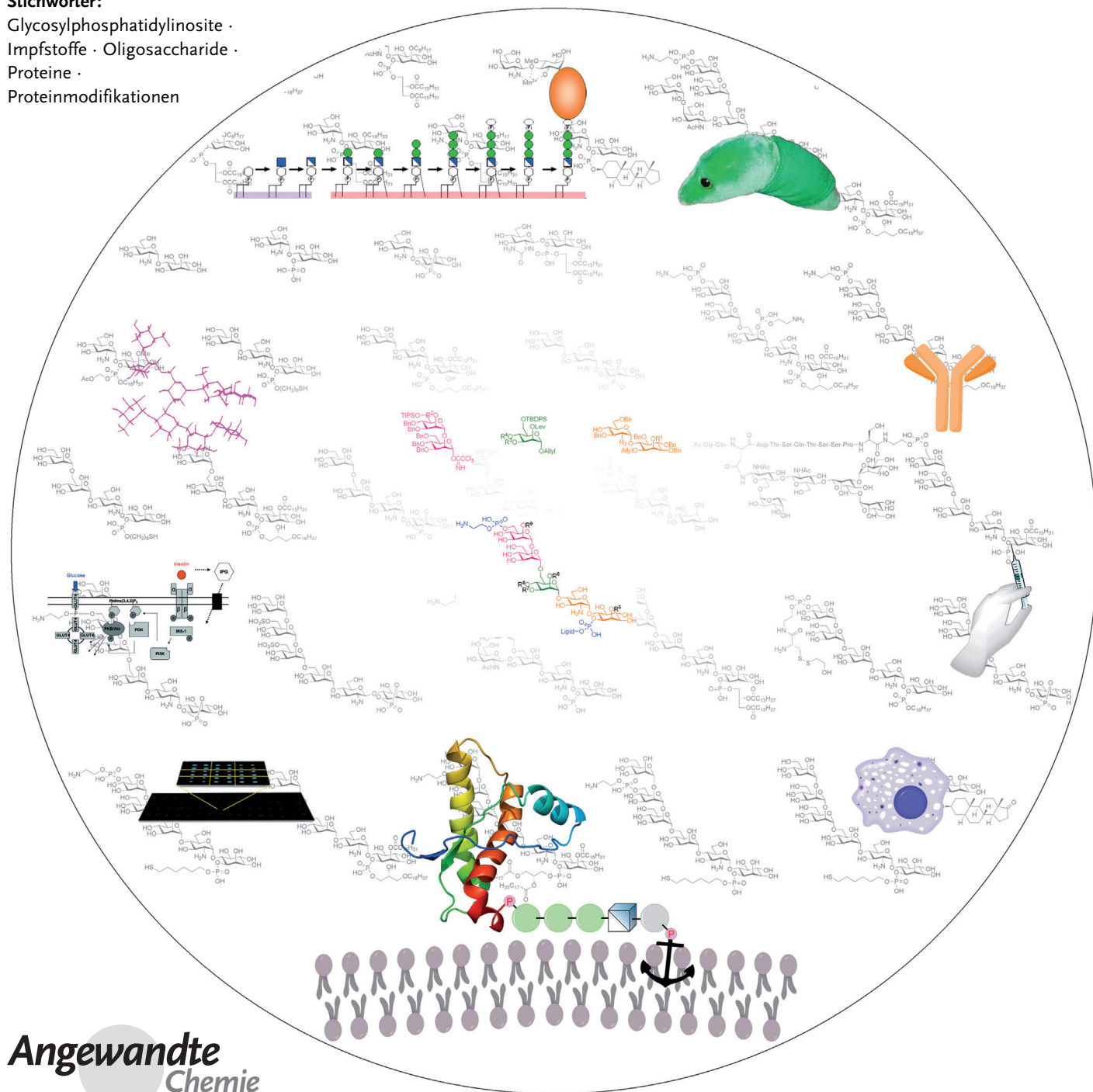


# Chemische Biologie der Glycosylphosphatidylinosit-Anker

*Yu-Hsuan Tsai, Xinyu Liu und Peter H. Seeberger\**

**Stichwörter:**

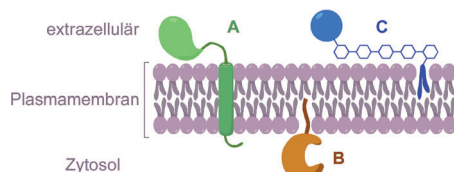
Glycosylphosphatidylinositol ·  
Impfstoffe · Oligosaccharide ·  
Proteine ·  
Proteinmodifikationen



**G**lycosylphosphatidylinosite (GPIs) gehören zu einer Klasse komplexer Glycolipide, die als C-terminale posttranslationale Modifikation kovalent an Proteine gebunden werden. Sie verankern Proteine in der Zellmembran und sind essenziell für die natürliche Funktionsfähigkeit der meisten eukaryotischen Zellen. GPI-verankerte Proteine können sich strukturell und funktional stark voneinander unterscheiden. Viele GPIs wurden strukturell charakterisiert, aber abgesehen von ihrer einfachen physikalischen Ankerfunktion ist wenig über ihre biologische Rolle bekannt. Die funktionelle Aufklärung der GPI-Anker auf molekularer Ebene ist noch wenig fortgeschritten. Dieser Aufsatz konzentriert sich auf die biologischen Funktionen von GPIs, die durch die Verwendung synthetischer Moleküle aufgeklärt werden konnten. Zudem enthält er eine Zusammenfassung über die strukturelle Diversität dieser Glycolipide und befasst sich ebenfalls mit deren biologischer und chemischer Synthese.

## 1. Entdeckung der GPIs

Membranverankerte Proteine sind essenziell für die einwandfreie Funktionsfähigkeit einer Zelle.<sup>[1]</sup> Ursprünglich wurde vermutet, dass membrangebundene Proteine nur mithilfe einer hydrophoben Peptidsequenz, die in die Lipiddoppelschicht eingebettet ist, in der Zellmembran verankert werden können (A in Schema 1). Später konnte gezeigt werden, dass Proteine, die eine freie Amin- oder Thiolgruppe



**Schema 1.** Klassifizierung von integralen Membranproteinen. A) Transmembranprotein, B) prenyliertes oder acyliertes Protein, C) GPI-verankertes Protein.

aufweisen, mit langkettigen Fettsäuren acyliert werden können und dass diese lipophile Einheit zur Verankerung von Proteinen in der Zellmembran verwendet wird (B in Schema 1). In den späten 1970er Jahren konnte eine neue Phospholipase (Phosphatidylinosit-Phospholipase C oder PI-PLC) aus verschiedenen Bakterien isoliert werden.<sup>[2]</sup> Dieses Enzym hat die Eigenschaft, Proteine wie die alkalische Phosphatase (AP), 5'-Nuklease und Acetylcholinesterase (AChE) aus unterschiedlichen Gewebeproben in eine lösliche Form zu überführen.<sup>[3]</sup> Auf der Basis dieser Experimente wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass verschiedene Proteine über eine kovalente Verbindung mit einem Anker, der ein PI enthält, an die Zellmembran gebunden sind (C in Schema 1).<sup>[4]</sup> Weitere Strukturanalysen ergaben, dass der Anker zusätzlich zur Inositeinheit einen Oligosaccharidanteil enthält,<sup>[5]</sup> was zur Etablierung einer generellen Struktur für die Klasse dieser Glycolipide führte. Zusätzlich zu GPIs, die als Membrananker für Proteine fungieren, konnten auf der

Oberfläche von verschiedenen Protozoen auch freie GPIs in großer Zahl gefunden werden, die nicht mit Proteinen verknüpft sind.<sup>[6]</sup>

## 2. Vorkommen und Struktur der GPIs

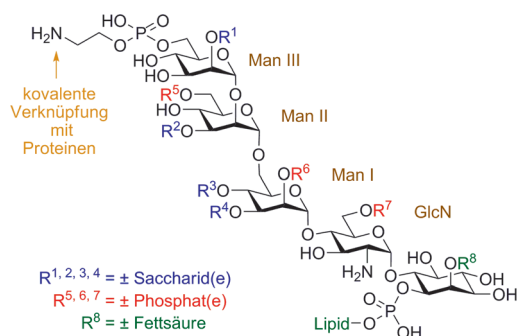
Hunderte GPI-verankerte Proteine sind in zahlreichen Organismen einschließlich Protozoen, Pilzen, Hefen, Pflanzen, Weichtieren, Insekten und Wirbeltieren identifiziert worden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass diese Art der Proteinmodifizierung in Eukaryoten weit verbreitet ist.<sup>[7]</sup> GPI-verankerte Proteine konnten ebenfalls indirekt in Archaeen<sup>[8]</sup> detektiert werden, aber bis jetzt noch nicht in Bakterien.<sup>[9]</sup> GPI-verankerte Proteine erfüllen verschiedenste Funktionen und spielen eine grundlegende Rolle bei der Signaltransduktion, Immunantwort, Metastasenbildung und der Pathophysiologie von Parasiten.<sup>[10]</sup> In vereinzelten Fällen ist die GPI-Verankerung auch notwendig für die korrekte Funktion von Proteinen.<sup>[11]</sup>

Mit einer Ausnahme<sup>[12]</sup> haben alle bis heute identifizierten GPIs eine gemeinsame Kernstruktur:  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OPO}_3\text{H}-6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Glc}\text{N}\alpha 1 \rightarrow 6\text{myo-Inol-OPO}_3\text{H-Lipid}$  (Schema 2).<sup>[13]</sup> Das Vorhandensein einer freien Aminogruppe an der Glucosamineinheit von GPIs ist ungewöhnlich, da Glucosamine in den meisten natürlichen Kohlenhydratkonjugaten N-acetyliert oder -sulfatiert vorlie-

## Aus dem Inhalt

1. Entdeckung der GPIs	11605
2. Vorkommen und Struktur der GPIs	11605
3. GPI-Biosynthese	11606
4. Chemische Synthese von GPIs	11608
5. Synthetische GPIs als Hilfsmittel in der chemischen Biologie	11612
6. Schlussfolgerungen und Perspektiven	11620

[\*] Dr. Y.-H. Tsai, Prof. Dr. P. H. Seeberger  
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  
Prof. Dr. X. Liu  
Department of Chemistry, University of Pittsburgh  
219 Parkman Avenue, Pittsburgh, PA 15260 (USA)



**Schema 2.** Konservierte Kernstruktur der GPIs und mögliche Modifizierungen.

gen.<sup>[14]</sup> Die üblichen Modifizierungen der Kernstruktur umfassen eine weitere Mannose an der C2-Position der ManIII, verschiedene Kohlenhydrate oder Oligosaccharide an der Position C3 oder C4 der ManI und zusätzliche Phosphorylierungen (Tabelle 1). Alle bekannten Variationen des GPI-Phospholipids, das aus (*lyso*)-Diacylglycerolen, (*lyso*)-Alkylacylglycerolen oder Ceramiden aufgebaut ist, bestehen aus Kohlenwasserstoffketten unterschiedlicher Länge und variieren im Grad ihrer Sättigung. Außerdem kann die C2-Position des *myo*-Inosits als Fettsäureester vorliegen, was dazu führt, dass der GPI-Anker unempfindlich gegenüber der enzymatischen Hydrolyse durch PI-PLC wird.<sup>[15]</sup> Es ist offensichtlich, dass zwischen GPIs verschiedener Organismen (Tabelle 1, Nr. 17–20) oder Gewebearten einer einzigen Spezies (Tabelle 1, Nr. 21–24) signifikante Strukturunterschiede bestehen; allerdings ist die funktionelle Signifikanz dieser Variationen zum Großteil unbekannt.

Die Struktur von GPIs kann nur bedingt durch NMR-Spektroskopie und/oder Röntgenkristallographie analysiert werden, da der amphiphile und heterogene Charakter dieser Glycolipide ein großes Problem bei ihrer Reinigung darstellt. Deshalb wurden viele Strukturen auf Grundlage indirekter Belege aus Massenspektrometrie oder Enzym- und Lectinassays vorgeschlagen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die begrenzten Abweichungen in den bis heute untersuchten GPI-Strukturen dem Stand der Technik, der während der Isolierung, Analyse und Strukturaufklärung der GPIs verwendet wurde, geschuldet sein können. Beispielsweise konnte in einem erst kürzlich erschienen Bericht gezeigt werden, dass der GPI der alkalischen Phosphatase der humanen Plazenta über einen Phosphodiester mit einem  $\beta$ -

GlcNAc verknüpft ist (Tabelle 1, Nr. 25).<sup>[16]</sup> Diese Modifikation hatte zuvor nicht nachgewiesen werden können.<sup>[17]</sup>

### 3. GPI-Biosynthese

Von Pilzen<sup>[18]</sup> bis hin zu Tieren<sup>[19]</sup> ist die Biosynthese von GPIs entscheidend für ihre Homöostase. Ein Defekt in der GPI-Biosynthese in menschlichen Erythrozyten kann zu paroxysmaler nächtlicher Hämoglobinurie führen. Diese erworbene Krankheit verursacht eine Anämie, die durch die beeinträchtigte Expression des GPI-verankerten Proteins CD59 ausgelöst wird.<sup>[19]</sup> Vererbte Mutationen in den Genen der GPI-Biosynthese können im Menschen zu nicht regulierter Homöostase der Blutkoagulation<sup>[20]</sup> oder geistiger Retardierung führen.<sup>[21]</sup> Deswegen ist das Verständnis der GPI-Biosynthese in Säugetierzellen von großer Bedeutung.

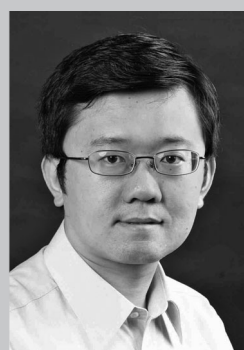
Die Biosynthesewege von GPIs in Säugetierzellen und protozoischen Parasiten wurden bereits detailliert untersucht, und die Gene, die für die Enzyme für die meisten biochemischen Transformationen während der GPI-Synthese kodieren, sind charakterisiert worden.<sup>[45]</sup> Wir diskutieren zuerst die GPI-Biosynthese in Säugetieren und heben anschließend die Abweichungen in der Biochemie der Parasiten *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* hervor. Da die GPI-Biosynthese unerlässlich für das Wachstum von vielen Parasiten während der Invasion des Säugetierwirts ist,<sup>[46]</sup> bieten Unterschiede im GPI-Biosyntheseweg oder den Enzymstrukturen zwischen Parasiten und Säugetieren mögliche Ziele für antiparasitäre Wirkstoffe.<sup>[47]</sup> Die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe, die gezielt gegen Enzyme der GPI-Biosynthese von *T. brucei* gerichtet sind, wird in Abschnitt 5.4 diskutiert.

In Säugetierzellen werden GPIs im endoplasmatischen Retikulum (ER) durch sequenzielle Anknüpfung von Monosacchariden, Fettsäureketten und Phosphoethanolaminen (PEtN) an Phosphatidylinosit (PI) synthetisiert.<sup>[45a]</sup> Die Biosynthese beginnt auf der zytoplasmatischen Seite des ER durch den Transfer eines GlcNAc auf Diacyl-PI (Schema 3 A). Das resultierende GlcNAc-PI wird N-desacyliert und anschließend auf die luminal Seite des ER überführt.

Die C2-Position des Inosits wird nachfolgend durch das Enzym PIG-W mit Palmitinsäure verestert. Dieser Schritt ist entscheidend, da die Menge an GPI-verankerten Proteinen in Zellen, die PIG-W fehlerhaft oder nicht exprimieren, drastisch abnimmt.<sup>[48]</sup> Es wird vermutet, dass der Lipidanteil des



Yu-Hsuan Tsai schloss sein Bachelor-Studium an der National Taiwan University ab, bevor er 2007 für sein Master-Studium an die ETH Zürich in die Gruppe von Peter H. Seeberger wechselte. Er erhielt 2008 seinen Master-Abschluss und fertigte von 2009 bis 2012 seine Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung an. Momentan arbeitet er als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gruppe von Jason W. Chin an verschiedenen Hilfsmitteln zur Einführung posttranslationaler Modifikationen in Proteine.



Xinyu Liu erhielt einen Bachelor-Abschluss von der Kyoto University, den Dokortitel unter der Anleitung von Peter H. Seeberger im Jahr 2007 von der ETH Zürich und absolvierte anschließend ein Postdoktorat an der Harvard Medical School in der Gruppe von Christopher T. Walsh. Seit 2010 ist er Assistenzprofessor an der University of Pittsburgh.

**Tabelle 1:** Struktur von ausgewählten GPIs verschiedener Organismen und Gewebearten.<sup>[a]</sup>

Nr.	Herkunft	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	Lipid
1	VSG 117 von <i>T. brucei</i> <sup>[22]</sup>	H	H	H	Gal <sub>2-4</sub> α	H	H	H	H	DAG
2	VSG 121 von <i>T. brucei</i> <sup>[23]</sup>	H	Galβ	H	Gal <sub>2-4</sub> α	H	H	H	H	DAG
3	VSG 221 von <i>T. brucei</i> <sup>[24]</sup>	± Galα	± Galβ	H	Gal <sub>2-4</sub> α	H	H	H	H	DAG
4	VSG von <i>T. congolense</i> <sup>[25]</sup>	H	H	Gal-GlcNAcβ	H	H	H	H	H	DAG
5	1G7 von <i>T. cruzi</i> <sup>[26]</sup>	Manα	H	H	H	H	H	H	H	AAG
6	NETNES von <i>T. cruzi</i> <sup>[27]</sup>	Manα	H	H	H	H	H	AEP	H	AAG
7	Epimastigote von <i>T. cruzi</i> <sup>[28]</sup>	Manα	H	H	H	H	H	AEP	H	AAG
8	<i>A. fumigatus</i> <sup>[29]</sup>	Man <sub>1-2</sub> α	H	H	H	H	H	H	H	Ceramid
9	PSP von <i>L. major</i> <sup>[30]</sup>	H	H	H	H	H	H	H	H	AAG
10	<i>P. falciparum</i> <sup>[31]</sup>	± Manα	H	H	H	H	H	H	Acyl	DAG
11	<i>T. gondii</i> <sup>[32]</sup>	H	H	± Glc-GalNAcβ	H	H	H	H	H	DAG
12	<i>S. cerevisiae</i> <sup>[33]</sup>	Man <sub>1-3</sub> α	H	H	H	H	H	H	H	Ceramid
13	AGP von <i>P. communis</i> <sup>[34]</sup>	H	H	± Galβ	H	H	H	H	H	Ceramid
14	Thy-1 aus Rattenhirn <sup>[35]</sup>	± Manα	H	GalNAcβ	H	H	PEtN	H	H	n.d.
15	PrP <sup>Sc</sup> aus Hamsterhirn <sup>[36]</sup>	± Manα	H	± Sia- ± Gal-GalNAcβ	H	H	PEtN	H	H	n.d.
16	NCAM aus Mausmuskeln <sup>[37]</sup>	± Manα	H	± GalNAcβ	H	H	PEtN	H	H	n.d.
17	MDP aus humanen Nieren <sup>[38]</sup>	± Manα	H	± Gal ± GalNAcβ	H	n.d.	PEtN	H	H	n.d.
18	MDP aus Schweinenieren <sup>[38]</sup>	H	H	± Gal/Sia- ± GalNAcβ	H	± PEtN	PEtN	H	H	DAG
19	AChE von <i>Torpedo californica</i> <sup>[39]</sup>	Glcα	H	± GalNAcβ	H	± PEtN	PEtN	H	H	DAG
20	AChE aus humanen Erythrozyten <sup>[40]</sup>	H	H	H	H	± PEtN	PEtN	H	Palmitoyl	AAG
21	humanes CD52 <sup>[41]</sup>	± Manα	H	H	H	H	PEtN	H	± Palmitoyl	DAG
22	CD52 aus humanem Sperma <sup>[42]</sup>	H	H	H	H	H	PEtN	H	Palmitoyl	AG
23	CD59 aus humanen Erythrozyten <sup>[43]</sup>	H	H	± GalNAcβ	H	PEtN	PEtN	H	Palmitoyl	AAG
24	CD59 aus humanem Urin <sup>[44]</sup>	± Manα	H	± GalNAcβ	H	H	PEtN	H	n.d.	n.d.
25	AP aus humaner Plazenta <sup>[16]</sup>	H	H	H	H	GlcNAcβ-P	PEtN	H	H	AAG

[a] Die Position der Reste R<sup>1</sup>–R<sup>8</sup> und des Lipids können aus Schema 2 entnommen werden. AAG = 1-Alkyl-2-acylglycerol, AEP = Aminoethylphosphonat, AG = 1-Alkyl-2-lysoglycerol, DAG = Diacylglycerol, Gal = Galactose, GalNAc = N-Acetylglactosamin, Glc = Glucose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin; Man = Mannose, n.d. = nicht bestimmt, PEtN = Phosphoethanolamin, Sia = Sialinsäure.

GlcN-PI von einem Diacyl- in ein Alkylacylglycerol umgewandelt wird, weil die meisten Säugetier-GPIs und ihre Intermediate 1-Alkyl-2-acylglycerol-Membrananker aufweisen.<sup>[49]</sup> Nach der sequenziellen Addition der Mannosen und Phosphoethanolamine wird der GPI-Anker mit dem Protein verknüpft.

Nachdem ein Protein kovalent mit dem GPI-Anker verknüpft wurde, werden normalerweise das zweite PEtN sowie der Palmitatrest entfernt, und das Molekül wird in den Golgi-Apparat transportiert. Beide Hydrolysen sind wichtig für den effizienten Transport des GPI-verankerten Proteins vom ER zum Golgi-Apparat.<sup>[50]</sup> Allerdings bestätigt die Präsenz des Palmitatrestes und zusätzlicher Phosphoethanolamine in GPIs, die aus Säugetieren isoliert werden konnten (Tabelle 1, Nr. 18–23), dass diese Modifizierungen nicht zwingend erforderlich sind.



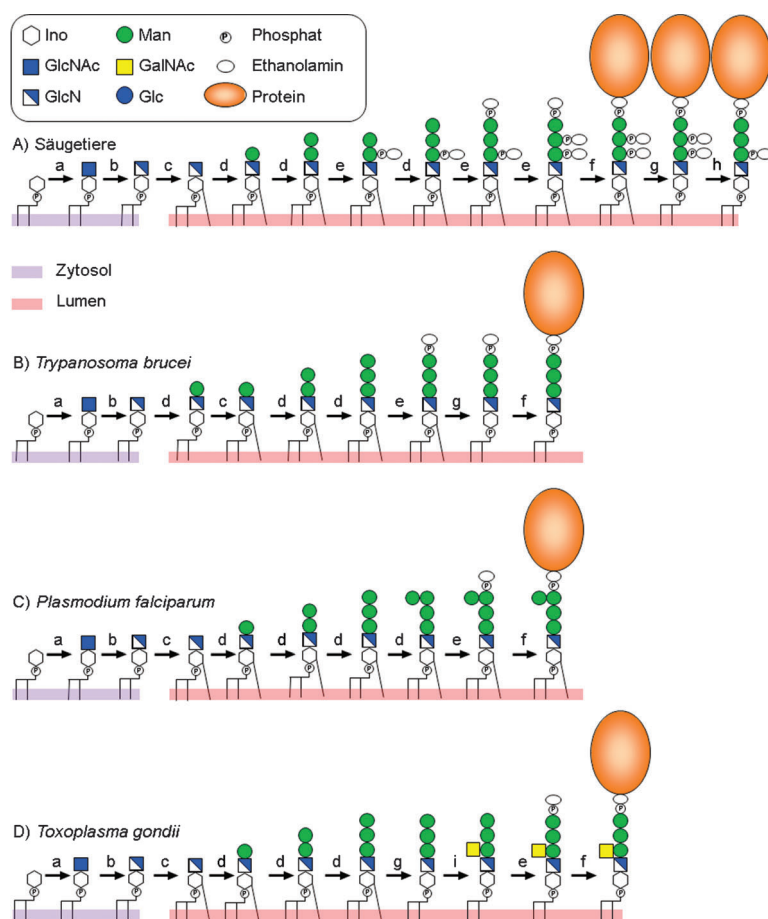
Peter H. Seeberger (Vordiplom Universität Erlangen-Nürnberg, Promotion University of Colorado bei Marvin H. Caruthers) absolvierte ein Postdoktorat am Sloan-Kettering Institute in New York bei Samuel J. Danishefsky und war von 1998 bis 2003 Assistant und Associate Professor mit Tenure am MIT. Nach einer Professur an der ETH Zürich von 2003 bis 2009 wurde er Direktor am Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung und Professor an der Freien Universität Berlin sowie Honorarprofessor an der Universität Potsdam.

Im Golgi-Apparat wird zuerst die ungesättigte Fettsäure an der *sn*-2-Position des Glycerols entfernt,<sup>[51]</sup> bevor das *lyso*-GPI mit einer gesättigten Fettsäure (normalerweise Stearinsäure) verestert wird.<sup>[52]</sup> Die Struktur des Lipids ist dabei entscheidend für die Integration des GPI-Ankers in Membranmikrodomänen.<sup>[54]</sup> GPI-verankerte Proteine, die zwei gesättigte Fettsäuren tragen, werden schließlich zur Zellmembran transportiert.

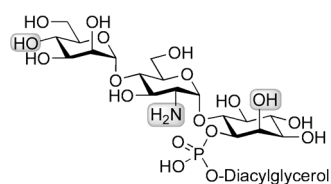
Die GPI-Biosynthese in *T. brucei* weist mehrere deutliche Unterschiede zu der in Säugetierzellen auf.<sup>[47]</sup> Die Inositacylierung findet erst nach dem Transfer der ersten Mannose statt, und es wird kein PEtN während der Biosynthese auf ManI oder ManII übertragen (Schema 3B). Kürzlich erschienene Studien mit synthetischen Man<sub>2</sub>-GlcN-PI-Analoga konnten zeigen, dass die Hydroxyfunktion der C4-Position der ManI entscheidend für die Inositacetylierung ist (Schema 4). Dies erklärt, warum bei der biochemischen Synthese der Trypanosomen die Mannosylierung vor der Inositacetylierung stattfindet.<sup>[53]</sup> Des Weiteren werden die Fettsäuren der GPIs vor der Kupplung mit einem Protein ausgetauscht, wohingegen beide Prozesse in Hefen oder Säugern in umgekehrter Reihenfolge ablaufen.

Im protozoischen Parasiten *P. falciparum* wird der Inosit des GlcN-PI vor der Mannosylierung acyliert. Dies ist auch der Fall in Säugetierzellen, obgleich nur ein PEtN an ManIII vor der Proteinanknüpfung angefügt wird (Schema 3C). Eine deutliche Abweichung dieses Synthesewegs ist im Enzym Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthetase (DPM) zu finden, das für die Synthese des Mannosendonors zuständig ist, der in der GPI- und N-Glycansynthese eingesetzt wird. DPM von





**Schema 3.** Biosynthese der GPI-verankerten Proteine an der ER-Membran in A) Säugern, B) *T. brucei*, C) *P. falciparum* und D) *T. gondii*. Reaktionen: a) Transfer von GlcNAc; b) N-Desacetylierung und anschließender Flip des GlcN-PI auf die luminal Seite des ER; c) Acylierung des Inosits; d) Mannosylierung unter Verwendung von Dolichol-Phosphat-Mannose als Donor; e) Phosphorylierung mit PETN; f) kovalente Verknüpfung des GPI mit einem Protein durch das Enzym GPI-Transamidase; g) Desacylierung des Inosits; h) Entfernung des zweiten PETN; i) Addition von GalNAc.



**Schema 4.** Zusammenfassung der Merkmale, die von der Inositol-Acyl-Transferase erkannt werden.<sup>[53]</sup> Die funktionellen Gruppen, die für die Acylierung des Inosits benötigt werden, sind hervorgehoben.

*P. falciparum* ist nicht dazu fähig, eine *Saccharomyces-cerevisiae*- oder eine Mausmutante, die dieses Enzym nicht korrekt exprimieren, zu komplettieren. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen diesen Genen geben muss.<sup>[55]</sup>

Die GPI-Biosynthese in *T. gondii* unterscheidet sich von der in anderen Organismen in verschiedenen Punkten (Schema 3D): Der Transfer von GlcNAc auf das Diacyl-PI wird von der GPI-GlcNAc-Transferase katalysiert, die aus sieben Untereinheiten (PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIG-P, PIG-

Q, PIG-Y und DPM2) aufgebaut ist und somit ein Multiuntereinheitenenzym ist. Allerdings konnten im Toxoplasma Genom keine Homologen der in Säugern, *P. falciparum* und Hefe bekannten Gene für PIG-H, PIG-P und DPM2 gefunden werden.<sup>[56]</sup>

Es wird davon ausgegangen, dass die Modifizierung der C3- oder C4-Position der ManI durch Anbindung zusätzlicher Kohlenhydrate (z.B. durch den GalNAc-Rest in den GPI-Ankern der Proteine Thy-1 und CD59 oder durch  $\alpha$ -Galactoside in den GPI-Ankern des Variant-Surface-Glycoproteins (VSG) von *T. brucei*) nach dem Transfer des Proteins auf den GPI-Anker stattfindet.<sup>[47]</sup> Allerdings wird das verzweigende GalNAc in den GPIs von *T. gondii* vor dem Transfer des Proteins auf den entsprechenden Membrananker eingeführt.<sup>[56]</sup> Tatsächlich wird vermutet, dass die Glycosylierung mit GalNAc vor der Phosphorylierung mit PETN erfolgt, weil diese Einheit nicht in allen isolierten GPIs von *T. gondii* zu finden ist.<sup>[32]</sup>

#### 4. Chemische Synthese von GPIs

GPIs gehören zu einer der komplexesten Klassen von Naturstoffen, da sie Lipide, Kohlenhydrate und Phosphate in sich vereinen. Diese präparative Herausforderung, gepaart mit der ständig steigenden biologischen Bedeutung dieser Klasse von Glykokonjugaten, bildet die wichtigste Motivation für die Entwicklung von Strategien zur effizienten Synthese von GPIs. Bis heute konnte durch unterschiedliche Glycosylierungs- und Schutzgruppenstrategien eine Reihe von GPIs synthetisiert werden (Tabelle 2). Die meisten Strategien beginnen mit der Synthese des Kohlenhydrats, das anschließend phosphoryliert und schließlich global von allen permanenten Schutzgruppen befreit wird. Hier fassen wir die Fortschritte in der chemischen Synthese von GPIs zusammen und konzentrieren uns vor allem auf die fundamentalen Konzepte der Konvergenz in der Synthese, der Inkorporation von ungesättigten Fettsäuren und der Herstellung GPI-verankerter Proteine. Interessierte Leser seien an dieser Stelle auf umfassende Übersichtsartikel, die sich mit der chemischen Synthese von GPIs beschäftigen, verwiesen.<sup>[57]</sup>

##### 4.1. Synthese von nativ lipidierten GPIs

Bei mehrstufigen Synthesen sind konvergente Strategien effizienter als lineare, da bei letzteren die Gesamtausbeute schnell mit jedem Reaktionsschritt sinkt. Die meisten bis heute beschriebenen Synthesen sind linear und zielorientiert. Das Resultat dieser Strategien sind Synthesen, die nicht einfach angepasst werden können, um Analoga oder andere GPI-Anker herzustellen. Um die funktionelle Bedeutung

**Tabelle 2:** Totalsynthesen verschiedener GPIs.<sup>[a]</sup>

Nr.	Ursprung	R <sup>1</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>	Lipid	Gruppe [Jahr]
1	VSG von <i>T. brucei</i>	H	H	Gal <sub>2</sub> α	H	H	H	DAG	Ogawa (1991) <sup>[59]</sup> Ley (1998) <sup>[60]</sup>
2	1G7 vpm <i>T. cruzi</i>	Manα	H	H	H	H	H	AAG	Vishwakarma (2005) <sup>[61]</sup>
3	Trypomastigote von <i>T. cruzi</i>	Manα	H	H	H	AEP	H	AAG	Nikolaev (2006) <sup>[62]</sup>
4	<i>T. gondii</i>	H	GalNAcβ	H	H	H	H	DAG	Seeberger (2005) <sup>[63]</sup>
5	<i>T. gondii</i>	H	Glcα1-4GalNAcβ	H	H	H	H	DAG	Seeberger (2011) <sup>[58]</sup>
6	<i>P. falciparum</i>	H	H	H	H	H	Myristoyl	DAG	Fraser-Reid (2004) <sup>[64]</sup>
7	<i>P. falciparum</i>	Manα	H	H	H	H	Palmitoyl	DAG	Seeberger (2005) <sup>[65]</sup>
8	<i>P. falciparum</i>	Manα	H	H	H	H	Palmitoyl	DAG	Vishwakarma (2010) <sup>[66]</sup>
9	Hefe	Manα	H	H	H	H	H	Ceramid	Schmidt (1994) <sup>[67]</sup>
10	Thy-1 aus Rattenhirn	Manα	GalNAcβ	H	PEtN	H	H	AAG	Fraser-Reid (1995) <sup>[68]</sup> Schmidt (2003) <sup>[69]</sup>
11	humanes CD52	H	H	H	PEtN	H	Palmitoyl	AG	Guo (2007) <sup>[70]</sup>
12	CD52 aus humanen Lymphozyten	Manα	H	H	PEtN	H	H	DAG	Guo (2012) <sup>[71]</sup>

[a] Die Position der Reste R<sup>1</sup>–R<sup>8</sup> und des Lipids können aus Schema 2 entnommen werden. Abkürzungen sind in Übereinstimmung mit denen aus Tabelle 1.

unterschiedlicher GPI-Modifikationen aufzuklären, ist eine allgemeingültige Route, die einen effizienten Zugang zu einer breiten Palette von GPIs eröffnet, essenziell. Dieses Ziel konnte vor Kurzem erreicht werden.<sup>[58]</sup>

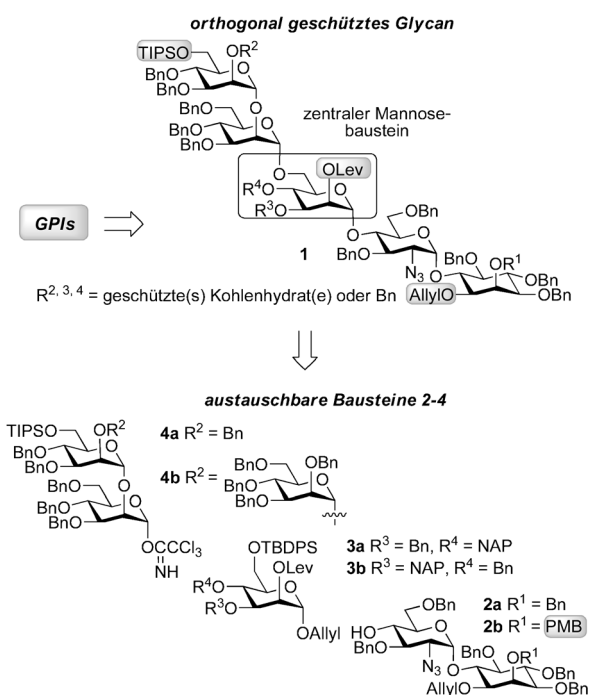
Dieser generelle Ansatz basiert auf der Konstruktion des orthogonal geschützten Oligosaccharids **1** mithilfe der allgemeinen Bausteine **2–4** (Schema 5) und zusätzlicher Kohlenhydrate, die für den Aufbau verzweigter Strukturen benötigt werden. Da die Synthese von Bausteinen der zeitaufwändigste und arbeitsintensivste Abschnitt der Zuckersynthese ist, spart die Verwendung von austauschbaren Kohlenhy-

dratdonoren und -akzeptoren Zeit und erhöht den Synthesedurchsatz.

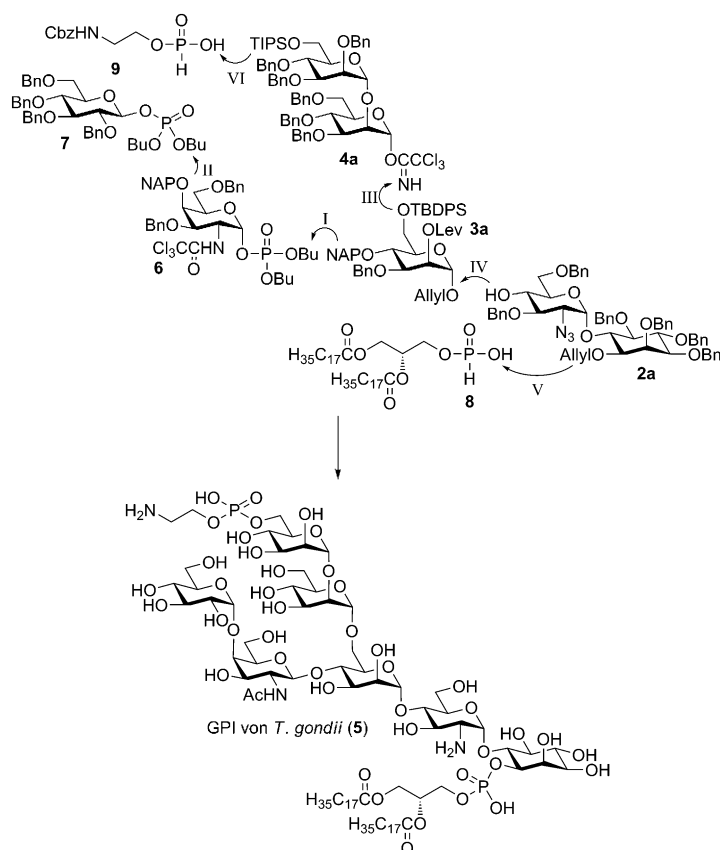
Das Schutzgruppenmuster in Glycan **1** ermöglicht die rasche Einführung unterschiedlicher Modifikationen. Strukturen, in denen die C2-Position des Inosits acyliert ist, und verschiedene Phosphorylierungsmuster sind durch diese Strategie ohne weiteres zugänglich. Diverse GPI-Anker, die für biologische Assays oder physikalische Messungen geeignet sind, können auf diese Art hergestellt werden.

Diese Strategie wurde für die Synthese des Low-Molecular-Weight-Antigens von *T. gondii* genutzt (Schema 6).<sup>[58]</sup> Die Trisacchariduntereinheit konnte zuerst mithilfe der Bausteine **3a**, **6** und **7** (über Glycosylierungen I und II; Schema 6) hergestellt werden. Eine [2+3+2]-Glycosylierungssequenz mit dem Dimannosylimidat **4a** und Pseudodisaccharid **2a** eröffnete den Zugang zum kompletten Glycan. Phosphorylierungen mit den H-Phosphonaten **8** und **9**, gefolgt von der Entfernung aller permanenten Schutzgruppen, lieferten schließlich den GPI-Anker von *T. gondii* (**5**).

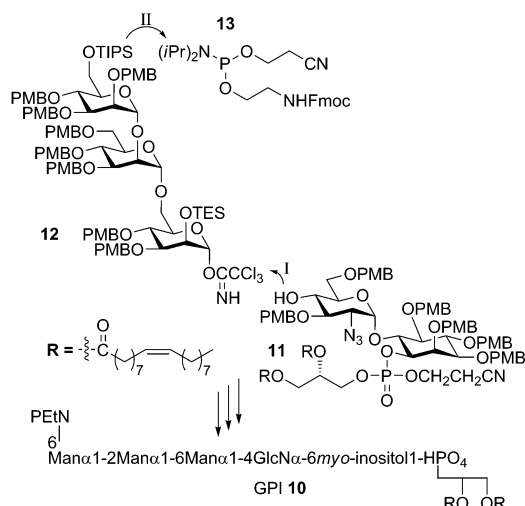
Die Verwendung von Benzylethern als permanenten Schutzgruppen bei der Kohlenhydrat- und GPI-Synthese verhindert die Herstellung von GPIs, die ungesättigte Lipide oder Funktionen wie Azide oder Alkine tragen, die für die Einführung verschiedener Sonden über dipolare Cycloaddition genutzt werden können. Es wurde vorgeschlagen, dass die ungesättigten Fettsäuren in isolierten GPIs von *Trypanosoma cruzi* (Moleküle die biologisch genauso aktiv sind wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS)) für eine starke proinflammatorische Antwort verantwortlich sind.<sup>[73]</sup> Um Zugang zu diesen Substanzen zu bekommen, haben Nikolaev und Al-Maharik eine Syntheseroute entwickelt, um GPIs von *T. cruzi*, die eine ungesättigte Fettsäure tragen, mithilfe von säure- und basenlabilen permanenten Schutzgruppen herzustellen.<sup>[57a]</sup> In einer ähnlichen Weise nutzt die Gruppe um Guo *p*-Methoxybenzylether als permanente Schutzgruppen, um GPIs zu synthetisieren, die Lipide mit Doppelbindungen (**10**; Schema 7) aufweisen.<sup>[72]</sup> Eines der Hauptmerkmale dieser Strategie ist die Synthese des phosphorylierten Pseudodisaccharids **11**. Dieses erspart in den finalen Stufen der Synthese zusätzliche Schutzgruppenmanipulationen, da Phosphate



**Schema 5.** Generelle Retrosynthese für GPI-Anker, die von Seeberger und Mitarbeitern entworfen wurde.<sup>[58]</sup> Orthogonale Schutzgruppen für die Einführung von Modifizierungen am Ende der Synthese sind hervorgehoben. Bn = Benzyl, Lev = Levulinoyl, NAP = 2-Naphthylmethyl, PMB = *p*-Methoxybenzyl, TIPS = Triisopropylsilyl.



**Schema 6.** Retrosynthese des Low-Molecular-Weight-Antigens von *T. gondii*.<sup>[58]</sup> Die römischen Ziffern geben die Reihenfolge der Synthese an. Cbz = Benzyloxycarbonyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl.



**Schema 7.** Synthese eines GPI, der ungesättigte Fettsäuren trägt.<sup>[72]</sup> Die römischen Ziffern geben die Reihenfolge der Synthese an. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, TES = Triethylsilyl.

normalerweise kurz vor der Entfernung aller permanenten Schutzgruppen eingeführt werden. Anstelle oxidativer Bedingungen wurden bei dieser Synthese alle PMB-Gruppen mit 10-proz. Trifluoressigsäure in Dichlormethan hydrolysiert. Diese Strategie ermöglichte die Synthese von GPIs, die

Azide oder Alkine enthalten,<sup>[74]</sup> sowie der GPI-Anker des menschlichen Lymphozytenproteins CD52.<sup>[71]</sup>

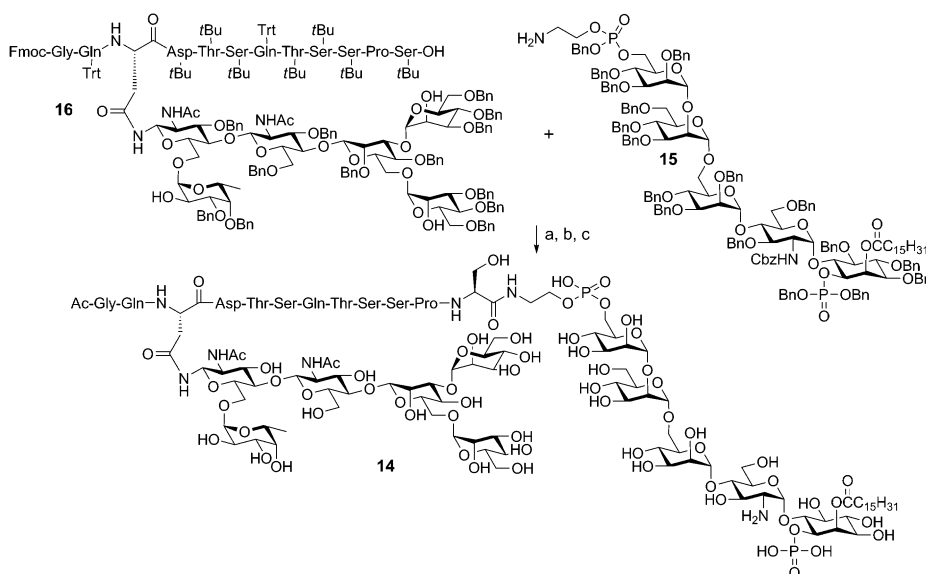
## 4.2. Synthese GPI-verankerter Proteine

Die Verankerung von Proteinen in der Membran ist eine der Hauptaufgaben von GPIs. Diese posttranslationale Modifizierung hat tiefgreifenden Einfluss auf die Funktionsweise von Proteinen.<sup>[75]</sup> Über die Synthese von GPI-Glycanen und nativ lipidisierten GPIs gibt es bereits zahlreiche Berichte. Über die wesentlich anspruchsvollere Synthese von GPI-verankerten Proteinen gibt es jedoch nur wenige Publikationen. Es ist wichtig anzumerken, dass synthetische GPI-verankerte Proteine korrekt gefaltet sein müssen, damit ihre natürlichen Funktionen gewährleistet sind.

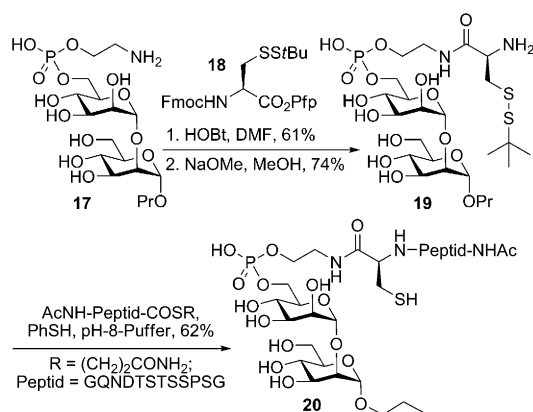
Die Gruppe um Guo veröffentlichte die Synthese der Gerüststruktur des Sperma-CD52 **14**,<sup>[76]</sup> eines GPI-verankerten Glycopeptids aus zwölf Aminosäuren und einem *N*-Glycan (Schema 8). Das geschützte Fragment **15** konnte direkt mit Glycopeptid **16**, das durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt worden war, gekuppelt werden. Nach der Entfernung aller Schutzgruppen fehlen dem synthetischen Molekül **14** gegenüber seinem natürlichen Gegenstück CD52 nur noch ein weiteres Phosphoethanolamin und das Phospholipid. Dieser Ansatz ist wahrscheinlich nicht auf größere Zielstrukturen anwendbar, da eine Kupplung zwischen einem geschützten GPI und einem nativem Protein aufgrund von Löslichkeitsproblemen schwierig werden kann. Außerdem sind die Bedingungen für die Schutzgruppenentfernung nicht kompatibel mit allen Proteinen, weshalb es zu einer Denaturierung kommen könnte.

Die direkte Verknüpfung von ungeschützten Peptiden und GPIs wurde zuerst von der Gruppe um Nakahara untersucht,<sup>[77]</sup> denen die Ligation von Dimannosid **17** mit Peptiden und Aminosäuren gelang (Schema 9). Die höhere Reaktivität der Aminogruppe von **17** ermöglichte die *N*-Acylierung mit dem Pentafluorphenolester (Pfp) **18** in einer Ausbeute von 60 % ohne merkliche Bildung von *O*-acylierten Nebenprodukten. Ein Modelldodecapeptid mit C-terminalem Thioester wurde mit **19** durch native chemische Ligation (NCL) gekuppelt, wofür der Thioester in Gegenwart von Thiophenol aktiviert wurde; nach zehn Tagen wurde **20** in 62 % Ausbeute erhalten. Bertozzi et al. wendeten die NCL auch während der Synthese von GPI-verankerten Analoga des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) an.<sup>[78]</sup> Cystein- und phospholipidtragende GPI-Substrukturen wurden mit rekombinantem GFP kovalent verbunden (Schema 10). Diese Resultate veranschaulichen, dass die NCL möglicherweise für die Synthese GPI-verankerter Proteine verwendet werden kann.

Vor Kurzem wurde die Synthese eines GPI-verankerten Prionproteins fertiggestellt, die auf der NCL ungeschützter Fragmente im letzten Teil der Synthese beruht (Schema 11).<sup>[79]</sup> Die wohlüberlegte Wahl einer Schutzgruppenstrategie, welche die Einfügung eines Cysteins in GPIs ermöglicht, war wichtig, da Thiole und Thioether üblicher-



**Schema 8.** Synthese des GPI-verankerten CD52.<sup>[76]</sup> Reaktionsbedingungen: a) HOBt, EDC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NMP (2:1), 70%; b) 10% Pd/C, H<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:10:3); c) TFA/Et<sub>3</sub>SiH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:3:15), 85% über zwei Stufen. EDC = 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, NMP = N-Methylpyrrolidinon, TFA = Trifluoressigsäure, Trt = Trityl.



**Schema 9.** Synthese eines GPI-Peptidfragments.<sup>[77]</sup> DMF = N,N-Dimethylformamid, Pfp = Pentafluorphenyl, Pr = Propyl.

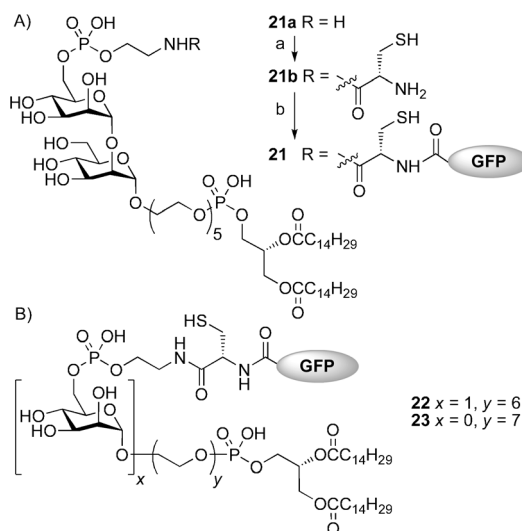
weise heterogene Palladiumkatalysatoren vergiften können und dadurch keine reduktive Entfernung der Benzylether möglich ist.<sup>[81]</sup> Ein GPI-Anker (**24**), der ein Cystein trägt, wurde ausgehend von einer perbenzylierten Vorstufe nach palladiumkatalysierter Hydrogenolyse hergestellt. Ligation des C-terminalen Thioesterderivats eines rekombinanten Prionproteins (rPrP) mit **24** ergab das GPI-verankerte PrP **25**, das bis heute das komplexeste GPI-verankerte Protein ist, das jemals synthetisiert werden konnte. **25** wurde, sobald es richtig gefaltet war, ebenfalls von PrP-spezifischen Antikörpern in wässriger Lösung erkannt und konnte durch das Phospholipid in Liposome integriert werden.<sup>[79]</sup>

Die kovalente Verknüpfung von Peptiden mit GPI-Glycanen kann ebenfalls in Gegenwart eines Enzyms durchgeführt werden.<sup>[80,82]</sup> Die Transpeptidase Sortase A (SrtA) hat ein breites Substratspektrum und katalysiert die Ligation

verschiedener Glycopeptide mit ManI-ManIII-GPI-Fragmenten. Das Trimannosid **26** konnte durch diese Methode in guten Ausbeuten mit verschiedenen Peptiden modifiziert werden (Schema 12). Auch wenn dieser Ansatz vielversprechend ist, gibt es eventuell Probleme mit der Regioselektivität dieser Reaktion, sobald ein natürlicher GPI-Anker mit bis zu vier Aminogruppen als Ausgangsverbindung eingesetzt wird.

### 4.3. Herausforderungen und Perspektiven der GPI-Synthese

Heute ist die Synthese von GPIs mithilfe der kürzlich entwickelten, generellen Synthesestrategie möglich.<sup>[58]</sup> Allerdings haben die meisten biomedizinischen Labors weder das Personal, wel-

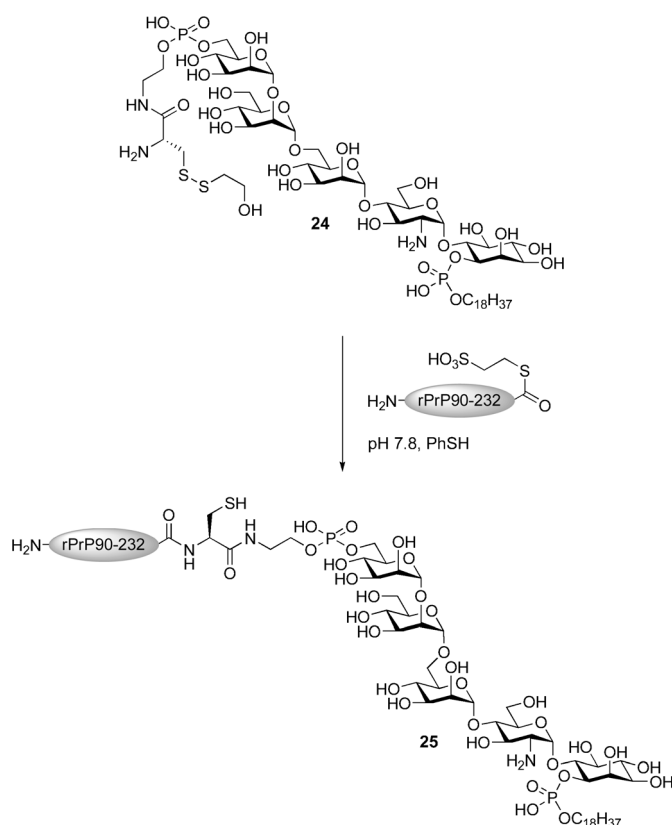


**Schema 10.** Struktur und Synthese der GPI-verankerten GFPs **21–23**.<sup>[78]</sup>

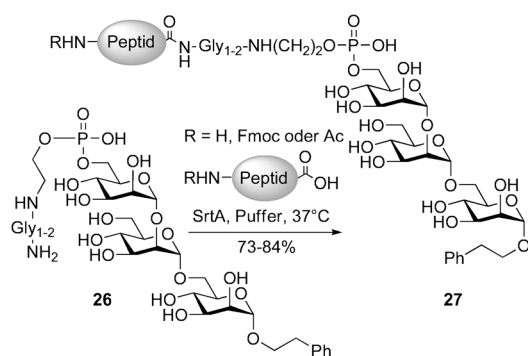
A) Synthese von **21**. Reaktionsbedingungen: a) 1. Boc-Cys(Trt)-OPfp, DIPEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH; 2. TIS/EDT/TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3:3:15:79, 66%; b) GFP-MESNa, 1-O-Octyl-β-D-glucopyranose, MESNa, 59%. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, EDT = 1,2-Ethandithiol, DIPEA = Diisopropylethylamin, MES = 2-Mercaptoethansulfonat, TIS = Triisopropylsilan.  
B) Struktur der Moleküle **22** und **23**.

ches diese chemischen Synthesen durchführen kann, noch die Ausrüstung, um diese Moleküle selbst zu generieren. Die automatisierte Kohlenhydrat-Festphasensynthese eröffnet den direkten Zugang zu divergenten synthetischen Oligosacchariden<sup>[83]</sup> und bietet die ideale Lösung für dieses Problem. GPIs konnten allerdings noch nicht durch diese Technik hergestellt werden.<sup>[84]</sup>





**Schema 11.** Synthese eines GPI-verankerten Prionproteins.<sup>[79]</sup>



**Schema 12.** SrtA-katalysierte GPI-Peptid-Ligation.<sup>[80]</sup>

Nur wenige der synthetisch hergestellten lipidierten GPIs enthalten ungesättigte Fettsäuren. Bei diesen Synthesen müssen verschiedene Intermediate durch präparative HPLC gereinigt werden, und die endgültige Entfernung aller Schutzgruppen wurde mit weniger als 1 mg Material durchgeführt.<sup>[71,72,74]</sup> Diese Tatsachen veranschaulichen die experimentellen Schwierigkeiten bei der Herstellung von GPIs, die reduktionsempfindliche Funktionen aufweisen. Dementsprechend bleibt die skalierbare Synthese von GPIs, die ungesättigte Lipide enthalten, eine schwierige Aufgabe.

Die Synthese GPI-verankerter Proteine kann einen entscheidenden Beitrag zur Beantwortung komplexer biologischer Fragen leisten. Auch wenn GPIs in Verbindung mit der Entwicklung und Ausbreitung der Prionkrankheit gebracht

werden, bleibt ihre genaue Rolle noch unklar.<sup>[85]</sup> Ein synthetisches und homogenes GPI-verankertes PrP könnte Einblicke in dieses kontrovers diskutierte Feld bieten, da dieses Material nicht aus natürlichen Ressourcen isoliert werden kann.

## 5. Synthetische GPIs als Hilfsmittel in der chemischen Biologie

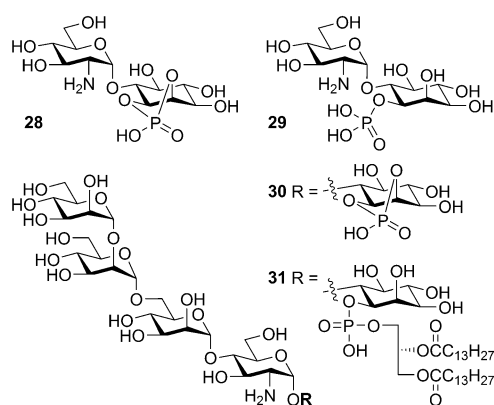
Das Ziel der chemischen Synthese von GPIs besteht nicht nur in der Zurschaustellung der Möglichkeiten organisch-präparativer Strategien, sondern auch in der Bereitstellung ausreichender Mengen dieser Moleküle, um deren biologische Funktion zu evaluieren. Außer mehreren Totalsynthesen nativer GPIs gelang auch die Herstellung von Substrukturen dieser Substanzklasse zur Beantwortung biologischer Fragen.

### 5.1. Die Konformation von GPIs

Einblicke in die dreidimensionale Struktur von Kohlenhydraten sind unabdingbar, um beispielsweise Protein-Zucker-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu verstehen. Es wird erwartet, dass eine detaillierte Untersuchung von GPI-Strukturen und deren Dynamik in Lösung unerwartete Funktionen dieser Substanzklasse aufdecken wird. Besonders interessant ist die Rolle der zusätzlichen Modifizierungen der Pseudopentasaccharidkernstruktur, die nur schwer in biologischen Assays untersucht werden kann.

Eine Kombination aus rechnerischen Methoden und anderen Techniken konnte die Konformation und Dynamik verschiedener GPI-verankerter Proteine veranschaulichen. Der GPI-Anker von Thy-1 übt einen Effekt auf die Struktur des Proteins aus,<sup>[86]</sup> wohingegen PrPs nicht beeinflusst werden.<sup>[87]</sup> In Trypanosomen ist die Seitenkette aus  $\alpha$ -Galactosen des GPI-Glycans des VSG eng mit dem Protein verbunden und füllt den Raum zwischen Protein und Membran aus.<sup>[88]</sup> Dieser Befund lässt darauf schließen, dass das GPI-Glycan ein integraler Bestandteil des GPI-verankerten Proteins ist.<sup>[89]</sup> Allerdings ist diese Funktion der Seitenkette wahrscheinlich nicht ubiquitär; beispielsweise enthalten 30 % der Seitenkette des PrP-GPI-Ankers eine terminale Sialinsäure,<sup>[36]</sup> deren Carboxylatgruppe nicht in engem Kontakt mit der negativ geladenen Plasmamembran stehen sollte.

Eine detaillierte Untersuchung der Konformation eines GPI gelingt nur mithilfe synthetischer GPI-Glycan-Fragmente. Die dreidimensionale Struktur synthetischer GPI-Glycane konnte beginnend von einem Di- bis hin zu einem Pentasaccharid durch Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie ermittelt werden (Schema 13).<sup>[90]</sup> Die dynamischen Eigenschaften dieser Moleküle wurden in Moleküldynamiksimulationen berechnet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Pseudodisaccharide **28** und **29** eine Hauptkonformation einnehmen, in der die geladene Ammonium- und Phosphatgruppe in kleinem Abstand zueinander stehen.<sup>[90b]</sup> Allerdings war es nicht möglich, eine definierte einzigartige Konformation für **30** zu definieren, das in einer gestreckten Form vorliegt und dessen Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man-Bindung



**Schema 13.** Synthetische GPIs, die für Konformationsstudien verwendet wurden.

großen Torsionsschwingungen ausgesetzt ist. Zusätzlich sind auch die Hydroxygruppen in Bewegung und schwanken im Pikosekundenbereich.<sup>[90c]</sup> Studien mit Micellen, die den GPI-Anker **31** enthalten, zeigten, dass die Konformation dieses Glycolipids eine starke Ähnlichkeit zu der von GPI **30** aufweist,<sup>[90d]</sup> dessen Moleküldynamik sich darin unterscheidet, dass die terminale Mannose eine schnellere relative Bewegung aufweist, während sich die Kohlenhydrate nahe der Micellenoberfläche langsamer bewegen.<sup>[90e]</sup> Diese Befunde legen nahe, dass sich das intrinsische Verhalten von GPI-Ankern nicht durch die Nähe zur Lipid-Wasser-Grenzfläche ändert und dass sich Moleküldynamikrechnungen für die Vorhersage der Konformation von GPIs in Lösung eignen können.

Bis jetzt wurden die Auswirkungen des Phosphorylierungsstatus auf die Konformation des GPI nicht erforscht. Die aktuelle Hypothese besagt, dass alle Säugetier-GPIs ein PEtN an der C2-Position der ManI enthalten. Auch wenn diese Hypothese noch nicht überprüft wurde, so ist es doch wahrscheinlich, dass eine zusätzliche Phosphorylierung zu einer Verringerung der Konformationsfreiheitsgrade führt, weshalb sich diese GPIs strukturell von anderen unterscheiden könnten.

## 5.2. GPIs als Immunmodulatoren

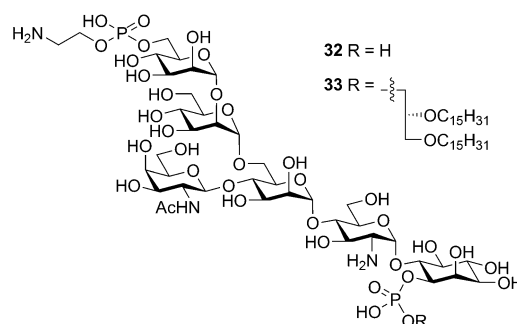
In der Medizin und Pharmaindustrie haben die Verwendung und Entwicklung von Immunmodulatoren zur Behandlung verschiedener Krankheiten in den letzten Jahren stark zugenommen.<sup>[91]</sup> Ein Immunmodulator kann die Immunantwort verändern, indem er die Fähigkeit des Immunsystems, Antikörper und sensibilisierte Zellen wie natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) zu bilden, steigert oder verringert.<sup>[92]</sup>

GPIs werden von NKT-Zellen erkannt.<sup>[93]</sup> Nach der Stimulation einer NKT-Zelle erzeugt diese eine schnelle Immunantwort gegen invasive parasitische Pathogene. Ein synthetischer Thy-1-GPI-Anker<sup>[68b]</sup> kann eine Immunantwort auslösen, die nicht auf einen der MHC-Wege (MHC = Major Histocompatibility Complex) beschränkt ist.<sup>[93]</sup> Diese durch

CD1d vermittelte Immunantwort in NKT-Zellen konnte in einer GPI-basierten Impfstudie gegen *T. brucei* bestätigt werden, da CD1d<sup>-/-</sup>-Mäuse im Unterschied zur Kontrollgruppe keine Protektion zeigten.<sup>[94]</sup> Diese Befunde lassen vermuten, dass eine GPI-vermittelte NKT-Zellen-Aktivierung eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen spielt.<sup>[93]</sup>

Während einer Infektion mit *T. gondii* konnte festgestellt werden, dass GPIs ebenfalls die Produktion von Zytokinen in Makrophagen auslösen können.<sup>[95]</sup> Es wird angenommen, dass ungefähr zwei Milliarden Menschen auf der Welt mit *T. gondii* infiziert sind.<sup>[96]</sup> Die Infektion mit *T. gondii* während der Schwangerschaft kann zu einer kongenitalen Toxoplasmose und im schlimmsten Fall zu fetalem Tod führen.<sup>[97]</sup> *T. gondii* ist ebenfalls für eine schwere Form der Enzephalitis in immungeschwächten Individuen verantwortlich und damit eine der Haupttodesursachen von AIDS-Patienten.<sup>[98]</sup>

Unter Verwendung isolierter und synthetischer GPI-Anker von *T. gondii* konnte der genaue Signalweg der Aktivierung von Makrophagen durch diese Glycolipide aufgeklärt werden (Schema 14). Die synthetischen Strukturen **32** und **33** besitzen das gleiche Oligosaccharid und unterscheiden sich im Lipidanteil (Schema 14).<sup>[99]</sup> GPI **33** trägt ein unnatürliches



**Schema 14.** Synthetische *T. gondii*-GPI-Analoga **32** und **33** für die TNF- $\alpha$ -Produktion in Makrophagen. Isolierte GPIs aus *T. gondii*-Tachyzoiten enthalten unterschiedliche Diacylglycerole (Hauptbestandteil: Palmitin- und Stearinsäureester). Zusätzlich kann ein  $\alpha$ Glc-Rest an der C4-Position von GalNAc angebracht sein, während in manchen Strukturen das PEtN fehlt.

Dialkylglycerol, während **32** überhaupt nicht lipidiert ist. Die isolierten Strukturen und **32** induzieren die Produktion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in Makrophagen durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.<sup>[100]</sup> Die Substanzen sind Liganden der Toll-ähnlichen Rezeptoren und induzieren gemeinsam mit MyD88 eine Signalkaskade, die zur Ausschüttung von TNF- $\alpha$  führt.<sup>[101]</sup> Zusätzlich bindet **32** stark an Galectin-3. Diese Wechselwirkung ist für die *T. gondii*-GPI-induzierte Produktion von TNF- $\alpha$  absolut notwendig.<sup>[102]</sup> Interessanterweise induziert GPI **33** keine Produktion von TNF- $\alpha$  in Makrophagen, sondern inhibiert diesen Vorgang und inaktiviert ebenfalls die durch isolierte *T. gondii*-GPIs hervorgerufene Bildung von NF- $\kappa$ B.<sup>[100]</sup>

GPIs können sowohl NKT-Zellen als auch Makrophagen stimulieren und eine Immunantwort auslösen.<sup>[103]</sup> GPI-Gly-

cane ohne Lipid allein können die Produktion von TNF- $\alpha$  in Makrophagen anregen, sind aber nicht ausreichend, um eine CD1d-beschränkte Immunglobulin-G(IgG)-Antwort in NKT-Zellen zu bewirken.<sup>[93]</sup> Deshalb wäre es von großem Interesse, die minimale Oligosaccharidstruktur zu bestimmen, die benötigt wird, um eine Immunantwort in Makrophagen zu erzeugen, und zu überprüfen, ob Säugetier-GPIs, die ein zusätzliches PEtN an der C2-Position der ManI tragen, einen ähnlichen Effekt haben.

### 5.3. Das Malariatoxin – ein GPI

Malaria ist eine verheerende parasitäre Erkrankung, die 40 % der Weltbevölkerung betrifft und pro Jahr mehr als zwei Millionen Menschenleben fordert. Vor allem junge Kinder in Entwicklungsländern sind von dieser Krankheit betroffen.<sup>[104]</sup> Übertragen durch weibliche Anopheles-Mücken, wird die Erkrankung durch die einzelligen Parasiten der Gattung *Plasmodium* verursacht. Von den vier bekannten Arten von *Plasmodium*, die den Menschen infizieren können, ist *P. falciparum* für die Mehrzahl der Infektionen verantwortlich und führt zu den schwersten Formen der Krankheit.

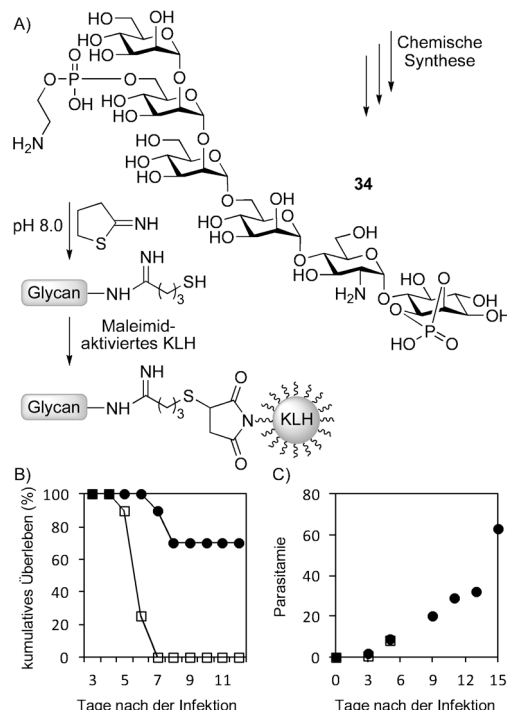
Die Zelloberfläche von *P. falciparum* enthält eine erhebliche Zahl GPI-verankerter Proteine und proteinfreier GPIs. Tatsächlich bilden diese den Hauptanteil der Kohlenhydrat enthaltenden Moleküle, wohingegen N- und O-verknüpfte Glycane oder Glycolipide nur in geringer Konzentration vorliegen.<sup>[105]</sup> Schofield und Hackett schlugen auf Grundlage von Experimenten, bei denen isolierte GPIs von *P. falciparum* in Mäusen die gleichen Symptome erzeugten, die auch während einer akuten Malaria vorliegen (Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, Fieber, Hypoglykämie) und sogar zum Tod der Tiere führten, als Struktur des Malariatoxins einen GPI vor.<sup>[106]</sup> Die anfängliche Skepsis gegenüber dieser Hypothese konnte durch immunologische Studien auf der Basis eines synthetischen GPI-Glycans und dessen Erfolg als Impfstoff entkräftet werden.<sup>[107]</sup>

#### 5.3.1. Ein synthetischer GPI als möglicher Anti-Toxin-Impfstoff gegen Malaria

Eine Impfung ist die ideale Lösung zur Senkung der durch Malaria-Infektionen verursachten Todesfälle, allerdings konnte bisher trotz intensiver Arbeit kein therapeutisch nützlicher Impfstoff entwickelt werden. Die meisten Vakzin-kandidaten basieren auf Proteinen und Peptiden immunogener Oberflächenantigene des Parasiten.<sup>[108]</sup> Diese Strategien generieren allerdings keinen angemessenen Schutz. Der Toxoidimpfstoff wirkt dabei nach einem anderen Ansatz: Er bekämpft gezielt die Hauptursache, welche die Pathologie des Wirtorganismus verursacht.<sup>[109]</sup> Als Beispiele für erfolgreiche Toxoidimpfstoffe sind die Vakzine gegen Tetanus und Diphtherie zu nennen.

Durch chemische und enzymatische Hydrolyse konnte eine ungiftige Konsensusstruktur des GPI-Glycans **34** von *P. falciparum* abgeleitet und synthetisiert werden.<sup>[109,110]</sup> Das synthetische Glycan wurde anschließend mit 2-Iminoethanol modifiziert und an Maleimid-funktionalisiertes Keyhole-

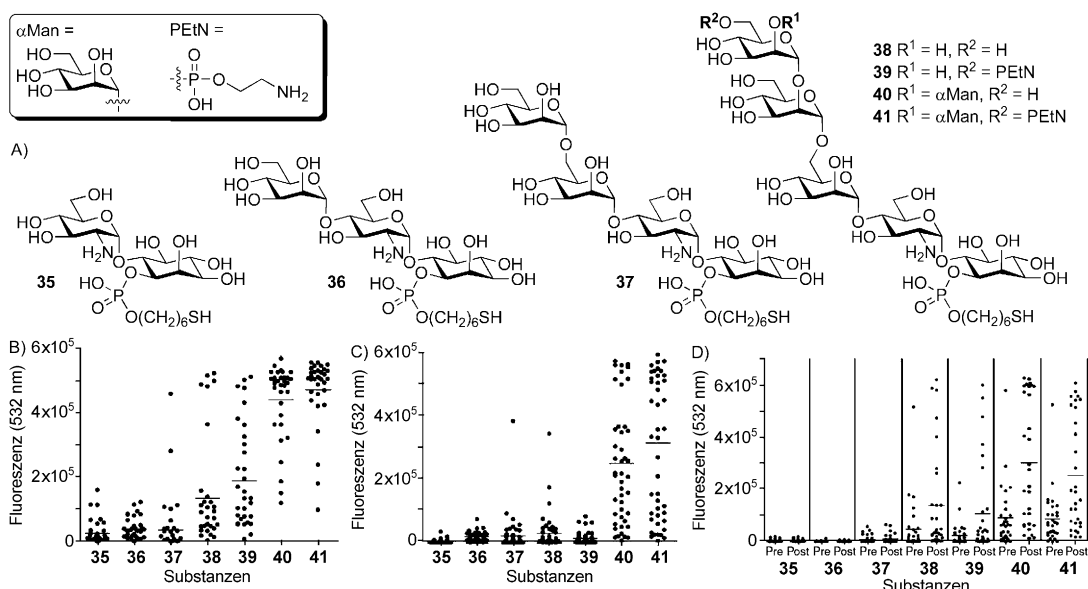
Limpet-Hämocyanin (KHL), das als Trägerprotein fungiert, gekuppelt (Schema 15 A). Das GPI-KLH-Konjugat erwies sich in Nagetieren als immunogen, erzeugte positive IgG-Titer und erkannte den intakten Parasiten, jedoch keine ge-



**Schema 15.** Ein synthetisches Konjugat aus GPI und KLH schützt gegen die murine zerebrale Malaria.<sup>[109]</sup> A) Synthese von untoxischem *P. falciparum*-GPI-Glycan **34** und seinem KHL-Konjugat. B) Kaplan-Meier-Überlebenskurve und C) Parasitämie bis zu zwei Wochen nach der Infektion von KLH-Glycan-immunisierten (●) und Sham-immunisierten Mäusen (□) mit Malaria-Parasiten.

sunden Erythrozyten, da sich die GPIs der Parasiten und des Menschen strukturell unterscheiden.<sup>[109]</sup> Des Weiteren wiesen die GPI-KHL-immunisierten Mäuse eine niedrigere Mortalität auf, und 75 % dieser Gruppe ( $n=16$ ) überlebten zwei Wochen nach der Infektion mit dem Parasiten, wohingegen alle Tiere der Sham-immunisierten Kontrollgruppe bereits am siebten Tag verstarben (Schema 15 B). Die Immunisierung veränderte allerdings nicht die Infektionsrate oder die allgemeine Parasitämie. Dies deutet darauf hin, dass die anti-GPI-Antikörper das GPI-Toxin neutralisieren, ohne den Parasiten zu töten (Schema 15 C). Diese Studien liefern überzeugende Belege, dass dieses GPI-Glycan eine geeignete Zielstruktur für die Entwicklung eines Malariaimpfstoffs ist. Ancora Pharmaceuticals hat Synthesestrategien entworfen, um große Mengen des Glycans **34** zu produzieren und so die Voraussetzungen für klinische Studien geschaffen.<sup>[111]</sup>

GPI-Antigene wurden auch zur Vakzinierung gegen die Afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) eingesetzt.<sup>[94]</sup> Isolierte GPIs wurden in Liposome integriert und in Mäuse injiziert. In den Modellen *T. brucei* und *Trypanosoma congolense* konnte eine Verringerung der infektionsassoziierten Pathologie nach der Infektion mit den Parasiten beobachtet werden.<sup>[94]</sup> Außer *P. falciparum* und *T. brucei* expri-



**Schema 16.** Synthetische GPI-Mikroarrays für die Untersuchung der Immunantwort gegen Malaria. A) Chemisch synthetisierte *P. falciparum*-GPI-Glycane und Substrukturen 35–41, die auf Mikroarrays immobilisiert wurden, um die anti-GPI-Antikörperantwort zu studieren. B) IgG-Spiegel gegen die Glycane 35–41 in Seren von afrikanischen Spendern einer Altersgruppe, die in Malaria-endemischen Gebieten leben und C) von Europäern, die sich nicht mit Malaria infiziert haben. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Serum, Balken veranschaulichen das arithmetische Mittel des Antikörperspiegels. D) Anstieg des Spiegels der Antikörper gegen die synthetischen Glycane nach der experimentellen Expositionsstudie mit *P. falciparum*-Sporozoiten in nicht mit Malaria infizierten Europäern. Seren wurden vor (Pre) und nach (Post) der Expositionsstudie abgenommen. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Serum, Balken veranschaulichen das arithmetische Mittel des Antikörperspiegels.

mieren auch andere protozoische Parasiten deutlich größere Mengen an GPIs als Säugetiere. Weitere präparative Arbeiten sind erforderlich, um die in diesen Erregern gefundenen Moleküle herzustellen, auf ihre Wirksamkeit als GPI-basierte Impfstoffe zu überprüfen und für die Prävention dieser Infektionen einzusetzen.

### 5.3.2. Analyse der Antikörperantwort in Malaria-infizierten Personen durch synthetische GPI-Mikroarrays

Die Immunisierungsstudien lieferten überzeugende Beweise, dass ein GPI das dominierende Toxin von *P. falciparum* ist und ein GPI-basiertes Vakzin Schutz vor Malaria bietet. Allerdings ist die protektive Rolle der anti-GPI-Antikörper noch nicht ganz aufgeklärt.

Isolierte GPIs von *P. falciparum* wurden in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) verwendet, um die Antikörperreaktion auf GPIs in Menschen zu erforschen.<sup>[112]</sup> In verschiedenen Studien konnte eine statistisch signifikante Verbindung zwischen einer anti-GPI-IgG-Antwort und einem Schutz vor den Symptomen der schweren Malaria gezeigt werden.<sup>[112a,f]</sup> In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht bestätigt werden.<sup>[112b,e]</sup> Um diesen Widerspruch aufzulösen, wurde eine Serie von synthetischen GPI-Glycanen und deren Substrukturen von *P. falciparum* synthetisiert.<sup>[113]</sup> Die GPIs 35–41 (Schema 16A) enthalten einen einzigartigen Thiollinker, der eine chemoselektive Funktionalisierung ermöglicht.

Um die Antikörperantwort gegen GPIs mit hohem Durchsatz zu analysieren, wurde ein GPI-basierter Mikroarray entworfen.<sup>[114]</sup> Dieser Mikroarray ermöglicht das paral-

lele Prüfen tausender Bindungsereignisse und benötigt dafür nur minimale Mengen an Serum und Liganden.<sup>[115]</sup> Um die minimale Struktur zu bestimmen, die benötigt wird, um eine Immunantwort zu erzeugen oder die Produktion spezifischer anti-GPI Antikörper im Rahmen einer Malariainfektion auszulösen, wurden die synthetischen Glycane 35–41 kovalent an Maleimid-funktionalisierte Mikroarrays gebunden.<sup>[114]</sup> Es wurde zunächst festgestellt, dass Serum von erwachsenen Afrikanern, die in endemischen Malariagebieten leben, hohe IgG-Spiegel gegen die GPIs 38–40 aufweisen (Schema 16B). Überraschenderweise enthalten die Seren von Europäern, die nie mit dem Malariaerreger in Kontakt gekommen sind, ebenfalls Antikörper gegen die Strukturen 40 und 41 (Schema 16C). Diese Resultate legen nahe, dass die IgG-Spiegel gegen die Glycane 38 und 39 möglicherweise spezifisch für eine Antimalaria-Immunantwort sind. Um diese Befunde weiter zu bestätigen, wurden die Seren von Europäern analysiert, die im Rahmen einer klinischen Studie mit einem Sporozoiten-Impfstoff behandelt wurden. Dabei konnte die Entwicklung einer signifikanten anti-Man<sub>3</sub>-GPI-Antikörperantwort beobachtet werden. Eine Folgestudie zeigte außerdem, dass anti-GPI-Antikörper nur selten in Kindern unter 18 Monaten vorkommen. Dies unterstreicht die Anfälligkeit von Kleinkindern für eine schwere Malaria und lässt darauf schließen, dass ein GPI-basiertes Vakzin von großer klinischer Bedeutung für Kinder werden wird.<sup>[116]</sup>

GPI-basierte Mikroarrays bieten detailliertere Einblicke in die Antikörperantwort während einer Malariainfektion, da genau charakterisierte GPI-Glycane und deren Fragmente, die normalerweise nicht in einer freien Form auf der Oberfläche des Parasiten vorzufinden sind, als Antigene verwen-

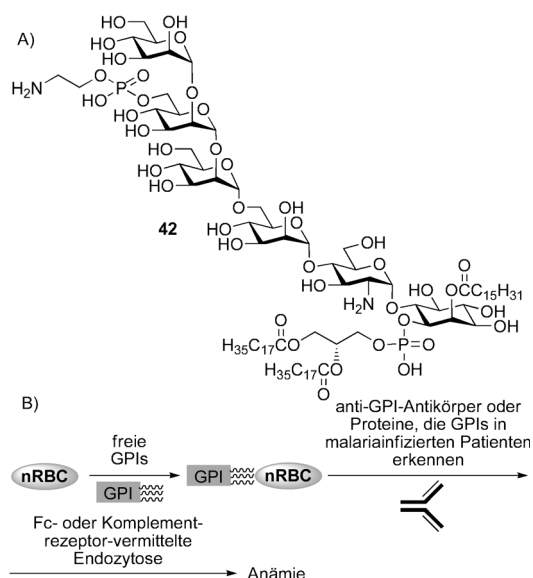


det wurden. Die anti-GPI-Antikörperspiegel, die mit isolierten GPIs aus *P. falciparum* gemessen wurden, hängen entscheidend vom Verhältnis der Man<sub>3</sub>- und Man<sub>4</sub>-GPIs in den Präparaten ab.

### 5.3.3. Synthetische GPIs zur Untersuchung malariaassoziierten Anämie

Anämie ist eine der weltweit führenden Ursachen von Invalidität und stellt ein ernstes globales Problem der öffentlichen Gesundheit dar.<sup>[117]</sup> Eine wesentliche Ursache für Anämie ist die Infektion mit *P. falciparum*.<sup>[117]</sup> Eine schwere Anämie ist die häufigste Komplikation während einer Malaria-Infektion und trägt wesentlich zu deren Morbidität und Mortalität bei.<sup>[117]</sup> In Malaria-infizierten Patienten liegt die Infektionsrate von roten Blutkörperchen (RBCs) in der Regel bei weniger als 5 %, obwohl der Grad an Verlust von RBCs zwischen 25 und 50 % liegt. Dies bedeutet, dass eine große Zahl nichtinfizierter Erythrozyten (nRBCs) während der Malariainfektion zerstört wird.<sup>[118]</sup>

VSG von *T. brucei* mit intaktem GPI-Anker kann von Parasiten auf Erythrozyten in vivo übertragen werden.<sup>[119]</sup> Gleichzeitig kann GPI-verankertes menschliches CD55 von Erythrozyten auf Parasiten in vivo übertragen werden.<sup>[120]</sup> Auf der anderen Seite können GPI-verankerte Proteine unter physiologischen Bedingungen mit intaktem Lipid in Lösung vorliegen, wo sie zwischen Zellen ausgetauscht werden.<sup>[121]</sup> Diese Beobachtung führte zur Hypothese, dass sich GPIs von *P. falciparum* möglicherweise in RBC-Membranen einfügen und dadurch körpereigene Zellen durch das Immun- oder Komplementsystem angegriffen oder lysiert werden. (Schema 17).



**Schema 17.** Beteiligung von GPIs an malariaassoziierten Anämie.

A) Chemisch synthetisierter GPI-Anker 42 von *P. falciparum*. B) Freie zirkulierende GPI-Anker von *P. falciparum* fügen sich in die Membran von nRBCs ein, was eventuell zu einer Erkennung durch anti-GPI-Antikörper und anschließende Endozytose führt.

Ein synthetischer GPI 42<sup>[65]</sup> von *P. falciparum* wurde verwendet, um die Assoziation mit naiven nRBCs zu studieren. Die Detektion der Insertion von 42 in nRBCs erfolgte über anti-GPI-Antikörper, die in Malariapatienten vorkommen, und anschließende durchflusszytometrische Analyse. Die Befunde stützen die Vorstellung, dass sich GPIs von *P. falciparum* in die Membran von nRBCs einfügen und diese Zellen deshalb von anti-GPI-Antikörpern erkannt und eliminiert werden können.<sup>[122]</sup> Dieser Prozess könnte zur malariaassoziierten Anämie beitragen. Genauere Untersuchungen sind jedoch erforderlich, bevor eine endgültige Schlussfolgerung gezogen werden kann. Beispielsweise könnte eine In-vivo-Verabreichung von Liposomen, die GPIs enthalten, eventuell tiefere Einblicke auf diesem Gebiet vermitteln. Da die Anämie auch eines der Hauptsymptome der Afrikanischen Trypanosomiasis ist, kann eine verbesserte Kenntnis der malariaassoziierten Anämie zu neuartigen Hilfsmitteln führen, die zur Bekämpfung der Schlafkrankheit eingesetzt werden können.

### 5.3.4. Perspektiven synthetischer GPIs in der Parasitologie

Viele Fragen in Bezug auf Malaria-GPIs sind immer noch nicht geklärt, und bis heute ist kein Rezeptor bekannt, der exklusiv parasitäre GPIs erkennt. Toll-ähnliche Rezeptoren wurden oft mit der Erkennung von GPIs in Verbindung gebracht, es ist aber nicht bekannt, ob auch andere Rezeptoren daran beteiligt sind. Unklar ist auch, ob sich alle parasitären GPIs auf die gleiche Weise verhalten. Galectin-3 beispielsweise ist essenziell für die Erkennung der GPIs von *T. gondii* durch Makrophagen,<sup>[102]</sup> aber es ist unwahrscheinlich, dass diese Lectine mit den GPIs von *P. falciparum* wechselwirken, da diese überhaupt keine Galactosen in ihrer Struktur enthalten. Synthetische GPI-Moleküle bieten damit die beste Möglichkeit zur Beantwortung dieser biologischen Fragen.

Synthetische GPIs, die mit einer orthogonalen chemischen Funktion ausgestattet sind, ermöglichen die mühelose Konjugation mit einer stationären Phase, die für Affinitätschromatographie verwendet werden kann. Einige Proteine, die an der GPI-Biosynthese beteiligt sind, konnten durch diese Methode identifiziert werden, indem ein Proteinextrakt des Parasiten durch Affinitätschromatographie an Harz, das mit GPI 38 modifiziert war, gereinigt wurde.<sup>[123]</sup> Die Konjugation synthetischer GPIs mit Vernetzungsagentien und Fluorophoren kann zu neuen Hilfsmitteln in der biologischen Forschung führen. Ein Einsatz dieser Substanzen wäre für die Identifikation von Bindungspartnern und die Visualisierung von Molekülen innerhalb der Zelle denkbar.

### 5.4. Die GPI-Biosynthese als Angriffspunkt für Wirkstoffe gegen *T. brucei*

Wie in Abschnitt 3 bereits diskutiert wurde, unterscheiden sich die GPI-Biosynthesen in Protozoen und Säugetieren. Eine Fehlfunktion der GPI-Biosynthese kann tödlich für Protozoen sein, die sich in Säugetierwirten aufhalten.<sup>[46]</sup> Die selektive Inhibition der GPI-Biosynthese kann daher ein wirksamer chemotherapeutischer Ansatz zur Behandlung

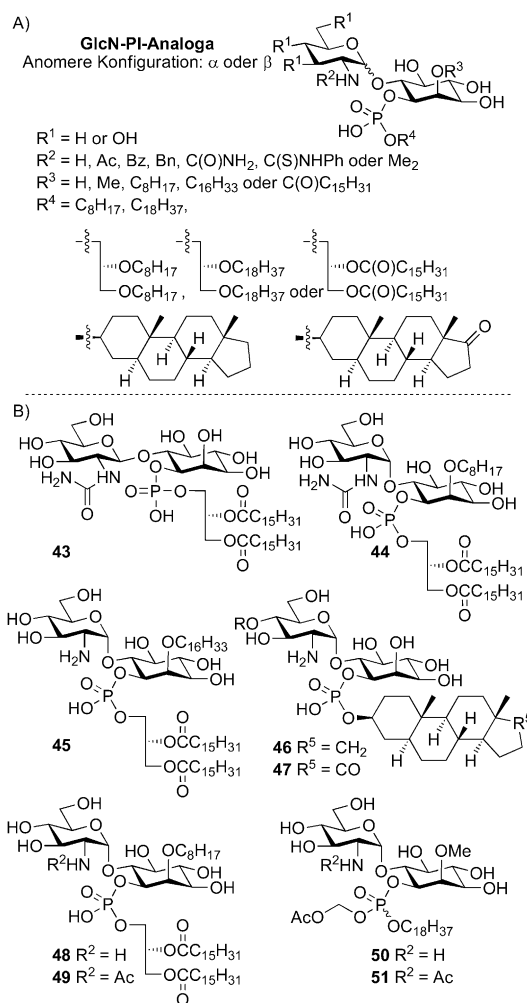
parasitärer Infektionen sein.<sup>[47]</sup> Die meisten Inhibitoren der GPI-Biosynthese wurden gegen *T. brucei* entwickelt und pharmakologisch evaluiert.

*T. brucei* verursacht die Afrikanische Trypanosomiasis, besser bekannt als Schlafkrankheit im Menschen und Nagana in Tieren. Die Schlafkrankheit bedroht Millionen von Menschen in 36 Ländern in Afrika südlich der Sahara und führt unbehandelt zum Tod.<sup>[124]</sup> Tierische Trypanosomiasis verursacht große wirtschaftliche Schäden in Afrika und schränkt die Tierhaltung auf dem Kontinent ein.<sup>[125]</sup>

Ferguson et al. untersuchten die Substratspezifität der Enzyme der GPI-Biosynthese von *T. brucei* und Menschen mithilfe eines diversen Satzes an GlcN-PI-Analoga.<sup>[126]</sup> Die GlcN-PI-Analoga unterscheiden sich in der anomeren Konfiguration, den Substituenten der Aminogruppe, der absoluten Konfiguration, den Substituenten des *myo*-Inosits und dem Lipidanteil (Schema 18 A). Diese gewissenhafte präparative Leistung identifizierte verschiedene Substanzen, die den GPI-Biosyntheseweg von *T. brucei* spezifisch in vitro inhibieren. Die Disaccharide **43** und **44** erwiesen sich als potente ( $IC_{50} = 8$  nM) GlcNAc-PI-De-*N*-acetylase-Selbstmordinhibitoren (Schema 18 B).<sup>[126c]</sup> Substanz **45** ist ein Inhibitor der Mannosyltransferase 1 (MT-1), während **48** und **49** die Inositacyltransferase inhibieren.<sup>[126b]</sup> Interessanterweise konnten die Steroidanaloga **46** und **47** effizient durch die  $\alpha$ -Mannosyltransferase mannosyliert, aber nicht an der C2-Position des Inosits acyliert oder mit PETN phosphoryliert werden.<sup>[126f]</sup> Allerdings können diese Inhibitoren wegen der negativen Ladung des Phosphodiesteres die Zellmembran nicht durchdringen, um direkt auf den lebenden Parasiten zu wirken. Um dieses Problem zu lösen, wurden zwei zellpermeable Analoga (**50** und **51**) entworfen.<sup>[126e]</sup> Die negative Ladung konnte durch eine Acetoxymethylgruppe maskiert werden, um einen neutralen und esterisablen Phosphotriester zu generieren. Diese Moleküle waren in der Lage, alle Trypanosomen innerhalb von 6 h bei einer Konzentration von 40  $\mu$ M zu töten, wohingegen HeLa-Zellen 72 h und Konzentrationen bis 100  $\mu$ M ohne merkliche Schäden überstanden.<sup>[126d]</sup>

Ein wesentlicher Nachteil der Verwendung von Kohlenhydraten als Wirkstoffkandidaten ist ihre schlechte Pharmakokinetik, wie die geringe orale Verfügbarkeit und schnelle renale Ausscheidung.<sup>[127]</sup> Kleine Moleküle wie Thiazolidinone inhibieren die DPM und die Inosit-3-phosphat-Synthetase und wurden intensiv untersucht (Tabelle 3).<sup>[128]</sup> Beide Enzyme spielen wichtige Rollen in der GPI-Biosynthese von *T. brucei*. Allerdings erreichen die besten Verbindungen gerade einmal Aktivität gegen Trypanosomen ( $ED_{50}$ ) im  $\mu$ M Bereich. Es konnte gezeigt werden, dass Thiazolidinone auch andere Enzyme inhibieren.<sup>[129]</sup> Deshalb sind diese Inhibitoren wahrscheinlich nicht sehr selektiv für spezifische Enzyme und nur von begrenztem Nutzen als Leitstrukturen.

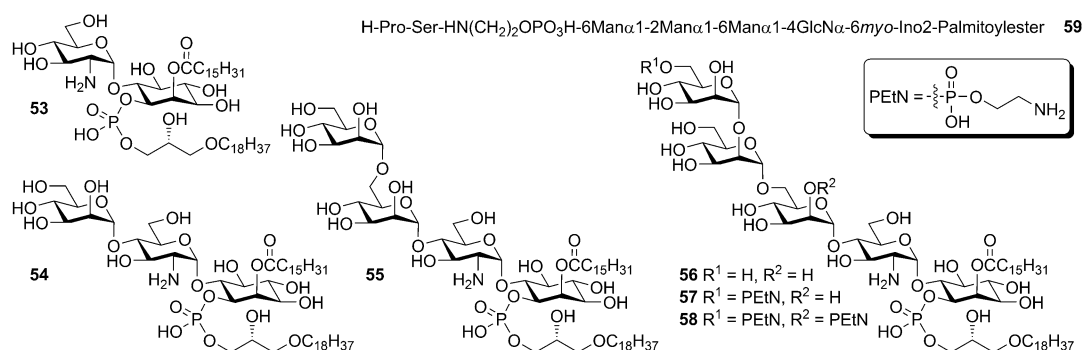
Da die Unterschiede in der GPI-Biosynthese zwischen Menschen und einer Vielzahl von eukaryotischen Pathogenen sehr groß sind, bieten sie einen Angriffspunkt für Wirkstoffe. Weitere gründliche Analysen der Spezifität der biosynthetischen Enzyme in Menschen und Krankheitserregern werden den Weg für die Entwicklung neuer Inhibitoren ebnen. Leitstrukturen bieten die Möglichkeit, effiziente und billige Me-



**Schema 18.** Synthetische GlcN-PI-Bibliothek zur Untersuchung der GPI-Biosynthese in *T. brucei*. A) Strukturvariationen der synthetischen GlcN-PI-Bibliothek. Bz = Benzoyl. B) **43** und **44**: GlcNAc-PI-De-*N*-acetylase-Selbstmordinhibitoren von *T. brucei*; **45**: GPI-MT-1-Inhibitor von *T. brucei*; **46** und **47**: Steroidanaloga, die den normalen biosynthetischen Ablauf des GlcNAc-PI hemmen; **48** und **49**: GPI-Inositacyltransferaseinhibitor von *T. brucei*; **50** und **51**: zellpermeable GPI-Analoga, die *T. brucei*-Parasiten töten.

**Tabelle 3:** Thiazolidinoninhibitoren der DPM von *T. brucei*.

Verbindung	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Aktivität gegen Trypanosomen [ $ED_{50}$ , $\mu$ M]
<b>52a</b>	H	H	H	232
<b>52b</b>	H	H	OBn	338
<b>52c</b>	H	OBn	H	96
<b>52d</b>	H	OBn	OBn	492
<b>52e</b>	OH	H	H	107
<b>52f</b>	H	H	OH	427
<b>52g</b>	H	OH	H	345
<b>52h</b>	H	H	CN	244
<b>52i</b>	H	H	Cl	398
<b>52j</b>	H	H	C $\equiv$ CH	> 1000



**Schema 19.** Synthetische GPIs **53–59**, die für Bindungsstudien mit dem CAMP-Faktor verwendet wurden.

dikamente für die am meisten vernachlässigten Krankheiten auf diesem Planeten zu finden.

### 5.5. GPIs als Rezeptoren für bakterielle Toxine

Ähnlich wie verschiedene Säugetierzellmembran-Glyco-konjugate können GPI-verankerte Proteine von Pathogenen dazu genutzt werden, um in die Zellen des Wirts einzudringen. Es konnte gezeigt werden, dass GPIs Rezeptoren für hämolysierende porenformende Toxine sind. Beispiele dafür sind Aerolysin,<sup>[130]</sup> das Tetanus-Toxin,<sup>[131]</sup> der CAMP-Faktor von *Streptococcus agalactiae*,<sup>[132]</sup> das α-Toxin von *Clostridium septicum*,<sup>[133]</sup> das K1-killer-Toxin von *S. cerevisiae*<sup>[134]</sup> und das Cry1A-Toxin.<sup>[135]</sup> Diese Toxine bilden Poren in der Zellmembran und töten die Zellen durch die Zerstörung der Permeabilitätsbarriere.<sup>[136]</sup>

Das synthetische Molekül **59** (Schema 19) war in der Lage, die Lyse durch den CAMP-Faktor in Schafserythrozyten zu inhibieren.<sup>[137]</sup> Eine detailliertere Studie wurde mit den GPIs **53–59**, die strukturell mit dem GPI von CD52 des Spermiums verwandt sind, durchgeführt. Die Bindung zwischen den GPIs und dem CAMP-Faktor wurde mithilfe einer Quarzmikrowaage gemessen.<sup>[138]</sup> Dabei wurde beobachtet, dass das Protein eine hohe Affinität für den intakten GPI und dessen Fragmente aufweist. Diese Experimente stützen die Annahme, dass der CAMP-Faktor stark mit GPIs wechselwirkt und dass ein kleines GPI-ähnliches Molekül das porenformende Toxin inhibieren kann.<sup>[139]</sup>

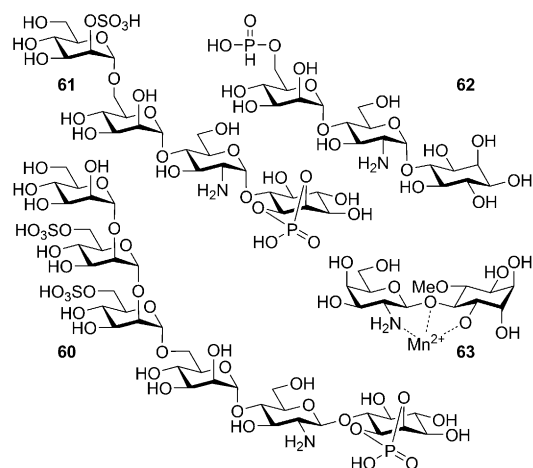
### 5.6. GPIs als Insulinmimetika

Das Verständnis der Insulinsignaltransduktion ist von größter Bedeutung, da neue Erkenntnisse zu besseren Strategien für die Behandlung von Diabetes, einer der häufigsten Stoffwechselerkrankungen weltweit, führen können. Es wurde schon lange vermutet, dass GPIs mögliche Vorstufen neuer sekundärer Botenstoffe mit insulinähnlicher Wirkung sein können.<sup>[140]</sup> Zahlreiche Studien zeigen, dass Insulin die Hydrolyse von GPIs fördert und zur Freisetzung von Inosithaltigen Phosphoglycanen (IPGs), die Insulin-ähnliche Wirkung auf intakte Adipozyten und Hepatozyten haben, beiträgt. Es konnte demonstriert werden, dass selbst in Abwe-

senheit von Insulin durch lipo- und proteolytischen Abbau von GPI-verankerten Proteinen in vitro erzeugte IPGs von *T. brucei* und *S. cerevisiae* die Insulinsignalkaskade aktivieren.<sup>[141]</sup>

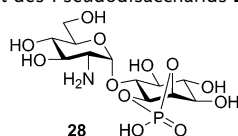
Trotz der Beweise für die insulinmimetischen Effekte der GPI-ähnlichen Moleküle bleiben deren exakte Strukturen und Wirkmechanismen ungeklärt. Um die Beziehung zwischen Struktur und biologischer Aktivität dieser Substanzen zu verstehen, müssen weitere Studien mit definierten synthetischen IPGs durchgeführt werden. Die Vorstellung, dass das Verständnis des Wirkmechanismus der potenziellen Insulinmimetika zu neuen Diabetestherapeutika führen könnte, hat mehrere Gruppen dazu angeregt, IPGs mit unterschiedlichen Struktureigenschaften zu synthetisieren und diese auf ihre biologischen Eigenschaften zu testen.<sup>[142]</sup> Bis heute wurden mehr als 80 IPGs synthetisiert und getestet.

Die umfassendste Untersuchung wurde von der Gruppe um Müller bei Sanofi-Aventis durchgeführt.<sup>[143]</sup> Angefangen von Pseudotri- bis hin zu Pseudoexasacchariden wurden synthetische IPGs hergestellt, die sowohl in der Zahl als auch in der Natur der Substituenten und der Konfiguration der glycosidischen Bindung des GlcN variieren. Unter diesen Verbindungen konnte IPG **60** als die aktivste identifiziert werden (Schema 20). **60** zeigt eine 96-prozentige MIR (maximal insulin response) und einen EC<sub>50</sub>-Wert von 3 μM während der Stimulierung der Lipogenese in Adipozyten von Ratten.<sup>[144]</sup> Dieses synthetische Molekül hat die stärkste insulinmimetische Aktivität aller evaluierten Substanzen. Die Erforschung der insulinmimetischen Wirkung von kleineren IPG-Analoga hat widersprüchliche Befunde geliefert. Beispielsweise wurde IPG **61** als hochpotent beschrieben (EC<sub>50</sub> = 1.1 μM und 78% MIR für die Lipogenese),<sup>[146]</sup> allerdings berichtete eine andere Gruppe, dass diese Verbindung keinerlei Aktivität aufweise.<sup>[148]</sup> Verschiedene Gruppen untersuchten IPG **63** mit dem gleichen Assay und erhielten widersprüchliche Ergebnisse.<sup>[149]</sup> Im Unterschied dazu wurde IPG **62** zuerst als inaktiv bezeichnet,<sup>[143]</sup> aber später von derselben Gruppe bei Verwendung des gleichen Lipogenese-Assays als moderat aktiv beschrieben.<sup>[144]</sup> Das drastischste Beispiel in Bezug auf die insulinmimetischen Aktivitäten bezieht sich auf die Untersuchung des Pseudodisaccharids **28** (Tabelle 4). Die biologische Aktivität von **28** wurde von unterschiedlichen Gruppen mit verschiedenen Assays untersucht und führte zu entgegengesetzten Befunden. Diese Resultate zeigen hin-



Schema 20. Ausgewählte Beispiele für synthetische IPGs.

Tabelle 4: Insulinmimetische Aktivität des Pseudodisaccharids **28**.

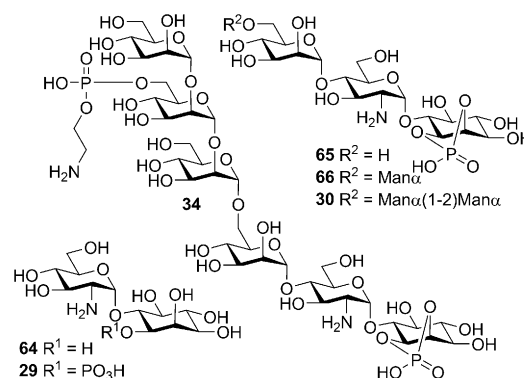


Studie	Untersuchungsmethode	Aktivität
d'Alarcao (1992) <sup>[145]</sup>	Gluconeogenese cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität	keine Aktivität keine Aktivität
d'Alarcao (2005) <sup>[146]</sup>	Lipogenese	30–40% MIR bei 40 $\mu\text{M}$
d'Alarcao (2005) <sup>[147]</sup>	Lipogenese	18% MIR, $\text{EC}_{50} = 10.5 \mu\text{M}$
Müller (1998) <sup>[143]</sup>	Lipogenese	24% MIR, $\text{EC}_{50} = 15.9 \mu\text{M}$
Seeberger (2010) <sup>[148]</sup>	Lipogenese PKB/Akt-Aktivierung	MIR < 20% keine Aktivität
	Glucosetransport	keine Aktivität
Martin-Lomas (1999) <sup>[90a]</sup>	Insulintoleranztest Zellproliferation otogener Vesikel Fos-Onkoproteinexpression	keine Aktivität max. Effekt bei 10 $\mu\text{M}$ max. Effekt bei 2.2 $\mu\text{M}$

sichtlich der Fähigkeit von IPG **28**, die Lipogenese in Ratteadipozyten zu stimulieren, dass es Schwierigkeiten gibt, die bereits publizierten Daten zu reproduzieren.<sup>[143,145–148]</sup>

Die Idee, dass GPIs Vorstufen von IPGs sein können, entstand nach der Erzeugung von IPGs aus Rinderleber, nachdem diese mit PI-PLC behandelt worden war.<sup>[150]</sup> Es wird vermutet, dass die PI-PLC ein 1,2-cyclisches Phosphat des Inosits herstellt, da die Acylierung der C2-Position dieses Hexols bei GPIs eine Resistenz gegen die enzymatische Hydrolyse zur Folge hat. Eine Vielzahl von IPGs, die ein cyclisches Phosphat tragen und die Struktur PI-PLC behandelter GPIs aufweisen, konnte synthetisiert und auf biologische Eigenschaften hin untersucht werden (Schema 21). Keines dieser Moleküle zeigt insulinmimetische Aktivität.<sup>[90c,142,145,148,151]</sup> Diese Befunde implizieren, dass IPGs, die strukturell von GPIs abgeleitet sind, allein nicht ausreichen, um insulinähnliche Reaktionen in Zellen auszulösen.

Zusammenfassend haben IPGs, die Phosphate, Inosit, Hexosamin, Saccharide und andere negativ geladene Gruppen tragen, insulinmimetische Eigenschaften. Allerdings konnte die Minimalstruktur, die für diese Aktivität notwen-



Schema 21. Ausgewählte Beispiele von IPGs, die keine biologische Aktivität zeigen und von GPIs abgeleitet sind.

dig ist, bis jetzt nicht bestimmt werden. Das Verständnis der molekularen Grundlagen, die verantwortlich für die biologischen Eigenschaften der IPGs sind, ist von höchster Priorität für den Entwurf wirksamerer Verbindungen. Frühere Untersuchungen zeigten, dass IPGs die Lipogenese ohne Eintritt in die Zelle stimulieren können,<sup>[147]</sup> allerdings konnte der entsprechende Rezeptor noch nicht identifiziert werden. Die Identifizierung des Rezeptors wird die Entwicklung noch wirksamerer Insulinmimetika fördern. Die bis jetzt beobachteten Konzentrationen, in denen IPGs ihre insulinähnlichen Eigenschaften zeigen ( $\mu\text{M}$ -Bereich), können nur als Ausgangspunkt für die Wirk-

stoffsuche dienen. Ein detailliertes Verständnis der IPG-induzierten Signalkaskaden könnte dazu beitragen, angemessene Zielstrukturen aufzufindig zu machen, um die IPG-Aktivität zu testen und das Problem der Reproduzierbarkeit der bereits veröffentlichten Daten zu lösen.

## 5.7. Synthetische GPI-verankerte Proteine

GPIs haben Einfluss auf die Dynamik und Topologie der Plasmamembran.<sup>[152]</sup> Es wurde vermutet, dass GPI-verankerte Proteine eine höhere laterale Beweglichkeit als Transmembranprotein aufweisen, da diese die ganze Plasmamembran durchspannen und dadurch kaum mobil sind.<sup>[153]</sup> Neueste Studien zeigen allerdings, dass die hohe Mobilität von GPI-verankerten Proteinen möglicherweise durch die Wechselwirkungen mit anderen Zelloberflächenkomponenten hervorgerufen wird.<sup>[154]</sup>

Die Gruppe um Bertozzi untersuchte die Mobilität und Proteinlokalisierung GPI-verankerter Proteine anhand von GFP-Analoga dieser Glykokonjugate (**21–23**; Schema 10).<sup>[155]</sup>



Diese modifizierten Proteine fügen sich in die Plasmamembran verschiedener Säugetierzellen ein und werden von dort durch Endozytose ähnlich wie GPI-verankerte GFPs in die Zelle aufgenommen. Die Analoga **21–23** breiten sich ebenfalls frei auf der Zelloberfläche aus. Interessanterweise haben Veränderungen der Glycanstruktur einen signifikanten Einfluss auf die Membranmobilität der Glycokonjugate. Der Verlust von Monosacchariden korreliert direkt mit einer verminderten Diffusionsrate. Diese Versuche demonstrieren, dass eine Änderung der Glycanstruktur von GPI-Ankern einen Einfluss auf die Eigenschaften der verankerten Proteine hat.

## 6. Schlussfolgerungen und Perspektiven

Mehr als drei Jahrzehnte sind seit der ersten Entdeckung von GPIs vergangen.<sup>[3]</sup> Die biologische Bedeutung der GPIs wurde weithin erkannt, wenn auch das Wissen über ihre Funktionen begrenzt bleibt. Da reines Material nicht aus natürlichen Quellen erhalten werden kann, wurden Synthesemethoden entwickelt, um diesen Mangel an homogenen GPIs auszugleichen. Die Aufklärung der Funktion ungesättigter Fettsäuren in GPIs und GPI-verankerten Proteinen wurde durch die Schwierigkeiten bei der chemischen Synthese dieser Substanzen erschwert. Die funktionelle Bedeutung ungesättigter Lipide wurde nie validiert. Es wurden allerdings Arbeiten publiziert, in denen ungesättigte Lipide essenziell für die hochpotenten proinflammatorischen Eigenschaften von GPIs aus *T. cruzi*<sup>[73]</sup> sind. Über die Bedeutung des GPI-Ankers in GPI-verankerten Proteinen ist wenig bekannt, was auf die präparativen Probleme während der Synthese dieser komplexen Biomoleküle zurückzuführen ist.

Fortschritte bei der chemischen Synthese von GPIs haben die Herstellung verschiedener GPI-Anker und ihrer Analoga ermöglicht. Die Entwicklung einer allgemeingültigen Synthesestrategie hat die schnelle Synthese unterschiedlicher Strukturen unter Verwendung gemeinsamer Kohlenhydratbausteine ermöglicht.<sup>[58]</sup> Ein einfacher Zugang zu synthetischen GPIs wird die Zahl der Fragen, die bearbeitet werden können, erhöhen. Beispiele dafür sind die molekulare Konformation dieser Glycolipide und deren Wechselwirkung mit bakteriellen Toxinen.

Parasitäre GPIs können Immunreaktionen in Säugetieren auslösen. Ihre eindeutige Struktur ermöglicht die Entwicklung von Impfstoffen gegen Parasiten auf der Basis von GPI-Glycanen, die bereits erfolgreich gegen Malaria und die Afrikanische Trypanosomiasis eingesetzt werden konnten. Da GPIs essenziell für das Überleben von Zellen sind, besteht ein weiterer Ansatz in der Bekämpfung von Protozoen darin, die GPI-Biosynthese zu stören. Im Fall von *T. brucei* konnten verschiedenste Enzyme als Ziele für Wirkstoffe ausfindig gemacht werden. Die gleiche Strategie kann auch auf Malaria übertragen werden, weil die DPM von *P. falciparum* charakteristisch für diesen Organismus ist und sich als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Wirkstoffe anbietet.

Seit der Entdeckung, dass GPIs mögliche Vorstufen neuer sekundärer Botenstoffe mit insulinähnlicher Wirkung sein können, gibt es eine kontroverse Diskussion über die phy-

siologischen Eigenschaften dieser IPGs. Fehlende Kenntnisse über den mutmaßlichen IPG-Rezeptor haben die weitere Forschung auf diesem Gebiet behindert. Eine Möglichkeit, diese(n) Rezeptor(en) zu identifizieren, bietet die Photoaffinitätsmarkierung mithilfe eines hochpotenten IPG-Derivats.

Die Fortschritte bei der chemischen Synthese von GPIs haben die biologische Forschung in diesem Bereich vorangetrieben. Die biomedizinischen Durchbrüche haben wiederum die Weiterentwicklung der Synthesemethoden beschleunigt, um bessere Hilfsmittel zur Beantwortung biologischer Fragen bereitzustellen. Mit einem ständig wachsenden Repertoire an Methoden aus beiden Bereichen ist die Forschung rund um GPIs bereit, schnell voranzuschreiten.

*Die Autoren danken allen Mitgliedern der AG Seeberger, die jemals an GPIs gearbeitet haben oder sich momentan mit diesem Thema beschäftigen. Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und der Körber Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Y.H.T. dankt dem DAAD für ein Doktorandenstipendium. Wir danken Prof. Dr. Morihisa Fujita (Osaka Universität, Japan) für die Bereitstellung des GPI-Biosyntheseschemas sowie Stefan Matthies und Markus Weishaupt für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts. Sebastian Götze sei an dieser Stelle für die Übersetzung des englischen Manuskripts in die deutsche Sprache gedankt.*

Eingegangen am 21. Mai 2012

Online veröffentlicht am 19. Oktober 2012

- [1] S. Mayor, H. Riezman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, 5, 110–120.
- [2] M. A. Ferguson, A. F. Williams, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 285–320.
- [3] a) H. Ikezawa, M. Yamanegi, R. Taguchi, T. Miyashita, T. Ohyabu, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 450, 154–164; b) M. G. Low, J. B. Finean, *Biochem. J.* **1977**, 167, 281–284; c) M. G. Low, J. B. Finean, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 508, 565–570; d) M. G. Low, J. B. Finean, *FEBS Lett.* **1977**, 82, 143–146.
- [4] M. G. Low, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 988, 427–454.
- [5] a) A. H. Futerman, M. G. Low, K. E. Ackermann, W. R. Sherman, I. Silman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 129, 312–317; b) A. G. Tse, A. N. Barclay, A. Watts, A. F. Williams, *Science* **1985**, 230, 1003–1008; c) M. A. Ferguson, M. G. Low, G. A. Cross, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 14547–14555.
- [6] S. D. Tachado, R. Mazhari-Tabrizi, L. Schofield, *Parasite Immunol.* **1999**, 21, 609–617.
- [7] H. Ikezawa, *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 409–417.
- [8] a) J. Eichler, M. W. W. Adams, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2005**, 69, 393–425; b) T. Kobayashi, R. Nishizaki, H. Ikezawa, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1997**, 1334, 1–4; c) M. Nishihara, M. Utagawa, H. Akutsu, Y. Koga, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12432–12435.
- [9] B. Eisenhaber, P. Bork, F. Eisenhaber, *Protein Eng.* **2001**, 14, 17–25.
- [10] O. Nosjean, A. Briolay, B. Roux, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Biomembr.* **1997**, 1331, 153–186.
- [11] M. G. Paulick, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2008**, 47, 6991–7000.
- [12] S. Moody-Haupt, J. H. Patterson, D. Mirelman, M. J. McConville, *J. Mol. Biol.* **2000**, 297, 409–420.
- [13] T. Kinoshita, M. Fujita, Y. Maeda, *J. Biochem.* **2008**, 144, 287–294.

- [14] a) A. Adibekian, P. Stallforth, M. L. Hecht, D. B. Werz, P. Gagneux, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 337–344; b) D. B. Werz, R. Ranzinger, S. Herget, A. Adibekian, C. W. von der Lieth, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 685–691.
- [15] W. L. Roberts, J. J. Myher, A. Kuksis, M. G. Low, T. L. Rosenberry, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18766–18775.
- [16] K. Fukushima, Y. Ikehara, M. Kanai, N. Kochibe, M. Kuroki, K. Yamashita, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 36296–36303.
- [17] C. A. Redman, J. E. Thomasoates, S. Ogata, Y. Ikehara, M. A. J. Ferguson, *Biochem. J.* **1994**, 302, 861–865.
- [18] S. D. Leidich, D. A. Drapp, P. Orlean, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 10193–10196.
- [19] K. Kawagoe, D. Kitamura, M. Okabe, I. Taniuchi, M. Ikawa, T. Watanabe, T. Kinoshita, J. Takeda, *Blood* **1996**, 87, 3600–3606.
- [20] A. M. Almeida, Y. Murakami, D. M. Layton, P. Hillmen, G. S. Sellick, Y. Maeda, S. Richards, S. Patterson, I. Kotsianidis, L. Mollica, D. H. Crawford, A. Baker, M. Ferguson, I. Roberts, R. Houlston, T. Kinoshita, A. Karadimitris, *Nat. Med.* **2006**, 12, 846–851.
- [21] P. M. Krawitz, M. R. Schweiger, C. Rodelsperger, C. Marcelis, U. Kolsch, C. Meisel, F. Stephani, T. Kinoshita, Y. Murakami, S. Bauer, M. Isau, A. Fischer, A. Dahl, M. Kerick, J. Hecht, S. Kohler, M. Jager, J. Grunhagen, B. J. de Condor, S. Doelken, H. G. Brunner, P. Meinecke, E. Passarge, M. D. Thompson, D. E. Cole, D. Horn, T. Roscioli, S. Mundlos, P. N. Robinson, *Nat. Genet.* **2010**, 42, 827–829.
- [22] M. A. J. Ferguson, S. W. Homans, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Science* **1988**, 239, 753–759.
- [23] I. R. E. Nett, A. Mehlert, D. Lamont, M. A. J. Ferguson, *Glycobiology* **2010**, 20, 576–585.
- [24] A. Mehlert, J. M. Richardson, M. A. J. Ferguson, *J. Mol. Biol.* **1998**, 277, 379–392.
- [25] P. Gerold, B. Striepen, B. Reitter, H. Geyer, R. Geyer, E. Reinwald, H. J. Risse, R. T. Schwarz, *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 181–194.
- [26] M. L. S. Guthrie, M. L. C. Dealmeida, N. Yoshida, M. A. J. Ferguson, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 6820–6828.
- [27] J. I. MacRae, A. A. Serrano, N. A. Morrice, A. Mehlert, M. A. J. Ferguson, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 12201–12211.
- [28] J. O. Previato, C. Jones, M. T. Xavier, R. Wait, L. R. Travassos, A. J. Parodi, L. Mendoncapreviato, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 7241–7250.
- [29] T. Fontaine, T. Magnin, A. Melhert, D. Lamont, J. P. Latge, M. A. J. Ferguson, *Glycobiology* **2003**, 13, 169–177.
- [30] P. Schneider, M. A. J. Ferguson, M. J. McConville, A. Mehlert, S. W. Homans, C. Bordier, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 16955–16964.
- [31] a) D. C. Gowda, R. S. Naik, O. H. Branch, A. S. Woods, M. Vijaykumar, D. J. Perkins, B. L. Nahlen, A. A. Lal, R. J. Cotter, C. E. Costello, C. F. Ockenhouse, E. A. Davidson, *J. Exp. Med.* **2000**, 192, 1563–1575; b) P. Gerold, L. Schofield, M. J. Blackman, A. A. Holder, R. T. Schwarz, *Mol. Biochem. Parasitol.* **1996**, 75, 131–143; c) P. Gerold, A. Dieckmannschuppert, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 2597–2606.
- [32] B. Striepen, C. F. Zinecker, J. B. L. Damm, P. A. T. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. G. Vliegthart, J. F. Dubremetz, R. T. Schwarz, *J. Mol. Biol.* **1997**, 266, 797–813.
- [33] C. Fankhauser, S. W. Homans, J. E. Thomasoates, M. J. McConville, C. Desponds, A. Conzelmann, M. A. J. Ferguson, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 26365–26374.
- [34] D. Oxley, A. Bacic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 14246–14251.
- [35] S. W. Homans, M. A. Ferguson, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, R. Anand, A. F. Williams, *Nature* **1988**, 333, 269–272.
- [36] N. Stahl, M. A. Baldwin, R. Hecker, K. M. Pan, A. L. Burlingame, S. B. Prusiner, *Biochemistry* **1992**, 31, 5043–5053.
- [37] R. Mukasa, M. Umeda, T. Endo, A. Kobata, K. Inoue, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 318, 182–190.
- [38] I. A. Brewis, M. A. J. Ferguson, A. Mehlert, A. J. Turner, N. M. Hooper, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22946–22956.
- [39] A. Mehlert, L. Varon, I. Silman, S. W. Homans, M. A. J. Ferguson, *Biochem. J.* **1993**, 296, 473–479.
- [40] M. A. Deeg, D. R. Humphrey, S. H. Yang, T. R. Ferguson, V. N. Reinhold, T. L. Rosenberry, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18573–18580.
- [41] A. Treumann, M. R. Lifely, P. Schneider, M. A. J. Ferguson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 6088–6099.
- [42] C. Kirchhoff, S. Schroter, P. Derr, H. S. Conrad, M. Nimtz, G. Hale, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 29862–29873.
- [43] P. M. Rudd, B. P. Morgan, M. R. Wormald, D. J. Harvey, C. W. vandenBerg, S. J. Davis, M. A. J. Ferguson, R. A. Dwek, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 7229–7244.
- [44] Y. Nakano, K. Noda, T. Endo, A. Kobata, M. Tomita, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 311, 117–126.
- [45] a) Y. Maeda, T. Kinoshita, *Prog. Lipid Res.* **2011**, 50, 411–424; b) M. Fujita, T. Kinoshita, *FEBS Lett.* **2010**, 584, 1670–1677; c) M. A. J. Ferguson, *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 2799–2809; d) M. J. McConville, M. A. J. Ferguson, *Biochem. J.* **1993**, 294, 305–324.
- [46] a) M. J. Wichroski, G. E. Ward, *Eukaryotic Cell* **2003**, 2, 1132–1136; b) R. S. Naik, E. A. Davidson, D. C. Gowda, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 24506–24511; c) K. Nagamune, T. Nozaki, Y. Maeda, K. Ohishi, T. Fukuma, T. Hara, R. T. Schwarz, C. Sutterlin, R. Brun, H. Riezman, T. Kinoshita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10336–10341.
- [47] a) T. K. Smith in *Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchoring of Proteins*, Vol. 26 (Hrsg.: A. K. Menon, P. Orlean, T. Kinoshita, F. Tamanoi), Elsevier, San Diego, **2009**, S. 247–267; b) M. A. Ferguson, J. S. Brimacombe, J. R. Brown, A. Crossman, A. Dix, R. A. Field, M. L. Guthrie, K. G. Milne, D. K. Sharma, T. K. Smith, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, 1455, 327–340.
- [48] Y. Murakami, U. Siripanyapinyo, Y. J. Hong, J. Y. Kang, S. Ishihara, H. Nakakuma, Y. Maeda, T. Kinoshita, *Mol. Biol. Cell* **2003**, 14, 4285–4295.
- [49] T. Houjou, J. Hayakawa, R. Watanabe, Y. Tashima, Y. Maeda, T. Kinoshita, R. Taguchi, *J. Lipid Res.* **2007**, 48, 1599–1606.
- [50] a) M. Fujita, Y. Maeda, M. Ra, Y. Yamaguchi, R. Taguchi, T. Kinoshita, *Cell* **2009**, 139, 352–365; b) S. Tanaka, Y. Maeda, Y. Tashima, T. Kinoshita, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 14256–14263.
- [51] Y. Maeda, Y. Tashima, T. Houjou, M. Fujita, T. Yoko-o, Y. Jigami, R. Taguchi, T. Kinoshita, *Mol. Biol. Cell* **2007**, 18, 1497–1506.
- [52] Y. Tashima, R. Taguchi, C. Murata, H. Ashida, T. Kinoshita, Y. Maeda, *Mol. Biol. Cell* **2006**, 17, 1410–1420.
- [53] M. D. Urbaniak, D. V. Yashunsky, A. Crossman, A. V. Nikolaev, M. A. J. Ferguson, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 625–634.
- [54] M. Fujita, Y. Jigami, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, 1780, 410–420.
- [55] H. Shams-Eldin, C. S. de Macedo, S. Niehus, C. Dorn, J. Kimmel, N. Azzouz, R. T. Schwarz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 370, 388–393.
- [56] T. K. Smith, J. Kimmel, N. Azzouz, H. Shams-Eldin, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 32032–32042.
- [57] a) A. V. Nikolaev, N. Al-Maharik, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 970–1020; b) Z. Guo, L. Bishop, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3585–3596.
- [58] Y. H. Tsai, S. Götze, N. Azzouz, H. S. Hahm, P. H. Seeberger, D. Varon Silva, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10136–10139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9961–9964.
- [59] a) C. Murakata, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 2439–2442; b) C. Murakata, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 671–674; c) C. Murakata, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1992**, 235, 95–114.

- [60] a) D. K. Baeschlin, A. R. Chaperon, V. Charbonneau, L. G. Green, U. Lucking, E. Walther, S. V. Ley, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3609–3614; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3423–3428; b) 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.
- [61] A. Ali, D. C. Gowda, R. A. Vishwakarma, *Chem. Commun.* **2005**, 519–521.
- [62] D. V. Yashunsky, V. S. Borodkin, M. A. J. Ferguson, A. V. Nikolaev, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 482–488; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 468–474.
- [63] Y. U. Kwon, X. Y. Liu, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2005**, 2280–2282.
- [64] a) J. Lu, K. N. Jayaprakash, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 879–882; b) J. Lu, K. N. Jayaprakash, U. Schlueter, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7540–7547.
- [65] X. Y. Liu, Y. U. Kwon, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5004–5005.
- [66] A. Ali, R. A. Vishwakarma, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4357–4369.
- [67] T. G. Mayer, B. Kratzer, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2289–2293; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2177–2181.
- [68] a) U. E. Udodong, R. Madsen, C. Roberts, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7886–7887; b) A. S. Campbell, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10387–10388.
- [69] K. Pekari, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1295–1308.
- [70] X. Wu, Z. Guo, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4311–4313.
- [71] S. Burgula, B. M. Swarts, Z. Guo, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1194–1201.
- [72] B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6648–6650.
- [73] I. C. Almeida, M. M. Camargo, D. O. Procopio, L. S. Silva, A. Mehlert, L. R. Travassos, R. T. Gazzinelli, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1476–1485.
- [74] B. M. Swarts, Z. Guo, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 2342–2352.
- [75] a) P. Orlean, A. K. Menon, *J. Lipid Res.* **2007**, *48*, 993–1011; b) N. Garg, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1998**, *10*, 439–453.
- [76] N. Shao, J. Xue, Z. Guo, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1595–1599; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1569–1573.
- [77] Y. Tanaka, Y. Nakahara, H. Hojo, Y. Nakahara, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4059–4067.
- [78] M. G. Paulick, A. R. Wise, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11543–11550.
- [79] C. F. Becker, X. Liu, D. Olschewski, R. Castelli, R. Seidel, P. H. Seeberger, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8338–8343; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8215–8219.
- [80] a) Z. Wu, X. Guo, Z. Guo, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5773–5774; b) Z. Wu, X. Guo, Q. Wang, B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1567–1571.
- [81] a) S. A. Hutchinson, S. P. Baker, J. Linden, P. J. Scammells, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4877–4884; b) Y. Okada, N. Ohta, *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 581–585.
- [82] X. Guo, Q. Wang, B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9878–9879.
- [83] a) P. H. Seeberger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 19–28; b) O. J. Plante, E. R. Palmacci, P. H. Seeberger, *Science* **2001**, *291*, 1523–1527; c) L. Kröck, D. Esposito, B. Castagner, C.-C. Wang, P. Bindschädler, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 1617–1622.
- [84] M. C. Hewitt, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13434–13436.
- [85] a) H. E. Radford, G. R. Mallucci, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2010**, *12*, 119–127; b) S. A. Priola, K. L. McNally, *Prion* **2009**, *3*, 134–138.
- [86] E. Barboni, B. P. Rivero, A. J. T. George, S. R. Martin, D. V. Renouf, E. F. Hounsell, P. C. Barber, R. J. Morris, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 487–497.
- [87] a) S. Hornemann, C. Schorn, K. Wuthrich, *EMBO Rep.* **2004**, *5*, 1159–1164; b) H. Eberl, P. Tittmann, R. Glockshuber, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25058–25065; c) J. Zuegg, J. E. Gready, *Glycobiology* **2000**, *10*, 959–974.
- [88] S. W. Homans, C. J. Edge, M. A. J. Ferguson, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2881–2887.
- [89] N. G. Jones, D. Nietlispach, R. Sharma, D. F. Burke, I. Eyres, M. Mues, H. R. Mott, M. Carrington, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 3584–3593.
- [90] a) H. Dietrich, J. F. Espinosa, J. L. Chiara, J. Jimenez-Barbero, Y. Leon, I. Varela-Nieto, J. M. Mato, F. H. Cano, C. Foces-Foces, M. Martin-Lomas, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 320–336; b) M. Martin-Lomas, P. M. Nieto, N. Khiar, S. Garcia, M. Flores-Mosquera, E. Poirot, J. Angulo, J. L. Munoz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 37–51; c) M. Martín-Lomas, N. Khiar, S. Garcia, J. L. Koessler, P. M. Nieto, T. W. Rademacher, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3608–3621; d) F. Chevalier, J. Lopez-Prados, S. Perez, M. Martin-Lomas, P. M. Nieto, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3489–3498; e) F. Chevalier, J. Lopez-Prados, P. Groves, S. Perez, M. Martin-Lomas, P. M. Nieto, *Glycobiology* **2006**, *16*, 969–980.
- [91] a) J. B. Bartlett, K. Dredge, A. G. Dalgleish, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 314–322; b) K. Scalzo, M. Plebanski, V. Apostolopoulos, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1759–1768.
- [92] A. O. Tzianabos, *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 523–533.
- [93] L. Schofield, M. J. McConville, D. Hansen, A. S. Campbell, B. Fraser-Reid, M. J. Grusby, S. D. Tachado, *Science* **1999**, *283*, 225–229.
- [94] B. Stijlemans, T. N. Baral, M. Williams, L. Brys, J. Korf, M. Drennan, J. Van Den Abbeele, P. De Baetselier, S. Magez, *J. Immunol.* **2007**, *179*, 4003–4014.
- [95] S. D. Tachado, L. Schofield, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 984–991.
- [96] WHO, World Health Organization International Food Safety Authorities Network Information Note n 3/2008 **2008**.
- [97] J. S. Remington, G. Desmonts, *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant* (Hrsg.: J. S. Remington, J. O. Klein), W. B. Sanders, Philadelphia, **1990**, S. 88–195.
- [98] B. J. Luft, J. S. Remington, *Clin. Infect. Dis.* **1992**, *15*, 211–222.
- [99] K. Pekari, D. Tailler, R. Weingart, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7432–7442.
- [100] F. Debierre-Grockiego, N. Azzouz, J. Schmidt, J. F. Dubremetz, H. Geyer, R. Geyer, R. Weingart, R. R. Schmidt, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 32987–32993.
- [101] F. Debierre-Grockiego, M. A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, A. G. Resende, D. Santos Mansur, R. Weingart, R. R. Schmidt, D. T. Golenbock, R. T. Gazzinelli, R. T. Schwarz, *J. Immunol.* **2007**, *179*, 1129–1137.
- [102] F. Debierre-Grockiego, S. Niehus, B. Coddeville, E. Ellass, F. Poirier, R. Weingart, R. R. Schmidt, J. Mazurier, Y. Guerardel, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 32744–32750.
- [103] F. Debierre-Grockiego, R. T. Schwarz, *Glycobiology* **2010**, *20*, 801–811.
- [104] WHO, World Health Organization Fact Sheet n 94 **2012**, Geneva: WHO.
- [105] D. C. Gowda, E. A. Davidson, *Parasitol. Today* **1999**, *15*, 147–152.
- [106] L. Schofield, F. Hackett, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 145–153.
- [107] a) L. Schofield, G. E. Grau, *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 722–735; b) T. Nebl, M. J. De Veer, L. Schofield, *Parasitology* **2005**, *130*, S45–S62.
- [108] S. Sharma, S. Pathak, *J. Vector Borne Dis.* **2008**, *45*, 1–20.
- [109] L. Schofield, M. C. Hewitt, K. Evans, M. A. Siomos, P. H. Seeberger, *Nature* **2002**, *418*, 785–789.
- [110] P. H. Seeberger, R. L. Soucy, Y. U. Kwon, D. A. Snyder, T. Kanemitsu, *Chem. Commun.* **2004**, 1706–1707.
- [111] W. Wolfson, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 689–691.
- [112] a) C. S. Boutlis, D. C. Gowda, R. S. Naik, G. P. Maguire, C. S. Mgone, M. J. Bockarie, M. Lagog, E. Ibam, K. Lorry, N. M.



- Anstey, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5052–5057; b) J. B. de Souza, J. Todd, G. Krishnegowda, D. C. Gowda, D. Kwiatkowski, E. M. Riley, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5045–5051; c) C. S. Boutlis, P. K. Fagan, D. C. Gowda, M. Lagog, C. S. Mgone, M. J. Bockarie, N. M. Anstey, *J. Infect. Dis.* **2003**, *187*, 862–865; d) S. N. H. Keenihan, S. Ratiwayanto, S. Soebianto, Krisin, H. Marwoto, G. Krishnegowda, D. C. Gowda, M. J. Bangs, D. J. Fryauff, T. L. Richie, S. Kumar, J. K. Baird, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *69*, 36–41; e) A. L. Suguitan, D. C. Gowda, G. Fouda, L. Thuita, A. N. Zhou, R. Djokam, S. Metenou, R. G. F. Leke, D. W. Taylor, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 5267–5273; f) R. Perraut, B. Diatta, L. Marrama, O. Garraud, R. Jambou, S. Longacre, G. Krishnegowda, A. Dieye, D. C. Gowda, *Microbes Infect.* **2005**, *7*, 682–687; g) R. S. Naik, G. Krishnegowda, C. F. Ockenhouse, D. C. Gowda, *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 1412–1415.
- [113] Y. U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2493–2504.
- [114] F. Kamena, M. Tamborrini, X. Y. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 238–240.
- [115] D. M. Ratner, E. W. Adams, J. Su, B. R. O’Keefe, M. Mrksich, P. H. Seeberger, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 379–382.
- [116] M. Tamborrini, X. Liu, J. P. Mugasa, Y. U. Kwon, F. Kamena, P. H. Seeberger, G. Pluschke, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 3747–3752.
- [117] a) A. A. Lamikanra, D. Brown, A. Potocnik, C. Casals-Pascual, J. Langhorne, D. J. Roberts, *Blood* **2007**, *110*, 18–28; b) C. Casals-Pascual, D. J. Roberts, *Curr. Mol. Med.* **2006**, *6*, 155–168.
- [118] H. Ekvall, *Curr. Opin. Hematol.* **2003**, *10*, 108–114.
- [119] M. R. Rifkin, F. R. Landsberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 801–805.
- [120] E. J. Pearce, B. F. Hall, A. Sher, *J. Immunol.* **1990**, *144*, 2751–2756.
- [121] a) I. A. Rooney, J. E. Heuser, J. P. Atkinson, *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1675–1686; b) I. A. Rooney, J. P. Atkinson, E. S. Krul, G. Schonfeld, K. Polakoski, J. E. Saffitz, B. P. Morgan, *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 1409–1420.
- [122] N. W. Brattig, K. Kowalsky, X. Liu, G. D. Burchard, F. Kamena, P. H. Seeberger, *Microbes Infect.* **2008**, *10*, 885–891.
- [123] N. Azzouz, F. Kamena, P. H. Seeberger, *OMICS* **2010**, *14*, 445–454.
- [124] WHO, World Health Organization Fact Sheet n 259 **2010**, Geneva: WHO.
- [125] H. Tabel, G. J. Wei, M. Q. Shi, *Immunol. Rev.* **2008**, *225*, 128–139.
- [126] a) T. K. Smith, D. K. Sharma, A. Crossman, A. Dix, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6667–6675; b) T. K. Smith, D. K. Sharma, A. Crossman, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **1999**, *18*, 5922–5930; c) T. K. Smith, A. Crossman, C. N. Borisow, M. J. Paterson, A. Dix, J. S. Brimacombe, M. A. Ferguson, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3322–3332; d) T. K. Smith, A. Crossman, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *EMBO J.* **2004**, *23*, 4701–4708; e) A. Crossman, T. K. Smith, M. A. J. Ferguson, J. S. Brimacombe, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7419–7421; f) M. D. Urbaniak, A. Crossman, M. A. J. Ferguson, *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72*, 127–132.
- [127] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 661–677.
- [128] a) T. K. Smith, B. L. Young, H. Denton, D. L. Hughes, G. K. Wagner, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1749–1752; b) L. L. Major, T. K. Smith, *Mol. Biol. Int.* **2011**, 389364.
- [129] a) T. Kline, K. C. Barry, S. R. Jackson, H. B. Felise, H. V. Nguyen, S. I. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1340–1343; b) E. C. Dykhuizen, J. F. May, A. Tongpenyai, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6706–6707; c) C. J. Andres, J. J. Bronson, S. V. D’Andrea, M. S. Deshpande, P. J. Falk, K. A. Grant-Young, W. E. Harte, H. T. Ho, P. F. Misco, J. G. Robertson, D. Stock, Y. X. Sun, A. W. Walsh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 715–717.
- [130] L. Abrami, M. Fivaz, F. G. van der Goot, *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 168–172.
- [131] P. Munro, H. Kojima, J. L. Dupont, J. L. Bossu, B. Poulain, P. Boquet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *289*, 623–629.
- [132] S. H. Lang, M. Palmer, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 38167–38173.
- [133] a) V. M. Gordon, K. L. Nelson, J. T. Buckley, V. L. Stevens, R. K. Tweten, P. C. Elwood, S. H. Leppla, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 27274–27280; b) M. J. Wichroski, J. A. Melton, C. G. Donahue, R. K. Tweten, G. E. Ward, *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 4353–4361.
- [134] F. Breinig, D. J. Tipper, M. J. Schmitt, *Cell* **2002**, *108*, 395–405.
- [135] a) G. Hua, K. Tsukamoto, M. L. Rasilo, H. Ikezawa, *Gene* **1998**, *214*, 177–185; b) L. E. Fernandez, K. G. Aimanova, S. S. Gill, A. Bravo, M. Soberon, *Biochem. J.* **2006**, *394*, 77–84; c) L. Pardo-López, I. Gómez, C. Muñoz-Garay, N. Jiménez-Juarez, M. Soberón, A. Bravo, *J. Invertebr. Pathol.* **2006**, *92*, 172–177.
- [136] V. Braun, T. Focareta, *Crit. Rev. Microbiol.* **1991**, *18*, 115–158.
- [137] S. Lang, J. Xue, Z. Guo, M. Palmer, *Med. Microbiol. Immunol.* **2007**, *196*, 1–10.
- [138] X. Wu, Z. Shen, X. Zeng, S. Lang, M. Palmer, Z. Guo, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1718–1729.
- [139] Q. Wu, Z. Guo, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 258–269.
- [140] A. R. Saltiel, J. A. Fox, P. Sherline, P. Cuatrecasas, *Science* **1986**, *233*, 967–972.
- [141] a) D. E. Misek, A. R. Saltiel, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16266–16273; b) D. E. Misek, A. R. Saltiel, *Endocrinology* **1994**, *135*, 1869–1876; c) G. Muller, S. Wied, A. Crecelius, A. Kessler, J. Eckel, *Endocrinology* **1997**, *138*, 3459–3475; d) G. Muller, S. Wied, C. Piossek, A. Bauer, J. Bauer, W. Frick, *Mol. Med.* **1998**, *4*, 299–323.
- [142] M. Goel, V. N. Azev, M. d’Alarcao, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 95–118.
- [143] W. Frick, A. Bauer, J. Bauer, S. Wied, G. Müller, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13421–13436.
- [144] W. Frick, G. Müller, in United States Patent, No. 6,004,938, Hoechst Aktiengesellschaft, US, **1999**.
- [145] R. Plourde, M. d’Alarcao, A. R. Saltiel, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2606–2610.
- [146] N. Chakraborty, M. d’Alarcao, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 6732–6741.
- [147] D. I. Turner, N. Chakraborty, M. d’Alarcao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2023–2025.
- [148] M. L. Hecht, Y. H. Tsai, X. Liu, C. Wolfrum, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 1075–1086.
- [149] a) J. Larner, J. D. Price, D. Heimark, L. Smith, G. Rule, T. Piccariello, M. C. Fonteles, C. Pontes, D. Vale, L. Huang, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3283–3291; b) P. McLean, S. Kunjara, A. L. Greenbaum, K. Gumaa, J. Lopez-Prados, M. Martin-Lomas, T. W. Rademacher, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33428–33436.
- [150] A. R. Saltiel, P. Cuatrecasas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 5793–5797.
- [151] a) C. H. Jaworek, S. Iacobucci, P. Calias, M. d’Alarcao, *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 375–391; b) A. Zapata, Y. Leon, J. M. Mato, I. Varelanieto, S. Penades, M. Martinlomas, *Carbohydr. Res.* **1994**, *264*, 21–31.
- [152] a) G. Müller, *Mol. Membr. Biol.* **2011**, *28*, 187–205; b) S. E. Lakhani, S. Sabharanjak, A. De, *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16*, 93.
- [153] A. Ishihara, H. Yu, K. Jacobson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1290–1293.
- [154] S. Chatterjee, S. Mayor, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1969–1987.
- [155] M. G. Paulick, M. B. Forstner, J. T. Groves, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20332–20337.