

149. Der Einfluss von D-Aminosäureresten auf das konformative Verhalten von Kollagenmodellpeptiden

von Peter Frey und Hans Nitschmann

Institut für Organische Chemie der Universität Bern,
Erlachstrasse 9a, CH-3012 Bern

(28. IV. 76)

The influence of D-amino acid residues upon the conformational behaviour of collagen model peptides. – *Summary.* (L-Pro-L-Pro-Gly)₁₀ and (L-Pro-D(L)-Pro-Gly)₁₀ with 10 percent D-Prolin residues have been synthesized by the *Merrifield* technique. Further Poly-(Gly-Pro-Pro) and Poly-(Ala-Gly-Pro) with various amounts of D-amino acid residues have been synthesized by polycondensation of the proper tripeptides. The conformational behaviour of all these polypeptides has been studied by measurements at varying temperatures of optical rotation, circular dichroism and molecular weight. The results show that limited amounts of D-amino acid residues do not impeded collagen-like triple helical conformations. The denaturation temperatures, however, are considerably lowered by D-amino acid residues. The implications of these findings for the understanding of the properties of partially racemized degraded gelatins with relatively low gel melting points are discussed.

Einleitung. – Über Konformationsprobleme von Kollagen, Gelatine und Kollagenmodellpeptiden ist in den letzten zwanzig Jahren sehr viel gearbeitet worden [1]. Mit der Synthese von Modellpeptiden konnte ermittelt werden, welche Aminosäuresequenzen die Konformation der Polyprolin-II-Helix ermöglichen, die weitgehend der Raumform der Einzelketten im nativen Kollagen entspricht, und welche Sequenzen das Zustandekommen der übergeordneten tripelhelikalen Struktur voraussetzt, für die *Ramachandran* [2] und *Crick* [3] nur wenig voneinander abweichende Vorschläge gemacht haben.

Was unseres Wissens noch nie untersucht worden ist, ist die Frage, welchen Einfluss D-Aminosäurereste in Kollagenmodellpeptiden auf deren konformatives Verhalten haben. Zwar haben *Fairweather & Jones* [4] solche D-aminosäurehaltigen Modellpeptide synthetisiert; sie interessierten sich aber nur für ihre Antigen-Eigenschaften.

Zu unseren Untersuchungen wurden wir durch folgende Frage angeregt:

Abgebaute, succinylierte Gelatine, wie sie nach Angaben von *Tourtelotte* [5] [6] hergestellt und als Kolloid für die Herstellung klinisch bewährter Plasmaersatz-Lösungen verwendet wird, hat bei einer Konzentration von 4% einen Gelschmelzpunkt von 8–10°. Erwünschter wäre aber ein Präparat, welches auch beim Abkühlen bis 0° nicht geliert. Kürzlich haben nun *Nitschmann et al.* [7] gefunden, dass man bei geeigneter Modifizierung der Abbaubedingungen der Gelatine vor der Succinylierung Präparate erhalten kann, die sehr viel tiefere Gelschmelzpunkte als die bislang hergestellten zeigen. Mittleres Mol.-Gew. und Polydispersitätspektrum liessen keine signifikante Differenz zwischen den Präparaten erkennen. Der einzig analytisch erfassbare

Unterschied bestand in einem bedeutend höheren Gehalt an D-Aminosäureresten in den Präparaten mit tiefem Gelschmelzpunkt.

Es hatte also bei dem anders geführten Abbau der Gelatine (viel höheres pH und höhere Temperatur bei kürzeren Zeiten) eine partielle Racemisierung stattgefunden; *ca.* 10% der optisch aktiven Aminosäurereste lag, wie *Ramelet* [8] gezeigt hat, in der D-Form vor, gegenüber *ca.* 2% bei den nach *Tourtelotte* hergestellten Präparaten.

Es lag nahe und schien plausibel, einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen partieller Racemisierung und Herabsetzung des Gelschmelzpunktes anzunehmen.

Das Gelieren beim Abkühlen einer warm zubereiteten Gelatinelösung ist eine unvollständige Renaturierung, beruht also auf einer teilweisen Rückbildung der nativen tripelhelikalen Kollagenstruktur. Der Helix-Knäuel-Übergang äussert sich bei Konzentrationen über 2% im sichtbaren Übergang Gel → Sol; bei verdünnteren Lösungen kann er chiroptisch verfolgt werden.

Die Frage ist somit, ob D-Konfiguration einzelner Aminosäurereste in den Gelatinepeptidketten die Rückbildung der Tripelhelix tatsächlich erschwert bzw. die Umwandlungstemperatur *helix* → *coil* herabsetzt.

An der Gelatine selbst ist ein einwandfreier Beweis für den kausalen Zusammenhang zwischen Gehalt an D-Aminosäuren und Gelschmelzpunkt schwer zu erbringen. Grund ist die Polydispersität jeder technischen Gelatine und die Tatsache, dass Racemisierung nicht ohne gleichzeitigen hydrolytischen Abbau durchführbar ist. Nun ist der Gel-Schmelzpunkt bekanntlich auch vom mittleren Mol.-Gew. und von der Molekulargewichtsverteilung abhängig. Für die angestrebte Beweisführung schien es uns deshalb besser, mit synthetischen Kollagenmodellpeptiden zu arbeiten, die ebenfalls tripelhelikale Assoziate bilden, und bei denen der Einfluss von dosiert eingebauten D-Aminosäuren auf das konformative Verhalten bei gegebenem Mol.-Gew. genau beobachtbar sein sollte.

Synthetische Kollagenmodellpeptide, die diesen Namen verdienen, sind bereits in grosser Zahl beschrieben worden [1]. Es handelt sich dabei um Polytripeptide mit Glycin in jeder dritten Stelle und mit einem hohen Prolin- bzw. Hydroxyprolin-gehalt. Für unsere Zwecke stellten wir (Pro-Pro-Gly)₁₀ nach der *Merrifield*-Methode, sowie Poly-(Gly-Pro-Pro) und Poly-(Ala-Gly-Pro) durch Tripeptid-Polykondensation her. Diese Peptide wurden mit L-Aminosäuren sowie mit dosierten Zusätzen von D-Aminosäuren synthetisiert.

Experimenteller Teil¹⁾

Z-Glycin (Z = Carbobenzyoxy), Z-Prolin, Z-Alanin, Prolin, *p*-Nitrophenol, Isobutylchloroformiat and HBr/HAc stammen von *Fluka* AG, Buchs. Das *Merrifield*-Harz stammt von *Merck*, Darmstadt.

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert. Die Reinheit der Ausgangs- und Zwischenprodukte wurde dünnschichtchromatographisch geprüft (Kieselgel G; Laufmittel I = Eisessig/Butanol/Wasser 4:1:1; Laufmittel II = Chloroform).

Synthese von (L-Pro-L-Pro-Gly)₁₀. Diese Substanz wurde nach *Sakakibara et al.* [10] hergestellt. An Stelle der Schutzgruppe Aoc (= Amyloxycarbonyl) wurde Boc (= *t*-Butyloxycarbonyl) verwendet.

¹⁾ Für detaillierte Angaben siehe [9].

Synthese von (L-Pro-D(L)-Pro-Gly)₁₀. Diese Substanz wurde gleich wie (L-Pro-L-Pro-Gly)₁₀ hergestellt, wobei bei jedem Kupplungsschritt 10% Tripeptid mit D-Prolin zugegeben wurde.

Beide Produkte wurden 2mal auf Sephadex G 50 fraktioniert, wobei für die späteren vergleichenden optischen Untersuchungen nur Substanz aus Fraktionen mit dem gleichen Elutionsvolumen verwendet wurde.

Synthese von Poly-(Gly-Pro-Pro). – *Z-Gly-Pro*. 30,6 g Z-Glycinsuccinimidester wurden in 200 ml Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von 11,5 g Prolin und 10,1 g Triäthylamin wurde über Nacht gerührt. Anschliessend wurde das Lösungsmittel i.V. abdestilliert, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Das ausfallende Öl wurde in Essigester aufgenommen und dann mehrmals mit Wasser ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat und Einengen der Lösung konnte das Produkt mit Petroläther ausgefällt werden. Dieses wurde 2mal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 26 g (85%). Smp. 148–150 (Lit. 151°).

Z-Pro-ONp (ONp = Paranitrophenylester). 24,9 g Z-Prolin wurden in 200 ml Methylchlorid gelöst. Nach Zugabe von 20,6 g Dicyclohexylcarbodiimid und 13,9 g *p*-Nitrophenol wurde die Lösung über Nacht gerührt. Der entstandene Harnstoff wurde abfiltriert, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand aus 2-Propanol umkristallisiert. Ausbeute 32,9 g (89%). Smp. 94° (Lit. 94°).

HBr · Pro-ONp. 30 g Z-Pro-ONp wurden in 40 ml HBr/HAc 1:2 gelöst. Nach 30 Min. wurde mit Äther gefällt, das Produkt abgenutscht, mit Äther gewaschen und aus 2-Propanol umkristallisiert. Ausbeute 24,7 g (96%). Smp. 192–193° (Lit. 198–199°).

Z-Gly-Pro-Pro-ONp. 3 g Z-Gly-Pro wurden in 40 ml Methylchlorid gelöst. Zu der auf –20° abgekühlten Lösung wurden zuerst 1,35 g Isobutylchloroformiat und 1,01 g Triäthylamin und, nach 10 Min., 3,17 g HBr · Pro-ONp und 1,01 g Triäthylamin zugegeben. Die Lösung wurde 30 Min. bei –20°, anschliessend 4 Std. bei RT. gerührt. Nun wurde das Lösungsmittel i.V. abdestilliert und das zurückbleibende Öl auf einer Kieselgel 60-Säule (2×10 cm) mit Methylchlorid chromatographiert. Die Fraktionen mit dem gewünschten Produkt wurden eingengt; das resultierende Öl wurde mit Petroläther zerrieben, bis eine feste, leicht bräunliche Substanz entstand. Amorphe Substanz; erweicht bei 40–50°. Ausbeute 3,2 g (61%).

HBr · Gly-Pro-Pro-ONp. 3 g Z-Gly-Pro-Pro-ONp wurden in 5 ml HBr/HAc 1:2 gelöst; nach 30 Min. (RT.) wurde das entstandene Produkt mit 500 ml Äther gefällt. Die überstehende Ätherlösung wurde abdekantiert, das Produkt mehrere Male mit Äther gewaschen und i.V. getrocknet. Amorphes, leicht bräunliches Pulver; stark hygroskopisch. Ausbeute 2,5 g (92%).

Poly-(Gly-Pro-Pro). 2 g HBr · Gly-Pro-Pro-ONp wurden in 1 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Bei Zusatz von 0,43 g N-Methylmorpholin erstarrte die Lösung nach einigen Minuten. Nach mehreren Tagen wurde das entstandene Polymer in Methanol gelöst, mehrere Male mit Äther umgefällt und schliesslich in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Es resultierte ein weisses bis leicht gelbliches Pulver. Ausbeute 0,6–0,9 g (60–90%).

Bei einigen Ansätzen wurden verschiedene Mengen D-Prolin eingesetzt.

Synthese von Poly-(Ala-Gly-Pro). Diese Substanz wurde nach Fairweather [4] hergestellt. Es wurden Polypeptide mit verschiedenen Mengen D-Alanin und D-Prolin hergestellt.

Fraktionierung der Polypeptide. Poly-(Gly-Pro-Pro) wurde auf einer Sephadex G 50 Säule (2,8×92 cm) mit Wasser als Laufmittel fraktioniert. Die Fliessgeschwindigkeit betrug 60 ml/Std. Poly-(Ala-Gly-Pro) wurde auf einer Sephadex G 75 Säule (2,8×85 cm) mit Essigsäure/Wasser 1:1 als Laufmittel fraktioniert. Die Fliessgeschwindigkeit betrug ca. 10 ml/Std. Es wurden jeweils 5 ml-Fractionen aufgefangen. Im Falle von Wasser als Laufmittel wurde die Extinktion bei 230 nm, bei Essigsäure/Wasser die optische Drehung bei 578 nm gemessen.

Optische Drehung in Abhängigkeit der Temperatur. Die Drehung wurde auf einem Perkin Elmer E 141 Polarimeter in einer thermostatisierbaren 10-cm-Zelle bei 578 nm gemessen. Die Konzentration der Polypeptidlösung betrug in jedem Fall 0,15 bis 0,2%. Die Konzentrationen wurden durch Stickstoffbestimmungen (Mikro-Kjehldahl) ermittelt. Die Messungen wurden mit Polypeptiden, welche aus Fraktionen mit gleichen Elutionsvolumina stammten, durchgeführt, um Produkte mit gleichem Mol.-Gew. miteinander vergleichen zu können. Die Lösungen wurden vor den Messungen während 2 Wochen bei 0° aufbewahrt, alle 2 Tage während ca. 1 Std. auf RT. erwärmt und wieder abgekühlt, um so eine optimale Renaturierung zu gewährleisten. Als Lösungsmittel verwendeten wir für Poly-(Gly-Pro-Pro) sowie für (Pro-Pro-Gly)₁₀ eine 1M NaCl-Lösung,

für Poly-(Ala-Gly-Pro) Essigsäure/Wasser 1:1. Für die einzelnen Messungen wurde nach jeder Temperaturerhöhung gewartet, bis der Drehwert über 1 Std. konstant blieb.

Zirkulardichroismus (CD). Die CD-Messungen wurden auf einem *Roussel-Jouan-II*-Dichrographen durchgeführt. Bei Poly-(Ala-Gly-Pro) konnte wegen des Lösungsmittels Essigsäure/Wasser 1:1 nur bis 210 nm hinunter gemessen werden. Die Messzelle war thermostatisierbar und es wurden Messungen von 0 bis 50° durchgeführt.

Molekulargewichtsbestimmungen. Die Beobachtung der Trimer-Monomer-Dissoziation von (Pro-Pro-Gly)₁₀ wurde nach *Kobayashi* [11] auf einer Ultrazentrifuge (*Spinco* Modell E) durchgeführt. Im weiteren wurden Molekulargewichtsbestimmungen nach der Gleichgewichtsmethode von *Baldwin* [12] gemacht²⁾. Anhand dieser Bestimmungen sowie mit Zwischenprodukten von der *Merrifield*-Synthese wurden Eichgeraden für die Sephadexsäulen aufgenommen. Die gesuchten Molekulargewichte wurden anhand dieser Geraden bestimmt.

D-Aminosäurebestimmung. Der Gehalt an D-Aminosäureresten in den Polypeptiden wurde gas-chromatographisch nach der Methode von *Parr* [13] bestimmt. Die gefundenen Werte werden in Mol-% angegeben (bezogen auf die Summe von L- und von D-Form der betr. Aminosäure).

Resultate. – *Optische Drehung in Abhängigkeit der Temperatur.* Fig.1 zeigt die für Kollagenmodellsubstanzen charakteristischen sigmoiden Kurven der optischen

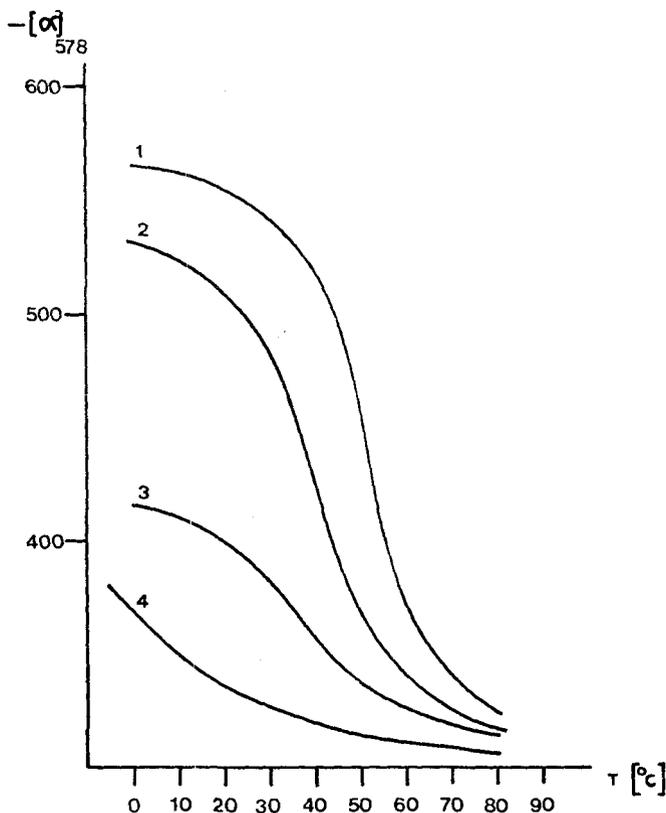


Fig. 1. Optische Drehung von Poly (Gly-L-Pro-L-Pro) (1), (Gly-L-Pro-D(L)-Pro) mit 7% D-Pro (2), (Gly-D(L)-Pro-D(L)-Pro) mit 14% D-Pro (3) und (Gly-L-Pro-D(L)-Pro) mit 18% D-Pro (4), (bei 578 nm) in Abhängigkeit der Temperatur. Lösungsmittel 1 M NaCl, Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,2%. M_n in jedem Fall 10000

²⁾ Die Werte für das partielle spez. Volumen für (Pro-Pro-Gly)₁₀ stammen aus der Arbeit von *Kobayashi* [11].

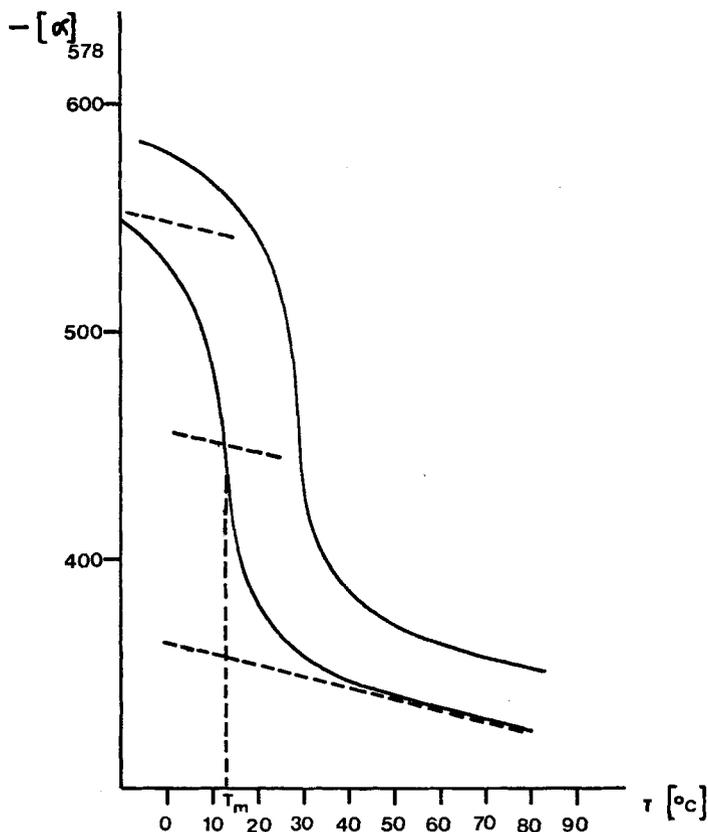


Fig. 2. *Optische Drehung von (L-Pro-L-Pro-Gly)₁₀ (1) sowie (L-Pro-D(L)-Pro-Gly)₁₀ mit 10% D-Pro (2) in Abhängigkeit der Temperatur. Lösungsmittel 1 M NaCl, Konzentration 0,15%*

Drehung in Abhängigkeit der Temperatur von Poly-(Gly-Pro-Pro) mit einem M_n von 10000 und verschiedenen Gehalten an D-Prolinresten, Fig. 2 die Kurven für $(L\text{-Pro-L-Pro-Gly})_{10}$ und $(L\text{-Pro-D(L)-Pro-Gly})_{10}$ mit 10% D-Prolinresten. Mit Poly-(Ala-Gly-Pro) erhielten wir ähnliche Kurven. Aus diesen Kurven ermittelten wir die Denaturierungstemperatur der einzelnen Polypeptide. Als Denaturierungstemperatur definieren wir die Temperatur am Wendepunkt der Kurve. Der Wendepunkt wird folgendermassen bestimmt: Bei der sigmoiden Kurve werden oben und unten Tangenten angelegt, welche zueinander parallel liegen. In der Mitte dieser Tangenten wird eine zu diesen wiederum parallel liegende Gerade gezogen. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der sigmoiden Kurve ergibt, senkrecht auf die Temperaturachse bezogen, die Denaturierungstemperatur (siehe Fig. 2).

Zirkulardichroismus. Die CD.-Spektren bei Temperaturen unterhalb der Denaturierungstemperatur zeigen den für tripelhelikale, kollagenähnliche Konformationen charakteristischen Verlauf. In Fig. 3 sind die Spektren von Poly-(Gly-Pro-Pro) angegeben, in Fig. 4 diejenigen von $(\text{Pro-Pro-Gly})_{10}$. Aus diesen Spektren geht hervor, dass Poly-(Gly-D(L)-Pro-D(L)-Pro) selbst noch mit 14% D-Prolinresten bei 0° in

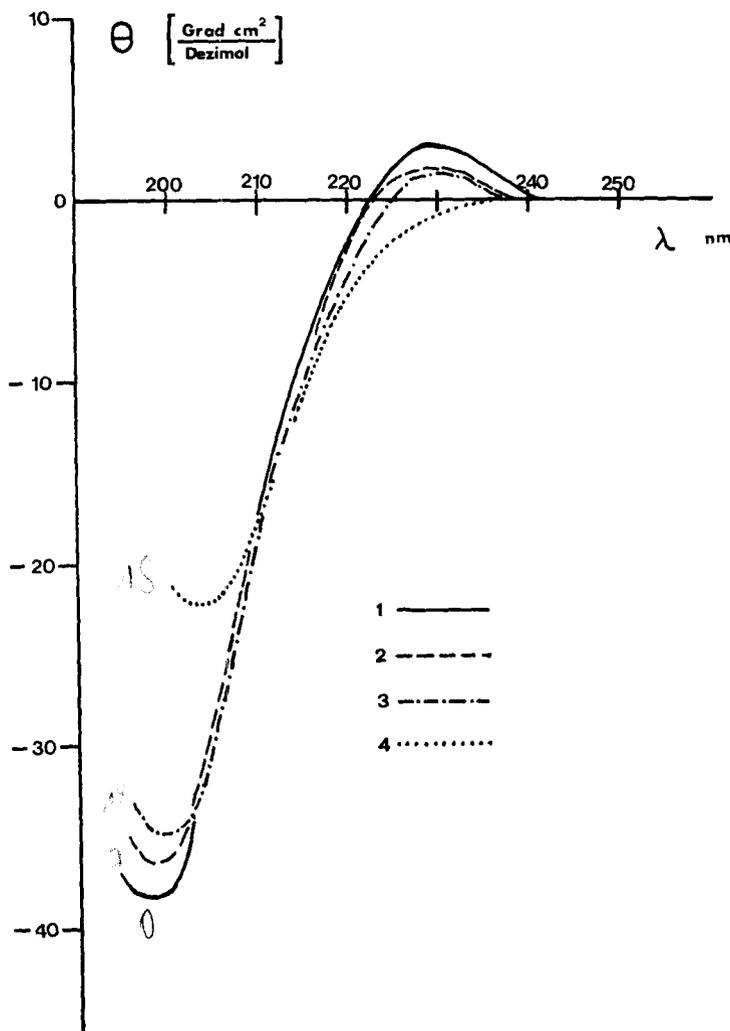


Fig. 3. CD.-Spektren von Poly-(Gly-L-Pro-L-Pro) (1), Poly (Gly-L-Pro-D(L)-Pro) mit 7% D-Pro (2), Poly-(Gly-D(L)-Pro-D(L)-Pro) mit 14% D-Pro (3) und Poly-(Gly-L-Pro-D(L)-Pro) mit 18% D-Pro (4). M_n in jedem Fall 10000. Aufgenommen bei 0°, Lösungsmittel 1 M NaCl, Konzentration zwischen 0,15 und 0,2%

tripelhelikaler Form vorliegt, Poly-(Gly-L-Pro-D(L)-Pro) mit 18% D-Pro dagegen nicht. Damit findet der aus den Drehungsmessungen gezogene Schluss, dass 18% D-Prolin in diesem Peptid genügen, um die Tripelhelix-Bildung bis zum Gefrierpunkt des Wassers herunter zu verhindern, seine Bestätigung. Wegen der Absorption durch die Essigsäure waren von Poly-(Ala-Gly-Pro) nur Messungen bis zu 210 nm hinunter möglich. Im Bereich 260 bis 210 nm erhielten wir aber dieselben aus der Literatur bekannten Kurven mit einem positiven Maximum bei 222 nm, welches bei Erhöhung der Temperatur verschwand.

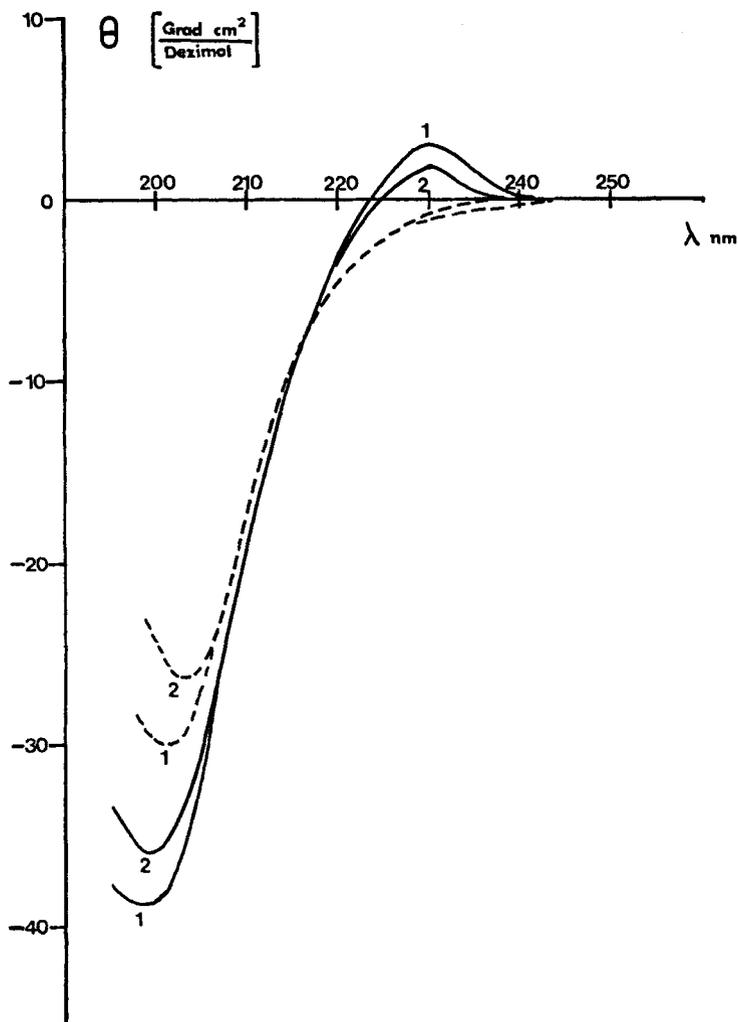


Fig. 4. CD.-Spektren von $(L\text{-Pro-L-Pro-Gly})_{10}$ (1) sowie $(L\text{-Pro-D(L)-Pro-Gly})_{10}$ mit 10% D-Pro (2), aufgenommen bei 0° (ausgezogene Linien) und bei 40° (punktierte Linien). Lösungsmittel 1 M NaCl, Konzentration 0,15%

Molekulargewichtsbestimmungen. Mit den beiden Merrifield-Präparaten wurden Molekulargewichtsbestimmungen mit der Ultrazentrifuge bei 10° und 35° durchgeführt. Die Resultate sind in Tabelle 2 aufgeführt. Es zeigt sich, dass sowohl die Peptide mit nur L-Prolin als auch diejenigen mit 10% D-Prolin bei tiefen Temperaturen Trimere bilden. Für die Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht bei Poly-(Gly-L-Pro-L-Pro) ergab sich ein M_z von 28000.

D-Aminosäurebestimmung. Die Bestimmung des Gehaltes an D-Aminosäureresten in den Polypeptiden ergab, dass bei der Polykondensation die D-Aminosäurereste nicht ganz in dem Mengenverhältnis in die Polymere eingebaut wurden, wie sie ein-

Tabelle 1. Denaturierungstemperaturen verschiedener Kollagenmodellpeptiden

Poly-(Ala-Gly-Pro) (M_n 17 000, Denaturierungstemperatur in HAc/H ₂ O 1:1)			
	D-Alanin	D-Prolin	Denaturierungstemperatur
Poly-(L-Ala-Gly-L-Pro)	–	–	27,5°
Poly-(D(L)-Ala-Gly-L-Pro)	8%	–	21,0°
Poly-(L-Ala-Gly-D(L)-Pro)	–	7%	20,5°
Poly-(D(L)-Ala-Gly-D(L)-Pro)	8%	7%	18,0°
Poly-(Gly-Pro-Pro) (M_n 10 000, Denaturierungstemperatur in 1 M NaCl)			
	D-Prolin		Denaturierungstemperatur
Poly-(Gly-L-Pro-L-Pro)	–		52°
Poly-(Gly-L-Pro-D(L)-Pro)	7%		41°
Poly-(Gly-D(L)-Pro-L-Pro)	7%		43°
Poly-(Gly-D(L)-Pro-D(L)-Pro)	14%		36°
Poly-(Gly-L-Pro-D(L)-Pro)	18%		<0°
(L-Pro-L-Pro-Gly) ₁₀	–		27,5°
(L-Pro-D(L)-Pro-Gly) ₁₀	10%		14,0°

Tabelle 2. Molekulargewichte von (Pro-Pro-Gly)₁₀ und ((Pro-Pro-Gly)₁₀)₃

	Molekulargewicht bei 10°	Errechneter Wert für Trimer
(L-Pro-L-Pro-Gly) ₃₀	7610	7584
(L-Pro-D(L)-Pro-Gly) ₃₀	7480	7584
	Molekulargewicht bei 35°	Errechneter Wert für Monomer
(L-Pro-L-Pro-Gly) ₁₀	2560	2528
(L-Pro-D(L)-Pro-Gly) ₁₀	2490	2528

gesetzt worden waren. In den niedermolekularen Anteilen eines Ansatzes wurden jeweils etwas mehr D-Reste gefunden als in den hochmolekularen Fraktionen. So wurden z. B. bei eingesetzten 10% D-Prolin im hochmolekularen Anteil nur 7% gefunden. Wegen dieses, wenn auch nur geringen Stereoselektivitätseffektes bei den Polykondensationen, ist also die direkte analytische Bestimmung des D-Aminosäuregehaltes des Präparates unumgänglich.

Diskussion. – Aus unseren Versuchen geht hervor, dass (Pro-Pro-Gly)_n ($n \approx 40$) und (Ala-Gly-Pro)_n ($n \approx 75$) auch mit D-Aminosäuregehalten von bis zu 15 Mol-% noch tripelhelikale Assoziate bilden können. Die Grenze für die noch mögliche Assoziatbildung dürfte zwischen 15 und 18% D-Reste liegen. Durch den Einbau der D-Reste in die Ketten sinkt allerdings die Denaturierungstemperatur dieser Kollagenmodellpeptide erheblich.

Welche Schlüsse können aus diesen Befunden für Gelatine gezogen werden, deren Peptidketten D-Aminosäurereste enthalten? Bei der Betrachtung des Gelierens gehen wir von der Vorstellung aus, dass sich die einzelnen Peptidketten wieder zu Tripelhelices aneinanderlagern, allerdings nicht mehr unbedingt «in register» wie im nativen

Kollagen, sondern so, dass einzelne Ketten an mehreren tripelhelikalen Bereichen beteiligt sein können und so ein dreidimensionales Netzwerk bilden, eben das Gel. Bei speziell gealterten Gelen hochmolekularer Gelatine, die eigentlich noch als denaturiertes Kollagen betrachtet werden kann, sind im Elektronenmikroskop von Tomka *et al.* [14] Fibrillen beobachtet worden. Die Assoziation von Tripelhelices zu Fibrillen setzt aber voraus, dass in den ersteren die Ketten «*in register*» sind, da die Fibrillenbildung auf einem gegenseitigen «Erkennen» strukturegebener Muster von hydrophoben und polaren hydrophilen Bereichen an der Oberfläche der Tripelhelices beruht. Beim Gelieren hydrolytisch abgebauter Gelatine sind die Voraussetzungen für eine derartige Fibrillenbildung nicht erfüllt. An der Ausbildung tripelhelikaler Assoziation der Ketten in begrenzten Bereichen ist aber nach den CD.-Messungen nicht zu zweifeln. Für die Modellpeptide wurde festgestellt, dass sich Tripelhelices auch noch bei einem Gehalt von 10 bis 15% D-Aminosäureresten bilden können. Da die Peptidketten der Gelatine eher flexibler sind, sollte ein begrenzter Gehalt an D-Resten auch bei ihnen die Bildung von Tripelhelices nicht verunmöglichen. Andererseits liegen in der Gelatine aber auch Aminosäuren mit wesentlich voluminöseren Seitenketten als Alanin oder Prolin in der D-Form vor, so z.B. Valin, Leucin und Isoleucin. Diese D-Aminosäure-Reste dürften die Ausbildung der Tripelhelix eher stärker stören, d.h. die Umwandlungstemperaturen besonders wirksam herabsetzen. Es spricht somit mindestens nichts gegen die Annahme, dass die relative Gelschmelzpunktserniedrigung, die beim hochalkalischen Abbau von Gelatine beobachtet wird, die direkte Folge der analytisch nachgewiesenen partiellen Racemisierung ist.

Die Ausführung der Arbeiten auf der Ultrazentrifuge verdanken wir Herrn Prof. von Tavel (Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern) und seinen Mitarbeitern J. Schaller und H. Rüfenacht. Die Arbeit wurde finanziell vom Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Traub & K. A. Piez, *Adv. Protein Chemistry* 25, 243 (1971).
- [2] G. N. Ramachandran & G. Kartha, *Nature* 176, 593 (1955).
- [3] A. Rich & F. H. C. Crick, *J. mol. Biol.* 3, 483 (1961).
- [4] R. Fairweather & J. H. Jones, *J. chem. Soc. Perkin I* 1972, 1908.
- [5] Knox Gelatine Comp. (Inventors: D. Tourtellotte, H. E. Williams). USA-Patent 2,827,419 (1953).
- [6] H. R. Stoll & Hs. Nitschmann, *Modified Gelatins as Plasma Substitutes*; *Bibl. haemat.*, No. 33, 81 (Karger, Basel/New York 1969).
- [7] Hs. Nitschmann, H. R. Stoll & A. Gardi (Patent-Inhaber: Laboratorien Hausmann AG, St-Gallen, Schweiz), *Argentinisches Patent* No. 200.549 (15. November 1974); *Belg. Patent* No. 820.300 (25. März 1975); *Südafrikanisches Patent* No. 74/6025 (7. Januar 1976); *USA-Patent* No. 500.213 (15. März 1976).
- [8] J. Ramelet, *Einfluss partieller Razemisierung und des Hydroxyprolinegehaltes auf den Gelschmelzpunkt von Gelatinepräparaten* (Dissertation Bern 1974).
- [9] P. Frey, *Der Einfluss von D-Aminosäureresten auf das konformative Verhalten von Kollagenmodellpeptiden* (Dissertation Bern 1975).
- [10] S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikuchi, R. Sakai & K. Kaikiuchi, *Bull. chem. Soc. Japan* 5, 1273 (1968).
- [11] Y. Kobayashi, R. Sakai, K. Kaikiuchi & T. Isemura, *Biopolymers* 9, 415 (1970).
- [12] R. L. Baldwin & K. E. van Holde, *J. phys. Chemistry* 62, 734 (1959).
- [13] W. Parr, S. Pieterski, C. Yang & E. Bayer, *J. Chrom. Sci.* 9, 141 (1971).
- [14] I. Tomka, J. Bohonek, A. Spühler & M. Ribeaud, *J. photogr. Sci.* 23, 97 (1975).