

Enzymatische Triterpen-Cyclisierung: neue Mosaikbausteine vervollständigen das Bild**

K. Ulrich Wendt*

Stichwörter:

Bioorganische Chemie · Enzymkatalyse · Steroide · Strukturbiologie · Terpene

Die bemerkenswerten stereoselektiven Cyclisierungen von 2,3-Oxidosqualen (**1**) und Squalen (**2**) zu polycyclischen Triterpenen haben Bioorganiker mehr als ein halbes Jahrhundert lang fasziniert.^[1–3] Diese Reaktionen werden in einer großen Zahl von Mikroorganismen und höheren Eukaryoten durch Squalen-Cyclasen und 2,3-Oxidosqualen-Cyclasen katalysiert. Unterschiedlich aufgebaute aktive Zentren dieser Enzyme führen zur Entstehung strukturell verschiedener polycyclischer Triterpene, die als biosynthetische Vorstufen der Hopanoide und Steroide fungieren.^[2] Die 2,3-Oxidosqualen-Cyclasen werden daher als mögliche Zielmoleküle für Wirkstoffe gegen Cholesterinämie und Pilzerkrankungen untersucht.^[4]

Die grundlegenden Schritte der Enzymreaktionen wurden durch detaillierte Studien mit nichtnatürlichen Substraten aufgeklärt (Schema 1). Diese Schritte sind: 1) Bindung des Polyolefin-Substrats in einer gefalteten Konformation, 2) Initiierung der Reaktion durch Protonierung einer Doppelbindung (Squalen) oder eines Epoxids (2,3-Oxidosqualen), 3) Ringschluss, 4) 1,2-Hydrid- und Methylgruppenverschiebungen (z. B. 2,3-Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase; OSC) und 5) Eliminierung eines Protons oder Addition von Wasser.^[1–3]

Die Aufklärung von Kristallstrukturen des monotopen Membranproteins Squalen-Hopen-Cylase (SHC) hat eine dreidimensionale Vorlage geliefert, deren Kombination mit den verfügbaren bioorganischen Daten und Mutagenesestudien erstmals die Aufstellung eines biomolekularen Mechanismus der enzymatischen Triterpen-Cyclisierung ermöglichte.^[3,5] Diese Strukturen erklären, wie die hydrophoben Substrate aus der Zellmembran in das im Enzyminneren gelegene aktive Zentrum aufgenommen werden, in welchem die Reaktion anschließend durch ein acidifiziertes Aspartat eingeleitet wird.^[5,6] Im Verlauf der folgenden Ringschluss-Reaktionen entfernt sich das Kation von der katalytischen Säure, und die Intermediate werden durch aromatische Aminosäuren abgeschirmt, die ihre π -Elektronen auf das aktive Zentrum richten.^[7] Die Deprotonierung des terminalen Kations erfolgt durch ein polarisiertes Wassermolekül (SHC) oder durch eine basische Aminosäure wie His232^{OSC}.^[3]

Entscheidende Schritte dieser komplexen Reaktionen sind nach wie vor ungeklärt: Wie wird die energetisch ungünstige Sessel-Boot-Sessel-Konformation des Substrats in der OSC induziert? In welchem Ausmaß verlaufen Ringschlüsse konzertiert mit der initialen Protonenübertragung? Verläuft die Bildung des C-Rings (OSC und SHC) und des D-Rings (SHC) über Markownikow-Additionen zu den Intermediaten **5**, **11** und **13** oder werden andere Reaktionswege durchlaufen? Was ist die katalytische Base der OSC?

Aktuelle Arbeiten liefern zwei wichtige Momentaufnahmen der Triterpen-Polycyclisierungskaskaden: Reinert et al. haben die Struktur der SHC im Kom-

plex mit dem Substratmimetikum 2-Azasqualen aufgeklärt, was einen Blick auf die Konformation des Substrats vor der initialen Protonenübertragung ermöglicht (Abbildung 1).^[8] Thoma et al. gelang die lang erwartete Aufklärung der Struktur der humanen OSC im Komplex mit dem Reaktionsprodukt Lanosterin (Abbildung 1).^[9] Im Folgenden werden die Beiträge dieser Studien entlang der prinzipiellen Schritte der enzymatischen Reaktion beleuchtet.

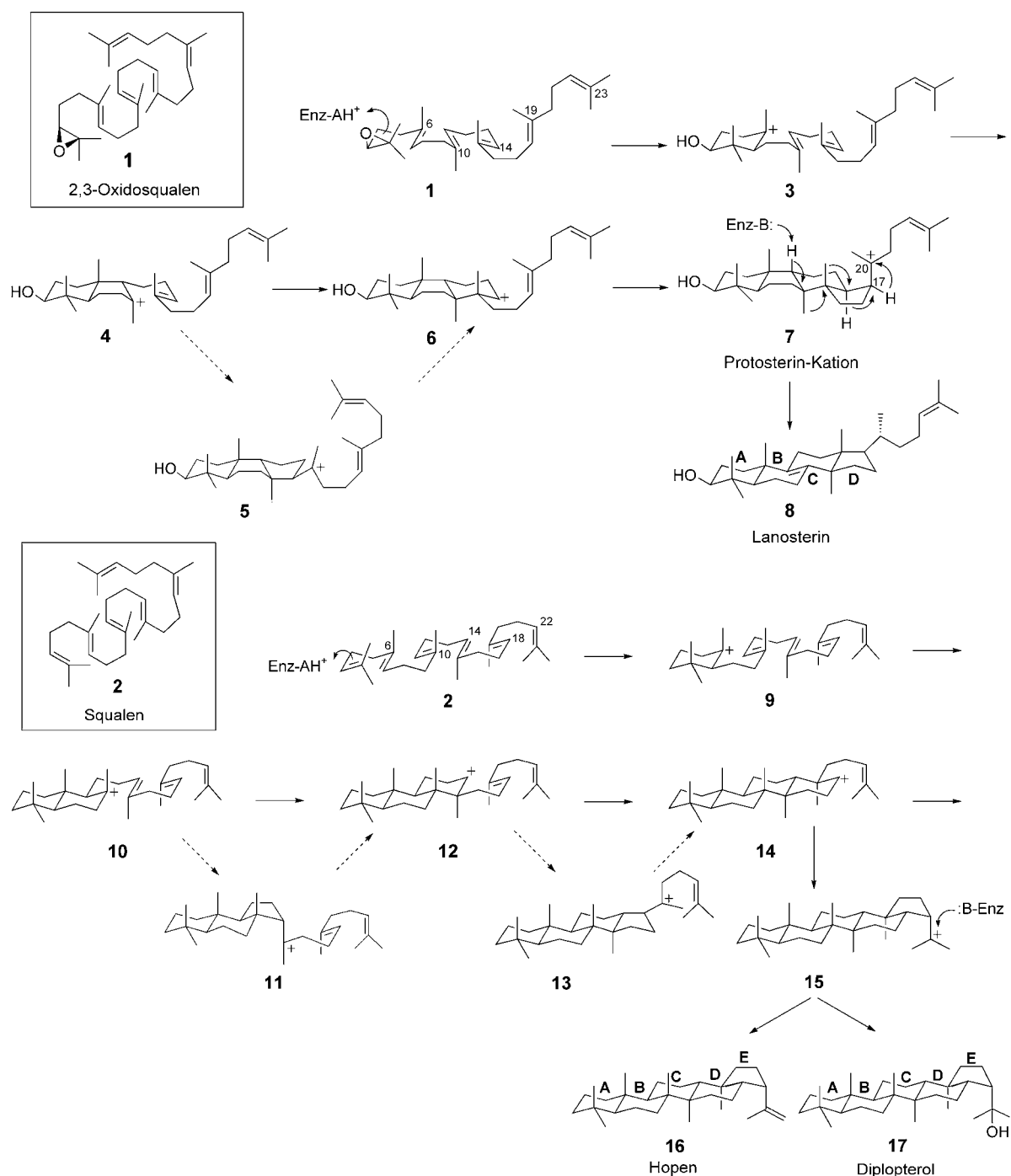
Initiierung

Da Epoxide leichter protoniert werden als Alkene, ist zu erwarten, dass die katalytische Säure der OSC weniger acidisch ist als die der SHC. In der SHC ist die katalytische Säure, Asp376^{SHC}, so orientiert, dass das acidere *anti*-Proton auf das Substrat gerichtet ist.^[3,10] Asp376^{SHC} bildet eine H-Brücke zu His451^{SHC}, das vor der Protonenübertragung wahrscheinlich positiv geladen ist und dadurch die Acidität von Asp376^{SHC} erhöht (Abbildung 1). Eine negative Gegenladung auf den fest H-verbrückten Seitenketten von Asp374^{SHC}:Asp377^{SHC} (2.6 Å Abstand) befindet sich in geeigneter Position zur Stabilisierung der C2- und C6-Kationen (Squalen-Nummerierung). Drei H-Brücken verbinden Asp376^{SHC} mit dem umgebenden Solvens und ermöglichen so die Reprotonierung, während sich das cyclisierende Kation von der katalytischen Säure entfernt.^[5]

Die von Thoma et al. bestimmte Struktur bestätigt Asp455^{OSC} als katalytische Säure der OSC (Abbildung 1).^[9,11] Wie für diese Struktur erwartet, wird Asp455^{OSC} nicht durch einen positiv

[*] Dr. K. U. Wendt
Aventis Pharma Deutschland GmbH
Industriepark Höchst
65926 Frankfurt (Deutschland)
Fax: (+49) 69-30580169
E-mail: ulrich.wendt@sanofi-aventis.com

[**] Ich danke Alexander Schiffer, Christian von der Heyden und Matthias Urmann für kritische Kommentare zu dieser Arbeit.



Schema 1. Gesamtmechanismen der Reaktionen, die durch die 2,3-Oxidosqualen-Lanosterin-Cyclase (OSC, oben) und die Squalen-Hopen-Cyclase (SHC, unten) katalysiert werden.

geladenen Histidinrest polarisiert und folgerichtig ist das negativ geladene Asp377^{SHC}:Asp374^{SHC}-Paar in der OSC nicht konserviert.^[3,5,9] Nicht erwartet waren dagegen die H-Brücken zwischen Asp455^{OSC} und zwei Cysteinresten sowie die Tatsache, dass das weniger acide *syn*-Proton von Asp455^{OSC} zum Substrat orientiert ist.^[9,10] Wie in der SHC kann die Reprotonierung über eine Kette

geordneter Wassermoleküle erfolgen, die Asp455^{OSC} mit dem umgebenden Solvens verbinden. Insgesamt scheint die Brønsted-Acidität der katalytischen Säure der OSC niedriger zu sein als jene der katalytischen Säure der SHC, was dem Enzym vermutlich die Unterscheidung der Olefin- und der Epoxid-Seite des Substrats ermöglicht.

Ringschluss

Aus der Struktur des Lanosterin-OSC-Komplexes lässt sich schließen, wie die energetisch ungünstige Boot-Konformation des B-Rings induziert wird: Thoma et al. schlagen vor, dass Tyr98^{OSC} (Leu36 in SHC) im ansonsten hoch konservierten „oberen“ Teil des aktiven Zentrums die C10-Methylgrup-

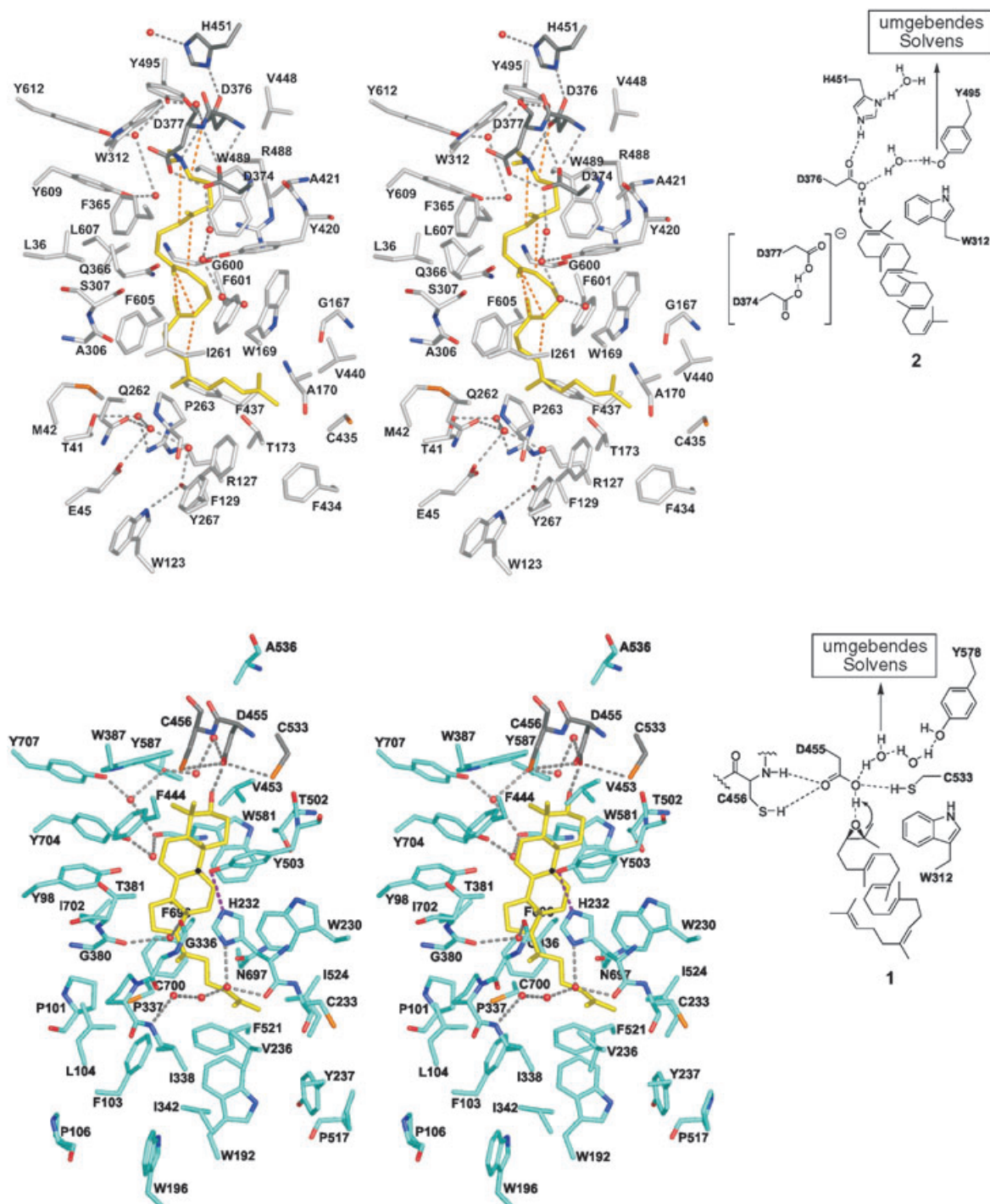


Abbildung 1. Aktive Zentren (Stereographiken links) und Schema der Initiierungsstelle (rechts). Obere Stereographik: SHC von *A. acidocaldarius* (hellgrau) mit 2-Azasqualen (gelb; PDB-Code 1ump).^[8] Hervorgehoben sind die polaren Aminosäuren um die katalytische Säure Asp 376^{SHC} (dunkelgrau), Strukturwasser-Moleküle (rote Kugeln) und polare Wechselwirkungen (gestrichelt). Der Pfad für die ersten vier Ringschlüsse ist gemäß Reinert et al. dargestellt (orange).^[8] Untere Stereographik: OSC von *H. sapiens* (türkis) mit Lanosterin (gelb; PDB-Code 1w6k).^[9] Polare Reste um die katalytische Säure Asp 455^{OSC}, polare Wechselwirkungen und Strukturwasser-Moleküle sind gezeigt wie oben. Die katalytische Base His 232^{OSC}:Tyr 503^{OSC} (H-Brücke violett) akzeptiert ein Proton von C9 des Lanosterin-Kations (schwarzer Punkt).^[9]

pe von 2,3-Oxidosqualen unter die Molekül-Ebene drückt und so eine Boot-Konformation erzwingt (Abbildung 2).^[9]

Eine zeitliche Überlappung der OSC-katalysierten A- und B-Ring-

schlüsse mit der initialen Protonierung wurde basierend auf nichtenzymatischen Daten vorgeschlagen und wird durch Modeling-Studien gestützt,^[12–14] die zudem einen analogen Mechanismus für die SHC nahelegen.^[15] Die von Rei-

nert et al. ermittelte Struktur enthält das Substratmimetikum 2-Azasqualen in einer Konformation, in der die ersten vier Isopren-Einheiten für die Bildung eines 6-6-6- oder 6-6-5-Tricyclus nur kleine Konformationsänderungen durchlaufen

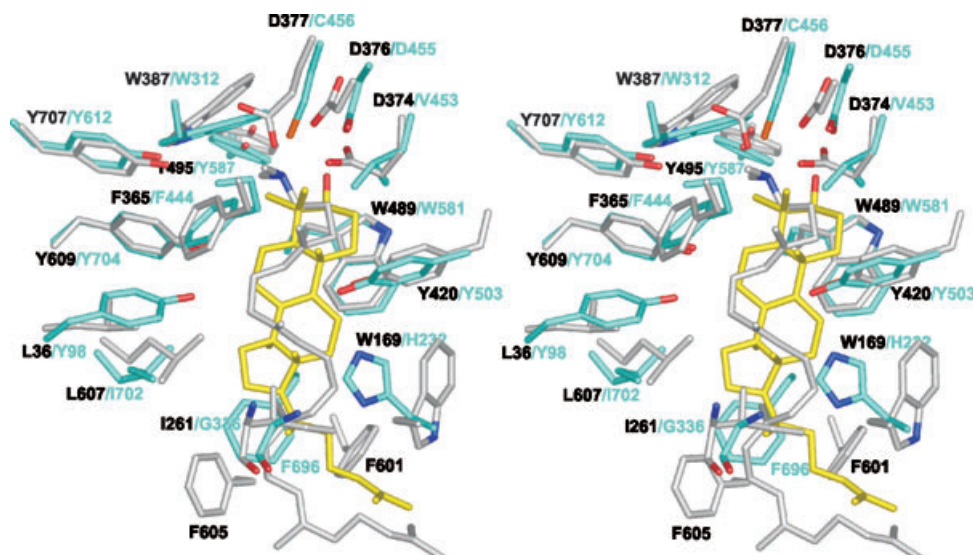
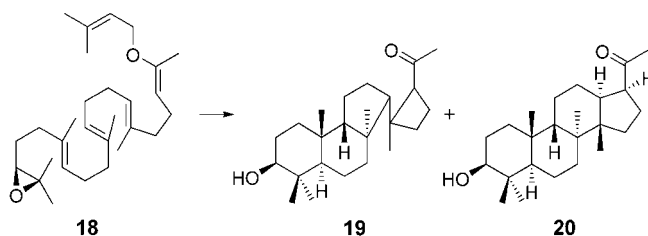


Abbildung 2. Stereographik der Überlagerung ausgewählter Reste der OSC von *H. sapiens* (türkis; türkise Nummerierung) mit Lanosterin (gelb) und der SHC von *A. acidocaldarius* mit 2-Azasqualen (grau; schwarze Nummerierung).^[8,9]

müssen (Abbildung 1).^[8] Vor der Bildung des D-Rings muss für eine effektive Annäherung der C18-C19-Doppelbindung an C14 zunächst eine Rotation um die C17-C18-Bindung erfolgen. Daher ist anzunehmen, dass die D-Ring-Bildung nicht konzertiert mit der initialen Protonierung abläuft. Die beobachtete Konformation von 2-Azasqualen lässt auf einen Markownikow-Ringschluss zum 6-6-6-5-Tetracyclus schließen.^[8] Darüber hinaus zeigen Reinert et al., dass der E-Ring in 2-Azasqualen nicht vorgefaltet ist und argumentieren überzeugend, dass die Annäherung der C22-C23-Doppelbindung an C18 eine signifikante Konformationsänderung mit einer erheblichen Energiebarriere erfordert, woraus sie folgern, dass die Kaskade auf der Stufe des 6-6-6-5-Kations **13** pausiert.^[8] Diese Pause würde Zeit für Nebenreaktionen lassen und erklärt damit das Auftreten diverser 6-6-6-5-Nebenprodukte bei der Reaktion der SHC mit dem natürlichen Substrat Squalen.^[8,16]

Das Konzept eines Markownikow-C-Ringschlusses mit nachfolgender Ringerweiterung wurde von Corey et al. aus der Beobachtung des 6-6-5-Produktes **19** abgeleitet, das sich bei der Cyclisierung von 20-Oxaoxidosqualen (**18**) mittels *S. cerevisiae*-OSC als Nebenprodukt zum erwarteten 6-6-6-5-Produkt **20** bildete (Schema 2).^[17] Eine Vielzahl partiell cyclisierter 6-6-5- und 6-6-6-5-Nebenprodukte aus Studien mit Sub-



Schema 2. Produkte der Cyclisierung von 20-Oxaoxidosqualen (**18**) mittels *S. cerevisiae*-OSC.^[17]

strat-Analoga und mutierten Cyclasen wurde als weiterer Beleg für die Relevanz der Kationen **5**, **11** und **13** im Mechanismus der SHC- und OSC-vermittelten Cyclisierungen herangezogen.^[3] Bisher nicht isoliert wurden dagegen 6-6-6-Produkte, die aus den Kationen **6** (OSC) und **12** (SHC) entstehen könnten,^[3] und nur in Spuren isoliert wurden 6-6-6-6-Nebenprodukte, die aus Kation **14** entstehen.^[18] Aus diesen Beobachtungen könnte man schließen, dass **6**, **12** und **14** keine stabilen Spezies auf der Reaktionskoordinate sind. Allerdings ist die Isolierung von Nebenprodukten, die aus unterbrochenen Cyclisierungen hervorgehen, kein endgültiger Beweis für den natürlichen Reaktionsmechanismus des Enzyms.

Basierend auf Moleküldynamik-Simulationen haben Gao et al. vorgeschlagen, dass **10** auf dem SHC-vermittelten Reaktionspfad als einziges Intermediat mit signifikanter Lebensdauer gebildet wird und über lediglich einen Übergangszustand zu **15** reagiert.^[15] Dieser

Vorschlag widerspricht der Arbeit von Reinert et al., die die schnelle Bildung des 6-6-6-5-Intermediats **13** vorschlagen, auf die zunächst eine langsame Konformationsänderung der verbleibenden nichtcyclisierten Polyolefinkette folgen soll. Im Anschluss würden D-Ring-Erweiterung und E-Ring-Bildung konzertiert verlaufen.^[8] Die Klärung dieses Widerspruchs würde durch Kenntnis der Konformation der nichtcyclisierten Isopren-Kette in Komplexen der SHC mit Analoga von **10–13** erleichtert.

Für die OSC zeigten Thoma et al., dass sich His232^{OSC} und Phe696^{OSC} in Positionen befinden, die π -Kation-Wechselwirkungen mit dem C20-Protoosterin-Kation **7** sowie mit einer Ladung auf C14, die im möglichen Intermediat **6** entstünde, erlauben (Abbildung 1).^[9] Wie für die SHC gezeigt, wären Komplex-Strukturen der OSC mit 2-Azasqualen und mit Analoga von **4–6** eine wichtige Grundlage für ein detailliertes Verständnis der Bildung des Lanosterin-C-Rings. Phe605^{SHC} ist an der SHC-

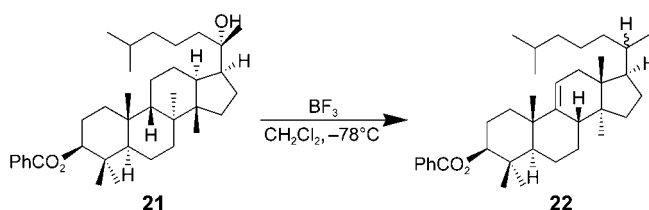
vermittelten Bildung des E-Rings beteiligt und daher in der OSC, die lediglich vier Ringe bildet, nicht konserviert.^[3]

Anders als in den Squalen-Cyclasen ist Gly600^{SHC} in allen bekannten Oxi-dosqualen-Cyclasen deletiert.^[19] Es wurde gezeigt, dass die ΔGly601^{SHC}-Mutante der SHC von *A. acidocaldarius* (3S)-2,3-Oxidosqualen in eine Mischung aus mono- und tricyclischen Produkten umsetzt, aber bei (3R)-2,3-Oxidosqualen und dem natürlichen Substrat Squalen inaktiv ist.^[20] Dieses Ergebnis ist in Anbetracht der bekannten Biostrukturen nicht selbstverständlich und bedarf weiterer Untersuchungen.

Umlagerung, Eliminierung und Freisetzung der Produkte

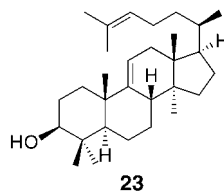
In der SHC wird die Reaktion durch ein polarisiertes Wassermolekül X terminiert,^[5] welches das Hopenyl-Kation **15** zu Hopen (**16**) deprotoniert oder sich unter Bildung von Diplopterol (**17**) addiert. X wurde allerdings in keiner der bisher analysierten Kristallstrukturen direkt beobachtet.^[8] Basierend auf Moleküldynamik-Simulationen schlagen Reinert et al. vor, dass sich das cyclisierende Squalen zu seinem Zentrum hin kontrahiert. Aufgrund der resultierenden Position des Hopenyl-Kations **15** kann man eine Position für X vorschlagen, die sich in der Nähe eines Wasser-Netzwerks um Glu45^{SHC} befindet.^[5,8]

Im aktiven Zentrum der OSC wird das C20-Protosterin-Kation **7** zunächst umgelagert und dann an der C9-Position deprotoniert (Lanosterin-Nummerierung; Schema 1 und Abbildung 1). Thoma et al. schlagen einen Gradienten der π-Elektronendichte im aktiven Zentrum der OSC als Triebkraft für die Umlagerung von **7** zu **8** vor. Allerdings entsteht bereits bei der nichtenzymatischen Umlagerung von **21** das 24,25-Dihydroparkeolbenzoat **22** (Schema 3)^[21] – diese Beobachtung zeigt, dass die Umlagerung von **7** zu **8** nur minimaler enzymatischer Unterstützung bedarf. Es ist daher anzunehmen, dass die Position der katalytischen Base eine wichtigere Triebkraft für die Umlagerung ist als die π-Elektronenverteilung im aktiven Zentrum. Thoma et al. bestätigen, dass His232^{OSC} der einzige basische Rest in der Umgebung der Deprotonie-



Schema 3. Nichtenzymatische Umlagerung von **21**.^[21]

rungsstelle ist.^[3,11] His232^{OSC} bildet eine H-Brücke zur Hydroxygruppe von Tyr503^{OSC}, die sich in einer geeigneteren Position zur Aufnahme eines Protons von C9 des Lanosterin-Kations befindet als His232^{OSC} selbst (Abbildung 1).^[9] Die Zuordnung des H-verbrückten His232^{OSC}:Tyr503^{OSC}-Paares als katalytische Base der OSC wird durch weitere Daten gestützt: 1) den essenziellen Charakter des entsprechenden His234 der OSC von *S. cerevisiae*^[11] sowie 2) die Beobachtung, dass die Tyr510 Ala-Mutante der OSC von *S. cerevisiae* Parkeol **23** bildet,^[22] ein Produkt, das dem der nichtenzymatischen Reaktion von **21** (zu **22**) entspricht.



Die Freisetzung der sperrigen Reaktionsprodukte aus den hydrophoben aktiven Zentren in die Zellmembran ist eine eindrucksvolle Fähigkeit der Triterpen-Cyclasen. In der SHC ist der Kanal von der Membran zum aktiven Zentrum wahrscheinlich flexibel genug für den Durchlass der Produkte,^[5,8] und auch in der OSC weist diese Region eine erhöhte Flexibilität auf, sodass für die Freisetzung der Produkte in beiden Fällen analoge Mechanismen zu erwarten sind.

Ausblick

Die grundlegenden Schritte der enzymatischen Triterpen-Cyclisierung wurden mithilfe einer Kombination von bioorganischer Chemie, Strukturbiologie und gerichteter Mutagenese aufgeklärt. Eine detaillierte experimen-

telte Analyse dieser komplexen Reaktionen wird aber dadurch erschwert, dass selbst kleine sterische Änderungen am Enzym oder am Substrat die Konformation und Position des cyclisierenden Polyolefins so verändern können, dass der Reaktionsweg weit entfernt vom Ort der Mutation beeinträchtigt wird.^[3,19] Eine Aufklärung der exakten Reaktionskoordinaten sowie eine Differenzierung von sterischen und elektronischen Beiträgen einzelner Aminosäuren erfordert daher die Bestimmung der Strukturen nativer und mutierter Cyclasen im Komplex mit Substrat- und Übergangszustands-Analoga.

Online veröffentlicht am 1. Juni 2005

- [1] a) R. B. Woodward, K. Bloch, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 2023–2024; b) G. Stork, A. W. Burgstahler, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 5068–5077; c) A. Eschenmoser, L. Ruzika, O. Jeger, D. Arigoni, *Helv. Chim. Acta* **1955**, 38, 1890–1904; d) R. K. Maudgal, T. T. Tchen, K. Bloch, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2589–2590; e) J. W. Cornforth, R. H. Cornforth, C. Donninger, G. Popjak, Y. Shimizu, S. Ichii, E. Forchielli, E. Caspi, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3224–3228; f) E. J. Corey, W. E. Russey, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4750–4751; g) E. J. Corey, W. E. Russey, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4751–4752; h) E. E. van Tamelen, J. D. Willet, R. B. Clayton, K. E. Lord, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 4752–4754.
- [2] I. Abe, M. Rohmer, G. D. Prestwich, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 2189–2206.
- [3] a) K. U. Wendt, G. E. Schulz, E. J. Corey, D. R. Liu, *Angew. Chem.* **2000**, 39, 2930–2952; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2812–2833; b) T. Hoshino, T. Sato, *Chem. Commun.* **2002**, 291–301.
- [4] a) O. H. Morand, J. D. Aebi, H. Dehmow, Y.-H. Ji, N. Gains, H. Lengsfeld, J. Himber, *J. Lipid Res.* **1997**, 38, 373–390; b) S. Jolidon, A. Polak-Wyss, P. G. Hartmann, P. Guerry, *Recent Advances in the Chemistry of Antiinfective Agents* (Hrsg.: P. H. Bentley), Royal Society of

- Chemistry, Cambridge, **1993**, S. 223–233; c) A. Lenhart, D. J. Reinert, J. D. Aebi, H. Dehmlow, O. H. Morand, G. E. Schulz, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2083–2092.
- [5] a) K. U. Wendt, K. Poralla, G. E. Schulz, *Science* **1997**, *277*, 1811–1815; b) K. U. Wendt, A. Lenhart, G. E. Schulz, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 175–187.
- [6] Die Sequenznummerierung entspricht der Squalen-Hopen-Cyclase (SHC) von *A. acidocaldarius* und der 2,3-Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase (OSC) von *H. sapiens*.
- [7] In der SHC/OSC sind die π -Elektronen von Trp312^{SHC}/Trp387^{OSC}, Trp489^{SHC}/Trp581^{OSC} und Phe365^{SHC}/Phe444^{OSC} zum aktiven Zentrum orientiert, wo sie mit den Kationen an C2, C6 und C10 (Squalen-Nummerierung) wechselwirken können. Trp169^{SHC}/His232^{OSC} und Phe601^{SHC}/Phe696^{OSC} liegen an der Stelle der C- und D-Ring-Bildung und wechselwirken mit den entsprechenden Intermediaten. Phe605^{SHC} ist nur in Squalen-Cyclasen konserviert und ist an der Bildung des E-Rings beteiligt. Die sterischen und elektronischen Beiträge dieser und anderer Reste sind Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen und Übersichtsartikel.^[3]
- [8] D. J. Reinert, G. Balliano, G. E. Schulz, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 121–126.
- [9] R. Thoma, T. Schulz-Gasch, B. D'Arcy, J. Benz, J. Aebi, H. Dehmlow, M. Hennig, M. Stihle, A. Ruf, *Nature* **2004**, *432*, 118–122.
- [10] a) R. D. Gandour, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 169–176; b) J. Gao, J. J. Pavelites, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1912–1914.
- [11] a) E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1277–1288; b) E. J. Corey, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, D. Li, X. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1289–1296.
- [12] E. J. Corey, D. D. Staas, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3526–3527.
- [13] a) C. Jenson, W. L. Joergensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10846–10854; b) B. A. Hess, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 165–167; c) B. A. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10286–10287.
- [14] D. Gao, Y.-K. Pan, K. Byun, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4045–4046.
- [15] R. Rajamani, J. Gao, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12768–12781.
- [16] C. Pale-Grosdemange, C. Feil, M. Rohmer, K. Poralla, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2355–2358; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2237–2240.
- [17] E. J. Corey, S. C. Virgil, H. Cheng, C. H. Baker, S. P. T. Matsuda, V. Sigh, S. Sars-har, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11819–11820.
- [18] T. Hoshino, T. Abe, M. Kouda, *Chem. Commun.* **2000**, 441–442.
- [19] T. Schulz-Gasch, M. Stahl, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 741–7523.
- [20] T. Hoshino, K. Shimizu, T. Sato, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6868–6871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6700–6703.
- [21] E. J. Corey, S. C. Virgil, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6429–6431.
- [22] T.-K. Wu, C.-H. Chang, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1712–1715.



Saved Search Alerts – Quick and Easy

Simply register. Registration is fast and free to all internet users.

Saved Search Alerts:

You are notified by e-mail whenever content is published online that matches one of your saved searches—complete with direct links to the new material.

To set a Saved Search alert: Run a search on Wiley InterScience, then click

● **Save Search** on the results page



Once you have saved the query, login to "My Profile" and go to **SAVED SEARCHES**.

Click **+ Activate Alert** to start getting e-mail results for that query.