

Synthese und Stabilität von cyclischen Disulfiden des Typs

Cys-[X]_n-Cys

Ulrich Weber und Peter Hartter

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. Dezember 1973)

Zusammenfassung: Die Synthese folgender Disulfide wird beschrieben: Cys-[Gly]_n-Cys-OMe ($n = 0-5$), Cys-[Gly]_n-Cys ($n = 0-4$), Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe, Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe.

Die Stabilität dieser Verbindungen wurde untersucht durch Verfolgung des Thiol-Disulfid-Austausches mit Glutathion (GSH). Als Indikatorreaktion wurde die gekoppelte enzymatische Reduktion des gebildeten oxidierten Glutathions (GSSG) benutzt. Die kinetischen Verhältnisse liegen in diesem Falle nicht mehr ganz so einfach, wie bei der Reaktion von offenkettigen Disulfiden mit GSH. Aus den Zeit-Umsatz-Kurven in den

ersten Minuten der Reaktion lassen sich jedoch die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmen. Die Stabilität ist für $n = 0$ sehr hoch und entspricht annähernd den Werten von offenkettigen Disulfiden des Typs Cys(SR). Für $n = 1$ nimmt die Stabilität sprunghaft um über eine Zehnerpotenz ab, steigt dann für $n = 2$ und 3 langsam wieder an und erreicht für $n = 4$ und 5 annähernd wieder Werte wie für $n = 0$. Zur Peptidsynthese sind die Verbindungen mit $n = 1, 2$ und 3 sicher zu wenig stabil. Dagegen sollten sich die Verbindungen mit $n = 0, 4, 5$ und wahrscheinlich auch höhere Analoge zur Peptidsynthese (Fragmentkondensation) einsetzen lassen.

Synthesis and stability of some cyclic cystine peptides Cys-[X]_n-Cys

Summary: The synthesis of the following cystine peptides is described: Cys-[Gly]_n-Cys-OMe ($n = 0-5$), Cys-[Gly]_n-Cys ($n = 0-4$), Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe, Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe.

The stability of these synthesized disulfides was investigated by measuring the thiol-disulfide exchange with glutathione (GSH). The coupled enzymatic reduction of the oxidized glutathione

(GSSG) was used as the indicator reaction. In this case the kinetic relations are not as simple as they were in the case of the reaction of open chain disulfides with GSH. The relative initial reaction velocity of the synthesized compounds could be determined by measuring the decrease of NADPH in the first minutes of the reaction. The stability is very high for $n = 0$ and corresponds to the values obtained for open chain disulfides Cys(SR). The stability decreases for $n = 1$ by more than one

Postanschrift: Univ.-Doz. Dr. U. Weber, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität, D-74 Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 1.

Abkürzungen: GSH = Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion, Cys(SR) = S-(Alkylthio)cystein, Cys(SG) = Disulfid aus Cystein und Glutathion, Cys-Cys = Cyclocystin, Cys-Cys = Diketopiperazin des Cyclo-Cystins, -OMe = -methylester, -OEt = -äthylester, ONSu = Hydroxysuccinimidester, Trt = Trityl, Boc = *t*-Butyloxy-carbonyl, Z = Benzyloxycarbonyl, -(S-IP) = Isopropylthio-, DCHA = Dicyclohexylamin, -ONp = *p*-Nitrophenylester, -OBzl(NO₂) = *p*-Nitrobenzylester.

Enzym: Glutathion-Reduktase (NAD(P)H), NAD(P)H:oxid.-Glutathion-Oxidoreduktase (EC 1.6.4.2).

power of ten, increases gradually for $n = 2$ and 3 and for $n = 4$ and 5 approaches the values of $n = 0$. The compounds with $n = 1, 2$ and 3 are probably not stable enough to be used for peptide syn-

thesis. On the other hand the compounds with $n = 0, 4, 5$, and probably their higher analogues, ought to be stable enough to be used for peptide synthesis (fragment condensation).

Zur Synthese cystinhaltiger Peptide wurde bisher meist ein am Schwefel geschütztes Cystein-Derivat eingesetzt und die Disulfidbindung erst nach beendeter Synthese und Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen durch Oxidation geschlossen. Dabei bilden sich, selbst wenn das Peptid nur eine Disulfidbindung enthält, oft erhebliche Mengen an Nebenprodukten (Polymere). Enthält das Peptid mehrere Disulfidbindungen, so ist es meist nicht möglich, das gewünschte Peptid durch Oxidation der reduzierten Form in annehmbaren Ausbeuten zu erhalten (Insulin). In diesem Falle müssen die Disulfidbindungen selektiv geschlossen werden. Dazu ist für jede Disulfidbrücke eine selektiv abspaltbare Schutzgruppe erforderlich. Durch Kombination etwa von *S*-Alkylthio-Schutzgruppen^[1-3] mit dem *S*-Trityl- und dem *S*-Diphenylmethyl-Rest und der Dirhodanmethode von Hiskey^[4-7] wäre es theoretisch möglich, 3 Disulfidbrücken selektiv zu schließen.

Die Synthese von cysteinhaltigen Peptiden ließe sich jedoch sehr vereinfachen, wenn Fragmente eingesetzt werden könnten, die bereits eine Disulfidbindung in richtiger Lage enthielten. So wäre es z. B. zur Synthese der Insulin-A-Kette von Vorteil, wenn der intrachenare Disulfidring -Cys-Cys-Ala-Gly-Val-Cys- bereits als Fragment eingeführt werden könnte. Voraussetzung ist allerdings, daß der Disulfidring während der Synthese ausreichend stabil ist.

Diese Strategie wurde in den letzten Jahren mehrfach angewandt. So zeigten Zahn und Schmidt^[8] an der Synthese einer Insulin-B-Kette aus symmetrischen Cystinpeptiden, daß es möglich ist, Cystein durch Cystein selbst zu schützen. Berndt, Klostermeyer und Zahn^[9] berichteten vor kurzem über die Synthese und Stabilität eines Cyclocystin-Derivates aus der Insulin-A-Kette sowie über die Synthese cyclischer Cystinpeptide mit Insulin-A- und -B-Ketten-Sequenzen^[10]. Sie konnten zeigen, daß das Peptid Boc-Cys-Cys-Ala-Gly-OBu^t unter Bedingungen der Peptidsynthese stabil ist. Durch Behandlung mit Bortrifluorid in Eisessig oder Triäthylamin in Essigsäure-äthylester wurde der Cyclocystinring nicht angegriffen. Der Disulfidring

wurde jedoch durch Hydrazin in Methanol fast quantitativ zerstört.

Mühlemann, Titov, Schwyzer und Rudinger^[11] synthetisierten Oxytocin durch Verknüpfen des Fragments 1-6 mit intaktem Disulfidring mit dem Fragment 7-9. Sie kuppelten das Peptid Boc-Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys in Dimethylformamid mit Pro-Leu-Gly-NH₂ und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol und entfernten anschließend den Boc-Rest mit 90proz. Trifluoressigsäure innerhalb von 30 min, ohne daß der Disulfidring dabei nennenswert angegriffen wurde.

Sieber et al.^[12] synthetisierten Calcitonin, indem sie das Teilstück 1-10 mit vorgefertigtem cyclischem Disulfidring mit der Sequenz 11-32 kondensierten.

Peptide der Struktur Cys-[X]_n-Cys sind also anscheinend für $n = 0, 4$ und 5 unter Bedingungen der Peptidsynthese ausreichend stabil.

Diese Befunde werden durch die Ergebnisse von Rydon^[13-16] gestützt, der zeigen konnte, daß Peptide des Typs Cys-[Gly]_n-Cys für n gleich oder größer 4 durch Luftoxidation fast ausschließlich in das cyclische Peptid Cys-[Gly]_n-Cys übergehen, während sich für $n = 1, 2$ und 3 erhebliche Mengen an Dimeren und Polymeren bilden.

Untersuchungen am Oxytocin und Vasopressin, beides Peptide vom Typ Cys-[X]₄-Cys, zeigen aber, daß der 20-gliedrige Disulfidring nicht immer die stabilste Form darstellt^[17-19]. Behandelt man nämlich Oxytocin und Vasopressin mit schwachen Basen, so bildet sich ein Gemisch von Dimeren und Polymeren, das biologisch völlig inaktiv ist.

Um vergleichbare Zahlenwerte für die Stabilität cyclischer Disulfide des Typs Cys-[X]_n-Cys vor allem auch für $n = 1, 2$ und 3 zu erhalten, synthetisierten wir die Reihe Cys-[Gly]_n-Cys ($n = 0-4$) und die entsprechenden Methylester ($n = 0-5$) und prüften die Stabilität der einzelnen Verbindungen durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mit GSH im gekoppelten Test mit Glutathion-Reduktase^[2,3,20-22]. Inwieweit sich die

so ermittelte Stabilität auch auf Peptide mit anderer Sequenz übertragen läßt, prüften wir an Oxytocin, Vasopressin sowie an einem Peptid aus der Insulin-A-Kette mit der Sequenz Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys.

Um die Synthese zu vereinfachen und die Löslichkeit im Wasser zu erhöhen, ersetzten wir das in der Insulin-A-Kette in Position 7 stehende Cystein durch Alanin.

Material und Methoden

Substanzen

L-Cystein wurde von der Fa. Diamalt AG (München), Glutathion-Reduktase und NADPH von Boehringer Mannheim GmbH, Glutathion und oxidiertes Glutathion von den Zellstoffwerken Waldhof (Mannheim) bezogen. Alle übrigen Reagenzien waren p.a.-Substanzen der Fa. Merck (Darmstadt).

Darstellung der N-Boc-S-Trt-geschützten Peptide

Alle Verbindungen Boc-Cys(Trt)-[Gly]_n-OMe wurden nach demselben Schema durch Umsetzung von Boc-Cys(Trt)-ONp^[23] mit Cys(Trt)-OMe^[24], Gly-OMe, [Gly]₂-OEt^[25], [Gly]₃-OEt^[26] und [Gly]₄-OEt^[27] dargestellt. Die Methylester wurden entweder verseift und mit Cys(Trt)-OMe und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol umgesetzt oder ins Hydrazid überführt und nach der Azidmethode mit Cys(Trt)-OMe gekuppelt (Tab. 1). Diese Strategie ließ sich jedoch zur Synthese von Cys(Trt)-[Gly]₅-Cys(Trt) nicht anwenden, da Boc-Cys(Trt)-[Gly]₅-OEt in allen Lösungsmitteln, in denen sich eine Verseifung durchführen läßt, praktisch unlöslich ist. Wir erhielten Boc-Cys(Trt)-[Gly]₅-Cys(Trt)-OMe durch Kondensation von Boc-Cys(Trt)-[Gly]₃ mit [Gly]₂-Cys(Trt)-OMe und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol. Ähnliche Schwierigkeiten hatten wir bei der Synthese von Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val-Cys(Trt)-OMe. Der Pentapeptid-methylester Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val-OMe war ebenfalls in allen für eine Verseifung in Frage kommenden Lösungsmitteln praktisch unlöslich. Wir stellten daher zunächst das freie Peptid Ala-Ala-Gly-Val durch Kondensation von Z-Ala-Ala mit Gly-Val-OBzl(NO₂) und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol und anschließende katalytische Abhydrierung der Schutzgruppen dar. Das freie Tetrapeptid setzten wir mit Boc-Cys(Trt)-ONSu in Dioxan/Wasser zum Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val um, das dann mit Cys(Trt)-OMe und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol ins Hexapeptid überführt wurde.

Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe synthetisierten wir, indem wir oxidiertes Glutathion mit Perbenzoesäure in den Thiosulfinsäureester überführten (analog zur Synthese von Cys(SG) in l.c.^[21]) und anschließend mit Boc-Cys-

(Trt)-Gly-Cys-OMe umsetzten. Das dabei anfallende Reaktionsgemisch wurde an Kieselgel im Laufmittel Butanol/Eisessig/Wasser 4:1 gereinigt. Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe mit freier SH-Gruppe erhielten wir durch Umsetzung von Boc-Cys(Trt)-Gly mit Cys(S-IP)-OMe und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol und anschließende Abspaltung des Isopropylthioestes mit Mercaptoäthanol in Dimethylformamid.

Cyclisierung zum Disulfidring

Die S-tritylgeschützten Methylester wurden verseift oder direkt mit Jod in Methanol nach l.c.^[28,29] cyclisiert. Nach beendeter Reaktion wurde das überschüssige Jod mit Thiosulfat reduziert, das Methanol abdestilliert, der beim Einengen ausfallende Triphenylmethylmethylläther abfiltriert und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die teilweise gut wasserlöslichen cyclischen Disulfide wurden entweder mit Essigester (*n* = 1,2,3) oder mit *n*-Butanol (*n* = 4,5) extrahiert und anschließend kristallisiert. Die entsprechenden cyclischen Disulfid-methylester fielen dabei in wesentlich besseren Ausbeuten und in reinerer Form an als die entsprechenden Derivate mit freier CO₂H-Gruppe. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Methylester sich bei der Isolierung mit Essigester relativ gut aus Wasser extrahieren lassen, während die Verbindungen mit freier CO₂H-Gruppe besser wasserlöslich sind und sich mit Essigester bzw. Butanol nur schwer extrahieren lassen. Einen signifikanten Gang in der Ausbeute mit steigender Ringgröße konnten wir nicht beobachten. Cyclocystin und Cyclocystin-methylester stellten wir nach l.c.^[19], das entsprechende Diketopiperazin nach l.c.^[30] dar.

Als Beweis dafür, daß es sich bei den Cyclisierungsprodukten um die monomeren Verbindungen handelt, bestimmten wir die Molekulargewichte sämtlicher Verbindungen dampfdruckosmometrisch. Außerdem bestimmten wir zum Vergleich das Molekulargewicht einiger ausreichend flüchtiger Verbindungen massenspektrometrisch*.

Abspaltung des Boc-Restes

Zur Abspaltung des Boc-Restes wurden die entsprechenden Verbindungen entweder 2 h mit 98proz. Ameisensäure oder 30 min mit 1N HCl in Eisessig behandelt. Anschließend wurde ein Teil des Lösungsmittels im Vak. abdestilliert und das Peptid mit Äther gefällt. Die Ausbeuten waren nahezu quantitativ. Cys-Cys × HCl wurde dabei nur als schmierige hygroskopische Masse erhalten. Es wurde daher in Methanol mit Triäthylamin in das freie Peptid überführt. Sämtliche Peptide waren chromatographisch rein in den Systemen Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:6:24:20.

* Herrn Dr. König, Chemisches Institut der Universität Tübingen, danken wir für die Aufnahme der Massenspektren.

Tab. 1. Ausbeuten, Schmelzpunkte und Drehwerte (a) sowie Analysen (b) der synthetisierten *N*-Boc-S-Trt-geschützten Verbindungen.Abkürzungen siehe Anmerkung^b.

a)	Ausbeute ^a [%]	Schmp. ^b [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (<i>c</i> = 1, in Methanol)	Mol.-Gew.
Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)-OMe ^[30]	85	75 – 77 (Zers.)	1,5 ⁰	823,1
Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt) (DCHA-Salz) ^[9]	76	155 – 157 (Ac)	18,6 ⁰	990,4
Boc-Cys(Trt)-Gly-OMe	90	167 – 168 (EtOH/PÄ)	6,4 ⁰	534,7
Boc-Cys(Trt)-Gly-N ₂ H ₃	80	104 – 106 (Ac/PÄ)	4,2 ⁰	534,7
Boc-Cys(Trt)-Gly	83	84 – 86 (EE/PÄ)	12,2 ⁰	520,7
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt)-OMe	85	amorph	20,2 ⁰	880,2
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt)	82	amorph	20,5 ⁰	866,1
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -OEt	76	Öl	–	605,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -N ₂ H ₃	82	159 – 160 (Ac/PÄ)	8,4 ⁰	591,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ (DCHA-Salz)	44	124 – 127 (Ac/PÄ)	8,0 ⁰	759,0
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -Cys(Trt)-OMe	91	amorph	16,3 ⁰	937,2
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -Cys(Trt)	74	112 – 115 (EtOH)	19,1 ⁰	923,2
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -OEt	82	157 – 158 (EE/PÄ)	9,3 ⁰	662,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -N ₂ H ₃	84	182 – 183 (MeOH/Ä)	9,5 ⁰ (DMF)	648,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃	74	95 – 98 (EE/PÄ)	–	634,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -Cys(Trt)-OMe	87	145 – 147 (Ä/PÄ)	12,5 ⁰	994,3
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -Cys(Trt)	81	amorph	14 ⁰	980,2
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -OEt	95	189 – 190 (Chl/PÄ)	9,5 ⁰	719,9
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -N ₂ H ₃	96	190 – 192 (MeOH)	10 ⁰ (DMF)	705,9
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄	63	125 – 128 (MeOH/Ä)	2 ⁰	691,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -Cys(Trt)-OMe	72	182 – 184 (Zers.)	24 ⁰	1051,3
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -Cys(Trt)	80	amorph	9 ⁰	1037,3
Boc-[Gly] ₂ -Cys(Trt)-OMe	78	144 – 145 (EE/PÄ)	12 ⁰	591,7
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₅ -Cys(Trt)-OMe	77	181 – 183 (EE/PÄ)	0 ⁰	1108,4
Z-Ala-Ala-Gly-Val-OBzl(NO ₂) ^b	85	157 – 158 (EE/PÄ)	–14,8 ⁰ (DMF)	585,6
Ala-Ala-Gly-Val	95	– (H ₂ O/MeOH)	–22,5 ⁰ (H ₂ O)	316,4
Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val	70	203 – 205 (Zers.) (EE)	–4,5 ⁰ (DMF)	762,0
Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val-Cys(Trt)-OMe	55	212 – 215 (Zers.) (EtOH)	3 ⁰ (DMF)	1121,5
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(S-IP)-OMe ^b	48	58 – 62 (Zers.)	–23 ⁰	712,0
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe	85	amorph	–14 ⁰	637,8

^a Die Ausbeuten beziehen sich auf die jeweilige Vorstufe.^b Abkürzungen: Ä = Äther, Ac = Aceton, EtOH = Äthanol, Chl = Chloroform, DCHA-Salz = Dicyclohexylammoniumsalz, DMF = Dimethylformamid, EE = Essigsäureäthylester, MeOH = Methanol, PÄ = Petroläther 60–90°C, Zers. = Zersetzung, OBzl(NO₂) = *p*-Nitrobenzylester, S-IP = S-Isopropylthio.

Tab. 1. Forts.

b)	% C		% H		% N		% S	
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt)-OMe ^[30]	72,96	72,6	6,12	6,3	3,40	3,7	7,79	7,6
Boc-Cys(Trt)-Cys(Trt) (DCHA-Salz) ^[9]	73,98	74,2	7,22	7,5	4,24	4,0	6,48	6,5
Boc-Cys(Trt)-Gly-OMe	67,39	66,9	6,41	6,2	5,24	5,0	6,00	5,9
Boc-Cys(Trt)-Gly-N ₂ H ₃	65,15	64,8	6,41	6,4	10,48	10,5	6,00	5,8
Boc-Cys(Trt)-Gly	66,89	66,8	6,19	6,3	5,38	5,4	6,16	6,0
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt)-OMe	70,96	70,5	6,07	6,1	4,77	4,9	7,29	7,0
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt)	70,72	70,5	5,94	6,1	4,85	5,0	7,40	7,1
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -OEt	65,43	64,8	6,49	6,6	6,94	7,1	5,29	5,0
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -N ₂ H ₃	62,92	62,7	6,30	6,1	11,84	11,9	5,42	5,3
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ (DCHA-Salz)	68,04	67,8	7,70	7,6	7,38	7,2	4,22	4,1
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -Cys(Trt)-OMe	69,21	69,1	6,02	6,05	5,98	5,85	6,84	6,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₂ -Cys(Trt)	68,95	68,6	5,89	5,8	6,07	6,2	6,95	6,8
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -OEt	63,42	62,9	6,39	6,2	8,45	8,55	4,84	4,6
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -N ₂ H ₃	61,10	60,7	6,21	6,35	12,95	13,0	4,94	4,7
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃	62,44	62,8	6,03	6,3	8,83	8,7	5,05	5,0
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -Cys(Trt)-OMe	67,65	67,3	5,98	5,85	7,05	7,0	6,45	6,2
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₃ -Cys(Trt)	67,39	67,2	5,86	5,7	7,15	7,3	6,54	6,3
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -OEt	61,73	61,4	6,30	6,2	9,73	9,8	4,45	4,1
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -N ₂ H ₃	59,55	59,3	6,14	6,3	13,89	13,8	4,54	4,3
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄	60,77	60,4	5,97	6,05	10,12	9,8	4,64	4,5
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -Cys(Trt)OMe	66,26	65,8	5,94	5,9	7,99	7,8	6,10	6,2
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₄ -Cys(Trt)	66,00	65,6	5,83	5,9	8,10	8,1	6,18	6,0
Boc-[Gly] ₂ -Cys(Trt)-OMe	64,95	65,3	6,30	6,5	7,10	7,0	5,42	5,4
Boc-Cys(Trt)-[Gly] ₅ -Cys(Trt)-OMe	65,02	64,7	5,91	6,1	8,85	8,6	5,79	5,5
Z-Ala-Ala-Gly-Val-OBzl(NO ₂) ^a	57,43	57,3	6,02	5,9	11,96	11,8	—	—
Ala-Ala-Gly-Val	49,35	48,9	7,65	7,5	17,71	17,5	—	—
Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val	63,05	62,8	6,75	6,7	9,19	9,1	4,21	4,0
Boc-Cys(Trt)-Ala-Ala-Gly-Val-Cys(Trt)-OMe	67,47	67,3	6,47	6,45	7,49	7,6	5,72	5,5
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys (S-IP)-OMe ^a	60,73	60,3	6,37	6,3	5,90	6,0	13,51	13,2
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe	62,14	61,9	6,16	6,2	6,59	6,4	10,06	9,7

^a Abkürzungen: OBzl(NO₂) = *p*-Nitrobenzylester, -S-IP = -S-Isopropylthio-.

Austauschreaktion

Die Untersuchung der Austauschreaktion wurde bereits l.c.^[2,3] ausführlich beschrieben. Cys(Trt)-Gly-Cys(SG)-OMe löste sich nur, wenn der Pufferlösung 5–10% Dimethylformamid zugesetzt wurden. Der Zusatz von Dimethylformamid störte den enzymatischen Test nicht.

Ergebnisse und Diskussion

Testsystem: Die Stabilität der cyclischen Disulfide untersuchten wir durch Bestimmung ihrer Reaktionsgeschwindigkeit mit Glutathion. Für diesen Fall steht als Indikatorreaktion die gekoppelte

Tab. 2. Ausbeuten, Schmelzpunkte, Drehwerte und Molekulargewichte (a) sowie Analysen (b) der synthetisierten Boc-geschützten cyclischen Disulfid-methylester.

Drehwerte, Molekulargewichte und Analysen nach Abspaltung des Boc-Restes (c).

a)	Ausbeute ^a [%]	Schmp. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c = 1)	Mol.-Gew. ^b Ber. Gef.	
Boc-Cys-Cys-OMe ^[30]	43	181 – 182	– 67 ⁰ (MeOH)	336,4	336 (m) 305 (d)
Boc-Cys-Gly-Cys-OMe	44	133 – 135 (Z)	– 82,5 ⁰ (MeOH)	393,5	393 (m) 350 (d)
Boc-Cys-[Gly] ₂ -Cys-OMe	30	148 – 150 (Z)	– 78 ⁰ (MeOH)	450,5	450 (m) 408 (d)
Boc-Cys-[Gly] ₃ -Cys-OMe	35	196 – 199 (Z)	– 59 ⁰ (DMF)	507,6	440 (d)
Boc-Cys-[Gly] ₄ -Cys-OMe	45	194 – 197 (Z)	– 30,5 ⁰ (DMF)	564,7	495 (d)
Boc-Cys-[Gly] ₅ -Cys-OMe	48	190 – 194 (Z)	– 12 ⁰ (DMF)	621,7	518 (d)
Boc-Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe	63	223 – 225 (Z)	– 28 ⁰ (DMF)	634,8	576 (d)
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe _{SG}	38	99 – 103 (Z)	– 72 ⁰ (MeOH)	943,2	–

b)	% C		% H		% N		% S	
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Boc-Cys-Cys-OMe ^[30]	42,84	42,7	5,99	5,9	8,33	8,2	19,06	18,8
Boc-Cys-Gly-Cys-OMe	42,73	43,1	5,89	5,9	10,68	10,5	16,30	15,9
Boc-Cys-[Gly] ₂ -Cys-OMe	42,65	42,8	5,82	5,9	12,44	12,4	14,23	13,9
Boc-Cys-[Gly] ₃ -Cys-OMe	42,59	42,6	5,76	5,8	13,80	14,1	12,63	12,6
Boc-Cys-[Gly] ₄ -Cys-OMe	42,54	42,4	5,71	5,6	14,88	14,6	11,36	11,2
Boc-Cys-[Gly] ₅ -Cys-OMe	42,50	42,2	5,67	5,7	15,77	15,5	10,32	10,05
Boc-Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe	47,30	47,1	6,67	6,6	13,24	13,2	10,10	10,25
Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe _{SG}	54,76	54,0	5,77	5,9	8,91	8,65	10,20	10,1

c)	$[\alpha]_D^{25}$ (c = 1, DMF)	Mol.-Gew.		% C		% H		% N		% S	
		Ber.	Gef. ^c	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Cys-Cys-OMe × HCl	– 7,6 ⁰	272,8	250	30,82	31,0	4,80	4,85	10,27	10,1	23,51	23,1
Cys-Gly-Cys-OMe × HCl	– 99 ⁰	329,8	310	32,77	32,4	4,89	4,9	12,74	12,5	19,44	19,2
Cys-[Gly] ₂ -Cys-OMe × HCl	– 52,5 ⁰	386,9	346	34,15	34,3	4,95	4,8	14,48	14,6	16,58	16,3
Cys-[Gly] ₃ -Cys-OMe × HCl	– 17 ⁰	443,9	385	35,17	34,9	5,00	4,9	15,78	15,8	14,45	14,2
Cys-[Gly] ₄ -Cys-OMe × HCl	– 40 ⁰	501,0	455	35,96	35,8	5,03	5,1	16,78	16,6	12,80	12,5
Cys-[Gly] ₅ -Cys-OMe × HCl	+ 90,5 ⁰	558,1	376	36,59	36,4	5,06	5,1	17,57	17,3	11,49	11,2
Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe × HCO ₂ H	– 13 ⁰	580,7	428	43,44	43,1	6,25	6,2	14,47	14,2	11,04	11,0

^a Bezogen auf *S*-tritylgeschützte Verbindung.^b m = massenspektrometrisch, d = dampfdruckosmometrisch in DMF.^c Dampfdruckosmometrisch in DMF.

Tab. 3. Ausbeuten, Schmelzpunkte, Drehwerte und Molekulargewichte (a) sowie Analysen (b) der synthetisierten Boc-geschützten cyclischen Disulfide mit freier CO₂H-Gruppe.

Drehwerte, Molekulargewichte und Analysen nach Abspaltung des Boc-Restes (c). DCHA-Salz = Dicyclohexylammoniumsalz.

a)

	Ausbeute ^a [%]	Schmp. [°C]	$[\alpha]_D^{25}$ (c = 1)	Mol.-Gew. Ber.	Gef. ^b
$\text{Cys-Cys}^{[30]}$	30	308 (Z)	308 ⁰ (DMSO)	204,3	155
Boc-Cys-Cys (DCHA-Salz)	72	183–184	– 95 ⁰ (MeOH)	503,7	390
Boc-Cys-Gly-Cys	15	amorph	– 72 ⁰ (MeOH)	379,5	344
Boc-Cys-[Gly] ₂ -Cys	12	185–187 (Z)	– 86 ⁰ (MeOH)	436,5	382
Boc-Cys-[Gly] ₃ -Cys	30	193–195 (Z)	– 57 ⁰ (DMF)	493,6	415
Boc-Cys-[Gly] ₄ -Cys	26	184–186 (Z)	– 83,5 ⁰ (DMF)	550,6	486

b)

	% C		% H		% N		% S	
	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
$\text{Cys-Cys}^{[30]}$	35,28	35,2	3,95	3,9	13,71	13,5	31,39	31,45
Boc-Cys-Cys (DCHA-Salz)	54,84	54,8	8,21	8,1	8,34	8,2	12,73	13,0
Boc-Cys-Gly-Cys	41,15	41,4	5,58	5,7	11,07	11,0	16,90	16,7
Boc-Cys-[Gly] ₂ -Cys	41,27	40,8	5,54	5,5	12,84	12,5	14,69	14,8
Boc-Cys-[Gly] ₃ -Cys	41,37	40,9	5,51	5,6	14,19	13,9	12,99	12,6
Boc-Cys-[Gly] ₄ -Cys	41,45	41,35	5,49	5,6	15,26	15,4	11,65	11,4

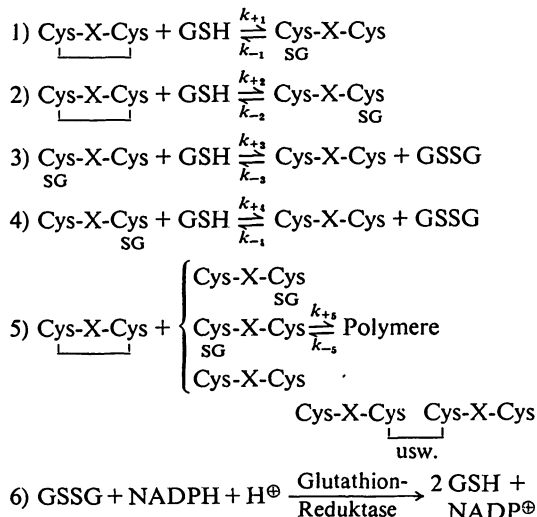
c)

	$[\alpha]_D^{25}$ (c = 1, DMF)	Mol.-Gew.		% C		% H		% N		% S	
		Ber.	Gef. ^b	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
Cys-Cys ^[31]	– 29 ⁰ (1N HCl)	222,3	195	32,42	32,2	4,53	4,5	12,60	12,5	28,85	28,6
Cys-Gly-Cys × HCl	– 52,5 ⁰	315,8	288	30,43	30,1	4,47	4,5	13,31	13,0	20,31	19,8
Cys-[Gly] ₂ -Cys × HCl	– 28 ⁰	372,9	350	32,21	31,9	4,60	4,5	15,03	14,8	17,20	16,9
Cys-[Gly] ₃ -Cys × HCl	– 6,5 ⁰	429,9	406	33,53	33,8	4,69	4,6	16,29	16,0	14,92	14,6
Cys-[Gly] ₄ -Cys × HCO ₂ H	– 70,5 ⁰	496,5	478	36,29	35,9	4,87	5,0	16,93	16,6	12,92	12,5

^a Bezogen auf S-tritylgeschützte Verbindung.^b Dampfdruckosmetrisch in DMF.

enzymatische Reduktion des oxidierten Gluthathions zur Verfügung (Gl. 6), die die unmittelbare Verfolgung der Reaktion gestattet^[2,3,20-22].

In dem untersuchten System sind prinzipiell folgende Teilreaktionen zu berücksichtigen:



Die in unserem Fall interessierenden Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} bzw. k_{+2} lassen sich aus der zeitlichen Abnahme der NADPH-Konzentration nur berechnen, wenn Reaktion 3 bzw. 4 wesentlich schneller abläuft als Reaktion 1 bzw. 2. Nur dann nämlich kann die Rückreaktion von 1 bzw. 2 (k_{-1} bzw. k_{-2} in Gleichung 1 bzw. 2) vernachlässigt werden. Die von oxidiertem Gluthathion abhängigen Folgereaktionen können außer acht gelassen werden (k_{-3} und k_{-4} in Gleichung 3 bzw. 4), da entstehendes GSSG praktisch momentan durch Glutathion-Reduktase und NADPH reduziert wird. Ebenso ist die Polymerisationsreaktion 5 vernachlässigbar, sofern die Auswertung der Umsatzkurven auf die Anfangszeiten beschränkt bleibt, da in diesem Fall die Konzentration der SH-Komponenten gering ist.

Aus den Geschwindigkeitskonstanten von Cystin^[2] und Cys(SG)^[2] (Tab.4) läßt sich jedoch schon rein qualitativ ableiten, daß Reaktion 3 bzw. 4 nur ca. doppelt so schnell abläuft wie Reaktion 1 bzw. 2. Zur Sicherstellung synthetisierten wir außerdem als Modellspezies für die als Zwischenprodukte postulierten Cys(X-SG)-Cys bzw. Cys(X-SG)-Cys die Verbindung Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe und bestimmten ihre Reaktionsgeschwindigkeit mit GSH. Die Reak-

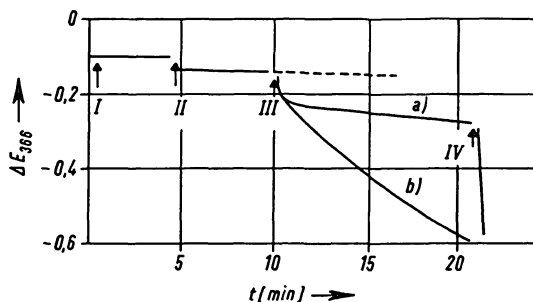


Abb. 1. Thiol-Disulfid-Austauschreaktion von a) Cys-[Gly]₄-Cys; b) Cys-Gly-Cys (jeweils 3×10^{-4} M) mit Glutathion (GSH) (2×10^{-3} M) in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Extinktionsabnahme (NADPH-Abnahme) zeigt das gebildete oxidierte Gluthathion (GSSG) an.

- I Zugabe der Disulfid- und NADPH-Lösung;
- II Zugabe der Glutathion-Reduktase-Lösung;
- III Zugabe von GSH;
- IV Zugabe von GSSG.

tionsgeschwindigkeit dieser Modellspezies liegt in derselben Größenordnung wie die Reaktionsgeschwindigkeit der am schnellsten austauschenden Disulfide (Tab. 4). Dies läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit auch von den oben genannten Zwischenprodukten annehmen. Für die schnell austauschenden Disulfide ist daher eine Akkumulation von Zwischenprodukten möglich, die sich in der zeitlichen Abhängigkeit der NADPH-Abnahme bemerkbar machen kann. Die Rückreaktion von 1 bzw. 2 (k_{-1} bzw. k_{-2}) ist dann nicht mehr zu vernachlässigen. Tatsächlich weichen die Zeit-Umsatzkurven der schnell austauschenden Disulfide von denen der langsam austauschenden Disulfide ab. Die NADPH-Abnahme verläuft nicht mehr streng linear, die Kurven hängen mehr oder weniger durch (Abb. 1). Die gemessenen Zeit-Umsatzkurven entsprechen allerdings nicht exakt dem Kurventyp, den man für reine Akkumulation vom Zwischenprodukt erwarten sollte. Entweder sind die kinetischen Verhältnisse doch etwas komplizierter als angenommen, oder aber kann die Polymerisationsreaktion 5 bei längerer Meßdauer nicht mehr vernachlässigt werden. Eine Folge davon könnte sein, daß während der Messung sich Polymere bilden, die die Lösung geringfügig, mit dem Auge nicht wahrnehmbar, trüben und so eine zu niedrige NADPH-Abnahme vortäuschen. Die zeitliche Ab-

Tab. 4. Relative Reaktionsgeschwindigkeit cyclischer Disulfide ($3 \times 10^{-4}M$) mit GSH ($2 \times 10^{-3}M$). Zum Vergleich sind auch einige nicht cyclische Disulfide mitaufgeführt.

Disulfid	-CO ₂ H [$\mu\text{Mol NADPH} \times l^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$]	-methylester [$\mu\text{Mol NADPH} \times l^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$]
<u>Cys-Cys</u> *	ca. 2*	—
Cys-Cys	9	ca. 3
Cys-Gly-Cys	175	100
Cys-[Gly] ₂ -Cys	133	70
Cys-[Gly] ₃ -Cys	81	50
Cys-[Gly] ₄ -Cys	10	38
Cys-[Gly] ₅ -Cys	—	30
Vasopressin	—	30
Oxytocin	—	10
Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe	—	14
Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe SG	—	180
Cys(SG)	200	—
Cystin	80	—
Cys(S-CH ₃)	25	—
Cys(S- <i>t</i> -Butyl)	3	—
Cys(S- <i>i</i> -Propyl)	8	—

* Diese Verbindung hat keine freie CO₂H-Gruppe. Sie wurde jedoch der Übersichtlichkeit halber in dieser Spalte aufgeführt.

hängigkeit der NADPH-Abnahme in den ersten Minuten der Reaktion sollte aber trotzdem ein Maß für die relative Stabilität der cyclischen Disulfide sein.

Wir verzichteten daher auf die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und verwendeten zur Bestimmung der relativen Umsatzgeschwindigkeit mit GSH die aus der Anfangssteigung ermittelten $\mu\text{Mol NADPH} \times l^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$. Diese Werte liefern bei gleicher GSH- und Disulfid-Konzentration direkt die relative Stabilität der cyclischen Disulfide (Tab. 4, Abb. 2).

Austauschraten

In Tab. 4 sind die relativen Umsatzgeschwindigkeiten der synthetisierten Verbindungen mit GSH bei konstanter GSH- und Disulfid-Konzentration

zusammengestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Verbindungen variieren sehr stark und zwar zunächst in Abhängigkeit von der Anzahl der Aminosäuren, die sich innerhalb des Disulfidringes befinden. Cyclocystin (Cys-Cys) und sein Diketopiperazin sind erstaunlich stabil und zeigen wenig Neigung zum Disulfidaustausch. Die Reaktionsgeschwindigkeit mit GSH liegt ungefähr in derselben Größenordnung wie bei den *S*-Alkylthiocysteinen. Die Stabilität nimmt für Cys-Gly-Cys ($n = 1$) sprunghaft um über eine Zehnerpotenz ab und steigt dann mit steigendem n für $n = 4$ und 5 wieder auf Werte, die mit den Werten für $n = 0$ vergleichbar sind.

Die entsprechenden Methylester sind dabei mit Ausnahme von Cys-[Gly]₄-Cys-OMe in Übereinstimmung mit dem vermutlichen Reaktionsmecha-

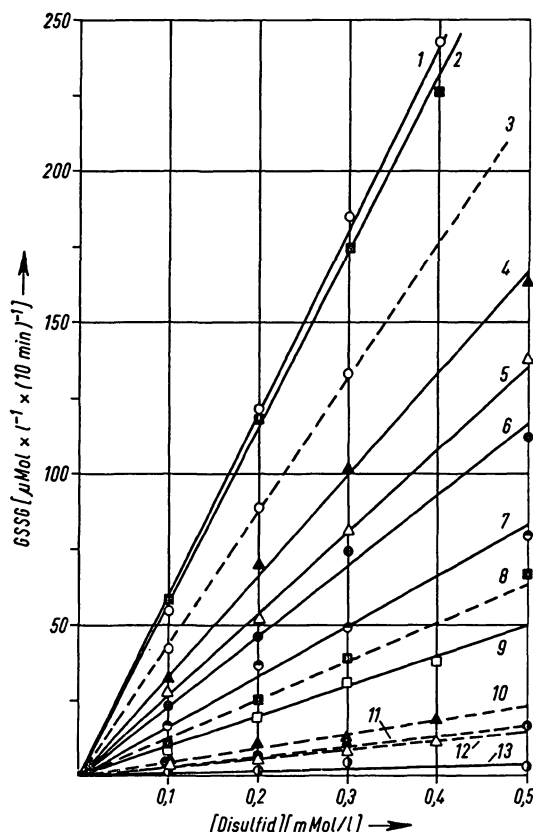


Abb. 2. Thiol-Disulfid-Austauschgeschwindigkeit (in μMol gebildetem oxid. Glutathion (GSSG) pro l und 10 min) von cyclischen Disulfiden mit Glutathion bei konstanter Glutathionkonzentration ($2 \times 10^{-3}\text{M}$) in Abhängigkeit von der Disulfidkonzentration.

- 1 ○—○ Cys(Trt)-Gly-Cys-OMe_{SG}
- 2 ■—■ Cys-Gly-Cys
- 3 ○---○ Cys-[Gly]₂-Cys
- 4 ▲—▲ Cys-Gly-CysOMe
- 5 △—△ Cys-[Gly]₃-Cys
- 6 ●—● Cys-[Gly]₂-CysOMe
- 7 ○—○ Cys-[Gly]₃-CysOMe
- 8 ■---■ Cys-[Gly]₄-CysOMe
- 9 □—□ Cys-[Gly]₅-CysOMe
- 10 ▲—▲ Cys-Ala-Ala-Gly-Val-CysOMe
- 11 ●---● Cys-[Gly]₄-Cys
- 12 △---△ Cys-Cys
- 13 ○—○ Cys-Cys-OMe

nismus^[1,2] etwas stabiler als die entsprechenden Verbindungen mit freier CO_2H -Gruppe. Die Ausnahmestellung von Cys-[Gly]₄-Cys können wir bisher nicht interpretieren.

Ein Vergleich einiger cyclischer Disulfide mit gleicher Ringgröße, jedoch verschiedener Aminosäuresequenz innerhalb des Disulfidringes (Oxytocin, Vasopressin, Cys-[Gly]₄-Cys-OMe, Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe, alles Peptide des Typs $n = 4$) zeigt, daß die Stabilität außer von der Ringgröße auch noch von der Aminosäuresequenz innerhalb des Disulfidringes abhängt. Sie variiert zwischen den Extremen Oxytocin und Cys-[Gly]₄-Cys-OMe um den Faktor 4.

Vergleicht man die Stabilität der cyclischen Disulfide mit der Stabilität einiger in Tab. 4 mitaufgeführter *S*-Alkylthiocysteine, von denen wir zeigen konnten, daß sie sich zur Peptidsynthese einsetzen lassen^[32,33], so läßt sich daraus schließen, daß sich die cyclischen Disulfide Cys-[X]_n-Cys mit $n = 0, 4, 5$ und wahrscheinlich auch höhere Analoge ebenfalls zur Peptidsynthese (Fragmentkondensation) einsetzen lassen. Die cyclischen Disulfide mit $n = 1, 2$ und 3 sind unter Bedingungen der Peptidsynthese wahrscheinlich nicht genügend stabil, auch wenn man berücksichtigt, daß durch Änderung der Sequenz innerhalb des Ringes die Stabilität sich beträchtlich ändern kann.

Frau Dr. A.-M. Fretzdorff danken wir für die Durchführung der Analyse. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

Literatur

- ¹ I. Mitteil.: Weber, U. & Hartter, P. (1970) *diese Z.* **351**, 1384–1388.
- ² II. Mitteil.: Weber, U., Hartter, P. & Flohé, L. (1970) *diese Z.* **351**, 1389–1394.
- ³ III. Mitteil.: Hartter, P. & Weber, U. (1973) *diese Z.* **354**, 365–370.
- ⁴ Hiskey, R. G. & Tucker, W. P. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 4789–4794; 4794–4797.
- ⁵ Hiskey, R. G. & Smith, R. L. (1968) *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 2677–2681.
- ⁶ Hiskey, R. G. & Sparrow, J. T. (1970) *J. Org. Chem.* **35**, 215–220.
- ⁷ Hiskey, R. G. & Ward, B. F. (1970) *J. Org. Chem.* **35**, 1118–1121.

- ⁸ Zahn, H. & Schmidt, G. (1970) *Liebigs Ann. Chem.* **731**, 91–100; 101–112.
- ⁹ Berndt, H., Klostermeyer, H. & Zahn, H. (1972) *Liebigs Ann. Chem.* **759**, 114–120.
- ¹⁰ Zahn, H., Berndt, H., Wachtendonk, D. von & Klostermeyer, H. (1973) in *Peptides*, Proc. 11th Eur. Peptide Symp. Vienna, 1971 (Nesvadba, H., Hrsg.) S. 101–106, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam.
- ¹¹ Mühlemann, M., Titov, M. I., Schwyzer, R. & Rudinger, J. (1972) *Helv. Chim. Acta* **55**, 2854–2860.
- ¹² Sieber, P., Brugger, M., Kamber, B., Riniker, B. & Rittel, R. W. (1968) *Helv. Chim. Acta* **51**, 2057–2061.
- ¹³ Heaton, G. S., Rydon, H. N. & Schonfield, J. A. (1956) *J. Chem. Soc.* 3157–3168.
- ¹⁴ Large, D. G., Rydon, H. N. & Schonfield, J. A. (1961) *J. Chem. Soc.* 1749–1751.
- ¹⁵ Jarvis, D., Rydon, H. N. & Schonfield, J. A. (1961) *J. Chem. Soc.* 1752–1765.
- ¹⁶ Hardy, P. M., Ridge, B., Rydon, H. N. & S. P. Serrao, F. O. dos (1971) *J. Chem. Soc. C* 1722–1731.
- ¹⁷ Ressler, C. (1958) *Science* **128**, 1281–1282.
- ¹⁸ Schally, A. V. & Barrett, J. F. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 2497–2499.
- ¹⁹ Schally, A. V. & Guillemin, R. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 1038–1041.
- ²⁰ Phil, A., Eldjarn, L. & Bremer, J. (1957) *J. Biol. Chem.* **227**, 339–345.
- ²¹ Paglia, D. E. & Valentine, W. N. (1967) *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 158–169.
- ²² Flohé, L. & Brand, I. (1970) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **8**, 156–161.
- ²³ Schnabel, E., Klostermeyer, H. & Berndt, H. (1971) *Liebigs Ann. Chem.* **749**, 90–108.
- ²⁴ Zervas, L. & Photaki, I. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 3887–3897.
- ²⁵ Fischer, E. (1901) *Chem. Ber.* **34**, 2868–2877.
- ²⁶ Lautsch, W. & Kräge, H.-J. (1956) *Chem. Ber.* **89**, 737–742.
- ²⁷ Goldschmidt, S. & Lautenschlager, H. (1953) *Liebigs Ann. Chem.* **580**, 68–82.
- ²⁸ Kamber, B. & Rittel, W. (1968) *Helv. Chim. Acta* **51**, 2061–2064.
- ²⁹ Kamber, B. (1971) *Helv. Chim. Acta* **54**, 398–422.
- ³⁰ Kamber, B. (1971) *Helv. Chim. Acta* **54**, 927–930.
- ³¹ Wade, R., Winitz, M. & Greenstein, J. P. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 373–377.
- ³² Weber, U., Herzog, K.-H., Grossmann, H., Hörnle, S. & Weitzel, G. (1969) *diese Z.* **350**, 1425–1429.
- ³³ Weber, U., Herzog, K.-H., Grossmann, H., Hartter, P. & Weitzel, G. (1971) *diese Z.* **352**, 419–429.