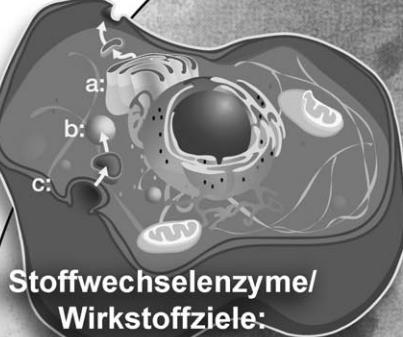


# Glycosphingolipide – Natur, Funktion und pharmakologische Modulierung

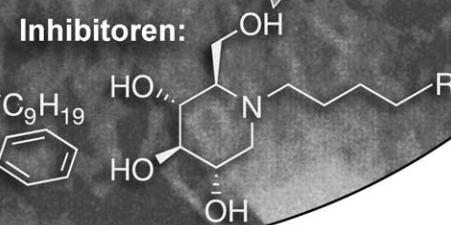
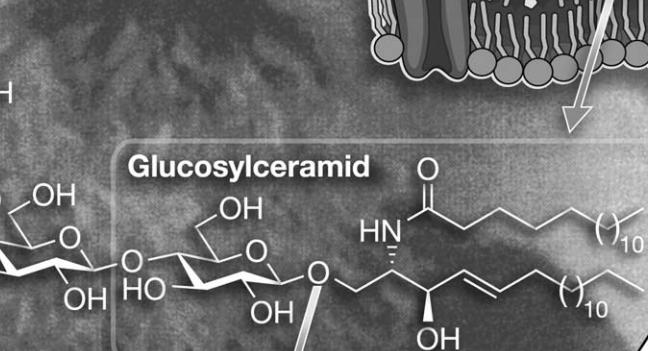
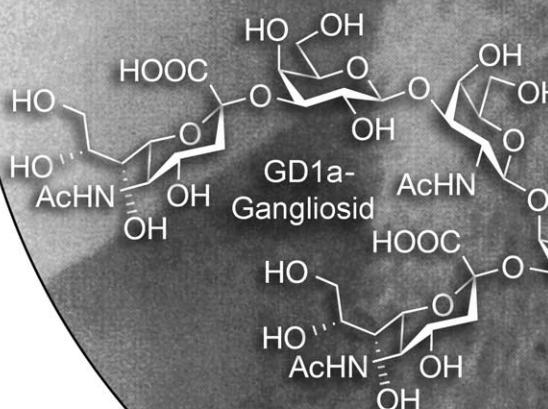
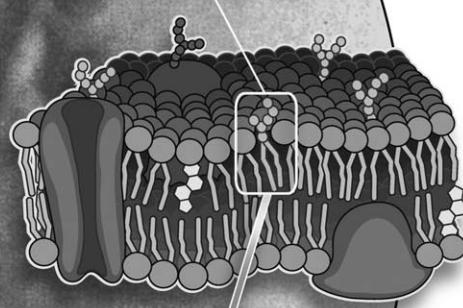
Tom Wennekes, Richard J. B. H. N. van den Berg, Rolf G. Boot,  
Gijsbert A. van der Marel, Herman S. Overkleeft\* und Johannes M. F. G. Aerts\*

**Stichwörter:**

Glycolipide · Inhibitoren · Sphingolipide ·  
Stoffwechsel ·  
Wirkstoff-Forschung

**J.L.W. Thudichum****Stoffwechselenzyme/  
Wirkstoffziele:**

- a: GCS am Golgi-Apparat
- b: GBA1 in Lysosomen
- c: GBA2 an der Plasmamembran

**Glycosphingolipide**

Die Entdeckung der Glycosphingolipide wird im Allgemeinen Johan L. W. Thudicum zugeschrieben, der 1884 über die chemische Zusammensetzung des Gehirns publizierte. In seinen Studien isolierte er aus ethanolischen Hirnextrakten mehrere Verbindungen, die er als Cerebroside bezeichnete. Eine dieser Verbindungen, Phrenosin (heute als Galactosylceramid bekannt), unterwarf er einer sauren Hydrolyse, aus der drei Komponenten hervorgingen. Eine Komponente identifizierte er als Fettsäure, eine andere als Isomer zur D-Glucose, heute als D-Galactose bekannt. Die dritte Komponente mit „alkaloidaler Natur“ gab Thudicum „viele Rätsel“ auf, weshalb er sie Sphingosin nannte, nach dem mythologischen Rätsel der Sphinx. Derzeit sind Sphingolipide und ihre glycosidierten Derivate Gegenstand intensiver Forschung mit dem Ziel, ihre Funktion für die strukturelle Integrität der Zellmembran, ihre Teilnahme in Erkennungs- und Signalübertragungsvorgängen und besonders ihre Beteiligung an pathologischen Prozessen, die als Ursache menschlicher Krankheiten (z. B. von Sphingolipidosen und Typ-2-Diabetes) gelten, aufzuklären. Dieser Aufsatz wird auf neuere Befunde zur Biosynthese, Funktion und zum Abbau von Glycosphingolipiden im Menschen eingehen, mit Fokus auf das Glycosphingolipidglucosylceramid. Besondere Aufmerksamkeit richtet sich auf die klinische Bedeutung von Verbindungen, die mit den Faktoren des Glycosphingolipid-Metabolismus wechselwirken.

## 1. Einleitung

Sphingolipide (SLs) und Glycosphingolipide (GSLs) sind essentielle Strukturbestandteile der Zellmembranen in Säugetieren und befinden sich größtenteils an der Zelloberfläche. Sphingolipide bestehen aus einem Ceramidteil mit einer N-acylierten Sphingosineinheit. An die primäre Hydroxygruppe der Sphingosineinheit ist über eine  $\beta$ -glycosidische Bindung entweder Glucose oder Galactose gebunden, wodurch die einfachsten Glycosphingolipide entstehen: Glucosylceramid und Galactosylceramid. Verknüpfung mit einer Phosphorylcholin-Einheit liefert Sphingomyelin, ein sehr häufig vorkommendes Membranlipid. Weitere Additionen von Oligosacchariden und Sulfatgruppen an Glycosphingolipide führen zu einer breiten Auswahl an komplexen Glycosphingolipiden.<sup>[4,5]</sup> Solche mit einer abschließenden N-Acetylneuraminsäure werden als Ganglioside bezeichnet (Abbildung 1). An der Biosynthese und dem Abbau von Gly-

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	9007
<b>2. Vererbte Sphingolipidosen</b>	9012
<b>3. Glycosphingolipide in Gesund- und Krankheitszuständen</b>	9013
<b>4. Modulation des GSL-Metabolismus: Inhibitoren und Chaperone</b>	9017
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	9023

sphingolipiden sind zahlreiche Enzyme beteiligt, die an unterschiedlichen subzellulären Orten wirken (Abbildung 2).

### 1.1. Sphingolipid-Metabolismus

Die Biosynthese der SLs<sup>[6–10]</sup> beginnt an der cytosolischen Seite der Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER), wobei aus L-Serin und zwei durch Coenzym A (CoA) aktivierte Fettsäuremoleküle über eine Sequenz aus drei enzymkatalysierten Reaktionen Dihydroceramid synthetisiert wird (Schema 1). Die meisten Sphingoid-Basen in Säugetieren enthalten 18 Kohlenstoffatome, aber es gibt auch kleine Mengen anderer Basen (C<sub>12–26</sub>).<sup>[11]</sup> Abhängig vom Gewebe können Länge und Sättigungsgrad des N-Acyl-Endes in SLs und GSLs deutlich variieren.<sup>[12]</sup> In Menschen wird dies durch sechs verschiedene Dihydroceramid-Synthase(CerS)-Gene (früher als LASS-Gene bekannt) erreicht, die für eine Familie von CerS-Enzymen mit unterschiedlicher Selektivität für die CoA-aktivierte Fettsäure codieren.<sup>[13]</sup> In diesem Aufsatz werden wir nur einen Sphingolipid-Typ abbilden, der aus der am häufigsten vorkommenden Fettsäure, der Palmitinsäure, gebildet wird. Die Hauptmenge an Dihydroceramid wird durch die Dihydroceramid-Desaturase in Ceramid umgewandelt. In Epithelzellen der Haut und des Dünndarms kommt jedoch auch das SL-Phytoceramid in signifikanten Mengen vor. Phytoceramid wird über die DES2-

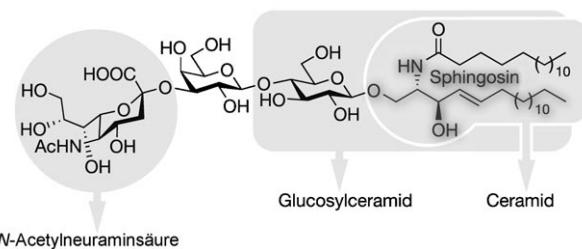
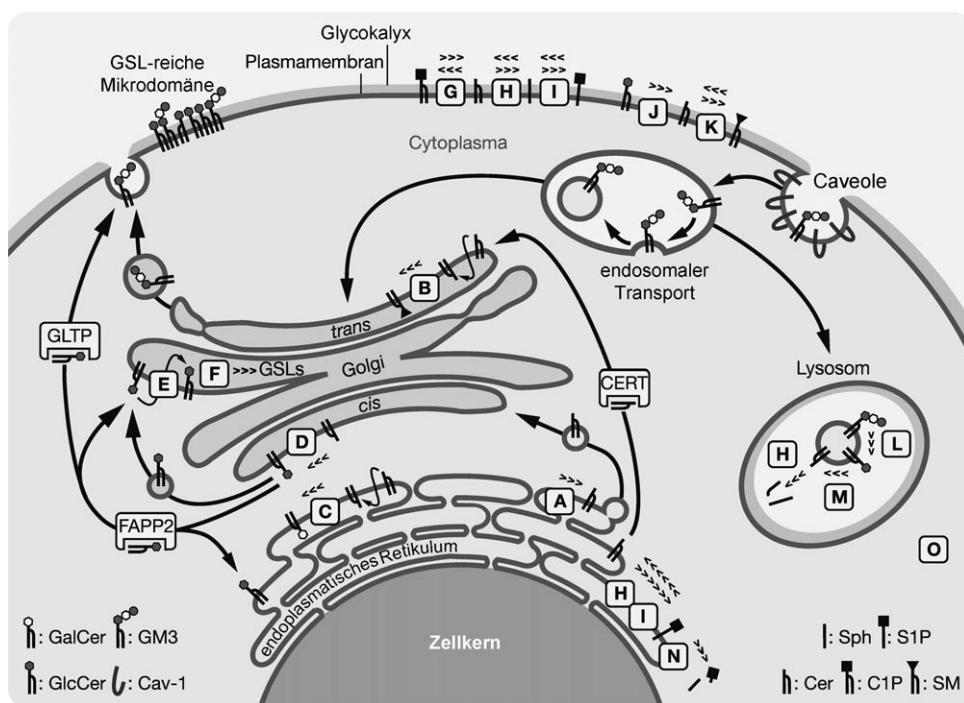


Abbildung 1. Struktur eines Glycosphingolipids: Gangliosid GM3.

[\*] Dr. T. Wennekes, Dr. R. J. B. H. N. van den Berg, Prof. Dr. G. A. van der Marel, Prof. Dr. H. S. Overkleef Leiden Institute of Chemistry, Gorlaeus Laboratories Leiden University, P.O. Box 9502, Leiden (Niederlande) E-Mail: h.s.overkleef@chem.leidenuniv.nl Homepage: <http://biosyn.lic.leidenuniv.nl/>

Dr. R. G. Boot, Prof. Dr. J. M. F. G. Aerts Department of Medical Biochemistry, Academic Medical Center University of Amsterdam, 1105 AZ, Amsterdam (Niederlande) E-Mail: j.m.aerts@amc.uva.nl



**Abbildung 2.** Zelluläre Topologie und Dynamik bei der Biosynthese und dem Abbau von Säugetier-SL/GSL. A) De-novo-Synthese von Ceramid; B) Synthese von Sphingomyelin (SM) durch SMS1; C) Synthese von GalCer durch CGaT; D) Synthese von GlcCer durch GCS; E) GlcCer-Flippase; F) Synthese von Lactosylceramid und komplexen GSLs (z. B. GM3); G) Synthese von Ceramid-1-phosphat (C1P) durch CERK und Hydrolyse durch LPP; H) Deacylierung von Ceramid zu Sphingosin (Sph) durch Ceramidase; I) Synthese von Sphingosin-1-phosphat (S1P) durch Sphingosinkinase 1 und Hydrolyse durch S1P-Phosphatase; J) Hydrolyse von GlcCer durch GBA2 (und LPH im Darm); K) Synthese von SM durch SMS2 und Hydrolyse durch Sphingomyelinase; L) stufenweise Hydrolyse komplexer GSLs; M) Hydrolyse von GlcCer durch GBA1; N) Abbau von S1P durch S1P-Lyase; O) Hydrolyse von GlcCer durch GBA3 (?); Cav-1: Caveolin-1 (vermittelt Endozytose der GSL).

vermittelte<sup>[14]</sup> C-4-Hydroxylierung von Dihydroceramid gebildet und kann durch eine spezialisierte alkalische Ceramidase in Phytosphingosin überführt werden.<sup>[15]</sup> Kürzlich wurde nachgewiesen, dass für biosynthetische Zwecke Ceramid auch durch Acylierung von Sphingosin, das aus dem lysosomalen Abbau von Sphingolipiden stammt, synthetisiert werden kann. Dieser Wiederverwertungsweg wird allgemein als Salvage-Pathway („Bergungsweg“) bezeichnet.<sup>[16]</sup>

Ceramid ist die zentrale Vorstufe bei der Synthese vieler Sphingolipide und Glycosphingolipide. Es wird durch das Transportprotein CERT vom ER zur cytosolischen Membranoberfläche des *trans*-Golgi-Apparats transportiert.<sup>[17-19]</sup> Hier stellt sich zwischen der cytosolischen und luminalen Seite der *trans*-Golgi-Membran ein Gleichgewicht ein. Auf der luminalen Innenseite überträgt die Sphingomyelin-Synthase 1 (SMS1) eine Phosphorylcholin-Kopfgruppe von Phospho-



Tom Wennekes studierte Chemie an der Universität Leiden und promovierte dort 2008 über lipophile Iminozucker als Inhibitoren für glycoprozessierende Enzyme aus dem Glucosylceramid-Stoffwechsel. Anschließend wechselte er als Postdoktorand in die Arbeitsgruppe von Steve Withers an der University of British Columbia.



Rolf Boot promovierte über die Gaucher-Krankheit und Chitotriosidase, einer von Gaucher-Zellen abgeleiteten humanen Chitinase, und ist gegenwärtig Assistant Professor für Medizinische Biochemie am Academic Medical Center der Universität Amsterdam. Seine Forschungen gelten Chitinases und den pathogenen Mechanismen und therapeutischen Eingriffen bei lysosomalen Speicherkrankheiten sowie der Identifizierung und Anwendung von neuen Biomarkern für diese Krankheiten.

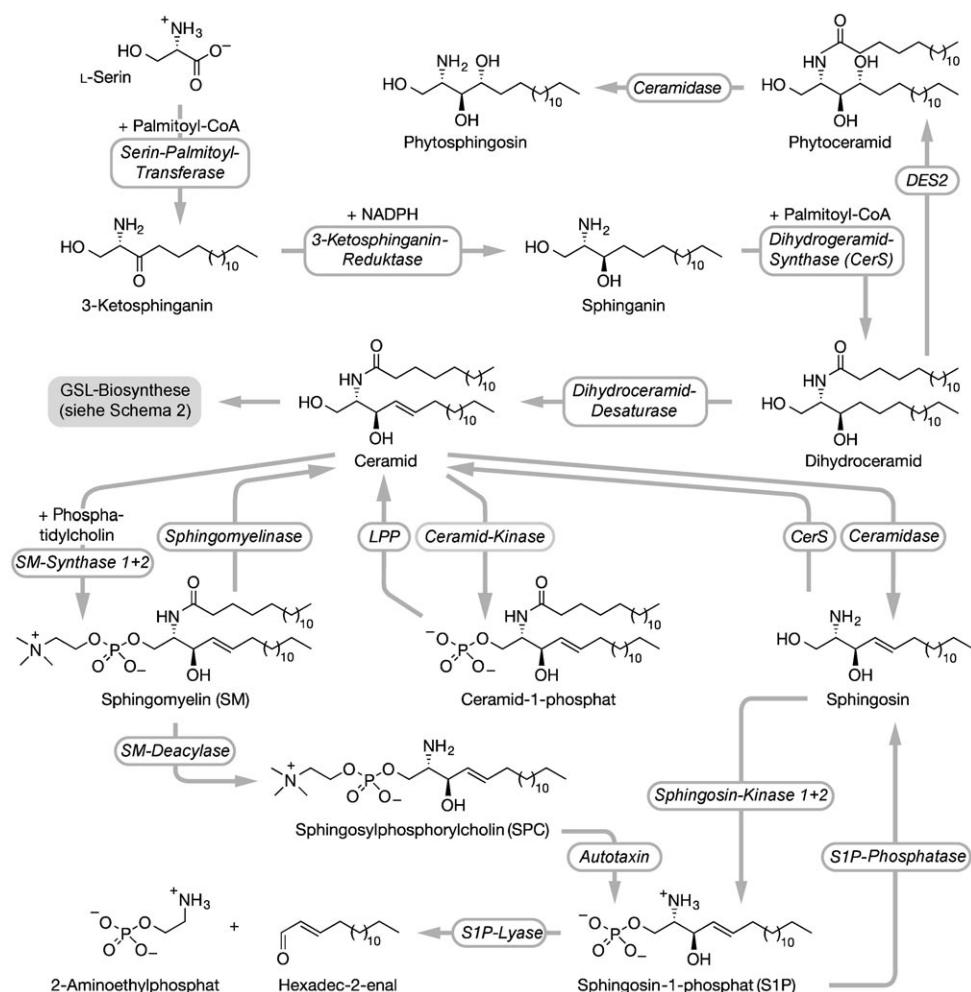


Richard van den Berg promovierte 2001 bei Jacques van Boom an der Universität Leiden, wo er anschließend ein Postdoktorat absolvierte und 2008 zum Dozenten ernannt wurde. Seine Forschungen gelten der Entwicklung lipphiler Iminozucker und Sphingolipid-verwandter Verbindungen.



Gijs van der Marel promovierte bei Jacques van Boom an der Universität Leiden, wo er gegenwärtig Professor für Präparative Organische Chemie ist. Seine Forschung richtet sich auf die Entwicklung präparativer Methoden für Kohlenhydrate und Nucleinsäuren, einschließlich Hybridstrukturen und nichtnatürlicher Analoga.

## Glycosphingolipide

**Schema 1.** Biosynthese und Abbau von Säugetier-Sphingolipiden.

Herman Overkleeft ist Professor für Bioorganische Chemie an der Universität Leiden. Seine aktuellen Forschungsinteressen liegen in der Entwicklung chemisch biologischer Strategien zur Untersuchung von Enzymen in ihrer physiologischen Umgebung mit Schwerpunkt auf Glucosylceramid-metabolisierenden Enzymen, dem Ubiquitin-Proteasom-Weg, lysosomalen Proteasen, Kinasen und Matrix-Metalloproteasen.



Hans Aerts ist Professor für Medizinische Biochemie am Academic Medical Center der Universität Amsterdam. Seine Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung der Glucocerebrosidase, dem defekten Enzym bei der Gaucher-Erkrankung. Spätere und gegenwärtige Forschungen galten der Therapie und Pathogenese lysosomaler Speicherkrankheiten und die Identifizierung und Anwendung von Biomarkern für diese Erkrankungen sowie der Rolle von Glycosphingolipiden bei Manifestationen des metabolischen Syndroms.

glycerolipiden auf Ceramid unter Bildung von Sphingomyelin (SM). Das zwitterionische SM passiert kaum noch die Membran. Ein zweites Enzym, SMS2, ist an der Plasmamembran lokalisiert und wandelt dort Ceramid in Sphingomyelin um. Eine neutrale und eine saure Form des Enzyms Sphingomyelinase können aus SM wieder Ceramid herstellen. Das letztere Enzym befindet sich in den Lysosomen und der äußeren Seite der Plasmamembran, wird aber auch ausgeschieden. Auf einer alternativen Route wird Ceramid an der Plasmamembran durch die Ceramid-Kinase (CERK) phosphoryliert. Das Produkt, Ceramid-1-phosphat, kann durch die Lipidphosphat-Phosphatase (LPP) wieder zu Ceramid hydrolysiert werden.<sup>[20]</sup> Acide, basische und neutrale Ceramid-Asen, die im Lysosom, der Plasmamembran bzw. im Golgi/ER lokalisiert sind, können Ceramid deacylieren, um in speziellen zellulären Bereichen Sphingosin-Pools zu bilden. Dieses Sphingosin kann durch die Sphingosin-

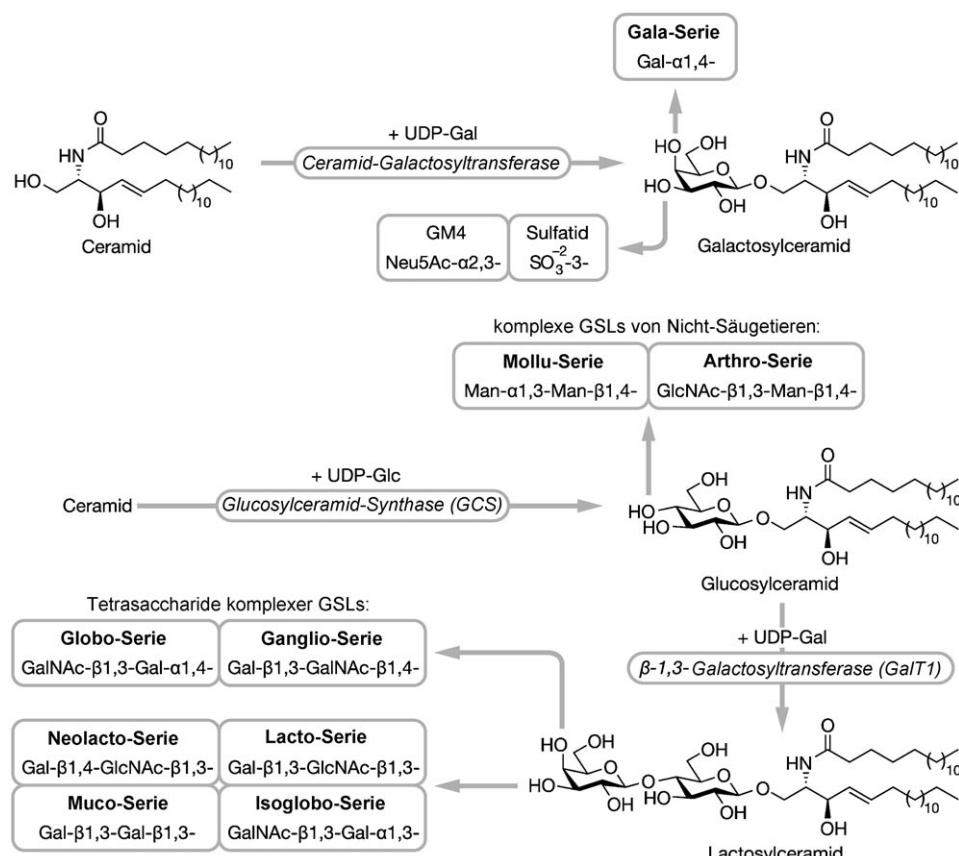
Kinase 1 (SK1), die an der Plasmamembran und in der extrazellulären Matrix operiert, zu Sphingosin-1-phosphat (S1P) phosphoryliert werden. Eine zweite Sphingosin-Kinase, SK2, kommt am ER nahe beim Kern vor.<sup>[21]</sup> Die S1P-Spiegel können wiederum durch die S1P-Phosphatase herunterreguliert werden. Seit langem weiß man, dass in Säugetierzellen und -plasma Sphingosylphosphorylcholin (SPC) vorhanden ist,<sup>[22,23]</sup> aber erst kürzlich wurden sein Stoffwechsel und die biologischen Funktionen teilweise aufgeklärt. Das extrazellulär abgesonderte Enzym, SM-Deacylase, hydrolysiert das Acyl-Ende von SM unter Bildung von SPC. Bisher ist kein zugehöriges katabolisches Enzym für SPC gefunden worden, aber das im Plasma zirkulierende Enzym Autotaxin kann SPC in S1P überführen. Die zelluläre Abstimmung dieser komplexen gegenseitigen Umwandlungen zwischen den SLs wird als Sphingomyelin-Kreislauf bezeichnet und kennzeichnet die Rolle dieser SLs in extra- und intrazellulären Signalübertragungswegen. Der einzige gegenwärtig bekannte Ausgang aus diesem vernetzten SL-Stoffwechsel ist der Abbau von S1P durch die S1P-Lyase am ER.

## 1.2. Glycosphingolipid-Biosynthese in Säugetieren

Nach der Synthese auf der cytosolischen Seite der ER-Membran wechselt Ceramid auf die luminaire Seite. Wenn es in die äußere Oberfläche einer unilamellaren Phosphatidylcholin-Vesikel eingelagert ist, stellt sich das Gleichgewicht zur inneren Oberfläche bei 37°C mit einer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) unter 1 min ein.<sup>[24]</sup> Bei einigen Zelltypen wird Ceramid im ER-Lumen durch die Ceramid-Galactosyl-Transferase (CGaT) in Galactosylceramid umgewandelt.<sup>[25,26]</sup> Dieses GSL wird zu den Gala-Serien weiter diversifiziert, entweder durch Sulfatierung oder Glycosylierung mit Neu5Ac an der 3-O-Position oder durch Erweiterung zu Oligosacchariden über eine zweite  $\alpha$ -verknüpfte D-Galactose an der 4-O-Position (Schema 2).<sup>[8]</sup> Ceramid wird vom ER auch über einen noch nicht gut verstandenen CERT-abhängigen Mechanismus zur cytosolischen Membranseite des *cis*-Golgi-Apparates transportiert.<sup>[19,27]</sup> Hier katalysiert die membrangebundene Glycosyl-Transferase, Glucosylceramid-Synthase (GCS), die Glycosylierung der primären Hydroxygruppe in Ceramid unter Verwendung von UDP-Glucose als Donorglycosid. Eine neuere Studie deutete darauf hin, dass eine eng mit den Mitochondrien verbundene Region des ER ebenfalls enzymatische Aktivität zur Bildung von Glucosylceramid aufweist.<sup>[28]</sup> Die Glucosylceramid-Synthase ist eine invertierende Transferase (Familie 21; GT-A-Faltung).<sup>[29,30]</sup> Sie enthält eine N-terminale hydrophobe Transmembranstrecke, die zusam-

men mit einer hydrophoben Schleife nahe der C-terminalen Region das Enzym an der cytosolischen Seite der Golgi-Membran verankert.<sup>[31]</sup> Eine Untersuchung ergab, dass GCS mit einem nicht identifizierten 15-kDa-Protein Heterodimere oder Oligomere bildet.<sup>[32]</sup> Durch ortsgerechtete Mutagenese und Sequenzvergleiche mit anderen Transferasen wurden mehrere Aminosäurereste im aktiven Zentrum – einschließlich des nahe am N-Terminus lokalisierten His193 – identifiziert, die für die Bindung zum Substrat und zum GCS-Inhibitor, D-*threo*-(1*R*,2*R*)-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP; **1** in Abbildung 6), wichtig sind.<sup>[33]</sup> GCS weist auch ein metallkoordinierendes DXD-Motiv auf, benötigt aber kein zweiwertiges Metall zur Katalyse.<sup>[34]</sup>

Glucosylceramid nimmt bei der Biosynthese vieler GSLs eine Schlüsselposition ein. Die Tatsache, dass GCS und Glucosylceramid beide die cytosolische Seite der zellulären Membran belegen, ist ein charakteristisches Merkmal der GSL-Biosynthese: Die weitere Synthese komplexer GSLs findet ausschließlich auf der luminalen Innenseite des Golgi-Apparates statt. Wenn Glucosylceramid in die äußere Oberfläche einer Modellmembran eingeführt wird, wechselt es ohne Hilfe nur sehr langsam auf die luminaire Seite ( $t_{1/2} = 5$  h bei 20°C). In der Membran des Golgi-Apparates bewegt sich Glucosylceramid jedoch schnell durch die Doppelschicht ( $t_{1/2} = 3$  min bei 20°C). Studien weisen darauf hin, dass ein ATP-abhängiges Golgi-lokalisierter „Flippase“-Protein beteiligt ist.<sup>[35]</sup> Der ATP-abhängige Multidrug-Transporter P-



Schema 2. Übersicht über die Biosynthese von (Säugetier)-Glycosphingolipiden.

Glycoprotein, der überall in der Zelle vorhanden ist, fungiert als schnelle Flippase für künstliches, fluoreszenzmarkiertes (NBD) Glucosylceramid, Galactosylceramid und Sphingomyelin, aber nicht für Lactosylceramid.<sup>[36]</sup> De Matteis et al. zeigten kürzlich, dass FAPP2 für die Synthese komplexer GSLs erforderlich ist, da es den nicht-vesikulären Transport von Glucosylceramid zu distalen Golgi-Kompartimenten vermittelt, und schlugen vor, dass auch die Verlagerung des Glucosylceramids zur luminalen Seite der *trans*-Golgi-Membranen, wo die weitere GSL-Synthese erfolgt, auf FAPP2 zurückzuführen ist.<sup>[37,38]</sup> Van Meer et al. beschrieben, dass FAPP2 Glucosylceramid auch zum ER transportieren kann. Das eng verwandte GLTP-Transportprotein kann zudem Glucosylceramid auf die cytosolische Seite der Plasmamembran befördern (Abbildung 2).<sup>[39,40]</sup>

Auf der luminalen Seite der *trans*-Golgi-Membranen wird

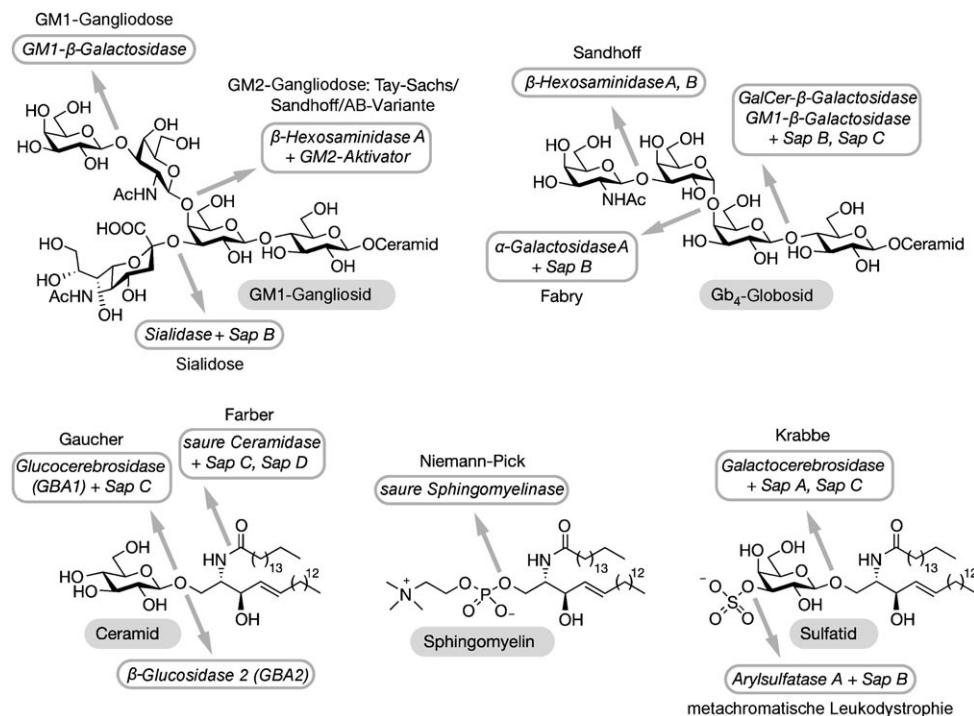
die GSL-Biosynthese mit der Synthese von Lactosylceramid durch GalT1 fortgesetzt. Lactosylceramid wird entweder an der 3-O-Position oder der 4-O-Position stufenweise weiter aufgebaut. Die Kerntetrasaccharide der GSL-Serien sind in Schema 2 gezeigt. Die meisten dieser GSLs bestehen aus wechselnden und verzweigten Kombinationen von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -verknüpfter Glucose, Galactose, *N*-Acetylglucosamin und *N*-Galactosamin. An ihrem nichtreduzierenden Ende werden zahlreiche dieser komplexen GSLs entweder mit L-Fucose oder saurer Neu5Ac abgeschlossen. Es gibt auch zwei andere, nicht in Säugetieren vorkommende Serien komplexer GSL, die auf ein mit Glucosylceramid  $\beta$ -1,4-verknüpftes Mannopyranosid zurückgehen. Komplexe GSLs aus der Mollusker-Serie<sup>[41]</sup> wurden aus Süßwassermuscheln (z.B. Mollusken) isoliert und GSLs der Arthro-Serie<sup>[42]</sup> aus mehreren Arthropoden (z.B. Drosophila-Fliegen). Von besonderem Interesse sind die Ganglioside, d.h. von Lactosylceramid abgeleitete Sphingolipide mit abschließenden *N*-Acetylneuraminsäure(Sialinsäure)-Einheiten. Für die verwirrende Menge an Gangliosiden hat Svennerholm, ein Pionier der Gangliosidforschung, eine geeignete Abkürzungsnomenklatur entwickelt.<sup>[43]</sup> In dieser Nomenklatur steht G für Gangliosid, A für Asialo-, M für Monosialo-, D für Disialo- und T für Trisialogangliosid.<sup>[44,45]</sup> Spezifische Sialyltransferasen überführen Lactosylceramid schrittweise in GM3, GD3 und GT3. Lactosylceramid und jedes seiner sialylierten Derivate dienen als Vorstufe für komplexe Ganglioside der 0-, a-, b- und c-Serien. Charakteristisch für diese unterschiedlichen Serien sind kein (0-Serie), ein (a-Serie), zwei (b-Serie) oder drei Sialinsäurereste (c-Serie), die an die 3-Position der inneren Galactosegruppe gebunden sind. In adulten menschlichen Geweben werden Ganglioside der 0- und c-Serien nur in Spuren gefunden.

### 1.3. (Glyco)sphingolipid-Katabolismus in Säugetieren

Der Abbau komplexer Glycosphingolipide erfolgt schrittweise überwiegend in Endosomen und Lysosomen. Glycosphingolipide erreichen das endosomal-lysosomale Kompartiment auf verschiedenen Wegen. Rezeptorvermittelte Endozytose von Lipoproteinen niedriger Dichte (low-density-lipoproteins, LDL) liefert Glycosphingolipide in das Lumen der Lysosome. Die Phagocytose größerer Strukturen, wie Glycosphingolipide enthaltender alternder Zellen, kommt bei spezialisierten Phagocyten, z.B. Makrophagen, vor. Ein

weiterer wichtiger Weg in den meisten Zellen beruht auf der Endozytose der Plasmamembran.<sup>[46,47]</sup> Glycosphingolipidreiche Membranteile werden internalisiert und verschmelzen mit frühen Endosomen. Zum Abbau bestimmte Glycosphingolipide werden durch Bildung innerluminaler Vesikel (multivesikulärer Körper), die das Lysosom erreichen, ausgesortiert.<sup>[48,49]</sup> Der endolysosomale Katabolismus von Glycosphingolipiden findet an der Oberfläche von Vesikeln der inneren Membran oder an durch Endozytose aufgenommenen Lipoproteinen statt (Abbildung 2). Die lysosomale Membran selbst wird durch eine Glycocalyx, die aus stark glykosidierten Membranproteinen besteht, vor dem Abbau geschützt.<sup>[50]</sup> Durch die Wirkung von Exoglycosidasen werden Kohlenhydratreste vom nichtreduzierenden Ende der GSL her nacheinander freigesetzt. Im Unterschied zu den Biosyntheseenzyme ist keine der katabolischen Glycosidasen membrangebunden. Ihre GSL-Substrate sind jedoch in innerylosomalen Membranen eingebettet. Daher benötigen GSLs mit weniger als vier Kohlenhydratresten spezifische (Glyco)sphingolipid-Aktivatorproteine (SAPs), die die Glycosidasen bei der Wechselwirkung mit ihren Zielsubstraten unterstützen. Bisher sind fünf solcher Proteine bekannt: Saposin-A, -B, -C, -D und das GM2-Aktivatorprotein. Dass diese bei In-vitro-Assays der Glycosidasen durch Tenside ersetzt werden können, sagt einiges über ihre Funktion im Katabolismus aus. Schema 3 liefert eine Übersicht über die Glycosidasen und Aktivatorproteine beim GSL-Abbau.<sup>[8,48,50]</sup>

Glucosylceramid wird durch das Enzym Glucocerebrosidase (GBA1; Glucosylceramid- $\beta$ -glucosidase) in Ceramid und Glucose gespalten.<sup>[51]</sup> GBA1 ist eine konfigurationserhaltende Glycosidase (Familie 30), und für seine Funktion in



**Schema 3.** Abbau von (Glyco)sphingolipiden in Säugetieren. Die Enzyme/Glycosidasen und Aktivatorproteine, die an den spezifischen Glycosidbindungen angreifen, sind angegeben. Ebenfalls angegeben ist die Art der Sphingolipidose (siehe Abschnitt 2), die sich bei einem Enzymdefekt manifestiert.

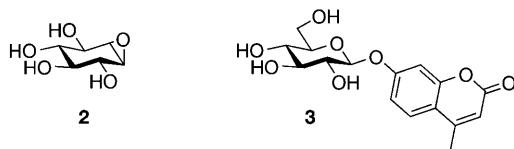
vivo ist das Aktivatorprotein Saposin C essentiell.<sup>[50]</sup> 1994 identifizierten Withers et al. den Seitenketten-Carboxylatrest der Glutaminsäure 340 als das katalytisch wirksame Nucleophil im aktiven Zentrum.<sup>[52]</sup> 2003 veröffentlichten Futerman et al. die erste Röntgenkristallstruktur von GBA1.<sup>[53]</sup> Vor kurzem folgte durch Saenger et al. die Röntgenkristallstruktur des GBA1-Aktivators, Saposin C.<sup>[54,55]</sup> Ceramid wird dann durch die saure Ceramidase in Sphingosin und Fettsäure getrennt. Es kann in anderen Teilen der Zelle auch durch neutrale Ceramidasen abgebaut werden. Sphingosin kann entweder zu Ceramid reacyliert werden oder als Substrat für die Sphingosin-1-phosphat(S1P)-Synthese fungieren.<sup>[56]</sup>

Der Metabolismus der durch Endocytose aufgenommenen Glycosphingolipide ist nicht auf die Lysosomen beschränkt. Eine begrenzte Menge des aus dem Abbau komplexer Glycosphingolipide stammenden Glucosylceramids kann dem weiteren lysosomalen Abbau entkommen und wieder in den Glycosphingolipid-Biosyntheseweg eintreten.<sup>[57]</sup> Zusätzlich kann eine direkte metabolische Remodellierung von Glycosphingolipiden an der Plasmamembran zur lokalen Bildung einfacherer Glycosphingolipide aus komplexeren führen.<sup>[58]</sup> Das Vorhandensein einer nicht-lysosomalen Glucosylceramidaseaktivität war schon lange bekannt und wurde kürzlich als  $\beta$ -Glucosidase 2 (GBA2) bestimmt.<sup>[59–61]</sup> GBA2, ein 105-kDa-Protein mit einer Transmembranregion, wurde bisher noch nicht einer bestimmten Glycosidase-Familie zugeordnet. Anders als GBA1 wird es nicht durch Conduritol-B-epoxid (**2**; CBE; Abbildung 3) in-

cosylceramid hydrolysiert. LPH ist eine konfigurationserhaltende  $\approx$  300-kDa-Glycosidase (Familie 1), die durch CBE (**2**) inhibiert wird. Sie ist an die äußere Plasmamembran gebunden und wird ausschließlich in den Microvilli der Darmepithelzellen exprimiert. LPH kann auch Galactosylceramid, Lactosylceramid sowie Glucosyl- und Galactosylsphingosin hydrolysiert, nicht aber GM1-Gangliosid.<sup>[64,65]</sup> Daher könnte LPH bei der Verdauung von aus der Nahrung stammenden GSLs im Darm eine Rolle spielen.<sup>[66]</sup> Die humane  $\beta$ -Glucosidase GBA3 ist eine im Cytosol lokalisierte konformationserhaltende Glucosidase ( $\approx$  60 kDa, Familie 1). Sie wird nicht durch CBE (**2**) inhibiert und hat ein pH-Optimum im neutralen Bereich. In-vitro-Studien mit rekombinanter GBA3 weisen auf eine breite Substratspezifität, die Glucosylceramid und Galactosylceramid einschließt. Kürzlich ermittelte Röntgenstrukturen von GBA3 enthüllten die zwei katalytisch aktiven Reste (Nucleophil: Glu-371; Säure/Base: Glu 165).<sup>[67,68]</sup>

## 2. Vererbte Sphingoliposen

Die Bedeutung des endolysosomalen Katabolismus der Sphingolipide wird am besten durch die Existenz einiger vererbbarer Krankheiten im Menschen illustriert, die durch einen Defekt in den lysosomalen Abbauwegen, den Sphingoliposen, verursacht werden (Schema 3).<sup>[50]</sup> Vererbte Defekte in einem speziellen lysosomalen Enzym oder Aktivatorprotein führen zur Akkumulation des entsprechenden (Glyco)sphingolipids.<sup>[69–71]</sup> Die häufigste der Sphingoliposen ist die Gaucher-Krankheit,<sup>[72]</sup> eine autosomal-rezessive Störung aufgrund unzureichender Glucocerebrosidase-Aktivität.<sup>[73,74]</sup> Die Manifestation der Gaucher-Krankheit ist bemerkenswert heterogen: Der Ausbruch kann sich von Geburt an bis zu einem fast asymptatischen Verlauf im hohen Alter erstrecken. Die zugrunde liegenden Mutationen im GBA1-Gen korrelieren mit der Schwere des Krankheitsbilds und besonders der Entwicklung neurologischer Symptome. Eine geringe Restenzymaktivität in Leukocyten oder Fibroblasten ist mit einem schwereren Krankheitsverlauf verbunden.<sup>[75,76]</sup> Die häufigste Mutation im GBA1-Gen, das für die Aminosäure-Schaltstation N370S codiert, hat gewöhnlich einen relativ milden Krankheitsverlauf ohne Beteiligung der Neuropathologie zur Folge. N370S-GBA1 wird normal synthetisiert und zu den Lysosomen transportiert, zeigt aber katalytische Anomalien.<sup>[77,78]</sup> Dagegen liefert die andere häufige L444P-Mutation ein Polypeptid, das sich im ER mangelhaft faltet.<sup>[77]</sup> Homozygoten für L444P-GBA1 entwickeln einen schweren, neuropathischen Verlauf der Krankheit. Im Unterschied zu anderen lysosomalen Glycosidasen akquiriert GBA1 keine Mannose-6-phosphat-Reste, wird aber durch Wechselwirkung mit dem integralen Membranprotein LIMP-2 ausgesondert und zu den Lysosomen transportiert.<sup>[79–81]</sup> Ein Mangel an LIMP-2 kann daher auch eine verringerte zelluläre GBA1-Aktivität zur Folge haben.<sup>[82]</sup> Da GBA1 das Aktivatorprotein Saposin C zum effizienten intralysosomalen Abbau von Glucosylceramid benötigt, führt ein Defizit an diesem Hilfsprotein ebenfalls zur Akkumulation von Glucosylceramid in Zellen.<sup>[83]</sup> Die meisten Gaucher-

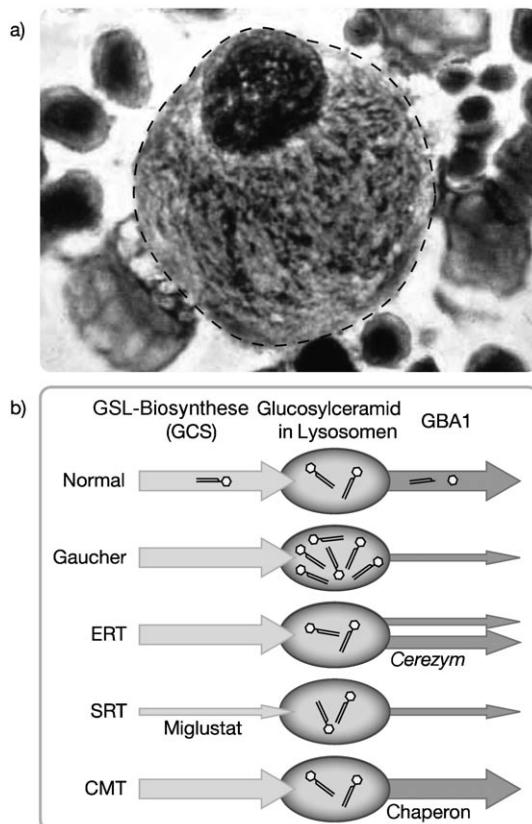


**Abbildung 3.** Strukturen von Conduritol-B-epoxid (**2**) und 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucosid (**3**).

hibiert.<sup>[60]</sup> Das Enzym hat ein pH-Optimum im neutralen Bereich, GBA1 dagegen im sauren Bereich. N- und C-terminale Fusionsproteine von GBA2 mit einem grün fluoreszierenden Protein zeigen die stärkste Fluoreszenz in der Nähe der Plasmamembran. Zugabe des fluoreszierenden Substrats 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucosid (**3**; Abbildung 3) zu GBA2 exprimierenden Zellkulturen zeigt fast sofortige GBA2-Aktivität an, was darauf hindeutet, dass das Enzym an der äußeren Plasmamembran verankert ist. Experimente mit fluoreszenzmarkiertem Glucosylceramid ergaben, dass das durch GBA2 gebildete Ceramid rasch in Sphingomyelin überführt wird, was darauf schließen lässt, dass GBA2 mit SMS2 colokalisiert ist.<sup>[60]</sup> Die Funktion von GBA2 ist gegenwärtig nicht bekannt, aber ihre Hemmung in Mäusen ist mit einer beeinträchtigten Spermatogenese verbunden; dieses Ergebnis wurde in Studien mit einem GBA2-Knockout-Mausmodell bestätigt.<sup>[61–63]</sup>

Zwei andere Glycosidasen wurden ebenfalls mit dem Glucosylceramid-Abbauweg in Verbindung gebracht. Die  $\beta$ -Glucosidase Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) kann Glu-

Patienten haben ein N370S-GBA1-Allel und entwickeln eine nicht neuropathische, sogenannte Typ-1-Krankheit. In diesen Patienten ist die Akkumulation des Substrats Glucosylceramid auf Gewebemakrophagen beschränkt. Diese stark lipidbeladenen Makrophagen, Gaucher-Zellen genannt, haben ein charakteristisches Aussehen (siehe Abbildung 4a). Gau-



**Abbildung 4.** a) Gaucher-Zelle; b) Schema der Gaucher-Krankheit und potenzielle Therapien.

cher-Zellen sind wachstumsfähig und sekretieren charakteristische Proteine wie Chitotriosidase und CCL-18.<sup>[84,85]</sup> Erhöhte Spiegel dieser Proteine sind in Gaucher-Patienten nachweisbar, und ihre Messung wird gegenwärtig verwendet, um den Fortschritt der Krankheit sowie die Wirksamkeit der therapeutischen Maßnahmen<sup>[86]</sup> zu verfolgen (Abbildung 4b; Besprechung siehe Abschnitt 4.3). Das massive Auftreten von Gaucher-Zellen in verschiedenen Geweben führt zu charakteristischen klinischen Symptomen wie Hepatosplenomegalie, Pancytopenia und Skelettschädigung. Die pathologischen Befunde der Störung resultieren vermutlich aus der ständigen Freisetzung von Hydrolasen und Cytokinen durch Gaucher-Zellen und umgebende Phagocyten.<sup>[87-91]</sup>

Vererbte Defekte der sauren Sphingomyelinase (Niemann-Pick-Krankheit A/B), sauren Ceramidase (Farber-Krankheit), Galactocerebrosidase (Krabbe-Krankheit),  $\beta$ -Hexosaminidase (Sandhoff- und Tay-Sachs-Krankheit), sauren  $\beta$ -Galactosidase (GM1-Gangliosidose), sauren  $\alpha$ -Galactosidase A (Fabry-Krankheit) und in den Saposin- und GM2-Aktivatorgenen ergeben ebenfalls Sphingolipidosen

(Schema 3). Interessanterweise akkumulieren im Fall der Krabbe- und der Fabry-Krankheit nicht nur die Glycosphingolipid-Substrate, sondern auch ihre *N*-deacylierten Derivate (Psychosin bzw. Globotriaosylsphingosin). Beide sind wichtig für die Pathophysiologie dieser Erkrankungen.<sup>[50,92]</sup> Die Tatsache, dass es nur wenige Erbkrankheiten gibt, die die Biosynthese der SLs und GSLs beeinträchtigen, bestätigt deren essenzielle physiologische Funktion.<sup>[71]</sup> Zu diesen wenigen Beispielen gehören der GM3-Synthase-Defekt,<sup>[93]</sup> erbliche sensorische Neuropathie (Defekt in einer Untereinheit der Serin-Palmitoyl-Transferase)<sup>[94]</sup> und Defekt der  $\alpha$ -1,4-Galactosyltransferase, der  $Gb_3$ -Synthase (woraus sich der seltene P-Blutgruppen-Phänotyp ergibt).<sup>[95]</sup> Systemische Deletion des GCS-Gens in einem Mausmodell führte in frühen Stadien der Embryogenese zum Tod.<sup>[96]</sup>

### 3. Glycosphingolipide in Gesund- und Krankheitszuständen

GSLs und SLs wurden ursprünglich als rein strukturelle Membrankomponenten angesehen. Die große Heterogenität der SL- und GSL-Strukturen durch Variation der Sphingoid-Base und des *N*-Acylierungs- und Glycosylierungsmusters lässt jedoch auf ein hohes Maß an funktioneller Komplexität schließen. Durch die Forschung der letzten Jahrzehnte wurde nachgewiesen, dass (Glyco)sphingolipide an vielen (patho)physiologischen Vorgängen beteiligt sind.<sup>[97,98]</sup> Die folgenden Abschnitte behandeln einige der biologischen Funktionen, die den SLs und GSLs zugeschrieben werden.

#### 3.1. Glycosphingolipide und Lipid-Rafts

Die Wirkungsweise von GSLs auf Zelloberflächen kann grob in zwei Grundfunktionen unterteilt werden: 1) Beteiligung an Zelladhäsions-/Erkennungsprozessen durch Wechselwirkungen mit GSL und Lectinen auf anderen Zellen und Modulation der Signaltransduktion durch Beeinflussung der Rezeptorproteine auf der Zelloberfläche. Anders als Phosphoglycerolipide verteilen sich GSLs und SLs nicht gleichmäßig in der äußeren Plasmamembran. Stattdessen wird postuliert, dass sie zusammen mit Cholesterin halbgeordnete Lipid-Mikrodomänen, auch Lipid-Rafts genannt, bilden.<sup>[99-103]</sup> Gewisse Proteine scheinen mit diesen Mikrodomänen zu assoziieren, darunter GPI-verankerte Proteine, Flotilline, Caveoline, an G-Proteine geknüpfte Rezeptoren und bestimmte Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor und der Insulinrezeptor. Die Lipid-Mikrodomänen existieren in einer gelartigen flüssiggeordneten Phase ( $I_o$ ), die eine niedrigere Diffusionsgeschwindigkeit hat als die umliegende flüssig-ungeordnete ( $I_d$ ) Phosphoglycerolipid-reiche Plasmamembran.

Durch Extraktion von Membranen bei 4°C in Gegenwart spezieller Tenside wurden Lipid-Mikrodomänen, sogenannte tensidresistente Membrandomänen (DRMDs), isoliert und ihre Existenz somit nachgewiesen. Die physiologische Relevanz der mit dieser Methode erhaltenen Befunde wird noch diskutiert, da die Zusammensetzung und Dynamik der bei

4°C mit Tensid extrahierten Membranen ziemlich von der Situation in lebenden Zellen bei 37°C abweichen kann.<sup>[104]</sup> Die folgende aktuelle Definition der Lipid-Rafts veranschaulicht die vorhandenen Probleme für die weitere Untersuchung: Membran-Rafts sind kleine (10–200 nm), heterogene, höchst dynamische ( $\approx$  0.1–1000 ms), Sterin- und Sphingolipid-angereicherte Domänen, die zelluläre Prozesse kompartimentieren. Gegenwärtig sind Existenz und physiologische Rolle der Lipid-Rafts noch sehr umstritten, und es werden weniger invasive Methoden benötigt, um die Lipid-Rafts in lebenden Zellen nachzuweisen und zu erforschen. Eine dieser Methoden, die STED-Mikroskopie (stimulated emission depletion), hat es vor kurzem ermöglicht, in lebenden Zellen nachzuweisen, dass SL- und GPI-gebundene Proteine tatsächlich vorübergehend in Cholesterin enthaltenden Domänen ( $\approx$  20 nm) eingeschlossen werden.<sup>[105]</sup> Mehrere neuere Übersichten dokumentieren den gegenwärtigen Stand der Forschung über Lipid-Rafts.<sup>[106,107]</sup> Obwohl sich aktuelle Studien von Lipid-Rafts meist auf die Zellaußenseite konzentrieren, war ihre ursprünglich vorgeschlagene Funktion die intrazelluläre Sortierung. Mit BODIPY-markierten GSLs zeigten Pagano et al., dass GSL enthaltende Mikrodomänen auch intrazellulär auftreten und dass diese eine wichtige Funktion bei der Caveolae-vermittelten Endozytose und der endosomalen Sortierung vieler zellulärer Proteine und Lipide ausüben.<sup>[108,109]</sup>

### 3.2. Sphingolipide und zelluläre Signalübertragung

SLs sind an zahlreichen intra- und extrazellulären Signalübertragungsprozessen beteiligt, sowohl als Signalmoleküle als auch als sekundäre Botenstoffe (second messengers).<sup>[110,111]</sup> Das am häufigsten vorkommende SL ist Sphingomyelin, das in bestimmten Geweben bis zu 30% der gesamten Membranlipide ausmacht.<sup>[112]</sup> Für die Plasmamembran wird postuliert, dass Sphingomyelin überwiegend mit Cholesterin und GSL unter Bildung von Mikrodomänen assoziiert. Es wird an zwei verschiedenen Stellen in der Zelle synthetisiert und durch neutrale, alkalische und saure Sphingomyelinasen, die überall in der Zelle verteilt sind, in Ceramid umgewandelt. Hitzeschock, oxidativer Stress und andere schädigende Bedingungen veranlassen die Zellen zur Produktion erhöhter Ceramidspiegel, die mit Signaltransduktionswegen in Zusammenhang gebracht werden, die zur Apoptose führen.<sup>[9]</sup> Ceramid kann in Ceramid-1-phosphat und über Sphingosin in Sphingosin-1-phosphat überführt werden (Schema 1). Über die Funktion von Ceramid-1-phosphat ist wenig bekannt, aber es ist an inflammatorischen Signalwegen beteiligt und gilt als Promotor für das Überleben der Zelle.<sup>[20,113]</sup> Sphingosin reguliert vermutlich intrazellulär die Aktivität mehrerer Kinasen. Sphingosin-1-phosphat fungiert für etliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren als extrazellulärer Ligand und ist in vielen Signalwegen, die Zellmigration, Zellwachstum und Angiogenese betreffen, eingebunden. Im Allgemeinen wirkt Sphingosin-1-phosphat entgegengesetzt zu Ceramid, indem es Wachstum und Überleben der Zelle fördert.<sup>[20,113]</sup> Schließlich wurde gezeigt, dass das weniger gut untersuchte Sphingosylphosphorylcholin die

Zellteilung anregt und an proinflammatorischen Signalwegen beteiligt ist.<sup>[22,23]</sup>

### 3.3. Glycosphingolipide in der Immunologie

$\alpha$ -Galactosylceramid, ein GSL aus Meeresschwämmen, das im Menschen nicht vorkommt, wird gewöhnlich als Modell-Ligand verwendet, um Bindung und Übergabe von Glycolipiden durch CD1d-Moleküle an invariante natürliche Killer-T-Zellen (iNKT-Zellen) zu studieren. Nach Erkennung des  $\alpha$ -Galactosylceramids durch iNKT-Zellen führt eine Kaskade von Ereignissen zur Aktivierung verschiedener Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems.<sup>[114]</sup>

Das Säugetier-GSL Isoglobotrihexosylceramid (iGb3; Gal- $\alpha$ 1,3-Lactosylceramid) wurde als der endogene Selbstligand vorgeschlagen, der sich entwickelnde iNKT-Zellen aufgrund ihrer normalen Funktion selektiert.<sup>[115]</sup> Zwei Studien widersprachen kürzlich diesen Ergebnissen.<sup>[116,117]</sup> Beobachtungen, dass die intrazelluläre CD1d-Antigen-Beladung in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten mit niedrigem pH-Wert stattfindet und von der Gegenwart von Saposin-Aktivator-Proteinen abhängig ist, weisen darauf hin, dass noch ein anderes GSL als Selbstligand in Betracht kommt. Dies wird weiter untermauert durch den Befund, dass GCS-defiziente Mäuse (durch Gen-Knock-out oder Inhibierung mit PDMP (1)) nicht fähig sind, das Antigen auf CD1d zu präsentieren und ihre iNKT-Zellen zu aktivieren.<sup>[118]</sup> Für eine umfassendere Besprechung zur Rolle von (Glyco)sphingolipiden in der Immunologie sei auf mehrere neuere Übersichten verwiesen.<sup>[119,120]</sup>

### 3.4. Glycosphingolipide im Gehirn

Angefangen mit der Arbeit von Thudichum wurde in der GSL-Forschung schon früh die Bedeutung der GSLs im Hirngewebe erkannt. Besonders den Neu5Ac-terminalen sauren Gangliosiden scheint eine wichtige Rolle in der Neurochemie zuzukommen. Sie werden in hohen Konzentrationen im Hirngewebe gefunden und machen bis zu 25% des Lipidgehalts der äußeren Membran aus. Während der Embryogenese und der postnatalen Periode wird im sich entwickelnden Gehirn ein kleiner Teil saurer Ganglioside stark exprimiert. Im adulten Gehirn sind die Gangliosidspiegel sehr viel niedriger, aber es werden viel mehr unterschiedliche Gangliosidarten exprimiert.<sup>[121]</sup> Mehrere Knock-out-Mausmodelle der Glycosyltransferasen in der GSL-Biosynthese haben etwas Aufschluss über ihre Funktionsweise im Gehirn gebracht. Die selektive Deletion von GCS in Nervenzellen verhinderte die Bildung der Ganglioside im Gehirn und führte zur Geburt von Tieren mit schweren Nervendefekten, die innerhalb von drei Wochen starben.<sup>[122]</sup> Knock-out-Modelle mehrerer an der Biosynthese komplexerer Ganglioside beteiligter Transferasen deuten darauf hin, dass ein gewisses Maß an funktioneller Redundanz zwischen den Gangliosiden des Gehirns besteht.<sup>[9,123]</sup> Hirn-Ganglioside wurden auch mit mehreren neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Unter Parkinson-Patienten kamen deutlich mehr

Träger mutierter GBA1-Allele vor.<sup>[124]</sup> Offenbar kann eine verringerte GBA1-Funktion Menschen anfälliger für die Parkinson-Krankheit machen. Des Weiteren hat eine verringerte GCS-Aktivität im Hirngewebe von Alzheimer-Patienten<sup>[125]</sup> eine Zunahme von Ceramid und eine Abnahme der Gehalte an komplexen GSL zur Folge, was wiederum eine anomale Funktion der Nervenzellen in Alzheimerpatienten verursachen könnte. Die anomale Funktion könnte durch Infusionen mit Gangliosid GM1 verhindert werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass GM1-angereicherte Membranmikrodomänen ebenfalls eine entscheidende Rolle für die Pathologie der Alzheimer-Krankheit spielen, indem sie die Bildung von Amyloidablagerungen oder -plaques durch Aggregation des Amyloid-β-Proteins fördern.<sup>[126]</sup>

### 3.5. Glycosphingolipide in der Haut

GSLs und SLs sind für die normale Funktion der Haut unbedingt notwendig. Ceramide und Keratine bilden die wesentlichen Komponenten des epidermalen Stratum Corneum, das die Haut aller landlebenden Tiere undurchlässig für Wasser macht und dadurch die tödliche Dehydratation verhindert.<sup>[127]</sup> Ceramide belegen den extrazellulären Raum des Stratum Corneum und sind durch eine *N*-Acyclierung des Sphingoid-Rückgrats mit langen  $\omega$ -Hydroxyfettsäureketten ( $C_{30}$ – $C_{36}$ ) charakterisiert.<sup>[8]</sup> Die  $\omega$ -Hydroxygruppen in diesen Ceramiden können mit Fettsäuren acyliert oder kovalent an epidermale Proteine gebunden werden.<sup>[128]</sup> Ceramid in Keratinocyten der Epidermis enthält häufig (ca. 40%)<sup>[129]</sup> Phytosphingosin anstelle von Sphingosin. In der Epidermis werden Ceramide durch Exozytose von Sphingomyelin-Zwischenstufen und freiem oder proteingebundenem<sup>[130]</sup> Glucosylceramid in den extrazellulären Raum ausgeschieden. Gleichzeitig sondern Keratinocyten Vesikel ab, die GBA1, Saposin C und Sphingomyelinase enthalten, die diese Zwischenstufen hydrolysieren, um an der erforderlichen Stelle Haut-Ceramide zu bilden. Tatsächlich macht Glucosylceramid rund 4 % der gesamten epidermalen Lipidmasse aus. Ein Knock-out-Mausmodell mit einer Keratinocyt-spezifischen GCS-Defizienz bewies kürzlich die lebenswichtige Rolle von Glucosylceramid als Intermediat bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut.<sup>[131]</sup> Die mutierten Tiere zeigten ein in hohem Maße anomales Stratum Corneum und starben innerhalb von fünf Tagen nach der Geburt an Dehydratation. Hemmung der GBA1-Aktivität durch lokale Behandlung der Haut mit CBE (2) beeinträchtigte ebenfalls die Funktion der Haut.<sup>[127]</sup> Entsprechend wurden in Patienten mit schweren Formen der Gaucher-Krankheit Hautanomalien beobachtet. Viele Hautleiden wie Psoriasis zeigen einen anomalen SL- und GSL-Stoffwechsel.

Vor kurzem wurde gezeigt, dass eine der Ursachen der schweren Hautstörung Harlequin ichthyosis eine Mutation ist, die zu einem defekten ABCA12-Lipidtransporter führt. Dieser Defekt hat einen verminderten extrazellulären Transport von Glucosylceramid zur Folge. In einem zellulären Modell konnten die Krankheitserscheinungen durch korrigierenden ABCA12-Gentransfer behoben werden.<sup>[132]</sup>

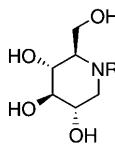
In Patienten mit atopischer Dermatitis stellte man fest, dass das Enzym SM-Deacylase überexprimiert wird und der Sphingosylphosphorylcholin (SPC)-Spiegel um 300 % erhöht ist.<sup>[133]</sup> Extrazellulär abgesonderte SM-Deacylase in der Epidermis kann auch Glucosylceramid zu Glucosylsphingosin deacylieren.<sup>[134]</sup> Die erhöhte Aktivität dieses Enzyms trägt vermutlich zum Krankheitsbild der Dermatitis bei, indem es die ausreichende Produktion von Ceramiden im Stratum Corneum verhindert.

### 3.6. Glycosphingolipide und Pathogene

GSLs werden in erhöhten Konzentrationen in den äußeren Membranen von apikalen Zellen, die die Innenseite des Magens, der Eingeweide und der Atmungswege säumen, gefunden. Apikale Zellen bilden die erste Barriere des Körpers zur Außenwelt und sind die ersten, die mit potenziellen Krankheitserregern in Kontakt kommen. Viele Krankheitserreger haben Mechanismen entwickelt, die GSLs auf der Oberfläche apikaler Zellen für die Infektion und das Eindringen in den Wirt ausnutzen. Membranmikrodomänen, die reich sind an GSLs mit terminalen Neu5Ac-Resten, werden häufig von Viren, Bakterien und Protozoen angegriffen. HIV-1-, Ebola- und Marburg-Viren verwenden alle diese Membranmikrodomänen, um sich an Wirtszellen zu binden, in sie einzudringen und sich dort vermehren.<sup>[135]</sup>

Eines der am besten untersuchten Beispiele ist das der Influenza-A/B/C-Virusfamilie, das mit der gegenwärtigen Pandemie der H1N1-Grippe („Schweinegrippe“) zu einem sehr aktuellen Thema geworden ist. Das Influenza-Virus hat nur drei unterschiedliche Oberflächenproteine, von denen die beiden häufigsten spezifisch auf die terminalen Neu5Ac-Reste der GSL und Glycoproteine des menschlichen Wirts gerichtet sind. Das als Hämagglobulin (H) bezeichnete Protein ist ein spezifisches Lectin für Neu5Ac und befähigt das Virus, sich an die Wirtzelle zu binden, worauf es durch Endozytose aufgenommen wird. Demgegenüber ist die H5N1-Grippe („Vogelgrippe“) beim Menschen bisher nur gering infektiös, weil das Hämagglobulin des Virus spezifisch die terminale  $\alpha$ -2-3-verknüpfte Neu5Ac in den Atemwegen von Vögeln erkennt, während Menschen vorwiegend terminale  $\alpha$ -2-6-verknüpfte Neu5Ac in ihren oberen Atemwegen aufweisen<sup>[136]</sup> (bei der H1N1-Pandemie von 1918 („Spanische Grippe“) hatte sich das Virus so verändert, dass diese 2-6-Verknüpfung als bevorzugtes Strukturmotiv erkannt wurde).<sup>[137]</sup> Das zweite virale Protein, eine als Neuraminidase (N) bezeichnete Sialidase, übernimmt die Weiterverarbeitung der in der Wirtzelle entwickelten Nachkommen der Viruspartikel, indem es Neu5Ac durch Hydrolyse aus der Wirtzelle und vom wachsenden Viruspartikel abspaltet, um so die Freisetzung von der Wirtzelle zu erreichen bzw. die Selbstagglutination der Viren zu verhindern.<sup>[136]</sup> Neben den aktuell verwendeten antiviralen Medikamenten, den Neuraminidase-Inhibitoren Tamiflu und Relenza, sind auch 1-Desoxynojirimycin-basierte Iminozucker wie Miglustat (4; siehe Tabelle 1) erfolgreich eingesetzt worden, um die Vermehrung der verschiedenen Viren in Zellmodellen zu unterdrücken.<sup>[138, 139]</sup> Viele Viren exprimieren Glycoproteine auf ihrer Oberfläche,

**Tabelle 1:** Inhibitorisches Profil ( $IC_{50}$  in vitro in  $\mu\text{M}$ ) und Cytotoxizität für N-alkylierte 1-Desoxynojirimycine.

		GCS	Zellproliferation, $CC_{50}^{[b]}$	GBA1
7: R = H	2 mM (0%) <sup>[a][201]</sup>	> 5 mM <sup>[201]</sup>	240 <sup>[203]</sup>	
20: R = Me	200 (31 %) <sup>[a][202]</sup>	–	150 <sup>[203]</sup>	
21: R = Et	200 (52 %) <sup>[a][202]</sup>	–	–	
22: R = Propyl	200 (69 %) <sup>[a][202]</sup>	–	700 <sup>[203]</sup>	
4: R = Butyl	34.4 <sup>[196]</sup>	> 10 mM <sup>[201]</sup>	270 <sup>[203]</sup>	
23: R = Hexyl	23.8 <sup>[196]</sup>	> 1 mM <sup>[196]</sup>	13 <sup>[203]</sup>	
24: R = Octyl	16.6 <sup>[196]</sup>	984.1 <sup>[196]</sup>	0.82 <sup>[203]</sup>	
25: R = Nonyl	7.4 <sup>[196]</sup>	118.9 <sup>[196]</sup>	0.66 <sup>[203]</sup>	
26: R = Decyl	3.1 <sup>[196]</sup>	95.5 <sup>[196]</sup>	–	
27: R = Dodecyl	5.2 <sup>[196]</sup>	39.7 <sup>[196]</sup>	0.05 <sup>[204]</sup>	
28: R = Hexadecyl	3.4 <sup>[196]</sup>	25.1 <sup>[196]</sup>	–	
29: R = Octadecyl	4.0 <sup>[196]</sup>	36.6 <sup>[196]</sup>	–	
30: R = 7-Oxadecyl	3.2 <sup>[201]</sup>	> 5 mM <sup>[201]</sup>	–	
31: R = 7,10,13-Trioxatetradecyl	200 (93 %) <sup>[a][197]</sup>	–	–	

[a] Inhibition in Prozent bei der angegebenen Konzentration. [b]  $CC_{50}$  = halbmaximale cytotoxische Konzentration.

und Glucosidase-Inhibitoren können die korrekte Weiterreaktion der viralen N-Glycoproteine im ER des Wirts unterbrechen, indem sie das „Trimming“ durch die ER-Glucosidase I + II und die Calnexin/Calreticulin-Bindung hemmen. Obwohl daraus bisher noch kein brauchbarer antiviraler Wirkstoff entstanden ist, hat die erfolgreiche und fortwährende Entwicklung von Iminozuckern als Therapeutika zur Behandlung GSL-bedingter Krankheit von dieser bahnbrechenden Arbeit stark profitiert.

Ein weiterer bakterieller Erreger, der die GSL des Wirts missbraucht, ist *Helicobacter pylori*. Dieser verursacht Magengeschwüre und infiziert die Magenwand durch Bindung von Lectin an verschiedene GSLs des Wirts, darunter das dimere Sialyl-Lewis-X-Antigen (Neolacto-Serie mit einem terminalen Neu5Ac- und zwei terminalen L-Fucose-Resten).<sup>[140]</sup> Ein Ausdünnen der Oberflächen-GSLs durch Inhibition von GCS mit Miglustat (4) oder PDMP (1) beeinträchtigt die Adhäsion verschiedener Bakterienspezies an Wirtzellen.<sup>[141,142]</sup> *Vibrio cholerae* schließlich exprimiert eine Sialidase, die terminale Neu5Ac von komplexen GSLs (z.B. Gangliosid GD1a) auf der apikalen Oberfläche der Darmepithelzellen des Wirts entfernt. Dieser Vorgang legt die apikalen GM1-Ganglioside frei, an die das Choleratoxin binden kann und dann nach Internalisierung Diarröh herverruft.<sup>[143,144]</sup>

### 3.7. Glycosphingolipide und Krebs

Die meisten Tumorzellen zeigen veränderte GSL-Muster auf ihrer Oberfläche sowie anomale SL-Signalübertragung und verstärkte GSL-Biosynthese, die zusammen eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasenbildung spielen.<sup>[145,146]</sup> Die humane Sialidase, Neu3,

kommt in Caveolae enthaltenden Mikrodomänen der Plasmamembran vor und spaltet terminale Neu5Ac-Reste von GSL ab.<sup>[147]</sup> Sie wird bei vielen Krebsarten überexprimiert und ist wichtig für Wachstum und Fortbestand von Tumoren.<sup>[148]</sup> Tumorzellen entfernen auch aktiv bestimmte Ganglioside von der Zelloberfläche, um sich selbst vor dem Immunsystem des Körpers zu verbergen.<sup>[149]</sup>

Die Wirkung vieler Chemotherapeutika und Radiotherapien zur Behandlung von Krebsleiden beruht auf deren Vermögen, die Ceramidspiegel in Tumorzellen zu erhöhen, um die ceramidvermittelte Apoptose anzuregen. Viele Tumore zeigen verstärkte GCS-Expression und -Aktivität. Man geht teilweise davon aus, dass dies als Entgiftungsme- thode für die erhöhten Ceramid-Spiegel durch Umwandlung in Glucosylceramid wirkt. Medikamentenresistente Krebszelllinien zeigen bis zu dreifach höhere Spiegel an Glucosylceramid. Viele Tumore erreichen eine Medikamentenresi- tenz, indem sie die Wirkstoffe mithilfe der Familie der ABC-Transporterproteine aktiv herauspumpen. Eine Überexpres- sion der häufigsten Effluxpumpe, P-Glycoprotein, deckt sich mit der abnorm hohen GCS-Aktivität in Krebsarten wie Brustkrebs, Leukämie, Melanom und Darmkrebs, die gegen mehrere Wirkstoffe resistent sind. P-Glycoprotein ist ein an der Plasmamembran verankertes 170-kDa-Protein, das sich in GSL enthaltenden Membranmikrodomänen befindet. Unter Verbrauch von ATP kann es eine breite Auswahl nichtgela- dener amphiphiler Moleküle – unter anderem Glucosylcer- amid – vom Cytosol zur äußeren Plasmamembran transpor- tieren. Die Überexpression der P-Glycoprotein-Effluxpumpe ist tatsächlich eines der am besten übereinstimmenden Kennzeichen der Wirkstoffresistenz vieler Pathogene, ein- schließlich der Antimalariaresistenz von *Plasmodium fal- ciparum*, der Chemotherapie-Resistenz des Protozoons *Leishmania* und der Resistenz gegen Makrolidantibiotika bei *S. pneumoniae*.<sup>[150,151]</sup>

### 3.8. (Glyco)sphingolipide und Insulinresistenz

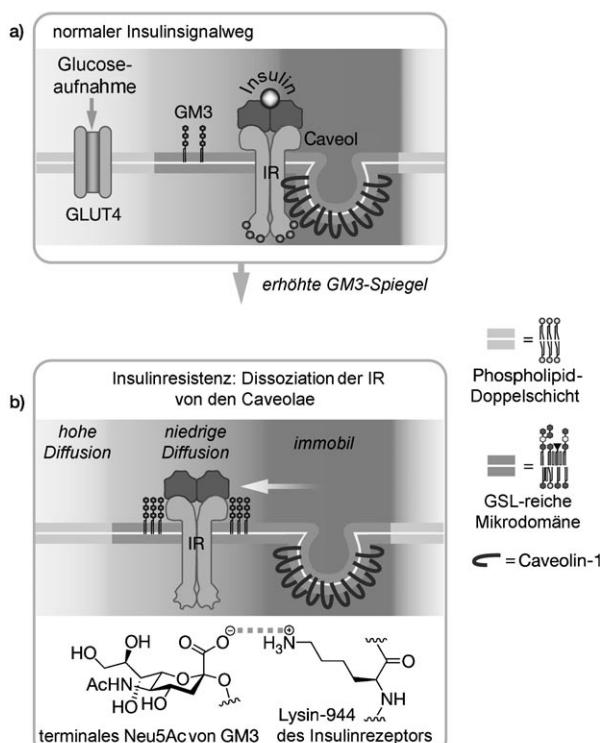
Die zunehmende Menge unserer Nahrung bei zugleich höher werdendem Energiegehalt in Verbindung mit einer allgemein sinkenden körperlichen Aktivität ist die Ursache für ein steigendes Auftreten von Fettleibigkeit. Fettleibigkeit ist mit einem erhöhten Risiko für eine verminderte Insulinempfindlichkeit verbunden. Diese sogenannte Insulinresi- tenz ist charakterisiert durch eine verringerte insulinvermit- telte Glucoseaufnahme und eine beeinträchtigte Unterdrückung der Lipolyse sowie der hepatischen Glucoseproduktion. Ein weiteres gemeinsames Merkmal adipöser Individuen ist das Auftreten niedriggradiger (low-grade) Ent- zündungen, vermittelt durch Cytokine, die von Makrophagen in das adipöse Gewebe sekretiert werden, wodurch die Insulinresistenz weiter gefördert wird.<sup>[152]</sup> Im letzten Jahrzehnt haben sich Hinweise gehäuft, die den überschüssigen Lipiden in der Ätiologie der durch Fettleibigkeit induzierten Insulinresistenz eine Schlüsselrolle zuweisen.<sup>[153]</sup> Ein Lipidüber- schuss im Gewebe beeinträchtigt die Signalübertragung und Wirkung von Insulin. Es besteht eine starke inverse Bezie- hung zwischen dem intramyozellulären Lipidgehalt und der

insulinstimulierten Glucoseaufnahme im gesamten Körper.<sup>[154]</sup> Man geht davon aus, dass der Überschuss an Triglyceriden und freien Fettsäuren, der in auf Insulin reagierende Gewebe transportiert wird, zu hohen lokalen Konzentrationen anderer Lipide – darunter auch Sphingolipide – führt. Überschüssige Sphingolipide behindern die Insulinsignale und fördern Entzündungen. In Zellmodellen beispielsweise hemmen erhöhte Ceramidkonzentrationen den Insulinsignalweg auf der Stufe der Akt/Proteininkinase B (PKB).<sup>[155]</sup> Da die Funktion von Ceramid und der Glycosphingolipide bei der Insulinresistenz schon umfassend besprochen wurde,<sup>[156–159]</sup> werden hier nur die neuesten Befunde diskutiert, die die Bedeutung der Glycosphingolipide für die Regulation der Insulinempfindlichkeit unterstreichen.

Der Insulinrezeptor ist an der Zelloberfläche in GSL-enthaltenden Lipidmikrodomänen lokalisiert (Abbildung 5a). Die Wechselwirkung zwischen Gangliosiden und

diesem Effekt entgegenwirkt.<sup>[162]</sup> GM3-defizierte Mäuse zeigten nach Ligandbindung eine erhöhte Phosphorylierung des Insulinrezeptors der Skelettmuskeln und waren vor einer durch fettreiche Diät hervorgerufenen Insulinresistenz geschützt.<sup>[163]</sup> Damit im Einklang ist ein neuer Bericht über die verbesserte Insulinempfindlichkeit und Glucosetoleranz in Mäusen mit erhöhter Expression der GM3-abbauenden Sialidase, Neu3.<sup>[164]</sup> Umgekehrt sind in den Muskeln bestimmter fetteibiger insulinresistenter Maus- und Rattenmodelle die GM3-Spiegel angehoben.<sup>[161]</sup> Ein veränderter Sphingolipid-Metabolismus, der sich in erhöhten Glycosphingolipidspiegeln niederschlägt, wurde kürzlich auch im Zusammenhang mit der neuronalen Pathologie bei diabetischer Retinopathie (Netzhauterkrankung) dokumentiert.<sup>[165]</sup> Kabayami et al. wiesen unlängst nach, dass die Wechselwirkung von GM3 mit dem Insulinrezeptor durch einen spezifischen Lysinrest vermittelt wird, der genau über der Transmembrandomäne des Rezeptors lokalisiert ist, und dass überschüssiges GM3 die Dissoziation des Insulinrezeptors von den Caveolae – den für die Insulinsignalübertragung wesentlichen Membranbereichen – fördert (Abbildung 5b).<sup>[166]</sup>

Der Nutzen einer pharmakologischen Absenkung überhöhter Glycosphingolipidspiegel für die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit wurde kürzlich demonstriert. Holland et al. beschrieben, dass die Hemmung der Synthese von Ceramid, einer Vorstufe der Glycosphingolipide, die Glucosetoleranz deutlich verbessert und den Ausbruch von offenem Diabetes in adipösen Nagetieren verhindert.<sup>[167]</sup> Zhao et al. zeigten, dass sich die Inhibierung der ersten Biosynthesestufe von Glycosphingolipiden, die durch GCS katalysiert wird, günstig auswirkt. Der GCS-Inhibitor Genz-123346 (**5**; Abbildung 6) senkte die Blutglucose- und HbA1C-Spiegel und steigerte die Glucosetoleranz in insulinresistenten Nagetieren.<sup>[168]</sup> Schließlich zeigten wir, dass die Behandlung verschiedener fetteibiger Nagetiere mit dem hydrophoben Iminozucker *N*-(5-Adamantan-1-yl-methoxy)-pentyl-1-desoxynojirimycin (**6**; Abbildung 7), einem gut tolerierten und wirksamen Inhibitor von GCS, sehr deutlich die zirkulierenden Glucosespiegel herabsetzte, die orale Glucosetoleranz verbesserte, HbA1C reduzierte und die Insulinempfindlichkeit in Muskeln und Leber verbesserte.<sup>[169]</sup> Eine weitere günstige Eigenschaft von **6** ist dessen Fähigkeit, die Funktion der Fettzelle zu steigern und Entzündungen im adipösen Gewebe fetteibiger Mäuse zu verringern.<sup>[170]</sup> Die Reduzierung von Glycosphingolipiden durch Behandlung mit **6** zeigte früher auch in Mausmodellen für entzündliche Darmerkrankung günstige Wirkungen.<sup>[171]</sup>

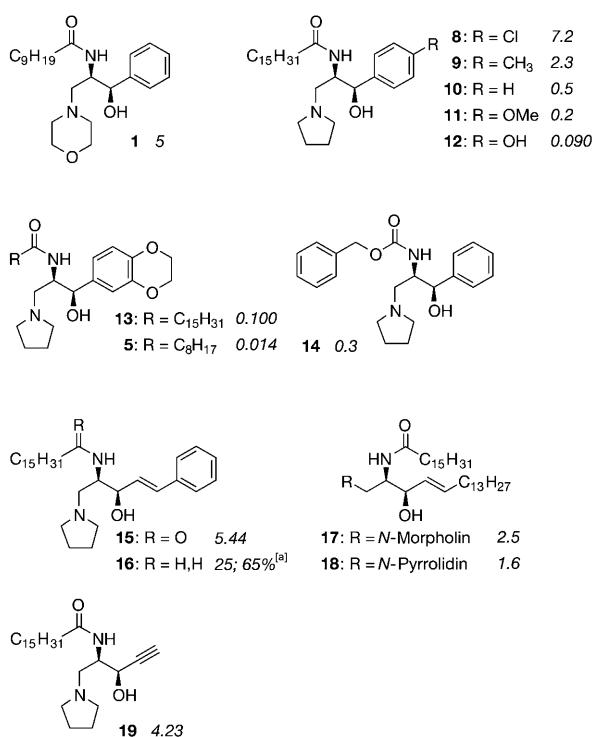


**Abbildung 5.** Der Insulinrezeptor (IR) und seine membranäre Umgebung unter Normalbedingungen (a) und bei Insulinresistenz (b).

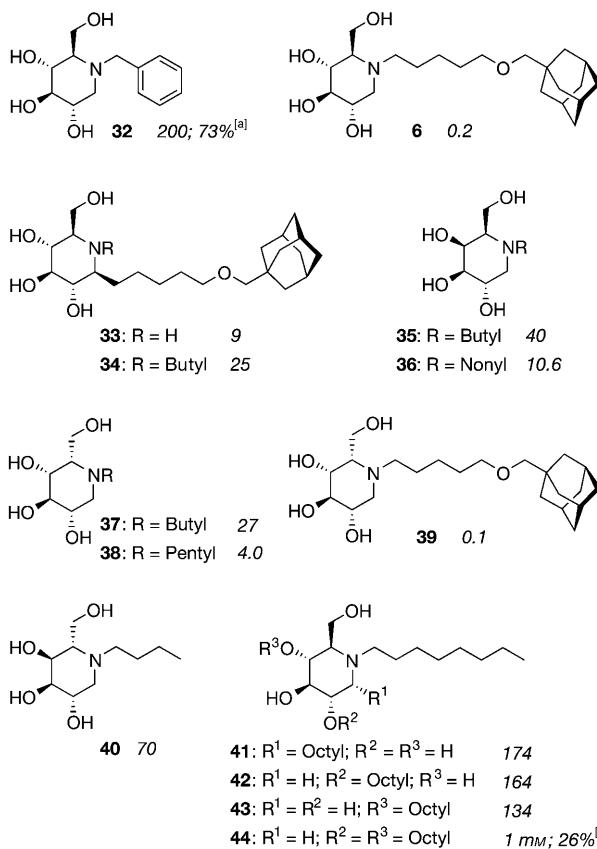
Insulinrezeptor wurde ursprünglich von Nojiri et al.<sup>[160]</sup> beschrieben, die eine Gangliosid-vermittelte Hemmung des insulinabhängigen Zellwachstums von Leukämie-Zelllinien nachwiesen. Tagami et al. zeigten als erste, dass durch Zugabe von GM3-Gangliosid zu kultivierten Adipozyten (Fettzellen) die Phosphorylierung des Insulinrezeptors und seines Downstream-Substrats IRS-1 unterdrückt wird, was eine verringerte Glucoseaufnahme zur Folge hat.<sup>[161]</sup> Inokuchi et al. berichteten, dass bei Einwirkung von TNF- $\alpha$  auf kultivierte Fettzellen der GM3-Spiegel steigt und IR- und IRS-1-Phosphorylierung inhibiert werden. Es wurde gefunden, dass PDMP (**1**), ein Inhibitor der Glycosphingolipid-Biosynthese,

#### 4. Modulation des GSL-Metabolismus: Inhibitoren und Chaperone

Niedermolekulare Inhibitoren der am Glycosphingolipid-Metabolismus beteiligten Enzyme werden weitverbreitet als Hilfsmittel für die Forschung eingesetzt, sind Gegenstand therapeutischer Studien und haben in einigen Fällen klinische Anwendung bei der Bekämpfung GSL-abhängiger Krankheiten gefunden. Von besonderem Interesse sind Verbindungen, die mit dem Glucosylceramid-Stoffwechsel interfe-



**Abbildung 6.** Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) PDMP-basierter GCS-Inhibitoren. [a] Prozentuale Inhibition bei der angegebenen Inhibitorkonzentration (in  $\mu\text{M}$ ).



**Abbildung 7.** Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) Piperidin-basierten GCS-Inhibitoren. [a] Prozentuale Inhibition bei der angegebenen Inhibitorkonzentration (in  $\mu\text{M}$ ).

rieren. Aus der Klasse der kovalenten Glycosidase-Inhibitoren wurde hauptsächlich CBE (2) zur irreversiblen Hemmung von GBA1 eingesetzt.<sup>[172]</sup> Die meisten der beschriebenen Inhibitoren für GBA1 und GCS sind reversible Inhibitoren und basieren auf dem natürlich vorkommenden Iminozucker 1-Desoxynojirimycin (7; siehe Tabelle 1) und seinen strukturellen und stereochemischen Kongeneren. Iminozucker sind Derivate von Kohlenhydraten, in denen das endocyclische Sauerstoffatom durch ein Stickstoffatom ersetzt ist, und die dadurch Glycosidasen<sup>[173–175]</sup> und in geringerem Ausmaß Glycosyltransferasen hemmen können.<sup>[176,177]</sup> Die strukturelle Diversität der Iminozucker führt zu einem hohen Grad an Selektivität unter den Aminozuckern bei der Hemmung spezifischer Glycosidasen und Transferasen.<sup>[178,179]</sup>

Angesichts der Schwierigkeiten bei der Isolierung großer Mengen Iminozucker aus natürlichen Quellen wurde seit 1970 intensiv an der Entwicklung präparativer Methoden für die Iminozuckersynthese gearbeitet.<sup>[178–181]</sup> Während der späten 80er und frühen 90er Jahren führte die Erforschung von Iminozuckern als antivirale Wirkstoffe zur Entdeckung *N*-alkylierter 1-Desoxynojirimycine als wirksame Inhibitoren der ER-Glycosidasen I und II. Ein Beispiel ist Miglustat (4), das sich auch als Inhibitor für GCS erwiesen hat.<sup>[182]</sup> Diese Entdeckung trieb die Entwicklung neuer Iminozucker als Inhibitoren des Glucosylceramid-Stoffwechsels voran. Die folgenden Abschnitte liefern eine Übersicht über die verschiedenen Inhibitoren für GCS und GBA1 mit Fokus auf Iminozucker-basierten Inhibitoren. Neuere Übersichten von Delgado et al. geben einen Überblick über die Inhibitoren der Enzyme des SL-Metabolismus.<sup>[183,184]</sup>

### 4.1. Inhibitoren der Glucosylceramid-Synthase

GCS ist ziemlich einzigartig unter den Glycosyltransferasen, da es eine ganz Reihe strukturell diverser Inhibitoren gegen diese Synthase gibt. 1980 beschrieben Vunnam und Radin die Synthese und Aktivität von PDMP (1), dem ersten GCS-Inhibitor. PDMP war Teil einer Serie von Ceramid-Analoga, in denen die ungesättigte Alkylkette des Sphingosin-Rückgrats durch eine Phenylgruppe und die primäre Hydroxygruppe durch verschiedene Heterocyclen ersetzt ist (Abbildung 6).<sup>[185]</sup> Nur Analoga mit *L-threo*-Konfiguration – umgekehrt zum Ceramid – inhibierten GCS. In kinetischen Analysen erwies sich 1 als unkompetitiv bezüglich UDP-Glucose und als gemischt kompetitiver Inhibitor für Ceramid.<sup>[186]</sup> Ein Wechsel des Heterocyclus zu Pyrrolidin (10) ergab eine zehnfach höhere Wirksamkeit.<sup>[187]</sup> Eine anschließende Untersuchung der *para*-Substituenten am Phenylring von 10 lieferte eine Beziehung zwischen dem  $IC_{50}$ , der hydrophilen Eigenschaft und der elektronenschiebenden Kapazität der *para*-Position (8–12; Abbildung 6).<sup>[188]</sup> Ethylendioxy-Substitution am Phenylring (13)<sup>[188]</sup> ergab in Kombination mit einer kürzeren Acylkette das bisher wirksamste GCS-inhibierende PDMP-Derivat (5).<sup>[168,189]</sup> Zwei andere Studien haben gezeigt, dass die Acylkette durch ein Benzoyloxycarbonyl (14)<sup>[190]</sup> ersetzt werden kann, aber nicht durch eine Alkylkette (15 gegen 16).<sup>[191]</sup> Die Derivate 17 und 18, die Ceramid stärker imitieren, hemmen GCS vergleichbar mit

PDMP.<sup>[192]</sup> Van Calenbergh et al. stellten fest, dass ein Austausch der Sphingosin-imitierenden Aryleinheit von PDMP gegen ein terminales Alkin (**19**) ebenfalls zu einem starken GCS-Inhibitor führt.<sup>[191]</sup>

Selektivitätsstudien an einem engen strukturellen Homologen von **13** mit einem  $IC_{50}$  von 24 nm für GCS ergaben eine Inhibition der Enzyme GBA1, GBA2, der ER- $\alpha$ -Glucosidasen I + II, des Debranching-Enzyms sowie von Sucrase und Maltase.<sup>[189]</sup> Eine andere Studie zeigte, dass **13** GCS in niederen Tieren, Pflanzen, Pilzen oder Bakterien nicht inhibiert, sondern nur humane GCS.<sup>[193]</sup> Bei der Entwicklung der PDMP-Derivate wurde festgestellt, dass viele dieser Verbindungen auch die lysosomale Phospholipase A2 hemmen. Dieses Enzym kann, unter anderem, Ceramid zu 1-O-Acylceramid acylieren. Seine Hemmung kann zur Phospholipidose<sup>[194]</sup> und erhöhten zellulären Ceramidspiegeln führen.<sup>[195]</sup>

1994 beschrieben Platt et al. die Verbindung Miglustat (**4**)<sup>[182]</sup> als effektiven GCS-Inhibitor. Nachfolgende Studien der gleichen Arbeitsgruppe galten dem Mechanismus, nach dem alkylierte Desoxynojirimycin-Derivate GCS inhibieren.<sup>[196,197]</sup> Diese Studien zeigten, dass das *N*-Propyl-Derivat (**22**) die minimale Länge für die Hemmung von GCS aufweist und dass eine Verlängerung der *N*-Alkylkette bis hin zur *N*-Decyl-Alkylierung die Inhibition von GCS weiter verbessert (**26**, Tabelle 1).<sup>[196]</sup> Die lineare aliphatische *N*-Alkylierung scheint nicht entscheidend zu sein, da der  $IC_{50}$  von *N*-benzyliertem **32** vergleichbar ist mit dem von **4** (Abbildung 7).<sup>[197]</sup> Verlängerung der *N*-Alkylkette erhöht die Cytotoxizität dieser Verbindungen (Tabelle 1).<sup>[196]</sup> Die genaue Ursache dieser Toxicität ist nicht völlig geklärt, sie könnte aber durch Solubilisierung der Membran wegen ihres Verhaltens als amphiphile Tenside verursacht werden. Van den Broek et al. haben gezeigt, dass die Einführung einer Etherfunktion in die *N*-Alkylkette die Cytotoxizität verringert (**26** im Vergleich zu **30** in Tabelle 1).<sup>[198]</sup> Das von uns 1998 beschriebene *N*-5-(Adamantan-1-yl-methoxy)-pentyl(AMP)-funktionalisierte 1-Desoxynojirimycin (**6**) erwies sich als sehr starker GCS-Inhibitor.<sup>[199]</sup> Verlagerung der AMP-Einheit an andere Positionen von 1-Desoxynojirimycin zerstörte die Fähigkeit zur Hemmung von GCS, außer bei den  $\beta$ -Aza-C-glycosid-Derivaten **33** und **34**.<sup>[200]</sup>

Miglustat (**4**) wurde zuerst 1988 von Fleet et al. als Teil einer Serie von Inhibitoren für die Replikation des HIV-Virus beschrieben.<sup>[205]</sup> Diese Wirkung wird durch Hemmung der ER- $\alpha$ -Glucosidase I und II erzielt, und in einem Versuch, diese Aktivität von der GCS-Inhibition zu trennen, haben Platt et al. Modifikationen des Iminozuckerteils von **4** studiert. Diese Studie ergab, dass *N*-butyierte 2-Aacetamido-, *D*-manno- und *L*-fuco-1-Desoxynojirimycine GCS nicht mehr inhibieren. *D*-galacto-Derivate (**35** und **36**) hemmen jedoch GCS, aber nicht mehr die ER-Glucosidase I oder GBA1 (Abbildung 7).<sup>[202]</sup> Neueren Befunden zufolge bilden *L*-ido- (**37–39**) und *L*-altro-konfigurierte (**40**) lipophile Iminozucker ebenfalls eine vielversprechende Klasse selektiver GCS-Inhibitoren.<sup>[206–208]</sup> Verbindung **39** ist der wirksamste Iminozucker-basierte GCS-selektive Inhibitor, der bisher beschrieben wurde.<sup>[208]</sup>

Da eine Kristallstruktur für GCS fehlt, gibt es wenige Strukturinformationen, die den Bindungsmechanismus lipo-

philer Iminozucker an das aktive Zentrum von GCS erklären. Eine Studie von Butters et al. zur Kinetik der GCS-Inhibition durch **4** deutet darauf hin, dass diese für UDP-Glucose nicht-kompetitiv und für Ceramid kompetitiv verläuft.<sup>[197]</sup> Dagegen erwies sich Verbindung **25** als nicht-kompetitiv bezüglich beider Substrate.<sup>[196]</sup> Aufgrund dieser Befunde und der strukturellen Ähnlichkeiten zwischen **4** und Ceramid wurde **4** vorläufig als Ceramid-Mimetikum vorgeschlagen.<sup>[196]</sup> Diese Hypothese lässt vermuten, dass die Bindung eines zweiten sekundären lipophilen Rests an der 2-O-Position von **4** oder **25** zu einem besseren Ceramid-Mimetikum führen könnte. Eine neuere Studie von Compain, Martin et al. mit den di- und trialkylierten Derivaten **41–44** zeigte jedoch, dass dabei keine wirksameren GCS-Inhibitoren entstanden sind (Abbildung 7).<sup>[209]</sup>

Einige Pyrrolidiniminozucker haben sich ebenfalls als GCS-Inhibitoren bewährt. 2000 beschrieben Butters et al. das DMDP-Derivat **47** als GCS-Inhibitor, dessen Aktivität vergleichbar ist mit der von **4** (Abbildung 8).<sup>[197]</sup> In zwei Studien

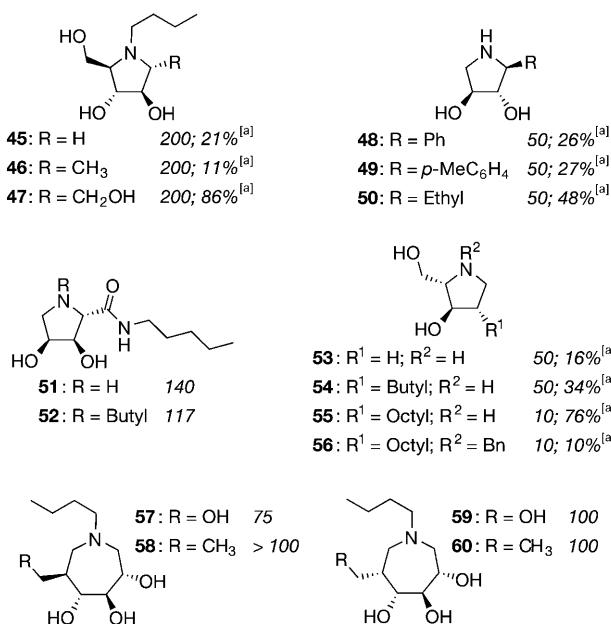


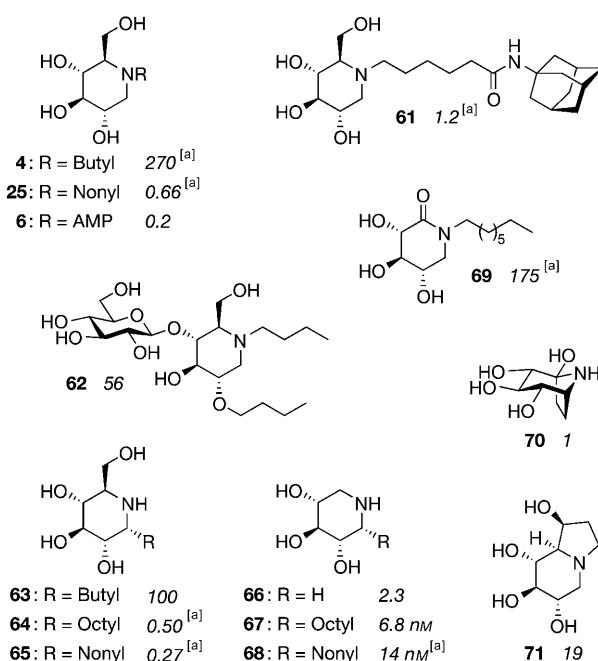
Abbildung 8. Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) von Pyrrolidin- und Azepan-basierter GCS-Inhibitoren. [a] Prozentuale Inhibition bei der angegebenen Inhibitorkonzentration (in  $\mu\text{M}$ ).

von Davis et al. wurden ebenfalls mehrere Pyrrolidin-Inhibitoren (**48–52**) identifiziert.<sup>[210,211]</sup> Génisson et al. haben Pyrrolidine entwickelt, die das Sphingosin-Rückgrat nachahmen (**53–56**), wobei sich **55** als wirksamer GCS-Inhibitor herausgestellt hat.<sup>[212]</sup> Schließlich haben Blériot et al. mäßig aktive Azepan-basierte Inhibitoren von GCS (**57–60**) beschrieben.<sup>[213]</sup>

#### 4.2. Inhibitoren der Glucocerebrosidase

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, hemmt Miglustat (**4**) auch GBA1. Forschungen haben gezeigt, dass –

ähnlich wie bei der GCS-Hemmung – eine Verlängerung der *N*-Alkylkette in **4** die GBA1-Inhibition verbessert (Tabelle 1; **4**, **25** und **6** in Abbildung 9). Wird Amantadin über eine



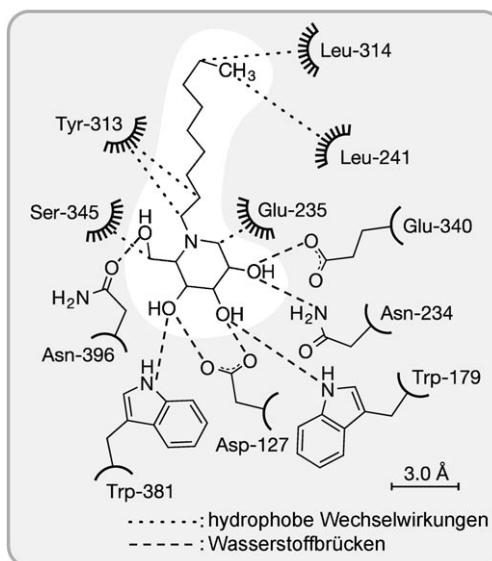
**Abbildung 9.** Übersicht der Strukturen und IC<sub>50</sub>-Werte (in μM, kursiv) Piperidin-basierter GBA1-Inhibitoren. [a] Als pharmakologisches Chaperon für GBA1-Varianten beschrieben: **4**,<sup>[215]</sup> **25**,<sup>[216,217]</sup> **61**,<sup>[214,218]</sup> **64**,<sup>[203]</sup> **65** und **68**,<sup>[219]</sup> **69**.<sup>[220]</sup>

Amid-Bindung an das *N*-Alkyl-Ende geknüpft, um AMP-DNM-Derivat **61** zu synthetisieren, wird die GBA1-Hemmung nicht vermindert.<sup>[214]</sup> Die Bindung eines AMP-Rests an die O2- oder O6-Hydroxygruppen von 1-Desoxynojirimycin lieferte ebenfalls submikromolare GBA1-Inhibitoren.<sup>[200]</sup>

2007 veröffentlichten Futerman, Sussman et al. zwei Kristallstrukturen von GBA1, wobei entweder **4** oder **25** im aktiven Zentrum gebunden waren. Die Bindung von **4** und **25** erfolgte sehr ähnlich, doch der Nonylrest von **25** ging zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen mit Leucinresten nahe dem Eingang zum aktiven Zentrum ein (Abbildung 10). Bemerkenswerterweise schien das Stickstoffatom bei beiden Inhibitoren nicht mit den beiden katalytischen Glutaminsäureresten (Glu-340/235) oder anderen Resten im aktiven Zentrum zu koordinieren.<sup>[221]</sup>

Mit dem Ceramid-imitierenden Modell von **4** als Basis beschrieben Compain, Martin et al. die β-4-O-Glucosylierung zweier *N*-alkylierter 1-Desoxynojirimycine. Entsprechend dem Modell sollte die Glycosylierung an dieser Position Glucosylceramid-Mimetika ergeben. Die Glycosylierung von Miglustat (**4**) führte zum Verlust der GBA1-Inhibition. *N*-Butyl-2-O-butyl-1-desoxynojirimycin – selbst kein GBA1-Inhibitor – zeigte jedoch nach β-4-O-Glucosylierung (**62**; Abbildung 9) Inhibitorwirkung bei GBA1.<sup>[222]</sup>

Zwei weitere Studien durch die gleiche Arbeitsgruppe zeigten, dass D-gluco- (**63–65**)<sup>[203]</sup> und D-xylo-α-Aza-C-glycoside (**66–68**)<sup>[219]</sup> sehr potente GBA1-Inhibitoren sind (Abbil-

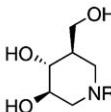
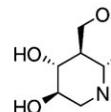
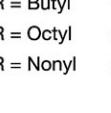


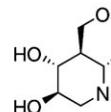
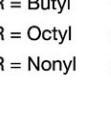
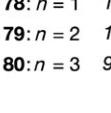
**Abbildung 10.** Die Koordination von **25** durch Reste des aktiven Zentrums, basierend auf der Röntgenkristallstruktur von GBA1 im Komplex mit **25**.<sup>[221]</sup>

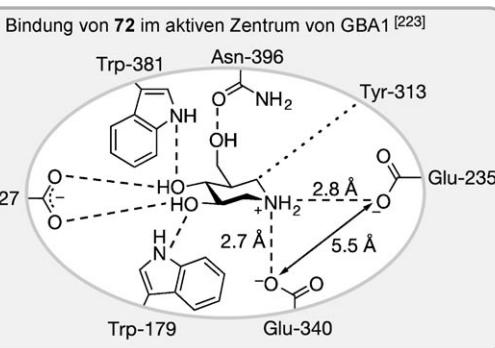
dung 9). Das N-substituierte D-xylo-δ-Lactam **69** ist ein schwacher GBA1-Inhibitor, aber als pharmakologisches Chaperon konnte es eine sechsfache Erhöhung der Aktivität der Mutante N370S-GBA1 erreichen (siehe Abschnitt 4.3).<sup>[220]</sup> Durch Evaluation natürlich vorkommender Iminozucker identifizierten Fan et al. mehrere Calystegine (**70**: Calystegin B2) und Castanospermine (**71**) als Inhibitoren von GBA1.<sup>[204]</sup> Isofagomin (**72**; Abbildung 11) erwies sich in diesem Screening als der beste GBA1-Inhibitor (IC<sub>50</sub> 40 nm) sowie als pharmakologisches Chaperon für GBA1-Varianten.

Petsko et al. beschrieben 2007 die Kristallstruktur von GBA1 mit **72** im aktiven Zentrum (Abbildung 11 unten).<sup>[223]</sup> Die sekundären Hydroxygruppen von **72** werden von den gleichen Resten koordiniert wie bei **4** und **25**, aber das Stickstoffatom koordiniert mit den beiden katalytisch wirksamen Resten. Fan et al. beobachteten einen großen Unterschied in der Stärke der GBA1-Inhibition zwischen *N*-Alkylierung (**73** und **74**) von **72** und Alkylierung am C-6 (**75–77**).<sup>[224]</sup> Das Isofagomin-Derivat **77** ist mit einem IC<sub>50</sub> von 0.6 nm der wirksamste GBA1-Inhibitor, der bisher beschrieben wurde. Kelly et al. haben seither gezeigt, dass die *N*-Alkylierung von **72** mit Alkylspacern, die mit Amantadinaminen verknüpft sind, moderate GBA1-Inhibitoren (**78–80**) mit pharmakologischer Chaperon-Aktivität liefert.<sup>[225]</sup>

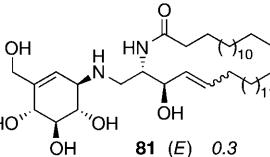
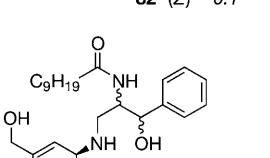
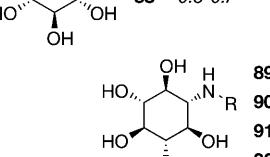
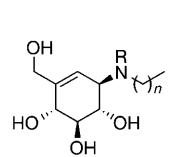
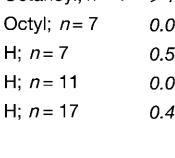
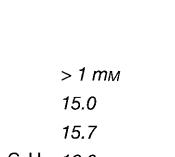
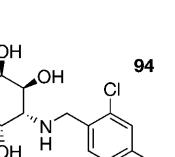
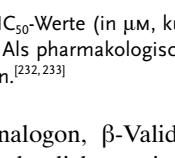
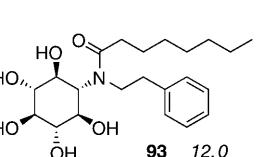
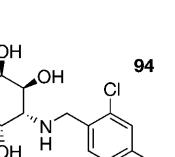
Lipophile Aminocyclitole bilden eine zweite wichtige Klasse von GBA1-Inhibitoren. 1995 beschrieben Ogawa et al. die *N*-Alkylierung des natürlich vorkommenden Aminocyclitols, β-Valienamin, zu den ersten bekannten selektiven GBA1-Inhibitoren **81** und **82** (Abbildung 12).<sup>[228]</sup> Durch Austausch des komplexen Ceramidrests gegen eine<sup>[229]</sup> oder zwei<sup>[230]</sup> aliphatische Alkylketten wurden ebenfalls wirksame Inhibitoren (**83–87**) hergestellt, die GCS nachweislich nicht inhibieren. Von PDMP abgeleitete Derivate von β-Valienamin (**88**) ergaben ebenfalls GBA1-Inhibitoren, und zwar ungeachtet der Stereochemie des PDMP-Teils. α-Valienamin

	$72: R = H$	$40 \text{ nM}^{[a]}$
	$73: R = \text{Butyl}$	$44$
	$74: R = \text{Nonyl}$	$> 100$

	$75: R = \text{Butyl}$	$160 \text{ nM}$
	$76: R = \text{Octyl}$	$0.8 \text{ nM}$
	$77: R = \text{Nonyl}$	$0.6 \text{ nM}$



**Abbildung 11.** Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) Isofagomin-basierter GBA1-Inhibitoren. [a] Als pharmakologisches Chaperon für eine GBA1-Variante beschrieben.<sup>[204, 225–227]</sup>

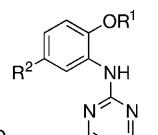
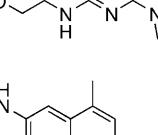
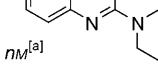
	$81: (E) \quad 0.3$
	$82: (Z) \quad 0.1$
	$88 \quad 0.3\text{--}0.7$
	$83: R = \text{Octanoyl}; n = 7 \quad > 100$
	$84: R = \text{Octyl}; n = 7 \quad 0.003$
	$85: R = H; n = 7 \quad 0.502^{[a]}$
	$86: R = H; n = 11 \quad 0.085^{[a]}$
	$87: R = H; n = 17 \quad 0.442$
	$93 \quad 12.0$
	$94 \quad 28$

**Abbildung 12.** Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) Aminocyclitol-basierter GBA1-Inhibitoren. [a] Als pharmakologisches Chaperon für eine GBA1-Variante beschrieben.<sup>[232, 233]</sup>

oder das gesättigte  $\beta$ -Valienamin-Analogon,  $\beta$ -Validamin, führten nach dieser Vorgehensweise zu deutlich verminderter GBA1-Hemmung.<sup>[231]</sup>

Delgado et al. haben die *N*-alkylierten Aminocyclitole **89–92** als GBA1-Inhibitoren beschrieben (Abbildung 12). Diese wurden durch regio- und stereokontrollierte Öffnung von CBE (**2**; siehe Abbildung 3) erhalten. Das Aminocyclitol **93** war der stärkste GBA1-Inhibitor und enthält bemerkenswerterweise keine basische Aminfunktion, die normalerweise für die Hemmung von GBA1 erforderlich ist.<sup>[234]</sup> Diese Verbindungen wurden auch als GCS-Inhibitoren geprüft, erwiesen sich aber als inaktiv. In einer zweiten kombinatorischen Studie untersuchten Delgado et al. die Substitution des Stickstoffatoms in zwei Aminocyclitol-Kernen und erhielten GBA1-Inhibitoren, die in Struktur und Aktivität ähnlich wie **90–92** waren, sowie eine neue Klasse von Inhibitoren, nämlich **94**.<sup>[235]</sup>

Schließlich identifizierten Sidransky et al. drei neue Klassen aromatischer, achiraler GBA1-Inhibitoren (**95**, **98** und **99**; Abbildung 13) durch Hochdurchsatz-Screening einer

	$95: R^1 = \text{Me}; R^2 = \text{Cl}$	$0.70^{[a]}$
	$96: R^1 = \text{H}; R^2 = \text{Ph}$	$0.37$
	$97: R^1 = t\text{Bu}; R^2 = \text{H}$	$0.33$

**Abbildung 13.** Übersicht der Strukturen und  $IC_{50}$ -Werte (in  $\mu\text{M}$ , kursiv) achiraler aromatischer GBA1-Inhibitoren. [a] Als pharmakologisches Chaperon für eine GBA1-Variante beschrieben.<sup>[236]</sup>

Bibliothek aus 59815 Verbindungen.<sup>[236]</sup> Modifizierungen am Pyrrolidin-Stickstoffatom und an der primären Hydroxygruppe von **95** verbesserten dessen Wirksamkeit nicht, dafür aber mehrere Modifizierungen des Phenylrings (**96** und **97**).<sup>[237]</sup>

#### 4.3. Therapeutische Anwendungen

Die Typ-I-Gaucher-Krankheit dient seit Jahrzehnten als „Übungsplatz“ zur Entwicklung von Therapien für ererbte lysosomale Speicherkrankheiten. Die erste entwickelte Therapie für diese Krankheit war die Enzymersatztherapie (ERT; Abbildung 4b). Brady et al. zeigten, dass die intravenöse Verabreichung von GBA1 aus menschlichem Plazentagewebe positive Wirkungen bei Gaucher-Patienten hervorrief.<sup>[238, 239]</sup> Während der 90er Jahre wurde das aus der Plazenta stammende Enzym durch ein rekombinantes GBA1-Derivat ersetzt.<sup>[240]</sup> Derzeit erhalten mehrere Tausend Typ-I-Gaucher-Patienten weltweit eine Enzymersatztherapie mit dieser rekombinanten GBA1, genannt Cerezym. Nachteile dieser Therapie sind die intravenöse Verabreichung, die hohen Kosten und das Unvermögen, neurologische Symptome in schwerer betroffenen Gaucher-Patienten zu behandeln oder

zu vermeiden (wegen der mangelnden Penetration von Cerezym in das Gehirn).

Schon 1980 schlugen Radin und Vunnam vor, dass die Herunterregulierung des Glucosylceramid-Zustroms in die Lysosome durch Hemmung von GCS mit dem Inhibitor PDMP (**1**) die Symptome der Gaucher-Krankheit mildern könnte.<sup>[185]</sup> 1994 beschrieben Platt et al. die Hemmung von GCS durch das *N*-butylierte 1-Desoxynojirimycin-Derivat (**4**) und dessen Vermögen, die Glucosylceramid-Akkumulation in einem In-vitro-Modell der Gaucher-Krankheit zu mindern.<sup>[182]</sup> Das Konzept wurde zur heutigen Substratreduktionstherapie (SRT; Abbildung 4b) weiterentwickelt. Nach der klinischen Erprobung in Gaucher-Patienten wurde **4** (nun als Miglustat oder Zavesca bezeichnet) 2002 als Arzneimittel für seltene Krankheiten in der SRT für die Gaucher-Krankheit anerkannt.<sup>[241,242]</sup> Für eine ausführlichere Besprechung der SRT für die Gaucher-Krankheit sei auf neuere Übersichten verwiesen.<sup>[243,244]</sup>

Studien mit **4** und Derivaten mit längeren *N*-Alkylketten haben gezeigt, dass diese metabolisch stabil sind und meist über die Niere ausgeschieden werden ( $t_{1/2}$  in Plasma: 6.3 h). Eine orale Verabreichung von Miglustat (100 mg, 0.46 mmol), dreimal pro Tag, führt nach 5 Wochen zu einer stationären Plasmakonzentration von 5  $\mu\text{M}$ , die nur teilweise die GSL-Biosynthese hemmt.<sup>[241]</sup> Experimente mit radioaktiv markierten Iminozuckerderivaten deuten darauf hin, dass *N*-Alkyldesoxynojirimycine die Blut-Hirn-Schranke passieren können.<sup>[245]</sup> Die wichtigsten Nebeneffekte, die mit der SRT gegen die Gaucher-Krankheit verbunden sind, lassen sich darauf zurückführen, dass **4** die Glycosidasen in den Darm-Mikrovilli inhibiert kann, was Durchfall, Blähungen und abdominale Gasansammlung zur Folge hat. Miglustat inhibiert auch die ER-Glycosidasen I und II, jedoch erfordert dies toxische Konzentrationen in 10000-fachem Überschuss verglichen mit der benötigten Dosis für die Hemmung von GCS.

Eine dritte Therapie für die Gaucher-Krankheit ist derzeit in der Entwicklung: die Chaperon-vermittelte Therapie (CMT; Abbildung 4b).<sup>[246–248]</sup> Sie basiert auf dem Konzept, dass ein reversibler, auf das aktive Zentrum gerichteter Inhibitor eines Enzyms (ein pharmakologisches Chaperon) schon während des Faltungsvorgangs im ER mit einer Enzymvariante assoziieren kann (Abbildung 14). Wird der Inhibitor in noch nicht hemmenden Konzentrationen verwendet, kann das Chaperon bei der korrekten Faltung und der Stabilisierung während des Transports helfen. Das kann dazu führen, dass ein höherer Prozentsatz an richtig gefaltetem Enzym seinen zellulären Bestimmungsort erreicht. Hier dissoziert das Chaperon vom aktiven Zentrum oder wird durch das Enzymsubstrat verdrängt. Mehrere der mit Gaucher verbundenen Mutationen im *GBA1*-Gen verursachen eine falsche oder gehinderte Faltung von *GBA1* im ER. Folglich erreichen viele veränderte (mutierte) *GBA1*-Proteine nie das Lysosom und werden stattdessen über den ERAD-Weg abgebaut (Abbildung 14).

Das erste Beispiel für ein pharmakologisches Chaperon, das eine lysosomale Glycosidase stabilisiert, wurde 1999 von Fan et al. für Varianten der  $\alpha$ -Galactosidase A von Patienten mit Fabry-Krankheit beschrieben.<sup>[249]</sup> Sie beobachteten, dass der Iminozucker-Inhibitor Galactostatin (**100**; Abbildung 15) das Enzym in den Zellen von Fabry-Patienten anhäufte, wenn er in Konzentrationen verabreicht wurde, die unterhalb der für die Inhibition des Enzyms notwendigen Mengen lagen.

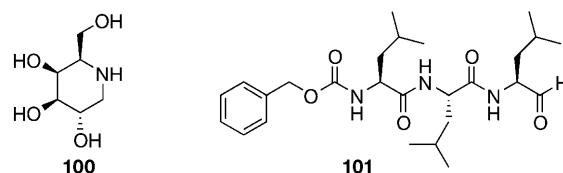


Abbildung 15. Struktur der Verbindungen **100** und **101**.

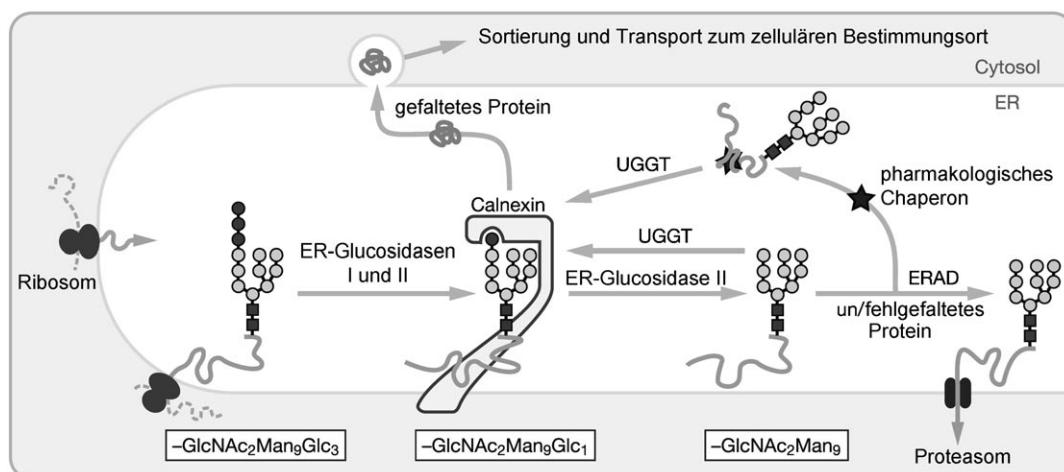


Abbildung 14. Übersicht über die im ER stattfindende Proteinfaltung, Qualitätskontrolle und die putative Wirkung eines pharmakologischen Chaperons in der CMT. Die ER-Glycosidasen I und II entfernen zwei von drei Glucoseresten, wonach die Chaperone Calnexin oder Calreticulin das gekürzte Oligosaccharid erkennen und die Proteinfaltung unterstützen. Die ER-Glycosidase II spaltet den letzten Glucoserest ab. Wenn das Protein richtig gefaltet ist, erfolgen Sortierung und Transport zum zellulären Bestimmungsort. Ist das Protein noch nicht richtig gefaltet, wird es vom UDP-Glucose-Glycoprotein, der Glucosyltransferase (UGGT) erkannt und entweder durch die UGGT reglucosyliert und wieder zur Faltung gebracht oder verworfen und in den ER-assoziierten Abbauweg (ERAD) eingeschleust.

Auch bei mehreren einfachen Varianten von GBA1 hat sich seither das CMT-Konzept bei der Gaucher-Krankheit als erfolgreich erwiesen, wenn auch nur in künstlichen zellulären Assays. Seitdem sind viele Beiträge erschienen, die eine Vielzahl verschiedener, hauptsächlich Iminozucker-basierter Inhibitoren für eine CMT-Anwendung bei der Gaucher-Krankheit bewerten (siehe mit [a] gekennzeichnete Verbindungen in den Abbildungen 10–13). In den meisten Fällen wird der Inhibitor zusammen mit Zellen, die eine spezifische, mit der Gaucher-Krankheit verbundene defizierte GBA1 exprimieren, 4–5 Tage lang inkubiert, nachdem das künstliche 4MU-Glucosid-Substrat (**3**; siehe Abbildung 3) zugefügt wurde, und die GBA1-Aktivität bestimmt. Die Aktivitätsmessung wird in Gegenwart von CBE (**2**; siehe Abbildung 3) wiederholt, um bezüglich der GBA2-Aktivität zu korrigieren. Neben einer Steigerung der Enzymaktivität war die Beobachtung, dass die Proteindynamik am aktiven und am sekundären Zentrum abnimmt (über Amid-Wasserstoff/Deuterium-Austausch-MS)<sup>[250]</sup> und die Thermostabilität zunimmt, ein weiterer Hinweis für die erhöhte Stabilität der chaperongebundenen GBA1-Variante.<sup>[214,250]</sup> Mehrere Studien haben auch bewiesen, dass nach der Behandlung größere Mengen an GBA1 das Lysosom erreichen. Es bleibt jedoch zu zeigen, dass der Glucosylceramid-Abbau in den Lysosomen intakter Zellen tatsächlich zunimmt. Durch Kombination des Iminozucker-Chaperons **25** mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (**101**; Abbildung 15) ergab sich ein synergistischer Effekt und größere Steigerungen der GBA1-Aktivität im Lysosom.<sup>[216]</sup> Da jedoch **25** auch GCS, GBA2 und die ER-Glucosidasen I und II hemmt und da MG-132 auch sekundäre Aktivitäten hat, ist völlig unklar, welche Aktionen dieser Verbindungen tatsächlich zur beobachteten Steigerung der GBA1-Aktivität führen. Interessant sind neuere Befunde zur häufigsten CFTR-Mutation (F508del), die Mucoviscidose (cystische Fibrose) verursacht. Die F508del-Mutation führt zur unkorrekten Faltung des CFTR-Proteins im ER und zum Abbau durch das Proteasom. Becq et al. haben beschrieben, dass die Behandlung mit Miglustat (**4**) eine 12-proz. Zunahme der korrekt gefalteten CFTR induziert, was zu einem besseren Ionentransport in Epithelzellen bei cystischer Fibrose führt.<sup>[251,252]</sup> Die Autoren haben vorgeschlagen, dass **4** die ER- $\alpha$ -Glucosidasen I + II, die bei der Qualitätskontrolle abweichender F508del-CFTR beteiligt sind, hemmen könnte und daher seinen Abbau über ERAD verhindert. Angesichts der relativ großen Unempfindlichkeit der ER- $\alpha$ -Glucosidasen gegenüber der Hemmung durch **4**, scheint diese Begründung nicht sehr attraktiv, und einige andere Wirkungen von **4** können nicht ausgeschlossen werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Sphingolipide und Glycosphingolipide sind an vielen physiologischen Vorgängen – bei Gesundheit und bei Krankheit – beteiligt. Der ersten Entdeckung dieser vielfältigen Verbindungsklasse durch Thudichum folgten besonders in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte sowohl im Bereich der Grundlagen- als auch der angewandten biomedizinischen Forschung. Gleichzeitig sollte klar sein, dass wir

gerade erst angefangen haben, die Rolle und das therapeutische Potenzial von SLs/GSLs und ihren metabolischen Wegen zu enträtseln und auszuschöpfen und noch viele Jahre aufregender Forschung an der Schnittstelle von Glyco- und Lipidbiologie vor uns liegen. Trotz der zahlreichen potentiellen therapeutischen Zielmoleküle, sind bisher nur solche Verbindungen zu validierten Therapeutika entwickelt worden, die mit an der Biosynthese und am Abbau von Glucosylceramid beteiligten Faktoren wechselwirken (Miglustat (**4**) als GCS-Inhibitor). Weitere Therapeutika dieses Typs, die sich erst in der Entwicklung befinden, sind pharmakologische Chaperone für GBA1-Varianten. Es muss betont werden, dass sowohl die Wirkungsweise als auch der therapeutische Nutzen von Iminozucker-Chaperonen noch bewiesen werden muss, und wir erwarten, dass dies in den nächsten Jahren geschehen wird. Die Tatsache, dass Glucosylceramid in vielen GSL-Stoffwechselwegen eine zentrale Stellung einnimmt, deutet darauf hin, dass die Beeinflussung seiner Biosynthese durch GCS-Hemmung auch zu Therapien für lysosomale Speicherkrankheiten, die durch Akkumulation komplexerer GSLs entstehen, führen könnte. Alternativ sind Inhibitoren von nachgelagerten Glycosyltransferasen, die bei der Synthese komplexerer GSLs mitwirken, sehr gefragt. Zukünftige Forschungen sollten dem kaum verstandenen Befund gelten, dass GCS anfällig ist gegenüber Inhibition durch Iminozucker, während die meisten Glycosyltransferasen dies nicht sind. Die Entwicklung von Iminozuckern ist trotz reicher Literaturdaten noch lange kein ausgereiftes Gebiet. Zum Beispiel sind Iminozucker-Bibliotheken gewöhnlich klein und lückenhaft, und ihre Aktivitäten gegen glycoprozessierende Enzyme sind kaum erforscht. Die Entdeckung von Miglustat (**4**) als GCS-Inhibitor (ursprünglich war es als Inhibitor der ER- $\alpha$ -Glucosidase entwickelt worden) und seine Weiterentwicklung zum klinischen Wirkstoff unterstreichen unsere Auffassung, dass Aufbau und Screening von Iminozucker-Bibliotheken ein lohnendes Forschungsziel sind. Auf diese Weise könnte Einblick in die Besonderheiten der jetzt kaum verstandenen glycoprozessierenden Enzyme erhalten werden. Hier merken wir an, dass sich bei der Durchführung solcher Studien herausstellen könnte, dass spezifische Inhibitoren mehr Aktivitäten abseits ihres eigentlichen Angriffsziels aufweisen könnten. Als ein faszinierendes Beispiel haben wir bei unseren Studien beobachtet, dass alle Desoxynojirimycin-artigen lipophilen Inhibitoren mit GCS-Inhibitorwirkung (einschließlich **4**) neben GBA1 auch die nicht-lysosomale GBA2 angreifen.<sup>[199,200,208]</sup> Weder die Funktion noch die Gefahren, die mit dieser fortwährenden Blockierung verbunden sind, sind bisher verstanden. Umfassende Iminozucker-Bibliotheken gepaart mit In-vitro- und In-vivo-Tests, um ihre Wirkung auf eine Reihe relevanter glycoprozessierender Enzyme zu prüfen, können zur Entdeckung neuer therapeutischer Strategien führen, wie kürzlich durch die Erkennung von GCS als potenzielles klinisches Zielmolekül für Diabetes II gezeigt wurde.<sup>[168,169]</sup> Letztendlich glauben wir, dass es unbedingt erforderlich ist, die (G)SL-Konzentrationen und ihre Änderungen durch Wechselwirkung mit ihren metabolischen Enzymen sorgfältig zu überwachen, und wir sehen ein wachsendes Interesse an

diesem entstehenden Feld der gezielten Lipidanalytik (lipidomics).

Diese Arbeit wurde durch das Academic Medical Center und die NWO-CW gefördert.

Eingegangen am 16. Mai 2009

Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim

- [1] C. S. Breathnach, *Hist. Psychiatry* **2001**, *12*, 283–296.
- [2] J. L. W. Thudichum, *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*, Baillière, Tindall & Cox, London, **1884**.
- [3] T. L. Sourkes, *The Life and Work of J. L. W. Thudichum, 1829–1901: „A Most Celebrated Exponent of the Art of Medicine and Chemistry“*, Osler Library, McGill University, Montreal, **2003**.
- [4] A. H. Merrill, Jr., M. D. Wang, M. Park, M. C. Sullards, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 457–468 ([www.sphingomap.org](http://www.sphingomap.org)).
- [5] M. Sud, E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, S. Subramaniam, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, D527–D532 ([www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org)).
- [6] A. H. Futerman, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1885–1892.
- [7] A. H. Futerman, H. Riezman, *Trends Cell Biol.* **2005**, *15*, 312–318.
- [8] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568.
- [9] S. Lahiri, A. H. Futerman, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 2270–2284.
- [10] A. H. Merrill, E. M. Schmelz, D. L. Dillehay, S. Spiegel, J. A. Shayman, J. J. Schroeder, R. T. Riley, K. A. Voss, E. Wang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *142*, 208–225.
- [11] S. T. Pruitt, A. Bushnev, K. Hagedorn, M. Adiga, C. A. Haynes, M. C. Sullards, D. C. Liotta, A. H. Merrill, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1621–1639.
- [12] W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J. C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M. C. Sullards, M. Cabot, A. H. Merrill, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1864–1884.
- [13] Y. Pewzner-Jung, S. Ben-Dor, A. H. Futerman, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 25001–25005.
- [14] Y. Mizutani, A. Kihara, Y. Igarashi, *FEBS Lett.* **2004**, *563*, 93–97.
- [15] C. G. Mao, R. J. Xu, Z. M. Szulc, A. Bielawska, S. H. Galadari, L. M. Obeid, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26577–26588.
- [16] K. Kitatani, J. Idkowiak-Baldys, Y. A. Hannun, *Cell. Signalling* **2008**, *20*, 1010–1018.
- [17] M. A. De Matteis, A. Di Campli, G. D'Angelo, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 761–768.
- [18] K. Hanada, K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa, M. Nishijima, *Nature* **2003**, *426*, 803–809.
- [19] K. Hanada, K. Kumagai, N. Tomishige, M. Kawano, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771*, 644–653.
- [20] C. E. Chalfant, S. Spiegel, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 4605–4612.
- [21] M. Maceyka, H. Sankala, N. C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L. S. Satin, A. H. Merrill, S. Miltstien, S. Spiegel, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37118–37129.
- [22] D. M. Z. Heringdorf, H. M. Himmel, K. H. Jakobs, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1582*, 178–189.
- [23] G. F. Nixon, F. A. Mathieson, I. Hunter, *Prog. Lipid Res.* **2008**, *47*, 62–75.
- [24] I. Lopez-Montero, N. Rodriguez, S. Cribier, A. Pohl, M. Velez, P. F. Devaux, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25811–25819.
- [25] A. Bosio, E. Binczek, M. M. LeBeau, A. A. Fernald, W. Stoffel, *Genomics* **1996**, *34*, 69–75.
- [26] S. Schulte, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10265–10269.
- [27] P. Giussani, T. Colleoni, L. Brioschi, R. Bassi, K. Hanada, G. Tettamanti, L. Riboni, P. Viani, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2008**, *1781*, 40–51.
- [28] D. Ardal, I. Popa, J. Bodennec, P. Louisot, D. Schmitt, J. Portoukalian, *Biochem. J.* **2003**, *371*, 1013–1019.
- [29] P. M. Coutinho, B. Henrissat, *Recent Adv. Carbohydr. Bioeng.* **1999**, *246*, 3–12 ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)).
- [30] S. Ichikawa, H. Sakiyama, G. Suzuki, K. Hidari, Y. Hirabayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4638–4643.
- [31] S. Ichikawa, Y. Hirabayashi, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 198–202.
- [32] D. L. Marks, K. J. Wu, P. Paul, Y. Kamisaka, R. Watanabe, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 451–456.
- [33] K. J. Wu, D. L. Marks, R. Watanabe, P. Paul, N. Rajan, R. E. Pagano, *Biochem. J.* **1999**, *341*, 395–400.
- [34] D. L. Marks, M. Dominguez, K. J. Wu, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 26492–26498.
- [35] X. Buton, P. Herve, J. Kubelt, A. Tannert, K. N. J. Burger, P. Fellmann, P. Muller, A. Herrmann, M. Seigneuret, P. F. Devaux, *Biochemistry* **2002**, *41*, 13106–13115.
- [36] P. D. W. Eckford, F. J. Sharom, *Biochem. J.* **2005**, *389*, 517–526.
- [37] G. D'Angelo, E. Polishchuk, G. Di Tullio, M. Santoro, A. Di Campli, A. Godi, G. West, J. Bielawski, C. C. Chuang, A. C. van der Spoel, F. M. Platt, Y. A. Hannun, R. Polishchuk, P. Mattjus, M. A. De Matteis, *Nature* **2007**, *449*, 62–67.
- [38] M. A. De Matteis, A. Luini, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 273–284.
- [39] D. Halter, S. Neumann, S. M. van Dijk, J. Wolthoorn, A. M. De Maziere, O. V. Vieira, P. Mattjus, J. Klumperman, G. van Meer, H. Sprong, *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 101–115.
- [40] S. Neumann, G. van Meer, *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 1349–1360.
- [41] S. Itonori, M. Sugita, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2005**, *17*, 15–25.
- [42] R. D. Dennis, R. Geyer, H. Egge, J. Peterkatalinic, S. C. Li, S. Stirm, H. Wiegandt, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 5370–5375.
- [43] L. Svennerholm, *J. Lipid Res.* **1964**, *5*, 145–155.
- [44] T. Kolter, R. L. Proia, K. Sandhoff, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25859–25862.
- [45] K. Sandhoff, T. Kolter, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2003**, *358*, 847–861.
- [46] S. Mayor, R. E. Pagano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 603–612.
- [47] R. D. Singh, V. Puri, J. T. Valiyaveettil, D. L. Marks, R. Bittman, R. E. Pagano, *Mol. Biol. Cell* **2003**, *14*, 3254–3265.
- [48] T. Kolter, K. Sandhoff, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 81–103.
- [49] H. Schulze, T. Kolter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 674–683.
- [50] T. Kolter, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 2057–2079.
- [51] J. M. F. G. Aerts, S. van Weely, R. Boot, C. E. M. Hollak, J. M. Tager, *J. Inherited Metab. Dis.* **1993**, *16*, 288–291.
- [52] S. C. Miao, J. D. McCarter, M. E. Grace, G. A. Grabowski, R. Aebersold, S. G. Withers, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10975–10978.
- [53] H. Dvir, M. Harel, A. A. McCarthy, L. Toker, I. Silman, A. H. Futerman, J. L. Sussman, *EMBO Rep.* **2003**, *4*, 704–709.
- [54] M. Rossmann, R. Schultz-Heienbrok, J. Behlke, N. Remmel, C. Alings, K. Sandhoff, W. Saenger, T. Maier, *Structure* **2008**, *16*, 809–817.
- [55] J. R. Alattia, J. E. Shaw, C. M. Yip, G. G. Prive, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17394–17399.
- [56] H. Le Stunff, S. Miltstien, S. Spiegel, *J. Cell. Biochem.* **2004**, *92*, 882–899.
- [57] M. Trinchera, R. Ghidoni, S. Sonnino, G. Tettamanti, *Biochem. J.* **1990**, *270*, 815–820.

- [58] A. Prinetti, V. Chigorno, L. Mauri, N. Loberto, S. Sonnino, *J. Neurochem.* **2007**, *103*, 113–125.
- [59] S. van Weely, M. Brandsma, A. Strijland, J. M. Tager, J. M. F. G. Aerts, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1993**, *1181*, 55–62.
- [60] R. G. Boot, M. Verhoek, W. Donker-Koopman, A. Strijland, J. van Marle, H. S. Overkleet, T. Wennekes, J. Aerts, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 1305–1312.
- [61] Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J. C. Allegood, R. L. Warren, D. M. O. Ramirez, R. E. Hammer, F. K. Hamra, S. Matern, D. W. Russell, *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 2985–2994.
- [62] D. A. Priestman, A. C. van der Spoel, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Diabetes Obes. Metab.* **2008**, *10*, 159–166.
- [63] C. M. Walden, R. Sandhoff, C. C. Chuang, Y. Yildiz, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, A. C. van der Spoel, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 32655–32664.
- [64] H. A. Buller, A. G. van Wassenaer, S. Raghavan, R. K. Montgomery, M. A. Sybicki, R. J. Grand, *Am. J. Physiol.* **1989**, *257*, G616–G623.
- [65] T. Kobayashi, K. Suzuki, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7768–7773.
- [66] H. Vesper, E. M. Schmelz, M. N. Nikolova-Karakashian, D. L. Dillehay, D. V. Lynch, A. H. Merrill, *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1239–1250.
- [67] Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30889–30900.
- [68] J. Noguchi, Y. Hayashi, Y. Baba, N. Okino, M. Kimura, M. Ito, Y. Kakuta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *374*, 549–552.
- [69] A. Ballabio, V. Gieselmann, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2009**, *1793*, 684–696.
- [70] A. H. Futerman, G. van Meer, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 554–565.
- [71] F. Sabourdy, B. Kedjouar, S. C. Sorli, S. Colie, D. Milhas, Y. Salma, T. Levade, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2008**, *1781*, 145–183.
- [72] E. Beutler, G. Grabowski in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases*, McGraw-Hill, New York, **2001**, S. 3635–3668.
- [73] J. M. F. G. Aerts, W. E. Donker-Koopman, M. Koot, J. A. Barranger, J. M. Tager, A. W. Schram, *Clin. Chim. Acta* **1986**, *158*, 155–163.
- [74] J. M. F. G. Aerts, W. E. Donker-Koopman, M. K. van der Vliet, L. M. V. Jonsson, E. I. Ginns, G. J. Murray, J. A. Barranger, J. M. Tager, A. W. Schram, *Eur. J. Biochem.* **1985**, *150*, 565–574.
- [75] L. M. V. Jonsson, G. J. Murray, S. H. Sorrell, A. Strijland, J. Aerts, E. I. Ginns, J. A. Barranger, J. M. Tager, A. W. Schram, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *164*, 171–179.
- [76] S. van Weely, M. B. van Leeuwen, I. D. C. Jansen, M. A. C. de Bruijn, E. M. Brouwereld, A. W. Schram, M. Clarasamiranda, J. A. Barranger, E. M. Petersen, J. Goldblatt, H. Stotz, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, L. Svennerholm, A. Erikson, J. M. Tager, J. Aerts, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1096*, 301–311.
- [77] T. Ohashi, C. M. Hong, S. Weiler, J. M. Tomich, J. Aerts, J. M. Tager, J. A. Barranger, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3661–3667.
- [78] S. van Weely, M. van den Berg, J. A. Barranger, M. C. S. Miranda, J. M. Tager, J. Aerts, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 1167–1175.
- [79] J. M. F. G. Aerts, A. W. Schram, A. Strijland, S. van Weely, L. M. V. Jonsson, J. M. Tager, S. H. Sorrell, E. I. Ginns, J. A. Barranger, G. J. Murray, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1988**, *964*, 303–308.
- [80] D. Reczek, M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Y. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, P. Saftig, *Cell* **2007**, *131*, 770–783.
- [81] S. Rijnbott, H. Aerts, H. J. Geuze, J. M. Tager, G. J. Strous, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4862–4868.
- [82] A. Balreira, P. Gaspar, D. Caiola, J. Chaves, I. Beirao, J. L. Lima, J. E. Azevedo, M. C. S. Miranda, *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 2238–2243.
- [83] A. Tylki-Szymanska, B. Czartoryska, M. T. Vanier, B. Poorthuis, J. A. E. Groener, A. Lugowska, G. Millat, A. M. Vaccaro, E. Jurkiewicz, *Clin. Genet.* **2007**, *72*, 538–542.
- [84] R. G. Boot, M. Verhoek, M. de Fost, C. E. M. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M. J. van Breemen, M. van Meurs, L. A. Boven, J. D. Laman, M. T. Moran, T. M. Cox, J. Aerts, *Blood* **2004**, *103*, 33–39.
- [85] C. E. M. Hollak, S. van Weely, M. H. J. van Oers, J. M. F. G. Aerts, *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 1288–1292.
- [86] J. Aerts, C. E. M. Hollak, M. van Breemen, M. Maas, J. E. M. Groener, R. G. Boot, *Acta Paediatr.* **2005**, *94*, 43–46.
- [87] L. A. Boven, M. van Meurs, R. G. Boot, A. Mehta, L. Boon, J. M. Aerts, J. D. Laman, *Am. J. Clin. Pathol.* **2004**, *122*, 359–369.
- [88] C. E. M. Hollak, L. Evers, J. Aerts, M. H. J. van Oers, *Blood Cells Mol. Dis.* **1997**, *23*, 201–212.
- [89] C. E. M. Hollak, M. Levi, F. Berends, J. Aerts, M. H. J. van Oers, *Br. J. Haematol.* **1997**, *96*, 470–476.
- [90] H. Michelakakis, C. Spanou, A. Kondyli, E. Dimitriou, S. van Weely, C. E. M. Hollak, M. H. J. van Oers, J. M. F. G. Aerts, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1996**, *1317*, 219–222.
- [91] M. J. van Breemen, M. de Fost, J. S. A. Voerman, J. D. Laman, R. G. Boot, M. Maas, C. E. M. Hollak, J. M. Aerts, F. Rezaee, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 788–796.
- [92] J. M. Aerts, J. E. Groener, S. Kuiper, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Ottenhoff, C. van Roomen, M. Mirzaian, F. A. Wijburg, G. E. Linthorst, A. C. Vedder, S. M. Rombach, J. Cox-Brinkman, P. Somerharju, R. G. Boot, C. E. Hollak, R. O. Brady, B. J. Poorthuis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2812–2817.
- [93] M. A. Simpson, H. Cross, C. Proukakis, D. A. Priestman, D. C. A. Neville, G. Reinkensmeier, H. Wang, M. Wiznitzer, K. Gurtz, A. Verganelaki, A. Pryde, M. A. Patton, R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt, A. H. Crosby, *Nat. Genet.* **2004**, *36*, 1225–1229.
- [94] K. Bejaoui, C. Y. Wu, M. D. Sheffler, G. Haan, P. Ashby, L. C. Wu, P. de Jong, R. H. Brown, *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 261–262.
- [95] K. Furukawa, K. Iwamura, M. Uchikawa, B. N. Sojka, J. Wiels, T. Okajima, T. Urano, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37752–37756.
- [96] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9142–9147.
- [97] S. Roseman, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41527–41542.
- [98] T. Yamakawa, *Glycoconjugate J.* **1996**, *13*, 123–126.
- [99] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112–124.
- [100] D. J. Sillence, *Int. Rev. Cytol.* **2007**, *262*, 151–189.
- [101] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, R. G. W. Anderson, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 7–14.
- [102] S. de Groot, J. Wolthoorn, G. van Meer, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 375–387.
- [103] J. F. Hancock, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 456–462.
- [104] D. Lichtenberg, F. M. Goni, H. Heerklotz, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 430–436.
- [105] C. Eggeling, C. Ringemann, R. Medda, G. Schwarzmann, K. Sandhoff, S. Polyakova, V. N. Belov, B. Hein, C. von Middendorff, A. Schonle, S. W. Hell, *Nature* **2009**, *457*, 1159–1161.
- [106] H. Gallala, K. Sandhoff, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2008**, *20*, 277–295.
- [107] L. J. Pike, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S323–S328.
- [108] D. J. Sillence, F. M. Platt, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 409–416.

- [109] D. K. Sharma, A. Choudhury, R. D. Singh, C. L. Wheatley, D. L. Marks, R. E. Pagano, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 7564–7572.
- [110] N. Bartke, Y. A. Hannun, *J. Lipid Res.* **2009**, *50*, S91–S96.
- [111] Y. A. Hannun, L. M. Obeid, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 139–150.
- [112] M. Koval, R. E. Pagano, *Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.* **1991**, *1082*, 113–125.
- [113] A. Kihara, S. Mitsutake, Y. Mizutani, Y. Igarashi, *Prog. Lipid Res.* **2007**, *46*, 126–144.
- [114] T. Kawano, J. Q. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, H. Koseki, M. Taniguchi, *Science* **1997**, *278*, 1626–1629.
- [115] D. P. Zhou, J. Mattner, C. Cantu, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. C. Wang, R. L. Proia, S. B. Levery, P. B. Savage, L. Teyton, A. Bendelac, *Science* **2004**, *306*, 1786–1789.
- [116] S. Porubsky, A. O. Speak, B. Luckow, V. Cerundolo, F. M. Platt, H. J. Grone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5977–5982.
- [117] A. O. Speak, M. Salio, D. C. A. Neville, J. Fontaine, D. A. Priestman, N. Platt, T. Heare, T. D. Butters, R. A. Dwek, F. Trottein, M. A. Exley, V. Cerundolo, F. M. Platt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5971–5976.
- [118] A. K. Stanic, A. D. De Silva, J. J. Park, V. Sriram, S. Ichikawa, Y. Hirabyashi, K. Hayakawa, L. Van Kaer, R. R. Brutkiewicz, S. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1849–1854.
- [119] A. O. Speak, V. Cerundolo, F. M. Platt, *Immunol. Cell Biol.* **2008**, *86*, 588–597.
- [120] D. M. Zajonc, M. Kronenberg, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2007**, *17*, 521–529.
- [121] C. L. Schengrund, *Brain Res. Bull.* **1990**, *24*, 131–141.
- [122] R. Jennemann, R. Sandhoff, S. Wang, E. Kiss, N. Gretz, C. Zuliani, A. Martin-Villalba, R. Jager, H. Schorle, M. Kenzelmann, M. Bonrouhi, H. Wiegandt, H. J. Grone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12459–12464.
- [123] K. Furukawa, N. Tokuda, T. Okuda, O. Tajima, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 389–396.
- [124] O. Goker-Alpan, G. Lopez, J. Vithayathil, J. Davis, M. Hallett, E. Sidransky, *Arch. Neurol.* **2008**, *65*, 1353–1357.
- [125] N. Marks, M. J. Berg, M. Saito, *Brain Res.* **2008**, *1191*, 136–147.
- [126] T. Ariga, M. P. McDonald, R. K. Yu, *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1157–1175.
- [127] W. M. Holleran, Y. Takagi, Y. Uchida, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5456–5466.
- [128] Y. Uchida, W. M. Holleran, *J. Dermatol. Sci.* **2008**, *51*, 77–87.
- [129] P. W. Wertz, D. C. Swartzendruber, K. C. Madison, D. T. Downing, *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *89*, 419–425.
- [130] T. Doering, R. L. Proia, K. Sandhoff, *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 167–170.
- [131] R. Jennemann, R. Sandhoff, L. Langbein, S. Kaden, U. Rothermel, H. Gallala, K. Sandhoff, H. Wiegandt, H. J. Grone, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 3083–3094.
- [132] M. Akiyama, Y. Sugiyama-Nakagiri, K. Sakai, J. R. McMillan, M. Goto, K. Arita, Y. Tsuji-Abe, N. Tabata, K. Matsuoka, R. Sasaki, D. Sawamura, H. Shimizu, *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1777–1784.
- [133] J. Hara, K. Higuchi, R. Okamoto, M. Kawashima, G. Imokawa, *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 406–413.
- [134] M. Ishibashi, J. Arikawa, R. Okamoto, M. Kawashima, Y. Takagi, K. Ohguchi, G. Imokawa, *Lab. Invest.* **2003**, *83*, 397–408.
- [135] S. Manes, G. del Real, C. Martinez-A, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 557–568.
- [136] N. M. Varki, A. Varki, *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 851–857.
- [137] C. J. Russell, R. G. Webster, *Cell* **2005**, *123*, 368–371.
- [138] P. A. Norton, G. Baohua, T. M. Block in *Ininosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Hrsg.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, Kap. 9.
- [139] R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt, N. Zitzmann, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 65–75.
- [140] J. Mahdavi, B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraia, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, T. Boren, *Science* **2002**, *297*, 573–578.
- [141] M. Svensson, B. Frendeus, T. Butters, F. Platt, R. Dwek, C. Svanborg, *Mol. Microbiol.* **2003**, *47*, 453–461.
- [142] N. S. Radin, *Microbes Infect.* **2006**, *8*, 938–945.
- [143] D. C. Smith, J. M. Lord, L. A. Roberts, L. Johannes, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 397–408.
- [144] J. E. Galen, J. M. Ketley, A. Fasano, S. H. Richardson, S. S. Wasserman, J. B. Kaper, *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 406–415.
- [145] B. Ogretmen, Y. A. Hannun, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 604–616.
- [146] S. Hakomori, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5309–5318.
- [147] T. Miyagi, T. Wada, K. Yamaguchi, K. Hata, K. Shiozaki, *J. Biochem.* **2008**, *144*, 279–285.
- [148] T. Miyagi, T. Wada, K. Yamaguchi, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 532–537.
- [149] R. McKallip, R. X. Li, S. Ladisch, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 3718–3726.
- [150] T. Ozben, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2903–2909.
- [151] V. Gouaze-Andersson, M. C. Cabot, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 2096–2103.
- [152] G. S. Hotamisligil, *Nature* **2006**, *444*, 860–867.
- [153] R. H. Unger, *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 319–336.
- [154] R. H. Unger, *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 398–403.
- [155] C. Schmitz-Peiffer, D. L. Craig, T. J. Biden, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24202–24210.
- [156] W. L. Holland, T. A. Knotts, J. A. Chavez, L. P. Wang, K. L. Hoehn, S. A. Summers, *Nutr. Rev.* **2007**, *65*, 39–46.
- [157] S. A. Summers, *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 42–72.
- [158] M. Langeveld, J. Aerts, *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 196–205.
- [159] W. L. Holland, S. A. Summers, *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 381–402.
- [160] H. Nojiri, M. Stroud, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 4531–4537.
- [161] S. Tagami, J. Inokuchi, K. Kabayama, H. Yoshimura, F. Kitamura, S. Uemura, C. Ogawa, A. Ishii, M. Saito, Y. Ohtsuka, S. Sakaue, Y. Igarashi, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3085–3092.
- [162] K. Kabayama, T. Sato, F. Kitamura, S. Uemura, B. W. Kang, Y. Igarashi, J. Inokuchi, *Glycobiology* **2005**, *15*, 21–29.
- [163] T. Yamashita, A. Hashiramoto, M. Haluzik, H. Mizukami, S. Beck, A. Norton, M. Kono, S. Tsuji, J. L. Daniotti, N. Werth, R. Sandhoff, K. Sandhoff, R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3445–3449.
- [164] S. Yoshizumi, S. Suzuki, M. Hirai, Y. Hinokio, T. Yamada, U. Tsunoda, H. Aburatani, K. Yamaguchi, T. Miyagi, Y. Oka, *Metab. Clin. Exp.* **2007**, *56*, 420–429.
- [165] T. E. Fox, X. L. Han, S. Kelly, A. H. Merrill, R. E. Martin, R. E. Anderson, T. W. Gardner, M. Kester, *Diabetes* **2006**, *55*, 3573–3580.
- [166] K. Kabayama, T. Sato, K. Saito, N. Loberto, A. Prinetti, S. Sonnino, M. Kinjo, Y. Igarashi, J. I. Inokuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13678–13683.
- [167] W. L. Holland, J. T. Brozinick, L. P. Wang, E. D. Hawkins, K. M. Sargent, Y. Q. Liu, K. Narra, K. L. Hoehn, T. A. Knotts, A. Siesky, D. H. Nelson, S. K. Karathanasis, G. K. Fontenot, M. J. Birnbaum, S. A. Summers, *Cell Metab.* **2007**, *5*, 167–179.
- [168] H. M. Zhao, M. Przybylska, I. H. Wu, J. H. Zhang, C. Siegel, S. Komarnitsky, N. S. Yew, S. H. Cheng, *Diabetes* **2007**, *56*, 1210–1218.

- [169] J. M. Aerts, R. Ottenhoff, A. S. Powlson, A. Grefhorst, M. van Eijk, P. F. Dubbelhuis, J. Aten, F. Kuipers, M. J. Serlie, T. Wennekes, J. K. Sethi, S. O'Rahilly, H. S. Overkleef, *Diabetes* **2007**, *56*, 1341–1349.
- [170] M. van Eijk, J. Aten, N. Bijl, R. Ottenhoff, C. P. A. A. van Roomen, P. F. Dubbelhuis, I. Seeman, K. Ghauharali-van der Vlugt, H. S. Overkleef, C. Arbeeny, A. K. Groen, J. M. F. G. Aerts, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4723.
- [171] C. Shen, D. Bullens, A. Kasran, P. Maerten, L. Boon, J. Aerts, G. van Assche, K. Geboes, P. Rutgeerts, J. L. Ceuppens, *Int. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 939–951.
- [172] B. P. Rempel, S. G. Withers, *Glycobiology* **2008**, *18*, 570–586.
- [173] N. Asano, R. J. Nash, R. J. Molyneux, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1645–1680.
- [174] N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R–104R.
- [175] N. Asano, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1479–1492.
- [176] P. Compain, O. R. Martin, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 3077–3092.
- [177] P. Compain, O. R. Martin, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 541–560.
- [178] *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Hrsg.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [179] A. E. Stütz, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [180] A. B. Hughes, A. J. Rudge, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 135–162.
- [181] M. S. M. Pearson, M. Mathe-Allainmat, V. Fargeas, J. Lebreton, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2159–2191.
- [182] F. M. Platt, G. R. Neises, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8362–8365.
- [183] A. Delgado, J. Casas, A. Llebaria, J. L. Abad, G. Fabrias, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2006**, *1758*, 1957–1977.
- [184] A. Delgado, J. Casas, A. Llebaria, J. L. Abad, G. Fabrias, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 580–606.
- [185] R. Rao Vunnam, N. S. Radin, *Chem. Phys. Lipids* **1980**, *26*, 265–278.
- [186] J. I. Inokuchi, N. S. Radin, *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 565–571.
- [187] A. Abe, N. S. Radin, J. A. Shayman, L. L. Wotring, R. E. Zipkin, R. Sivakumar, J. M. Ruggieri, K. G. Carson, B. Ganem, *J. Lipid Res.* **1995**, *36*, 611–621.
- [188] L. Lee, A. Abe, J. A. Shayman, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 14662–14669.
- [189] K. A. McEachern, J. Fung, S. Komarnitsky, C. S. Siegel, W. L. Chuang, E. Hutto, J. A. Shayman, G. A. Grabowski, J. Aerts, S. H. Cheng, D. P. Copeland, J. Marshall, *Mol. Genet. Metab.* **2007**, *91*, 259–267.
- [190] M. Jimbo, K. Yamagishi, T. Yamaki, K. Nunomura, K. Kabayama, Y. Igarashi, J. Inokuchi, *J. Biochem.* **2000**, *127*, 485–491.
- [191] U. Hillaert, S. Boldin-Adamsky, J. Rozenski, R. Busson, A. H. Futerman, S. Van Calenbergh, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5273–5284.
- [192] T. Miura, T. Kajimoto, M. Jimbo, K. Yamagishi, J. C. Inokuchi, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1481–1489.
- [193] I. Hillig, D. Warnecke, E. Heinz, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 1782–1785.
- [194] A. Abe, M. Hiraoka, J. A. Shayman, *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 2255–2263.
- [195] J. A. Shayman, A. Abe, M. Hiraoka, *Glycoconjugate J.* **2003**, *20*, 25–32.
- [196] T. D. Butters, H. R. Mellor, K. Narita, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2003**, *358*, 927–945.
- [197] T. D. Butters, L. van den Broek, G. W. J. Fleet, T. M. Krulle, M. R. Wormald, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 113–124.
- [198] L. A. G. M. van den Broek, D. J. Vermaas, F. J. van Kemenade, M. C. C. A. Tan, F. T. M. Rotteveel, P. Zandberg, T. D. Butters, F. Miedema, H. L. Ploegh, C. A. A. van Boeckel, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 507–516.
- [199] H. S. Overkleef, G. H. Renkema, J. Neele, P. Vianello, I. O. Hung, A. Strijland, A. M. van der Burg, G. J. Koomen, U. K. Pandit, J. Aerts, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26522–26527.
- [200] T. Wennekes, R. van den Berg, W. Donker, G. A. van der Marel, A. Strijland, J. Aerts, H. S. Overkleef, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1088–1097.
- [201] T. D. Butters, R. A. Dwek, F. M. Platt, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 561–574.
- [202] F. M. Platt, G. R. Neises, G. B. Karlsson, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27108–27114.
- [203] L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736–7744.
- [204] H. H. Chang, N. Asano, S. Ishii, Y. Ichikawa, J. Q. Fan, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4082–4092.
- [205] G. W. J. Fleet, A. Karpas, R. A. Dwek, L. E. Fellows, A. S. Tym, S. Petursson, S. K. Namgoong, N. G. Ramsden, P. W. Smith, J. C. Son, F. Wilson, D. R. Witty, G. S. Jacob, T. W. Rademacher, *FEBS Lett.* **1988**, *237*, 128–132.
- [206] T. D. Butters in *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Hrsg.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, Kap. 11.
- [207] T. D. Butters, R. A. Dwek, G. Fleet, M. G. Orchard, F. M. Platt, *WO 02/055498A1*, **2002**, S. 26–27.
- [208] T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, K. M. Bonger, W. E. Donker-Koopman, A. Ghisaidoobe, G. A. van der Marel, A. Strijland, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleef, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 836–846.
- [209] C. Boucheron, V. Desvergne, P. Compain, O. R. Martin, A. Lavi, M. Mackeen, M. Wormald, R. Dwek, T. D. Butters, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1747–1756.
- [210] T. M. Chapman, S. Courtney, P. Hay, B. G. Davis, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3397–3414.
- [211] T. M. Chapman, I. G. Davies, B. Gu, T. M. Block, D. I. C. Scopes, P. A. Hay, S. M. Courtney, L. A. McNeill, C. J. Schofield, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 506–507.
- [212] V. Faugeroux, Y. Genisson, N. Andrieu-Abadie, S. Colie, T. Levade, M. Baltas, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4437–4439.
- [213] H. Q. Li, T. Liu, Y. M. Zhang, S. Favre, C. Bello, P. Vogel, T. D. Butters, N. G. Oikonomakos, J. Marrot, Y. Bleriot, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 253–260.
- [214] A. R. Sawkar, M. Schmitz, K. P. Zimmer, D. Reczek, T. Edmunds, W. E. Balch, J. W. Kelly, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 235–251.
- [215] P. Alfonso, S. Pampin, J. Estrada, J. C. Rodriguez-Rey, P. Giraldo, J. Sancho, M. Pocovi, *Blood Cells Mol. Dis.* **2005**, *35*, 268–276.
- [216] T.-W. Mu, D. S. T. Ong, Y.-J. Wang, W. E. Balch, J. R. Yates III, L. Segatori, J. W. Kelly, *Cell* **2008**, *134*, 769–781.
- [217] A. R. Sawkar, W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15428–15433.
- [218] A. R. Sawkar, S. L. Adamski-Werner, W. C. Cheng, C. H. Wong, E. Beutler, K. P. Zimmer, J. W. Kelly, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1235–1244.
- [219] P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356–1359.
- [220] G. N. Wang, G. Reinkensmeier, S. W. Zhang, J. Zhou, L. R. Zhang, L. H. Zhang, T. D. Butters, X. S. Ye, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3146–3149.
- [221] B. Brumshtein, H. M. Greenblatt, T. D. Butters, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, I. Silman, A. H. Futerman, J. L. Sussman, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29052–29058.
- [222] C. Boucheron, S. Tournieux, P. Compain, O. R. Martin, K. Ikeda, N. Asano, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 1960–1965.

- [223] R. L. Lieberman, B. A. Wustman, P. Huertas, A. C. Powe, C. W. Pine, R. Khanna, M. G. Schlossmacher, D. Ringe, G. A. Petsko, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 101–107.
- [224] X. X. Zhu, K. A. Sheth, S. H. Li, H. H. Chang, J. Q. Fan, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7616–7619; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7450–7453.
- [225] Z. Q. Yu, A. R. Sawkar, L. J. Whalen, C. H. Wong, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 94–100.
- [226] R. Steet, S. Chung, W. S. Lee, C. W. Pine, H. Do, S. Kornfeld, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1376–1383.
- [227] R. A. Steet, S. Chung, B. Wustman, A. Powe, H. Do, S. A. Kornfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13813–13818.
- [228] H. Tsunoda, J. Inokuchi, K. Yamagishi, S. Ogawa, *Liebigs Ann.* **1995**, 279–284.
- [229] S. Ogawa, M. Ashiura, C. Uchida, S. Watanabe, C. Yamazaki, K. Yamagishi, J. Inokuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 929–932.
- [230] S. Ogawa, Y. Kobayashi, K. Kabayama, M. Jimbo, J. Inokuchi, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1955–1962.
- [231] S. Ogawa, T. Mito, E. Taiji, M. Jimbo, K. Yamagishi, J. Inokuchi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1915–1920.
- [232] K. Lei, H. Ninomiya, M. Suzuki, T. Inoue, M. Sawa, M. Iida, H. Ida, Y. Eto, S. Ogawa, K. Ohno, Y. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2007**, *1772*, 587–596.
- [233] H. Lin, Y. Sugimoto, Y. Ohsaki, H. Ninomiya, A. Oka, M. Taniguchi, H. Ida, Y. Eto, S. Ogawa, Y. Matsuzaki, M. Sawa, T. Inoue, K. Higaki, E. Nanba, K. Ohno, Y. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2004**, *1689*, 219–228.
- [234] M. Egido-Gabás, P. Serrano, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1195–1201.
- [235] P. Serrano, J. Casas, M. Zucco, G. Emeric, M. Egido-Gabás, A. Llebaria, A. Delgado, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 43–52.
- [236] W. Zheng, J. Padia, D. J. Urban, A. Jadhav, O. Goker-Alpan, A. Simeonov, E. Goldin, D. Auld, M. E. LaMarca, J. Ingles, C. P. Austin, E. Sidransky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13192–13197.
- [237] W. W. Huang, W. Zheng, D. J. Urban, J. Ingles, E. Sidransky, C. P. Austin, C. J. Thomas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5783–5789.
- [238] N. W. Barton, R. O. Brady, J. M. Dambrosia, A. M. Dibisceglie, S. H. Doppelt, S. C. Hill, H. J. Mankin, G. J. Murray, R. I. Parker, C. E. Argoff, R. P. Grewal, K. T. Yu, *N. Engl. J. Med.* **1991**, *324*, 1464–1470.
- [239] R. O. Brady, J. F. Tallman, W. G. Johnson, A. E. Gal, W. R. Leahy, J. M. Quirk, A. S. Dekaban, *N. Engl. J. Med.* **1973**, *289*, 9–14.
- [240] G. A. Grabowski, N. W. Barton, G. Pastores, J. M. Dambrosia, T. K. Banerjee, M. A. McKee, C. Parker, R. Schiffmann, S. C. Hill, R. O. Brady, *Ann. Intern. Med.* **1995**, *122*, 33–39.
- [241] T. Cox, R. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. van Weely, M. Hrebicek, F. Platt, T. Butters, R. Dwek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein, A. Zimran, *Lancet* **2000**, *355*, 1481–1485.
- [242] T. M. Cox, J. Aerts, G. Andria, M. Beck, N. Belmatoug, B. Bembi, R. Chertkoff, S. Vom Dahl, D. Elstein, A. Erikson, M. Giralt, R. Heitner, C. Hollak, M. Hrebicek, S. Lewis, A. Mehta, G. M. Pastores, A. Rolfs, M. C. S. Miranda, A. Zimran, *J. Inherited Metab. Dis.* **2003**, *26*, 513–526.
- [243] J. M. F. G. Aerts, C. E. M. Hollak, R. G. Boot, J. E. M. Groener, M. Maas, *J. Inherited Metab. Dis.* **2006**, *29*, 449-U441.
- [244] F. M. Platt, M. Jeyakumar, U. Andersson, D. A. Priestman, R. A. Dwek, T. D. Butters, T. M. Cox, R. H. Lachmann, C. Hollak, J. Aerts, S. Van Weely, M. Hrebicek, C. Moyses, I. Gow, D. Elstein, A. Zimran, *J. Inherited Metab. Dis.* **2001**, *24*, 275–290.
- [245] H. R. Mellor, J. Nolan, L. Pickering, M. R. Wormald, F. M. Platt, R. A. Dwek, G. W. J. Fleet, T. D. Butters, *Biochem. J.* **2002**, *366*, 225–233.
- [246] T. D. Butters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 412–418.
- [247] J. Q. Fan in *Inminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications* (Hrsg.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley-VCH, Weinheim, **2007**, Kap. 10.
- [248] Z. Q. Yu, A. R. Sawkar, J. W. Kelly, *FEBS J.* **2007**, *274*, 4944–4950.
- [249] J. Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 112–115.
- [250] G. J. Kornhaber, M. B. Tropak, G. H. Maegawa, S. J. Tuske, S. J. Coales, D. J. Mahuran, Y. Hamuro, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2643–2649.
- [251] S. Noel, M. Wilke, A. G. M. Bot, H. R. de Jonge, F. Becq, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 1016–1023.
- [252] C. Norez, S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. de Jonge, F. Becq, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2081–2086.