

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Hamburg
(Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. C. KRAUSPE)

Antigene Eigenschaften von β^{1-24} -Corticotropin*

Von

U. HACHMEISTER und J. KRACHT

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Februar 1965)

Mit der Konstitutionsaufklärung von β -Corticotropin (BELL), einem Polypeptid mit 39 Aminosäuren waren die Voraussetzungen zur chemischen Modifizierung und zur Synthese von Teilsequenzen des ACTH mit Corticotropin-Aktivität gegeben (Lit. s. SCHWYZER). SCHWYZER und SIEBER gelang die Totalsynthese von β -Corticotropin. Es zeigte sich, daß die Aminosäuresequenz 1—24 des natürlichen ACTH bei allen Species gleich und für die biologische Aktivität verantwortlich ist, während Speciesdifferenzen im Restmolekül zum Ausdruck kommen (HOFMANN). Corticotrop aktive synthetische Polypeptide sollen keine oder minimale allergisierende bzw. antigene Eigenschaften besitzen. Im Rahmen eigener immunhistologischer Untersuchungen zur Darstellung der ACTH-Bildungsstätten mit markierten Antiseren gegen extraktives ACTH interessierte die Frage, ob auch ein derartiges synthetisches Polypeptid unter experimentellen Bedingungen antigene Eigenschaften zu entwickeln vermag. Damit gewonnene Antiseren sollten sich zur Darstellung und Lokalisation ACTH-haltiger Zellen im Vorderlappen verschiedener Species besser eignen als jene gegen natürliches ACTH, weil Verunreinigungsfaktoren entfallen und damit die Spezifität der Befunde steigen würde.

Material und Methodik

Verwendet wurde das von KAPPELER und SCHWYZER synthetisierte β^{1-24} -Corticotropin (Ciba**), ein Tetracosapeptid mit den ersten 24 des aus 39 Aminosäuren bestehenden β -Corticotropins in natürlicher Reihenfolge. Die Substanz ist chemisch-physikalisch, durch quantitative Aminosäurenanalyse, UV-Spektrum, Hochspannungselektrophorese, Dünnschicht- und Papierchromatographie und durch die spezifische Drehung charakterisiert worden (SCHULER u. Mitarb.).

Vier weibliche Kaninchen mit einem Ausgangsgewicht zwischen 1,9 und 2,4 kg erhielten im Abstand von 1 Woche jeweils 0,25 mg β^{1-24} -Corticotropin, gelöst in 0,5 ml Aqua dest. emulgiert mit 0,5 ml komplettem Freundschens Adjuvans (Difco) i. m. 8 Tage nach der sechsten Injektion wurde erstmals Blut aus der Ohrvene entnommen und das Serum zur Bestimmung des Antikörpertiters mit dem Boydentest (FISCHER u. Mitarb.) und für die Immunfluoreszenz gewonnen. In der angegebenen Art wurden die Tiere weiter immunisiert, um bei Bedarf jeweils 8 Tage nach der letzten Injektion Serum zu gewinnen. Die Seren wurden bei -20°C aufbewahrt oder mit Merthiolat (1:10000) versetzt bei $0-2^{\circ}\text{C}$ im Kühlraum kurzfristig gelagert.

Zur weitgehenden Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurde die γ -Globulinfraction mit der Rivanolmethode hergestellt. Im Hinblick auf mögliche Denaturierungserscheinungen

* Herrn Professor Dr. Dr. h. c. C. KRAUSPE zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Der Ciba AG., Basel, danken wir für die Überlassung von β^{1-24} -Corticotropin (Ciba 30920 Ba, Synacthen®).

durch Präcipitation erschien dieses Verfahren vorteilhaft, da die γ -Globuline hierbei nicht ausgefällt werden. Die γ -Globulinfraktion wurde mit einer Apparatur zur Liquoranreicherung (Membranfiltergesellschaft, Göttingen) auf $\frac{1}{4}$ des Serumausgangsvolumens eingeengt.

Zur Markierung der Seren verwendeten wir das nach der Methode von RINDERKNECHT auf Celite adsorbierte Fluoresceinisothiocyanat (FITC-California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles). Den Angaben von RINDERKNECHT folgend, wurden dem γ -Globulinkonzentrat ein gleiches Volumen Carbonat-Bicarbonatpuffer 0,05 M, pH 9 und 15 mg des 10%ig auf Celite adsorbierten FITC zugefügt. Mit dem Magnetrührer wurde 30 min gerührt. Das Adsorbens wurde anschließend abzentrifugiert und der ungebundene Farbstoff mittels Gelfiltration auf einer Sephadex G 50 fine Säule (Deutsche Pharmacia GmbH., Frankfurt a. M.) equilibriert mit phosphatgepufferter physiol. NaCl-Lösung vom Farbstoff-Protein-Konjugat getrennt. Dabei wird gleichzeitig der Carbonatpuffer gegen den Phosphatpuffer ausgetauscht.

Dem Konjugat wurde Merthiolat (1:10000) zugesetzt. Vor Gebrauch wurde das markierte Serum mit 100 mg Kaninchen- oder Rattenleberpuder pro ml (1 Std lang) geschüttelt und der Puder anschließend bei 18000 U/min abzentrifugiert.

Als Testobjekt dienten Hypophysen von Schlachtschweinen. Das frisch entnommene Gewebe wurde 1 Std in 10%igem neutralem Formalin bei 0—2° C fixiert, anschließend je 1 Std in 70, 80, 96 und 100% Äthanol dehydriert und über Methylbenzoat und Benzol in Paraffin eingebettet. Weiteres Material wurde zur Aufarbeitung mit dem Kryostaten eingefroren. Zu Kontrollzwecken wurden andere Hypophysen in Eialbumin eingefroren.

4 μ dicke Schnitte wurden nach Entparaffinierung über die absteigende Alkoholreihe in phosphatgepufferter physiol. NaCl-Lösung gebracht. Kryostatschnitte von 5—10 μ Dicke wurden 30 min in 96%igem Äthanol bei Zimmertemperatur fixiert und in gepufferter physiol. NaCl-Lösung gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit paraffingetränkten Klebestreifen umrahmt, mit 6%igem Rinderalbumin beschichtet und 45 min lang bei 37° C in der feuchten Kammer inkubiert. Das Albumin wurde anschließend mit Fließpapier abgesaugt. Die daraufhin zweimal 30 min mit markiertem Antiserum überschichteten Schnitte wurden bei gleicher Temperatur in der feuchten Kammer exponiert (direkte Methode nach COONS und KAPLAN). Anschließend wurden sie dreimal 10 min in gepufferter physiol. NaCl-Lösung (pH 7,2) gewaschen und mit einem Glycerin-Puffergemisch (pH 9) eingedeckt.

Zur Sicherung der Spezifität der Befunde wurden Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Die Schnittbeschichtung erfolgte hierbei mit:

1. markiertem Serum unbehandelter Kaninchen,
2. markiertem Antirattencolonserum von Kaninchen,
3. markiertem Antihuman- γ -globulin,
4. unmarkiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin gefolgt von markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin,
5. unmarkiertem Serum unbehandelter Kaninchen, danach mit markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin.
6. Mischung von steigenden Mengen
 - a) phosphatgepufferter physiol. NaCl-Lösung,
 - b) wie vor + 0,5 mg β^{1-24} -Corticotropin/ml,
 - c) wie vor + 100 IE Acethropan (Hoechst)/ml,
 - d) wie vor + 0,5 mg TSH (Pretiron-Schering)/ml,
 - e) wie vor + 0,5 mg Insulin (Kristallinsulin-Hoechst)/ml zu gleichbleibenden Mengen von Anti- β^{1-24} -Corticotropin.

Nach zweistündiger Absorption bei Zimmertemperatur erfolgte die Beschichtung von Kryostatschnitten von Schweinehypophysen. Um auch eventuelle unspezifische Reaktionen verifizieren zu können, wurde in diesem Fall auf die Präinkubation mit Albumin und die Absorption der Seren mit Leberpuder verzichtet.

7. Kryostat- und Paraffinschnitte von Leber, Milz und Niere der Ratte wurden mit markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin beschichtet.

Paraffinschnitte von Schweinehypophysen und Hypophysen anderer Species (Mensch, Hund, Katze, Kaninchen) wurden nach Betrachtung der Immunfluoreszenzphänomene mit der Ferameisensäure-Alcianblau-PAS-Orange G-Methode umgefärbt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen extraktiv gewonnenes ACTH (Acethropan, Hoechst) und gegen das synthetische Peptid wurden an aufeinanderfolgenden 2 μ dicken Schnitten in

spiegelbildlicher Anordnung miteinander verglichen. Hierzu diente die Leitz-Fluoreszenzeinrichtung mit Dunkelfeldkondensor in Verbindung mit der Mikroskopkamera Orthomat am Ortholux. Als Strahlungsquelle wurde die Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200 W verwendet. UV-Erregerfilter: Schott UG 1 (1 mm) in Kombination mit dem Rotdämpfungsfilter BG 38 (4 mm), UV-Sperrfilter: K 430, Filmmaterial: Adox KB 14, Anscochrome 200 (24 DIN).

Befunde

Mit FITC markierte Antiseren gegen β^{1-24} -Corticotropin hinterlassen nach Überschichtung von Kryostat- und Paraffinschnitten von Schweinehypophysen eine apfelgrüne Fluoreszenz in einem Teil des Zellbestandes der Pars distalis und in einigen vorderlappennahen Zellen der Pars intermedia. Der Mittellappen hebt sich durch eine mehr diffuse Fluoreszenz von den kontrastreich fluoreszierenden

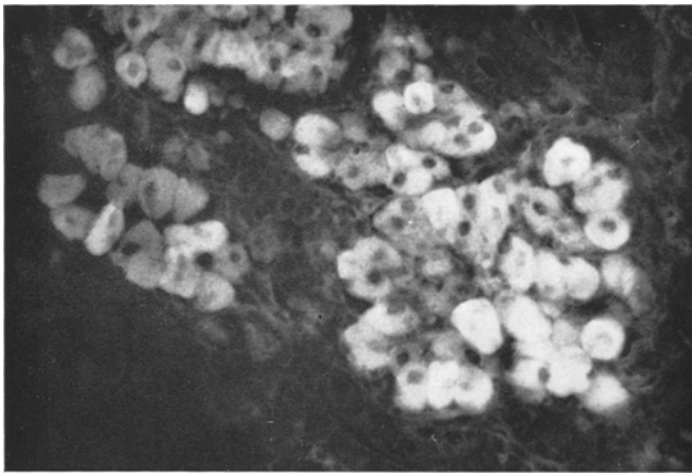


Abb. 1. Immunhistologische Darstellung ACTH-enthaltender Zellen im Hypophysenvorderlappen des Schweins mit markiertem β^{1-24} -Corticotropin-Antiserum: Gelbgrünliche, in der Wiedergabe weißliche Fluoreszenz von Zellkomplexen unter Aussparung der Zellkerne (Direktmethode nach COONS u. KARLAN). Vergr. 312fach

Zellen des Vorderlappens und vom nichtfluoreszierenden Hinterlappen ab. Die fluoreszierenden Zellelemente sind meistens gruppenförmig angeordnet, teils liegen sie verstreut und werden vielfach in unmittelbarer Nachbarschaft von Gefäßen angetroffen. Sie haben eine polygonale bis ovale Gestalt. Die Fluoreszenz bleibt auf das Cytoplasma beschränkt; der Zellkern ist stets ausgespart (Abb. 1). Besonders zu erwähnen ist das Hervortreten der perinucleären Golgikomplexe, in denen die Fluoreszenz abgeschwächt ist. Dadurch ergibt sich ein deutlicher Kontrast zum sonst diffus fluoreszierenden Cytoplasma einerseits und zum Negativ des Zellkerns andererseits. Nach Lokalisation und Struktur entsprechen die fluoreszenzmikroskopisch als Golgikomplexe angesprochenen Cytoplasmaanteile in allen Einzelheiten den mit der Silberimprägnation nach McDONALD dargestellten Golgifeldern. Gleichartige Resultate wurden mit markierten Anti-Seren gegen extraktiv gewonnenes ACTH erzielt. Unterschiede bestehen nur insofern, als mit markierten Antiseren gegen β^{1-24} -Corticotropin angefertigte Präparate durchschnittlich kontrastreicher sind, weil die unspezifische Fluoreszenz des Hintergrundes schwächer ist oder ganz fehlt. Ihre Existenz nach Anwendung markierter Antiseren gegen kommerzielles ACTH vom Schwein beruht vermutlich auf Anti-

körpern gegen Beimengungen. Bei der Betrachtung der Aktivitäts-/Gewichtsrelationen von natürlichem ACTH (Acethropan) und β^{1-24} -Corticotropin ergibt sich, daß der Gehalt an Internationalen Einheiten (III. Int. ACTH-Stand.) im Tetracosapeptid um den Faktor 125 größer ist. Umfärbungen mit der Perameisensäure-Alcianblau - PAS - Orange-G-Technik zeigen, daß die fluoreszierenden Zellelemente im Vorderlappen R-Zellen entsprechen (Abb. 2). Auch in dieser Färbung heben sich die Golgifelder als vermindert granulohaltig heraus. Prinzipiell gleichartige Befunde gelten für andere Species, bei denen lediglich eine Variabilität hinsichtlich Größe, Anordnung und Verteilung der antigenhaltigen Zellen zu verzeichnen ist.

Die Beschichtung von *Kontrollschnitten* mit markierten Seren von unbehandelten oder mit Rattencolonschleimhaut bzw. menschlichen γ -Globulin immunisierten Kaninchen führte lediglich zu einer blauen Autofluoreszenz im Vorderlappen (Kontrolle 1—3).

Die Vorbeschichtung mit unmarkiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin ergab gemessen am negativen Ergebnis nach Vorbehandlung der Schnitte mit Serum unbehandelter Kaninchen nur eine Verminderung, jedoch keine vollständige Hemmung der Fluoreszenz in den Antigen-Reservoirs (Kontrolle 4—5).

Nach Absorption mit steigenden Mengen von β^{1-24} -Corticotropin, Acethropan, thyreotropem Hormon, Insulin und phosphatgepufferter physiol. NaCl-Lösung ergaben sich die in der Tabelle wiedergegebenen Befunde. Dabei zeigt sich, daß die Markierungspotenz von β^{1-24} -Corticotropin-Antiserum durch β^{1-24} -Corticotropin bereits in einem niedrigen Konzentrationsgrad gehemmt wird. Auf der Basis des III. Internationalen ACTH-Standards ent-

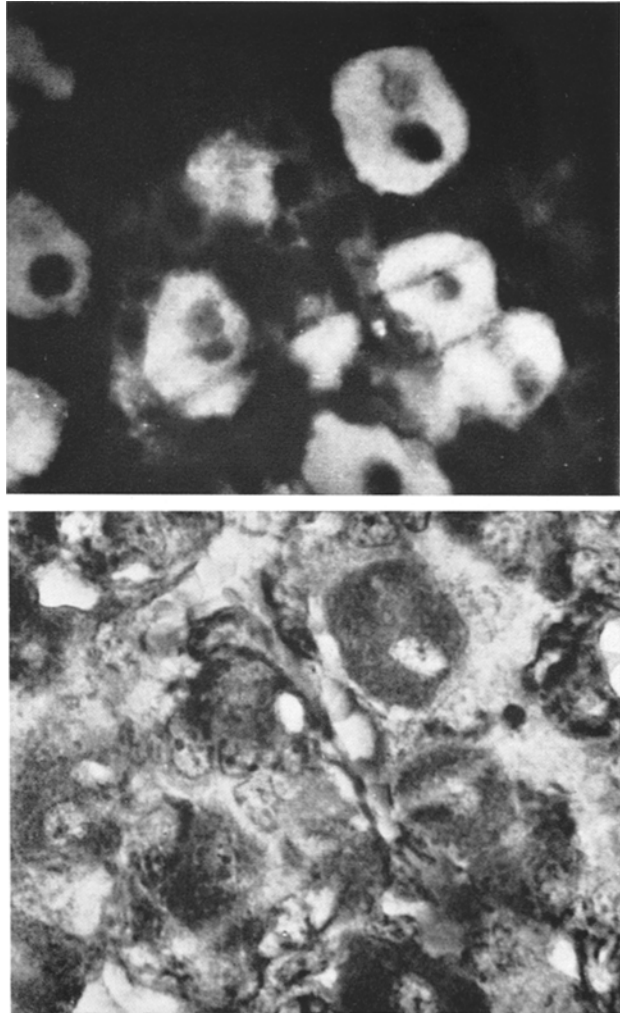


Abb. 2. Oben: Fluoreszierende ACTH-enthaltende Zellen im Hypophysenvorderlappen des Schweins, dargestellt mit FITC-markiertem β^{1-24} -Corticotropin-Antiserum (Direktmethode nach COONS u. KAPLAN): intensive Fluoreszenz des Cytoplasmas, Kernaussparung, verminderte Fluoreszenz im Golgi-Komplex. Unten: Gleicher Schnitt nach Umfärbung mit Perameisensäure-Alcianblau-PAS-Orange G. Die fluoreszierenden Elemente entsprechen R-Zellen. Golgi-Komplexe sind vermindert granulohaltig. Vergr. 946fach (Nachvergrößert)

sprechen 0,5 mg β^{1-24} -Corticotropin 50 IE Acethropan. Es wurde festgestellt, daß die Hemmung der Fluoreszenz nach Absorption des Antiserums mit Acethropan schwächer ist und bei doppelter Ausgangsdosis erst in einem höheren Konzentrationsbereich erfolgt. Demgegenüber fanden sich nach Anwendung von thyreotropem Hormon und Insulin noch positive Ergebnisse in wesentlich höheren Konzentrationsbereichen.

Tabelle. *Fluoreszenz antigenhaltiger Zellen im Hypophysenvorderlappen des Schweines nach Beschichtung mit FITC-markiertem β^{1-24} -Corticotropin-Antiserum und vorheriger Absorption mit anderen Hormonen in verschiedenen Mengenverhältnissen*

Antiserum: Hormon gelöst in phosphatgepufferter physiol. NaCl-Lösung.

	1:3	1:5	1:10	1:15	1:20	1:40	1:60
β^{1-24} -Corticotropin 0,5 mg/ml	+	—	—	—	—	—	—
Acethropan 100 IE/ml	+	+	—	—	—	—	—
Pretiron 0,5 mg/ml	+	+	+	+	+	+	—
Kristall. Insulin 0,5 mg/ml	+	+	+	+	+	+	—
Phosphatgepufferte phys. NaCl-Lösung	+	+	+	+	+	+	+

Kryostat- und Paraffinschnitte von Leber, Pankreas, Milz und Niere der Ratte fluoreszierten nicht, nachdem sie mit FITC-markiertem Anti- β^{1-24} -Corticotropin beschichtet worden waren.

In der zweidimensionalen Geldiffusion nach OUCHTERLONY bildete das β^{1-24} -Corticotropin mit seinem Antiserum keine Präcipitationslinien.

Besprechung

In eigenen Untersuchungen über den Produktionsort des corticotropen Hormons wurde festgestellt, daß mucoidzellige adenomatöse Hyperplasien des Hypophysenvorderlappens bei hypothalamisch-hypophysär vermitteltem M.-Cushing aus R-Zellen bestehen (KRACHT, ZIMMERMANN und KRACHT). Da in diesen Hyperplasien verschiedentlich hohe ACTH-Konzentrationen nachgewiesen worden sind (Lit. s. KRACHT) und in Einzelfällen auch der immunhistologische Antigen-nachweis mit fluoreszierenden ACTH-Antikörpern gelungen ist (LEZNOFF u. Mitarb.), dürfte feststehen, daß ACTH in den R-Zellen oder in einer Untergruppe der R-Zellen gebildet wird. Da aus lichtoptischen Färbeverfahren jedoch nur vergleichende und indirekte Schlußfolgerungen möglich sind, gingen wir dazu über, den Fragenkomplex immunhistologisch zu bearbeiten.

Mit dieser Technik gelang MARSHALL erstmalig der Nachweis der ACTH-Lokalisation in der basophilen Zellgruppe der Schweinehypophyse. Wir konnten feststellen, daß mit Antiseren von Kaninchen gegen extraktiv aus Hypophysen gewonnenes ACTH im Direktverfahren nach COONS und KAPLAN bei verschiedenen Species Vorderlappenzellen dargestellt werden, die sich nach Umfärbung als R-Zellen erweisen. Die eigenen Befunde decken sich mit den Angaben von PEARSE und VAN NOORDEN, LEZNOFF u. Mitarb. sowie MCGARRY u. Mitarb. (2) für die menschliche Hypophyse.

Hieraus ergab sich die Fragestellung, inwieweit ähnliche oder bessere Ergebnisse mit Antiseren gegen ein synthetisches Polypeptid mit ACTH-Aktivität zu erzielen wären. Es war fraglich, ob derartige Polypeptide überhaupt Antigen-Eigenschaften besitzen, da experimentell ein derartiger Nachweis bisher nicht geführt werden konnte (AXELROD u. Mitarb., LARON) und auch klinisch der therapeutische Vorteil von synthetischem ACTH durch das Fehlen allergisierender oder antigenen Eigenschaften betont wird. Lediglich CHARPIN u. Mitarb. er-

wähnen den Fall einer 47jährigen Frau mit Asthma bronchiale, bei der es einige Stunden nach zweimaliger Anwendung des Tetracosapeptids jeweils zur Asthmakrise kam.

Wir stellten fest, daß die Immunfluoreszenz der R-Zellen im wesentlichen an das granulohaltige Cytoplasma gebunden ist.

Zur Deutung des Phänomens abgeschwächter Fluoreszenz und geringeren Granulagehalts im Bereich des Golgiapparates verweisen wir auf elektronenmikroskopische Befunde kleinerer und weniger dichter Granula in der Nähe oder innerhalb des Golgifeltes (FARQUHAR und WELLINGS, FARQUHAR, GUSEK). Diese Autoren treten für die Entstehung inkretorischer Granula im Golgikomplex von Vorderlappenzellen ein. Es muß allerdings offenbleiben, ob die geringere Immunfluoreszenz des Golgifeltes lediglich auf geringerer Granulagröße und Quantität beruht oder ob es sich um einen Mangel an Antigen im Sinne einer niedrigeren Reifungsstufe im Rahmen der Hormonsynthese handelt.

In der Immunhistologie kommt dem Spezifitätsnachweis besondere Bedeutung zu. Die wichtigste Voraussetzung hierfür ist ein definiertes Antigen, eine Forderung, die nicht immer erfüllt werden kann, in den vorliegenden Untersuchungen aber als Idealfall gegeben war. Beim Vergleich von β^{1-24} -Corticotropin und extraktivem ACTH in der Immunfluoreszenz und mit der Hämagglutinationsmethode (Boyden-Test) wird die immunologische Heterogenität von hypophysärem ACTH deutlich. Im Gegensatz dazu sind die gegen das synthetische β^{1-24} -Corticotropin gerichteten Antikörper spezifisch allein gegen das definierte Antigen gerichtet.

MCGARRY u. Mitarb. (1) berichten, daß die Hemmung der Agglutination mit hypophysärem ACTH beladener Erythrocyten durch homologe Antikörper nach Zugabe von β^{1-24} -Corticotropin nicht zu erreichen war. Die Autoren ziehen daraus den Schluß, daß eine Kreuzreaktion nicht auftritt. Mit diesem System kamen wir zu gleichen Reaktionsergebnissen, die wir jedoch auf Grund ergänzender immunologischer Untersuchungen anders interpretieren müssen. Die Hemmung von Antikörpern, die durch Immunisierung mit hypophysärem ACTH gewonnen wurden, durch Tetracosapeptid in der Immunfluoreszenztechnik, wie umgekehrt von Antikörpern, die durch Verabreichung von β^{1-24} -Corticotropin entstehen, durch natürliches ACTH läßt den Schluß auf eine immunologische Kreuzreaktion zu. Dieser immunhistologisch gewonnene Befund wird durch den Nachweis einer Hemmung der cellulären Antikörperbildung mit β^{1-24} -Corticotropin beladener Erythrocyten durch homologe Antikörper nach Zugabe von Acethropan bestätigt (FISCHER u. Mitarb.). Bei der Immunisierung mit natürlichen ACTH-Präparaten (z.B. Acethropan) entstehen neben dem spezifisch reagierenden Anti-ACTH noch ein oder mehrere Antikörper, die offenbar immunhistologisch nicht erfaßt werden, wohl dann aber störend in Erscheinung treten, wenn nach dem Vorgehen von MCGARRY u. Mitarb. (1) getestet wird.

Die Reaktion von Antikörpern gegen Tetracosapeptid und gegen extraktiv gewonnenes ACTH im Schnitt wird bereits durch geringe Mengen von β^{1-24} -Corticotropin vollständig gehemmt. Zur Erzielung eines gleichartigen Effektes sind erheblich größere Mengen an hypophysärem ACTH erforderlich, die an Internationalen Einheiten gemessen eine größere corticotrope Aktivität besitzen als eine gleiche Hemmung bewirkende Mengen des Tetracosapeptids. Dies beruht unter anderem darauf, daß die immunologische Reaktion mit natürlichen

ACTH-Präparaten durch den darin enthaltenen unspezifischen Anteil verzögert bzw. gehemmt wird.

Aus Gründen der Spezifität wird deshalb zum immunhistologischen Nachweis zellgebundener corticotroper Substanzen die Verwendung von Antikörpern empfohlen, die durch Immunisierung mit einem chemisch definierten corticotrop wirksamen Antigen (z.B. β^{1-24} -Corticotropin) erzeugt werden.

Zusammenfassung

Mit Antiseren gegen synthetisches β^{1-24} -Corticotropin vom Kaninchen wurden die antigenhaltigen Zellelemente im Hypophysenvorderlappen des Schweines und anderer Species (Mensch, Hund, Katze, Kaninchen) immunhistologisch dargestellt. Die Befunde sind mit jenen vergleichbar, die mit markierten Antiseren gegen hypophysäres ACTH erreicht werden, aber prägnanter, da gegen Beimengungen gerichtete Antikörper entfallen. Umfärbungen mit der Perameisensäure-Alcianblau-PAS-Orange G-Technik ergaben, daß die fluoreszierenden Vorderlappenzellen R-Zellen entsprechen. Die Fluoreszenz ist an das granulohaltige Cytoplasma gebunden und im Bereich von Golgikomplexen abgeschwächt, während der Zellkern ausgespart bleibt. Für die Immunhistologie zellgebundener corticotroper Substanzen wird die Verwendung von Antikörpern empfohlen, die durch Immunisierung mit einem chemisch definierten Antigen vom Typ der corticotrop wirksamen synthetischen Polypeptide erzeugt werden.

Antigenic Properties of β^{1-24} -Corticotropin

Summary

Using rabbit antisera produced against the synthetic β^{1-24} -corticotropin, the antigen-containing cells in the anterior lobe of the pig hypophysis and of other species (man, dog, cat, rabbit) were demonstrated immunohistologically. The results were comparable to those which were obtained with labelled antisera against hypophyseal ACTH, but were more precise, since antibodies against impurities were excluded. Restaining with the periodic acid-alcian blue-PAS-orange G technic disclosed, that the fluorescing cells of the anterior lobe are identical with the R-cells. The fluorescence was restricted to the granula-containing cytoplasm, in the region of the Golgi complex it was fainter, whereas the cell nucleus failed to stain. For immunohistological studies on cell bound corticotropic substances it seems recommendable to use such antibodies, which are obtained by immunization with a chemically defined antigen of the type of synthetic polypeptides with corticotropic activity.

Literatur

- AXELROD, A. E., A. C. TRAKATELLIS, and K. HOFMANN: Antigenicity of synthetic polypeptides with known amino-acid sequence. *Nature (Lond.)* **197**, 146 (1963).
 BELL, P. H.: Purification and structure of β -Corticotropin. *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5585 (1954).
 CHARPIN, J., A. ZAFIROPOULOU, J. AUBERT, PH. OHRESSER et CH. BOUTIN: Données actuelles concernant l'allergie à l'ACTH. *Presse méd.* **72**, 3025 (1964).
 FARQUHAR, M. G.: Origin and fate of secretory granules in cells of the anterior pituitary gland. *Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II*, **23**, 346 (1961).
 —, and S. R. WELLINGS: Electron microscopic evidence suggesting secretory granule formation within the Golgi apparatus. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 319 (1957).

- FISCHER, K., U. HACHMEISTER u. J. KRACHT: Darstellung und Nachweis von Antikörpern gegen β^{1-24} -Corticotropin. *Naturwissenschaften* (im Druck).
- GUSEK, W.: Vergleichende licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen menschlicher Hypophysenadenome bei Akromegalie. *Endokrinologie* **42**, 257 (1962).
- KAPPELER, H., u. R. SCHWYZER: Die Synthese eines Tetracosapeptides mit der Aminosäurefrequenz eines hochaktiven Abbauproduktes des β^{1-24} -Corticotropins (ACTH) aus Schweinehypophysen. *Helv. chim. Acta* **44**, 1136 (1961).
- KRACHT, J.: Das Hypophysen-Nebennierenrinden-System bei Cushing-Syndrom. *Verh. dtsh. Ges. Path.* **47**, 280 (1963).
- LARON, Z.: Immunological aspects of anterior pituitary hormones with special emphasis on growth hormone. 11. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin, S. 9. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.
- LEZNOFF, A., F. FISHMAN, M. TALBOT, E. E. MCGARRY, J. C. BECK, and B. ROSE: The cytological localisation of ACTH in the human pituitary. *J. clin. Invest.* **41**, 1720 (1962).
- MARSHALL jr., J. M.: Localisation of adrenocorticotrophic hormone by histochemical and immunochemical methods. *J. exp. Med.* **94**, 21 (1951).
- MCDONALD, D. M.: Silver impregnation of the Golgi apparatus with subsequent nitrocellulose embedding. *Stain Technol.* **39**, 345 (1964).
- MCGARRY, E. E., L. AMBE, R. NAYAK, E. BIRCH, and J. C. BECK: (1) Studies with antisera to pituitary hormones. *Metabolism* **13**, 1154 (1964).
- J. C. BECK, L. AMBE, and R. NAYAK: (2) Some studies with antisera to growth hormone, ACTH and TSH. *Recent Progr. Hormone Res.* **20**, 1 (1964).
- PEARSE, A. G. E., and S. VAN NOORDEN: The functional cytology of the human adenohypophysis. *Canad. med. Ass. J.* **88**, 462 (1963).
- RINDERKNECHT, H.: Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins. *Nature (Lond.)* **193**, 167 (1962).
- SCHULER, W., B. SCHÄR u. P. DESAULLES: Zur Pharmakologie eines ACTH-wirksamen, voll-synthetischen Polypeptids des β^{1-24} -Corticotropins, CIBA 30920 Ba, Synacthen®. *Schweiz. med. Wschr.* **93**, 1027 (1963).
- SCHWYZER, R.: Synthetische Polypeptide mit physiologischer Wirkung. *Ergebn. Physiol.* **53**, 1 (1963).
- , and P. SIEBER: Total synthesis of adrenocorticotrophic hormone. *Nature (Lond.)* **199**, 172 (1963).
- ZIMMERMANN, D., u. J. KRACHT: Der Hypophysenvorderlappen des Menschen bei Hypercortisolismus. 11. Symp. Dtsch. Ges. Endokrin, S. 180. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965.

Professor Dr. J. KRACHT
Pathologisches Institut der Universität
2 Hamburg 20