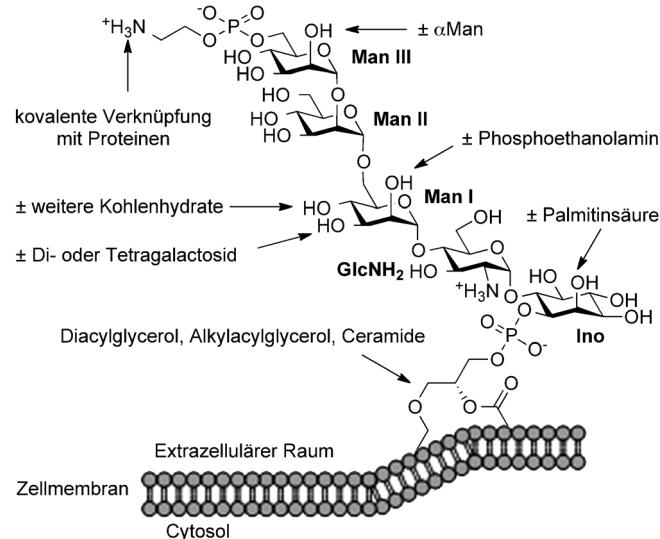


Eine allgemeine Methode zur Herstellung von GPI-Membranankern am Beispiel der Totalsynthese des „Low-molecular-weight-Antigens“ von *Toxoplasma gondii***

Yu-Hsuan Tsai, Sebastian Götze, Nahid Azzouz, Heung Sik Hahm, Peter H. Seeberger* und Daniel Varon Silva*

Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker gehören zu einer Klasse von Glycolipiden mit der konservierten Kernstruktur $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OPO}_3\text{H}-6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{GlcNH}_2\alpha 1 \rightarrow 6\text{myo-Ino}1-\text{OPO}_3\text{H-Lipid}$ (Man = Mannose; GlcNH_2 = Glucosamin; Ino = Inositol) (Schema 1).^[1] GPI-Membrananker werden von allen eukaryotischen Zellen exprimiert, und ihre Struktur und Funktion weicht artenabhängig voneinander ab. Zu den unterschiedlichen Modifikationen zählen eine weitere Mannose am nicht-reduzierenden Ende der linearen Pentasaccharidkernstruktur, die Verzweigung der Mannose I an den Positionen 3 oder 4 sowie zusätzliche Phosphorylierungen. Die GPI-Lipidanker zeigen eine hohe Diversität, wobei die Position 2 des *myo*-Inosits ebenfalls verestert sein kann.^[2]

Die primäre Funktion von GPI-Ankern in höheren Eukaryoten besteht darin, Proteine in der Zellmembran zu verankern und diese in Membran-subdomänen zu lokalisieren, wodurch eine spezifische Interaktion mit anderen Membranproteinen ermöglicht wird.^[3] Diese GPI-basierte Lokalisation ist vor allem bei Zell-Zell-Interaktionen und Signalkaskadenprozessen essentiell.^[4] Protozoische Parasiten wie *Plasmodium falciparum* oder *Toxoplasma gondii* hingen nutzen freie GPI-Anker und GPI-verankerte Proteine, um das Immunsystem ihres Wirtes zu modulieren.^[5] GPI 1 (Schema 2b) spielt beispielsweise eine noch nicht vollkom-



Schema 1. Konservierte Kernstruktur aller GPI-Membrananker und deren mögliche Modifizierungen.

men verstandene Rolle in der Aktivierung des menschlichen Immunsystems während der Infektion mit dem Parasiten *T. gondii* und führt in Toxoplasmosepatienten zur Bildung von Antikörpern gegen dieses Kohlenhydrat, welches auch als „Low-molecular-weight-Antigen“ bezeichnet wird.^[6]

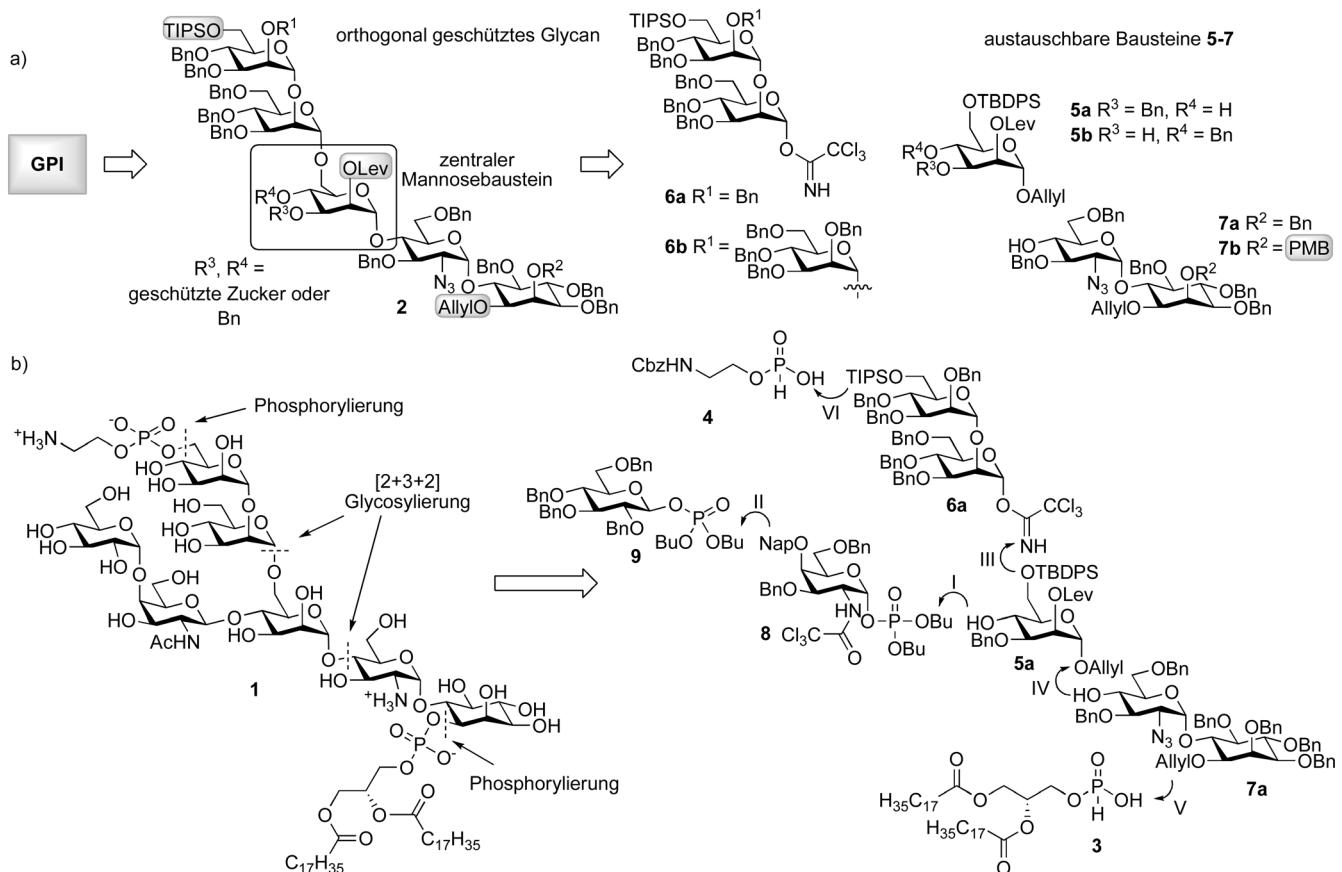
In vielen weiteren Fällen sind die Funktionen von GPI-Ankern allerdings unbekannt. Dies liegt vor allem am amphiphilen Charakter dieser Verbindungen, der ihre Isolierung erschwert und keine detaillierte Aussage über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zulässt. Der einzige Zugang zu hinreichenden Mengen definierter GPI-Membrananker ist deshalb ihre chemische Synthese.^[7] Obwohl bereits einige dieser komplexen Naturstoffe durch unterschiedliche Methoden und Schutzgruppenstrategien synthetisiert wurden, existiert bisher kein allgemeines Konzept, das die Herstellung aller bekannten Strukturen ermöglicht.^[8]

Wir präsentieren hier einen allgemeinen Ansatz zur Herstellung verzweigter Glycosylphosphatidylinositole. Durch die Verwendung der austauschbaren Bausteine **5–7** ist es prinzipiell möglich, eine Bibliothek aus orthogonal geschützten Glycanen **2** in wenigen Syntheseschritten aufzubauen (Schema 2a). Das dabei verwendete Schutzgruppenmuster ermöglicht es am Ende der Synthese, verschiedene GPI-Membrananker oder deren Derivate aus einem Vorläufermolekül herzustellen und diese für Bioaktivitätstests und

[*] Y.-H. Tsai, S. Götze, Dr. N. Azzouz, H. S. Hahm, Prof. Dr. P. H. Seeberger, Dr. D. Varon Silva
Abteilung Biomolekulare Systeme
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)
und
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: seeberger@mpikg.mpg.de
daniel.varon@mpikg.mpg.de
Homepage: http://www.mpikg.mpg.de/Biomolekulare_Systeme

[**] Diese Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, der Körber-Stiftung (Körber-Preis der europäischen Wissenschaften an P.H.S.) und dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (Promotionsstipendium für Y.-H.T.) unterstützt. Dank geht an: Dr. Ivan Vilotijevic, Dr. Xiaoqiang Guo und Martha Kozakowski für ihre Hilfe, Prof. Dr. Xinyu Liu (University of Pittsburgh, USA) für Anregungen, Dr. Jean Francois Dubremetz (Universität Montpellier, Frankreich) für die monoklonalen Antikörper mAbT54E10 und mAbT33F12, GIANTmicrobes für das *T. gondii*-Bild sowie Dr. Steffen Eller und Markus Weishaupt für die Korrektur des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103483> zu finden.



Schema 2. a) Allgemeine Retrosynthese zur Herstellung von GPI-Ankern. Orthogonale Schutzgruppen sind grau unterlegt. b) Retrosynthese des GPI **1**. Die römischen Ziffern geben die Reihenfolge der Synthese wieder. Ac = Acetyl; Bn = Benzyl; Bu = Butyl; Cbz = Benzyloxycarbonyl; Lev = Lävulinoyl; Me = Methyl; Nap = 2-Naphthylmethyl; Ph = Phenyl; PMB = *p*-Methoxybenzyl; TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl; TIPSO = Triisopropylsilyl.

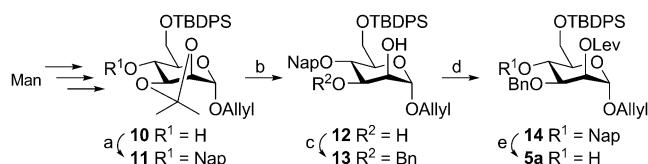
physikalische Messungen zu nutzen. Eine vierte Mannose, die Palmitoylierung des Inositals und unterschiedliche Phosphorylierungsmuster sind somit einfach zugänglich.

Die Durchführbarkeit unseres Konzepts bestätigen wir dabei am Beispiel der Totalsynthese des biologisch aktiven „Low molecular weight antigen“ **1** von *T. gondii* und vergleichen in zusätzlichen Bindungsexperimenten mit bekannten monoklonalen Antikörpern unsere synthetische mit isolierten Strukturen (Schema 2b).^[9]

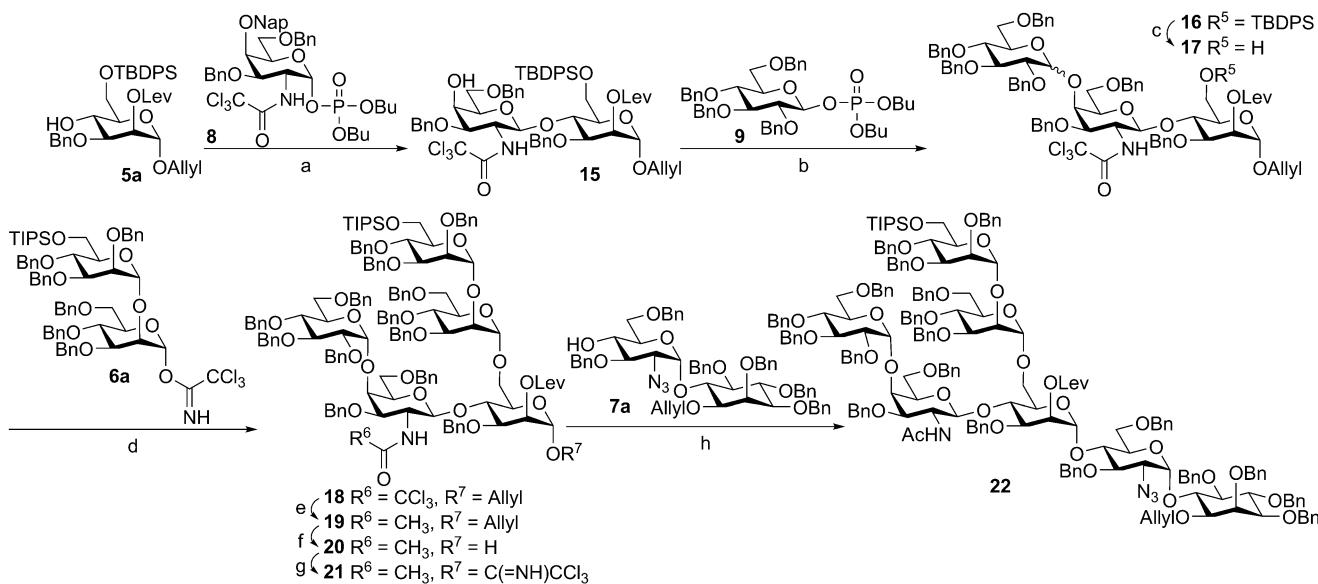
Der zentrale Mannosebaustein **5a** steht in der retrosynthetischen Analyse des GPI **1** im Mittelpunkt und ermöglicht den Aufbau eines Trisaccharids, das mit dem Dimannosylimidat **6a** und dem Pseudodisaccharid **7a**^[8c] in einer [2+3+2]-Glycosylierung zu Pseudoheptasaccharid **22** verlängert wird. Die selektive Phosphorylierung mit den H-Phosphonaten **3**^[8f] und **4**^[8b] liefert nach abschließender Entfernung der verbleibenden Ester- und Etherschutzgruppen GPI **1**. Erste Versuche, in denen die lineare Pentasaccharidkernstruktur mit verschiedenen *N*-Acetylgalactosyldonoren verzweigt werden sollte, führten zu keinem Erfolg, weshalb diese Reihenfolge eine Optimierung der Synthese darstellt.

Die Herstellung des Bausteins **5a** begann mit der Umwandlung von D-Mannose in das Acetal **10**,^[10] bevor dessen Position 4 temporär als 2-Naphthylmethylether geschützt wurde^[11] (Schema 3). Nach saurer Hydrolyse des Isopropyli-

denacetals wurde das Diol **12** über ein Stannylenacetal selektiv an Position 3 als Benzylether geschützt. Die Veresterung der freien Alkoholgruppe mit Lävulinsäure und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC)^[12] gefolgt von der Abspaltung des 2-Naphthylmethylethers lieferte die zentrale Mannose **5a**.^[13] Diese flexible Strategie erlaubte ebenfalls die Synthese der Verbindung **5b**, indem die Schutzgruppen an den Positionen 3 und 4 vertauscht wurden. Baustein **5b** bietet dabei Zugang zu den GPI-Ankern des Parasiten *Trypanosoma brucei*, welche bis heute die einzigen Verbindungen sind, die an Position 3 der Mannose I eine Verzweigung aufweisen.^[14]



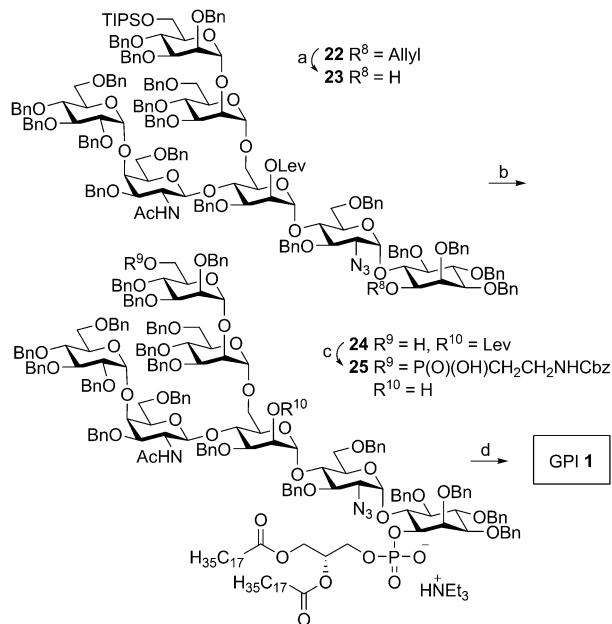
Schema 3. Synthese des zentralen Mannosebausteins **5a**. Reaktionsbedingungen: a) $NapBr$, NaH , DMF , 99% ; b) 80% $AcOH$, $65^\circ C$, 72% ; c) 1. Bu_2SnO , $Toluol$, Rückfluss; 2. $BnBr$, $TBAB$, 99% ; d) $LevOH$, DIC , $DMAP$, CH_2Cl_2 , 82% ; e) DDQ , H_2O , CH_2Cl_2 , 96% . $DDQ = 2,3$ -Dichlor-5,6-dicyanobenzochinon; $DMAP = 4$ -(Dimethylamino)pyridin; $DMF =$ Dimethylformamid; $TBAB =$ Tetrabutylammoniumbromid; $THF =$ Tetrahydrofuran.



Zur Synthese des Pseudoheptasaccharids **22** wurde Manose **5a** in einer Eintopfreaktion mit Galactosylphosphat **8** durch Zusatz von Trimethylsilyltriflat als Promotor glycosiert und der 2-Naphthylmethylether oxidativ durch DDQ entfernt (Schema 4). Das quantitativ erhaltene Disaccharid **15** wurde danach mit dem perbenzylierten Phosphat **9**^[15] in einer Ausbeute von 82 % und einem Anomerenverhältnis von 6:1 (α/β) verlängert. Die Verwendung von Thiophen als Lösungsmittel erhöhte hierbei die α -Selektivität, da dieses mit Oxocarbeniumionen ein β -konfiguriertes Intermediat bildet, welches die Bildung von α -Glycosiden begünstigt.^[16] Das Anomerengemisch des Trisaccharids konnte jedoch nicht säulenchromatographisch getrennt werden, weshalb die TBDPS-Gruppe mit HF-Pyridin abgespalten und das Trisaccharid unter Säurekatalyse mit dem Dimannosylimidat **6a** zum Pentasaccharid umgesetzt wurde. Die neue glycosidische Bindung entstand dabei in einem Anomerenverhältnis von 15:1 (α/β). Auf dieser Stufe konnte das gewünschte Pentasaccharid **18** aus dem Gemisch der vier Diastereomere in 69 % Ausbeute isoliert werden. Nach Reduktion des Trichloracetamids durch Zink in Essigsäure bei 55 °C wurde der anomere Allylether am reduzierenden Ende des Glycans **19** mithilfe eines Iridium-Katalysators isomerisiert und der gebildete Enolether durch Zusatz von Quecksilber(II)-Salzen unter leicht sauren Bedingungen hydrolysiert.^[8g,17] Das Halbacetal **20** konnte anschließend in das Glycosyltrichloracetimidat **21** überführt und per [5+2]-Glycosylierung mit Pseudodisaccharid **7a** stereoselektiv in 71 % Ausbeute zu Pseudoheptasaccharid **22** umgesetzt werden.

Die Abspaltung des Allylethers der Kernglycanstruktur **22** lieferte Alkohol **23** in 80 % Ausbeute, der mit dem in situ erzeugten gemischten Säureanhydrid aus H-Phosphonat **3** und Pivaloylchlorid phosphoryliert und direkt durch Iod in

wässriger Lösung oxidiert wurde (Schema 5).^[8f,18] Anschließend wurde der TIPS-Silylether durch Verwendung von Scandium(III)-triflat sauer hydrolysiert und das resultierende Glycolipid **24** in 64 % Ausbeute über zwei Stufen isoliert. Nach der zweiten Phosphorylierung und darauffolgender



Hydrazinolyse des Lävulinesters konnten die restlichen Benzylether des Glycolipids **25** palladiumkatalysiert in einer Mischung aus Methanol, Chloroform und Wasser hydriert und GPI-Anker **1** in 58% Gesamtausbeute über drei Stufen erhalten werden.^[19]

Der synthetische Kohlenhydratanteil des GPI-Membranankers **1** wurde auf speziell beschichtete Glasträger gedruckt und kovalent über eine Amidbindung an dessen Oberfläche gebunden.^[20] Anschließend konnte dieser Glycoarray mit monoklonalen Antikörpern (mAb) inkubiert werden, die durch Immunisierung von Mäusen mit *T. gondii* erzeugt und durch Subklonierung erhalten wurden. mAbT54E10 erkennt dabei spezifisch **1**, und mAbT33F12 eine GPI-Struktur, welche sich von **1** nur durch das Fehlen der α -Glucose unterscheidet. Diese Ergebnisse konnten bisher nur durch Experimente bestätigt werden, in denen Isolate des Parasiten verwendet wurden.^[6,9] Die von uns durchgeföhrten Antikörperbindungsexperimente zeigen, dass mAbT54E10 eindeutig **1** erkennt, wohingegen mAbT33F12 eine geringere Affinität für dessen Kohlenhydratstruktur besitzt. Deshalb können wir durch Totalsynthese sowohl die Struktur des „Low molecular weight antigen“ von *T. gondii* als auch die Selektivität der Antikörper bestätigen.^[21]

Zusammenfassend haben wir eine Strategie für die Synthese von GPI-Membranankern entwickelt und diese am Beispiel der Totalsynthese des vollständigen Oberflächenantigens **1** von *T. gondii* erstmalig demonstriert. Überdies konnten wir zeigen, dass unsere synthetische Verbindung von monoklonalen Antikörpern erkannt wird. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte es möglich sein, einen diagnostischen Test auf der Basis von Mikroarrays zu entwickeln, der gesunde von mit *T. gondii* infizierten Patienten unterscheiden kann, falls polyklonale Antikörper aus deren Blut die synthetische Struktur erkennen.^[22]

Eingegangen am 20. Mai 2011,
veränderte Fassung am 4. Juli 2011
Online veröffentlicht am 5. September 2011

Stichwörter: Glycosylphosphatidylinositol · Naturstoffe · Oberflächenantigene · Synthesemethoden · *Toxoplasma gondii*

- [1] R. Gigg, J. Gigg, *Glycopeptides and Related Compounds* (Hrsg.: D. G. Large, C. D. Warren), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 327–392.

- [2] Z. Guo, L. Bishop, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3585–3596.
- [3] T. B. Nicholson, C. P. Stanners, *J. Cell Biol.* **2006**, 175, 647–659.
- [4] S. Hiscox, M. B. Hallett, B. P. Morgan, C. W. van den Berg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 293, 714–721.
- [5] M. A. J. Ferguson, *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 2799–2809.
- [6] a) N. Azzouz, H. Shams-Eldin, S. Niehus, F. Debierre-Grockiego, U. Bieker, J. Schmidt, C. Mercier, M.-F. Delauw, J.-F. Dubremetz, T. K. Smith, R. T. Schwarz, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, 38, 1914–1925; b) B. Striepen, C. F. Zinecker, J. B. L. Damm, P. A. T. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. G. Vliegenthart, J.-F. Dubremetz, R. T. Schwartz, *J. Mol. Biol.* **1997**, 266, 797–813.
- [7] N. Azzouz, F. Kamena, P. H. Seeberger, *OMICS* **2010**, 14, 445–454.
- [8] Übersicht: a) A. V. Nikolaev, N. Al-Maharik, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 970–1020; Originalbeiträge: b) C. Murakata, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1992**, 235, 95–114; c) D. K. Baeschlin, A. R. Chaperon, L. G. Green, M. G. Hahn, S. J. Ince, S. V. Ley, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 172–186; d) K. Pekari, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 1295–1308; e) Y.-U. Kwon, X. Liu, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2004**, 1706–1707; f) X. Liu, Y.-U. Kwon, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5004–5005; g) B. M. Swarts, Z. Guo, J. Am. Chem. Soc. **2010**, 132, 6648–6650.
- [9] S. Tomavo, G. Couvreur, M. A. Leriche, A. Sadak, A. A. Achbarou, B. Fortier, J. F. Dubremetz, *Parasitology* **1994**, 108, 139–145.
- [10] P. Cmoch, Z. Pakulski, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1494–1503.
- [11] M. Csávás, A. Borbás, L. Szilágyi, A. Lipták, *Synlett* **2002**, 887–890.
- [12] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, *Tetrahedron Lett.* **1976**, 17, 4875–4878.
- [13] J. Xia, C. F. Piskorz, J. L. Alderfer, R. D. Locke, K. L. Matta, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2773–2776.
- [14] M. J. Ferguson, S. W. Homans, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Science* **1988**, 239, 753–759.
- [15] R. R. Schmidt, M. Stumpp, J. Michel, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 405–408.
- [16] J. Park, S. Kawatkar, J.-H. Kim, G.-J. Boons, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1959–1962.
- [17] J. J. Oltvoort, C. A. A. van Boeckel, J. H. de Koning, J. H. van Boom, *Synthesis* **1981**, 305–308.
- [18] R. H. Hall, A. Todd, R. F. Webb, *J. Chem. Soc.* **1957**, 3291–3296.
- [19] Analytische Daten der Endverbindung siehe Hintergrundinformationen.
- [20] T. Horlacher, P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1414–1422.
- [21] Bilder aller Mikroarrays siehe Hintergrundinformationen.
- [22] F. Kamena, M. Tamborini, X. Liu, Y.-U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 238–240.