,5)P₂ **1**: R¹=H, R²=P(O)(OH)₂; PtdIns(3,4,5)P₃ **2**: R¹=R²=P(O)(OH)₂; PtdIns(3,4)P₂ **3**: R¹=P(O)(OH)₂, R²=H und die korrespondierenden membranpermeablen, bioaktivierbaren Derivate Di-C₈-Bt₃PtdIns(3,5)P₃/AM **4**: R¹=Bt, R²=P(O)(OCH₂OAc)₂; Di-C₈-Bt₂PtdIns(3,4,5)P₃/AM **5**: R¹=R²=P(O)(OCH₂OAc)₂; Di-C₈-Bt₃PtdIns(3,4)P₂/AM **6**: R¹=P(O)(OCH₂OAc)₂, R²=Bt. (Bt=CO₂C₅H₇).

der Kontrolle der intrazellulären Calciumspiegel beteiligt. Das Schlüsselenzym ihrer Biosynthese ist die Phosphoinositid-3-kinase (PI-3-Kinase), die durch Wachstumsfaktoren wie EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet-derived growth factor) aktiviert wird. Den dabei gebildeten 3-OH-phosphorylierten Phosphoinositiden wurden zahlreiche Botenstofffunktionen zugewiesen, so bei den Mechanismen der Onkogentransformation, der Cytoskelettveränderungen, der Translokation von Proteinen an die Plasmamembran, der Proteinsortierung, der Endo- und Exozytose, der Glucoseauf-

[*] Dr. C. Schultz

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2436

E-mail: carsten.schultz@mpi-dortmund.mpg.de

Dipl.-Chem. C. Dinkel
Institut für Organische Chemie, Universität Bremen, UFT
Leobener Straße, 28359 Bremen (Deutschland)

M. Moody, Prof. Dr. A. Traynor-Kaplan
Inologic Inc.
3005, 1st Ave., Ste. 300, Seattle, WA 98121 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, vom Fonds der Chemischen Industrie sowie in den USA von den National Institutes of Health (SBIR NIH #R44 DK 52733-02) und der Cystic Fibrosis Foundation gefördert.

nahme in Fettzellen und der Regulation des epithelialen Chloridtransports.^[1, 2] Obwohl üblicherweise mehr als ein 3-OH-phosphoryliertes Phosphoinositid in Zellen gefunden wird, entspringen die meisten von ihnen dem gleichen Biosyntheseweg.^[1] PtdIns(3,5)P₂ scheint vorwiegend in Hefe vorzukommen und in geringerem Maße in Säugerzellen. Wegen seiner wenig erforschten Funktion ist dieses Isomer besonders interessant für biologische Untersuchungen.^[3]

Welches Phosphoinositid also verbindet die Besetzung des Wachstumsfaktorrezeptors mit einer gegebenen physiologischen Antwort, in unserem Fall mit der bei der tödlichen Erbkrankheit Mukoviszidose wesentlichen Chloridsekretion humaner Epithelzellen (Abbildung 1)? Um diese Frage

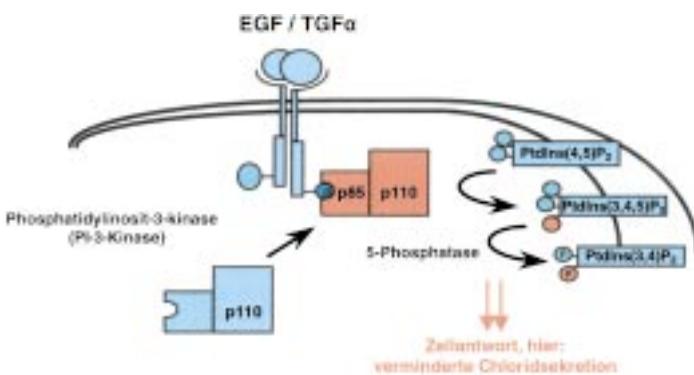


Abbildung 1. Ausschnitt aus dem Wachstumsfaktor-stimulierten Signalweg: EGF oder TGF α aktivieren Rezeptortyrosinkinasen, was zu einer Translokation der PI-3-Kinase vom Cytosol zur Plasmamembran führt. Hier phosphoryliert der heterodimere Enzymkomplex p85/p110 Phosphoinositide an der 3-Hydroxygruppe. Welches der 3-OH-phosphorylierten Produkte vermittelt das Signal, das schließlich zur Zellantwort führt?

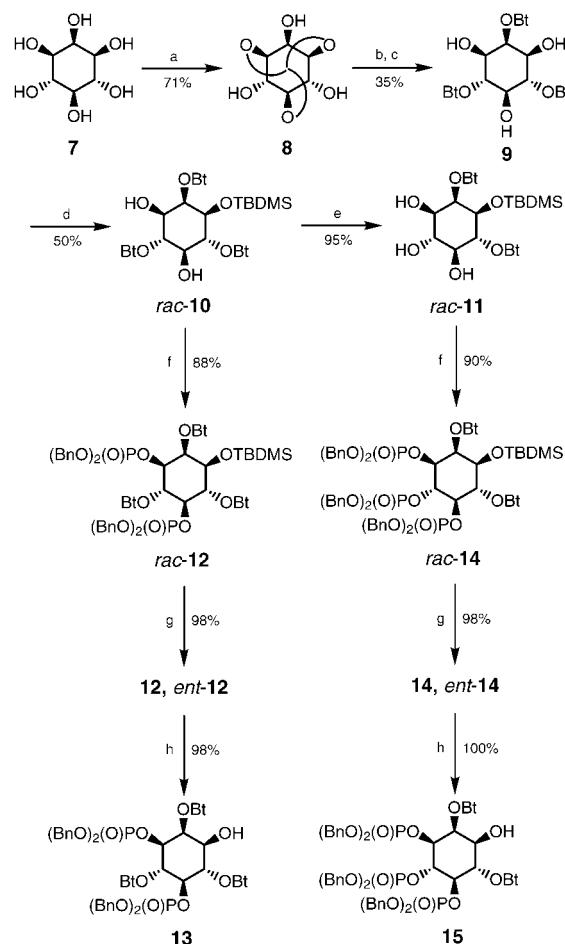
beantworten zu können, haben wir membranpermeable Derivate von drei der natürlich vorkommenden 3-OH-phosphorylierten Phosphoinositide, nämlich Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat PtdIns(3,5)P₂ **1**, das Trisphosphat PtdIns(3,4,5)P₃ **2** und seinen direkten Metaboliten PtdIns(3,4)P₂ **3** synthetisiert (Schema 1). Membranpermeable Derivate von Inositolphosphaten und Phosphoinositiden sind als nützliche Werkzeuge bekannt, mit denen man intrazelluläre Signale simulieren kann, ohne bei der Verabreichung die Plasmamembran zu verletzen.^[2, 4, 5] Die bisher verwendeten membranpermeablen PtdIns(3,4,5)P₃-Derivate waren nicht oder nur teilweise mit Buttersäureestern zum Maskieren der Hydroxygruppen versehen.^[2] Diese sind allerdings sehr nützlich, verhindert ihre langsamere enzymatische Hydrolyse doch eine intramolekulare Phosphatwanderung^[5] während der enzymatischen Spaltung der Acetoxymethylester, mit denen die Phosphatgruppen versehen sind. Dies ist bei den Bisphosphaten **1** und **3** besonders wichtig, da beide Isomere ansonsten leicht ineinander umwandelbar sind. Extrazelluläre Gabe der Verbindungen sollte intrazellulär vorwiegend die Konzentration eines einzelnen Phosphoinositids erhöhen, eine wichtige Voraussetzung, wenn man kurzfristige physiologische Antworten der Zelle untersuchen möchte. In den vorliegenden Experimenten haben wir die inhibitorische Wirkung von EGF und drei Phosphoinositidderivaten auf

die transepitheliale Chloridsekretion humaner Nasenepitheli von Patienten untersucht, die an Mukoviszidose (cystic fibrosis, CF) leiden. Es ist zunehmend wichtiger, die Wachstumsfaktor-vermittelte Signalübertragung im Falle der Mukoviszidose zu verstehen, da neuere Studien zeigen, dass die Wachstumsfaktorspiegel im Lungengewebe von Mukoviszidosepatienten stark erhöht sind.^[6]

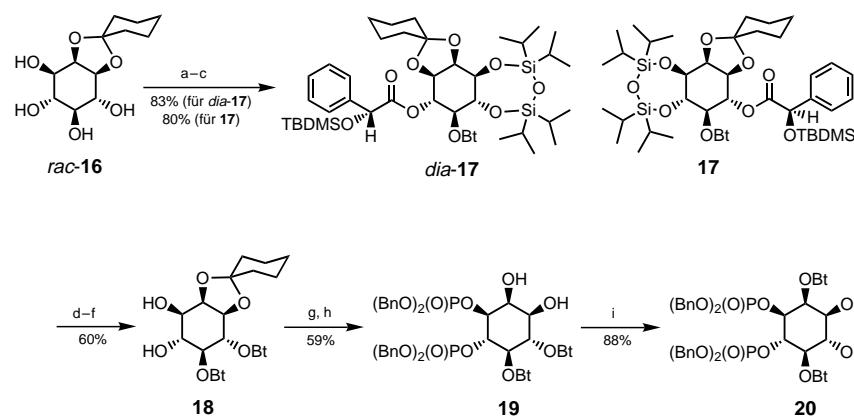
Wie bei der Mehrzahl der Inosithophosphatsynthesen begannen unsere Synthesen ebenfalls mit dem *myo*-Inositol 7. Zunächst wurde das Tributyrat 9 in drei Stufen über einen Orthoester hergestellt.^[7] Monosilylierung der reaktiveren 1-/3-Hydroxygruppen ergab das Racemat **rac-10**, welches als Vorstufe zur Synthese der PtdIns(3,4,5)P₃- und PtdIns(3,5)P₂-Derivate diente (Schema 2). Phosphitylierung von **rac-10** und anschließende Oxidation der Phosphorigsäuretriester^[8] lieferte das vollständig geschützte Inositol-3,5-bisphosphatderivat **rac-12**. Die Enantiomere wurden mittels präparativer HPLC an chiraler Phase (50 × 250 mm, Chiradex, Merck) getrennt.^[9] Die anschließende Abspaltung der Silylschutzgruppe mit Triethylamintrihydrofluorid führte zu den Alkoholen **13** und **ent-13**.

Für die Synthese der 3,4,5-phosphorylierten Vorstufe musste regioselektiv der sterisch am wenigsten gehinderte Butyratrest gespalten werden. Wir entdeckten, dass Schweineleberesterase und die Lipase von *Candida cylindracea* den Butyratrest an der 4-OH-Gruppe von **rac-10** in fast quantitativer Ausbeute hydrolysierten, leider ohne Enantiomerselektivität.^[10] Der so gebildete Diester **rac-11** wurde phosphoryliert, und die Enantiomere **14** und **ent-14** wurden anschließend ebenfalls mittels HPLC an chiraler Phase getrennt. Entschützen ergab die für die Lipidkopplung geeigneten 1- bzw. 3-Hydroxyverbindungen **15** und **ent-15**.

Erste Versuche, eine enantiomerenreine Vorstufe für das gewünschte PtdIns(3,4)P₂-Derivat **6** herzustellen, scheiterten daran, dass sich das zu den anderen Vorstufen analoge, vollständig geschützte Inositol-3,4-bisphosphat auf der chiralen HPLC-Phase nicht in seine Enantiomere trennen ließ. Dies deutet auf den essentiellen Charakter der 5-Position des Inosittrings bei der molekularen Erkennung durch die chirale β -Cyclodextrinphase hin. Als Alternative entwickelten wir ausgehend vom Monoketal **rac-16** eine einfache Dreistufen-Eintopf-Reaktion zu den diastereomeren Mandelsäureestern **17** und **dia-17**^[11] (Schema 3). Die Trennung der Diastereomere an Kieselgel erfolgte mit überraschend hohen Ausbeuten (83 bzw. 80 %). Das chirale Auxiliar wurde nachfolgend gegen einen Butyratrest ausgetauscht. Die anschließende Desilylierung ergab das Dibutyrat **18**, welches phosphoryliert wurde. Nach der Spaltung des Cyclohexylidenkets musste der dritte Butyratrest regioselektiv an der axialen 2-Hydroxygruppe des Diols **19** eingeführt werden. Dies gelang über die Bildung eines intermediären Orthobutyrates.^[12] Dessen spontane Hydrolyse beim Rühren in wässrigem Methanol lieferte hochselektiv das 1-Hydroxyderivat **20** in 88 % Ausbeute.



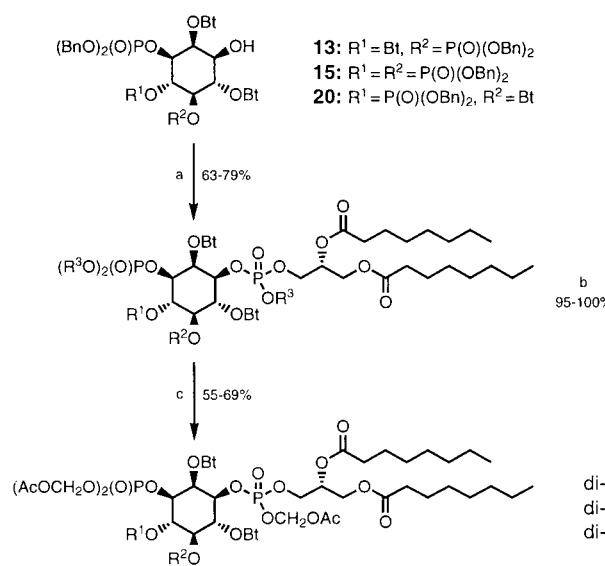
Schema 2. a) $\text{HC}(\text{OMe})_3$, PTS, DMF, 120°C , 18 h; b) Bt_2O , DMAP, Pyridin, 25°C , 18 h; c) TFA, H_2O , MeOH, 25°C , 8 h; d) TBDMS-Cl , Imidazol, DMF, 25°C , 4 d; e) Lipase aus *Candida cylindracea*, 0.1 M Phosphatpuffer (pH 8), MeOH, 25°C , 5 d; f) $(\text{BnO})_2\text{P}(\text{NPr}_2)_2$, Tetrazol, MeCN, 25°C , 3 d, anschließend MeCO_3H (32 %), $-30 \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 1 h; g) Enantiomerentrennung an Chiradex (Merck), Eluent: 100 % MeCN; h) $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$, MeCN, 25°C , 3 d. PTS = *p*-Toluolsulfonsäure, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TFA = Trifluoressigsäure, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, Bn = Benzyl.



Schema 3. a) TIPDS-Cl₂, Pyridin, 25°C , 3 d; b) $(-)$ -2-*O*-TBDMS-Mandelsäurechlorid, Pyridin, $-20 \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 1 d; c) Bt_2O , DMAP, Pyridin, 80°C , 5 d, Diastereomerentrennung an Kieselgel, Petrolether(55–62 °C):EtOAc 25:1, anschließend 10:1; d) MeNH_2 , EtOH, H_2O , 25°C , 2 h; e) Bt_2O , DMAP, Pyridin, $25 \rightarrow 60^\circ\text{C}$; f) TBAF (5 Äquiv.), TBME, 25°C , 2 h; g) $(\text{BnO})_2\text{P}(\text{NPr}_2)_2$, Tetrazol, MeCN, 25°C , 3 d, anschließend MeCO_3H (32 %), $-30 \rightarrow 25^\circ\text{C}$, 1 h; h) TFA, MeOH, 25°C , 1 h; i) $\text{MeCH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{OMe})_3$, PTS, 25°C , 2 h, anschließend MeOH , H_2O , 25°C , 18 h. TIPDS-Cl₂ = 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TBME = *tert*-Butylmethylether.

Die abschließenden Schritte sind in Schema 4 dargestellt: die Alkohole **13**, **15** und **20** wurden mit dem enantiomerenreinen Phosphoramidit **21**^[13] gekuppelt. Die anschließende Oxidation mit Peressigsäure lieferte die vollständig geschützten Phosphoinositidderivate **22–24**. Das Entfernen der Benzylgruppen durch Hydrogenolyse und die Alkylierung der freien Phosphatreste mit Acetoxymethylbromid^[14] führte zu den membranpermeablen Phosphoinositidderivaten **4–6** als R_{Pi}/S_{Pi} -Diastereomerenpaare in 5–15 % Gesamtausbeute. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurden die enantiomerenreinen Zwischenstufen *ent*-**13**, **15** und **17** in literaturbekannte *myo*-Inositderivate überführt (siehe *Experimentelles*).

Für membranpermeable Derivate von Inositphosphaten und Phosphoinositiden wurde gezeigt, dass die bioaktivierbaren Modifikationen der Hydroxy- und Phosphatgruppen die Diffusion der Verbindungen durch die Plasmamembran von lebenden Zellen erlauben, dass die hochgeladenen Mutterverbindungen intrazellulär gebildet werden und dass die biologische Aktivität der Botenstoffe gemessen werden kann.^[2, 4, 5] Die Phosphoinositidderivate **4–6** erlauben uns nun erstmals, zu unterscheiden, ob PtdIns(3,4,5)P₃ oder sein Metabolit PtdIns(3,4)P₂ die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren steuert (Abbildung 1). Letzteres ist von besonderem Interesse bei der Mukoviszidose. Bei dieser tödlichen Erbkrankheit ist aufgrund einer Punktmutation im cAMP-regulierten apicalen Chloridkanal die Chloridsekretion der Epithelzellen stark eingeschränkt.^[15] Um die dadurch ausgelösten pathologischen Symptome zu verhindern, wird unter anderem die Aktivierung alternativer Chloridkanäle, insbesondere Calcium-regulierter, als therapeutisches Target diskutiert.^[16] Allerdings werden diese Kanäle durch verschiedene externe Signale herunterreguliert, darunter auch durch Wachstumsfaktoren.^[2, 17] Diese findet man insbesondere im infektiösen Lungengewebe von Mukoviszidosepatienten, und der Verdacht liegt nahe, dass Wachstumsfaktoren die Chloridsekretion durch Calcium-aktivierte Chloridkanäle zusätzlich verringern.^[6]



Schema 4. a) **21**, Tetrazol, CH_2Cl_2 , $25^\circ C$, 3 d, anschließend $MeCO_3H$ (32 %), $-30 \rightarrow 25^\circ C$, 1 h; b) H_2 (1 atm), $Pd(C)$, $MeCO_2H$, $25^\circ C$, 1 d; c) $AcOCH_2Br$, iPr_2NEt , $MeCN$, $25^\circ C$, 3 d.

Hier zeigen wir, dass EGF (epidermal growth factor) die durch ATP ausgelöste, Calcium-aktivierte Chloridsekretion in Nasenepithelen von Mukoviszidosepatienten herunterreguliert. Wenn die Zellen mit $200 \mu M$ Di-C₈-Bt₂PtdIns(3,4,5)P₃/AM **5** vorinkubiert wurden, konnte der negative Effekt von EGF auf die Chloridsekretion simuliert werden (Abbildung 2). Zellen, die mit $200 \mu M$ des korrespondierenden 3,5-Bisphosphats **4** vorinkubiert wurden, zeigten diesen Effekt

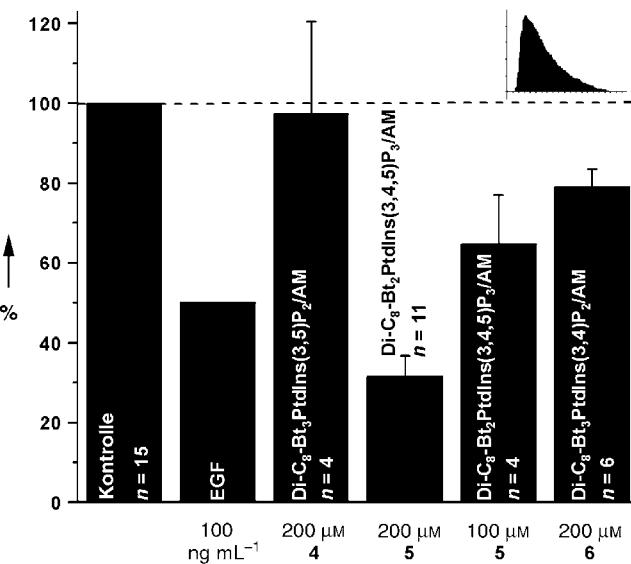


Abbildung 2. Effekt der membranpermeablen Phosphoinositidderivate **4–6** auf die ATP-stimulierte Chloridsekretion, gemessen als Kurzschlussstrom I_{SC} (short-circuit current), an kultivierten nasalen Epithelzellen eines Mukoviszidose-Patienten: Prozentanteil verglichen mit Kontrollexperimenten nach Integration des transienten Signals (siehe Graph oben rechts).

nicht. Das 3,4-Bisphosphat **6** zeigte einen sehr schwachen inhibitorischen Effekt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass vorwiegend PtdIns(3,4,5)P₃ **2** und nicht sein Metabolit **3** an der intrazellulären Übertragung des Wachstumsfaktorsi-

gnals beteiligt ist. Damit kann man PtdIns(3,4,5)P₃-bindende Proteine als herausragende Zielproteine für die Entwicklung von Therapeutika gegen Mukoviszidose ansehen. Insbesondere PtdIns(3,4,5)P₃-Antagonisten sollten in Zukunft von Bedeutung sein.

Experimentelles

Herkunft der nasalen Epithelzellen: Nasales Epithelgewebe von Mukoviszidosepatienten wurde vom Children's Hospital in Seattle, USA, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden für bis zu vier Passagen in Kultur gehalten und anschließend auf durchlässigen Membranen zur Konfluenz wachsen gelassen.

Ionentransportmessungen: Chloridsekretion wurde als Veränderung des Kurzschlussstroms (short-circuit current, I_{SC}) gemessen, nachdem die konfluenten Zellen wie zuvor beschrieben in Ussing-Kammern eingesetzt wurden.^[18] Calcium-vermittelte, transiente Erhöhungen der Chloridsekretion wurden durch Zugabe von 100 μ M ATP zur apicalen Seite der Einzelzellschicht ausgelöst.

Transport der Phosphoinositide ins Cytosol: Die Epithelzellen wurden mit den membranpermeablen Derivaten **4**–**6** 45 min vor dem Einsetzen in die Ussing-Kammer inkubiert. Zuvor konnte gezeigt werden, dass Butyrylgruppen und Acetoxymethylester recht rasch im Cytosol gespalten wurden, während die Verbindungen im extrazellulären Medium stabil waren.^[4]

Ausgewählte physikalische Daten von **5 (R_{P1}/S_{P1}-Diastereomerenpaar):** ¹H-NMR (600 MHz, [D₈]Toluol, 20 °C): δ = 0.793 (t, J = 7.4 Hz, 3H; CH₃), 0.804 (t, J = 7.6 Hz, 3H; CH₃), 0.817 (t, J = 7.3 Hz, 3H; CH₃), 0.820 (t, J = 7.1 Hz, 3H; CH₃), 0.822 (t, J = 7.1 Hz, 6H; 2 \times CH₃), 1.050 (t, J = 7.5 Hz, 3H; CH₃), 1.097 (t, J = 7.5 Hz, 3H; CH₃), 1.087–1.232 (m, 32H; 16 \times CH₂), 1.444–1.594 (m, 12H; 6 \times β -CH₂), 1.732 (s, 3H; Ac), 1.741 (s, 3H; Ac), 1.767 (s, 3H; Ac), 1.768 (s, 3H; Ac), 1.779 (s, 3H; Ac), 1.780 (s, 3H; Ac), 1.782 (s, 3H; Ac), 1.784 (s, 3H; Ac), 1.800 (s, 3H; Ac), 1.875–2.009 (m, 4H; 2 \times β -CH₂), 1.826 (s, 3H; Ac), 1.830 (s, 3H; Ac), 1.836 (s, 3H; Ac), 1.881 (s, 3H; Ac), 1.961 (s, 3H; Ac), 2.040–2.323 (m, 12H; 2 \times α -CH₂), 2.664 (ddd, J = 17.5 Hz, 8.1 Hz, 7.3 Hz, 1H; α -CH₂), 2.723 (ddd, J = 17.6 Hz, 7.8 Hz, 7.5 Hz, 1H; α -CH₂), 2.732 (ddd, J = 17.5 Hz, 8.2 Hz, 7.2 Hz, 1H; α -CH₂), 2.779 (ddd, J = 17.6 Hz, 8.3 Hz, 7.2 Hz, 1H; α -CH₂), 4.165 (dd, J = 12.1 Hz, 6.2 Hz, 1H, H_y-sn1), 4.178 (ddd, J = 11.1 Hz, 7.7 Hz, 5.8 Hz, 1H; H_y-sn3), 4.315 (ddd, J = 11.3 Hz, 7.1 Hz, 4.3 Hz, 1H; H_x-sn3), 4.333 (dd, J = 12.2 Hz, 6.4 Hz, 1H; H_x-sn1), 4.390 (dd, J = 6.8 Hz, 5.2 Hz, 2H; 2 \times H_x-sn3), 4.407 (dd, J = 12.3 Hz, 3.8 Hz, 1H; H_y-sn1), 4.510 (dd, J = 12.3 Hz, 3.6 Hz, 1H; H_x-sn1), 4.853 (ddd, J = 9.5 Hz, 9.5 Hz, 4.7 Hz, 1H; H-5), 4.868 (ddd, J = 9.6 Hz, 9.6 Hz, 4.7 Hz, 1H; H-5), 4.911–5.013 (m, 4H; H_x-1, H_y-1, H_x-3, H_y-3), 5.089 (ddd, J = 9.7 Hz, 9.7 Hz, 9.7 Hz, 1H; H-4), 5.105 (ddd, J = 9.6 Hz, 9.6 Hz, 9.6 Hz, 1H; H-4), 5.326 (ddd, J = 5.7 Hz, 5.7 Hz, 4.2 Hz, 4.2 Hz, 1H; H_y-sn2), 5.460 (ddd, J = 6.2 Hz, 5.2 Hz, 5.2 Hz, 3.8 Hz, 1H; H_x-sn2), 5.571 (dd, J = 11.6 Hz, 5.3 Hz, 1H, H-6), 5.593 (dd, J = 11.3 Hz, 5.4 Hz, 1H; H-6), 5.625 (dAB, J = 5.5 Hz, δ _A = 5.614, δ _B = 5.636, J_{AB} = 7.2 Hz, 2H; OCH₂O (P-1)), 5.647 (dAB, J = 5.5 Hz, δ _A = 5.635, δ _B = 5.659, J_{AB} = 8.0 Hz, 2H; OCH₂O (P-1)), 5.742–5.896 (m, 24H; 12 \times OCH₂O), 6.207 (dd, J = 2.9 Hz, 2.9 Hz, 2H; H_x-2, H_y-2); ¹³C-NMR (150 MHz, [D₈]Toluol, 20 °C): δ = 13.61, 13.64, 13.94, 14.03, 14.38, 18.26, 18.34, 18.81, 20.22, 20.31, 23.15, 25.31, 29.54, 29.57, 32.22, 34.12, 34.18, 34.27, 34.36, 35.77, 35.81, 35.93, 36.07, 62.02, 62.29, 66.67, 69.58, 69.82, 70.03, 70.20, 73.72, 76.67, 76.98, 82.95, 83.06, 83.16, 83.47, 83.54, 168.85, 168.00, 169.17, 169.25, 169.32, 169.53, 172.14, 172.27, 172.57, 172.69, 172.90, 172.98, 173.08; ³¹P-NMR (81 MHz, [D₈]Toluol, 20 °C): δ = -1.30 (s, 1P), -2.10 (s, 1P), -2.84 (s, 1P), -2.86 (s, 1P), -3.13 (s, 2P), -3.77 (s, 2P); MS (DCI): *m/z*: 1397 [M - CH₂OAc]⁻, 1143 [M - C₁₉H₃₅O₄]⁻; HR-MS (DCI, *R* = 5000) für [M - CH₂OAc]⁻: ber. 1397.37720, gef. bestätigt (± 10 ppm).

Bestimmung der absoluten Konfiguration: **4**: *ent-13* wurde durch komplettes Entschützen (Hydrogenolyse und Esterverseifung) in das bekannte *myo*-Inositol-1,5-bisphosphat^[19] überführt. ([α]_D²⁰ = +9.8°, *c* = 0.5 in H₂O; Lit. [19]: [α]_D = +6.0°, *c* = 0.5 in H₂O). **5**: **15** wurde durch Phosphorylierung der 1-Hydroxygruppe und komplettes Entschützen in *myo*-Inositol-1,3,4,5-tetrakisphosphat^[20] überführt. ([α]_D²⁰ = -3.2°, *c* = 1 in H₂O; Lit. [20]: [α]_D²⁵ = -2.5°, *c* = 1 in H₂O). **6**: **17** wurde desacyliert und desilyliert, um

das bekannte 1,2-*O*-Cyclohexyliden-*myo*-inosit zu bilden. ([α]_D²⁵ = -33.8°, *c* = 1.0 in MeOH; Lit. [21]: [α]_D²² = -36.0°, *c* = 1.05 in MeOH, 96 % ee).

Eingegangen am 29. Januar 2001,
ergänzte Fassung am 21. Mai 2001 [Z 16521]

- [1] L. E. Rameh, L. C. Cantley, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8347–8350.
- [2] L. Eckmann, M. T. Rudolf, A. Ptaszniak, C. Schultz, T. Jiang, N. Wolfson, R. Y. Tsien, J. Fierer, S. B. Shears, M. F. Kagnoff, A. E. Traynor-Kaplan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14456–14460; T. Jiang, G. Sweetney, M. T. Rudolf, A. Klip, A. E. Traynor-Kaplan, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11017–11024.
- [3] S. K. Dove, F. T. Cooke, M. R. Douglas, L. G. Sayers, P. J. Parker, R. H. Michell, *Nature* **1997**, *390*, 187–192; G. D. Gary, A. E. Wurmser, C. J. Bonangelino, L. S. Weisman, S. Emr, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 65–79; R. K. McEwen, S. K. Dove, F. T. Cooke, G. F. Painter, A. B. Holmes, A. Shisheva, Y. Ohya, P. J. Parker, R. H. Michell, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33905–33912.
- [4] M. Vajanaphanich, C. Schultz, M. T. Rudolf, M. Wasserman, P. Enyedi, A. Craxton, S. B. Shears, R. Y. Tsien, K. E. Barrett, A. E. Traynor-Kaplan, *Nature* **1994**, *371*, 711–714; „Phosphoinositides: Chemistry, Biochemistry and Biomedical Applications“: C. Schultz, M. T. Rudolf, H. H. Gillandt, A. E. Traynor-Kaplan, *ACS Symp. Ser.* **1999**, *718*, 232–243; M. A. Carew, X. Yang, C. Schultz, S. B. Shears, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26906–26913.
- [5] W. Li, C. Schultz, J. Llopis, R. Y. Tsien, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12017–12040.
- [6] W. D. Hardie, P. A. Bejarano, M. A. Miller, J. R. Yankaskas, J. H. Ritter, J. A. Whitsett, *Pediatr. Dev. Pathol.* **1999**, *2*, 415–423.
- [7] H. W. Lee, Y. Kishi, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4402–4404.
- [8] K. L. Yu, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 979–982.
- [9] A. Burmester, B. Jastorff, *J. Chromatogr. A* **1996**, *749*, 25–32.
- [10] Für ein weiteres wichtiges Beispiel chemoenzymatischer Entschützung bei Inositolphosphatsynthesen siehe: G. Baudin, B. I. Glänzer, K. S. Swaminathan, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1367–1378.
- [11] Y. Watanabe, M. Mitani, T. Morita, S. Ozaki, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 482–483; Y. Watanabe, M. Nakatomi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1583–1586.
- [12] S.-K. Chung, Y.-T. Chang, K.-H. Sohn, *Korean J. Med. Chem.* **1994**, *4*, 57–65.
- [13] **20** wurde synthetisiert gemäß: S. F. Martin, J. A. Josey, Y.-L. Wong, D. W. Dean, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4805–4820; W. Bannwarth, A. Trzeciak, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 175–186; K. K. Reddy, M. Saady, J. R. Falck, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3385–3390.
- [14] S. Roemer, C. Stadler, M. T. Rudolf, B. Jastorff, C. Schultz, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1996**, 1683–1694.
- [15] J. Pilewski, R. Frizzell, *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S215–S255, Supplement.
- [16] E. J. Thomas, S. E. Gabriel, M. Makhлина, S. P. Hardy, M. I. Lethem, *Am. J. Physiol.* **2000**, *279*, C1578–C1586.
- [17] J. M. Uribe, S. J. Keely, A. E. Traynor-Kaplan, K. E. Barrett, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26588–26595.
- [18] T. Jiang, G. Sweeney, M. T. Rudolph, A. Klip, A. E. Traynor-Kaplan, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 11017–11024.
- [19] P. Westerduin, H. A. M. Willems, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6915–6918.
- [20] G. Baudin, B. I. Glänzer, K. S. Swaminathan, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1367.
- [21] L. Ling, S. Ozaki, *Carbohydr. Res.* **1994**, *256*, 49–58.