

Fig. 1. Chlamydospores of *C. albicans* obtained after incubation (4 h at 37°C plus 48 h at room temperature) of blastocells in swine serum diluted 1:10 containing 1 mg/ml N-acetylglucosamine. Leitz Ortholux-Orthomat microscope. $\times 500$.

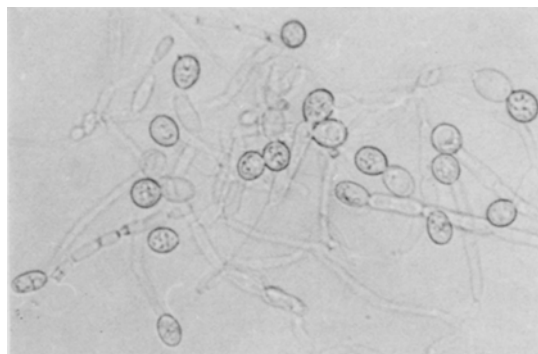


Fig. 2. The same chlamydospores as in Figure 1, but without serum. Acetylglucosamine was dissolved in water or MES buffer. $\times 380$.

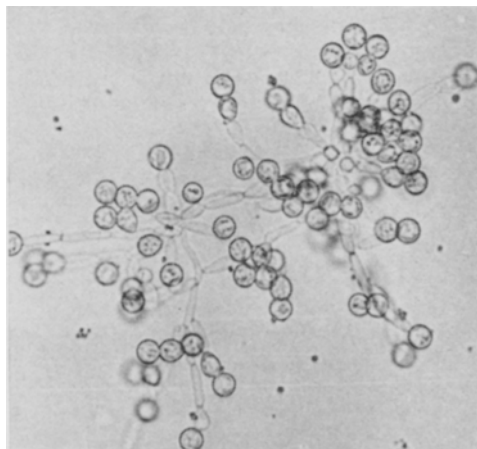


Fig. 3. Massive production of chlamydospores of *C. albicans* in N-acetylglucosamine-agar. Note the marked difference in contrast between the chlamydospores and the supporting pseudomycelium. For other experimental details see text. $\times 300$.

Subsequently, we found that serum can be omitted from incubation mixture and that the simplest medium for obtaining chlamydospores are made up of N-acetylglucosamine dissolved in imidazole-HCl 0.01 M pH 6.6 buffer, or in 2-morpholino-ethanesulfonic acid (MES, Fluka) buffer 0.05 M at a pH of 6.2 or also in simple water. As shown in Figure 2, many typical chlamydospores are found after 4 h at 37°C followed by 48–72 h at room temperature in N-acetylglucosamine-containing MES buffer.

It is possible to add 2% agar base (Special Agar Noble, Difco) to N-acetylglucosamine-medium, so obtaining an excellent solid medium for chlamydospore production. In this case, the purification of the agar is not important (as it is in the medium proposed by JANSONS and NICKERSON³) and the chlamydospores are obtained by simple streaking 0.1 ml of a suspension containing 10^4 – 10^6 blastospores (16 h old) on the surface of the agar itself or on a slice of dialysis tube (The Scientific Instrument Centre Ltd., London, England) put onto the surface of the agar. After streaking, the medium was left to dry for 70 min at 37°C in Petri dishes, then incubated for 24 h at 26°C. Maximal yield of chlamydospores was observed after 48 h. These chlamydospores were typical in morphology and size (Figure 3).

Glucose, glucosamine, galactosamine, N-acetylgalactosamine, fructose, glucose-1-phosphate could not replace N-acetylglucosamine in chlamydospore induction, which was only slightly stimulated by MgSO_4 (0.1 mM Merck, Germany) or MnCl_2 (0.1 mM, Merck, Germany); the optimal pH ranges from 6.2 in MES buffer to 6.6 in imidazole HCl buffer.

In general the experimental conditions of chlamydospore formation seem very similar to those specifically inducing germ-tube formation from blastospore of *C. albicans*⁴ and in this respect N-acetyl-D-glucosamine can be considered a 'key' substance for dimorphism and morphological variations in *C. albicans*.

The possibility of obtaining high yield of typical chlamydospores of *C. albicans* with N-acetyl-D-glucosamine by a simple and reproducible method offers also a new reliable approach to a simple laboratory diagnosis of *C. albicans*.

Riassunto. La N-acetil-D-glucosamina in acqua, in alcuni tamponi o in siero, induce specificamente la formazione di clamidospore in *Candida albicans*. Esse mostrano una tipica morfologia e sono idonee per studi biochimici e per la diagnosi di questo micete.

V. STRIPPOLI and N. SIMONETTI

Institutes of Microbiology, University of Rome and Camerino, Piazzale delle Scienze 5, I-00100 Roma (Italy), 4 July 1974.

³ V. K. JANSONS and W. J. NICKERSON, J. Bact. 104, 910 (1970),

⁴ N. SIMONETTI, V. STRIPPOLI and A. CASSONE, Nature, Lond., 250, 344 (1974).

Ein neues Verfahren zur Peptidsynthese: die alternierende Fest-Flüssigphasen Methode

Die bisher beschriebenen Verfahren zur Peptidsynthese unter Verwendung unlöslicher oder löslicher Träger basieren alle auf der von MERRIFIELD¹ in die Peptidchemie eingeführten Grundidee, d.h. die im

schrittweisen Verfahren wachsende Peptidkette ist entweder über die Carboxylgruppe^{1,2} oder die Amino-
gruppe³ mit einem polymeren Träger verknüpft. Hierdurch soll die Abtrennung der zur Kettenverlängerung im

Überschuss eingesetzten, partiell geschützten Aminosäuren gegenüber der konventionellen Peptidsynthese erleichtert werden. Bei unvollständiger Kupplungs- und Deblockierungsreaktion tritt bei dieser Synthesestrategie eine Anhäufung von Rumpf- und Fehlsequenzen auf⁴, da eine Abtrennung nicht umgesetzter Peptidketten bei diesem Syntheseprinzip nicht möglich ist. Sehr viel Arbeit ist in den letzten Jahren investiert worden, um die Kupplungsausbeuten möglichst nahe an 100% heranzubringen, wodurch dieser wesentliche Nachteil der Peptidsynthese nach dem Merrifield-Prinzip eliminiert würde. Eine allgemein gültige Lösung dieses Problems wurde jedoch bisher nicht gefunden.

Versuche, das Problem der Rumpf- und Fehlsequenzen durch eine Änderung der Synthesestrategie prinzipiell zu lösen sind unseres Wissens bisher nicht beschrieben worden. Im folgenden soll daher ein neues Verfahren zur Peptidsynthese beschrieben werden, das unter Verwendung polymerer Träger auf jeder Synthesestufe die einfache Abtrennung sowohl der im Überschuss zur Kettenverlängerung eingesetzten Aminosäuren als auch der nicht verlängerten Peptidkette vom gewünschten Peptid erlaubt. Das Prinzip dieser alternierenden Fest-Flüssigphasen Methode ist schematisch in der Figur dargestellt.

Das Wesentliche der neuen Synthesestrategie liegt darin, dass eine zu verlängernde Peptidkette durch den Ablauf der Kupplungsreaktion physikalisch so verändert wird, dass nicht umgesetztes Ausgangsprodukt einfach vom Endprodukt abgetrennt werden kann. Dieses Prinzip ist besonders leicht zu verwirklichen durch die Verwendung von Aminosäuren, die an der Aminofunktion über eine selektiv spaltbare Gruppierung an einen unlöslichen Träger gebunden sind. Die in Lösung vorliegende, am Aminoende zu verlängernde Peptidkette wird mit der entsprechenden trägergebundenen Aminosäure zur Reaktion gebracht. Durch das Knüpfen der Peptidbindung wird die Peptidkette aus der Lösung entfernt und über die kettenverlängernde, trägergebundene Aminosäure in die feste Phase überführt. Nach beendeter Kupplungsreaktion wird der in Lösung befindliche Anteil an nicht umgesetzter Peptidkette durch einfaches Auswaschen und Filtrieren entfernt. Durch Abspaltung der am festen Träger gebundenen Schutzgruppe wird die verlängerte Peptidkette zusammen mit im Überschuss eingesetzter

Aminosäure wieder in die lösliche Phase überführt; eventuell nicht deblockierte Peptidkette verbleibt am festen Träger. Die Abtrennung der Aminosäure vom Peptid erfolgt je nach verwendeter Carboxylschutzgruppe und Peptidkettenlänge durch Ausschütteln, Gelpermeations-Chromatographie, Ultrafiltration oder Umfällen. Hierauf kann der nächste Syntheszyklus beginnen.

Durch einen solchen Reaktionszyklus, bei dem die wachsende Peptidkette alternierend in fester und flüssiger Phase vorliegt, wird die vollständige Abtrennung sowohl nicht umgesetzter wie nicht deblockierter Peptidketten ermöglicht. Dies ist der entscheidende Vorteil des neuen Verfahrens, da die Abtrennung dieser analytisch oft schwierig erfassbaren Nebenprodukte bei der konventionellen Peptidsynthese sehr zeitaufwendig, bei der MERRIFIELD-Strategie jedoch überhaupt nicht durchführbar ist.

Weitere Vorteile der alternierenden Fest-Flüssigphasen Methode gegenüber den bisherigen Methoden sollen im folgenden kurz angedeutet werden. Sie ist auf jeder Synthesestufe mit jeder anderen Strategie der Peptidsynthese – mit Ausnahme der MERRIFIELD-Methode – kombinierbar. Wenn es vorteilhaft erscheint, kann die Synthese auf einer Synthesestufe nach konventionellen Methoden weitergeführt werden oder umgekehrt.

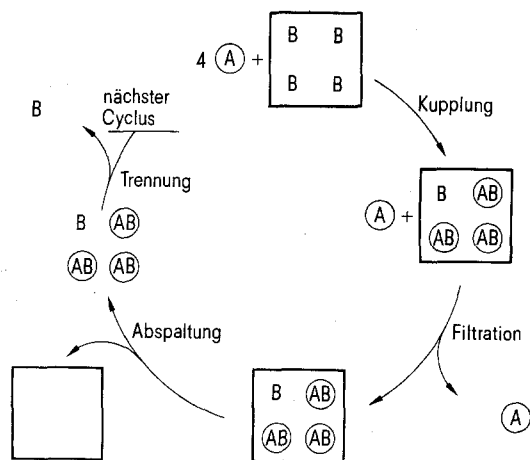
Da für die am festen Träger gebundenen Aminosäuren bezüglich Träger und Schutzgruppe viele Variationsmöglichkeiten bestehen, lässt sich das beschriebene Syntheseprinzip mit den üblichen Schutzgruppen für Drittfunktionen kombinieren. Für die Aktivierung der Carboxylgruppe bestehen ebenfalls kaum Beschränkungen, es werden im Gegenteil neue Vorteile eröffnet; so würde z. B. bei der Aktivierung über ein gemischtes Anhydrid die Kupplung mit der «falschen» Carboxylgruppe zwar zu einem Ausbeuteverlust, nicht aber zur Produktverunreinigung führen.

Als Carboxylschutzgruppen bieten sich vor allem solubilisierende monofunktionelle Polymere an, wie die von uns genauer untersuchten Polyäthylenglykolmonoalkyläther⁵, die ausserdem den Vorteil haben, dass durch ihre Verwendung die Abtrennung der freien Aminosäuren sehr vereinfacht wird². Im Prinzip kann aber jede andere Carboxylschutzgruppe eingesetzt werden.

Ein weiterer Vorteil ist die einfache analytische Kontrolle des Kupplungsverlaufs und der Deblockierungsreaktion durch die Durchflussanalyse mit Ninhydrin oder Fluorescamin⁶.

Die beschriebene alternierende Fest-Flüssigphasen Strategie ist auf die Synthese anderer hochmolekularer Stoffe mit wechselnder aber definierter Folge von über je zwei funktionellen Gruppen verknüpfte Monomere z. B. Polynucleotide oder Polysaccharide mit entsprechenden Abwandlungen der Träger-Monomer Bindung prinzipiell ebenso vorteilhaft anwendbar.

Das Verfahren wird an der Synthese des Pentapeptids H-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OH erläutert.



Schematische Darstellung eines Syntheszyklus der alternierenden Fest-Flüssigphasen-Methode. A) Aminosäure (rest), Peptidkette. B) Aminosäure (rest). □, fester Träger und Aminoschutzgruppe; ○, Carboxylschutzgruppe.

¹ R. B. MERRIFIELD, J. Am. chem. Soc. 85, 2149 (1963).

² M. MUTTER, H. HAGENMAIER und E. BAYER, Angew. Chem. 83, 883 (1971).

³ R. L. LETSINGER und M. J. KORNET, J. Am. chem. Soc. 85, 3045 (1963).

⁴ E. BAYER, H. ECKSTEIN, K. HÄGELE, W. A. KÖNIG, W. BRÜNING, H. HAGENMAIER und W. PARR, J. Am. chem. Soc. 92, 1735 (1970). – H. FRANK, H. HAGENMAIER, Tetrahedron, 30, 2523 (1974).

⁵ H. HAGENMAIER, H. FRANK, H. MEYER, unveröffentlichte Ergebnisse.

⁶ H. HAGENMAIER und M. MUTTER, Tetrahedron Lett. 1974, 767.

a) Trägergebundene Aminosäuren. Als fester Träger dient vernetztes Polystyrol. Die daran gebundene Aminoschutzgruppe ist ein Benzhydryloxy-carbonyl-Analogon, bei dem ein Phenylring durch den des Polystyrols ersetzt ist.

Vernetztes Polystyrol wird benzoiliert⁷, mit Natriumborhydrid zum Carbinol reduziert^{7,8} und zum entsprechenden gemischten Kohlensäurephenylester umgesetzt⁹. Durch Reaktion mit der entsprechenden Aminosäure erhält man das Derivat⁹. Der Reaktionsverlauf wird auf jeder Stufe durch Elementaranalyse und IR-Spektrum verfolgt. Die Beladung liegt bei 1,8–2,5 Aminosäurereste pro 10 Monomereinheiten.

b) Kupplungsreaktion. Äquimolare Mengen von Prolinpicolyester¹⁰ und trägergebundenes, an der Aminogruppe geschütztes Alanin werden in DMF mit DCCI und Hydroxybenzotriazol¹¹ gekuppelt. Der Umsatz wird mit der Durchflussanalyse verfolgt⁶. Wenn die Aminosäurekomponente nicht vollständig verbraucht ist, wird nochmals eine entsprechende Menge des Alaninderivates zugesetzt. Nach beendeter Reaktion (über Nacht bei 0°C) wird gewaschen, bis das Filtrat beim Eindampfen keine Rückstände mehr enthält und ninhydrin-negativ ist.

c) Freisetzung des Peptids. Sie erfolgt durch Zugabe von 10%iger Trifluoressigsäure in Methylenchlorid. Nach 10 Min wird abfiltriert und mehrfach mit DMF gewaschen, bis das Filtrat ninhydrin-negativ ist. Darauf wird das Filtrat im Hochvakuum eingedampft und mit DMF aufgenommen. Die Abtrennung der Aminosäure erfolgt durch Ionenaustausch an SE-Sephadex oder Gelpermeations-Chromatographie an Sephadex G-10 mit DMF als Elutionsmittel. Hierauf kann die Kupplung mit der nächsten trägergebundenen Aminosäure erfolgen.

Nach vollendeter Synthese wird die Carboxylschutzgruppe durch katalytische Hydrogenolyse abgespalten. Das Peptid ist chromatographisch rein¹².

Das Peptid wurde auch unter Verwendung von Polyäthylenglykolmonostearyläther als Carboxylschutzgruppe⁵ synthetisiert. Der einzige Unterschied zum geschilderten Verfahren ist die Abtrennung der freien Aminosäure; sie erfolgt hier durch Ausfällen des Peptidesters mit Äthanol oder durch Ultrafiltration².

Summary. A new strategy for peptide synthesis on polymeric supports is described. This alternating liquid-solid phase peptide synthesis procedure facilitates the ready separation of reacted and unreacted amino component at the end of each coupling reaction. Incomplete coupling reactions and incomplete deprotection reactions, the most serious problems in previously described methods of peptide synthesis on polymeric supports, have in this procedure no influence on the success of a synthesis. The principle is exemplified by the synthesis of the pentapeptide Gly-Val-Gly-Ala-Pro.

H. FRANK und H. HAGENMAIER

*Chemisches Institut der Universität,
Auf der Morgenstelle, D-74 Tübingen 1
(Bundesrepublik Deutschland, BRD), 6. September 1974.*

⁷ P. RIVAILLE, A. ROBINSON, M. KAMEN und G. MILHAUD, *Helv. chim. Acta* **54**, 2772 (1971).

⁸ G. L. SOUTHARD, G. S. BROOKE, J. M. PETTEE, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 3505. – H. FRANK, Dissertation Tübingen (1973).

⁹ P. SIEBER und B. ISELIN, *Helv. chim. Acta* **51**, 622 (1968).

¹⁰ R. CAMBLE, R. GARNER und G. T. YOUNG, *J. chem. Soc. (C)* **1969**, 1911.

¹¹ W. KÖNIG und R. GEIGER, *chem. Ber.* **103**, 788 (1970).

¹² H. HAGENMAIER und H. FRANK, *J. Chromat. Sci.* **10**, 663 (1972).

Studies on the Maintenance of Porcine Graafian Follicles in Organ Culture

It is now well established for a variety of mammalian species that the changes characteristic of pre-ovulatory maturation in the Graafian follicle are dependent upon an adequate supply of gonadotrophic hormones, and especially on the so called 'LH-surge' which occurs in the pig about 40 h before ovulation. It is conceivable, however, that two of the processes involved (resumption of meiosis by the oocyte and synthesis of steroid hormones by the somatic tissues of the follicle), require different endocrine control mechanisms (see NEAL and BAKER¹). The precise rôle played by FSH and LH remains unknown and is difficult to study in vivo. The purpose of the present investigation was therefore to develop a suitable technique for maintaining porcine Graafian follicles in organ culture so that the effects of gonadotrophic hormones administered during the phases of pre-ovulatory maturation could be assessed. If successful, these techniques would also provide a means of studying the interrelationships between the germinal and somatic components of the follicle.

Materials and methods. 16 sexually mature pigs, either purebred Large Whites or Large White crosses maintained at the pig unit of the Edinburgh School of Agriculture, were used in this study. Their ovaries were removed during mid-ventral laparotomy at known stages of the oestrous cycle (on days 17 to 21). Approximately 80 follicles with antra, each follicle measuring 4 to 10 mm in diameter, were cleanly dissected from the ovarian

tissue within 1 to 2 h of surgery. Some of the follicles were fixed for histology to serve as controls, while the remainder were set up for organ culture using one of the following procedures: a) the follicles were placed 'free floating' in culture medium within plastic Petri dishes containing Eagle's minimal essential medium supplemented with calf serum (20% v/v) and glutamine. Racks of 4 of these dishes (each with 2 to 5 follicles) were placed in modified 'Kilner' preserving jars (see BAKER and NEAL²), which were gassed at 0 to 0.703 kg/cm² with 5% CO₂ in either air or 55% oxygen; b) as for system (a), except that the follicles were supported by lens tissue on a stainless steel grid, such that the follicle only received nutrients which diffused through the tissue; c) method (b) was modified by the addition of a second piece of lens tissue which was draped over the follicle to act as a 'wick' which wetted the entire surface of the follicle with medium; d) the follicles, together with 2 ml of nutrient medium, were placed in roller culture tubes which were rotated at 4 rpm within the incubator. The same gas mixtures were used as in (a) above, but the tubes were not gassed at the high pressures.

¹ P. NEAL and T. G. BAKER, *J. Endocr.*, in press (1974).

² T. G. BAKER and P. NEAL, *Biophysik* **6**, 39 (1969).