



# 糖基磷脂酰肌醇及其锚定蛋白的合成研究进展

高健<sup>①</sup>, 郭忠武<sup>①②\*</sup><sup>①</sup> Department of Chemistry, Wayne State University, Detroit, MI 48202, USA<sup>②</sup> 山东大学国家糖工程技术研究中心, 济南 250100

\*通讯作者, E-mail: zwguo@sdu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-02; 接受日期: 2013-03-30; 网络版发表日期: 2013-05-28

doi: 10.1360/032013-116

**摘要** 在真核生物中, 蛋白质的 C-末端以共价键形式与糖基磷脂酰肌醇(GPI)相连是一种常见的翻译后修饰, GPI 修饰的蛋白质可以通过 GPI 锚定在细胞膜的外叶. GPI 锚及其锚定蛋白的结构复杂、多样, 在众多生物学过程中扮演着不可或缺的重要作用. 化学合成结合酶催化反应是获得结构明确、纯度高的 GPI 锚及 GPI 锚定蛋白的重要方法, 为在分子水平上深入探索此类化合物的结构和生物学功能奠定了基础. 本文对此合成领域中所涉及的光学纯且差异性保护的肌-肌醇衍生物的制备、天然来源 GPI 的合成策略、以结构多样性为导向的 GPI 衍生物的合成, 以及 GPI 锚定蛋白的合成策略进行综述.

**关键词**

糖脂

肌-肌醇

糖基磷脂酰肌醇(GPI)

GPI 锚定蛋白

全合成

## 1 引言

糖基磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)作为结构复杂的糖脂类化合物在真核生物中有广泛的表达. 如图 1 所示, 许多低等和高等真核生物的膜表面蛋白和糖蛋白与 GPI 以共价键结合, 从而通过 GPI 锚定在细胞质膜上<sup>[1-4]</sup>. 至今已有 250 余种真核生物膜蛋白被阐明通过此种方式与质膜相连, 而基因组学研究发现, GPI 锚定的蛋白占有真核生物蛋白总量的 0.5%~1%<sup>[5, 6]</sup>.

自 Ferguson 课题组<sup>[7, 8]</sup>于 1988 年从布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)变异表面糖蛋白中分离得到并鉴定首个 GPI 分子以来, 到目前为止, 已确证的 GPI 结构有 50 余个. 研究发现, 所有 GPI 的结构中均含有一个高度保守的核心结构, 即 6-O-磷酸乙醇胺- $\alpha$ -D-甘露糖(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-甘露糖(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -D-甘露糖(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-葡萄糖胺(1 $\rightarrow$ 6)-肌-肌醇-甘油磷脂<sup>[9, 10]</sup> (图 1). GPI 分子中保守的磷酸乙醇胺桥链上的氨基可与细

胞膜表面蛋白或糖蛋白的 C-末端以共价方式连接, 而肌-肌醇(myo-inositol)上的甘油磷脂的脂肪链可以嵌入到脂质双分子层中, 从而将 GPI 锚定蛋白与质膜相连. GPI 分子中的四聚糖核心结构可以被一个或多个单糖、寡糖侧链以及磷酸乙醇胺等基团修饰, 修饰位点包括甘露糖-III 的 2-位、甘露糖-II 的 3-和 6-位、甘露糖-I 的 2-, 3-和 4-位, 以及氨基葡萄糖的 6-位等<sup>[3, 4]</sup> (图 1); 肌-肌醇的 2-位有时会被酰基修饰<sup>[11, 12]</sup>; 此外, 甘油磷脂的脂肪链可以通过酯键或醚键链接, 其长度和不饱和度也会有很大变化<sup>[13]</sup>. 因此, GPI 分子呈现复杂的结构多样性. 值得注意的是, 不同生物来源以及同种生物不同组织来源的 GPI 分子结构会有显著不同, 但这些不同的 GPI 结构对其生物学功能的具体意义仍然需要进一步深入的研究<sup>[14]</sup>.

GPI 锚和 GPI 锚定蛋白可参与多种生物学及病理学进程, 如细胞之间的识别与黏附, 生物信号的传导, 细菌、病毒和寄生虫感染, 以及细胞表面的酶促反应等, 在此方面已有多篇研究及综述性文章报

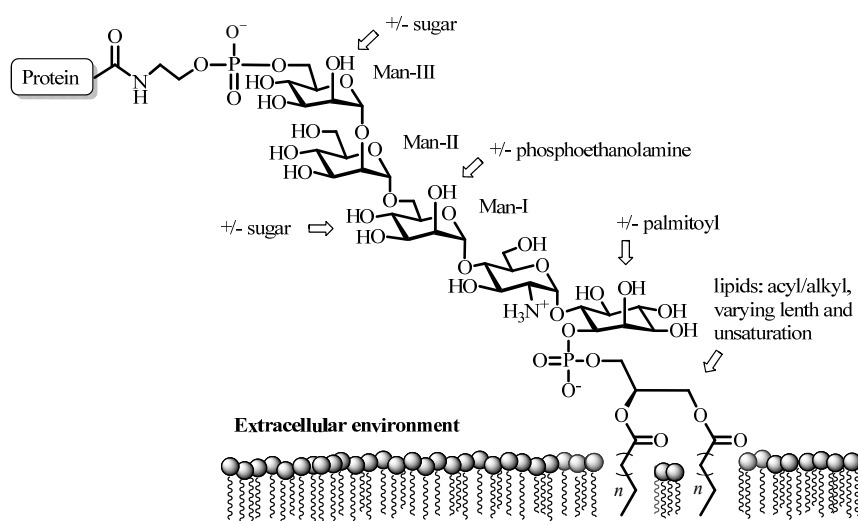


图1 GPI的母核结构、可修饰位点及其与蛋白质的链接方式和膜锚定功能

道<sup>[5, 15-19]</sup>. 本文主要介绍 GPI 锚和 GPI 锚定蛋白的合成策略.

## 2 GPI 的合成

GPI 及 GPI 锚定蛋白作为一类具有重要生物学功能的天然产物一直吸引着糖科学家的目光. 然而, 天然来源的化合物一般是不均一的, 是由一系列同系物组成的混合物, 具有微观不均一性, 从而使其分离纯化困难. 因此, 化学全合成成为制备结构确定、纯度均一且足够大量的此类复杂糖缀合物的重要方法.

GPI 的结构非常复杂, 其分子中含有磷酸乙醇胺、甘油磷脂、糖及肌-肌醇等功能团, 由此对其进行化学合成时会涉及诸多难点, 例如, 制备光学纯且位置差异性保护的肌-肌醇衍生物、糖基化反应中立体构型的控制, 以及衍生化侧链的位置选择性引入等. 自 1991 年 Ogawa 课题组<sup>[20, 21]</sup>实现首个 GPI 分子的全合成以来, 至今已有数种不同的糖基化方法和基团保护策略被成功应用于不同结构的 GPI 全合成中, Ley<sup>[22, 23]</sup>, Fraser-Reid<sup>[24, 25]</sup>, Schmidt<sup>[26, 27]</sup>, Seeberger<sup>[18, 28, 29]</sup>, Nikolaev<sup>[30]</sup>及本课题组<sup>[31-33]</sup>等在此领域均取得了重要进展. 下面将对 GPI 锚全合成中所涉及的主要问题和典型合成策略进行简要综述.

### 2.1 肌-肌醇衍生物的合成

肌-肌醇衍生物, 特别是 1,2-差异性保护和 1,2,6-

差异性保护的肌-肌醇衍生物是 GPI 合成路线中的重要模块. 肌-肌醇(**1**, 图 2)的结构具有对称性, 其结构中位置 1 和 4 分别等同于位置 3 和 6, 但是, 对这些位置进行差异性衍生化得到的产物却是手性分子, 因此产物是外消旋混合物. 化学家们已通过多种不同方法制备得到了光学纯的肌-肌醇衍生物, 详细的合成和分离方法可参见 Sureshan 的综述<sup>[34]</sup>. 在此, 仅对其中涉及的几种典型合成策略做简单介绍.

#### 2.1.1 1,2-差异性保护的肌-肌醇衍生物的合成

Garegg<sup>[35]</sup>和 Wyss<sup>[36]</sup>等课题组首先将肌-肌醇 **1** 进行双环己缩酮保护, 随后以重结晶和柱层析的方法对结构异构体进行分离可获得对映异构体混合物 ( $\pm$ )-**2** (图 2). 随后的合成策略可根据对映体的分离方法分为两种: (1) 将对映异构体 ( $\pm$ )-**2** 或其衍生物与手性试剂反应得非对映异构体混合物, 再对此非对映异构体进行分离, 多个研究组在 GPI 的合成中均采用了此方法<sup>[22, 37-39]</sup>; (2) Gou 等<sup>[40]</sup>通过酶催化的选择性反应将对映体分离. 如图 2 所示, 在胆固醇酯酶或猪胰脂肪酶的作用下, 外消旋对映异构体混合物 ( $\pm$ )-**3** 中仅 (+)-**3** 的酯链会被水解, 未脱除酯链的异构体 (-)-**3** 和脱保护的 (+)-**4** 可通过柱层析进行简便的分离获得光学纯的产物, 随后对 (-)-**3** 进行去保护可得光学纯 (-)-**4**. 对此方法制备的光学纯中间体 (+)-**4** 和 (-)-**4** 的 1-或 6-位进行选择性保护, 可以制备 1,6-差异性保护的肌-肌醇衍生物, 但以此为基础制备 1,2,6-差

异性保护的肌-肌醇衍生物仍具有一定的挑战性。

此外, Fraser-Reid 课题组<sup>[41]</sup>还发展了一种以甲基- $\alpha$ -D-葡萄糖苷为原料制备光学纯 1,2-差异性保护的肌-肌醇衍生物的方法(图 3)。首先, 经过 4 步简便的反应将原料转化为化合物 5, 再将其伯羟基进行氧化和酰化得到含有烯醇乙酸酯基团的中间体 6, 随后在醋酸汞作用下进行立体控制性的 Ferrier 重排反应得环己酮衍生物 7, 化合物 7 经过简便的还原和脱乙酰基反应便得 1,2,6-三羟基环己醇衍生物 9, 最后将 1,2-二羟基进行环己缩酮保护得到化合物 10。在对化合物 10 中裸露的羟基进行糖基化反应之后, 再对 1-和 2-位进行差异性保护。此方法的优点是, 不用对反应的外消旋中间体进行拆分, 而是以立体控制性的 Ferrier 重排反应组建肌醇的母核结构。

### 2.1.2 1,2,6-差异性保护的肌-肌醇衍生物的合成

本课题组<sup>[42]</sup>发展了一条以(+)-4 和(-)-4 为关键

中间体的制备 1,2,6-差异性保护肌-肌醇衍生物的路径(图 4): (1) 在烷基锡亚基的介导下, (+)-4 的 6-位可以选择性地烯丙基化保护, 然后在其 1-位引进对甲氧基苄基获得化合物 11; (2) 化合物 11 在酸性条件下将反式环己缩酮进行选择性脱除, 并将生成的两个羟基进行苄基化得中间体 12; (3) 脱去 12 中的顺式环己缩酮后, 在烷基锡亚基介导下将新生成的二醇 13 的 3-位羟基选择性苄基化便获得目标化合物 14。以(+)-4 为原料的合成路线总收率为 32%。为提高整体的合成效率, 其对映体(-)-4 也通过与上述策略类似但顺序几乎相反的反应过程制备获得同一目标产物 14。以(-)-4 为原料的总路线收率为 42%。

此外, 本课题组<sup>[43]</sup>还根据 Fraser-Reid 课题组<sup>[41]</sup>的研究结果, 对中间体 9 的 1-和 2-位羟基进行异丙叉基保护(图 5), 随后对剩余的 6-位羟基用烯丙基保护, 在酸性条件下脱除异丙叉基后, 在烷基锡亚基介导下对 1-位羟基进行选择性对甲氧基苄基化以制备化

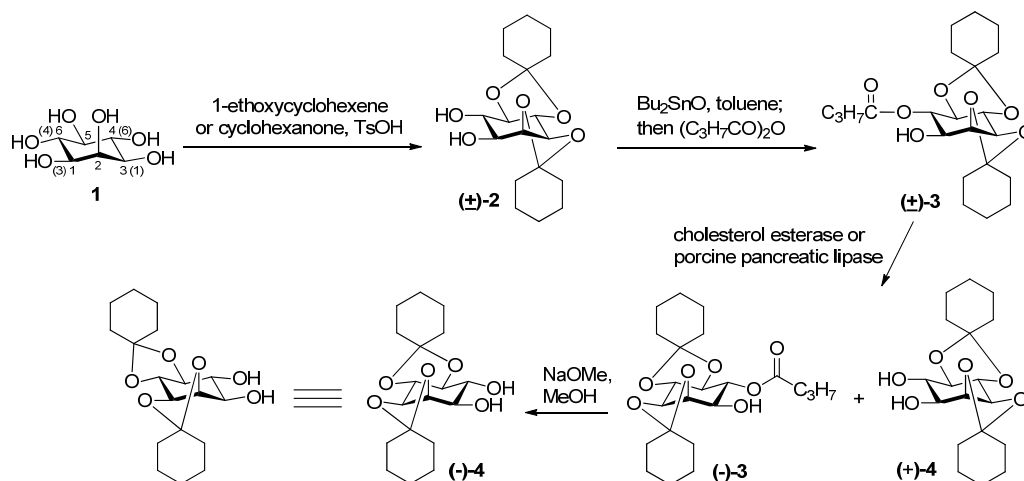


图 2 1,2-差异性保护的光学纯肌-肌醇衍生物(+)-4 和(-)-4 的化学酶法合成

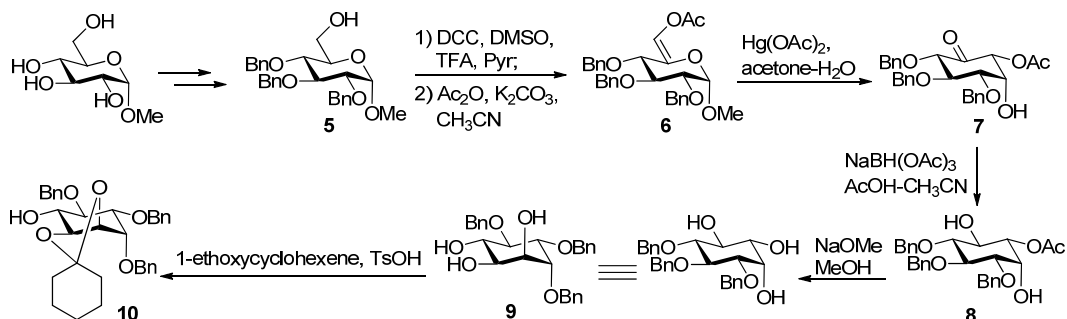


图 3 1,2-差异性保护的光学纯肌-肌醇衍生物 10 的化学合成

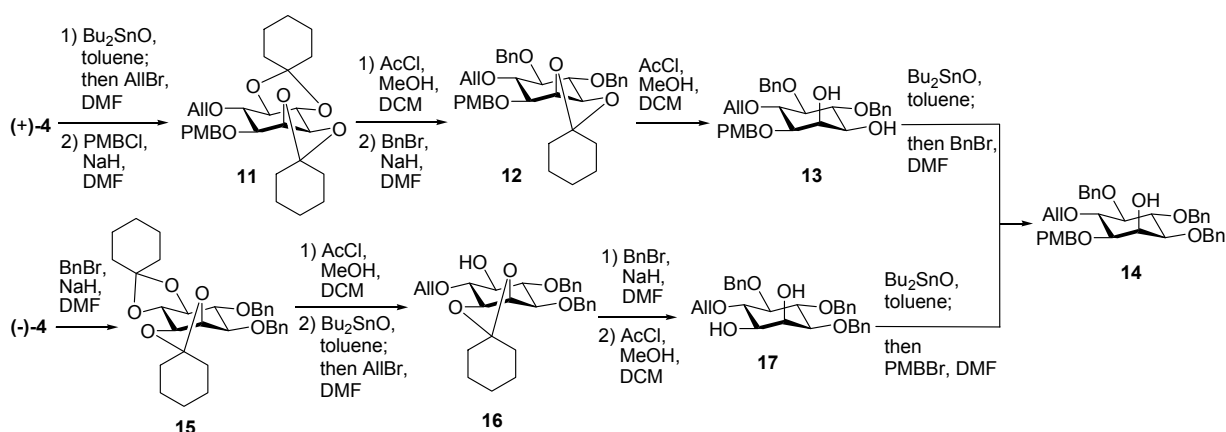


图4 1,2,6-差异性保护的纯光学肌-肌醇衍生物 14 的合成

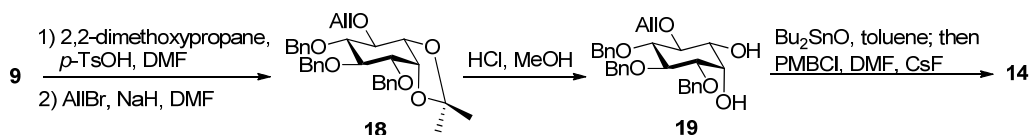


图5 光学纯肌-肌醇衍生物 14 的不对称合成

合物 14. 此方法的优点在于, 其适合于大量制备 1,2,6-差异性保护的肌-肌醇衍生物. 此外, Bertozzi 课题组<sup>[44]</sup>还以光学纯的二甲基-2,3-*O*-异亚丙基-D-酒石酸盐为起始原料, 发展了一种 1,2,6-差异性保护的肌-肌醇衍生物不对称合成方法.

## 2.2 天然 GPI 分子的经典合成策略

### 2.2.1 含非酰化肌-肌醇的 GPI 的合成

Ogawa 课题组<sup>[20, 21]</sup>在合成首个 GPI 分子时所采用的整体策略是首先组建 GPI 的糖基化肌醇骨架结构, 然后对其特定位置进行选择脱保护和衍生化, 最后实现肌醇的 1-位磷脂酰化并完全脱保护获得目标化合物. 后来的 GPI 合成大多采用相似的策略, 该合成策略分别被 Ley<sup>[22, 23]</sup>, Fraser-Reid<sup>[24, 25]</sup>, Schmidt<sup>[26, 27]</sup>, Seeberger<sup>[18, 28, 29]</sup>和 Nikolaev<sup>[30]</sup>等课题组成功地用于制备多个 GPI 分子. 一个典型的例子是, Seeberger 课题组<sup>[29]</sup>应用这一策略发展了一种相对通用的合成含非酰化肌醇 GPI 分子的方法, 该方法以图 6 所示的骨架结构为通用的全保护中间体, 其中  $R_1$ - $R_3$  可以是永久性保护基团, 或是与甘露糖-I 和 III 上乙酰丙酰基 (Lev5) 及三异丙基硅醚基 (TIPS) 互不干扰的特异性保护基团.

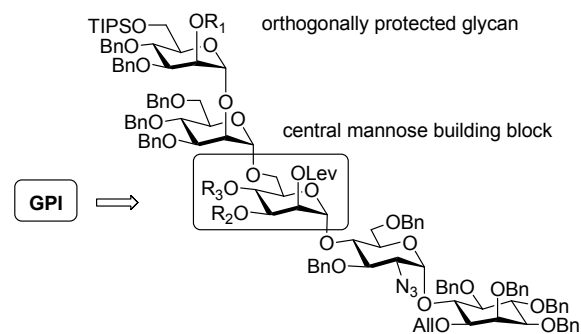
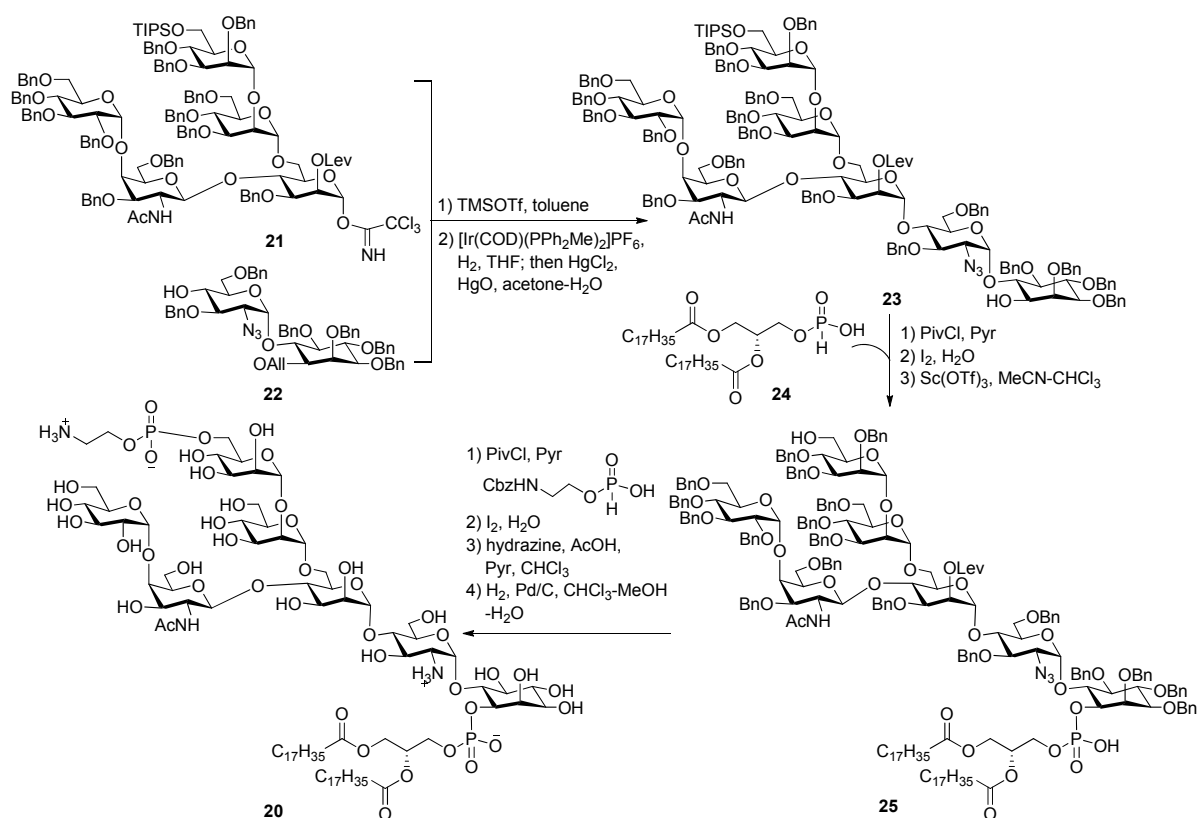


图6 一种合成含非酰化肌醇 GPI 分子的通用中间体结构

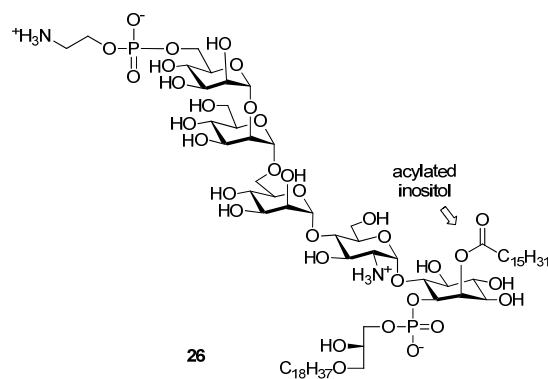
各种不同的糖基化方法和磷酸化方法被成功用于基于上述策略的 GPI 全合成, 而用于保护羟基的永久性保护基团一般是苄基. 以弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) GPI 分子 20 的合成为例 (图 7), 在获得五糖亚胺酯 21 作为糖供体和伪二糖 22 作为糖受体之后, 它们之间的偶联在三氟甲磺酸三甲基硅酯 (TMSOTf) 的作用下进行, 然后用  $[\text{Ir}(\text{COD})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$  作为催化剂选择性地脱除肌醇 1-位的烯丙基获得关键中间体 23, 新生成的羟基用化合物 24 进行磷脂酰化, 并用三氟甲磺酸铈  $[\text{Sc}(\text{OTf})_3]$  脱去 TIPS 基团形成中间体 25, 最后, 在糖链末端甘露糖-III 的 6-位引入磷酸乙醇胺链并氢解去除所有苄基保护基便获得目标 GPI 产物 20.

图7 弓形虫来源 GPI 分子 **20** 的合成

### 2.2.2 含 2-酰化肌醇的 GPI 的合成

GPI 分子中肌醇 2-位所连接的棕榈酸酯(图 8)对 GPI 的生物合成是必需的,但在 GPI 生物合成完成之后该酯链一般被脱除<sup>[1]</sup>,所以多数天然的 GPI 分子不含此酯链.虽然如此,人们还是发现了多个肌醇 2-位棕榈酰化的 GPI<sup>[4, 11]</sup>.除了其在生物合成中的重要作用外,肌醇 2-位棕榈酸酯的生物学功能并不十分清楚,但可以肯定的是,其使 GPI 对磷脂酶 C (phosphoinositide-specific phospholipase C, PI-PLC)产生抵抗力,使 GPI 不再被 PI-PLC 所识别和裂解<sup>[45, 46]</sup>.因此,含 2-棕榈酰化肌醇的 GPI 的全合成对深入探索此类化合物的生物合成、代谢及生物学功能具有重要意义.

本课题组<sup>[42]</sup>以人精子 CD52 抗原的 GPI 分子 **26** (图 8)为目标化合物,探索了含 2-棕榈酰化肌醇的 GPI 的化学全合成.研究发现,在肌醇 2-位引入长链酯之后,可能因为空间位阻增大和/或立体构象发生变化,最后的肌醇 1-位磷脂酰化产生副反应,从而无

图8 含 2-棕榈酰化肌醇的人精子 CD52 抗原 GPI 分子 **26** 的结构

法获得目标产物,因此,前述关于 GPI 合成的传统方法不适用.为了合成含有 2-棕榈酰化肌醇的 GPI 分子,我们发展了一种完全不同且更为收敛的合成策略(图 9).在组建了棕榈酰化的伪二糖 **29** 之后,我们首先以硝酸铵(CAN)将其 1-位脱保护并磷脂酰化获得关键中间体 **32**,而不是先延伸其糖链以形成核心骨架.

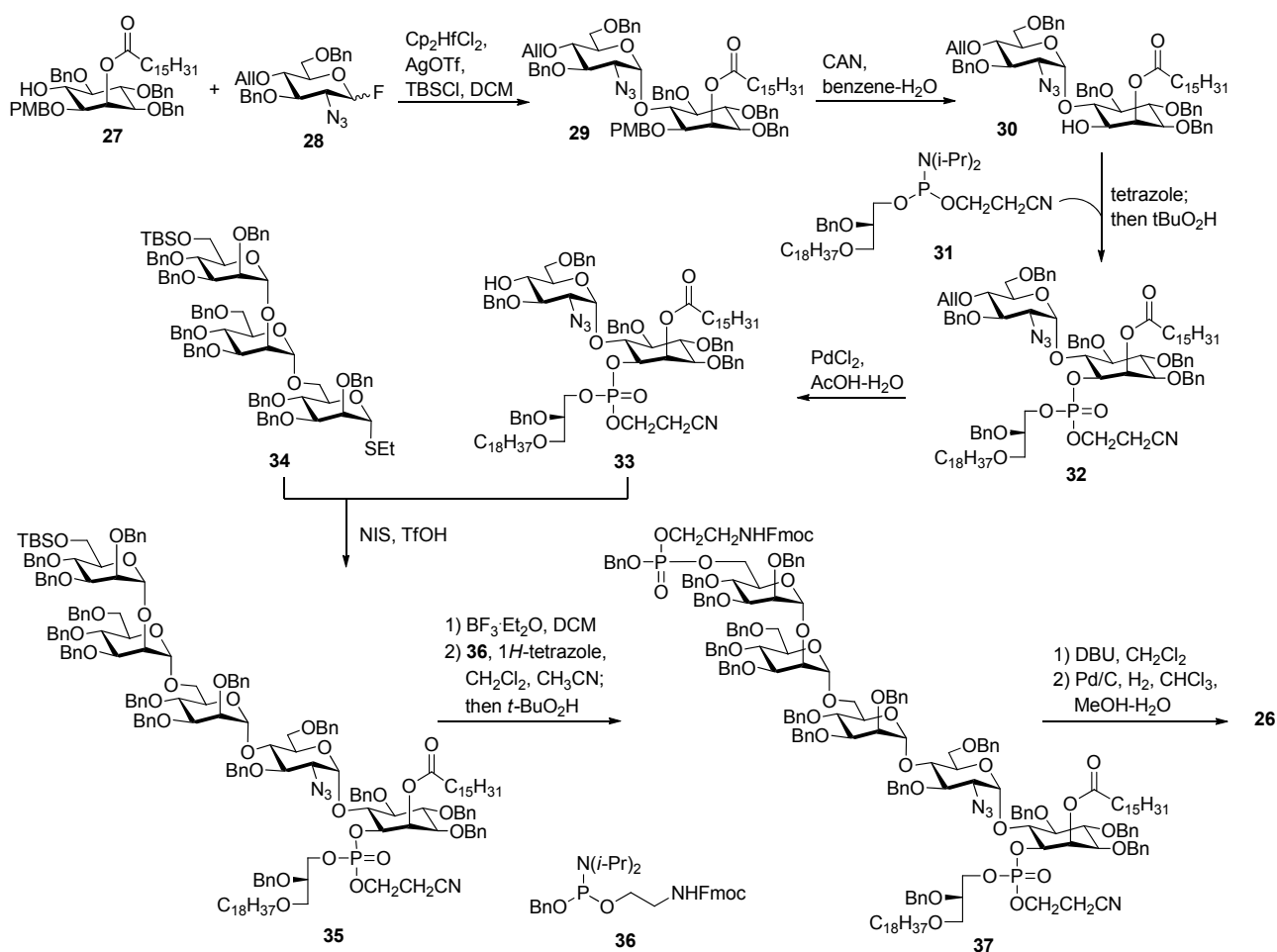


图9 人精子 CD52 抗原 GPI 分子 26 的全合成

实践证明, 伪二糖 **30** 的磷脂酰化反应很成功. 与此同时, 本课题组用传统方法制备了甘露三糖 **34**, 使其作为糖供体. 在 **32** 选择性地脱去烯丙基获得 **33** 后, 与供体 **34** 在 *N*-碘代丁二酰亚胺和三氟甲磺酸 (NIS/TfOH) 作用下偶联便可以迅速获得磷脂酰化的 GPI 核心结构 **35**. 随后, 以 BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O 脱除分子中的特丁基二甲基硅醚 (TBS) 基团, 并在新生成的伯醇上引入磷酸乙醇胺基获得全保护的化合物 **37**. 最后, 通过两步脱保护反应便获得目标 GPI 产物 **26**.

图 9 中高度收敛的合成路线显示, 通过化合物 **33** 与不同寡糖链的偶联可以快速制备各种不同的 GPI 分子和 GPI 衍生物. 因此, 该合成策略可被用于合成一系列 GPI 分子及其衍生物, 这些化合物被用于研究 GPI 与细菌毒素之间的相互作用<sup>[31, 47]</sup>.

### 2.3 以结构多样性为导向的复杂 GPI 的合成

上述几种 GPI 合成策略通常采用苄基作为糖和肌醇羟基的永久性保护基团. 苄基的使用有许多优点, 如其引入条件简便、对多数反应条件稳定、易于其他反应模块保护基的正交选择, 以及钯催化的氢解脱除条件温和等. 然而, 苄基的脱除条件虽然温和, 但其催化氢解反应却导致在 GPI 分子中引入许多重要的官能团, 如烯烃、炔烃、叠氮、硫醇和硫醚等变得非常困难. 这些基团的引入对于 GPI 的结构和功能研究至关重要, 但其易受还原条件的影响. 为了解决这一问题, Nikolaev 课题组<sup>[30]</sup>和本课题组<sup>[33, 48]</sup>通过选择不同的永久性保护基团发展了以 GPI 的结构多样性为导向的复杂 GPI 分子全合成策略.

### 2.3.1 含不饱和脂肪链的 GPI 的合成

Nikolaev 课题组<sup>[30]</sup>首先以苯甲酰基作为糖和肌醇羟基的永久性保护基合成了含有不饱和脂肪链的 *T. cruzi* GPI 分子(**38**和**39**, 图 10). 这种合成策略的弊端是其最后的完全脱保护反应产率较低, 仅 38%~40%. 这可能是因为在 NaOMe/MeOH 条件下脱除**40**和**41**中的苯甲酰基时, 连在分子中肌醇 1-位上的磷脂基团的酯链也会发生部分裂解, 从而影响产率.

为了克服上述合成策略中在完全脱保护过程中遇到的问题, Nikolaev 课题组<sup>[30]</sup>以乙缩醛和硅烷基作为羟基的保护基团合成 GPI (图 11), 使总产率得到显

著提高. 但是, 在最后的完全脱保护阶段, 以  $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$  脱除中间体**42**中的 TBS 时, 反应非常耗时, 大约需要 18 d 才能完成.

此外, 本课题组<sup>[33]</sup>发展了一种以对甲氧苄基(PMB)替代苄基作为糖和肌醇羟基的永久性保护基团的 GPI 合成策略. PMB 在弱酸性条件下, 如 5%~10%的三氟乙酸(TFA)溶液, 或在温和的氧化条件下可选择性地脱除, 而不饱和脂肪链以及前述的一些重要官能团在此条件下不受影响. 该策略首先用于合成含有两个不饱和脂肪酸链的 GPI 分子**43**(图 12)<sup>[33]</sup>. 此后, 该策略又被成功地用于合成结构更复杂和含有敏感的多不饱和脂肪链的人淋巴细胞 CD52

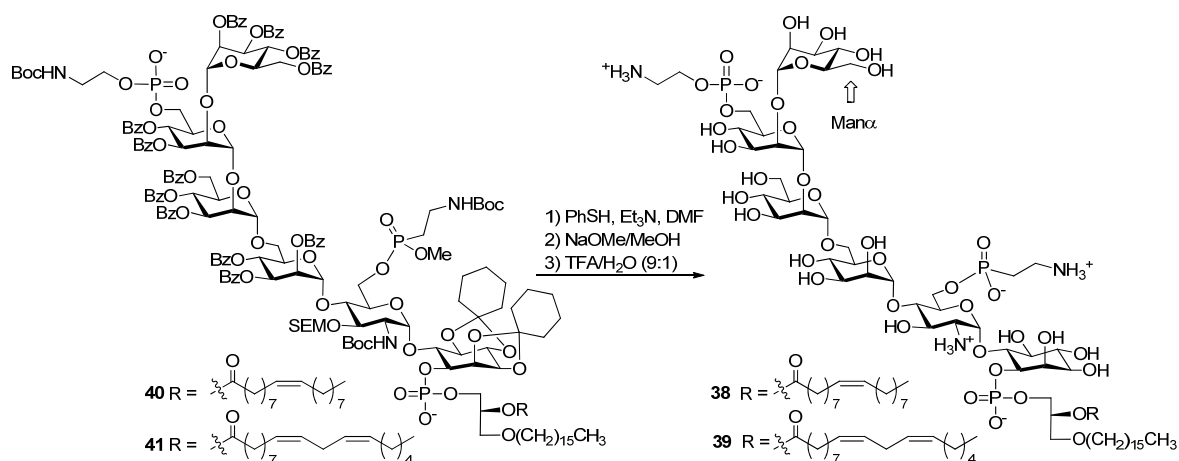


图 10 *T. cruzi* 源的含不饱和脂肪链的 GPI 分子**38**和**39**的合成

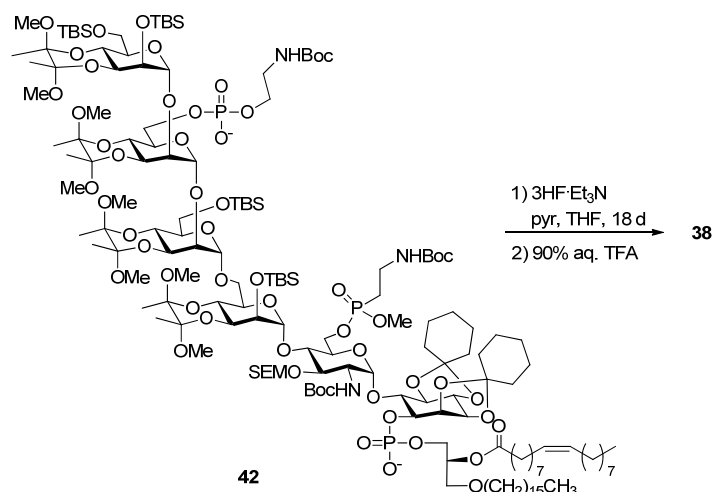


图 11 以乙缩醛和硅烷基作为羟基的保护基团合成 GPI 分子**38**的关键中间体

抗原 GPI 分子 **44** (图 12)<sup>[48]</sup>.

以 GPI 分子 **43** 为例, 基于 PMB 的合成策略如下 (图 13): 首先, 我们发展了一种用 PMB 保护的纯肌-肌醇衍生物 **45** 的合成路线, 并通过 **45** 合成制备了磷脂酰化的伪二糖 **46** 作为糖基受体. 与此同时, 从甘露糖开始, 制备了用 PMB 保护的甘露三糖亚胺酯 **47**, 并作为糖基供体. 研究发现, 以亚胺酯作为供体的糖基化反应最适合于以 PMB 作为永久性保护基团的寡糖合成. 糖基供体 **47** 在 TMSOTf 的催化下可

与糖基受体 **46** 成功偶联获得 GPI 的骨架结构, 随后将其糖链末端甘露糖 6-位羟基上的 TBS 基团脱除, 再通过 **48** 引入磷酸乙醇胺链桥便可得到全保护的靶分子 **49**. 最后, 用一釜三步反应的方法脱除 **49** 中所有的保护基团, 便可获得目标产物 **43**. 这 3 步反应包括叠氮还原形成伯胺基, 温和碱性条件下脱除保护氨基的苄氧羰基(Fmoc)和磷酸基保护基团, 以及用 10% TFA 脱除所有 PMB 基团实现. 该脱保护方法反应快、产率高(3 步共用时 4 h, 总产率为 81%).

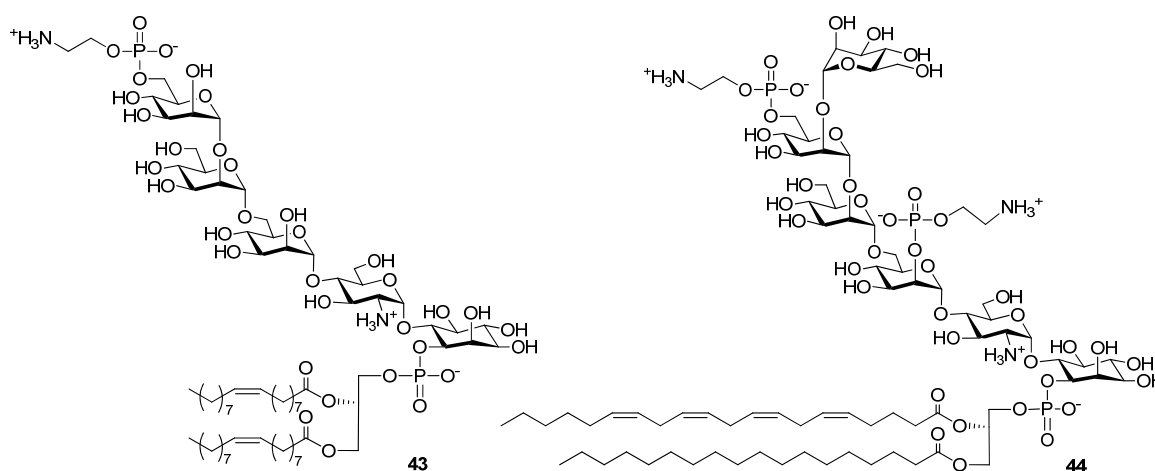


图 12 含两个不饱和脂肪链的 GPI 分子 **43** 和人淋巴细胞 CD52 抗原 GPI 分子 **44** 的结构

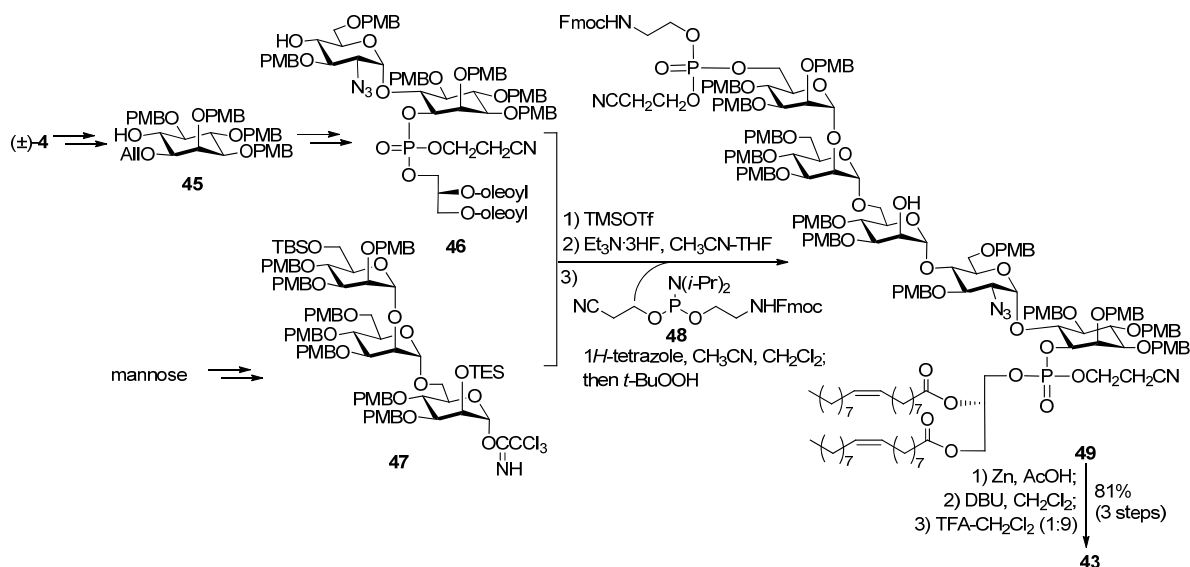


图 13 GPI 分子 **43** 的合成路线



### 2.3.2 用于点击化学的 GPI 衍生物的合成

自 Sharpless 课题组<sup>[49]</sup>于 2001 年提出点击化学的概念以来, 该技术因可以在相对温和的条件下很方便地偶联不同的分子, 已被广泛应用于快速合成各种新化合物集合, 以及研究各种各样的生物学问题. 在点击化学中, 炔与叠氮化合物之间的 1,3-偶极环加成反应(又称为 Huisgen 反应), 因其选择性好、反应条件温和及生物适用性强而得到特别广泛的应用<sup>[50-52]</sup>. 为了在 GPI 研究中充分利用点击化学, 快速获得结构多样和可视化的 GPI 探针, 以便更加深入地研究 GPI 以及 GPI 锚定分子的生物学功能和其在活细胞表面的生物学行为, 本课题组设计并合成了连有炔基或叠氮基团的 GPI 衍生物, 如化合物 **50** 和 **51**(图 14)<sup>[32]</sup>, 以便实现 GPI 的点击化学反应. 为了尽

量降低衍生化对 GPI 生物学功能可能造成的影响, 我们设计在甘露糖-I 的 2-位引进炔基或叠氮基团. 因为多数天然 GPI 分子在此位有功能团, 因此希望在此引入一个位阻较小的基团, 使其对结构和功能不至产生太大影响.

由于目标化合物 **50** 和 **51** 的分子中含有对氢解敏感的炔基或叠氮基团, 因此, 在其合成中采用了之前所讨论的以 PMB 作为羟基永久性保护基团的 GPI 合成策略. 如图 15 所示, 在 **50** 的合成中, 首先通过已经确立的方法制备获得含有可用于点击化学的炔丙基基团的甘露三糖亚胺酯 **52** 和磷脂酰化的伪二糖 **53**, 二者在 TMSOTf 作用下偶联便可立体选择性地生成  $\alpha$  构型的关键中间体 **54**, 随后脱除甘露糖-III 中 6-位的 TBS 保护基团, 并对新生成的伯醇进行磷酰化便可

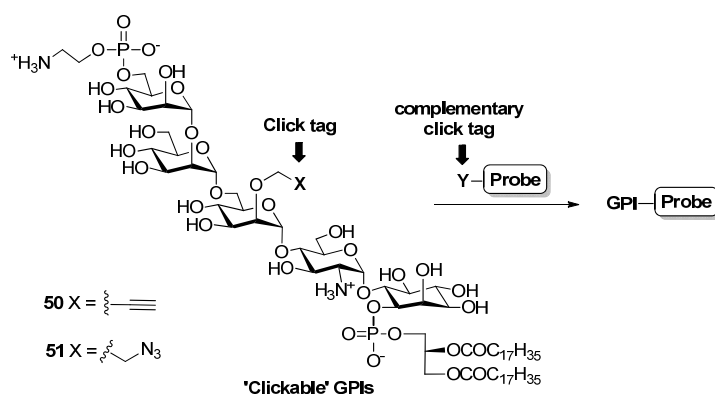


图 14 GPI 探针合成示意图

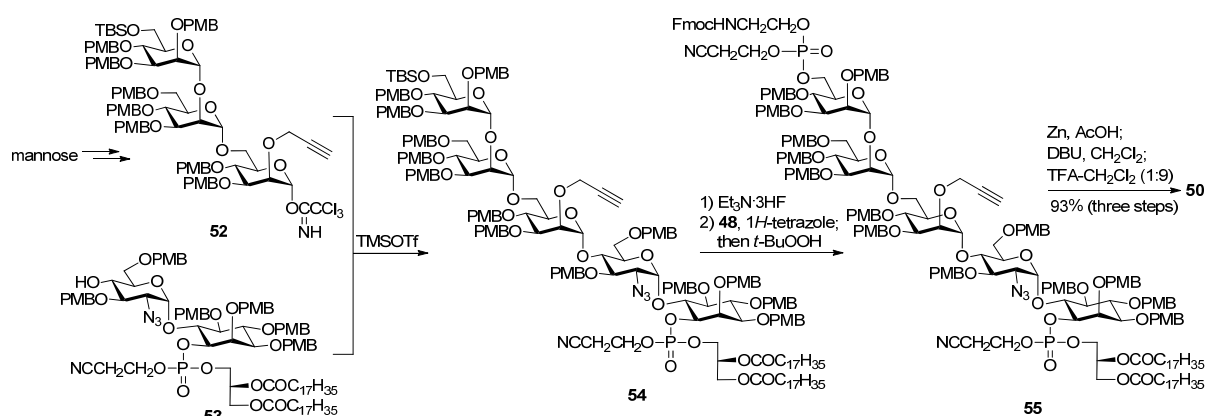


图 15 含炔基的 GPI 衍生物 **50** 的合成

获得 GPI 骨架分子 **55**, 最后通过一釜三步的脱保护反应形成目标化合物 **50**<sup>[32]</sup>.

在合成化合物 **51** 时(图 16), 由于其分子中含有叠氮基团, 以叠氮基团作为氨基葡萄糖中氨基的永久保护基团的 GPI 合成策略无法使用. 所以, 在合成伪二糖 **56** 之后, 首先将其分子中的叠氮基团还原并用 Fmoc 基团保护得到 **57**, 随之将肌醇的 1-位磷脂酰化并脱去氨基葡萄糖 4-位的 TBS 得到关键中间体 **58**. 然后按照与图 15 相似的合成策略, 将磷脂酰化的伪二糖 **58** 与含有叠氮基团的甘露三糖亚胺酯 **59** 在 TMSOTf 作用下偶联便可立体选择性地生成  $\alpha$  构型的关键中间体 **60**. 随后脱除 **60** 中甘露糖-III 6-位的 TBS 保护基团, 并进行磷酰化得到 **61**. 最后通过一釜二步反应全脱保护便可获得目标化合物 **51**<sup>[32]</sup>.

在得到衍生化的 GPI 分子 **50** 和 **51** 后, 进一步的实验证明, 其可以通过点击化学的方法与荧光探针或者亲和分子生物素(biotin)进行有效的偶联(图 17), 获得相应的荧光和生物素标记的分子 **63** 和 **65**<sup>[32]</sup>. **50** 与含有叠氮基团的荧光探针 Fluor 488 (**62**)之间的偶联反应是在铜催化下经[3+2]环加成反应完成的, 而 **51** 与含有反应活性较高的环辛炔基的 BARAC-biotin (**64**)之间的反应则不需要铜催化, 反应可以在室温条件下自发进行, 特别适合生物学的需要<sup>[52]</sup>.

### 3 GPI 锚定肽、糖肽和蛋白的合成

相比于 GPI 分子及其类似物而言, GPI 锚定肽、糖肽和蛋白的结构要复杂得多, 因此其合成难度也大大增加. 由于自然界中所有的 GPI 锚定蛋白和糖蛋白都是以其多肽链的 C-端通过酰胺键的方式连接在 GPI 保守核心结构中寡糖链末端甘露糖-III 的 6-位磷酸乙醇胺基团上, 所以, 一种可以普遍适用的 GPI 锚定肽、糖肽和蛋白的合成策略是, 在分别制备 GPI 分子和肽、糖肽或蛋白分子之后, 将它们用一种区域特异性的偶联反应连接, 获得目标化合物. 目前, 虽然有关 GPI 锚定肽、糖肽和蛋白合成方面的文献报道还相对较少, 但用于 GPI 与肽、糖肽或蛋白分子偶联的方法不少, 包括化学反应和酶催化反应. 下面将根据 GPI 与肽进行偶联时所使用的反应方法的不同, 对 GPI 锚定肽、糖肽和蛋白的合成策略进行简要的综述.

#### 3.1 GPI 锚定肽和糖肽的化学合成

GPI 锚定肽和糖肽化学合成的基本策略如图 18 所示. 在合成中, 为了实现 GPI 与肽或糖肽之间的区域特异性偶联, 除了涉及偶联反应的 GPI 中氨基和肽链的 C-末端羧基之外, 化学合成的 GPI 和肽、糖肽分子应当是全保护的, 这样, GPI 和肽及糖肽可以通过

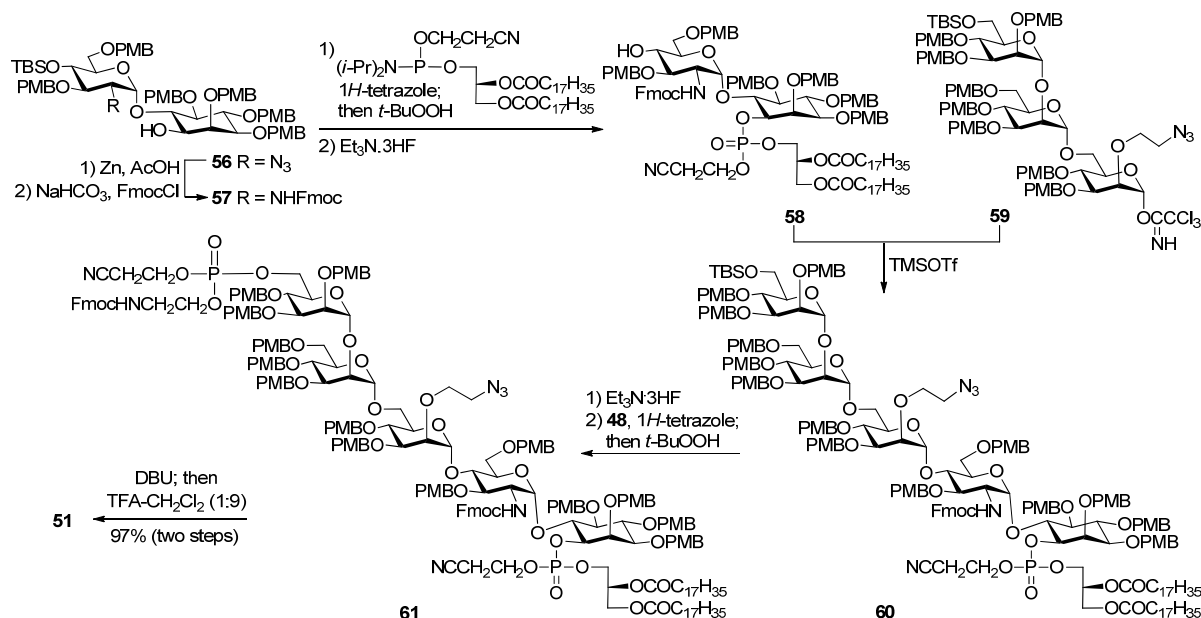


图 16 含叠氮基团的 GPI 衍生物 **51** 的合成

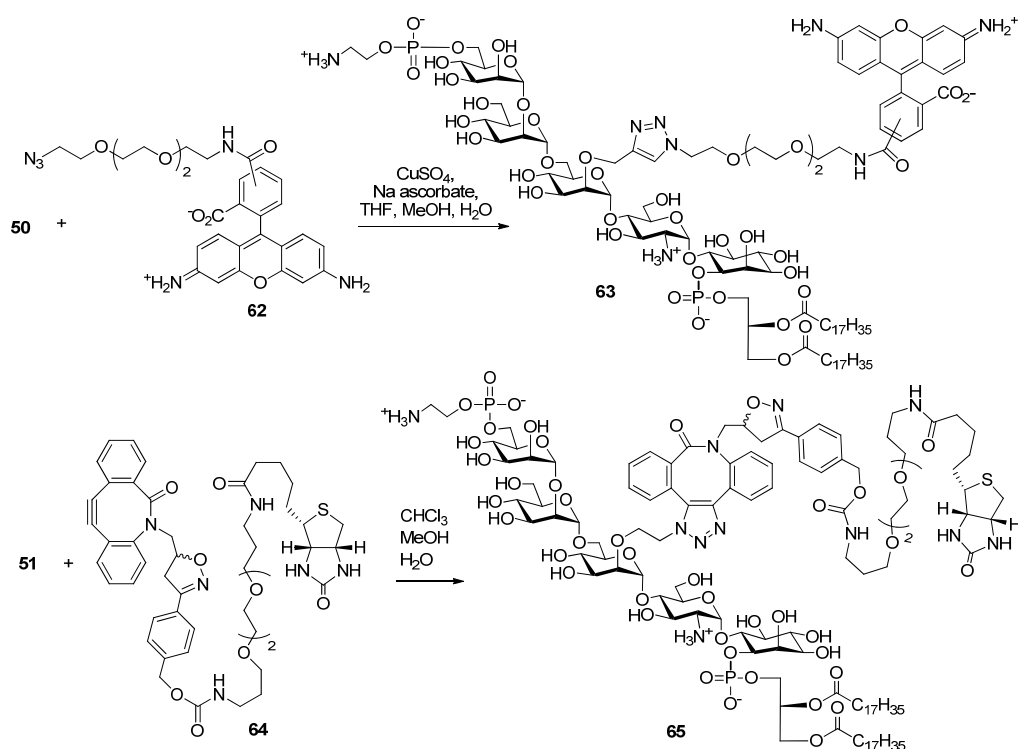


图 17 GPI 衍生物 **50** 和 **51** 通过点击化学与荧光探针和亲和探针的偶联反应

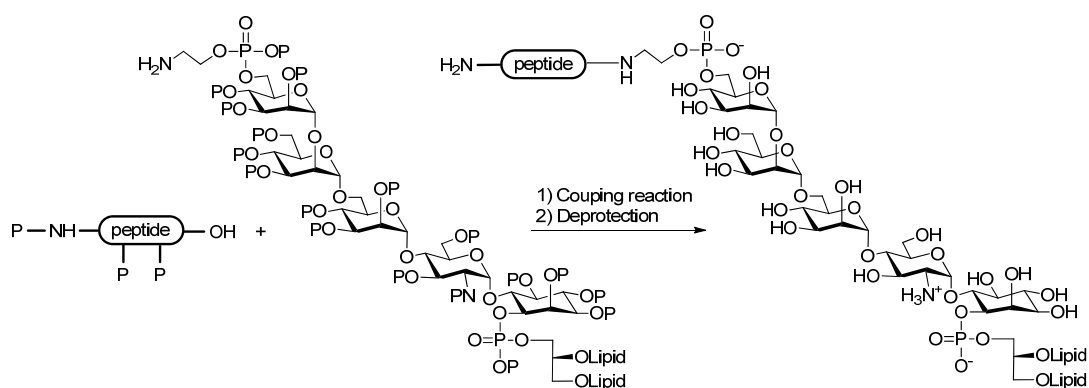


图 18 GPI 锚定肽和糖肽的化学合成策略示意图

简单的缩合反应实现偶联。当然，该策略最后将涉及脱保护步骤。

本课题组利用上述策略(图 18)实现了首个 GPI-肽和 GPI-糖肽复合物的全合成<sup>[53, 54]</sup>。在人精子 CD52 抗原的天然骨架结构 **66** 的合成中(图 19)，首先以对酸高度敏感的 2-氯三苯甲基树脂为载体，采用固相肽合成方法实现全保护糖肽的组装，然后用 90% 的 HOAc 溶液将糖肽从固相载体上切下，获得肽链 C-末端暴露的糖肽 **69**。在此切除条件下，糖苷键以及

糖和氨基酸侧链的保护基团均不受影响。然后，**69** 与全合成的 GPI 分子 **70** 以 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)和 1-羟基苯并三氮唑(HOBt)为缩合剂，通过简单的羧基-氨基缩合反应进行区域特异性偶联，所获得的产物再经两步脱保护反应便可获得 GPI 锚定糖肽 **66**。

### 3.2 GPI 锚定蛋白的“天然化学连接”合成方法

虽然 GPI-糖肽复合物 **66** 等的合成证明，GPI

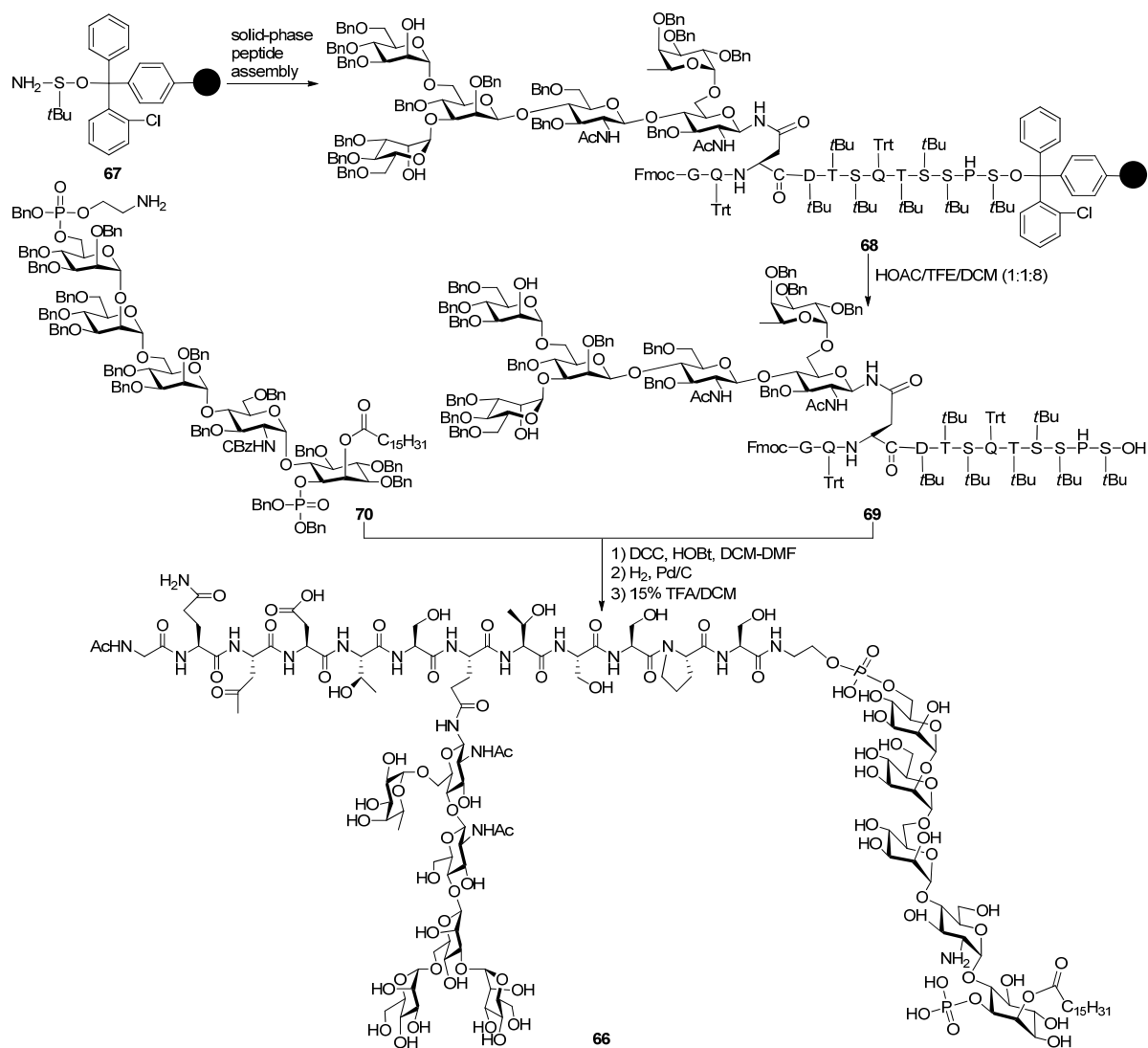


图 19 人精子 CD52 抗原的骨架结构 **66** 的全合成

锚定肽和糖肽完全可以通过化学全合成得以实现, 但是, 要想用此策略合成 GPI 锚定蛋白和糖蛋白将会十分困难, 至少目前无法合成除了 C-末端之外全保护的大分子蛋白和糖蛋白, 此外, 对肽链和糖链的脱保护也是一个难题. 因此, 制备 GPI 锚定蛋白和糖蛋白需要运用完全不同的和更接近于此类化合物自然合成方法的偶联技术, 如多肽的天然化学偶联(native chemical ligation, NCL)或酶催化偶联等.

NCL<sup>[55-58]</sup>可以将两个多肽片段进行非常有效的, 以及区域特异性的偶联, 合成长序列的多肽或蛋白. 如图 20 所示, 该方法要求反应所用的两个多肽片段中一个多肽片段(**71**)的 C-端为羧酸硫酯, 而另一个多

肽片段(**72**)的 N-端是半胱氨酸. 此方法利用硫酯与半胱氨酸的巯基进行特异性偶联反应, 所形成的硫酯 **73** 再进行分子内的重排反应生成肽键, 获得目标化合物 **74**. 该偶联方法具有一系列优点, 如不需要对多肽的侧链功能基团进行保护, 偶联反应可以在含有硫醇的水溶液中进行等, 此方法已经成功地用于许多复杂多肽和蛋白质的合成中.

Nakahara 课题组<sup>[59]</sup>首先探讨了 GPI 与多肽通过 NCL 进行偶联的反应. 如图 21 所示, 他们首先将 GPI 的甘露二糖片断 **75** 中的氨基与半胱氨酸的五氟苯基 (Pfp) 酯 **76** 在 HOBT 作用下反应进行偶联, 然后脱除氨基酸中的 Fmoc 基团得到连有半胱氨酸的 GPI 衍生

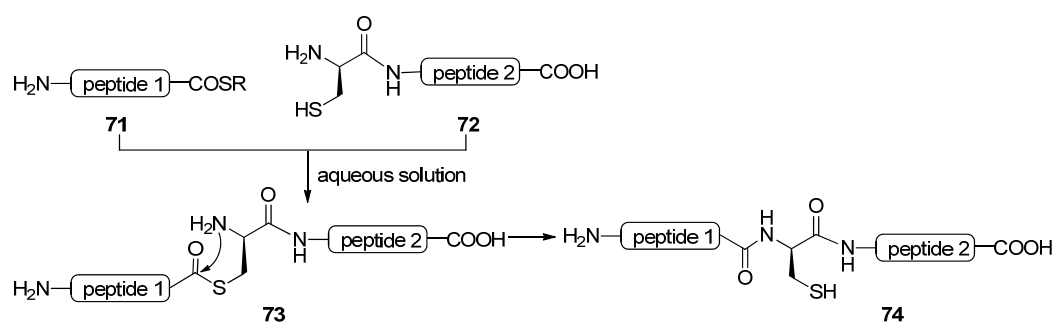


图 20 多肽之间通过 NCL 方法偶联合成蛋白质

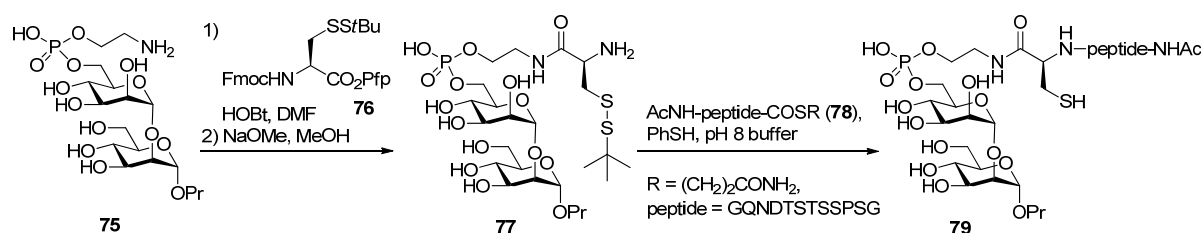


图 21 多肽与 GPI 衍生物通过 NCL 方法偶联获得 GPI 锚定多肽 79 的合成

物 77。最后, 77 在含有苯硫醇的, pH 8 的缓冲溶液中与 C-末端为硫酯的十二肽 78 成功地进行天然化学连接反应, 以 62% 的产率获得目标产物 79。

NCL 方法也被 Bertozzi 课题组<sup>[60]</sup>和 Seeberger 课题组<sup>[61]</sup>成功地用于实现 GPI 类似物与大分子蛋白的偶联, 获得 GPI 锚定蛋白。以 Seeberger 课题组的合成为例(图 22), 首先在 GPI 寡糖链末端的磷酸乙醇胺基团上引入一个半胱氨酸衍生物获得化合物 80, 然后将 80 与 C-末端形成羧酸硫酯的重组朊病毒蛋白 81 反应, 通过 NCL 方法使二者偶联得到 GPI 锚定的朊病毒蛋白 82。这些研究报道充分说明, NCL 方法有可能被有效地用于合成 GPI 锚定的蛋白。

### 3.3 GPI 锚定糖肽的酶催化合成

虽然 NCL 偶联方法被证明可以用于合成 GPI 锚定蛋白, 但是, 该方法仍然存在一定的弊端: (1) 基于 NCL 偶联方法的合成策略需要 GPI 连有一个半胱氨酸, 该类 GPI 衍生物的合成具有一定挑战性, 更重要的是目前还没有发现天然 GPI 锚定蛋白中肽链 C-末端含有半胱氨酸; (2) NCL 偶联反应所用的蛋白需要在 C-末端形成硫酯, 蛋白质的此类衍生物虽然可以实现, 但其制备有一定困难。这些弊端促使了其他

更有效的 GPI 锚定蛋白合成策略的发展, 其中仿生合成方法备受青睐。

GPI 与蛋白质的链接是翻译后修饰现象, GPI 的生物合成与蛋白质的生物合成是两个独立的过程, 二者各自合成完成之后, 在 GPI 转氨酶(GPI-transamidase, GPI-T)的酶催化作用下偶联, 形成 GPI 锚定蛋白。GPI-T 可以识别与 GPI 发生偶联的目标蛋白质 C-末端的 GPI 链接信号, 并与其反应形成以羧酸硫酯方式连接的蛋白-GPI-T 偶联物, 最后将蛋白转移到 GPI 上去<sup>[62-64]</sup>。GPI-T 应当是实现 GPI 锚定蛋白体外酶促合成的理想酶分子。然而, GPI-T 的结构极其复杂, 其重组表达十分困难, 因此, 目前还无法实际应用于合成研究中。为了解决这一问题, 本课题组发展了一种采用结构简单但功能和作用机理与 GPI-T 十分相似的细菌分选酶(sortase)作为催化酶的 GPI 锚定蛋白合成方法<sup>[65]</sup>。

Sortase 是由细菌表达的一类转肽酶, 其主要功能是将某些细菌表面蛋白与细菌细胞壁肽聚糖偶联, 从而将蛋白镶嵌在细胞的表面。本课题组在合成中所使用的酶是 sortase A (Srt A), 其由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)表达。如图 23 所示, Srt A 可以识别处于目标蛋白 C-末端的一个特定的五肽序

列(sorting signal), 即 LPXTG (X 代表任意一种氨基酸), 酶活性中心的半胱氨酸侧链上的巯基可以对 T 和 G 之间的肽键进行亲核进攻, 形成以硫酯键连接的蛋白-Srt A 复合物, 该复合物可与细胞壁上肽聚糖侧链 N-末端甘氨酸反应, 将目标蛋白锚定于细胞壁肽聚糖上<sup>[66-68]</sup>. Srt A 已经被证明可以接受多种不同的底物, 因此其可用于将多肽或蛋白与多肽<sup>[69, 70]</sup>、糖、核酸或脂质连接<sup>[71-73]</sup>, 以及将蛋白锚定于活细胞的表面<sup>[74, 75]</sup>.

在将 Srt A 应用于 GPI 锚定蛋白的合成研究时, 本课题组首先证明了, 在 GPI 类似物中的保守磷酸乙醇胺桥上引入 1 个或 2 个甘氨酸基团(如化合物 **83** 和 **84**, 图 24)后, 可以使 GPI 类似物成为被 Srt A 接受的底物, 使其以很高的产率(> 95%)与多肽偶联形成 GPI-多肽缀合物<sup>[76]</sup>. 随后又表明, Srt A 可以接受结构更为复杂的 GPI 类似物(如 **86**), 以催化其与多肽或小的合成蛋白之间偶联<sup>[77]</sup>(图 24). 同时还发现, 对于 Srt A 的多肽底物, 酶所识别的 LPXTG 五肽序列应

当处于接近 C-末端的位置, 而不能直接暴露于 C-末端.

本课题组还用 Srt A 催化 GPI 衍生物与糖肽之间的偶联反应获得 GPI-糖肽缀合物<sup>[78]</sup>(图 25). 该反应的糖肽底物 **88** 含有 3 个糖链, 其中 1 个糖链处于紧接于 LPXTG 五肽序列的位置, 所以, 该底物的立体位阻相对较大. 此外, 偶联产物 **89** 在其 N-末端脱保护后也可以成为 Srt A 的底物, 其糖肽链可以得到进一步延伸形成非常复杂的 GPI-糖肽缀合物 **90**. 这些结果说明, 作为 Srt A 的底物, GPI 类似物以及多肽分子的立体位阻对 Srt A 催化的转肽反应影响并不大, 因此, 该反应应当具有合成结构更为复杂的 GPI 锚定蛋白和糖蛋白的巨大潜力.

此外, 本课题组还用 Srt A 实现了多肽或糖肽的环化反应, 获得了大环多肽或糖肽产物<sup>[79]</sup>, 以及蛋白质与甘氨酸修饰的脂质体之间的特异性偶联<sup>[80]</sup>. 由此可见, Srt A 可以在合成化学以及化学生物学等领域具有广泛的用途.

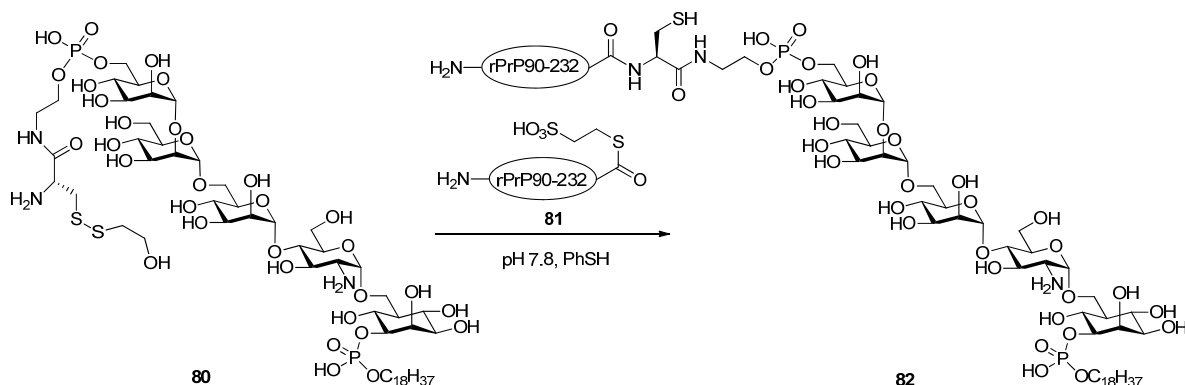


图 22 采用 NCL 方法合成 GPI 锚定朊病毒蛋白 **82**

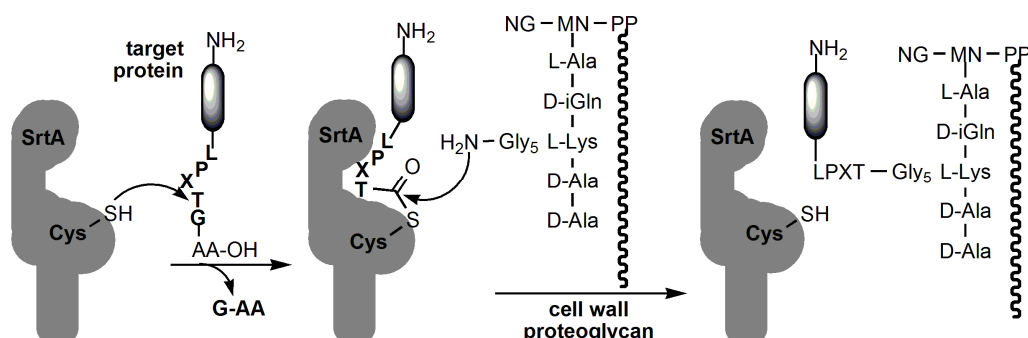


图 23 由 Srt A 催化的蛋白-肽聚糖偶联反应示意图

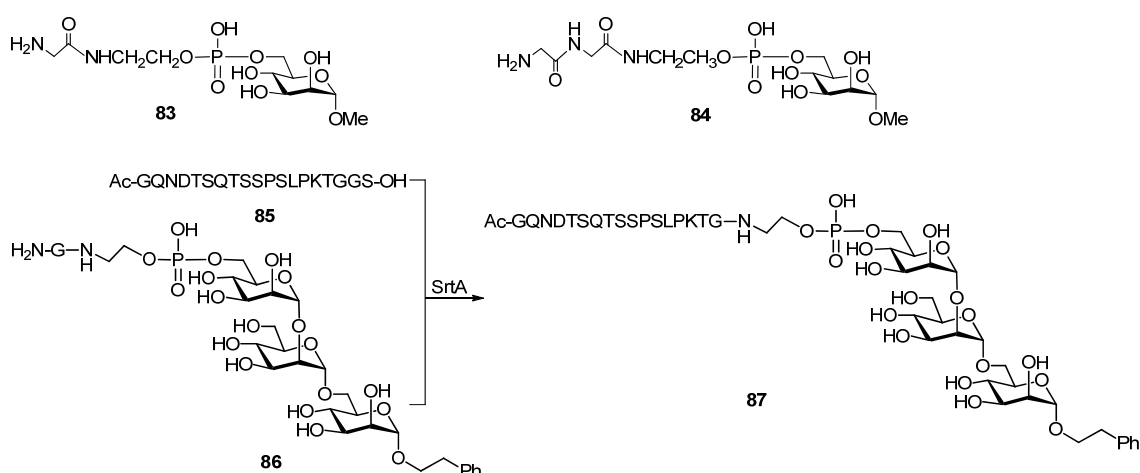


图 24 被 Srt A 接受为反应底物的 GPI 类似物结构及其与多肽的酶催化偶联反应

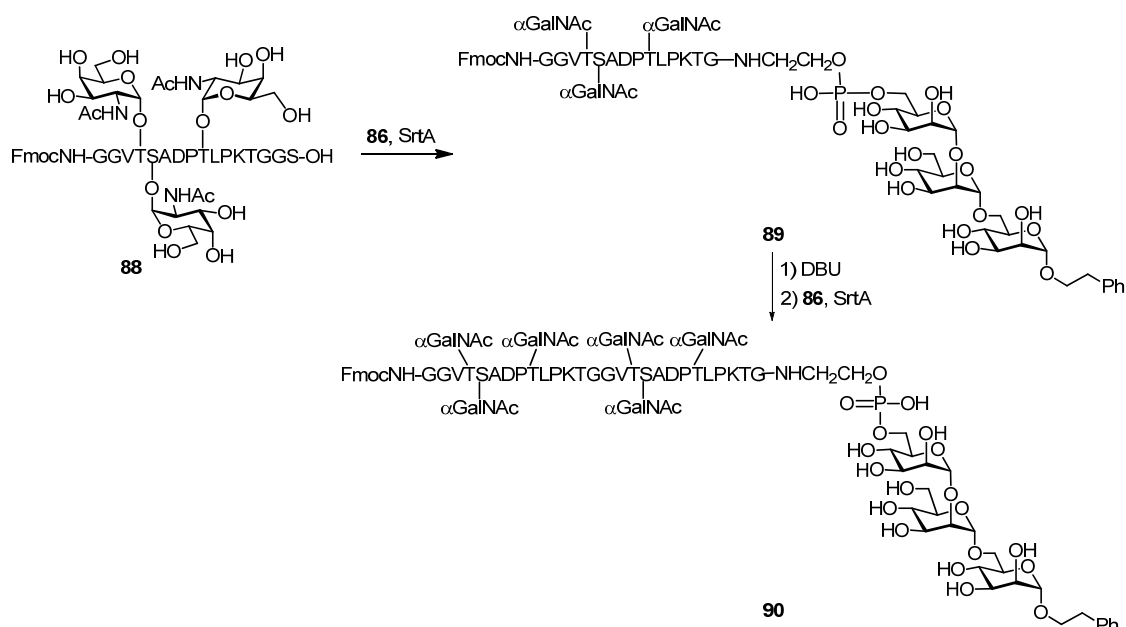


图 25 Srt A 催化的 GPI-糖肽缀合物 90 的合成

## 4 结论与展望

自 1991 年 Ogawa 课题组首次完成对 GPI 分子的化学合成至今, 糖化学家们已经实现了多种生物或组织来源的、不同结构的 GPI 分子的全合成。简言之, 近年来此领域所取得的重要进展包括: (1) 发展了收敛的 GPI 合成策略, 其可以帮助实现各种天然 GPI 分子的合成; (2) 发展了以 PMB 为糖和肌醇羟基的永久性保护基团的合成策略, 其可以帮助实现含有不

饱和脂肪酸链或其他官能团的天然 GPI 分子的合成; (3) 以 PMB 作为糖和肌醇羟基永久性保护基团的合成策略可以帮助实现含有各种重要官能团的 GPI 衍生物, 这些化合物使得在 GPI 分子内引入可视化的分子探针成为可能, 从而为深入研究 GPI 锚定分子在细胞膜表面的生物学行为, 以及 GPI 相关分子的生物学功能和构效关系等奠定了坚实基础; (4) 发展了以传统的化学全合成、“天然化学连接”反应和 Sort A 催化转肽反应为基础的 GPI-多肽、糖肽和蛋白缀合物

的合成方法, 这为实现具有生物学活性的 GPI 锚定蛋白或糖蛋白的合成提供了较好的思路。

虽然 GPI 及其锚定分子的合成研究已经取得了重要进展, 但该领域目前仍然面临着巨大的挑战, 仍无法满足日益增多的有关 GPI 结构和生物功能研究的需求。因此, 有必要发展、建立能大大缩短反应步骤的 GPI 合成策略, 以便能够快速、大量地制备各种结构类型的 GPI 分子, 实现 GPI 分子的结构多样性,

这对阐明此类化合物的构效关系至关重要; 更为重要的是, 发展、建立切实有效的 GPI 锚定蛋白和糖蛋白分子的合成方法, 以获得结构明确、组成单一的相关分子, 为深入探索细胞膜表面 GPI 锚定蛋白和糖蛋白的各种生物学功能以及发现新的靶标和抗原分子提供物质基础。在此基础上, 有关 GPI 和 GPI 锚定分子的基础研究, 以及此类物质在医药领域的应用研究步伐必将得到快速推进。

**致谢** 本工作得到“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09502001-005)、国家高技术研究发展计划(“863”计划)主题项目(2012AA021500)、美国国立卫生研究院(1R01GM090270), 以及美国国家科学基金委(CHE-1053848, CHE-0715275, CHE-0407144)资助, 特此一并致谢。

## 参考文献

- 1 Englund PT. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 121–138
- 2 Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25: 409–417
- 3 Paulick MG, Bertozzi CR. The glycosylphosphatidylinositol anchor: A complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, 2008, 47: 6991–7000
- 4 Ferguson MA, Williams AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem*, 1988, 57: 285–320
- 5 Ferguson MA. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci*, 1999, 112: 2799–2809
- 6 Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: Constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng*, 1998, 11: 1155–1161
- 7 Ferguson MA, Homans SW, Dwek RA, Rademacher TW. Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science*, 1988, 239: 753–759
- 8 Homans SW, Ferguson MA, Dwek RA, Rademacher TW, Anand R, Williams AF. Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature*, 1988, 333: 269–272
- 9 Kinoshita T, Fujita M, Maeda Y. Biosynthesis, remodelling and functions of mammalian GPI-anchored proteins: Recent progress. *J Biochem*, 2008, 144: 287–294
- 10 Udenfriend S, Kodukula K. How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem*, 1995, 64: 563–591
- 11 Roberts WL, Myher JJ, Kuksis A, Low MG, Rosenberry TL. Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J Biol Chem*, 1988, 263: 18766–18775
- 12 Schroter S, Derr P, Conrath HS, Nitz M, Hale G, Kirchhoff C. Male-specific modification of human CD52. *J Biol Chem*, 1999, 274: 29862–29873
- 13 Fujita M, Jigami Y. Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1780: 410–420
- 14 Tsai YH, Liu X, Seeberger PH. Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51: 11438–11456
- 15 Rudd PM, Morgan BP, Wormald MR, Harvey DJ, van den Berg CW, Davis SJ, Ferguson MA, Dwek RA. Roles for glycosylation in the anti-inflammatory molecule CD59. *Biochem Soc Trans*, 1997, 25: 1177–1184
- 16 Hwa KY. Glycosyl phosphatidylinositol-linked glycoconjugates: Structure, biosynthesis and function. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 491:



207–214

- 17 Thomas JR, Dwek RA, Rademacher TW. Structure, biosynthesis, and function of glycosylphosphatidylinositols. *Biochemistry*, 1990, 29: 5413–5422
- 18 Schofield L, Hewitt MC, Evans K, Siomos MA, Seeberger PH. Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature*, 2002, 418: 785–789
- 19 Kamena F, Tamborrini M, Liu X, Kwon YU, Thompson F, Pluschke G, Seeberger PH. Synthetic GPI array to study antitoxic malaria response. *Nat Chem Biol*, 2008, 4: 238–240
- 20 Murakata C, Ogawa T. A total synthesis of gpi anchor of *Trypanosoma brucei*. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32: 671–674
- 21 Murakata C, Ogawa T. Synthetic studies on glycosylphosphatidylinositol anchor: A highly efficient synthesis of glycosylphosphatidylinositol through H-phosphonate approach. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32: 101–104
- 22 Baeschlin DK, Chaperon AR, Charbonneau V, Green LG, Ley SV, Lucking U, Walther E. Rapid assembly of oligosaccharides: Total synthesis of a glycosylphosphatidylinositol anchor of *Trypanosoma brucei*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1998, 37: 3423–3428
- 23 Baeschlin DK, Chaperon AR, Green LG, Hahn MG, Ince SJ, Ley SV. 1,2-Diacetals in synthesis: Total synthesis of a glycosylphosphatidylinositol anchor of *Trypanosoma brucei*. *Chemistry*, 2000, 6: 172–186
- 24 Lu J, Jayaprakash KN, Fraser-Reid B. First synthesis of a malarial prototype: A fully lipidated and phosphorylated GPI membrane anchor. *Tetrahedron Lett*, 2004, 45: 879–882
- 25 Lu J, Jayaprakash KN, Schlueter U, Fraser-Reid B. Synthesis of a malaria candidate glycosylphosphatidylinositol (GPI) structure: A strategy for fully inositol acylated and phosphorylated GPIs. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 7540–7547
- 26 Pekari K, Schmidt RR. A variable concept for the preparation of branched glycosyl phosphatidyl inositol anchors. *J Org Chem*, 2003, 68: 1295–1308
- 27 Pekari K, Tailler D, Weingart R, Schmidt RR. Synthesis of the fully phosphorylated GPI anchor pseudohexasaccharide of *Toxoplasma gondii*. *J Org Chem*, 2001, 66: 7432–7442
- 28 Hewitt MC, Snyder DA, Seeberger PH. Rapid synthesis of a glycosylphosphatidylinositol-based malaria vaccine using automated solid-phase oligosaccharide synthesis. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 13434–13436
- 29 Tsai YH, Gotze S, Azzouz N, Hahn HS, Seeberger PH, Silva DV. A general method for synthesis of GPI anchors illustrated by the total synthesis of the low-molecular-weight antigen from *Toxoplasma gondii*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50: 9961–9964
- 30 Yashunsky DV, Borodkin VS, Ferguson MA, Nikolaev AV. The chemical synthesis of bioactive glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* containing an unsaturated fatty acid in the lipid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006, 45: 468–474
- 31 Wu XM, Guo ZW. Convergent synthesis of a fully phosphorylated GPI anchor of the CD52 antigen. *Org Lett*, 2007, 9: 4311–4313
- 32 Swarts BM, Guo ZW. Chemical synthesis and functionalization of clickable glycosylphosphatidylinositol anchors. *Chem Sci*, 2011, 2: 2342–2352
- 33 Swarts BM, Guo ZW. Synthesis of a glycosylphosphatidylinositol anchor bearing unsaturated lipid chains. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 6648–6650
- 34 Sureshan KM, Shashidhar MS, Praveen T, Das T. Regioselective protection and deprotection of inositol hydroxyl groups. *Chem Rev*, 2003, 103: 4477–4503
- 35 Garegg PJ, Iversen T, Johansson R, Lindberg B. Synthesis of some mono-*O*-benzyl and penta-*O*-methyl-*myo*-inositol. *Carbohydr Res*, 1984, 130: 322–326
- 36 Massy DJR, Wyss P. The synthesis of DL-1-(hexadecanoyloxy)methyl and 1-*O*-hexadecanoyl-inositols as potential inhibitors of phospholipase C. *Helv Chim Acta*, 1990, 73: 1037–1057
- 37 Campbell AS, Fraser-Reid B. First synthesis of a fully phosphorylated GPI membrane anchor: Rat brain Thy-1. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 10387–10388
- 38 Murakata C, Ogawa T. Synthetic study on glycosylphosphatidyl inositol (GPI) anchor of *Trypanosoma brucei*: Glycoheptaosyl core. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31: 2439–2442
- 39 Mayer TG, Weingart R, Munstermann F, Kawada T, Kurzchalia T, Schmidt RR. Synthesis of labeled glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchors. *European J Org Chem*, 1999: 2563–2571
- 40 Gou DM, Liu YC, Chen CS. An efficient chemoenzymic access to optically active *myo*-inositol polyphosphates. *Carbohydr Res*, 1992, 234:

51–64

- 41 Jia ZJ, Olsson L, Fraser-Reid B. Ready routes to key *myo*-inositol component of GPIs employing microbial arene oxidation or Ferrier reaction. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1998, 4: 631–632
- 42 Xue J, Guo ZW. Convergent synthesis of a GPI containing an acylated inositol. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 16334–16339
- 43 Yu F, Guo Z. Efficient syntheses of chiral *myo*-inositol derivatives-key intermediates in glycosylphosphatidylinositol (GPI) syntheses. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 3852–3855
- 44 Conrad RM, Grogan MJ, Bertozzi CR. Stereoselective synthesis of *myo*-inositol via ring-closing metathesis: A building block for glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor synthesis. *Org Lett*, 2002, 4: 1359–1361
- 45 Kinoshita T, Inoue N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, 4: 632–638
- 46 Tartakoff AM, Singh N. How to make a glycoinositol phospholipid anchor. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17: 470–473
- 47 Wu X, Shen Z, Zeng X, Lang S, Palmer M, Guo Z. Synthesis and biological evaluation of sperm CD52 GPI anchor and related derivatives as binding receptors of pore-forming CAMP factor. *Carbohydr Res*, 2008, 343: 1718–1729
- 48 Burgula S, Swarts BM, Guo Z. Total synthesis of a glycosylphosphatidylinositol anchor of the human lymphocyte CD52 antigen. *Chemistry*, 2012, 18: 1194–1201
- 49 Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2001, 40: 2004–2021
- 50 Lutz JF, Borner HG. Modern trends in polymer bioconjugates design. *Prog Polym Sci*, 2008, 33: 1–39
- 51 Tornøe CW, Christensen C, Meldal M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-Triazoles by regioselective copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem*, 2002, 67: 3057–3064
- 52 Lallana E, Riguera R, Fernandez-Megia E. Reliable and efficient procedures for the conjugation of biomolecules through Huisgen azide-alkyne cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011, 50: 8794–8804
- 53 Shao N, Xue J, Guo Z. Chemical synthesis of a skeleton structure of sperm CD52-A GPI-anchored glycopeptide. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004, 43: 1569–1573
- 54 Shao N, Xue J, Guo Z. Chemical synthesis of CD52 glycopeptides containing the acid-labile fucosyl linkage. *J Org Chem*, 2003, 68: 9003–9011
- 55 Dawson PE, Muir TW, Clark-Lewis I, Kent SB. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*, 1994, 266: 776–779
- 56 Bang D, Kent SBH. A one-pot total synthesis of crambin. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004, 43: 2534–2538
- 57 Torbeev VY, Kent SBH. Convergent chemical synthesis and crystal structure of a 203 amino acid "covalent dimer" HIV-1 protease enzyme molecule. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46: 1667–1670
- 58 Johnson ECB, Kent SBH. Insights into the mechanism and catalysis of the native chemical ligation reaction. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 6640–6646
- 59 Tanaka Y, Nakahara Y, Hojo H, Nakahara Y. Studies directed toward the synthesis of protein-bound GPI anchor. *Tetrahedron*, 2003, 59: 4059–4067
- 60 Paulick MG, Wise AR, Forstner MB, Groves JT, Bertozzi CR. Synthetic analogues of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and their behavior in supported lipid bilayers. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 11543–11550
- 61 Becker CFW, Liu XY, Olschewski D, Castelli R, Seidel R, Seeberger PH. Semisynthesis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47: 8215–8219
- 62 Hong Y, Nagamune K, Ohishi K, Morita YS, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T. TbGPI16 is an essential component of GPI transamidase in *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett*, 2006, 580: 603–606
- 63 Meitzler JL, Gray JJ, Hendrickson TL. Truncation of the caspase-related subunit (Gpi8p) of *Saccharomyces cerevisiae* GPI transamidase: Dimerization revealed. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 462: 83–93
- 64 Zhu Y, Fraering P, Vionnet C, Conzelmann A. Gpi17p does not stably interact with other subunits of glycosylphosphatidylinositol transamidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1735: 79–88
- 65 Wu Z, Guo Z. Sortase-mediated transpeptidation for site-specific modification of peptides, glycopeptides, and proteins. *J Carbohydr Chem*, 2012, 31: 48–66

- 66 Huang X, Aulabaugh A, Ding W, Kapoor B, Alksne L, Tabei K, Ellestad G. Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA. *Biochemistry*, 2003, 42: 11307–11315
- 67 Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, 70: 192–221
- 68 Ton-That H, Mazmanian SK, Alksne L, Schneewind O. Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7447–7452
- 69 Mao H, Hart SA, Schink A, Pollok BA. Sortase-mediated protein ligation: A new method for protein engineering. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 2670–2671
- 70 Parthasarathy R, Subramanian S, Boder ET. Sortase A as a novel molecular "stapler" for sequence-specific protein conjugation. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 469–476
- 71 Pritz S, Wolf Y, Kraetke O, Klose J, Bienert M, Beyermann M. Synthesis of biologically active peptide nucleic acid-peptide conjugates by sortase-mediated ligation. *J Org Chem*, 2007, 72: 3909–3912
- 72 Antos JM, Miller GM, Grotenbreg GM, Ploegh HL. Lipid modification of proteins through sortase-catalyzed transpeptidation. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 16338–16343
- 73 Samantaray S, Marathe U, Dasgupta S, Nandicoori VK, Roy RP. Peptide-sugar ligation catalyzed by transpeptidase sortase: A facile approach to neoglycoconjugate synthesis. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 2132–2133
- 74 Popp MW, Antos JM, Grotenbreg GM, Spooner E, Ploegh HL. Sortagging: A versatile method for protein labeling. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 707–708
- 75 Tanaka T, Yamamoto T, Tsukiji S, Nagamune T. Site-specific protein modification on living cells catalyzed by Sortase. *Chembiochem*, 2008, 9: 802–807
- 76 Guo X, Wang Q, Swarts BM, Guo Z. Sortase-catalyzed peptide-glycosylphosphatidylinositol analogue ligation. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 9878–9879
- 77 Wu Z, Guo X, Wang Q, Swarts BM, Guo Z. Sortase A-catalyzed transpeptidation of glycosylphosphatidylinositol derivatives for chemoenzymatic synthesis of GPI-anchored proteins. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 1567–1571
- 78 Wu Z, Guo X, Guo Z. Chemoenzymatic synthesis of glycosylphosphatidylinositol-anchored glycopeptides. *Chem Commun (Camb)*, 2010, 46: 5773–5774
- 79 Wu Z, Guo X, Guo Z. Sortase A-catalyzed peptide cyclization for the synthesis of macrocyclic peptides and glycopeptides. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47: 9218–9220
- 80 Guo X, Wu Z, Guo Z. New method for site-specific modification of liposomes with proteins using sortase A-mediated transpeptidation. *Bioconjug Chem*, 2012, 23: 650–655

## Recent progress in the synthesis of GPIs and GPI-anchored proteins

GAO Jian<sup>1</sup>, GUO ZhongWu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Wayne State University, Detroit, MI 48202, USA

<sup>2</sup> National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250100, China

\*Corresponding author (email: zwguo@sdu.edu.cn)

**Abstract:** Glycosylphosphatidylinositol (GPI) attachment to the protein C-terminus is a common posttranslational modification in eukaryotic species. GPIs help anchor proteins onto the out leaflet of cell membranes. GPI-anchored proteins play an important role in various biological and pathological processes. To study GPIs and GPI-anchored proteins in detail, it is necessary to access these molecules in homogeneous form and sufficient quantities, which is difficult to achieve via natural product isolation. As a result, chemical and chemoenzymatic synthesis has become a potent approach to obtain GPIs and GPI-anchored proteins for various studies. This paper reviews the recent progress in the synthesis of GPI anchors and GPI-anchored proteins by mainly focusing on the strategies developed for the preparation of optically pure, position-differentiated inositol derivatives, the key intermediates in GPI synthesis, for natural GPI anchor assembly, for diversity-oriented synthesis of functionalized GPI derivatives, and for peptide/protein and GPI anchor coupling.

**Keywords:** glycolipid, *myo*-inositol, glycosylphosphatidylinositol (GPI), GPI-anchored protein, total synthesis