

Synthese und Stabilität von cyclischen Disulfiden der Struktur Cys-X-Cys-OMe^[1–4]

Ulrich Weber und Peter Hartter

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. Dezember 1973)

Zusammenfassung: Die Synthese der cyclischen Disulfide des Cystins der Struktur Cys-X-Cys-OMe (X = Gly, Ala, Val, Leu, Glu, Phe, Lys) wird beschrieben. Die relative Stabilität dieser Verbindungen wurde bestimmt durch Untersuchung der Reaktionsgeschwindigkeit der synthetisierten

Verbindungen mit Glutathion. Als Indikatorreaktion diente die enzymatische Bestimmung des bei dieser Reaktion gebildeten oxidierten Glutathions mit Glutathion-Reduktase. Die Stabilität nimmt in der Reihenfolge für X = Lys < Gly ≈ Ala < Leu ≈ Val < Glu < Phe zu.

Synthesis and stability of cyclic cystine peptides Cys-X-Cys-OMe

Summary: The synthesis of the cyclic cystine peptides Cys-X-Cys-OMe (X = Gly, Ala, Val, Leu, Glu, Phe, Lys) is described. The relative stability of these compounds was investigated by measuring the reaction velocity of the synthesized

compounds with glutathione. As indicator reaction we used the enzymatic evaluation of the oxidized glutathione by glutathione reductase. The stability increases in the order X = Lys < Gly ≈ Ala < Leu ≈ Val < Glu < Phe.

In l.c.^[4] untersuchten wir die Stabilität von cyclischen Disulfiden des Cystins in Abhängigkeit von der Ringgröße. Wir stellten dabei fest, daß die Stabilität nicht nur von der Ringgröße, sondern auch von der Aminosäuresequenz innerhalb des Ringes abhängt. So schwankt die Stabilität der Verbindungen Oxytocin, Vasopressin, Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe und Cys-[Gly]₄-Cys-OMe, alles Verbindungen gleicher Ringgröße, um den Faktor 4. Oxytocin ist am stabilsten, Cys-[Gly]₄-Cys-OMe ist am wenigsten stabil (Tab. 1).

Tab. 1. Relative Stabilität cyclischer Disulfide gleicher Ringgröße.

| Disulfid | $\mu\text{Mol NADPH} \times$ $t^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$ |
|--|---|
| <u>Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂</u> (Oxytocin) | 10 |
| <u>Cys-Ala-Ala-Gly-Val-Cys-OMe</u> | 14 |
| <u>Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Lys-Gly-NH₂</u> (Vasopressin) | 30 |
| <u>Cys-Gly-Gly-Gly-Gly-Cys-OMe</u> | 38 |

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

Abkürzungen: GSH = Glutathion, GSSG = oxid. Glutathion, Cys(SR) = S-Alkylthiocystein, Boc- = N-t-Butyloxycarbonyl-, Z = Benzyloxycarbonyl-, Trt = Trityl-, -OMe = methylester, -OBu^t = -t-butylester, -ONp = p-Nitrophenylester, -OBz(NO₂) = p-Nitrobenzylester, DÄA = Diäthylammonium.

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

Aus Tab. 1. geht hervor, daß schon geringfügige Änderungen der Sequenz relativ großen Einfluß auf die Stabilität haben. So sinkt die Stabilität von Oxytocin durch Ersatz eines Isoleucins innerhalb des Ringes durch Phenylalanin und eines Leucins außerhalb des Ringes durch Lysin beim (Vasopressin) auf ein Drittel. Ersatz dreier Glycinreste im $\text{Cys-[Gly]}_4\text{-Cys-OMe}$ durch 2 Alanin und 1 Valin erhöht die Stabilität um über das Doppelte.

Um weitere Aufschlüsse über den Einfluß der Sequenz innerhalb des Disulfidringes auf die Stabilität cyclischer Disulfide des Cystins zu erhalten, synthetisierten wir die Verbindungen Cys-X-Cys-OMe ($X = \text{Gly, Ala, Val, Leu, Glu, Phe, Lys}$) und prüften ihre Stabilität durch Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit der synthetisierten Verbindungen mit GSH. Wir wählten Cys-X-Cys-OMe aus zwei Gründen als Modell: Die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Verbindungen mit GSH ist relativ hoch. Dadurch sollten auch geringfügige Stabilitätsänderungen meßbar sein. Zum zweiten sind die Verbindungen präparativ relativ problemlos und ohne allzu großen Zeit- und Arbeitsaufwand herzustellen.

Material und Methoden

Substanzen

L-Cystein wurde von der Fa. Diamalt AG (München), Glutathion-Reduktase und NADPH von Boehringer Mannheim GmbH, Glutathion und oxid. 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 Verbindungen

Die zur Cyclisierung benötigten Verbindungen Boc-Cys(Trt)-X-Cys(Trt)-OMe wurden alle nach demselben Schema dargestellt. Zunächst wurde Boc-Cys(Trt)-ONp mit X-OMe zum Boc-Cys(Trt)-X-OMe umgesetzt. Anschließend wurde zum Boc-Cys(Trt)-X-OH verseift und dann mit Cys(Trt)-OMe und Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol zum Boc-Cys(Trt)-X-Cys(Trt)-OMe gekuppelt.

Die Verbindungen Boc-Cys(Trt)-X-OMe und Boc-Cys(Trt)-X-Cys(Trt)-OMe ließen sich zum Teil nicht kristallisieren und fielen als amorphe Pulver an, die jedoch durch mehrmaliges fraktioniertes Fällen aus Essigsäure-äthylester/Petroläther chromatographisch rein erhalten wurden.

Die Verbindungen Boc-Cys(Trt)-X-OH ließen sich [Ausnahme für $X = \text{Lys(Z)}$] als Diäthylammoniumsalze kristallisieren. Die analytischen Daten der *N*-Boc-*S*-Trt-geschützten Verbindungen sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Cyclisierung zum Disulfid

Die *N*-Boc-*S*-Trt-geschützten Methylester wurden wie in l.c.^[4] beschrieben mit Jod in Methanol cyclisiert. Danach wurden die Boc-geschützten cyclischen Disulfide mit Essigester extrahiert, anschließend aus wenig Essigester kristallisiert und aus Methanol umkristallisiert. Sämtliche Verbindungen waren chromatographisch rein in den Systemen Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:6:24:20. Durch dampfdruckosmometrische und massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung wiesen wir nach, daß es sich bei den Cyclisierungsprodukten um die monomeren Verbindungen handelt (Tab. 3).

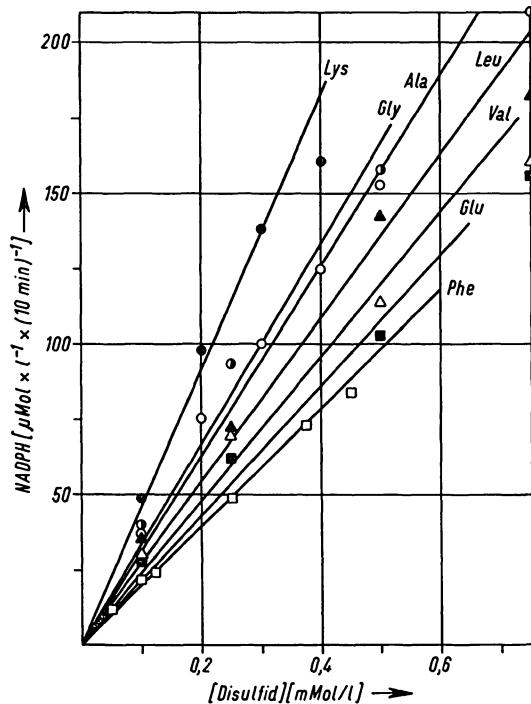


Abbildung. Thiol-Disulfid-Austauschgeschwindigkeit (in μMol gebildetem oxid. Glutathion pro l und 10 min) der cyclischen Disulfide Cys-X-Cys-OMe ($X = \text{Lys, Gly, Ala, Leu, Val, Glu, Phe}$; an den Geraden angegeben) mit Glutathion bei konstanter Glutathionkonzentration ($2 \times 10^{-3}\text{M}$) in Abhängigkeit von der Disulfidkonzentration.

Tab. 2. Ausbeuten und Schmelzpunkte^a (a) und Analysen (b) der synthetisierten *N*-Boc-*S*-Trt-geschützten Verbindungen.

| a) | Ausbeute ^b [%] | Schmelzpunkt ^c [°C] | Mol.-Gewicht | |
|---|------------------------------|-----------------------------------|--------------|--|
| Boc-Cys(Trt)-Gly-OMe | 90 | 167–168 (Ä/PÄ) | 534,7 | |
| Boc-Cys(Trt)-Gly | 83 | 84–86 (EE/PÄ) | 520,7 | |
| Boc-Cys(Trt)-Gly-Cys(Trt)-OMe | 85 | amorph | 880,2 | |
| Boc-Cys(Trt)-Ala-OMe | 82 | 193–195 (EE/PÄ) | 548,7 | |
| Boc-Cys(Trt)-Ala(DÄA-Salz) | 90 | 133–135 (Ac) (Zers.) | 607,8 | |
| Boc-Cys(Trt)-Ala-Cys(Trt)-OMe | 69 | amorph | 894,2 | |
| Boc-Cys(Trt)-Val-OMe | 74 | 187–189 (EE/PÄ) | 564,8 | |
| Boc-Cys(Trt)-Val(DÄA-Salz) | 75 | 142–144 (Ac) (Zers.) | 635,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Val-Cys(Trt)-OMe | 70 | 148–150 (EE/PÄ) | 922,2 | |
| Boc-Cys(Trt)-Leu-OMe | 82 | 158–159 (EE/PÄ) | 578,8 | |
| Boc-Cys(Trt)-Leu(DÄA-Salz) | 92 | 164–166 (Ac) (Zers.) | 648,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Leu-Cys(Trt)-OMe | 80 | amorph | 936,3 | |
| Boc-Cys(Trt)-Phe-OMe | 85 | Öl | 624,8 | |
| Boc-Cys(Trt)-Phe(DÄA/Salz) | 77 | 155–158 (Ac) (Zers.) | 683,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Phe-Cys(Trt)-OMe | 87 | amorph | 970,3 | |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t)-OMe | 84 | 112–115 (EE/PÄ) | 642,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t) (DÄA-Salz) | 74 | 110–115 (Ac) | 722,0 | |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t)-Cys(Trt)-OMe | 65 | amorph | 1008,3 | |
| Boc-Cys(Trt)-Lys(Z)-OMe | 85 | Öl | 739,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Lys(Z) | 77 | amorph | 725,9 | |
| Boc-Cys(Trt)-Lys(Z)-Cys(Trt)-OMe | 70 | amorph | 1084,4 | |

| b) | % C | | % H | | % N | | % S | |
|---|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. |
| Boc-Cys(Trt)-Gly-OMe | 67,39 | 66,9 | 6,41 | 6,2 | 5,24 | 5,0 | 6,00 | 6,1 |
| 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 | 4,6 | 7,29 | 7,1 |
| Boc-Cys(Trt)-Ala-OMe | 67,86 | 67,5 | 6,61 | 6,5 | 5,11 | 5,0 | 5,84 | 5,6 |
| Boc-Cys(Trt)-Ala (DÄA-Salz) | 67,19 | 66,8 | 7,45 | 7,5 | 6,92 | 6,7 | 5,28 | 5,4 |
| Boc-Cys(Trt)-Ala-Cys(Trt)-OMe | 71,19 | 71,0 | 6,20 | 6,4 | 4,70 | 4,7 | 7,17 | 7,1 |
| Boc-Cys(Trt)-Val-OMe | 68,05 | 68,5 | 7,14 | 7,0 | 4,96 | 4,8 | 5,68 | 5,9 |
| Boc-Cys(Trt)-Val (DÄA-Salz) | 68,00 | 67,6 | 7,77 | 7,6 | 6,61 | 6,5 | 5,04 | 5,3 |
| Boc-Cys(Trt)-Val-Cys(Trt)-OMe | 71,63 | 71,4 | 6,45 | 6,6 | 4,56 | 4,8 | 6,95 | 6,8 |
| Boc-Cys(Trt)-Leu-OMe | 68,48 | 68,9 | 7,31 | 7,2 | 4,84 | 4,7 | 5,54 | 5,7 |
| Boc-Cys(Trt)-Leu (DÄA-Salz) | 68,49 | 68,2 | 7,92 | 7,8 | 6,48 | 6,5 | 4,95 | 5,1 |
| Boc-Cys(Trt)-Leu-Cys(Trt)-OMe | 71,84 | 71,6 | 6,57 | 6,4 | 4,49 | 4,6 | 6,85 | 6,9 |
| Boc-Cys(Trt)-Phe (DÄA-Salz) | 70,25 | 69,7 | 7,23 | 6,9 | 6,15 | 6,0 | 4,69 | 5,0 |
| Boc-Cys(Trt)-Phe-Cys(Trt)-OMe | 73,03 | 72,7 | 6,13 | 6,3 | 4,33 | 4,4 | 6,62 | 6,5 |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t)-OMe | 69,13 | 68,9 | 7,21 | 7,1 | 4,36 | 4,2 | 4,99 | 4,9 |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t) (DÄA-Salz) | 66,54 | 66,1 | 7,68 | 7,5 | 5,83 | 5,8 | 4,44 | 4,6 |
| Boc-Cys(Trt)-Glu(γ -OBu ^t)-Cys(Trt)-OMe | 70,28 | 69,6 | 6,50 | 6,6 | 4,17 | 4,3 | 6,36 | 6,3 |
| Boc-Cys(Trt)-Lys(Z) | 67,84 | 67,7 | 6,53 | 6,6 | 5,79 | 5,3 | 4,42 | 4,8 |
| Boc-Cys(Trt)-Lys(Z)-Cys(Trt)-OMe | 70,89 | 70,4 | 6,23 | 6,2 | 5,17 | 5,3 | 5,92 | 6,3 |

^a Die Drehwerte sämtlicher Verbindungen liegen sehr niedrig, in den meisten Fällen unter 5° und wurden daher nicht angegeben.

^b Bezogen auf die jeweils vorhergehende Verbindung.

^c Abkürzungen: Ä = Äther, Ac = Aceton, EE = Essigsäure-äthylester, PÄ = Petroläther, Zers. = Zersetzung.

Tab. 3. 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 | | Schmelzpunkt [°C] | Drehwert (c=1, MeOH) | Mol.-Gew. ^b | |
|--|-----------------------|--|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|
| | [%] | | | | Ber. | Gef. |
| Boc-Cys-Gly-Cys-OMe | 44 | | 133–135 (Zers.) | – 82,5 ⁰ | 393,5 | 393 (m) 305 (d) |
| Boc-Cys-Ala-Cys-OMe | 45 | | 193–195 (Zers.) | – 71 ⁰ | 407,5 | 407 (m) 365 (d) |
| Boc-Cys-Val-Cys-OMe | 37 | | 209–211 (Zers.) | – 55 ⁰ | 435,6 | 435 (m) 385 (d) |
| Boc-Cys-Leu-Cys-OMe | 49 | | 185–186 (Zers.) | – 83,5 ⁰ | 449,6 | 449 (m) 406 (d) |
| Boc-Cys-Phe-Cys-OMe | 54 | | 210–212 (Zers.) | – 111 ⁰ | 483,6 | 483 (m) 455 (d) |
| Boc-Cys-Glu(γ-OBu ^t)-Cys-OMe | 35 | | 176–178 (Zers.) | – 77 ⁰ | 521,7 | 521 (m) 475 (d) |
| Boc-Cys-Lys(Z)-Cys-OMe | 40 | | 175–180 (Zers.) | – 60 ⁰ | 598,8 | 490 (d) |

| b) | % C | | % H | | % N | | % S | |
|--|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. |
| Boc-Cys-Gly-Cys-OMe | 42,73 | 43,1 | 5,89 | 5,9 | 10,68 | 10,5 | 16,30 | 15,9 |
| Boc-Cys-Ala-Cys-OMe | 44,21 | 44,3 | 6,18 | 5,9 | 10,31 | 10,2 | 15,74 | 15,9 |
| Boc-Cys-Val-Cys-OMe | 46,87 | 46,6 | 6,71 | 6,6 | 9,65 | 9,5 | 14,72 | 14,9 |
| Boc-Cys-Leu-Cys-OMe | 48,09 | 48,1 | 6,95 | 6,9 | 9,35 | 9,2 | 14,26 | 14,5 |
| Boc-Cys-Phe-Cys-OMe | 52,16 | 52,6 | 6,04 | 6,2 | 8,69 | 8,8 | 13,26 | 13,2 |
| Boc-Cys-Glu(γ-OBu ^t)-Cys-OMe | 48,35 | 48,1 | 6,76 | 6,8 | 8,06 | 8,0 | 12,29 | 12,6 |
| Boc-Cys-Lys(Z)-Cys-OMe | 52,15 | 52,0 | 6,40 | 6,6 | 9,36 | 9,4 | 10,71 | 11,0 |

| c) | Drehwert (c=1) | Mol.-Gew. | | % C | | % H | | % N | | % S | |
|--|-------------------|-----------|-------------------|-------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| | | Ber. | Gef. ^c | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. | Ber. | Gef. |
| Cys-Gly-Cys-OMe HCl (DMF) | –99 ⁰ | 329,8 | 310 | 32,77 | 32,4 | 4,89 | 4,9 | 12,74 | 12,5 | 19,44 | 19,2 |
| Cys-Ala-Cys-OMe HCOOH (H ₂ O) | –53 ⁰ | 353,4 | 324 | 37,38 | 37,1 | 5,42 | 5,3 | 11,89 | 11,6 | 18,15 | 17,9 |
| Cys-Val-Cys-OMe HCOOH (DMF/H ₂ O, 1:1) | –72 ⁰ | 381,5 | 328 | 40,93 | 41,2 | 6,08 | 6,0 | 11,02 | 10,9 | 16,81 | 16,6 |
| Cys-Leu-Cys-OMe HCOOH (DMF/H ₂ O, 1:1) | –57 ⁰ | 395,5 | 360 | 42,52 | 41,9 | 6,37 | 6,3 | 10,63 | 10,4 | 16,22 | 15,9 |
| Cys-Phe-Cys-OMe HCOOH (DMF) | –13 ⁰ | 429,5 | 375 | 47,54 | 47,4 | 5,40 | 5,3 | 9,78 | 9,6 | 14,93 | 14,8 |
| Cys-Glu-Cys-OMe HCOOH (DMF/H ₂ O, 1:1) | –26 ⁰ | 411,5 | 402 | 37,95 | 38,3 | 5,14 | 5,2 | 10,21 | 10,1 | 15,58 | 15,3 |
| Cys-Lys(Z)-Cys-OMe HCOOH (DMF) | –72 ⁰ | 544,7 | 488 | 48,51 | 48,8 | 6,92 | 6,7 | 10,29 | 10,1 | 11,77 | 11,9 |
| Cys-Lys-Cys-OMe 2 HBr (H ₂ O) | –60 ⁰ | 526,3 | 470 | 29,67 | 29,3 | 4,98 | 4,8 | 10,65 | 10,5 | 12,18 | 11,8 |

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

Abspaltung des Boc-Restes

Zur Abspaltung des Boc-Restes wurden die Boc-geschützten Verbindungen 2 h mit 98proz. Ameisensäure oder 30 min mit 1N HCl in Eisessig behandelt. Anschließend wurde ein Teil des Lösungsmittels abdestilliert und das Peptid gefällt. Die Ausbeuten waren nahezu quantitativ. Sämtliche Peptide waren chromatographisch rein in den Systemen Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin 30:6:24:20.

Im Falle von Boc-Cys-Lys(Z)-Cys-OMe wurde der Boc-Rest und der Z-Rest gleichzeitig mit Bromwasserstoff in Eisessig abgespalten. Bei dieser Behandlung wurde ein Teil des Disulfidringes zerstört. Reines Cys-Lys-Cys-OMe \times 2HBr wurde durch Chromatographie an Silicagel in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 erhalten.

Austauschreaktion

Die Untersuchung der Austauschreaktion (Abbildung) wurde bereits in l.c.^[2-4] ausführlich beschrieben. Die Verbindungen mit X=Val und Phe lösten sich in dem verwendeten Puffer nur schwer. Zur vollständigen Lösung mußte dem Puffer 5–10% Dimethylformamid zugesetzt werden. Dieser Zusatz störte den enzymatischen Test nicht.

Ergebnisse und Diskussion

In l.c.^[4] wurde ausführlich diskutiert, daß die kinetischen Verhältnisse bei der Reaktion von Glutathion mit cyclischen Disulfiden wahrscheinlich nicht mehr so einfach sind wie bei Reaktion von Glutathion mit offenkettigen Disulfiden des Typs Cys(SR). Die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten der untersuchten Verbindungen erhielten wir aus der Steigung der Zeit-Umsatz-Kurve in den ersten Minuten der Reaktion. Sie sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Die Stabilität ist für X = Gly und Ala ungefähr gleich und steigt in der Reihenfolge für X = Leu, Val, Glu, Phe langsam an. Die Verbindung mit X = Lys ist weniger stabil als die mit X = Gly. Die Unterschiede zwischen X = Lys und X = Phe variieren um den Faktor 2–3. Der Stabilitäts-

Tab. 4. Relative Reaktionsgeschwindigkeit cyclischer Disulfide Cys-X-Cys-OMe (X = Lys, Gly, Ala, Leu, Val, Glu, Phe) mit GSH (2×10^{-3} M GSH, 3×10^{-4} M Disulfid) in μ Mol NADPH \times $l^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$.

| Disulfid | μ Mol NADPH \times $l^{-1} \times (10 \text{ min})^{-1}$ |
|-----------------|--|
| Cys-Lys-Cys-OMe | 138 |
| Cys-Gly-Cys-OMe | 100 |
| Cys-Ala-Cys-OMe | 95 |
| Cys-Leu-Cys-OMe | 81 |
| Cys-Val-Cys-OMe | 72 |
| Cys-Glu-Cys-OMe | 65 |
| Cys-Phe-Cys-OMe | 60 |

unterschied der geprüften Verbindungen liegt also in der gleichen Größenordnung wie der Stabilitätsunterschied der Verbindungen in Tab. 1. Aus den Ergebnissen der Verbindungen Cys-X-Cys-OMe lassen sich jedoch die Stabilitätsunterschiede der Verbindungen in Tab. 1 nicht erklären. Zur Klärung des Einflusses der Aminosäuresequenz innerhalb des Disulfidringes auf die Stabilität sind daher noch weitere Untersuchungen nötig.

Wir danken Frau Dr. A.-M. Fretzdorff für die Durchführung der Analysen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für eine Sachbeihilfe.

Literatur

- ¹ Weber, U. & Hartter, P. (1970) *diese Z.* **351**, 1384–1388.
- ² Weber, U., Hartter, P. & Flohé, L. (1970) *diese Z.* **351**, 1389–1394.
- ³ Hartter, P. & Weber, U. (1973) *diese Z.* **354**, 365–370.
- ⁴ Weber, U. & Hartter, P. (1974) *diese Z.* **355**, 189–199, vorstehend.