

Toxoplasmose-Diagnose mithilfe eines synthetisch hergestellten Glycosylphosphatidylinositol-Glycans**

Sebastian Götze, Nahid Azzouz, Yu-Hsuan Tsai, Uwe Groß, Anika Reinhardt, Chakkumkal Anish, Peter H. Seeberger und Daniel Varón Silva*

Abstract: Geschätzte zwei Milliarden Menschen sind weltweit mit dem apikomplexen Parasiten *Toxoplasma gondii* infiziert, der die Ursache für eine Reihe gesundheitlicher Probleme ist. So kann eine Primärinfektion während der Schwangerschaft zum Tod des Fötus oder zu einer geistigen Behinderung des Kindes führen. Da die Medikamente gegen eine Infektion mit *T. gondii* potenziell schädlich für das ungeborene Kind sind, ist eine verlässliche Diagnose akuter Infektionen von schwangeren Frauen unentbehrlich. Bessere, schnellere, zuverlässigeren und günstigeren Diagnostika, die auf akkurate serologischen Tests basieren und definierte Antigene verwenden, sind deshalb von großem Interesse. Synthetische pathogenspezifische Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-Glycan-Antigene sind solche diagnostischen Biomarker, die eine akkurate Unterscheidung verschiedener Toxoplasmose-Krankheitsstadien in menschlichen Seren ermöglichen.

Der Apikomplexa *T. gondii* ist ein Parasit, der jedes warmblütige Tier infizieren kann.^[1] Eine Infektion beginnt durch Aufnahme von kontaminiertem rohem Fleisch oder Oozyten, die von Katzen, den Hauptwirten des Parasiten, ausgeschieden werden.^[2] Obwohl Infektionen mit *T. gondii* in den USA die dritthäufigste Ursache für eine Lebensmittelinfektion sind, die einen Krankenhausaufenthalt notwendig macht,^[3] werden sie in den Industrieländern nicht als ein größeres Gesundheitsproblem angesehen, da die Krankheit normalerweise unproblematisch verläuft.^[4] In immunkompromittierten Individuen allerdings kann sich eine latente

Toxoplasmose zu einer gefährlichen Krankheit entwickeln, z.B. zu einer Toxoplasmose-Enzephalitis, einer schweren Entzündung des Gehirns, die eine Haupttodesursache bei AIDS-Patienten ist.^[5] Eine Primärinfektion während der Schwangerschaft kann zu einer Übertragung des Parasiten von der Mutter auf das ungeborene Kind führen, was eine mentale oder physische Retardierung oder sogar den Tod des Fötus zur Folge haben kann.^[6] Die konnatale Toxoplasmose kann nur durch Verhinderung der Übertragung gestoppt werden. Die dafür verwendete Chemotherapie ist jedoch potenziell gesundheitsgefährdend für das ungeborene Kind, weshalb falsch-positive Diagnosen vermieden werden müssen. Zurzeit wird eine akute Toxoplasmose durch den serologischen Nachweis von IgG- und IgM-Antikörpern sowie die Bestimmung der Avidität von IgG, die gegen Antigene von *T. gondii* gerichtet ist, diagnostiziert. Der IgM-Titer hat dabei den größten diagnostischen Wert, da die Abwesenheit von IgM-Antikörpern eine erst kürzlich erworbene Infektion mit großer Sicherheit ausschließt. Allerdings ist bekannt, dass kommerziell erhältliche Diagnosesets, die von nichtzertifizierten Laboren genutzt werden, einen hohen Anteil (bis 60%) an falsch-positiven Testresultaten erzeugen.^[7] Aus diesem Grund ist die Identifizierung von Antigenen, die für die Entwicklung eines zuverlässigen diagnostischen Tests genutzt werden können, wichtig.

Glycosylphosphatidylinosole (GPIs) gehören zu einer Molekülklasse, die in hoher Zahl (rund 10^6 pro Zelle) auf der Zelloberfläche von *T. gondii* vorkommt.^[8] Diese Glycolipide finden man in allen eukaryotischen Organismen; sie haben die konservierte Glycankernstruktur α -Man-(1→2)- α -Man-(1→6)- α -Man-(1→4)- α -GlcNH₂-(1→6)-*myo*-Ino (Abbildung 1).^[9] *T. gondii* nutzt GPIs, um Enzyme und andere Oberflächenproteine über deren C-Terminus auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran zu verankern. Die zwei am häufigsten vorkommenden GPI-Glycoformen, die *T. gondii*-spezifisch sind, weisen eine zusätzliche Verzweigung an der O4-Position von ManI auf, die bei GPI **1** aus einer α -Glc-(1→4)- β -GalNAc- und bei GPI **2** nur aus einer (1→4)- β -GalNAc-Seitenkette besteht.^[10] Die Moleküle **1** und **2** unterscheiden sich zudem in ihrer Funktion. GPI **2** dient Oberflächenantigenen und -enzymen als Membrananker, wohingegen GPI **1** frei auf der Zelloberfläche vorkommt und nicht kovalent an ein Protein gebunden ist.^[11] Insbesondere GPI **1** ist eine immunologisch aktive Verbindung, die nach einer Infektion mit *T. gondii* eine frühe IgM-Antwort im Menschen hervorruft.^[12] Auf diesen Befunden basierte unsere Hypothese, dass die Phosphoglycane **1** und **2** sowie deren Substrukturen und biochemischen Intermediate potenzielle

[*] Dr. S. Götze, Dr. N. Azzouz, Dr. Y.-H. Tsai, A. Reinhardt, Dr. C. Anish, Prof. Dr. P. H. Seeberger, Dr. D. Varón Silva
Abteilung Biomolekulare Systeme
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)
und
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: daniel.varon@mpikg.mpg.de
Prof. Dr. U. Groß
Nationales Konsiliarlabor Toxoplasma und Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsmedizin Göttingen (Deutschland)

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und dem RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology für die großzügige finanzielle Unterstützung. A.R. dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes und Y.-H. T. dem DAAD für jeweils ein Doktorandenstipendium. Wir danken Dr. Ryan McBride für die Zusendung der Vorschrift, die für die Detektion von Anti-Kohlenhydrat-Antikörpern in Serumproben genutzt wurde, sowie Felix Bröcke und Andreas Geißner für die Korrektur des Manuskripts.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406706> zu finden.

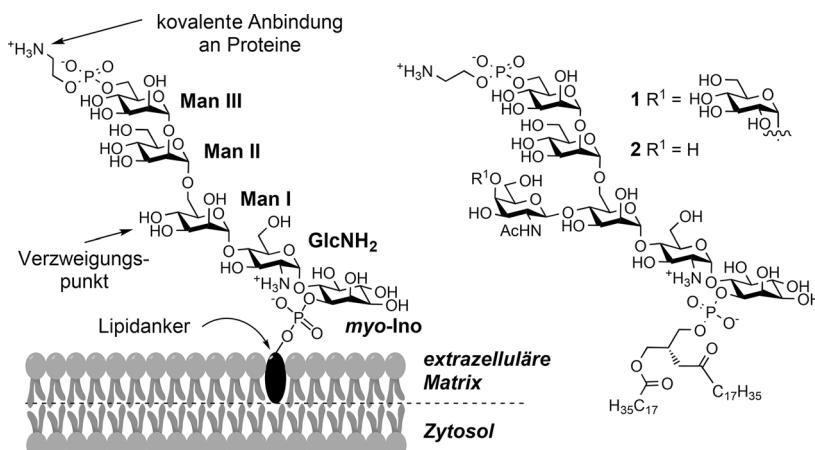


Abbildung 1. Konservierte Pseudopentasaccharidkernstruktur aller GPIs und die für *T. gondii* spezifischen Glycolipide **1** und **2**. $\text{GlcNH}_2 = \text{d-Glucosamin}$, $\text{Ino} = \text{Inositol}$, $\text{Man} = \text{d-Mannose}$.

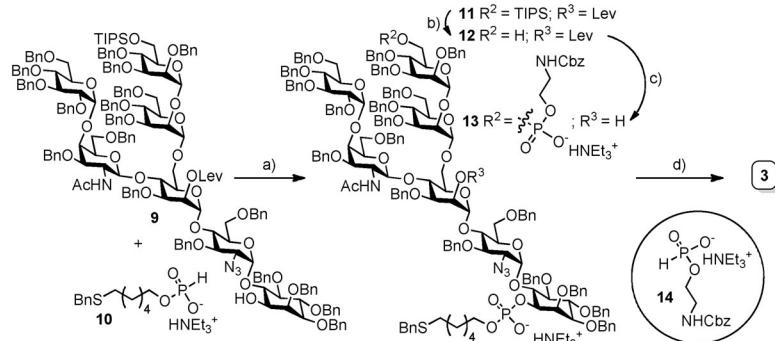
diagnostische Biomarker für die Unterscheidung einer akuten von einer latenten Toxoplasmose sind.^[13]

Die Isolierung homogener GPIs aus Parasiten ist anspruchsvoll und eignet sich nicht, um einen Zugang zu deren Derivaten oder Substrukturen zu erhalten. Aus diesem Grund nutzten wir die Möglichkeiten der chemischen Synthese, um GPIs mit definierter Struktur und hoher Reinheit herzustellen,^[14] die für biochemische Experimente und medizinische Anwendungen geeignet sind.^[15] Dieser Ansatz bietet einen weiteren Vorteil, nämlich dass falsch-positive Testresultate, die durch Kreuzreaktivitäten gegen Unreinheiten in *T. gondii*-Isolaten hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden können.^[16] Um einen diagnostischen Test auf der Basis von GPI-Glycanen enthaltenden Kohlenhydratkohärenzarrayrs^[17] zu konstruieren, wurde ein orthogonales Spacer-Molekül benötigt, das eine regioselektive kovalente Anbindung an eine feste Phase ermöglichte. Zum Schutz der freien GPI-Aminogruppen wurde ein Thiol als orthogonales

Nucleophil ausgewählt und anstatt des natürlich vorkommenden Lipidankers eine Phosphodiesterseinheit mit einem Sulfanyl-*n*-alkyl-Substituenten an der O1-Position von *myo*-Ino installiert, um die konjugationsbereiten Phosphoglycane **3–6** herzustellen (Abbildung 2).^[18]

Um die Immunantwort gegen den Kohlenhydratteil von **1** und **2** während einer Infektion mit *T. gondii* zu untersuchen und immundominante Epitope wie die Seitenketenglycosylierung oder den Phosphorylierungsgrad zu bestimmen, wurden die Glycane **3** und **4** sowie ein Satz eng verwandter Zucker synthetisiert. Glycan **5** repräsentiert eine biosynthetische Vorstufe von GPI **2**, die an der O6-Position von Man III nicht phosphoryliert ist.^[10] Die triphosphorylierte Substanz **6** ist eine allen Säugetier-GPIs gemeinsame Minimalstruktur, die eine zusätzliche Phosphoethanolamineinheit an Position O2 und eine GalNAc-Verzweigung an O4 von Man I trägt.^[15b]

Der Zugang zu diesen komplexen GPI-Molekülen wurde durch eine konvergente Synthesestrategie möglich, die wir



Schema 1. Synthese des Phosphoglycans **3**. Reagenzien und Bedingungen: a) 1. **10**, PivCl , Py ; 2. I_2 , H_2O , 87%; b) $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, MeCN , H_2O , 50°C , 76%; c) 1. **14**, PivCl , Py ; 2. I_2 , H_2O ; 3. Hydrazin, 76%; d) $\text{NH}_3(f)$, THF , $\text{Na}_{(s)}$, -78°C , $t\text{BuOH}$, 55%. $\text{Bn} = \text{Benzyl}$, $\text{Cbz} = \text{Benzylloxycarbonyl}$, $\text{Lev} = \text{Lävulinoyl}$, $\text{Piv} = \text{Pivaloyl}$, $\text{Py} = \text{Pyridin}$, $\text{Tf} = \text{Triflyl}$, $\text{TIPS} = \text{Triisopropylsilyl}$.

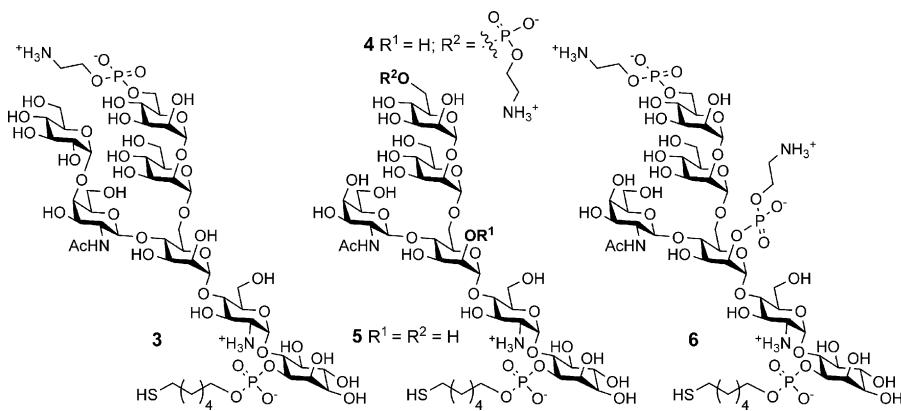


Abbildung 2. Die GPI-Glycane **3–5** spiegeln den Kohlenhydratteil der GPIs von *T. gondii* wieder. Die Minimalstruktur **6** ist Teil aller Säugetier-GPIs.

bereits für die Synthese dieser Glycolipide und ihrer Abkömmlinge entwickelt hatten.^[19] Als Beispiel für die Synthese der Glycane **3–6**^[20] wird die von Verbindung **3** genau vorgestellt (Schema 1). Die Synthese begann mit der Phosphitylierung von Alkohol **9**^[19] durch ein in situ generiertes gemischtes Anhydrid aus dem *H*-Phosphonat **10**^[18] und Pivaloylchlorid. Die anschließende Oxidation des resultierenden *H*-Phosphonats mit Iod in wässrigem Pyridin lieferte das Phosphatsalz **11** in 87 % Ausbeute. Die saure Hy-

droylyse des Silylethers führte zum primären Alkohol **12**. Eine Eintopfreaktion ergab durch Phosphitylierung von **12** mit dem *H*-Phosphonat **14**^[14d], Oxidation und abschließende Hydrazinolyse des Lävulinesters das Bisphosphat **13** in 76 % Ausbeute. Zur kompletten Entfernung der restlichen Benzyletherschutzgruppen von **13** diente eine Birch-Reduktion, die **3** in einer Ausbeute von 55 % ergab.^[15g]

Um die Kollektion synthetischer GPI-Glycane, die mit Toxoplasmose-Antigenen verwandt sind, zu vervollständigen, wurden die Substrukturen **15–17** (Abbildung 3 A), welche die Seitenkette von GPI **3** repräsentieren, mit der generellen Synthesestrategie hergestellt.^[20] Die linearen Zucker **18** und **19**,^[18] die GPI-Anker der apikomplexen Parasiten *Plasmodium falciparum* bzw. *Cryptosporidium parvum*^[21] entsprechen, wurden zusammen mit dem Pseudodisaccharid **20**^[18] (Abbildung 3 B) auf dem Mikroarray platziert, um eine mögliche Immunantwort gegen das konservierte GPI-Rückgrat zu untersuchen. Das mit Mannan verwandte Tetramannosid **21**^[22] (Abbildung 3 C) diente als Kontrollzucker, da es nicht mit den GPIs von *T. gondii* verwandt ist, dafür aber in verschiedenen Arten von Mykobakterien^[23] und Pilzen^[24] vorkommt.

Alle Kohlenhydrate, die entweder einen Amino- oder einen Sulfanyllinker tragen, wurden auf Epoxid-modifizierte Glasträger gedruckt und dadurch kovalent auf deren Oberfläche immobilisiert.^[25] Die resultierenden Kohlenhydratmikroarrays wurden mit Referenzseren von Individuen, die entweder seronegativ waren oder an einer akuten oder latenten Toxoplasmose litten, nach einer reproduzierbaren Vorschrift für die Detektion von Anti-Kohlenhydrat-Antikörpern inkubiert.^[26]

Das Screening (Abbildung 4) ergab, dass alle Seren von seronegativen Patienten^[27] nicht nachweisbare oder geringe Konzentrationen der Antikörper (IgG und IgM) aufwiesen, die gegen die gedruckten GPIs oder ihre Substrukturen gerichtet sind (Abbildung 4A). Einige gesunde Individuen enthielten in detektierbaren Konzentrationen IgG- und IgM-Antikörper, die das Tetramannosid **21** erkannten. Diese Struktur steht jedoch nicht mit einer *T. gondii*-Infektion in Verbindung, und Antikörper, die gegen dieses Oligosaccharid gerichtet sind, lassen sich möglicherweise auf eine Infektion mit anderen Pathogenen zurückführen.^[28]

Dagegen enthielten die Seren aller Patienten, die als akut infiziert eingestuft waren,

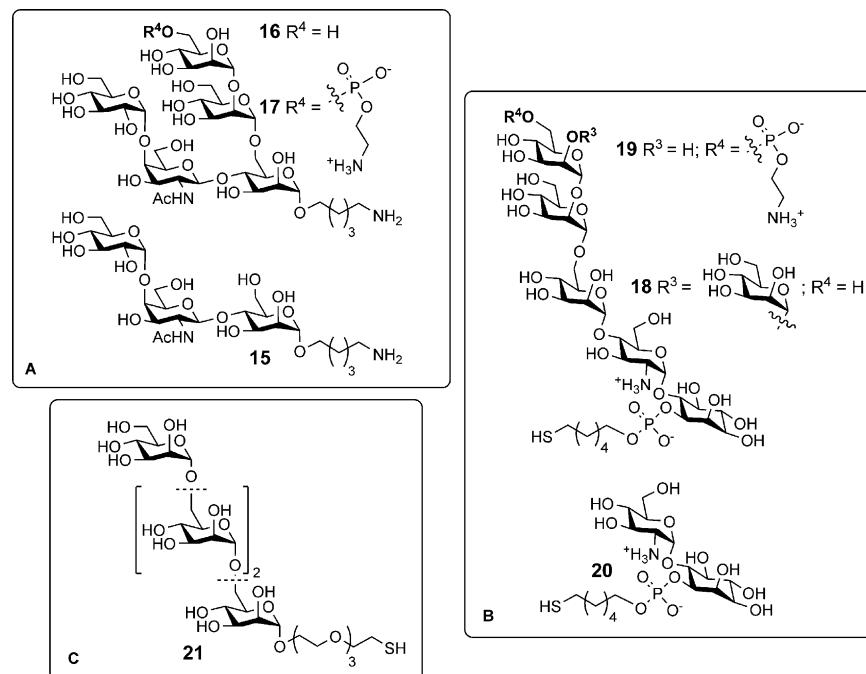


Abbildung 3. Kohlenhydratstrukturen, die als Biomarker für die Diagnose von Toxoplasmose evaluiert wurden. A) Die Substrukturen **15–17** enthalten die Seitenkette von GPI **3**. B) Die linearen Phosphoglycane **18–20** weisen das konservierte Rückgrat von GPIs auf. C) Die Mannan-Substruktur **21** ist Bestandteil der Zellwand von pathogener Hefe.

hohe Konzentrationen der IgG- und IgM-Antikörper, die das Kohlenhydrat **3** erkannten (Abbildung 4B). Zusätzlich konnten in fast allen Proben IgG- und IgM-Antikörper gefunden werden, die gegen die Substrukturen **15–17** von GPI **1** gerichtet waren und dabei Signalstärken lieferten, die den Fluoreszenzintensitäten aus der Analyse des Antikörperspiegels gegen das Phosphoglycan **3** ähnelten. Die meisten Seren enthielten auch IgG- und IgM-Antikörper, die GPI **4** erkannten, allerdings war die Signalintensität normalerweise niedriger als bei den α -Glc tragenden Substanzen **3**, **15**, **16**

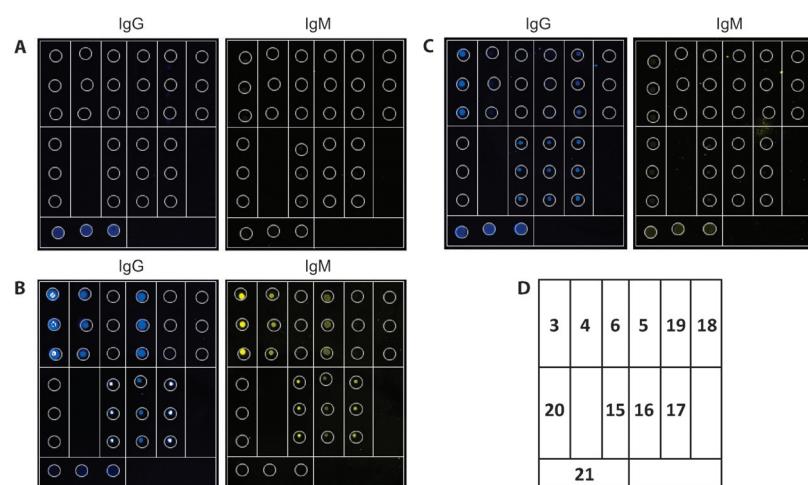


Abbildung 4. Charakteristische Aufnahmen eines Kohlenhydratmikroarrays, der mit verschiedenen Seren inkubiert wurde (Verdünnung 1:15). Die Seren stammten von Patienten, die A) nicht infiziert, B) akut infiziert und C) latent infiziert waren (Druckmuster wurde überlagert). D) Position der getesteten Verbindungen auf dem Mikroarray.

und **17**. Ein paar Seren von akut infizierten Patienten enthielten IgG- und IgM-Antikörper gegen das lineare GPI **19** und das monophosphorylierte GPI-Glycan **5**. Die *P.falciparum*-Zuckerstruktur **18** wurde von keinem Serum eines Patienten mit akuter Toxoplasmose erkannt. Interessanterweise enthielten einige wenige Seren IgM-, aber keine IgG-Antikörper gegen das Pseudodisaccharid **20**.

Wie erwartet zeigten Proben von latent infizierten Patienten ein IgG-Antikörperbindungsmuster und Signalintensitäten, die denen der Seren von akut infizierten Individuen ähnelten (Abbildung 4C). Dagegen waren die IgM-Antikörperspiegel gegen alle gedruckten Strukturen deutlich reduziert.

Diese Resultate sind in Einklang mit veröffentlichten Ergebnissen, nach denen die Immunreaktion gegen *T.gondii*-GPIs in infizierten Menschen hauptsächlich gegen das α -Glc tragende Glycolipid **1** und nicht gegen **2** gerichtet ist, somit stellt das Seitenkettenmotiv ein wichtiges immunogenes Epitop dar.^[11] Keines der getesteten Seren enthielt Antikörper, die das Säugetierkohlenhydrat **6** erkannten, was dafür spricht, dass das adaptive Immunsystem fremde von eigenen GPI-Strukturen anhand der zusätzlichen Phosphoethanolamineeinheit an Man I unterscheiden kann.

Da Antikörper gegen das GPI-Glycan **3** in allen infizierten Proben detektiert worden war, wurde diese Struktur als diagnostischer Biomarker für Toxoplasmose evaluiert (Abbildung 5). Eine statistische Analyse ergab, dass die Durchschnittswerte für die Antikörperspiegel von IgG und IgM gegen das Antigen **3** während der akuten Phase der Krankheit signifikant erhöht sind. Doch während die mittlere Konzentration der IgG-Antikörper im Blut nach der akuten Phase

nicht wesentlich abfällt, sinken die Werte für den IgM-Antikörperspiegel stark ab und ähneln in den meisten Fällen denen seronegativer Individuen.

Das Antigen **3** hat sich als ein angemessener Biomarker für die Diagnose verschiedener Stadien von Toxoplasmose herausgestellt. Der IgG-Antikörperspiegel gegen **3** kann dazu verwendet werden, nichtinfizierte Menschen von *T.gondii*-infizierten zu unterscheiden, und die Konzentration an IgM-Antikörpern kann zur Differenzierung zwischen einer latenten und einer akuten Toxoplasmose herangezogen werden.^[29]

Wir haben hier die Synthese von GPI-Glycanen, die auf der Oberfläche von Parasiten und Säugetierzellen vorkommen, sowie eine detaillierte Untersuchung der humanen Immunreaktion gegen GPIs während einer natürlichen Infektion mit *T.gondii* beschrieben, wozu auf Glycanarrays präsentierte parasitenspezifische Kohlenhydrate eingesetzt wurden. Die Analyse humaner Seren ergab, dass nur das komplexe Phosphoglycan von GPI **1** ein wertvolles Antigen ist, da es von allen infizierten Proben erkannt wurde. Konzentrationsunterschiede der gegen GPI **3** gerichteten IgG- und IgM-Antikörper erlaubten eine Differenzierung zwischen infizierten und nichtinfizierten Individuen. Die parallele Detektion von IgG und IgM, die gegen das synthetische Zelloberflächenantigen **3** gerichtet sind, eignet sich deshalb für die Entwicklung eines schnelleren und spezifischeren diagnostischen Tests zur Unterscheidung zwischen einer latenten und einer akuten Toxoplasmose.

Eingegangen am 30. Juni 2014

Online veröffentlicht am 16. Oktober 2014

Stichwörter: Biomarker · Kohlenhydratmikroarrays · Medizinische Chemie · Toxoplasmose

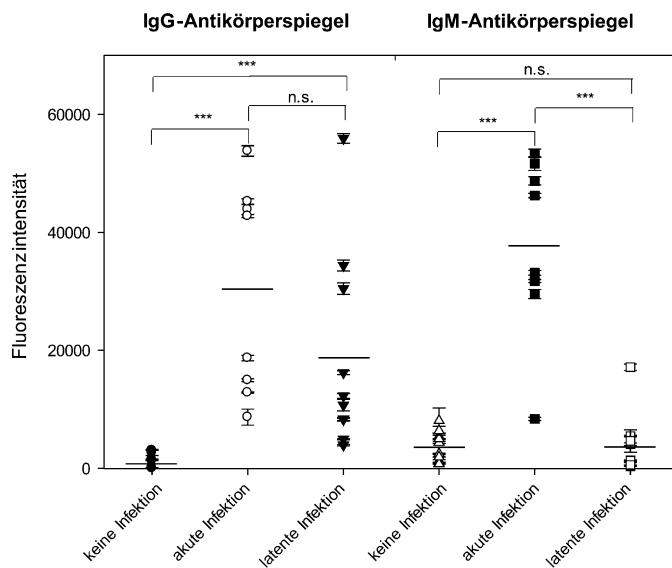


Abbildung 5. Durch Mikroarrayanalyse von Serumproben (Verdünnung 1:15) ermittelte Antikörperspiegel gegen das Antigen **3**, inklusive der Standardabweichung für jeden Datenpunkt, für verschiedene Toxoplasmose-Kohorten (n.s.=nicht signifikant; ***= $p < 0.005$, berechnet mit einem Mann-Whitney-U-Test). Beschreibung der Kohorten: keine Infektion ($n=10$); akute Infektion ($n=8$); latente Infektion ($n=10$). Schwarze Balken repräsentieren den durchschnittlichen Antikörperspiegel.

- [1] F. A. Hunter, L. D. Sibley, *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 766–778.
- [2] F. Debierre-Grockiego, *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 404–411.
- [3] P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, R. V. Tauxe, *Emerging Infect. Dis.* **1999**, *5*, 607–625.
- [4] F. Debierre-Grockiego, R. T. Schwarz, *Glycobiology* **2010**, *20*, 801–811.
- [5] J. G. Montoya, O. Liesenfeld, *Lancet* **2004**, *363*, 1965–1976.
- [6] J. S. Remington, R. McLeod, P. Thulliez, G. Desmonts in *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 6 (Hrsg.: T. Hummel, J. Ehlers), Elsevier Saunders, Philadelphia, **2006**, S. 947–1091.
- [7] O. Liesenfeld, C. Press, J. G. Montoya, R. Gill, J. L. Isaac-Renton, K. Hedman, J. S. Remington, *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 174–178.
- [8] M. A. Ferguson, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2799–2809.
- [9] M. Fujita, T. Kinoshita, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 1670–1677.
- [10] B. Striepen, C. F. Zinecker, J. B. Damin, P. A. Melgers, G. J. Gerwig, M. Koolen, J. F. Vliegenthart, J. F. Dubremetz, R. T. Schwarz, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 797–813.
- [11] N. Azzouz, H. Shams-Eldin, S. Niehus, F. Debierre-Grockiego, U. Bieker, J. Schmidt, C. Mercier, M. F. Delaunay, J.-F. Dubremetz, T. K. Smith, R. T. Schwarz, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38*, 1914–1925.
- [12] S. D. Sharma, J. Mullenax, F. G. Araujo, H. A. Erlich, J. S. Remington, *J. Immunol.* **1983**, *131*, 977–983.

- [13] F. Kamena, M. Tamborrini, X. Y. Liu, Y. U. Kwon, F. Thompson, G. Pluschke, P. H. Seeberger, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 238–240.
- [14] Übersichtsartikel: 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; c) I. Vilotijevic, S. Götz, P. H. Seeberger, D. Varón Silva in *Modern Synthetic Methods in Carbohydrate Chemistry: From Monosaccharides to Complex Glycoconjugates* (Hrsg.: D. B. Werz, S. Vidal), Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, S. 335–372; ausgewählte Originalbeiträge: d) C. Murakata, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 671–674; e) D. V. Yashunsky, V. S. Borodkin, M. A. Ferguson, A. V. Nikolaev, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 468–474; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 482–488; f) B. M. Swarts, Z. Guo, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6648–6650; g) K. Pekari, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1295–1308.
- [15] Übersichtsartikel: a) S. Yu, Z. Guo, C. Johnson, G. Gu, Q. Wu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 1006–1013; b) Y.-H. Tsai, X. Liu, P. H. Seeberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11438–11456; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11604–11623; ausgewählte Originalbeiträge: c) F. Debierre-Grockiego, S. Niehus, B. Coddeville, E. Elass, F. Poirier, R. Weingart, R. R. Schmidt, J. Mazurier, Y. Guérardel, R. T. Schwarz, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 32744–32750; d) X. Wu, Z. Shen, X. Zeng, S. Lang, M. Palmer, Z. Guo, *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1718–1729; e) 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; f) M. D. Urbaniak, D. V. Yashunsky, A. Crossman, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 625–634; g) W. Frick, A. Bauer, J. Bauer, S. Wied, G. Müller, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13421–13436.
- [16] A. Dao, N. Azzouz, C. Eloundou Nga, J. F. Dubremetz, R. T. Schwarz, B. Fortier, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2003**, *7*, 418–421.
- [17] a) S. Park, J. C. Gildersleeve, O. Blixt, I. Shin, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4310–4326; b) S. R. Stowell, C. M. Arthur, R. McBride, O. Berger, N. Razi, J. Heimborg-Molinaro, L. C. Rodrigues, J.-P. Gourdin, A. J. Noll, S. von Gunten, D. F. Smith, Y. A. Knirel, J. C. Paulson, R. D. Cummings, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 470–476.
- [18] Y.-U. Kwon, R. L. Soucy, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2493–2504.
- [19] a) Y.-H. Tsai, S. Götz, N. Azzouz, H. S. Hahn, P. H. Seeberger, D. Varón Silva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9961–9964; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10136–10139; b) Y.-H. Tsai, S. Götz, I. Vilotijevic, M. Grube, D. Varón Silva, P. H. Seeberger, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 468–481.
- [20] Syntheseschemata und experimentelle Vorschriften für alle neuen Verbindungen sind zusammen mit Kopien der zugehörigen ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [21] J. W. Priest, A. Mehlert, D. M. Moss, M. J. Arrowood, M. A. Ferguson, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2006**, *149*, 108–112, zit. Lit.
- [22] A. Hölemann, B. L. Stocker, P. H. Seeberger, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8071–8088.
- [23] V. Briken, S. A. Porcelli, G. S. Besra, L. Kremer, *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 391–403.
- [24] H. Kobayashi, J. Suzuki, S. Tanaka, Y. Kiuchi, H. Oyamada, N. Iwadate, H. Suzuki, N. Shibata, S. Suzuki, Y. Okawa, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *341*, 70–74.
- [25] Vorschriften für die Herstellung und Inkubation der Kohlenhydratmikroarrays sind in den Hintergrundinformationen zu finden.
- [26] F. Jacob, D. R. Goldstein, N. V. Bovin, T. Pochechueva, M. Spengler, R. Caduff, D. Fink, M. I. Vuskovic, M. E. Huflejt, V. Heinzelmann-Schwarz, *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 138–146.
- [27] Alle analysierten Serumproben wurden zuvor im Labor von Prof. Dr. Uwe Groß charakterisiert. Die Resultate der standardisierten Tests sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.
- [28] M. X. Zhang, T. R. Kozel, *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 4845–4850.
- [29] Grenzwertoptimierungskurven wurden für gegen das Kohlenhydrat **3** gerichtete IgG- und IgM-Spiegel berechnet und sind in den Hintergrundinformationen zu finden.