

## 60. Der Einfluss der *O*-Acetylierung auf das konformative Verhalten des Kollagen-Modellpeptides (L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> und von Gelatine

von Rolf W. Weber und Hans Nitschmann

Institut für Organische Chemie der Universität Bern  
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern

(I.X.77)

---

### The Influence of *O*-Acetylation upon the Conformational Behaviour of the Collagen Model Peptide (L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> and of Gelatin

#### Summary

(L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> which can be considered as a model peptide for collagen structure studies has been synthesized by the *Merrifield* technique. Subsequently, the hydroxyprolin residues have been acetylated by acetic acid anhydride in trifluoroacetic acid. In the same way, the hydroxyl groups of commercial bovine gelatin have been selectively acetylated. The influence of blocking the hydroxyl groups upon the thermal stability of the triple helix formed by (L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> and upon the transition temperature and the gel stability of the gelatin has been investigated by the measurement of optical rotation, circular dichroism, molecular weights and gel melting points. The results show that *O*-acetylation reduces the thermal stability of the collagen-like triple helices formed in solution by the synthetic peptide and during the gelation process of gelatin. Our experiments support data previously published by various authors indicating that the hydroxyl group of hydroxyprolin plays an important role in stabilizing the collagen triple helix. The possibility to use *O*-acetylated gelatin with its reduced gel forming capability for the preparation of plasma substitute solutions is discussed.

---

**1. Einleitung.** - Das bekannte tripelhelikale Strukturmodell für natives Kollagen [1-3] erfordert, dass in der Aminosäuresequenz der drei Ketten jede dritte Stelle durch Glycin besetzt ist. Jede Kette kann demnach als ein Poly-Tripeptid der Formel (Gly-X-Y)<sub>n</sub> betrachtet werden. Eine Besonderheit ist ferner der hohe Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin, die zusammen bei Säugern rund 23% aller Aminosäuren ausmachen. Hydroxyprolin ist nicht genetisch codiert, sondern entsteht nach dem Kettenaufbau durch enzymatische Hydroxylierung von Prolinresten, und zwar nur von solchen in der Y-Stellung. Die Tripelhelix wird durch sterische Faktoren und durch intercatenare Wasserstoffbindungen stabilisiert.

Die wichtigste dieser H-Bindungen geht von der (NH)-Gruppe von Glycin der einen Kette der Tripelhelix zur CO-Gruppe einer Aminosäure in der Stellung X einer anderen Kette aus. Diese Art intercatenare Bindung scheint aber nicht die einzige zu sein.

Schon 1954 hatte *Gustavson* [4] [5] eine Korrelation zwischen der Schrumpfungstemperatur in Wasser und dem Hydroxyprolinegehalt verschiedener Hautkollagene gefunden. Diese Befunde wurden

aber damals kaum beachtet, da noch kein Strukturmodell des Kollagens vorlag, das eine Deutung gestattet hätte. Seit 1973 haben mehrere Autoren [6-9] bestätigt, dass zwischen der thermischen Stabilität der nativen Konformation, d. h. der Tripelhelix und dem Gehalt an Hydroxyprolinresten ein Zusammenhang besteht. Nicht hydroxylierte Protokollagene zeigen eine bis zu 15° tiefere Denaturierungstemperatur als solche mit hydroxyliertem Prolin.

Untersuchungen an den synthetischen Kollagen-Modellpeptiden (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> und (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> von *Sakakibara et al.* [10] [11] und an (Pro-*allo*Hyp-Gly)<sub>10</sub> von *Inouye et al.* [12] haben deutlich gezeigt, dass die *trans*-4-Hydroxylgruppe des Hydroxyprolins ebenfalls auf die Tripelhelix von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> einen stabilisierenden Einfluss hat.

In der neueren Literatur sind drei verschiedene Modellvorstellungen beschrieben, wie Hydroxyprolin die Tripelhelix von Kollagen stabilisieren könnte. Dabei stehen vom Proton der OH-Gruppen ausgehende intercatenare H-Bindungen, die eventuell eine Molekel H<sub>2</sub>O einbeziehen, im Vordergrund [13-15]. In einer erst 1977 erschienenen Mitteilung setzen sich *Engel et al.* [16] allerdings kritisch mit diesen drei Modellen auseinander und geben aufgrund von Versuchen mit Modellpeptiden neue Erklärungen für die zweifellos vorhandene Stabilisierung der Tripelhelix durch Hydroxyprolin.

Wir haben versucht abzuklären, ob die Blockierung der OH-Gruppe von Hydroxyprolin, z. B. durch Acetylierung, einen Einfluss auf die Stabilität der Kollagen-Tripelhelix ausübt. Wir synthetisierten hierzu das Kollagen-Modellpeptid (L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> nach der *Merrifield*-Methode und acetylierten die Hydroxylgruppen der Hydroxyprolin-Reste. Zudem haben wir die Auswirkungen der *O*-Acetylierung auf das Verhalten von Gelatine untersucht.

*Bello & Vinograd* [17] haben schon 1956 zwei Verfahren zur selektiven Acetylierung von Hydroxylgruppen beschrieben, (a) mit Acetanhydrid in Eisessig/Perchlorsäure, und (b) mit Acetanhydrid in Trifluoressigsäure. Beide Medien sorgen für eine vollständige Protonierung der Aminogruppen, so dass diese von der Acetylierung ausgeschlossen bleiben. In einer späteren Mitteilung über den Einfluss der verschiedenen funktionellen Gruppen auf das Gelieren von Gelatine haben *Bello et al.* [18] mitgeteilt, dass ihre gemäss (b) *O*-acetylierte Gelatine tiefere Gel-Schmelzpunkte zeigte als gewöhnliche Gelatine von vergleichbarem Mol.-Gew. Merkwürdigerweise war dieser Effekt aber bei nach (a) acetylierten Präparaten nicht vorhanden. Diese Diskrepanz wurde nicht abgeklärt und *Bello et al.* kamen damals zur Feststellung: 'The hydroxyl groups are not indispensable for gelation, but may contribute'.

Nach unseren heutigen Kenntnissen über die Struktur des Kollagens und die Rolle des Hydroxyprolins in der Tripelhelix ist zu erwarten, dass Acetylierung der OH-Gruppen die Gelierfähigkeit der Gelatine herabsetzt. Gelatine, ein Abbauprodukt von denaturiertem Kollagen, ist in der Lage, beim Abkühlen in Lösung kollagen-ähnliche Tripelhelices zu bilden. Bei genügender Konzentration (> 0,3-0,4%) tritt dabei Gelieren ein. Dieses kann als ein Versuch zur Renaturierung in Richtung Kollagenstruktur betrachtet werden, wenn schon die Vorgänge bei der Gelbildung komplex und im einzelnen noch keineswegs restlos erforscht sind [19-21].

Es ging uns darum, die von *Bello* nicht eindeutig beantwortete Frage nach der Wirkung einer *O*-Acetylierung auf die Thermostabilität von Gelatine-Gelen abzuklären. Wir haben die *O*-Acetylierungen allerdings ausschliesslich in Trifluoressigsäure ausgeführt, weil dieses Medium weniger aggressiv ist als CH<sub>3</sub>COOH/HClO<sub>4</sub>, und vor allem, weil Gelatine darin sehr leicht löslich ist, während sie in CH<sub>3</sub>COOH/HClO<sub>4</sub> nur quillt.

In Kap. 4 wird schliesslich die Möglichkeit diskutiert, *O*-acetylierte Gelatine als Kolloid für die Herstellung eines Plasma-Ersatzmittels für die Human-Medizin zu verwenden, eine Frage, die von Anfang an hinter unseren Versuchen stand [22].

**2. Experimenteller Teil<sup>1)</sup>**. - 2.1. *Allgemeines*. Mit Ausnahme des Merrifield-Harzes (Merck, Darmstadt) stammten sämtliche verwendeten Substanzen von Fluka AG, Buchs. Die Charakterisierung der Zwischenprodukte und Produkte erfolgte mit der Dünnschichtchromatographie (Laufmittel A: 1-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1; Laufmittel B: Methylenchlorid/Äthanol 10:1), den NMR.-Spektren (in  $\delta$  bzgl. TMS (=0 ppm)) und IR.-Spektren, der Messung der optischen Drehung und der Bestimmung des Smp. (unkorrigiert). - *Optische Drehungen in Abhängigkeit der Temperatur* (0 bis 80°) wurden auf einem Polarisimeter der Marke Perkin Elmer E 141 bei einer Wellenlänge von 436 nm in einer thermostatisierbaren Küvette gemessen. Damit die Peptide eine helikale Anordnung einnehmen konnten, wurden die Lösungen vor der Messung mindestens 2 Tage bis eine Woche bei +1° aufbewahrt. Nach jeder Erhöhung der Küvettemp. wurde 1 Std. bis zum Ablesen des Drehwertes gewartet. - Die *CD*-Spektren wurden auf einem Dichographen Typ II von Roussel-Jouan, Paris, mit einer thermostatisierbaren Messzelle der Schichtdicke 0,01 cm gemessen. Nach jeder Temperaturänderung wurde 1 Std. gewartet. Die Konzentrationen der Messlösungen wurden durch Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ermittelt. - Die *Molekulargewichte*  $M_z$  der synthetischen Peptide wurden auf einer Spinco Modell E Ultrazentrifuge mit Rotor D und Interferenzoptik nach der Gleichgewichtsmethode [24] bestimmt. Für beide Peptide wurde der Wert für das partielle spezifische Volumen aus [11] verwendet. - Die mittleren *Molekulargewichte*  $M_n$  der Gelatinepräparate wurden bei 37° mit dem Konzentrations-Osmometer nach [25] je 5mal bestimmt. Der rel. mittlere Fehler des Mittelwertes (rel.  $\Delta X$ ) betrug  $\pm 3\%$ . Abbauprodukte mit Mol.-Gew. unter ca. 6000 werden bei der verwendeten Membran nicht erfasst; sie machen höchstens wenige % aus. - Die Messung der *Gel-Smp.* erfolgte in Reagensgläsern einheitlicher Grösse (Länge 8 cm, Durchmesser 6 mm) an je 1 ml 4proz. Gelatinelösung, welche über Nacht bei +1° erstarren gelassen wurde. Auf die Oberfläche des festen Gels wurde ein dünnes Holzstäbchen (Durchmesser 3 mm, Gewicht 0,5 g) mit stumpfem Ende gesetzt, das Reagensglas mit Stäbchen in einem Wasserbad um 2°/Std. erwärmt und die Schmelztemp. abgelesen, sobald das Ende des Stäbchens den Grund des Reagensglases erreicht hatte.

2.2. *Synthese und O-Acetylierung von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>*. Die Synthese des Polypeptides (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> wurde erstmals von Sakakibara *et al.* [11] beschrieben. Die spärlichen exper. Angaben der Autoren ermöglichten es uns nicht, ihre Synthese nachzuvollziehen. Wir entwickelten daher einen eigenen Syntheseweg.

2.2.1. *Synthese von Boc-Pro-Hyp(OBzl)-Gly-OH (VII)*. Boc-Pro und Boc-Hyp. Die beiden Substanzen wurden nach den Vorschriften von Carpino [26] und Schnabel [27] hergestellt. Boc-Hyp konnte nicht kristallin erhalten werden. Ausbeute 80 bzw. 85%. - NMR. (CDCl<sub>3</sub>): 1,45 (s, 9 H).

*Boc-Hyp(OBzl)-OH (I)*. 6,45 g (0,28 mol) Natrium wurden in 300 ml fl. Ammoniak gelöst und 32,5 g (0,14 mol) Boc-Hyp in 150 ml THF dazu getropft. Nach 1 Std. wurden 24 g (0,14 mol) Benzylbromid zugegeben und dann der Ammoniak bei RT. abgedampft. Nach Rühren über Nacht wurde mit viel Eiswasser versetzt, mit NaCl gesättigt und 3mal mit 50 ml Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Phosphorsäure auf pH 2,5 angesäuert und das abgeschiedene Öl in Essigester aufgenommen. Es wurde mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und i.RV. eingedampft. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel mit Methylenchlorid/Äthanol 10:1 chromatographiert und mit der Front eluiert: 22,5 g (50%) gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{20} = -37,2^\circ$  ( $c = 1,7$ , Äthanol). - NMR. (CDCl<sub>3</sub>): 7,2 (s, 5 H).

*HCl-Hyp(OBzl)-OH (II)*. I wurde in 1N HCl/Eisessig gelöst (Mol-Verhältnis I/HCl = 1:10). Nach 1 Std. wurde mit Äther versetzt, das Hydrochlorid II abgenutscht und aus 2-Propanol umkristallisiert: 80% II, Smp. 183-184°.

*HCl-Hyp(OBzl)-OMe (III)*. Abs. Methanol wurde bei -10° mit frisch destilliertem Thionylchlorid versetzt. Nach 10 Min. wurde II zugegeben. Das Molverhältnis Aminosäure/Thionylchlorid/Methanol betrug ca. 10:11:79. Nach 30 Min. bei -10° und 4 Std. bei 40° wurde über Nacht bei RT. gerührt, die Lösung eingedampft und in der Kälte mit viel Äther versetzt: 90% III, Smp. 135°. - NMR. (CDCl<sub>3</sub>): 3,83 (s, 3 H).

1) Für detaillierte Angaben siehe [23].

2) Es wird im folgenden darauf verzichtet, die Konfiguration L der optisch aktiven Aminosäuren aufzuführen.

*Boc-Pro-Hyp(OBzl)-OMe* (IV). Das Dipeptid wurde nach [28] aus Boc-Pro und III mit dem Kupplungsreagens Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxy-benzotriazol (DCC/HOBt) in Methylenchlorid hergestellt. Nach 1-2 Std. bei 0° und über Nacht bei RT. wurde die Lösung mehrmals mit 0,5N Zitronensäure, Wasser, 0,5N NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und wiederum mit Wasser gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und eingedampft: 96% gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{20} = -42,2^\circ$  ( $c=1$ , CHCl<sub>3</sub>). - NMR. (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>): 1,4 ( $d$  bei 25°,  $s$  bei 80°, 9 H); 3,65 ( $s$ , 3 H); 7,26 ( $s$ , 5 H).

*Boc-Pro-Hyp(OBzl)-OH* (V). IV wurde in THF/Wasser 5:1 gelöst und bei RT. mit 1N KOH bei pH 10-11 titriert (Kontrolle durch Glas-Elektrode). Nachdem der pH-Wert nicht mehr absank und im DC. (B) kein IV mehr nachweisbar war, wurde mit 1N HCl neutralisiert, das THF abgedampft und die Lösung mit Phosphorsäure auf pH 2,5 angesäuert. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen, die org. Phase i.RV. eingedampft und getrocknet. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel mit Methylenchlorid/Äthanol 13:1 chromatographiert: 95% gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{20} = 58,0^\circ$  ( $c=2$ , CHCl<sub>3</sub>).

*Boc-Pro-Hyp(OBzl)-Gly-OMe* (VI). VI wurde aus V und HCl-Gly-OMe (*Fluka*) mit DCC/HOBt in Methylenchlorid hergestellt. Die Kupplung und Aufarbeitung erfolgte wie bei IV: 92% gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{20} = -46,1^\circ$  ( $c=3$ , THF).

*Boc-Pro-Hyp(OBzl)-Gly-OH* (VII). Die Verseifung von VI zu VII erfolgte analog der Herstellung von V: 97% gelbes Öl,  $[\alpha]_D^{20} = -57,0^\circ$  ( $c=2$ , CHCl<sub>3</sub>).

2.2.2. *Synthese von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>*. Die Bindung von Boc-Glycin an das *Merrifield*-Harz erfolgte nach [29]. Der Glycingehalt am Harz wurde nach [30] bestimmt und betrug 0,36 mmol/g Harz.

Zuerst wurde das Dipeptid V, dann 9mal das Tripeptid VII mit DCC/HOBt in Methylenchlorid bei RT. über Nacht an das Harz gekuppelt. Die Boc-Gruppe wurde mittels Trifluoressigsäure/Methylenchlorid 1:1 während 30 Min. abgespalten [31] und mit Triäthylamin freigesetzt. Es wurden zwei Mol-Äquiv. der Reaktanden eingesetzt, bezogen auf den Glycingehalt des Harzes. Nach jedem Kupplungsschritt erfolgte das übliche Waschen mit Eisessig, Äthanol und Methylenchlorid. Nach beendeter Synthese wurde das Peptid mit HF/Anisol 1:1 vom Harz getrennt; damit wurden gleichzeitig die Schutzgruppen abgespalten. Das wasserlösliche Rohprodukt wurde lyophilisiert. Ausbeute 48%. Anschliessende Gel-Chromatographie an *Sephadex G-50*(fine) mit Wasser und einer Eluierungsgeschwindigkeit von 40 ml/Std. lieferte einheitliches (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>.

2.2.3. *O-Acetylierung von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>*. Vgl. [17], Variante b). 100 mg (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> (0,37 mmol OH-Gruppen) wurden in 2 ml eiskalter Trifluoressigsäure gelöst. Nach 1/2 Std. Stehen bei 35° und Abkühlen auf -10° wurden 150 mg (1,5 mmol) Acetanhydrid zugegeben. Nachdem die Temp. auf 0° gestiegen war, wurde 45 Min. bei dieser Temp. gerührt, das Produkt mit kaltem Äther gefällt, mehrmals mit Äther gewaschen, abgenutscht und getrocknet: 95% Rohprodukt, IR. (CHCl<sub>3</sub>): Intensive Ester-carbonylbande bei 1735 cm<sup>-1</sup>. Anschliessende Gel-Chromatographie unter den gleichen Bedingungen wie für (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> lieferte einheitliches (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub>.

2.3. *O-Acetylierung von Gelatine*. Die selektive *O*-Acetylierung erfolgte nach [17] mit Acetanhydrid in Trifluoressigsäure bei -5 bis -10° während 1/2, 1 und 2 Std.<sup>3)</sup> Als Ausgangsmaterial wurde eine alkalisch abgebaute Rindergelatine (SAB 5)<sup>4)</sup> mit einem mittleren Molekulargewicht  $M_n$  von 44000, einem Gel-Schmelzpunkt von 30° in 4proz. Lösung und einer optisch bestimmten Denaturierungstemperatur  $T_m$  von 20° in 0,2proz. Lösung verwendet. Acetanhydrid wurde in 8fachem molarem Überschuss, bezogen auf die OH-Gruppen, eingesetzt. Die acetylierte Gelatine wurde mit kaltem Äther/Methanol 3:1 gefällt, mehrmals mit Äther gewaschen, getrocknet, dann in Wasser (ca. 50 ml/g) gelöst und mit verdünnter NaOH-Lösung auf pH 7 neutralisiert. Die Lösung wurde durch Austausch an Ionenaustauschern von allen niedermolekularen Ionen befreit (*Amberlite MB-3*, H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup>-Mischharz von *Fluka*, dann stark basischer Anionenaustauscher (OH<sup>-</sup>) des Typs III von *Merck* und nochmals *Amberlite MB-3*). Dann wurde lyophilisiert. Ausbeuten 70-90%. - IR. (Gelatinefilm): Ester-carbonylbande bei 1735 cm<sup>-1</sup>.

Der *O*-Acetylgehalt der 3 Ansätze wurde nach [32] bestimmt. Die Titration erfolgte potentiometrisch mit Glas-Elektrode und pH-Meter (*Metrohm*). Analog wurde der Blindwert für die Ausgangsgelatine bestimmt, der zur Korrektur diente.

3) Dass bei dieser Methode die Trifluoressigsäure an der Acetylierung nicht teilnimmt, haben schon *Bello & Vinograd* [17] gezeigt.

4) Hersteller: *Gelatine GmbH*, Nienburg, BRD.

**3. Resultate.** - 3.1. *O*-Acetylierung von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>. Figuren 1 und 2 zeigen anhand der optischen Drehung in Abhängigkeit von der Temperatur den Übergang Helix-Coil für (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> und (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub> in 1M NaCl. Der Wendepunkt der Kurven liefert die Denaturierungstemperatur  $T_m$  mit einem Fehler von  $\pm 2^\circ$ .  $T_m$  von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> liegt bei  $58^\circ$  und stimmt mit dem von *Skakibara et al.* [11] gefundenen Wert überein.  $T_m$  von (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub> liegt um  $33^\circ$  tiefer und ist mit  $25^\circ$  vergleichbar mit  $T_m$  von (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> [11] [33], das ebenfalls keine OH-Gruppen enthält und sonst in seiner Primärstruktur analog ist. Die optischen Drehungen in Äthanol/Wasser 1:1 ergeben die gleichen  $T_m$  wie in 1M NaCl. Abspaltung der *O*-Acetylgruppen von (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub> nach [32] ergibt wieder ein Produkt der gleichen Thermostabilität wie das ursprüngliche (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub>.

Die CD.-Spektren von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> (Fig. 3) und (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub> (Fig. 4) zeigen kollagen-ähnliche Strukturen mit einem temperaturabhängigen Übergang Helix-Coil an. Die Spektren sind sehr ähnlich denjenigen von (Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> [33] sowie von Polyprolin-II und Poly(OAc)Hyp [34]. In *Figur 3* und *4* sind nur 3 bzw. 2 Kurven gezeichnet, nämlich eine für den tripelhelikalen Zustand unterhalb und eine für den coil-förmigen Zustand der Peptide oberhalb von  $T_m$ . Bei  $54^\circ$  liegt (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> noch weitgehend als Helix vor, nicht aber das acetylierte Peptid. Die Abhängigkeit des CD.-Maximums bei 225 nm von der Temperatur steht in Einklang mit den aus der optischen Drehung ermittelten  $T_m$ -Werten.

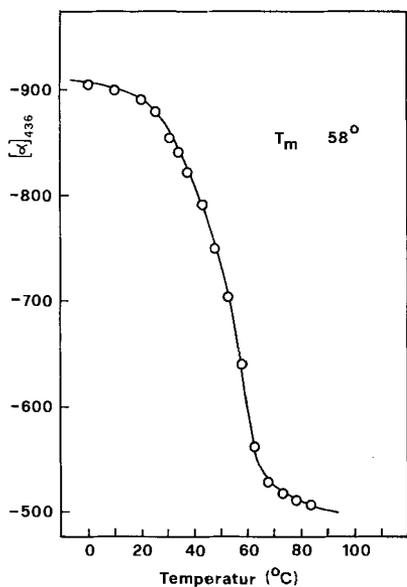


Fig. 1. Optische Drehung von (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> in Abhängigkeit der Temperatur ( $c = 0,2$ , 1M NaCl)

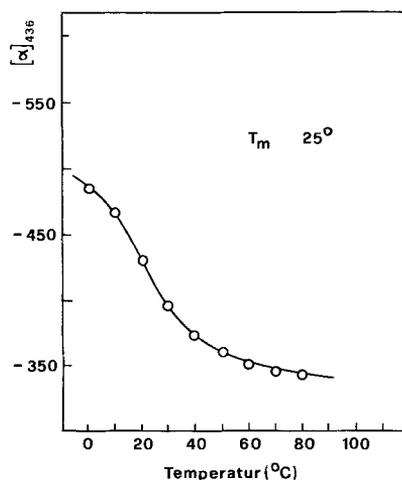


Fig. 2. Optische Drehung von (Pro-Hyp(OAc)-Gly)<sub>10</sub> in Abhängigkeit der Temperatur ( $c = 0,2$ , 1M NaCl)

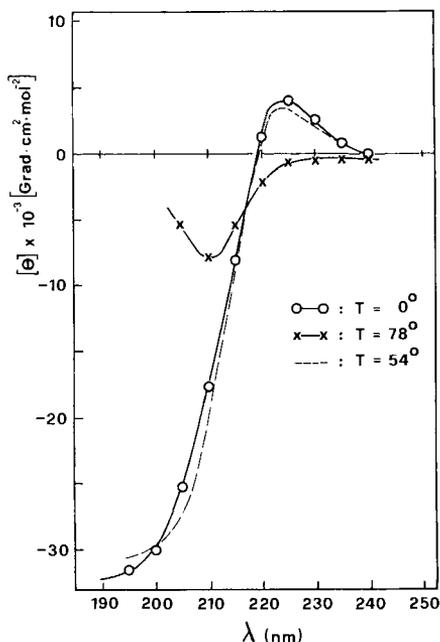


Fig. 3. CD-Spektrum von  $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$  bei 0, 54 und  $78^\circ$  ( $c=0,19$ ,  $1\text{M NaCl}$ )

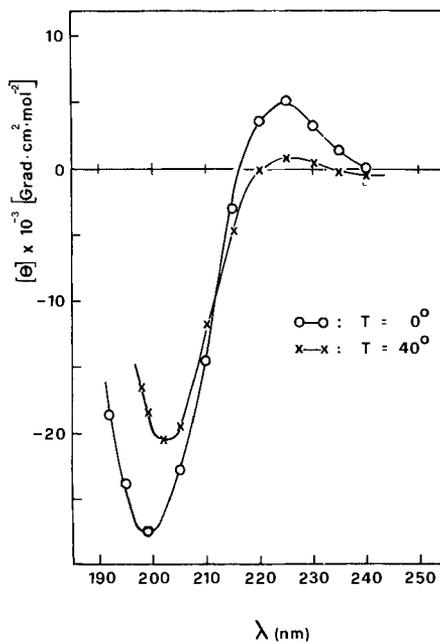


Fig. 4. CD-Spektrum von  $(\text{Pro-Hyp(OAc)-Gly})_{10}$  bei 0 und  $40^\circ$  ( $c=0,165$ , 2-Chlor-äthanol/Wasser 22:78)

Die Molekulargewichte  $M_z$  von  $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$  und  $(\text{Pro-Hyp(OAc)-Gly})_{10}$  wurden bei  $10^\circ$  bzw.  $10$  und  $35^\circ$  bestimmt, um abzuklären, ob diese Modellpeptide bei tiefer Temperatur in trimerer Form vorliegen und ob das acetylierte Peptid bei  $35^\circ$  wirklich monomer ist. Tabelle 1 zeigt, dass  $M_z$  bei  $10^\circ$  für beide Peptide im Bereich des theoretischen Wertes für trimere Assoziate und bei  $35^\circ$  für das acetylierte Peptid in demjenigen für eine Einzelkette liegt. Die Veränderungen der optischen Drehwerte und der CD-Maxima des acetylierten Peptids mit der Temperatur spiegeln also eindeutig den Übergang von einem tripelhelikalen Trimeren zum coil-förmigen Monomeren wieder.

3.2. O-Acetylierung von Gelatine. In den Präparaten 1-3 (vgl. Tab. 2) erwies sich der grösste Teil der OH-Gruppen als acetyliert; über 90% liess sich der Acety-

Tab. 1. Molekulargewichte  $M_z$  von  $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$  und  $(\text{Pro-Hyp(OAc)-Gly})_{10}$  bei  $10$  und  $35^\circ$

Temp.	$M_z$ von $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$		$M_z$ von $(\text{Pro-Hyp(OAc)-Gly})_{10}$	
	ber.	gef.	ber.	gef.
$10^\circ$	8070 <sup>a)</sup>	8520	9330 <sup>a)</sup>	9590
$35^\circ$ <sup>c)</sup>	-	-	3110 <sup>b)</sup>	2820

a) Theoretischer Wert für ein Trimer.

b) Theoretischer Wert für ein Monomer.

c) Bei dieser Temperatur liegt  $(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}$  noch als Trimeres vor.

Tab. 2. Resultate der O-Acetylierung an Gelatine SAB5

	Versuchs-Nr.			
	0 <sup>a)</sup>	1	2	3
Acetylierungsdauer (Std.)	0	0,5	1	2
Acetylierungsgrad <sup>b)</sup>	0	78	88	89
$M_n$ ( $\pm 3\%$ )	44000	43000	41000	32000
Gel-Smp. ( $c = 4,0$ , H <sub>2</sub> O)	30	10	7	2
$T_m$ ( $c = 0,2$ , 1M NaCl)	20	10	7	-

<sup>a)</sup> Unbehandelte Ausgangs-Gelatine.  
<sup>b)</sup> O-Acetylierte Hydroxyamino-Säuren in % der vorhandenen  $155 \pm 5^\circ$  pro 1000 Aminosäuren.  
<sup>c)</sup> Die Hyp-Reste machen hiervon  $\frac{2}{3}$  aus.

lierungsgrad aber nicht heraufstreben. Bei zunehmender Reaktionsdauer fiel andererseits das mittlere Mol.-Gew. weiter ab.

Die Gel-Smp. der acetylierten Gelatinen liegen bedeutend tiefer als diejenigen der Ausgangs-Gelatine; dasselbe gilt für die chiroptisch in verdünnten Lösungen bestimmten  $T_m$ -Werte<sup>5)</sup>. Unsere in der Einleitung begründete Erwartung ist damit bestätigt worden. Es bleibt die Frage, wie weit der die Acetylierung begleitende Kettenabbau an den erwähnten Effekten mitbeteiligt ist. Dass hydrolytischer Abbau der Gelatine deren thermische Gelstabilität beeinträchtigt, ist bekannt, seit Molekulargewichtsbestimmungen an diesem Stoff ausgeführt werden [21]. Wird SAB Gelatine in wässriger Lösung (pH 4, Salzsäure) bei 90° gehalten, bis der  $M_n$ -Wert auf 32 000 gefallen ist, dann beträgt der Gel-Smp. immerhin noch 24° [35]. Ein Vergleich dieses Wertes mit demjenigen für unsere acetylierte Gelatine No. 3, die ein gleiches  $M_n$  aufweist, zeigt dass die Acetylierung allein den Gel-Smp. um gut 20° gesenkt hat. Werden noch die Ergebnisse unserer Versuche über den Einfluss der O-Acetylierung auf das konformative Verhalten des Kollagen-Modellpeptides (Pro-Hyp-Gly)<sub>10</sub> berücksichtigt, so können wir die seinerzeit von *Bello* [18] mehr oder weniger offen gelassene Frage (vgl. Einleitung) jetzt sicher beantworten: Indem die OH-Gruppen des Hydroxyprolins zur Stabilisierung der Kollagen-Tripelhelix beitragen, verleihen sie auch den Gelen von Gelatine eine erhöhte Stabilität, die sich in der Höhe der Gel-Smp. ausdrückt. Die strukturverfestigende Wirkung dieser OH-Gruppen fällt dahin, wenn sie acetyliert sind.

**4. Zur Verwendung O-acetylierter Gelatine in Blutplasma-Ersatzlösungen.** - Es soll schliesslich noch auf die Möglichkeit hingewiesen werden, O-acetylierte Gelatine als Kolloid in Plasma-Ersatzlösungen in der Human-Medizin einzusetzen. Für allgemeine Betrachtungen über die Verwendung von chemisch modifizierten Gelatinen für diesen Zweck sei auf die Literatur verwiesen [22] [33] [36]. Das Ziel einer Modifizierung besteht immer darin, eine Gelatine zu erhalten, die schwer geliert (4proz. Lösungen sollten bis nahe zum Gefrierpunkt von H<sub>2</sub>O flüssig bleiben) und die noch ein möglichst hohes mittleres Teilchengewicht besitzt ( $M_n > 22\,000$ ), um eine längere Verweildauer im Kreislauf zu gewährleisten. Nach unseren Versuchen besteht kein Zweifel, dass O-Acetylierung ein sehr wirksames und bisher

<sup>5)</sup> Die negative Drehung der Gelatine wird durch die Acetylierung für Helix und Coil beträchtlich vermindert.

technisch noch nie verwendetes Verfahren wäre, um dieses Ziel zu erreichen. Präparat 3 (Tab. 2) weist z. B. ein um *ca.* 50% höheres  $M_n$  auf, als alle heute im Handel befindlichen Gelatine-Transfusionslösungen von vergleichbar tiefem Gel-Smp. (vgl. [22]).

Es ist übrigens zu erwarten, dass auch andere *O*-Acylgruppen das konformative Verhalten von Gelatine ähnlich beeinflussen wie *O*-Acetylgruppen. Obschon letztere physisch unbedenklich erscheinen, können nur eingehende pharmakologische und klinische Versuche darüber entscheiden, ob *O*-acetylierte Gelatine wirklich für den Einsatz in der Human-Medizin in Frage kommt.

Diese Arbeit wurde finanziell und materiell durch das Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern unterstützt.

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Traub & K. A. Piez, *Adv. Protein Chemistry* 25, 243 (1971).
- [2] J. C. W. Chien, *J. macromol. Sci. - Revs. macromol. Chemistry C/2 1975*, 1-80.
- [3] P. F. Fietzek & K. Kühn, *Molecular Cellular Biochemistry* 8, 141 (1975).
- [4] K. H. Gustavson, *Acta. chem. scand.* 8, 1299 (1954).
- [5] K. H. Gustavson, *Nature* 175, 70 (1955).
- [6] S. Jimenez, M. Harsch & J. Rosenbloom, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 52, 106 (1973).
- [7] R. A. Berg & D. J. Prockop, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 52, 115 (1973).
- [8] J. Rosenbloom, M. Harsch & S. Jimenez, *Arch. Biochem. Biophys.* 158, 478 (1973).
- [9] A. R. Ward & P. Mason, *J. mol. Biol.* 79, 431 (1973).
- [10] S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikucha, R. Sakai & K. Kikiuchi, *Bull. chem. Soc. Jap.* 41, 1273 (1968).
- [11] S. Sakakibara, Y. Kishida, Y. Kikucha, R. Sakai & K. Kikiuchi, *Bull. chem. Soc. Jap.* 41, 1273 (1968).
- [12] K. Inouye, S. Sakakibara & D. J. Prockop, *Biochim. biophys. Acta.* 420, 133 (1976).
- [13] G. N. Ramachandran, M. Bansal & R. S. Bhatnagar, *Biochim. biophys. Acta* 322, 166 (1973).
- [14] R. A. Berg, Y. Kishida, Y. Kobayashi, K. Inouye, A. E. Tonelli, S. Sakakibara & D. J. Prockop, *Biochim. biophys. Acta* 328, 553 (1973).
- [15] W. Traub, *Israel J. Chemistry* 12, 435 (1974).
- [16] J. Engel, H. T. Chen & D. J. Prockop, *Biopolymers* 16, 601 (1977).
- [17] J. Bello & J. R. Vinograd, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 1369 (1956).
- [18] J. Bello, H. R. Bello & J. R. Vinograd, *Biochim. biophys. Acta* 57, 222 (1962).
- [19] E. G. Finer, F. Franks, M. C. Phillips & A. Suggitt, *Biopolymers* 14, 1995 (1975).
- [20] I. Tomka, J. Bohonek, A. Spühler & M. Ribaudeau, *J. fotogr. Sci.* 23, 97 (1975).
- [21] G. Stainsby, 'The Science and Technology of Gelatin', Ed. A. G. Ward & A. Courts, Academic Press 1977, S. 179-207.
- [22] H. Nitschmann & H. R. Stoll, 'Modified Gelatins as Plasma Substitutes', *Bibl. Haem.*, No. 33 Karger-Verlag, Basel/New York 1969, S. 55-152.
- [23] R. Weber, *Dissertation Universität Bern* 1977.
- [24] R. L. Baldwin & K. E. van Holde, *J. phys. Chemistry* 62, 734 (1959).
- [25] H. Nitschmann, H. R. Gyax, P. Moser & H. R. Stoll, *Vox Sang.* 12, 106 (1967).
- [26] L. A. Carpino, *Org. Synth.* 44, 15 (1964).
- [27] E. Schnabel, *Liebigs Ann. Chem.* 702, 188 (1967).
- [28] W. König & R. Geiger, *Chem. Ber.* 103, 788 (1970).
- [29] M. W. Monahan & Ch. Gilon, *Biopolymers* 12, 2513 (1973).
- [30] B. F. Gisin, *Analyt. chim. Acta* 58, 248 (1972).
- [31] S. Karlsson, G. Lindeberg, J. Porath & U. Ragnarsson, *Acta chem. Scand.* 24, 1010 (1970).
- [32] S. Blackburn & H. Phillips, *Biochem. J.* 38, 171 (1944).
- [33] P. Frey & H. Nitschmann, *Helv.* 59, 1401 (1976).
- [34] S. Knof & J. Engel, *Israel J. Chemistry* 12, 165 (1974).
- [35] G. Gehring, *Lizentiatsarbeit Universität Bern* 1970.
- [36] A. Gardi & H. Nitschmann, *Helv.* 55, 2468 (1972).