

Semisynthese eines Glycosylphosphatidylinositol-verankerten Prionproteins**

Christian F. W. Becker,* Xinyu Liu, Diana Olschewski, Riccardo Castelli, Ralf Seidel und Peter H. Seeberger*

Viele Proteine werden durch Glycosylierungen und Lipidierungen posttranslational modifiziert.^[1] Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker vereinigen diese beiden Arten der Modifikation und sind für die Verankerung einer Vielzahl von Proteinen an der Zelloberfläche verantwortlich.^[2] Die Fortschritte bei der Festphasensynthese von Peptiden und bei der rekombinanten Herstellung von Proteinen haben, in Kombination mit der nativen chemischen Ligation (NCL) und der Ligation exprimierter Proteine (EPL), zur Total- und Semisynthese einer Vielzahl von Proteinen geführt.^[3] Diese Methoden vereinfachen den Zugang zu homogenen Präparationen von Lipo- und Glycoproteinen, die anschließend als definierte molekulare Sonden zur gezielten Untersuchung der Auswirkungen von Glycosylierung und Lipidierung auf die biophysikalischen Eigenschaften von Proteinen eingesetzt werden können.^[4] Ferner eignen sich synthetische GPI-Glycane und lipidierte GPI-Anker^[5] gut zur Untersuchung der biologischen Relevanz entsprechender natürlicher Konjugate dieser Verbindungen bei Stoffwechselerkrankungen sowie bei Infektionskrankheiten.^[6] Die bisherigen Ansätze

zur Synthese chemisch definierter GPI-verankerter Proteine basierten auf Modellstudien; bislang ist noch kein synthetisches GPI-verankertes Protein beschrieben worden.^[7,8]

Ein bedeutendes Mitglied der Klasse der GPI-verankerten Proteine ist das Prionprotein (PrP).^[9] Viele Studien zeigen den starken Einfluss der Membranverankerung des Proteins über den GPI-Anker auf die Umwandlung des zellulären PrP (PrP^C) in seine pathogene Isoform PrP scrapie (PrP^{Sc}). Allerdings ist der mögliche Einfluss der GPI-Verankerung auf die Pathogenität von PrP umstritten.^[10] Da die Isolierung von homogenem GPI-verankertem PrP bislang nicht möglich war, wurden die meisten In-vitro-Studien zur Funktion, Faltung, Struktur und Stabilität entweder mit rekombinantem PrP ohne GPI-Anker, PrP mit einfachen GPI-Mimetika oder heterogenen PrP-Präparationen aus Säugetierzelllinien vorgenommen.^[11] Aus diesem Grund konnten bis jetzt auch noch keine eindeutigen Aussagen zur Funktion des GPI-Ankers getroffen werden. Entsprechende Untersuchungen könnten mit chemisch synthetisiertem homogenem GPI-verankertem Protein durchgeführt werden. Hier stellen wir die Entwicklung einer generellen Strategie zur Synthese von homogenen GPI-verankerten Proteinen am Beispiel des Prionproteins vor.

Unsere Strategie beruht auf der Konstruktion definierter GPI-verankerter Proteine unter Verwendung der EPL. Dabei reagiert ein synthetischer GPI-Anker **2**, ausgestattet mit einem Cysteinrest an der 2-Aminoethylphosphatgruppe, in einer Ligation mit Peptiden oder Proteinen mit einem C-terminalen Ca-Thioester, um so die Synthese von GPI-verankerten Proteinen (**1**) zu ermöglichen (Schema 1). Zur Synthese solcher Cystein-modifizierten GPI-Anker gibt es mehrere Möglichkeiten. So wäre die direkte Kupplung eines Cysteinmoleküls an einen nativen GPI-Anker über eine Amidbindung möglich, allerdings erschweren die amphiphilen Eigenschaften nativer GPI-Anker sowie die Instabilität von Lipidestern unter basischen Bedingungen diesen Ansatz. Der Einbau eines geschützten Cysteinrestes in den GPI-Anker vor der globalen Entschützung ist hier zu bevorzugen. Dabei wird der Cystein-Ethanolamin-Phosphatrest in das Glycanrückgrat in der letzten Stufe der GPI-Synthese eingebaut. Die Thiol- und Aminogruppe des Cysteinrestes sind mit säurelabilen Gruppen wie *tert*-Butyl oder *tert*-Butoxycarbonyl (z.B. in **3**) geschützt. Die Benzylschutzgruppen lassen sich durch Hydrogenolyse abspalten. Durch die anschließende Umsetzung mit Säure wird der Cysteinrest entschützt und somit der Cystein-modifizierte GPI-Anker **2** erhalten.

Zwei geplante Schlüsselreaktionen mussten vor der eigentlichen Synthese eingehend untersucht werden: Der

[*] Prof. Dr. C. F. W. Becker,^{[+],[#]} Dr. D. Olschewski, Dr. R. Seidel
Abteilung Physikalische Biochemie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: christian.becker@ch.tum.de
Homepage: <http://www.ch.tum.de/proteinchemie>
Dr. X. Liu,^[#] R. Castelli, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Laboratorium für Organische Chemie
ETH Zürich
Wolfgang-Pauli Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
Fax: (+41) 44-633-1235
E-Mail: seeberger@org.chem.ethz.ch
Homepage: www.seeberger.ethz.ch
und
Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Fax: (+49) 89-289-13345

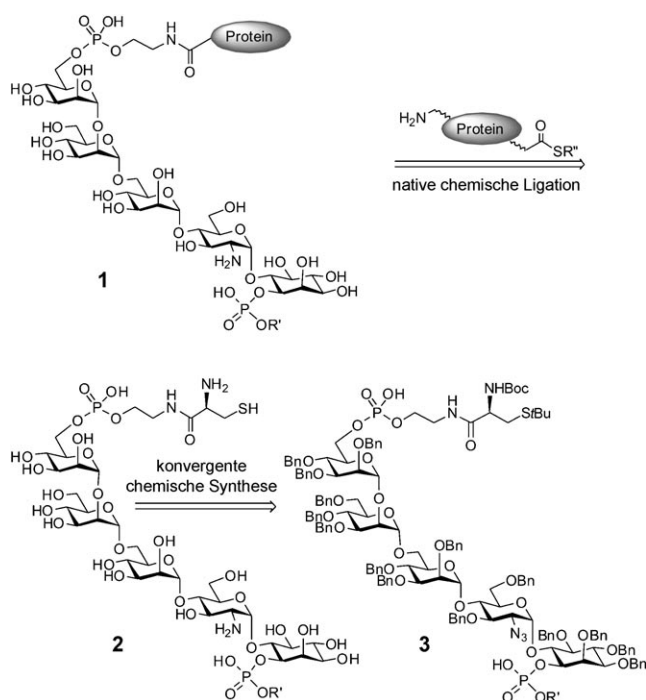
[+] Derzeitige Adresse: TU München, Department Chemie, AG Proteinchemie, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

[#] Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Fax: (+49) 89-289-13345

[#] Derzeitige Adresse: Harvard Medical School, Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology, 240 Longwood Avenue, Boston, MA, 02115 (USA)

[**] Für finanzielle Unterstützung danken wir der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der chemischen Industrie, dem Schweizerischen Nationalfonds (SNF-Fördernummer 205321-107651) und der ETH Zürich. Wir danken J. Tatzelt und M. Engelhard für hilfreiche Diskussionen.

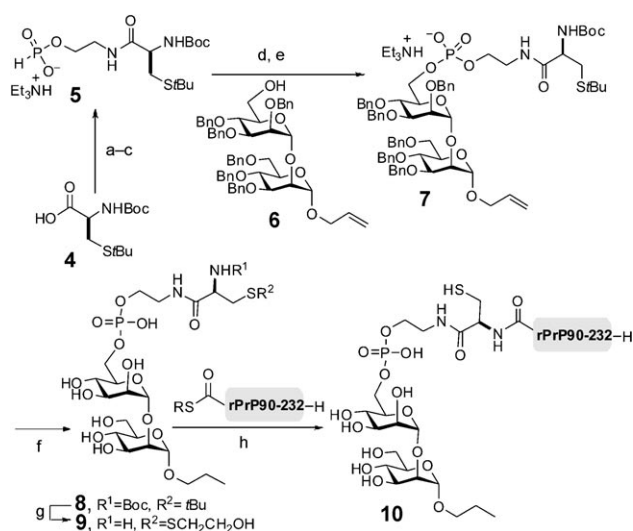
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802161> zu finden.



Scheme 1. Generelle Strategie zur Semisynthese von GPI-verankerten Proteinen mithilfe nativer chemischer Ligation (R' = Lipidkette, R'' = Alkyl- oder Arylgruppe). Bn = Benzyl, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

Einbau des Phosphatdiesters beruht auf der H-Phosphonatmethode, die eine Oxidation von Phosphor(III) zu Phosphor(V) unter Verwendung von Iod in Pyridin und Wasser erfordert.^[12] Es war nicht auszuschließen, dass unter diesen Bedingungen die vorhandene Thioetherfunktion oxidiert wird. Des Weiteren muss zur Abspaltung der Benzylschutzgruppen durch Hydrogenolyse der Heterogenkatalysator Pd/C eingesetzt werden, und Thioether können, wenn auch in geringerem Ausmaß als Thiole, solche Heterogenkatalysatoren vergiften.^[13] Um diese Bedenken auszuräumen, wurden die beiden genannten Umwandlungen zunächst mit einer Modellverbindung geprüft (Schema 2).

Die Synthese beginnt mit der Herstellung des H-Phosphonats **5** (Schema 2). Das kommerziell erhältliche *N*-Boc-*S*-*t*Bu-L-Cystein (**4**) wurde mit Succinimid aktiviert und bei 0 °C mit Ethanolamin umgesetzt. Die nachfolgende Umwandlung zum H-Phosphonatmonoester **5** erfolgte durch Zugabe von Phosphonsäure in Gegenwart von Pivaloylchlorid.^[14] Als Modellsystem zur Evaluierung der Phosphorylierungs- und globalen Entschützungsstrategie wurde das α -(1 \rightarrow 2)-Dimannosid **6**, das einen Teil des GPI-Glycans darstellt, verwendet (Schema 2). Die Phosphonylierung der C-6-Hydroxygruppe von **6** wurde mithilfe von Pivaloylchlorid erreicht. Die selektive In-situ-Oxidation zu Phosphor(V) mit Iod bei 0 °C war innerhalb von 1 h vollständig, wobei kein oxidiertes Schwefelprodukt beobachtet wurde. Die Bedingungen zur Hydrogenolyse in Gegenwart von Thioethern wurden genau untersucht.^[15] Unter Verwendung von Ameisensäure in Methanol, kombiniert mit Pd/C und Wasserstoff, konnten die Benzylschutzgruppen in **7** innerhalb von 2 h quantitativ unter Bildung von **8** abgespalten werden (Schema 2). Die *N*-Boc-



Scheme 2. Test der Synthesestrategie: Synthese des GPI-Dimannosid-Fragmentes. Reagentien und Bedingungen: a) *N*-Hydroxysuccinimid, DIPC, THF, RT; b) Ethanolamin, THF, DMF, 90 % über 2 Stufen; c) H_3PO_3 , PivCl, Pyridin, RT, 75 %. (d) **5**, PivCl, Py; e) I_2 , Py/ H_2O , 0 °C, 94 % über 2 Stufen; f) Pd/C, H_2 , 4 % $HCOOH$ in MeOH, quant.; g) $Hg(TFA)_2$, TFA/Anisol, 0 °C; dann $HS(CH_2)_2OH$, AcOH, H_2O , RT, 93 %, h) pH 7.8, PhSH (1 %, v/v), $R = (CH_2)_2SO_3^-$. DIPC = Diisopropylcarbodiimid, PivCl = Pivaloylchlorid, Py = Pyridin, TFA = Trifluoressigsäure/Trifluoressigsäure.

und *S*-*t*Bu-Schutzgruppen wurden mit $Hg(TFA)_2$ in Trifluoressigsäure entfernt. Überschüssiges Quecksilbersalz wurde durch Zugabe von 2-Sulfanylethanol ausgefällt.^[13b] Die Reinigung mit Sephadex G-25 ergab das Dimannosid **9** als gemischtes Disulfid mit einer $S(CH_2)_2OH$ -Gruppe.

9 wurde als Substrat für die NCL mit rekombinantem PrP (rPrP) mit einer C-terminalen MESNa-Thioesterfunktion eingesetzt (MESNa = Natriumsalz der Mercaptoethansulfonsäure).^[11f] Die Inkubation des rPrP-Thioesters mit **9** (1.5 Äquiv.) in der Gegenwart von Thiophenol führte zur Bildung des Glycan-rPrP-Konjugats **10** in einer Ausbeute von 80 %. Die Ligation war innerhalb von 12 h bei Raumtemperatur abgeschlossen (Analyse durch Umkehrphasen-HPLC (RP-HPLC), Abbildung 1 A). Die Produkthomogenität konnte mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) nachgewiesen werden, und die detektierte Masse von 16929.5 Da stimmt gut mit der berechneten Masse (16927 Da) von **10** überein (Abbildung 1 B).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein vollständiger GPI-Anker synthetisiert. Native Prionen-GPI-Anker bestehen aus einem für Säugertiere typischen Pseudopentasaccharidglycan, das durch eine Oligosaccharidverzweigung bis zum Trisaccharid Neu-Gal-GalNAc ergänzt wird.^[16] Sechs verschiedene Glycoformen von PrP-GPI wurden bisher beschrieben, ohne die genaue Stelle für die Anknüpfung oder die anomere Konfiguration der Oligosaccharidverzweigung zu definieren.^[17] Details über die Lipidzusammensetzung in PrP-GPIs sind bisher nicht bekannt. Angesichts dieser Unsicherheit in Bezug auf die Struktur wurde als erstes Synthesziel die Kernstruktur gewählt: das GPI-Pseudopentasaccharid **2**.

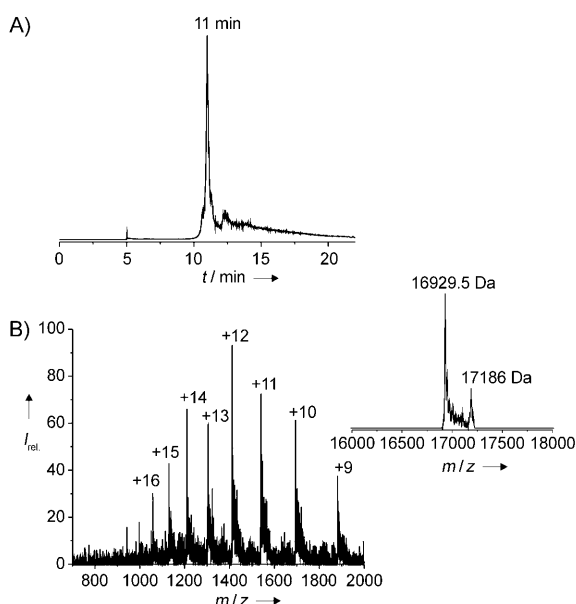


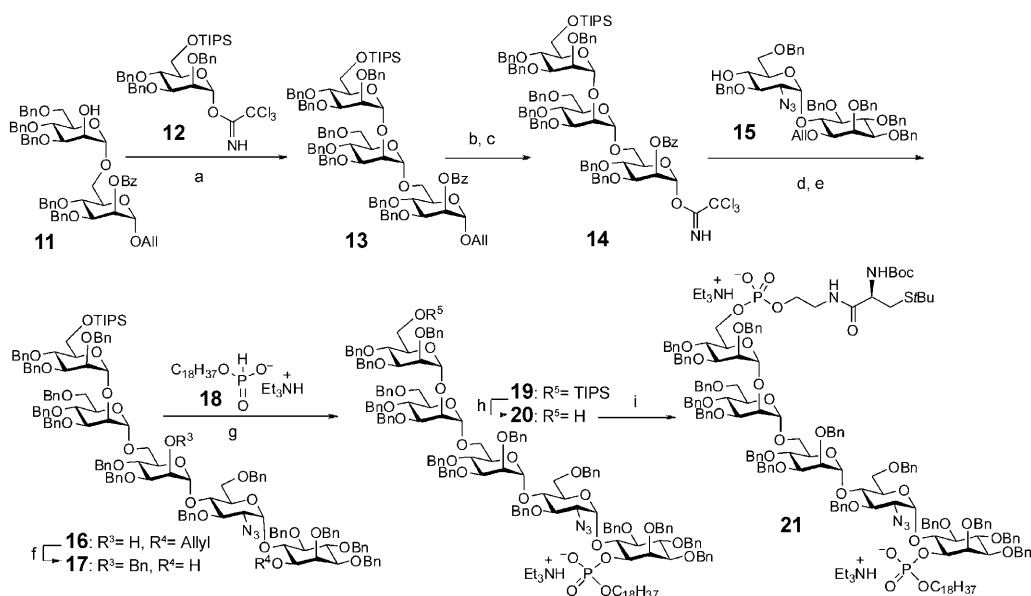
Abbildung 1. A) RP-HPLC der NCL-Reaktion des rPrP-Thioesters mit **9** nach 12 h. B) ESI-MS des Materials, das aus der Fraktion bei 11 min isoliert wurde.

Die konvergente Synthese von **2** setzte auf eine [3+2]-Glycosylierungsstrategie, die ein Trimannosid mit einem Glucosamininose-Pseudodisaccharid verbindet (Schema 3). Die selektive Verknüpfung von Mannosyltrichloracetimidat **12** und dem Dimannosid **11**^[18] wurde mit TMSOTf in Diethylether vermittelt. Die Allylgruppe am reduzierenden Ende von **13** wurde mit PdCl₂ in Acetatpuffer entfernt. Durch Inkubation mit Trichloracetonitril und DBU wurde das Trimannosyltrichloracetimidat **14** gebildet. Die Verknüpfung

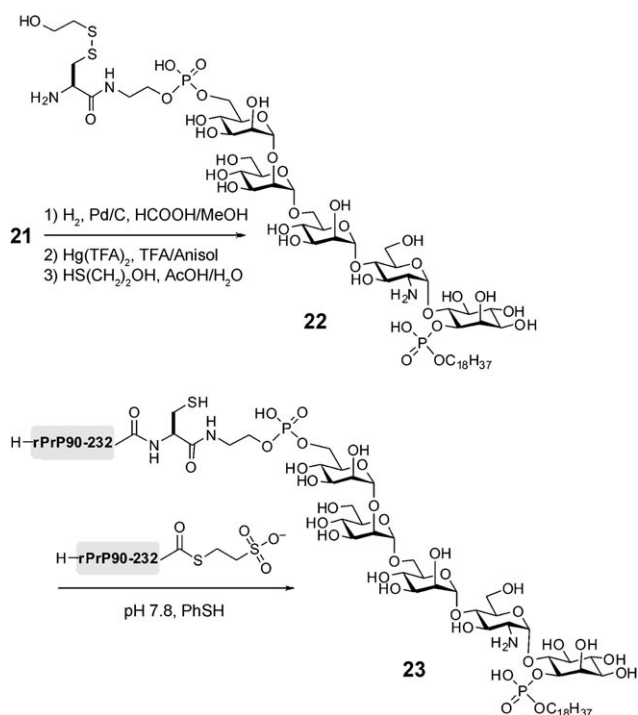
von **14** mit **15** erfolgte in der Gegenwart katalytischer Mengen TMSOTf, was zum differentiell geschützten Pseudopentasaccharid führte. Inkubation mit Natriummethanolat ergab anschließend **16** mit 80 % Ausbeute über beide Stufen. Benzylierung der zentralen Mannoseeinheit und Entfernung der Allylgruppe am Inositolrest lieferten **17**. Die anschließende Phosphorylierung wurde in einem Schritt unter Verwendung des H-Phosphonats **18** als Diacylglycerinphosphat-Surrogat durchgeführt und lieferte so **19**.^[19] Die Abspaltung des C-6-Silyl ethers an der terminalen Mannoseeinheit gelang durch in situ generiertes HCl in Methanol. Eine weitere Phosphorylierung mit **5** ergab den vollständig geschützten und lipidierten GPI-Anker **21**.

Die stufenweise Entschützung wurde unter den für das Dimannosid **9** beschriebenen Bedingungen durchgeführt (Schema 4). Der Hydrogenolyse mit Pd/C in Ameisensäure und Methanol folgte die Abspaltung der säurelabilen Boc- und *tert*-Butylgruppen in TFA mit Hg(TFA)₂. Überschüssige Quecksilbersalze wurde mit 2-Sulfanylethanol ausgefällt; der Cystein-modifizierte GPI-Anker **22** wurde als Heterodisulfid erhalten und mit ESI-MS identifiziert (siehe Hintergrundinformationen).

GPI-Anker **22** wurde direkt für die Ligation mit dem rekombinanten PrP (rPrP) mit einem C-terminalen MESNa-Thioester eingesetzt.^[11f] Die Ligation des rPrP-Thioesters mit **22** (1.5 Äquiv.) wurde in 6 M Guanidin-Hydrochlorid bei pH 7.8 in Gegenwart von 1 % (v/v) Benzothiol durchgeführt. Die Reaktion verlief mit einer Ausbeute von 50 %, und das erhaltene rPrP-GPI **23** wurde mit RP-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert (berechnete Masse: 17705 Da; Abbildung 2 A,B).^[20] Überschüssiger GPI-Anker **22** ohne die S(CH₂)₂OH-Schutzgruppe konnte zurückgewonnen und für weitere Ligationen eingesetzt werden, wo-



Schema 3. Synthese des geschützten GPI-Pseudopentasaccharids **21** mit eingebautem 2-(Cysteinylamino)phosphat. Reagentien und Bedingungen: a) TMSOTf, CH₂Cl₂, 95 %; b) PdCl₂, AcONa, AcOH, AcOEt, RT; c) Cl₃CCN, DBU, CH₂Cl₂, 68 % über 2 Stufen; d) TMSOTf, CH₂Cl₂, 0 °C; e) NaOMe, MeOH, 50 °C, 80 % über 2 Stufen; f) BnBr, NaH, DMF, 0 °C → RT, dann PdCl₂, AcONa, AcOH, RT, 76 % über 2 Stufen; g) 1) **18**, PivCl, Pyridin, RT, 2) I₂, Py/H₂O, quant. über 2 Stufen; h) HCl, MeOH 0 °C → RT, 88 %; i) 1) **5**, PivCl, Pyridin, RT, 2) I₂, Py/H₂O, quant. über 2 Stufen. All = Allyl, Bz = Benzoyl, DBU = 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, TIPS = Triisopropylsilyl, TMSOTf = Trimethylsilyltrifluormethansulfonat.



Schema 4. Abschluss der Synthese des Cystein-modifizierten GPI-Pseudopentasaccharids und dessen native chemische Ligation mit rPrP-Thioester.

durch sich die Effizienz der Reaktion erhöhen ließ. Es war keine Zugabe von Detergentien oder Lipiden zur Solubilisierung von **22** oder **23** während der Ligation erforderlich, anders als bei literaturbekannten Ligationen mit lipidierten Peptiden.^[7b,16,21]

Zum einen verleiht der GPI-Anker **22** dem Protein lipophile Eigenschaften, und zum anderen gewährleistet die große hydrophile Kopfgruppe eine gute Wasserlöslichkeit. Die Faltung von **23** in seine native Form wurde durch schnelle Verdünnung (1:10) in 20 mM Natriumacetat bei pH 5.5 und anschließende Gelfiltration erreicht.^[22] Gefaltetes rPrP-GPI **23** konnte in einer Ausbeute von 90 % erhalten werden. Die Homogenität von **23** wurde mit SDS-PAGE verifiziert, wobei das Protein eine scharfe Bande bei 17 kDa ergab (Abbildung 2C). Circular dichroismus(CD)-Spektren belegen eine α -helicale Struktur des Proteins, was für PrP^C charakteristisch ist. Dabei entsprechen die gemessenen molaren Elliptizitäten für **23** denen für PrP^C, das durch Expression in bakteriellen und eukaryotischen Systemen gewonnen wurde, und sie unterscheiden sich nicht von denjenigen für gefaltetes rPrP ohne GPI-Anker (Abbildung 3A).^[11b,e,f] Gefaltetes **23** war löslich in wässrigen Puffern ohne Zusatz von Tensiden oder Lipiden.

Zur Untersuchung des Einflusses des GPI-Ankers auf die Membranassoziation wurde **23** in kleine unilamellare 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin(DOPC)-Vesikel (SUVs) inkorporiert und mit einem Vesikel-Zentrifugations-

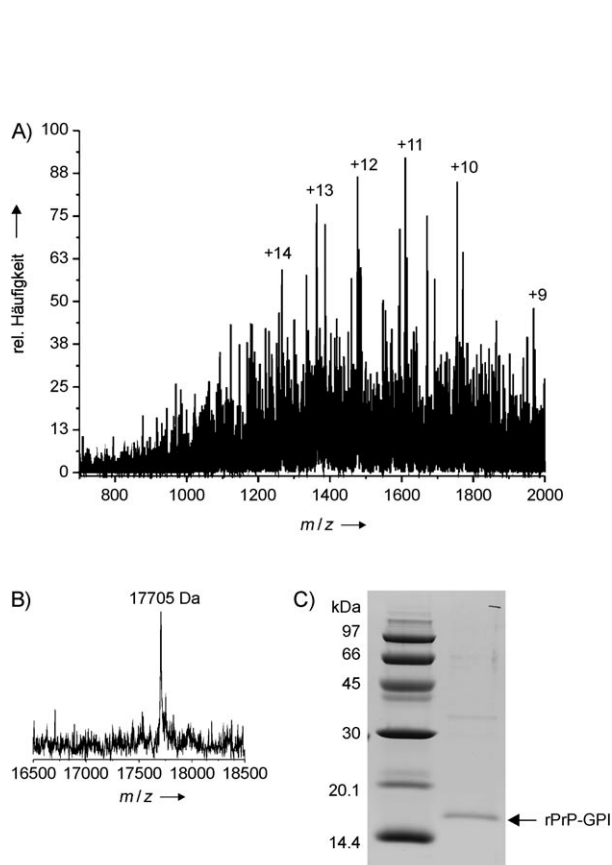


Abbildung 2. A) ESI-MS-Spektrum von **23**. B) Entfaltetes Spektrum von **23** (berechnetes Molekulargewicht: 17704 Da). C) SDS-PAGE des gereinigten **23** (rechte Spur), linke Spur: Molekulargewichtsmarker.

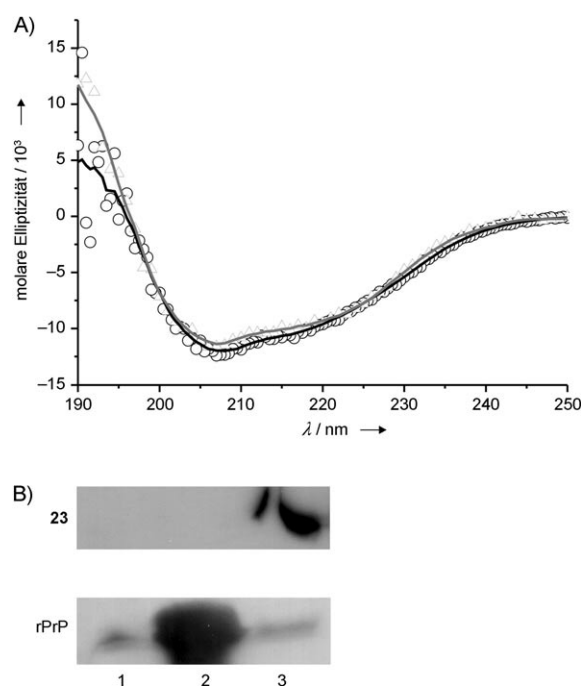


Abbildung 3. A) CD-Spektrum von gefaltetem **23** (○) und rPrP (△) bei 0.2 mg mL^{-1} in NaOAc-Puffer bei pH 5.5. B) Immunblotting-Analyse des Vesikel-Pull-Down-Assays mit **23** (obere Reihe) und rPrP (untere Reihe) mit dem PrP-spezifischen Antikörper A7. DOPC-Vesikel mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 80 nm wurden mit **23** gemischt. Spur 1: Pellet der Zentrifugation bei niedriger Umdrehungszahl von rPrP-GPI- und rPrP-Lösungen vor Zugabe von Vesikeln; Spur 2: Überstand der Zentrifugation bei hoher Umdrehungszahl der Vesikel nach Inkubation mit PrP-Proben; Spur 3: Pellet der Zentrifugation bei hoher Umdrehungszahl der Vesikel nach Inkubation mit PrP-Proben.

assay untersucht. Ein Zentrifugationsschritt bei niedriger Umdrehungszahl entfernte unlösliches Protein vor dem Transfer in die Vesikel (Abbildung 3B, Spur 1). Es wurde keine Präzipitation von **23** festgestellt. Vollständig lösliches **23** wurde 1:10 in eine Lösung mit 10 mg mL^{-1} SUVs verdünnt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der nachfolgenden Ultrazentrifugation wurden die Vesikel und die damit assoziierten Proteine präzipitiert. Die Analyse der erhaltenen Pellets und der Überstände ergab, dass sich **23** ausschließlich im Pellet befand (Abbildung 3B, Spuren 2 und 3). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass **23** quantitativ mit den Vesikeln assoziiert, obwohl der Anker nur eine einzige C_{18} -Kette enthält; dagegen werden in peptidischen GPI-Mimetika mindestens zwei Lipidketten für eine effiziente Verankerung benötigt. rPrP ohne GPI-Anker hingegen verblieb unter den gleichen Bedingungen im Überstand (Abbildung 3B, Spur 2). Diese Beobachtungen unterstreichen die besonderen Eigenschaften von GPI-Ankern bei der Membranassoziation von Proteinen.

Wir haben eine generelle Strategie zur Synthese homogener GPI-verankerter Proteine entwickelt, basierend auf der nativen chemischen Ligation eines synthetischen Cystein-modifizierten GPI-Ankers mit einem rekombinanten Protein, das über einen C-terminalen Thioester verfügt. Der Zugang zum lipidierten GPI-Anker beruht auf der Einführung des Cysteinrestes in das GPI-Rückgrat vor der vollständigen Entschützung und einer sinnvollen Wahl der Schutzgruppen. Diese Strategie wurde zur Synthese eines GPI-verankerten Prionproteins verwendet. Die präparative Zugänglichkeit von lipidierten GPI-Ankern in Milligramm-Mengen zur selektiven Proteinmodifizierung mithilfe nativer chemischer Ligation eröffnet die Möglichkeit zur gezielten Untersuchung, welche Auswirkungen diese komplexe posttranslationale Modifikation auf die Proteinstruktur und -funktion hat. In-vitro- und In-vivo-Experimente mit diesem GPI-verankerten PrP sollen helfen, den Einfluss der GPI-vermittelten Membranassoziation auf die Umwandlung in die pathogene PrP^{Sc}-Form aufzuklären.

Eingegangen am 8. Mai 2008

Online veröffentlicht am 22. September 2008

Stichwörter: Glycosylphosphatidylinositol · Native chemische Ligation · Proteine · Proteinsemisynthesen · Totalsynthesen

- [1] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, Jr., *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7508–7539; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372.
- [2] Übersichten: a) H. Ikezawa, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 409–417; b) A. S. Campbell in *Glycoscience: Chemistry and Biology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem), Springer, Berlin, **2001**, S. 1696–1777; c) M. A. J. Ferguson, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2799–2809.
- [3] Übersichten: a) P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960; b) T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289; c) V. Muralidharan, T. W. Muir, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 429–438.
- [4] Übersichten: a) M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593–634; b) A. Brik, S. Ficht, C. H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 638–644; c) L. Brunsfeld, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, A. Wittinghofer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6774–6798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6622–6646.
- [5] Übersichten über GPI-Synthesen: a) Z. W. Guo, L. Bishop, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3585–3596; b) D. Martin-Lomas, J. Lopez-Prados in *Comprehensive Glycoscience*, Vol. 1 (Hrsg.: J. P. Kamerling, G.-J. Boons, Y. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi, A. G. J. Voragen), Elsevier, Dordrecht, **2007**, S. 748–795.
- [6] Ausgewählte biologische Anwendungen von synthetischen GPIs: a) N. W. Brattig, K. Kowalsky, X. Liu, G. D. Burchard, F. Kamena, P. H. Seeberger, *Microb. Infect.* **2008**, *10*, 885–891; b) F. Kamena, M. Tamborini, X. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Plusche, P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 238–240; c) T. K. Smith, A. Crossman, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4701–4708; d) L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785–789; e) T. K. Smith, A. Crossman, C. N. Borissow, M. J. Paterson, A. Dix, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3322–3332; f) M. Martín-Lomas, N. Khair, S. Garcia, J.-L. Koessler, P. M. Nieto, T. W. Rademacher, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3608–3621; g) W. Frick, A. Bauer, J. Bauer, S. Wied, G. Mueller, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13421–13436.
- [7] Modellstudien an synthetischen GPI-verankerten Proteinen: a) Y. Tanaka, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4059–4067; b) M. J. Grogan, Y. Kaizuka, R. M. Conrad, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14383–14387; c) M. G. Paulick, A. R. Wise, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11543–11550.
- [8] Eine GPI-Glycan-Peptidsynthese: N. Shao, B. Xue, Z. W. Guo, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1595–1599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1569–1573.
- [9] N. Stahl, D. R. Borchelt, K. Hsiao, S. B. Prusiner, *Cell* **1987**, *51*, 229–240.
- [10] Aktuelle Beispiele dieser Kontroverse: a) P. A. Lewis, F. Properzi, K. Prodromidou, A. R. Clarke, J. Collinge, G. S. Jackson, *Biochem. J.* **2006**, *395*, 443–448; b) B. Chesebro, M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah, M. Oldstone, *Science* **2005**, *308*, 1435–1439; c) G. Legname, I. V. Baskakov, H. O. B. Nguyen, D. Riesner, F. E. Cohen, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, *Science* **2004**, *305*, 673–676.
- [11] Beispiele: a) L. Breydo, Y. Sun, N. Makarava, C. I. Lee, V. Novitskaia, O. Bocharova, J. P. Y. Kao, I. V. Baskakov, *Biochemistry* **2007**, *46*, 852–861; b) M. R. Hicks, A. C. Gill, I. K. Bath, A. K. Rullay, I. D. Sylvester, D. H. Crout, T. J. T. Pinheiro, *FEBS J.* **2006**, *273*, 1285–1299; c) D. R. Taylor, N. M. Hooper, *Mol. Membr. Biol.* **2006**, *23*, 89–99; d) P. Crichtley, J. Kazlauskaitė, R. Eason, T. J. T. Pinheiro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *313*, 559–567; e) H. Eberl, P. Tittmann, R. Glockshuber, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25058–25065; f) D. Olschewski, R. Seidel, M. Miesbauer, A. S. Rambold, D. Oesterhelt, K. F. Winklhofer, J. Tatzelt, M. Engelhard, C. F. W. Becker, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 994–1006; g) A. Gorodinsky, D. A. Harris, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 619–627.
- [12] a) C. B. Reese, Q. L. Song, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 1477–1486; b) R. H. Hall, A. Todd, R. F. Webb, *J. Chem. Soc.* **1957**, 3291–3296.
- [13] a) S. A. Hutchinson, S. P. Baker, J. Linden, P. J. Scammells, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4877–4884; b) Y. Okada, N. Ohta, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 581–585.
- [14] C. Lin, H. Fu, G. Tu, Y. Zhao, *Synthesis* **2004**, 509–513.
- [15] a) A. M. Felix, M. H. Jiménez, J. Meienhofer, *Org. Synth. Coll. Vol.* **59**, 159; b) B. El Amin, G. M. Anantharamaiah, G. P. Royer, G. E. Means, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3442–3444; c) A. M. Felix,

- M. H. Jiménez, T. Mowles, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 329.
- [16] N. Stahl, M. A. Baldwin, R. Hecker, K. M. Pan, A. L. Burlingame, S. B. Prusiner, *Biochemistry* **1992**, *31*, 5043–5053.
- [17] M. A. Baldwin, *Methods Enzymol.* **2005**, *45*, 172–186.
- [18] a) Y. U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2493–2504; b) X. Liu, Y.-U. Kwon, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5004–5005.
- [19] Die Struktur der Lipidreste in Prionprotein-GPI-Ankern ist nicht vollständig aufgeklärt (siehe Lit. [16, 17]). Es wird angenommen, dass diese Reste auf Glycerol-1-phosphat beruhen. Möglicherweise handelt es sich auch um Diacyl- oder Dialkylglycerollipide sowie 1-Acyl- oder 1-Alkyl-2-lyso-glycerollipide usw. Aus diesem Grund haben wir als Startpunkt unserer Untersuchungen eine einzelne Lipidkette (Stearoylphosphat) gewählt, deren Länge für Wechselwirkungen mit Membranen ausreichend sein sollte.
- [20] Die RP-HPLC- und Massenanalyse von **23** wurde durch dessen amphiphile Eigenschaften erschwert. MALDI-TOF-Analyse bestätigte die Identität von **23** (siehe Hintergrundinformationen S4).
- [21] T. Durek, K. Alexandrov, R. S. Goody, A. Hildebrand, I. Heinemann, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16368–16378.
- [22] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180–182.
-