

U 67. 11252

**KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DYNAMIK UND WIRKUNGSWEISE
DES ADRENOCORTICOTROPINS**

München/Med.

DR. MED. PETER C. SCRIBA

AUS DER II.MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR PROFESSOR DR.DR. GUSTAV BODECHTEL

KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DYNAMIK UND WIRKUNGSWEISE DES ADRENOCORTICOTROPINS

ALS HABILITATIONSSCHRIFT
ZUR ERLANGUNG DER VENIA LEGENDI
UND
ERNENNUNG ZUM PRIVATDOZENTEN
IN DER
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
DR.MED. PETER C. SCRIBA
aus Hamburg
1966

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft
und des US Department of Health, Education and Welfare



Habilitationsdatum: 18.1.1967
Datum der Ernennung zum
Privatdozenten: 19.1.1967

Fotodruck: Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Meinen akademischen Lehrern und meinen Förderern

Mein besonderer Dank gilt meinem verehrten klinischen Lehrer, Herrn Prof.Dr.Dr.G. Bodechtel, für die Unterstützung, die er meiner Arbeit zuteil werden ließ und für den freizügigen Geist, in dem in seiner Klinik wissenschaftlich gearbeitet werden durfte. Meinen Mitarbeitern, Frau D. Seibert, Fräulein M. Fries, Herrn R. Hacker und Herrn F. Kluge danke ich für die erfreuliche Zusammenarbeit, für den Fleiß und für die Gewissenhaftigkeit, mit denen sie arbeiteten. Herrn Priv. Doz. Dr.K. Schwarz sei für anregende Diskussionen der endokrinologischen Probleme herzlich gedankt, Herrn Prof.Dr. P. Eymmer für seine freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

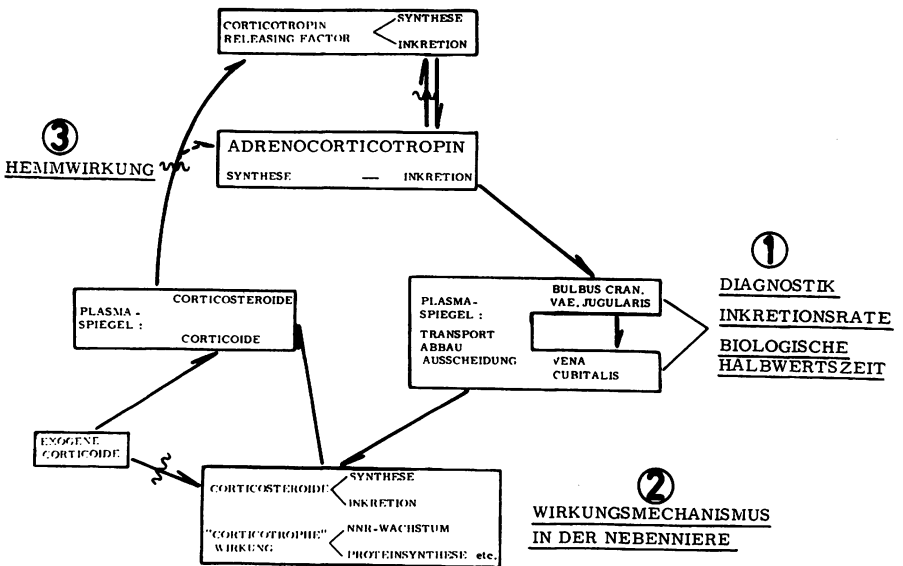
I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
M E T H O D E N	5
I. ACTH-BESTIMMUNG DURCH MESSUNG DES ANSTIEGES DER CORTICOSTERON-INKRETIION IM NEBENNIEREN- VENENBLUT DER AKUT HYPOPHYSEKTOMIERTEN RATTE	
1. Hypophysektomie	5
2. Arterien- und Venenkatheter	5
3. Corticosteronbestimmung im Nebennieren- venenplasma der Ratte	8
4. Fluorimetrische Bestimmung der sog. 11-Hydroxycorticosteroide	8
5. ACTH-Bestimmung : Standardlösungen und menschliches Plasma	9
6. Punktion des Bulbus cranialis venae jugularis	10
7. Applikation von ACTH-Standard- oder Plasma- proben bei der hypophysektomierten Ratte. Auswertung und Statistik	10
II. SACCHAROSEDICHTGRADIENTENZENTRIFUGATION	16
III. PRÄPARATION VON POLYSOMEN UND RIBOSOMEN	19
IV. INTRAVENÖSE GLUKOSEBELASTUNGEN	22
E R G E B N I S S E	
I. BESTIMMUNG VON ACTH-SPIEGELN IM MENSCHLICHEN PLASMA	23
II. VERSUCHE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES ACTH	33
1. ACTH UND PROTEINSYNTHESE DER NEBENNIERE	33
a) BIOCHEMIE DER PROTEINSYNTHESE	34
b) PROTEINSYNTHESE IM NEBENNIERENHOMOGENAT	35
c) METHODIK	38
d) VORVERSUCHE	40
e) EINFLUSS VON ACTH AUF DIE AKTIVITÄT DER LÖSLICHEN ZELLFRAKTION	42
f) NATUR DES STIMULIERENDEN FAKTORS IN DER LÖSLICHEN ZELLFRAKTION	44
g) EINFLUSS VON ACTH AUF DIE AKTIVITÄT DER MIKROSOMEN	50
h) KINETISCHE VERSUCHE MIT AMINOACYLTRANS- FERASE UND POLYSOMEN AUS SCHWEINENE- NIEREN	50
2. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PROTEINSYNTHESE UND CORTICOSTEROIDSYNTHESE	
a) EINFLUSS VON ACTH UND CYKLISCHEM 3',5'-ADENOSINMONOPHOSPHAT IN VITRO	55
b) CORTICOSTEROID- UND PROTEINSYNTHESE NACH HYPOPHYSEKTOMIE	59
III. SUPPRESSION DER ENDOGENEN CORTICOSTEROIDINKRETIION DURCH KURZZEITIGE CORTICOIDTHERAPIE	62
D I S K U S S I O N	65
Z U S A M M E N F A S S U N G	78
L I T E R A T U R	I

E I N L E I T U N G

Unter den Fächern der Inneren Medizin ist die klinische Endokrinologie in ganz besonderem Maße von leistungsfähigen und spezialisierten Laboratorien abhängig. Unter diesem Gesichtspunkt soll diese Arbeit aus dem Gebiet der klinischen und experimentellen Endokrinologie verstanden werden. Im Zentrum unseres Interesses und dieser Schrift steht das Adrenocorticotropin, dessen mannigfache funktionelle Verknüpfungen schematisch in Abb. 1 a dargestellt sind. Drei Fragestellungen klinischer und experimenteller Natur haben uns in den letzten Jahren besonders beschäftigt, und diese sollen hier einleitend kurz aufgezeigt werden.

Abb. 1 a: Schematische Darstellung der Fragestellungen dieser Schrift



Die Regulation der Inkretion von ACTH und Corticosteroiden, sowie des sog. Corticotropin-Releasing-Factors sind Gegenstand zahlreicher Darstellungen unter dem Gesichtspunkt der Kybernetik (vgl. 1, 2) gewesen, so daß wir auf eine Wiederholung verzichten möchten. Es kann heute als gesichert gelten, daß aus dem Hypothalamus stammende Faktoren (CRF) die Synthese und die Inkretion von ACTH im Hypophysenvorderlappen beeinflussen (3 - 22).

Man hat die Struktur mehrerer solcher Substanzen mit CRF-Charakter aufklären können (4, 8). Implantationsversuche mit Corticosteroiden und ACTH sprechen dafür, daß diese Substanzen aus dem Hypothalamus stammen (3, 12 - 15, 20) und über Pfortadergefäße in den Hypophysenvorderlappen gelangen können (3, 16). Man vermutet einen Rückkopplungsmechanismus zwischen CRF und ACTH (4, 21, 22). Nach neueren Untersuchungen wird das ACTH beim Menschen in der R-Zelle, bei der Ratte in azidophilen Zellen synthetisiert (5, 23, 24).

Aus dem Hypophysenvorderlappen gelangt das ACTH über die die Hypophyse umgebenden Sinus und die Blutleiter der Dura mater zum Bulbus cranialis venae jugularis (3, 140, 141). Es lag nahe zu vermuten, daß die ACTH-Spiegel im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis höher sein würden als die Spiegel im Plasma aus dem übrigen venösen Stromgebiet, z.B. aus der Vena cubitalis. Das erste der uns interessierenden Probleme (Abb. 1 a) war, ob man aus dem Unterschied der Plasmaspiegel, welche wir mittels einer biologischen Bestimmungsmethode - Corticosteron-Anstieg im Nebennierenvenenblut der akut hypophysektomierten Ratte - erfaßten, eine Verbesserung der Diagnostik bei bestimmten endokrinen Erkrankungen erzielen, sowie Information über Inkretionsraten und biologische Halbwertzeiten endogenen Adrenocorticotropins erhalten könnten. Das gelingt zumindest für erhöhte ACTH-Spiegel im Plasma, wie sie bei manchen Erkrankungen vorliegen. Auf die klinische Bedeutung dieser diffizilen Methode ist im Ergebnisteil näher eingegangen worden.

Das Blut ist für das ACTH Transportorgan und liefert es den für die biologische Halbwertzeit entscheidenden Vorgängen

wie Verteilung, Abbau und Ausscheidung aus. Nur ein sehr kleiner Teil des ACTH gelangt auf dem arteriellen Wege in die Nebenniere, um dort seine spezifischen Wirkungen auszuüben. Eine ganze Reihe von Wirkungen des ACTH auf die Nebennierenrinde sind bekannt. ACTH steigert die Durchblutung der Nebennierenrinde (116 - 120), es führt zu einer Ausschüttung von Ascorbinsäure und Corticosteroiden, sowie zu einer Steigerung der Corticosteroidsynthese in der Nebenniere. Daneben ist ACTH der für die Größe der Nebenniere verantwortliche Faktor (263, 263a und b). Läßt sich für alle diese Effekte ein gemeinsamer Wirkungsmechanismus des ACTH finden? Diese Frage ist das zweite Thema unserer Untersuchungen (Abb. 1 a). Wir kommen, wie im Ergebnisteil ausgeführt, zu dem Schluß, daß die genannten Wirkungen des ACTH dissoziierbar sind und daß die "Primärwirkung" des ACTH noch unbekannt ist.

Der Wirkungsmechanismus von Hormonen ist Gegenstand sehr zahlreicher Untersuchungen in den verschiedensten Laboratorien. Besondere Aufmerksamkeit hat man in den letzten Jahren der Wirkung der Hormone auf die Proteinsynthese bzw. auf die Synthese von Nucleinsäuren in den Zielorganen oder -geweben gewidmet (25 - 31). Es ist in diesem Rahmen nicht möglich, die Problematik aller dieser Untersuchungen einzeln zu diskutieren, es sei nur auf entsprechende Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Testosterons (32 - 36), der Oestrogene (37 - 41), der Corticosteroide (42 - 47), der Schilddrüsenhormone (48 - 54), des Insulins (55 - 60), des Wachstumshormons (61 - 63), des thyreotropen Hormons (64) und schließlich des Adenocorticotropins (s.u.) verwiesen. Diesen Untersuchungen liegt im allgemeinen die Vorstellung zu Grunde, daß Hormone über die Induktion der Synthese von Enzymproteinen ihre verschiedenartigen biologischen Effekte bewirken. Interessante biochemische Untersuchungen über die Induzierbarkeit der Proteinsynthese sind auf diese Weise entstanden.

Unser Interesse galt also dem Mechanismus, durch den ACTH die Proteinsynthese in der Nebenniere beschleunigt und der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Wirkung des ACTH auf die Proteinsynthese und auf die Corticosteroidsynthese besteht. Daß diese Untersuchungen nicht nur experimentelles, sondern auch klinisches Interesse haben, wurde offenbar, als wir uns mit der Funktion der Nebenniere nach Hypophysectomie bzw. unter Suppression durch exogene Corticoide beschäftigten.

Dem Kliniker ist es seit langem bekannt, daß exogene Corticoide zu einer Suppression der Funktion des Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrinden-Systems führen. Die Corticoide wirken ebenso wie die endogenen Corticosteroide hemmend auf Synthese und Ausschüttung des Corticotropin-Releasing-Factors (10, 18, 20, 65 - 72, 166). Exogene Corticoide scheinen ferner auch unabhängig von der Suppression der CRF- und ACTH-Inkretion direkt supprimierend auf die Nebennierenrinde zu wirken (19, 72, 166). Es ist umstritten, ob Corticoide oder Corticosteroide direkt bremsend auf den Hypophysenvorderlappen wirken (10, 19 - 22, 65). Im Zusammenhang mit dem Suppressionsphänomen haben wir uns für die Dissozierbarkeit der ACTH-Wirkung auf die Corticosteroidsynthese und auf die Proteinsynthese in der Nebenniere nach Hypophysektomie interessiert.

Ein etwas ungewöhnlicher Weg, die supprimierende Wirkung von Corticoiden auf die Hypophysen-Nebennierenrindenfunktion zu untersuchen (Abb. 1 a), ergab sich im Zusammenhang mit unseren früheren Untersuchungen über den Wert der i.v. Glucose-Belastung für die Erfassung eines latenten Diabetes mellitus (79, 80). Während die meisten der vorliegenden Untersuchungen (66 - 72) über die Suppressionswirkung von Corticoiden bei Patienten durchgeführt wurden, die relativ hohe Dosen über längere Zeiträume erhielten, haben wir die Wirkung einer wenige Tage dauernden Prednisolon-Behandlung untersucht. Nach Absetzen einer solchen Behandlung ist die fluorimetrisch erfaßte endogene Corticosteroidproduktion supprimiert (74, 82) und die mittels i. v. Glucose-Belastung erfaßte Glucose-Toleranz vorübergehend erhöht (81). Da die Halbwertszeit der Corticoide wenige Stunden beträgt (73) interpretieren wir die Erhöhung der Glucose-Toleranz als Zeichen einer flüchtigen latenten Nebennierenrindensuffizienz.

Die enge Verknüpfung von klinischer und experimenteller Endokrinologie soll also an den im folgenden eingehend dargestellten Ergebnissen zu den genannten drei Fragestellungen (Abb. 1 a) aufgezeigt werden.

M E T H O D E N

ACTH-BESTIMMUNG DURCH MESSUNG DES ANSTIEGES DER CORTICOSTERON- INKRETION IM NEBENNIERENVENENBLUT DER AKUT HYPOPHYSEKTOMIERTEN RATTE.

1. Hypophysektomie

Die Hypophysektomie der Ratte wurde bei uns auf dem parapharyngealen Wege (104) durchgeführt. Männliche Sprague-Dawley-Ratten (190 - 230 g) erhielten unter kurzer Aethernarkose 0,8 ml 2,5%ige Avertin®-Lösung (Tribromäthanol in Amylenhydrat, Bayer-Leverkusen) pro 100 g Körpergewicht intraperitoneal, was zu einem etwa 25 Minuten anhaltenden Toleranzstadium führte. Die einzelnen Schritte der Hypophysektomie sind in Abb. 1-7 festgehalten. Nach einem paramedianen Hautschnitt an der linken Halsseite wurde der linke Musculus digastricus dargestellt. Unter Verwendung einer Operationslupe mit 10facher Vergrößerung (Leitz) wurde lateral des Sehenspiegels des M. digastricus sagittal in die Tiefe bis auf den Processus mesopterygoides gegangen. Von dem Processus gelangt man durch die Muskulatur auf die leicht bläuliche Sphenoidosis sphenoccipitalis, auf die eine in der Medianen von dem Foramen occipitale magnum nach rostral verlaufende Crista senkrecht auftrifft. Rostral vom Schnittpunkt wurde mit einem Kugelbohrer mit der Hand vorsichtig das Sphenoid bis auf die Dura durchbohrt und mit einem rechtwinklig abgebogenen, spitz zulaufenden Glasrohr (Öffnung der Spitze 1 mm) unter Sog von einer Wasserstrahlpumpe die Hypophyse unter Schonung der Membrana tectoria herausgesaugt. Die Haut wurde durch 2 Michel-Klammern verschlossen. - Nach der ACTH-Bestimmung (s.u.) wurde die Vollständigkeit der Hypophysektomie durch Inspektion der Membrana tectoria nach Darstellung der Schädelbasis von oben verifiziert (Abb. 1 - 7).

2. Arterien- und Venenkatheter

Nach Hypophysektomie nimmt die Empfindlichkeit, mit der die Ratte auf ACTH mit gesteigerter Corticosteron-Ausschüttung reagiert, innerhalb weniger Stunden schnell ab (101). Das ist der Grund, warum man kleinstmögliche ACTH-Mengen an der akut hypophysektomierten Ratte bestimmen muß. Vor kurzem wurde allerdings von OHSAWA (115) mitgeteilt, daß die Empfindlichkeit von Ratten, die 24 Stunden vorher hypophysektomiert worden waren und 2 Stunden vor der ACTH-Bestimmung 10 mE ACTH i.v. erhalten hatten, gleich gut sei. Bei uns wurde 60 - 70 Minuten nach der Hypophysektomie in Urethan®-Narkose (10 %ige Lösung, Merck, 1,2 ml/100 g Ratte s.c.) die linke A. femoralis in der Fossa inguinalis kanüliert und der Katheter (Gefäßkatheter OR, Braun - Melsungen, mit einem Kupferdraht als Mandrin) 7 cm weit in die Aorta geschoben, so daß die Katheterspitze ca. 1 cm



Abb. 1



Abb. 2



Abb. 3



Abb. 4



Abb. 5



Abb. 6



Abb. 7

ZU DEN ABBILDUNGEN

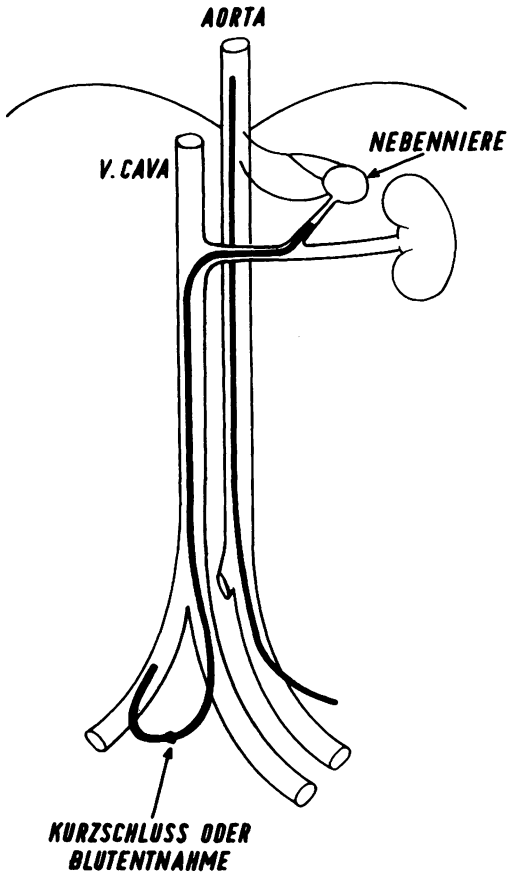
- 1 Situs nach Eröffnung der Halsfaszien. Eingehen bei der Pfeilspitze lateral vom Sehnenspiegel des M. digastricus
- 2 Processus mesopterygoideus dargestellt
- 3 Bohrfeld an der unteren Schädelbasis freipräpariert. Synchondrosis spheno-occipitalis und Crista sind deutlich zu erkennen. Unterhalb der Synchondrose ist zur Verdeutlichung der anatomischen Verhältnisse weiter als notwendig freipräpariert
- 4 Bohrloch bis auf die Dura mater
- 5 Hypophyse herausgesaugt nach Aufreißen der Dura
- 6 Schädelbasis von oben: Hypophyse in situ
- 7 Schädelbasis von oben Hypophyse entfernt. Beide Nervi optici sind zu erkennen

Vergrößerung von Abb. 1, 6, 7 etwa 5-fach
von Abb. 2, 3, 4, 5 etwa 15-fach

HYPHYPHYSECTOMIE VON RATTEN AUF DEM PARAPHARYNGEALEN WEG

oberhalb der Durchtrittsstelle der Aorta durch das Diaphragma (Abb. 8) und sicher oberhalb der die Nebenniere versorgenden Arterien lag (116).

Abb. 8: Schema der Arterien und Venenkatheter der Ratte.
In Anlehnung an (107, 116).



Der arterielle Katheter diente zur ACTH-Applikation (s.u.); diese Modifikation wurde gewählt, um die Empfindlichkeit der

Methode zu steigern (107). Sodann wurde die rechte und die linke V. femoralis katheterisiert (CLAY-ADAMS-Polyäthylen-Katheter, PE 10, Fa. Vogel, Giessen/Lahn), wobei der linke Venenkatheter 5 cm weit, der rechte bis in die Vena iliaca communis vorgeschoben wurde. Sofort nach Einführung wurden alle Katheter mit Heparin durchgespritzt, insgesamt erhielten die Tiere 50 E Heparin pro 100 g Ratte (0,5 ml Vetren[®], Promonta, Hamburg, pro 100 g). Schließlich wurde laparotomiert, die Spitze des linken Femoraliskatheters in der Vena cava aufgesucht und über die linke Nierenvene soweit wie möglich in die linke Nebennierenvene hineindirigiert (123). Die gelegentlich vor der Katheterspitze einmündende Vena phrenica inferior wurde nicht ligiert. Die Bauchhöhle wurde durch Kompressen feucht und das Tier bei ca. 35°C (Infrarotlampe) gehalten. Wenn nicht gerade Blut entnommen wurde, waren die Venenkatheter (rechte und linke V. femoralis) kurzgeschlossen (vgl. schematische Darstellung, Abb. 8). Nach dem Versuch wurde die Lage der Katheter kontrolliert.

3. Corticoosteron-Bestimmung im Nebennierenvenenplasma der Ratte

Das aus der Nebennierenvene stammende Blut wurde ohne Sog in Hämatokritröhrchen aufgefangen, bis zum Ende des Versuches bei + 4°C aufgehoben und die Gesamtblut- und -plasmamenge nach Zentrifugation (15 Min. x 1000 x g) abgelesen. Die Plasmamenge wurde mit Wasser auf 1,0 ml gebracht und bis zur Corticoosteron-Bestimmung bei - 18°C aufgehoben. Unter geringfügiger Abänderung der Methode von ZENKER und BERNSTEIN (122) wurde der Corticoosterongehalt des Rattennebenierenplasmas fluorimetrisch bestimmt. - Bekanntlich ist der Quotient Cortisol zu Corticoosteron bei der Ratte kleiner als 0,05 (121). - Die Plasmaproben (1 ml) wurden mit Chloroform (15 ml) extrahiert, der wässrige Überstand (5 Min. x 800 x g) abgesaugt und der Chloroformextrakt mit 1,5 ml 0,1 N NaOH gewaschen. Zu je 6 ml Chloroformextrakt wurden 3 ml Fluoreszenzreagens (2,4 Volumen konzentrierte Schwefelsäure und 1,0 Volumen 50%iges (V/V) wässriges Äthanol) gegeben, 15 Sek. geschüttelt und 5 Min. x 800 x g zentrifugiert. Die überstehende Chloroformphase wurde abgesaugt und nach 2 Std. die Fluoreszenz mit dem Fluoreszenzzusatz zum Photometer Eppendorf (Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) unter Verwendung des Primärfilters von 405 + 435 nm, des Sekundärfilters 500 - 3000 nm und des verkleinerten Standards Nr. 5816 gemessen. Doppelwerte der Plasmaproben wurden in zwei Reihen von Einzelwerten in der Reihenfolge der Extraktion gemessen. Weitere Einzelheiten der Methode werden anderweitig mitgeteilt (173, 174).

4. Fluorimetrische Bestimmung der sog. 11-Hydroxycorticoesteroiden.

Da ACTH-Spiegel, insbesondere wenn sie erhöht sind, nur dann sinnvoll zu interpretieren sind, wenn die zum Zeitpunkt der Messung des ACTH-Spiegels gegebene Plasma-Cortisol-Konzentration bekannt ist (101, 102), haben wir nach der Methode von

deMOOR und STEENO (175), sowie MATTINGLY und Mitarb. (176) und weiteren Verfassern (177 - 183) die sog. 11-Hydroxycorticosteroide fluorimetrisch bestimmt. Die Bezeichnung 11-Hydroxycorticosteroide ist nicht ganz korrekt; für die Praxis ist wichtig zu wissen, daß bei der Verwendung dieser Methode im menschlichen Plasma im wesentlichen Cortisol und Corticosteron erfaßt werden, wobei das Corticosteron in geringerer Menge vorliegt, dafür aber eine stärkere Fluoreszenz gibt. - Zwei ml Plasma wurden mit 15 ml Methylenchlorid überschichtet und in einem sich langsam drehenden Rotor 20 Min. lang extrahiert. Nach Absaugen der wässrigen Phase wurde der Methylenchlorid-Extrakt mit 2 ml 1N NaOH 20 Sek. lang geschüttelt, 10 Min. später die Natronlauge abgesaugt und 8 ml des Methylenchlorid-Extraktes mit 4 ml Fluoreszenzreagens (7 Volumen konzentrierte Schwefelsäure und 3 Volumen absoluter Aethylalkohol) 20 Sek. heftig geschüttelt. Nach Absaugen des überstehenden Methylenchlorids wurde das Fluoreszenzreagens in eine Glasküvette geschüttet und genau 13 Min. nach Zugabe des Methylenchlorids zum Fluoreszenzreagens die Fluoreszenz wie oben gemessen. Als Standard diente bei diesen Bestimmungen Cortisol, so daß die Angabe der gefundenen Werte in gamma Cortisol pro 100 ml Plasma erfolgte (Versuche mit M. MÜLLER - BARDORFF und W. HOCHHEUSER (82), Normalbereich: ca 5 - 23 gamma % für 9 Uhr morgens).

5. ACTH-Bestimmung: Standardlösungen und menschliches Plasma

In den meisten Laboratorien, die sich mit der biologischen ACTH-Bestimmung beschäftigen, mißt man ACTH Standards an einem Kollektiv akut hypophysektomierter Ratten und die unbekanntes Proben an einem anderen Kollektiv (101 - 103, 105, 106, 108 - 115, 132). Wir waren mit der Streubreite des Corticosteron-Anstieges im Nebennierenvenenblut der Ratte nach ACTH nicht zufrieden und haben daher versucht, durch Berücksichtigung der individuellen Empfindlichkeit der einzelnen Ratte gegen ACTH die Reproduzierbarkeit der Methode zu verbessern. Die Ratten erhielten daher eine oder zwei kleine Standardmengen ACTH (bis 0,05 m E) vor der Injektion des zu bestimmenden Plasmas (107). - Zur Herstellung der ACTH-Standardlösungen wurde synthetisches Beta-1-24 Corticotropin (Synacthen[®], Ciba) oder der internationale Arbeitsstandard für Corticotrophin (WHO, 1962, Nat.Inst.Med.Research, Mill Hill, London, NW 7) mit 0,001 N HCl-0,9 % NaCl-Lösung, der in den ersten Versuchen 0,2 % Humanalbumin zugesetzt war, gelöst. Der Zusatz von Humanalbumin unterblieb später, da wir wie andere Autoren keine Unterschiede feststellen konnten (131). Die Verdünnung erfolgte in der Kälte, die Standardlösungen wurden bei mindestens -18°C für den Zeitraum von höchstens 5 Tage aufgehoben. Nach diesem Zeitraum hatten eingefrorene Standardlösungen nachweislich an Aktivität verloren. Standard- und Plasmaproben waren bei jedem untersuchten Patienten etwa gleich eingefroren.- Die biologische Testung des Beta-1-24-Corticotropins von Ciba hatte gezeigt, das man mit einer biologischen Aktivität von 100 - 110 E/mg rechnen kann (124 - 130). Alle Angaben von ACTH-Spiegeln im

Plasma erfolgen in Einheiten statt in mg, da das den Vergleich mit den Werten des Internationalen Standards und den Werten anderer Autoren (101, 102, 106 - 115) erleichtert. Die ACTH- und Corticosteroid-Inkretion unterliegt beim Menschen bekanntlich einem Tagesrhythmus, die höchsten Werte werden in den frühen Morgenstunden gefunden (136, 137), so daß wir das zu untersuchende Blut jeweils morgens um 6 Uhr abnahmen.

6. Punktion des Bulbus cranialis venae jugularis

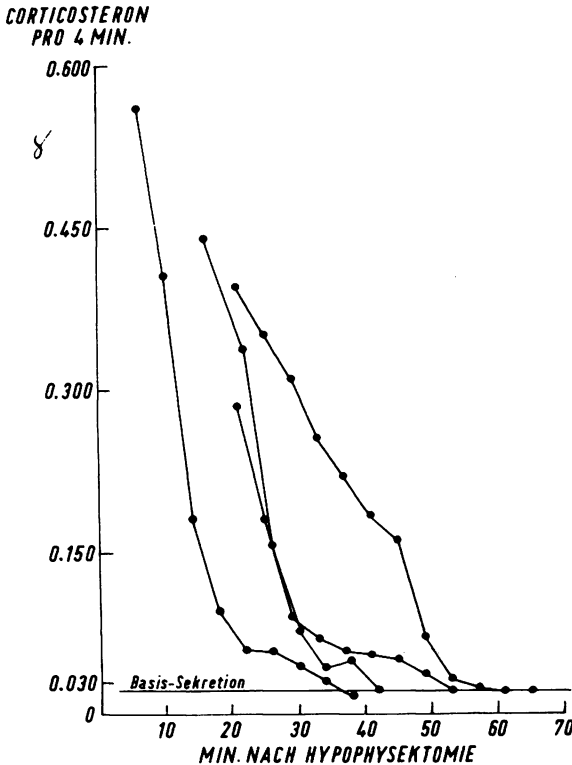
Das venöse Blut des Hypophysenvorderlappens fließt über die die Hypophyse umgebenden Sinus und die größeren Sinus der Dura ab. Diese münden beiderseits in den Bulbus cranialis venae jugularis, welcher die Fossa jugularis des Felsenbeins erfüllt (140, 141). Die Vena jugularis erhält erst im Carotisdreieck zahlreiche weitere venöse Zuflüsse (141). Durch Punktion des Bulbus cranialis vae. jugularis, wie das ja auch bei der Messung der Hirndurchblutung geschieht (138, 139), erhält man ein "hypophysäres" Venenblut, welches allerdings bereits durch etwa 15 % des Herzminutenvolumens (139) verdünnt ist. - Unter Lokalanästhesie wurde in Seitenlagerung des Kopfes bei leicht angezogenem Kinn eine etwa 6 cm lange Kanüle mit Mandrin ca. 1 cm unterhalb des Processus mastoideus am vorderen Rand des Musculus sternocleidomastoideus mit einer Neigung von etwa 40° in Richtung auf den Bulbus cranialis vae. jugularis vorgeschoben. Nach Punktion des Bulbus wurde 15 Min. gewartet, um den "Stress" dieser Punktion abklingen zu lassen, und dann Blut aus dem Bulbus und aus einer Cubitalvene mit heparinisierten Spritzen entnommen. Das Blut wurde sofort im Eisbad zur Kühlzentrifuge gebracht und bei + 4°C 10 Min. bei 1000 x g zentrifugiert. Das so erhaltene Plasma wurde in mehrere Proben aufgeteilt, bei -18°C eingefroren und bis zur Bestimmung aufgehoben. Die Stabilität des ACTH im Blut bei 37° und bei 2°C ist umstritten (142 - 144, 134, 145), so daß wir darauf bedacht waren, das Plasma bei niedrigen Temperaturen zu gewinnen und möglichst schnell zu verarbeiten. (Versuche mit P. DIETERLE, 173).

7. Applikation von ACTH Standard- oder Plasmaproben bei der hypophysektomierten Ratte. Auswertung und Statistik

Vorversuche hatten die aus der Literatur (101, 102) wohlbekannte Tatsache bestätigt, daß spätestens 90 Minuten nach der Hypophysektomie die Corticosteroninkretion in das Nierenvenenblut auf einen Basisspiegel (Abb. 9) abgesunken ist (ca. 0,020 Gamma Corticosteron pro 4 Min.). Da die Empfindlichkeit der Corticosteronsynthese der Nebenniere gegenüber ACTH hierauf schnell abnimmt (112, 115, 119), haben wir bei all unseren Bestimmungen 90 Min. nach Hypophysektomie mit der Applikation der Standardlösung von ACTH begonnen.

Abb. 9: Einstellung der Corticosteron-Basis-Sekretion nach Hypophysektomie

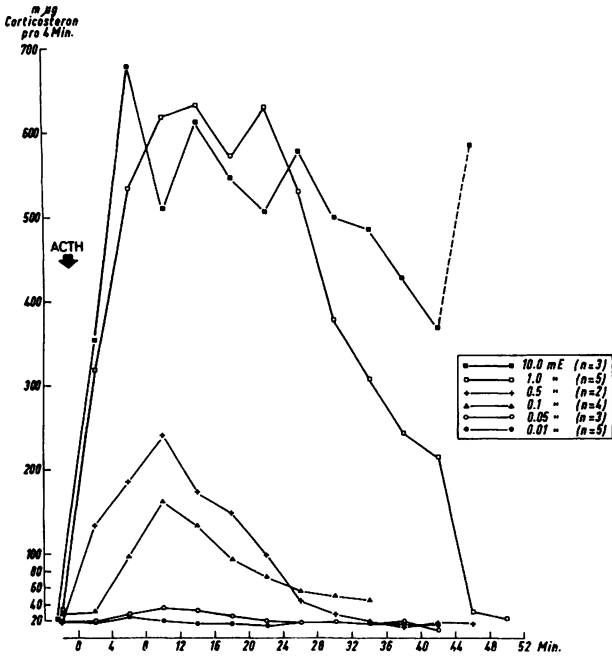
Hypophysektomie und Corticosteronbestimmung im Nebennierenvenenblut, wie oben beschrieben.



Mittels eines Gerätes zur kontinuierlichen Infusion (Perfusor, Fa. Braun, Melsungen) wurden 1 ml der zu untersuchenden Lösung innerhalb von 94 Sek. über den Aortenkatheter (Abb. 8) infundiert. Vor jeder Infusion einer Standardlösung oder eines Plasmas wurde ein- oder zweimal 4 Min. lang Blut aus dem Nebennierenvenenkatheter entnommen, um zu kontrollieren, ob die Corticosteronsekretion auf die Basishöhe abgesunken war. Genau 3 Min. nach Beginn der Infusion der Testlösung bis 11 Min. danach wurde Blut

aus der Nebennierenvene zur Corticosteronbestimmung entnommen. Der Zeitraum zwischen der 3. und 11. Minute wurde nach Vorversuchen gewählt. Diese hatten gezeigt (Abb.10),

Abb. 10: Dauer der Wirkung verschiedener Dosen ACTH auf die Corticosteron-Inkretion.



daß nach intraarterieller Infusion steigender Dosen von ACTH bei kontinuierlicher Bestimmung der Corticosteron-Ausschüttung in das Nebennierenvenenblut in 4-minütigen Intervallen wesentlich länger anhaltende Anstiege der Corticosteron-Ausschüttung erfolgen (101). Will man an einem Tier, wie oben erwähnt, zwei oder drei ACTH-Bestimmungen durchführen, so würde der Blutverlust bei längeren Entnahmeperioden für das Tier jedoch zu groß. Es sei festgehalten, daß bei der 8-minütigen Sammelperiode (3. - 11.Min.) also nur ein Teil und vor allem in Abhängigkeit von der Dosis wechselnd kleiner Anteil der Steigerung der Corticosteron-Ausschüttung durch ACTH erfaßt wurde. Abb. 10 zeigt

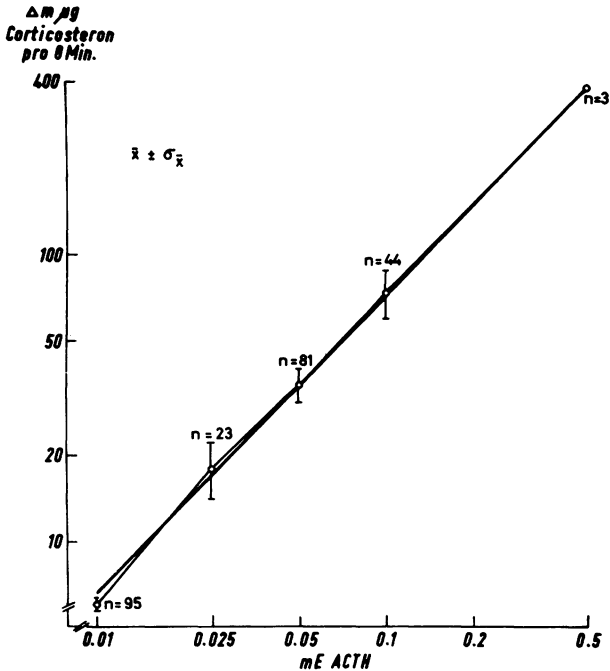
ferner, daß man 20 Min. nach Infusion einer Standardmenge von 0,05 mE ACTH damit rechnen kann, daß die Corticosteron-Ausschüttung wieder auf die Basis zurückgekehrt ist. Daher gaben wir bei den meisten unserer Bestimmungen 24 Min. nach Infusion der Standardmenge von 0,05 mE die zu untersuchenden Plasmen. Auch nach der Infusion von 1 ml Plasma wurde von der 3. bis zur 11. Min. Nebennierenvenenblut aus dem Katheter gesammelt und der Corticosterongehalt im Plasma, wie oben beschrieben, bestimmt.

In der Literatur bestehen erheblich Diskrepanzen um die Abgrenzung dieser Sammelperiode (101, 102, 107, 108, 113, 119). Für ungünstig halten wir, wie nach Abb. 10 verständlich, daß manche Autoren eine konstante Blutmenge (0,6 ml) sammeln und die Zeit registrieren. - Es ist ja aus der Literatur bekannt (116 - 120) und war auch bei unseren Versuchen zu beobachten, daß ACTH die Durchblutung der Nebenniere steigert. Man weiß ferner, daß bei konstantem ACTH-Spiegel eine Steigerung der Durchblutung zu einer Steigerung der Corticosteroidsekretion führt (117, 118). Man sieht nun auch nach intraarterieller Infusion von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung bereits, wenn auch geringere, Steigerungen der Nebennierendurchblutung. Wie erheblich dieser Faktor sein muß, wenn man wie manche Autoren bis zu 5 ml menschliches Plasma pro Ratte injiziert (108, 109, 114a), ist einleuchtend. Die Wirkung von ACTH-Dosen ist nur bei Infusion gleicher Volumina bzw. möglichst gleicher Nebennierendurchblutung zu beurteilen. Schließlich kann wegen der Durchblutungssteigerung die Wirkung von ACTH auf die Corticosteron-Synthese nur bei Erfassung der Zunahme der Corticosteron-Menge, nicht aber der Corticosteron-Konzentration im Nebennierenvenenblut (112) erfaßt werden.

Trägt man die gegebene Dosis ACTH und den Anstieg der Corticosteron-Ausschüttung in der Nebennierenvene gegenüber 0,9 % NaCl-Infusionen doppelt logarithmisch gegeneinander auf (Abb. 11), so erhält man eine lineare Eichkurve von 0,01 - 0,5 mE ACTH. Die Dosiswirkungskurve ist nur für diesen Bereich linear, sie wird erst bei höchsten Dosen (> 1,0 mE) flacher. Bei biologischen Bestimmungsmethoden ist an sich mit einer linearen Beziehung zwischen dem Logarithmus der Dosis und der Wirkung zu rechnen. Eine solche Beziehung wurde für den Bereich unserer Eichkurve (Abb. 11) nicht gefunden, auch dann nicht, wenn wie in Abb. 11 die Steigerung der Corticosteron-Inkretion von der 3. bis zur 11. Minute, sondern die gesamte Steigerung der Corticosteron-Inkretion, wie in Abb. 10 dargestellt, gegen den Logarithmus der ACTH-Dosis aufgetragen wurde. Es wurde schon betont, daß bei unserer Versuchsanordnung nur ein in Abhängigkeit von der Größe der Dosis wechselnder Teil der Wirkung erfaßt wurde (s.o.). - Bei der Prüfung der Empfindlichkeit der Methode zeigte sich, daß zwischen der Dosis 0,01 mE ACTH (n = 95) und einer Kochsalzinfusion (n = 10) ein nur sehr schwach signifikanter Unterschied bestand ($0,15 > p > 0,10$). Dagegen fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von 0,025 mE

Abb. 11: Eichkurve Dosis ACTH und Anstieg der Corticosteron-Inkretion

Angegeben sind die Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($\sigma_{\bar{x}}$) von (n) als technisch geglückt anzusehenden Bestimmungen.



ACTH ($n = 23$) und $0,01$ mE ACTH ($p < 0,0025$), sowie der Wirkung von $0,025$ mE ACTH und einer Kochsalzinfusion ($p < 0,01$). Danach liegt die Empfindlichkeitsgrenze der Methode zwischen $0,010$ und $0,015$ mE ACTH. Der Regressionskoeffizient betrug $b = 0,74$ (84). - Nach dem Vorschlag von GADDUM (85, 113) wurde der Index der Genauigkeit der Methode (λ) als

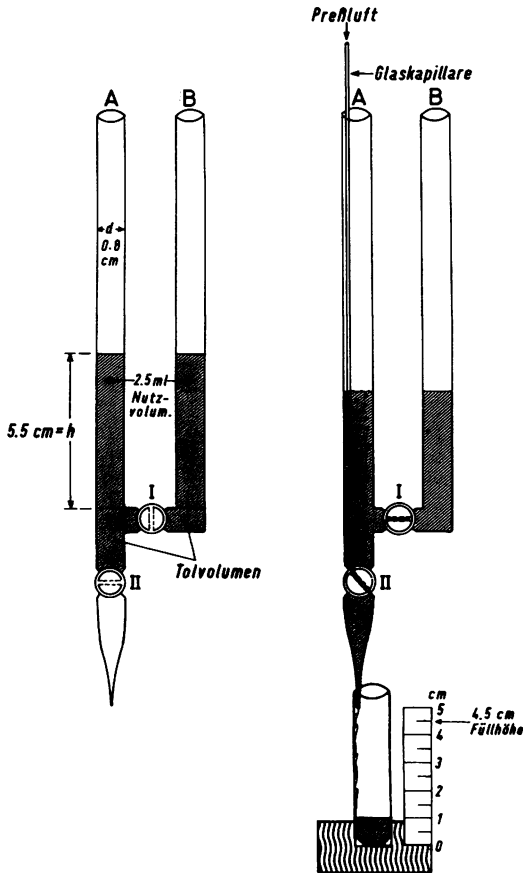
Quotient von Standardabweichung der errechneten Kurve und Regressionskoeffizient zu $\lambda = 0,07$ berechnet, was als recht zufriedenstellender Wert angesehen werden darf. Der Korrelationskoeffizient ist signifikant von Null verschieden $r = 0,421$ (Irrtumswahrscheinlichkeit $0,001$).

Die Plasmaspiegel an ACTH wurden aus dem Anstieg der Corticosteron-Inkretion über die Eichkurve (Abb.11), in Einzelfällen unter Berücksichtigung der individuellen Empfindlichkeit der Ratten, ermittelt. Da jahreszeitliche Schwankungen der Empfindlichkeit der Ratten bekannt sind, sei angefügt, daß alle Plasmabestimmungen in der Zeit vom 5.11.65 bis 31.3.66 erfolgten. Der Zeitaufwand der geschilderten Methode ist so groß, daß zwei eingearbeitete Personen an zwei Tagen acht Tiere, das sind je acht ACTH-Standardwerte und acht Plasmen, operieren bzw. untersuchen können.

II. SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION

Saccharose-Dichte-Gradienten wurden nach dem von BRITEN und ROBERTS (187) angegebenen Prinzip hergestellt. Ein einfacher Glasapparat, wie in Abb.12 schematisch dargestellt,

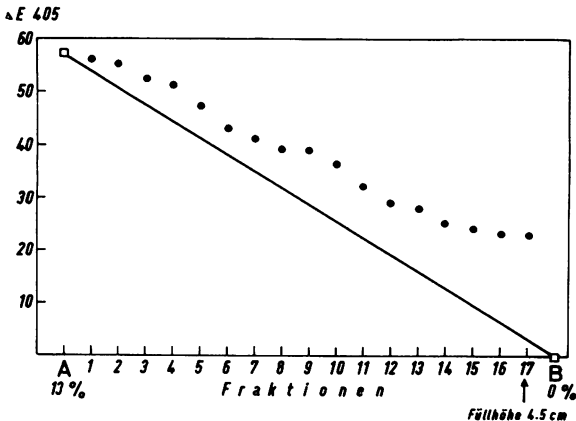
Abb. 12: Apparat zur Herstellung von Saccharose-Dichte-Gradienten - Beschreibung s. Text



wurde bei geschlossenem Hahn I und II gefüllt. In den Schenkel A wurden 3,45 ml (Totvolumen A = 0,95 ml plus Nutzvolumen A = 2,5 ml) 13 % Saccharose, 0,005 M $MgCl_2$,

0,025 M KCl in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gefüllt. In den Schenkel B kamen 0,35 (Totvolumen) plus 2,5 ml der gleichen Lösung ohne Saccharose. Vor dem vorsichtigen Anstellen der Preßluft (s. Schema), welche eine Durchmischung des Inhalts von Schenkel A sicherstellte, sollen die Flüssigkeitsspiegel in den Schenkeln A und B gleich hoch stehen (linke Hälfte Abb. 12). Hahn I wurde dann vollständig geöffnet, Hahn II dagegen nur so wenig, daß bei kontinuierlichem Ausfluß die Füllhöhe des Gradienten im Zentrifugenröhrchen von 4,5 cm in 6 - 7 Minuten erreicht wurde. Je drei Gradienten dieser Art wurden im Swinging Bucket Rotor SW 39 der Spinco Model L Ultrazentrifuge (Fa. Beckman Instr.) 2 Stunden bei 37500 UPM zentrifugiert, wodurch eine Stabilisation der Gradienten erreicht wurde. - Setzt man der Lösung im Schenkel A z.B. Nilblausulfat zu, so läßt sich die Konzentrationsabnahme an Nilblausulfat und damit an Saccharose von unten nach oben in den so hergestellten Gradienten nach Funktion des Bodens der Zentrifugenröhrchen und tropfenweisem Auffangen in Fraktionen nach Verdünnung photometrisch bestimmen. Abb. 13 zeigt, daß man einen etwa linearen Gradienten von

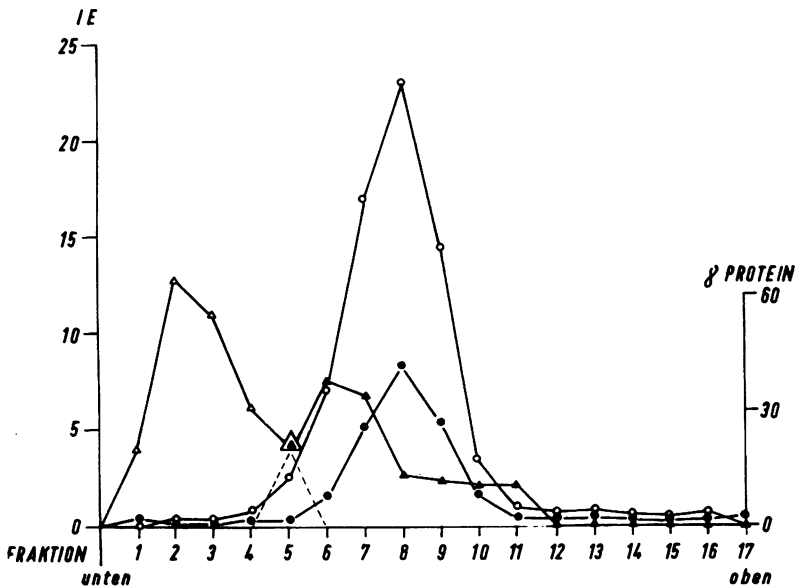
Abb. 13:
Prüfung der Linearität von Saccharose-Dichte-Gradienten durch Zusatz von Nilblausulfat



13-5 % Saccharose erhält, wenn man die richtige Füllhöhe für die Zentrifugenröhrchen (Abb.12) wählt. - Auf solchen Gradienten lassen sich (s. auch ERGEBNISSE) ungefähre Molekulargewichtsbestimmungen von Enzymproteinen durchführen (Abb.14) und Gewebshomogenate nach dem Molekulargewicht fraktionieren (Abb. 16, 18).

Abb.14: Molekulargewichtsbestimmungen von Enzymen nach MARTIN und AMES (194).

Es wurde 17 Stunden bei +2°C und 37 500 UPM zentrifugiert. Lactatdehydrogenase (▲—▲), Pyruvatkinase (△—△), Citratsynthase (○—○), alle Enzyme wurden von Boehringer bezogen und dialysiert. Die Citratsynthase wurde von Dr. L.Weiss mit Stearyl-CoA inkubiert (●—●).



III. PRÄPARATION VON POLYSOMEN UND RIBOSOMEN

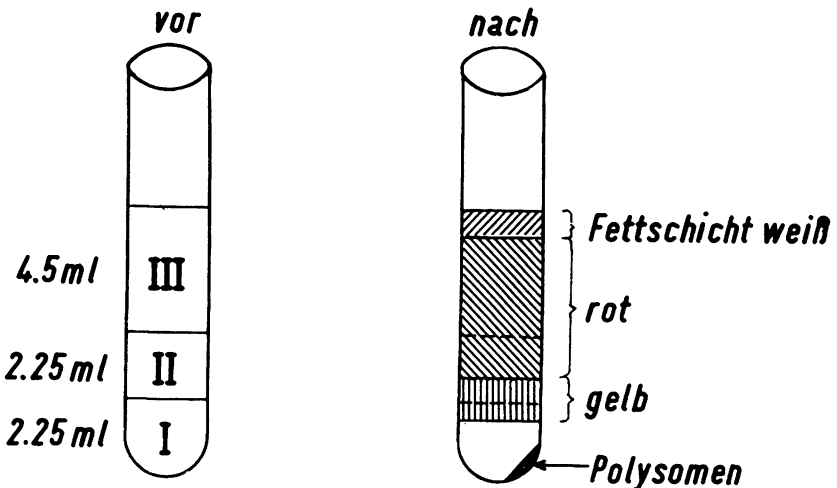
Nach dem Vorschlag von WETTSTEIN und Mitarbeitern (230) wurden Homogenate von frischen Schweinenebnieren (s. Legende zu Tab.3) 10 Minuten bei 15 000 x g zentrifugiert. Zu 9 Teilen 15 000 x g Überstand wurde 1 Teil 10 % Natriumdesoxycholat in 0,05 M Tris-HCl pH 8,2 bei 0°C unter Rühren tropfenweise zugesetzt. In Cellulose Nitrate Tubes NO. 302235 der Fa. Beckman Instr. wurden kalte (0°C) 2 M (I) und 0,5 M (II) Saccharose-Lösung sowie der Desoxycholat-behandelte Überstand (III) übereinander geschichtet (Abb.15).

Abb.15:

Schematische Darstellung der Präparation von Polysomen

Auf 2,25 ml Lösung I (2 M Saccharose, 0,005 M MgCl₂, 0,025 M KCl, 0,05 M Tris-HCl-Puffer ph 7,5) wurden 2,25 ml Lösung II (0,5 M Saccharose, Elektrolyte wie oben) vorsichtig daraufgeschichtet. Darauf kamen 4,5 ml NaDOC-behandelter 15 000 x g Überstand (III) von Schweinenebnieren-homogenaten (s. Text).

**4 Std.
zentrifugieren**



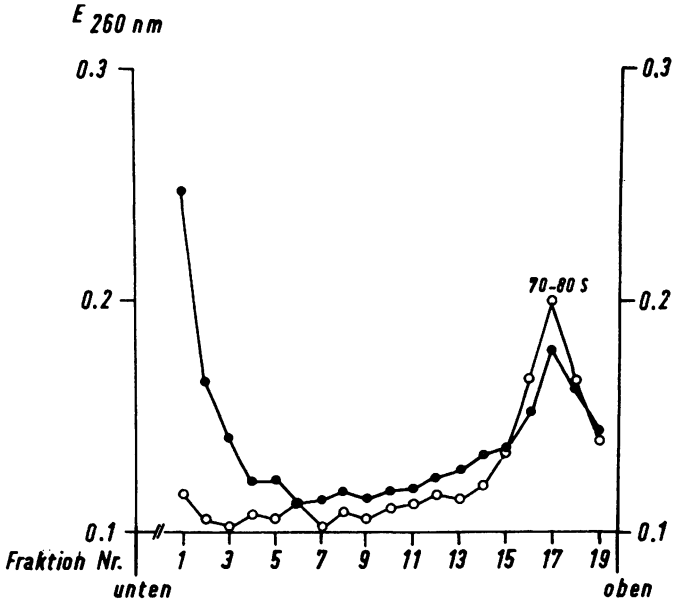
Nach 4 Std. Zentrifugation (Spinco Model L) im Rotor Nr.40 bei 37 500 UPM und +2°C befanden sich die Polysomen als gelartiger leicht gelbbraunlicher Niederschlag am Boden. Das Sediment ließ sich in 0,5 ml Medium A (vgl. Tab.3) durch sehr vorsichtiges Plümpern lösen.

Ribosomen wurden mit den übrigen in 4,5 ml enthaltenden Partikeln des Desoxycholat-behandelten 15 000 x g Überstandes von Schweineleberhomogenaten (s.o.) in 4 Stunden durch 4,5 ml einer Lösung von 1 M Saccharose, 0,005 M MgCl₂, 0,025 M KCl und 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 sedimentiert. Abb. 16 zeigt die Sedimentation von so gewonnenen Polysomen und "Ribosomen", welche hier in Saccharose-freiem Medium A (s.Tab.3) gelöst wurden. Es wurden 18 - 20 Fraktionen von jedem Saccharose-Dichte-Gradienten nach 20 Minuten Zentrifugation im Rotor SW 39 bei 37 500 UPM und +2°C gesammelt und die Absorption bei 260 und 280nm nach 1 : 15 Verdünnung im Spektralphotometer PMQ II von Zeiss gemessen.

Abb. 16:

**Dichtegradientenzentrifugation von Polysomen (●—●)
und Ribosomen (○—○).**

Gezeigt ist die Absorption bei 260 nm. Die Polysomen weisen neben vermutlich durch Desintegration bei der Präparation entstandenen Ribosomen (70 - 80 S) eine etwas höhere Absorption in den Fraktionen Nr. 10 bis 16 auf (285). Ferner findet sich bei den Polysomen, nicht aber bei Ribosomen, ein Sediment (Absorption der Fraktion Nr. 1 - 3), das vermutlich aus noch konglomerierten aber aktiven Polysomen besteht (285).



IV. INTRAVENÖSE GLUKOSEBELASTUNGEN

Die Methode der i.V. Glukosebelastung wurde von uns früher ausführlich dargestellt und die vorliegende Literatur diskutiert (79, 80). Unter Grundumsatzbedingungen wurden dem Patienten morgens 0,5 g Glukose pro kg KG innerhalb von 3 - 5 Min. injiziert. Nüchternblutzucker und in 10-minütigen Abständen nach der Glukoseinjektion gewonnene Blutzucker wurden enzymatisch bestimmt. Die Berechnung des sog. Glukoseassimilationskoeffizienten k_G erfolgte nach graphischer Ermittlung der Halbwertszeit der Glukose nach der

$$\text{Formel: } k = \frac{\ln 2}{T} = \frac{0,693}{T}$$

die aus der Gleichung: $C_{(t)} = C_{(o)} \cdot e^{-kt}$

wie früher beschrieben (79, 80) abgeleitet wird. Durch Multiplikation des k-Wertes mit 100 erhält man den k_G -Wert, die Glukoseelimination in % pro Min. zum Zeitpunkt der Halbwertszeit, bzw. den sog. Glukoseassimilationskoeffizienten. Unsere Befunde über Normalbereich und diagnostische Bedeutung dieser Methode wurden anderweitig beschrieben (80).

E R G E B N I S S E

I. BESTIMMUNG VON ACTH-SPIEGELN IM MENSCHLICHEN PLASMA

Das Interesse der Kliniker an einer zuverlässigen Bestimmung von ACTH-Spiegeln im Plasma ist naturgemäß groß. Das von uns angewandte, unter "METHODEN" beschriebene Verfahren, die ACTH-Aktivität über den Anstieg der Corticosteron-Inkretion im Nebennierenvenenblut der akut hypophysectomierten Ratte zu bestimmen, ist seit einigen Jahren in verschiedenen Laboratorien in der Hoffnung angewandt worden, den ACTH-Spiegel im Plasma des Normalen sicher erfassen zu können (101, 102, 106 - 114a). Wie unter "METHODEN" bereits erwähnt, haben wir versucht, die Empfindlichkeit der Methode durch Infusion der Testlösung (ACTH-Standard oder Plasma) in die Aorta der Ratte zu erhöhen, und die Genauigkeit der Methode durch Konstanthaltung des Volumens, in dem die Testlösungen appliziert wurden, und durch Berücksichtigung der individuellen Empfindlichkeit der hypophysectomierten Ratten gegenüber den ACTH-Standardlösungen zu verbessern. Wir können den Optimismus mancher Autoren bezüglich der quantitativen Erfassbarkeit normaler ACTH-Spiegel im Plasma nach statistischer Überprüfung unserer Ergebnisse nicht teilen. In Tab. 1 sind die von uns gefundenen Plasmaspiegel im Blut aus der Vena cubitalis bzw. dem Bulbus cranialis venae jugularis zusammengestellt. Die meisten Werte lagen unter 0,01 mE/ml, also unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze der Methode (siehe "METHODEN"). Etwas höhere Werte, wie sie bei einzelnen Patienten gefunden wurden, sind bei der kleinen Zahl der Bestimmungen, die auf Grund der begrenzten Haltbarkeit des ACTH in eingefrorenen Plasmaproben (siehe "METHODEN") durchzuführen sind, nicht signifikant von dem Bereich der doppelten Standardabweichung des Nullwertes (Kochsalzinfusion) verschieden. Die Mittelwerte der ACTH-Spiegel im Plasma von Nebennierengesunden, die in der untersten Spalte der Tabelle angegeben sind, sind sowohl im Bulbus cranialis venae jugularis mit und ohne Dexamethason-Suppression, als auch in der Vena cubitalis kleiner als 0,01 mE/ml. Die Methode ist

somit in der von uns durchgeführten Form für die Erfassung normaler ACTH-Spiegel nicht geeignet. Die Schlüsse, die man aus diesem Befund auf die biologische Halbwertszeit des endogenen ACTH beim Nebennierengesunden dennoch ziehen kann, sind in der DISKUSSION besprochen.

Tab. 1: ACTH-Plasmaspiegel bei Nebennierengesunden

Patient	ACTH mE/ml Plasma			"Cortisol" %	
	Bulbus c.v.jug.	V.cubit.	B.c.v.j. nach Dexamethason	vor	nach Dexamethason
K.M. 36J. m. Verdacht auf Myopathie	<0,01 (2)	<0,01 (2)	<0,01 (3)	16,0	8,0
B.O. 47 J. m. vegetative Beschwerden	0,015 (1)	<0,01 (2)	<0,01* (2)	32,0	25,0
R.M. 20 J. m. Zustand nach Schädeltrauma	0,01 (2)	0,01 (2)	0,025 (2)	24,0	15,0
H.P. 19 J. m. Alimentäre Adipositas (171)	0,025 (2)	<0,01 (2)	0,025 (2)	16,0	8,0
K.J. 49 J. m. Jackson- Epilepsie	<0,01 (3)	0,015 (2)	<0,01 (3)	36,5	23,0
B.J. 46 J. m. traumatische Epilepsie	-	<0,01 (6)	0,015* (4)	23,0	18,0
W.B. 52 J. m. Prostata- Hypertrophie	<0,01 (3)	0,02 (2)	<0,01 (2)	30,0	21,0
Mittelwerte	<0,01 (n=13)	<0,01 (n=18)	<0,01 (n=18)	29,4	16,9

Die Tabelle zeigt die gefundenen Plasmaspiegel der einzelnen Patienten. Für jeden Patienten wurde der Mittelwert von (n) technisch als gelungen anzusehenden Bestimmungen angegeben. Die Blutentnahmen erfolgten um 6 Uhr morgens bzw. in der 3. senkrechten Spalte eine Stunde nach Infusion von 4 mg Dexamethason innerhalb 4 Min. zur Suppression. Die mit

einem Stern *) versehenen Werte in der 3. senkrechten Spalte stammen aus der Vena cubitalis. Die Mittelwerte der Anstiege der Corticosteronmengen im Nebennierenvenenblut der Ratte nach Infusion von 1 ml Plasma der Patienten dienen zur Ermittlung der Mittelwerte der ACTH-Spiegel im Plasma (unterste Zeile). Die Einzelheiten der Methoden sind in Kapitel METHODEN beschrieben. Die Werte für gamma% Cortisol im Plasma liegen etwas höher als der Normalbereich für 9 Uhr (siehe Bestimmung der sog. 11-Hydroxycorticosteroide unter METHODEN). Bei den Diagnosen handelt es sich um Abschlußdiagnosen.

Es hat nicht an Versuchen anderer Autoren gefehlt, mit etwas anderen Methoden den Normalspiegel von ACTH zu bestimmen. Dabei sind zwei Wege am ehesten erfolgversprechend. Die Arbeitsgruppe von LITTLE hat ein Verfahren angegeben, ACTH aus größeren Plasamengen anzureichern und mit einer biologischen Bestimmungsmethode zu bestimmen (101, 109, 110). Auch andere Autoren haben diese Möglichkeit untersucht (108, 111). Die Ausbeuten liegen bei diesen Anreicherungsverfahren zwischen 44 und 124 %. Zu diesem Fehler addiert sich der Fehler der biologischen Bestimmungsmethoden. Immerhin verdankt man diesen Untersuchungen die Vorstellung, daß der normale Plasmaspiegel an ACTH zwischen 0,3 und 0,6 mE/100 ml Plasma liegt. (Vgl. Abb. 24). - Einen ganz anderen Weg gingen Untersucher, die sich des Prinzips der radio-immunologischen Bestimmung von Peptidhormonen für die ACTH-Bestimmung bedienten (133 - 135). Diese Autoren berichten über eine ganz ausgezeichnete Empfindlichkeit dieses Verfahrens (0,001 mE). Es wurden zunächst allerdings um 3 Zehnerpotenzen höhere Normalspiegel gefunden, als sie bei den biologischen Bestimmungsmethoden geschätzt wurden (134). Ein weiterer Einwand gegen dieses Verfahren kommt aus der Arbeitsgruppe von FORSHAM (135). Ein synthetisches Peptid aus den Aminosäuren Nr. 22 - 39 der Sequenz des vollständigen Beta-1-39-Corticotropins zeigte die volle immunologische Aktivität, ohne daß irgendeine biologische Aktivität nachweisbar war.

Die erhöhten ACTH-Spiegel im Plasma von Patienten mit bestimmten Erkrankungen der Nebennieren sind dagegen mit der von uns verwandten Methode eindeutig zu erfassen. Solche

ACTH-Spiegel sind mit den dazugehörigen Cortisolwerten des Plasmas (sog. 11-Hydroxycorticosteroide siehe METHODEN) in Tab. 2 zusammengefaßt. Wir besprechen im folgenden kurz die Krankengeschichten unserer Patienten sowie unsere Befunde und diskutieren der Übersichtlichkeit halber an dieser Stelle die einschlägige Literatur.

Tab. 2: ACTH-Plasmaspiegel von "Nebennierenkranken"

Patient	ACTH mE/ml Plasma			"Cortisol" γ %	
	Bulbus c.v.j.	V. cubit.	B.c.v.j. nach Dexa- methason	vor Dexamethason	nach Dexamethason
B.S. 48 J. m. 67,3 kg M. ADDISON	0,45 (4)	0,27 (3)	0,28 (3)	4,0	8,0
G.J. 18 J. m. 55,5 kg M. ADDISON	0,26 (2)	0,24 (2)	0,02 (2)	7,0	7,0
E.T. 44 J. w. Cushing-Syndrom Bilaterale adeno- matöse Hyper- plasie	<0,01 (2)	<0,01 (2)	<0,01 (2)	38,0	30,0
E.L. 19 J. m. 50,5 kg Zustand nach tota- ler Adrenalektomie wegen Cushing-Syn- droms (bilaterale Hyperplasie) Ver- dacht auf chromo- phobes Adenom d. HVL	0,20 (4)	0,045 (3)	<0,01 (3)	5,0	8,0
M.E. 44 J. 82,0 kg Zustand n. totaler Adrenalektomie weg. Cushing-Syndroms (bilaterale Hyper- plasie)	0,09 (2)	0,13 (3)	0,07* (2)	(10,0)	(17,0)
L.J. 61 J. m. Bronchial-Ca sekundäre NNR-In- suffizienz, meta- stat. Zerstörung des HVL	<0,01 (4)	<0,01 (3)	<0,01 (3)	3,0	6,0

Tab. 2: Forts.

Patient	ACTH mE/ml Plasma			"Cortisol" γ %	
	Bulbus c.v.j.	V.cubit.	B.c.v.j. nach Dexa- methason	vor Dexamethason	nach Dexamethason
W.F. 21 J. w. Adrenogenitales Syndrom 65,5 kg	0,80 (2)	0,48 (3)	0,065 (2)	"22,0"	"14,0"

Wie in Tab.1 sind die Diagnosen und die Mittelwerte der ACTH-Spiegel im Plasma der Patienten aus (n) Bestimmungen angegeben. Der mit * versehene Wert (M.E.) stammt aus der Vena cubitalis. Die Blutentnahmen erfolgten um 6 Uhr morgens bzw. 1 Stunde nach i.v. Infusion von 4 mg Dexamethason innerhalb von 4 Min. (3. Spalte), also gegen 7 Uhr 20. ACTH-Bestimmung siehe METHODEN. Die in gamma pro 100 ml Plasma angegebenen Cortisol-Werte (sog. 11-Hydroxycorticosteroide, siehe METHODEN) liegen bei den NNR-insuffizienten Patienten unterhalb des Normalbereiches für 9 Uhr morgens (siehe METHODEN, Ausnahme M.E.). Bei den NNR-insuffizienten Patienten kommt es vermutlich als Folge der Dexamethason-Infusion zu einem geringfügigen Anstieg der fluorimetrisch bestimmten "Cortisol"-Werte. Die nebenniereninsuffizienten Patienten (B.S., G.J., E.L., M.E.(?) und L.J.) erhielten bis ca. 22 Stunden vor dem Untersuchungszeitpunkt (6 Uhr) die bei ihnen übliche Cortisol-Substitutionstherapie.

Man weiß seit einigen Jahren, daß bei Patienten mit Morbus ADDISON die ACTH-Spiegel im Plasma kurz nach Absetzen der Substitutionsbehandlung stark erhöht sein können (101, 102, 108, 137, 167). Das ist zunächst erstaunlich, da alle diese Patienten ja im allgemeinen unter einer als ausreichend betrachteten Substitutionsbehandlung mit Cortisol stehen. Bedenkt man aber die relativ kurzen Halbwertszeiten oral applizierter Corticosteroide (73), so wird vorstellbar, daß die orale Substitutionsbehandlung z.B. mit morgens 20 mg und nachmittags 10 mg Cortisol p.o. zu erheblichen Schwankungen des Plasmacortisolspiegels führen muß und die kontinuierliche Cortisol-Inkretion der Nebennierenrinde nicht vollwertig zu ersetzen vermag. So wird es auch bei "korrekt" durchgeführter Substitutionsbehandlung im Laufe der 24 Stunden eines Tages immer wieder zu Phasen des relativen Cortisolmangels kommen.

Der 1. Patient der Tab. 2 (B.S.) litt seit 1952 an einem tuberkulös bedingtem M. ADDISON. Er hatte, bis er zu uns kam, eine an sich als veraltet zu bezeichnende Behandlung mit Desoxycorticosteron erhalten. Intensive Pigmentation und verkalkte Ohrknorpel (THORN's Zeichen) sprachen dafür, daß die Nebennierenrindeninsuffizienz nicht vollwertig substituiert war. Die ACTH-Werte dieses Patienten waren extrem erhöht, und zwar sowohl im Bulbus c.v.j., als auch in der Vena cubitalis und waren durch die schnelle Dexamethason-Infusion nur teilweise zu supprimieren. -

Der 2. Patient mit einem M. ADDISON (G.J.) erkrankte nach der Vorgeschichte Ende 1964 mit einer Nebennierenrindeninsuffizienz, deren erstes Zeichen interessanterweise ein deutliches Nachlassen der Konzentrations- und Merkfähigkeit war (172). Bei diesem Patienten waren die erhöhten ACTH-Spiegel im Plasma durch die Dexamethason-Infusion (Tab. 2) fast vollständig zu supprimieren, wie das aus der Literatur für die kontinuierlicher wirkende orale Corticosteroid-Behandlung bekannt ist (101, 167).

Wir fassen die z.T. exzessiv hohen ACTH-Spiegel bei Addison-Patienten also als Ausdruck der trotz "ausreichender" Substitutionsbehandlung mit Corticosteroiden gestörten Regulation (1, 2) des Plasmaspiegels der Corticosteroide auf. Die Antwort des Reglers ist, - um im Bilde zu bleiben -, durch seine ständige Überbeanspruchung verstärkt.

Beim Cushing-Syndrom mit bilateraler Hyperplasie der Nebennierenrinde wurden zumeist normale ACTH-Spiegel im Plasma gefunden (101, 102, 114a, 108 - 110), in manchen Fällen waren die ACTH-Spiegel auch geringfügig erhöht (109, 111, 167). Für die Überlegungen zur Pathophysiologie dieser Form der Cushing'schen Erkrankung haben die Befunde der Arbeitsgruppe von PFEIFFER (102, 114a, 164) in letzter Zeit erhebliche Bedeutung erlangt. Danach sind die ACTH-Spiegel im Plasma bei den meisten Patienten mit bilateraler Hyperplasie nicht erhöht, weisen aber ein Fehlen der bei Gesunden üblichen Tagesrhythmik auf. Im Integral ist die Tagessekretion damit doch erhöht, ihre Berechnung gibt Werte, die in der Größenordnung derjenigen ACTH-Menge liegt, welche über 24 Stunden gegeben eine Erhöhung der Cortisol-Spiegel erzielt, wie man sie bei Patienten mit Cushing-Syndrom findet (165).

Eine 44-jährige Patientin mit einem Cushing-Syndrom, welches nach der Anamnese seit etwa 10 Jahren (!) bestand, wurde von uns untersucht. Zwischen der zweizeitig durchgeführten Adrenalektomie fanden sich Spiegel unter 0,01 mE ACTH pro ml Plasma, also unterhalb unserer Nachweisbarkeitsgrenze. Die Plasmacortisolwerte dieser Patientin waren ebenso wie die Cortisolausscheidungen im 24 Std. Urin auch nach der einseitigen Adrenalektomie noch deutlich erhöht.

Die Tatsache, daß die ACTH-Spiegel bei diesen Fällen nicht oder nur unwesentlich erhöht sind, sollte unbedingt im Zusammenhang mit den Plasmacortisolwerten dieser Patienten beurteilt werden. Findet man doch bei den Patienten mit Cushing-Syndrom erhöhte Cortisolwerte im Plasma, die bei nichtgestörter Regulation der Cortisolinkretion eigentlich zu einer Erniedrigung der ACTH-Spiegel im Plasma führen sollten (101, 102). Normale oder leicht erhöhte ACTH-Spiegel im Plasma sind somit bei diesen Patienten als pathologisch anzusehen.

Im Jahre 1958 beschrieben NELSON und Mitarb. den ersten Fall, bei dem man die Entwicklung eines chromophoben Adenoms des Hypophysenvorderlappens nach totaler Adrenalektomie wegen eines Cushing-Syndroms mit bilateraler Hyperplasie beobachtete und exzessiv hohe ACTH-Spiegel im Plasma fand (159). Seither wurden immer wieder Beobachtungen solcher Fälle mitgeteilt (156 - 158, 160, 161).

Ein 19-jähriger Mann (E.L.) ist seit dem 15. Lebensjahr in unserer Beobachtung. Er wurde wegen eines typischen Cushing-Syndroms mit bilateraler Hyperplasie der Nebennierenrinde totaladrenalektomiert. Das führte zu einer vollständigen Remission des Krankheitsbildes und zu einer Umkehr der vorher latent diabetischen Stoffwechsellage in eine erhöhte Glukosetoleranz (81, 172). Jetzt findet sich bei dem Patienten eine intensive Pigmentation und ein doppelt konturierter Sella Boden. Nach der Tomographie ist die Sella einseitig vergrößert, so daß wir den Patienten unter dem Verdacht auf das Vorliegen eines chromophoben Adenoms weiter beobachten. Wie aus Tab. 2 ersichtlich, sind die ACTH-Spiegel bei diesem Patienten extrem hoch. Dexamethason führte zu einem Absinken auf nicht mehr sicher meßbare Spiegel. Diese Supprimierbarkeit der ACTH-Spiegel ist, soweit sie untersucht wurde, bei den meisten der in der Literatur mitgeteilten Fälle nachzuweisen gewesen (159 - 165).

Es sei noch kurz auf die andere Form des Cushing-Syndroms, die primär nebennierenbedingte, eingegangen. Die erhöhte, autonome Cortisolinkretion von Nebennierenadenomen oder -carcinomen führt in diesen Fällen zu einer Suppression des Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems. Morphologisch findet sich eine Atrophie der übrigen Nebennierenrinde, funktionell bei Entfernung des Tumors eine Hypofunktion der Nebennierenrinde und der Hypophyse (72, 137, 166). Nach den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von LIDDLE (72) erholt sich in diesen Fällen zunächst die Hypophysenvorderlappenfunktion. Die ACTH-Spiegel sind vorübergehend erhöht. Die Unterfunktion der Nebennierenrinde kann dagegen monatelang weiterbestehen und jeder ACTH-Therapie trotzen (166, eigene Beobachtung). Wir verdanken Herrn Dr. R. FROESCH, Zürich, die Plasmen von drei Patienten, bei denen vor mehreren Monaten Nebennierenrinden-adenome, die das Bild eines Cushing-Syndroms hervorgerufen hatten, entfernt worden waren. Die Plasmacortisolwerte waren bei diesen Patienten unterhalb des Normalbereiches (2,5 Gamma% in einem und 5 Gamma% in zwei weiteren Fällen). Die ACTH-Spiegel im Plasma aus der Vena cubitalis waren in zwei Fällen erhöht (0,02 und 0,03 mE pro ml Plasma). In der Diskussion wird auf die Suppression des Hypophysen-Nebennierenrindensystems durch verschieden lang dauernde exogene oder endogene Erhöhung des Spiegels an Plasmacorticosteroiden noch einmal eingegangen.

Tab. 2 zeigt noch eine weitere Patientin, bei der wir extrem hohe ACTH-Spiegel im Plasma fanden (W.F.). Hier bestand ein adrenogenitales Syndrom, das schon vor Jahren diagnostiziert worden war, aber infolge der Indolenz der Patientin bislang nicht behandelt wurde. Bekanntlich handelt es sich bei typischen Fällen meist um eine Störung der 21-Hydroxylierung, was zu einer verminderten Cortisolproduktion, einer vermehrten ACTH-Ausschüttung und einer erhöhten Androgenproduktion in der Nebenniere führt. Unter Verzicht auf eine ausführliche Besprechung der komplizierten

Pathophysiologie dieser Erkrankung sei hier nur auf die erhöhte ACTH-Produktion bei Patienten mit adrenogenitalem Syndrom eingegangen (101). Wir fanden, wie in Tab.2 aufgeführt, extrem hohe Spiegel im Plasma aus dem Bulbus cranialis vae. jugul. und etwa um die Hälfte niedrigere Spiegel in der Vena cubitalis. Durch Dexamethason war der ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis vae. jugul. um eine Zehnerpotenz zu senken. - Aus der Literatur ist der Anstieg der Plasma-ACTH-Spiegel auch bei der kurzzeitigen Blockierung einer weiteren Hydroxylierung (11- β -Hydroxylierung) durch Metopiron (SU 4885) bekannt (101, 102, 108, 153 - 155). Diese ACTH-Anstiege waren jedoch relativ mäßig und erst etwa 8 Stunden nach Verabfolgung des Metopirons zu beobachten.

Klinisch interessante Gesichtspunkte bot auch die Krankengeschichte des Patienten L.J. (Tab.2). Dieser Patient wurde bei uns wegen eines Bronchialcarcinoms beobachtet. Adynamie, ausgeprägte Hypotonie und Hyponatriämie ließen uns eine Nebennierenrindeninsuffizienz diagnostizieren. Dazu paßten die deutlich erniedrigten Plasmacortisolwerte. Zu unserer Überraschung fanden wir weder im Bulbus cranialis vae. jugul. noch in der Vena cubitalis meßbare Plasma-ACTH-Spiegel, die bei unseren Addison-Patienten (B.S. und G.J.) deutlich erhöht waren. Bei der Autopsie fand sich die Erklärung dieses Befundes. Der Hypophysenvorderlappen war durch Metastasen des Bronchialcarcinoms vollständig zerstört, während die Nebennieren nur kleine Metastasen aufwiesen. Es handelte sich somit um eine sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz. Daran war klinisch auch schon gedacht worden, da dieser Patient keinerlei vermehrte Pigmentation aufwies und bei Addison-Patienten ja nicht nur das ACTH, dessen endogene MSH-Wirkung relativ gering ist (168, 169), sondern auch MSH vermehrt ausgeschüttet wird (169, 170). Ferner hatten eine ausgeprägte Kälteempfindlichkeit und Bradycardie, sowie eine Verlangsamung der Achillessehnenreflexe eine sekundäre Hypothyreose vermuten lassen.

Es ist zwar bedauerlich, daß man mit der biologischen Bestimmungsmethode in der von uns angewandten Form normale ACTH-Spiegel im Plasma direkt nicht zuverlässig messen kann. Für die Klinik interessante Ergebnisse lassen sich, wie gezeigt, mit dieser Methode jedoch bei Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln finden. In der DISKUSSION wurde auf dynamische Gesichtspunkte, auf die Exkretionsrate und die biologische Halbwertszeit des endogenen ACTH, eingegangen. Wir meinen zeigen zu können, warum mit der von uns verwandten Methode bei normalen ACTH-Spiegeln keine Differenzen zwischen den ACTH-Spiegeln im Plasma aus dem Bulbus cranialis vae. jugul. und der V. cubitalis zu finden sind.

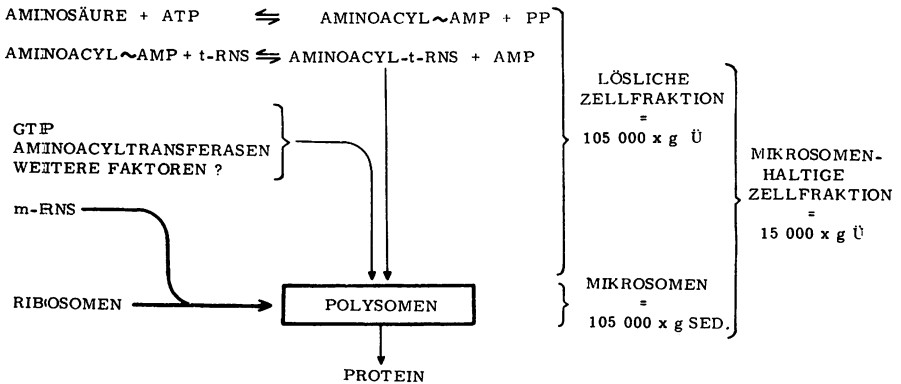
II. VERSUCHE ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS DES ACTH

1. ACTH UND PROTEINSYNTHESE DER NEBENNIERE

ACTH wurde zunächst als derjenige Faktor beschrieben, der nach Hypophysektomie das Gewicht der Nebenniere erhält (263, 263 a, b). Es ist einleuchtend, daß ein Hormon, welches das Gewicht der Nebenniere steigert (263 - 268), auch eine Steigerung der Nucleinsäure-(269 - 276) und der Proteinsynthese (277 - 286) in der Nebenniere bewirkt. Der Besprechung unserer Befunde über den biochemischen Mechanismus der Steigerung der Proteinsynthese in der Nebenniere durch ACTH sei eine kurzgehaltene Darstellung der augenblicklichen Anschauungen über die Biochemie der Proteinsynthese vorangestellt (201 - 257).

Abb. 17: Schema der Biochemie der Proteinsynthese

ATP=Adenosintriphosphat, AMP=Adenosinmonophosphat,
PP=Pyrophosphat, t-RNS=Transfer-Ribonucleinsäure,
m-RNS=Messenger-Ribonucleinsäure



HOAGLAND, ZAMECNIK und Mitarbeiter (211, 213) zeigten, daß Aminosäuren zuerst mit ATP aktiviert werden und der Aminoacylrest dann auf eine transfer-Ribonucleinsäure übertragen wird (Abb. 17). Die sog. "pH 5-Enzyme" oder auch Aminoacyl-t-RNS-Synthetasen katalysieren diese beiden Schritte. Der nächste Schritt ist die Übertragung des Aminoacylrestes auf die an Ribosomen bzw. Polysomen in Synthese befindlichen Peptidketten. Hier ist der Angriffspunkt der Transferenzyme (Aminoacyltransferasen). Abb. 17 zeigt diese Verhältnisse schematisch und macht ferner anschaulich, welche Faktoren in der sogenannten löslichen Zellfraktion (105 000 x g Überstand) bzw. in der mikrosomenhaltigen Zellfraktion (15 000 x g Überstand) zu finden sind (301, 302).

a) BIOCHEMIE DER PROTEINSYNTHESE

Es erscheint zweckmäßig, über diesen zusammenfassenden Absatz hinaus eine etwas detailliertere, wenn auch bei weitem nicht umfassende Zusammenstellung der Befunde über die Biochemie der Proteinsynthese hier einzufügen. Einige Übersichtsarbeiten zu diesem Thema seien zitiert (201 - 210). Die Aktivierung der Aminosäuren unter Bildung von Aminoacyl-AMP und die Bildung der energiereichen Oxyester zwischen der Aminosäure und der 3'-Hydroxylgruppe der Ribose der endständigen Adenosylgruppe der Transferribonucleinsäuren wurden bereits erwähnt (204, 211 - 218). Beide Schritte werden von den Aminoacyl-RNS-Synthetasen katalysiert, die bei pH 5 gefällt werden können. ATP und GTP sind für die Proteinsynthese bei Inkubation der pH 5-Enzyme mit isolierten Mikrosomen erforderlich (212). Die Kenntnis über den Ort der Peptidsynthese hat sich ebenfalls in den letzten Jahren weiter entwickelt. Mikrosomen können nach Homogenisation von Lebergewebe in isotonen Rohrzuckerlösungen, - zur Erhaltung der Mitochondrienstruktur (186) -, durch Zentrifugation des 15 000 x g-Überstandes bei 105 000 x g sedimentiert werden (184, 185). Durch Desoxycholatzusatz können aus den Mikrosomen, die als Bruchstücke des Ergastoplasmas aufzufassen sind, die Ribosomen isoliert werden (219 - 222). Der Quotient Ribonucleinsäure zu Protein beträgt bei Mikrosomen 0,25, bei Ribosomen 1,0 (220, 222). Die Sedimentationsanalyse zeigt für Ribosomen einen S-Wert von etwa 70 (221, 223 - 227). Durch Phenolextraktion oder Detergentien lassen sich die Ribosomen in kleinere Partikel (30 S und 50 S) zerlegen. Diese Dissoziation erfolgt auch

nach Senkung der Magnesiumionenkonzentration durch Dialyse (226). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten bereits 1960, daß Dimere der 70 S-Ribosomen mit einem S-Wert von 100 existieren (224). Neuere Untersuchungen zeigten, daß Penta- bis Heptamere von 73 S Ribosomen, welche auch Polysomen oder Ergosomen genannt werden, wesentlich aktiver als die monomeren 73 S Ribosomen Aminosäuren in Eiweiß einbauen. Man ist der Auffassung, daß 5-7 oder mehr Ribosomen mit einem Molekül einer Messenger-Ribonucleinsäure zusammengehalten werden (225, 228 - 230). - Erste Hinweise auf die Existenz einer Ribonucleinsäure mit relativ hohem Molekulargewicht (500 000), mit schnellem Umsatz und einer Basenzusammensetzung, die der Desoxyribonucleinsäure entspricht, ergaben Versuche mit Bakterien, die mit Phagen infiziert wurden (205, 232 - 236). Man spricht der Messenger-Ribonucleinsäure (m-RNS) eine entscheidende Rolle bei der qualitativen und quantitativen Regulation der Proteinsynthese zu. Die Rolle synthetischer Polynucleotide für die Erforschung des sog. Amino-Acid-Code kann hier nur angedeutet werden (207, 237), - Auch in Säugetierorganen scheint m-RNS für die Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Verhältnisse liegen hier allerdings etwas anders als bei den phageninfizierten Bakterien. Die m-RNS hat eine erheblich größere Stabilität (238). Sie läßt sich aus Nucleolen bei Phenolextraktion in der Interphase anreichern, - stammt also aus dem Zellkern. Wenn es auch möglich war, mit phenolextrahierten Fraktionen aus Leber z.B. die Albuminsynthese im zellfreien System aus Ehrlich Aszites-Zellen zu stimulieren (240), so erscheinen andere Berichte über das Vorkommen eines m-RNS ähnlichen Faktors im Zytoplasma vom Methodischen her eher zweifelhaft (241, 242), - Nach der kurzen Besprechung der Rolle der m-RNS muß noch erwähnt werden, daß für die Übertragung der Aminoacylgruppe von der Aminoacyl-t-RNS auf die in Synthese befindliche Peptidkette Transferenzyme (Aminoacyltransferasen) notwendig sind. Man kennt zwei solche Aminoacyltransferasen, von denen eine stabil, die andere relativ instabil ist. Sie lassen sich durch Ammonsulfatfällungen fraktionieren (217, 243 - 250). Für die Proteinsynthese in mikrosomenhaltigen Systemen scheint die Aminoacyltransferase I alleine auszureichen (244), vermutlich weil die Transferfaktoren teilweise an Mikrosomen oder Ribosomen gebunden sind (217). Neben der Komplexbildung zwischen Aminoacyl-t-RNS und Ribosomen, sowie der Peptidsynthese an Ribosomen wird von den Transferfaktoren auch die Hydrolyse der Aminoacyl-t-RNS, also die enzymatische Deacylierung katalysiert (217). Diese Hydrolyse läßt sich durch Puromycin-zusatz steigern, da Puromycin ebenso wie Chloramphenicol den Aminoacyl-Transfer spezifisch hemmt (251, 254). Schließlich sei noch erwähnt, daß auch ohne Ribosomen, nämlich im Zellkern, in Mitochondrien und in der sog. löslichen Zellfraktion Aminosäuren in Protein eingebaut werden können (254 - 257).

b) PROTEINSYNTHESE IM NEBENNIERENHOMOGENAT

Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen war die Beobachtung von FARESE und REDDY (278), daß nach ACTH-Behandlung der Einbau von ^{14}C -Glycin in Protein im 15 000 x g Überstand der Homogenate von Rattennebennieren gesteigert ist. Die ursprüngliche Mitteilung dieser Autoren, daß die Aktivität der Mikrosomen der Nebennieren ACTH-behandelter Tiere gleich derjenigen der Kontrolltiere sei, wurde später von FARESE (281 - 283) korrigiert. Danach sinkt die Aktivität der Mikrosomen nach ACTH-Behandlung zunächst für einige Stunden ab, um dann später gegenüber Kontrollen anzusteigen (286). Die kreuzweise Inkubation von Mikrosomen und löslicher Zellfraktion von Nebennieren ACTH- und unbehandelter Ratten zeigt dagegen schon zwei Stunden nach Beginn der ACTH-Behandlung und zu jedem danach untersuchten Zeitpunkt eine gegenüber Kontrollen höhere Aktivität in der löslichen Zellfraktion (284, 286). Daher galt unser Interesse in erster Linie der Natur des Faktors im 105 000 x g-Überstand der Nebennieren ACTH-behandelter Ratten, welcher für die in vitro Proteinsynthese offenbar geschwindigkeitsbestimmend ist. - Sehr vereinfacht wurden diese Untersuchungen durch die Beobachtung, daß nicht nur die mikrosomenhaltigen Zellfraktionen der Nebennieren von Kontrollratten, sondern auch von Hunden und von Schweinen auf den Zusatz der löslichen Zellfraktion der Nebennieren ACTH- und unbehandelter Ratten in gleicher Weise ansprechen (284). So wird der Einbau von ^{14}C -Glycin in 0,4 ml 15 000 x g-Überstand von Nebennierenhomogenaten von Kontrollratten, Hunden oder Schweinen von 0,4 ml 105 000 x g-Überstand von Nebennierenhomogenaten von Kontrollratten und weit deutlicher von ACTH-behandelten Ratten in gleicher Weise stimuliert (Tab.3). Dieser Versuch zeigt, daß der für die in vitro Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmende Faktor nicht speziespezifisch ist. Bei den nicht unerheblichen Gewichtsmengen der Nebennieren, die für unsere Untersuchungen benötigt wurden, war es eine erhebliche Erleichterung, daß für die Präparation der mikrosomenhaltigen Zellfraktion nicht mehr die kleinen Nebennieren der Ratten verwandt werden mußten.

Tab.3: Einfluß der löslichen Zellfraktion (105 000 x g Ü) der Nebennieren ACTH-behandelter Ratten auf die mikrosomenhaltige Fraktion (15 000 x g Ü) der Nebennieren von Kontrollratten vom Hund und vom Schwein.

Testlösung =		mikrosomenhaltige Zellfraktion:		
		Kontroll-Ratte	Hund	Schwein
Medium A		241	257	192
Lösliche Zellfraktion Ratte	Kontrolle	553	292	593
	ACTH	870	531	926

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200-250 g) wurden durch Dekapitation getötet, die Nebennieren von anhängenden Fett- und Bindegewebe befreit und etwa 2 Min. nach dem Tod des Tieres in eiskalter 0,9 % NaCl gesammelt. Nach genau zweiminütiger Homogenisation (200 mg Nebenniere pro ml Medium A nach LITTLEFIELD und KELLER (219), d.h. 0,25 M Saccharose, 0,025 M KCl, 0,005 M MgCl₂, 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) im POTTER-ELVEJHEM Homogenisator (188) mit Teflon-Pistill wurde der 10 Min. x 15000 x g Überstand als mikrosomenhaltige Fraktion hergestellt. - Schweinenebennieren wurden im Schlachthof etwa 10 Minuten nach dem Tod des Tieres entnommen und schon bei der Entnahme vollständig von allem Fett- und Bindegewebe befreit, was nach Schlitzen der Kapsel möglich ist. Homogenisiert wurde wiederum unter sehr konstant gehaltenen Bedingungen (4 x 10 Sek. in einem kleinen Messerhomogenisator und 1 Minute im POTTER-ELVEJHEM). Der 15 000 x g Überstand hat keine geringere Aktivität, wenn die Schweinenebennieren wochenlang bei - 18°C aufgehoben werden (284). Alle Schritte wurden bei 0 bis 3° C durchgeführt. - ACTH-Behandlung: Die Ratten erhielten drei Tage vor dem Versuch morgens und abends i.m. je 20 E Depot-ACTH (Schweine-ACTH der Firma Upjohn Co), in späteren Versuchen je 5 E synthetisches B 1-24 Corticotropin in Depotform (Ciba 36 716-Ba). - Zur Gewinnung der löslichen Zellfraktion wurden 100 mg Nebennieren von Kontrollratten oder von ACTH-behandelten Tieren pro ml Medium A wie oben homogenisiert und die Homogenate 120 Min. bei 105 000 x g (Model L Spinco-Ultrazentrifuge der Fa. Beckman Instr.) zentrifugiert. - Die Inkubationsbedingungen zur Messung des Einbaus von 14-C-Glycin in Protein sind im Text beschrieben. Proteinbestimmungen nach LOWRY (189) wurden regelmäßig am 15 000 x g Ü (15 mg/ml) und am 105 000 x g Ü (im Mittel 3 mg/ml) durchgeführt. - In dieser Tabelle sind IPM-Mittelwerte von je drei Inkubationsansätzen der 3 verschiedenen Versuche (Ratte, Hund, Schwein) angegeben.

c) METHODIK

Es soll hier noch kurz auf die Methodik der Inkubation der Zellfraktionen zur Messung des Einbaus radioaktiver Aminosäuren in Proteine eingegangen werden. Soweit nicht ausdrücklich anders vermerkt, wurden 0,4 ml der mikrosomenhaltigen Zellfraktion (15 000 x g Überstand), die also das Äquivalent von 80 mg Schweinenebnieren in Medium A (Tab.3) enthielten, in einem Gesamtvolumen von 1,05 ml mit $1/\mu\text{Ci}$ 14-C-Glycin inkubiert. Die spezifische Aktivität des verwandten 14-6-Glycins war 2,78, in späteren Versuchen 70 mCi/mMol. Da dialysierte 15 000 x g Überstände ohne Zusatz von Aminosäuregemischen zum Inkubationsansatz (Tab.4) praktisch keinen Glycineinbau zeigten, nach Zusatz von je $1/\mu\text{Mol}$ von 19 Aminosäuren (284) jedoch etwa die gleiche Menge 14-C-Glycin wie durch den nicht dialysierten 15 000 x g Überstand eingebaut wurde, kann angenommen werden, daß die Glycinkonzentration im Inkubationsgemisch in der Größenordnung von 10^{-4} bis 10^{-3}M liegt, was etwa dem Gehalt von Organen, z.B. von Hirngewebe an freiem Glycin entspricht (190). Die Beschleunigungen des Glycineinbaus, die man nach Zusatz von 0,4 ml der Testlösungen, also des 105 000 x g Überstandes von Rattennebnierenhomogenaten in Medium A, bzw. einzelner Fraktionen aus dieser löslichen Zellfraktion - letztere wurden in jedem Fall gegen Medium A dialysiert - findet, können nicht auf der Basis höherer spezifischer Aktivitäten des 14-C-Glycins erklärt werden. Im Gegenteil, die spezifische Aktivität dürfte bei Zusatz der löslichen Zellfraktion absinken. Der Zuwachs an eingebautem Glycin ist also in Wirklichkeit höher als es in der Zunahme der IPM zum Ausdruck kommt (Tab. 3 und 5). - Es wurde bewußt darauf verzichtet, den Glycineinbau in Mol pro mg Protein oder entsprechend anzugeben, da die Gesamt-Glycinkonzentration im Inkubationsansatz nicht genau bekannt war und, um tatsächlich gemessene Werte angeben zu können. - Die 14-C-Glycin-Lösungen müssen frisch sein, bzw. eingefroren aufgehoben werden, da sich sonst in ihnen, vermutlich durch Bakterien, Produkte bilden, die sich wie Eiweißkörper

gegenüber der üblichen Waschprozedur (s.u.) verhalten und den Blindwert (=Null-Minutenwert) für die Glycininkorporation erhöhen (278). Für den chromatographischen Nachweis waren diese Verunreinigungen jedoch zu gering. Wir fanden, daß mehr als 99 % der Radioaktivität unserer ^{14}C -Glycin-Lösungen sich chromatographisch (n-Butanol:Eisessig: $\text{H}_2\text{O} = 5 : 1 : 4$) wie Glycin verhielten. - Dem Inkubationsgemisch (Tab.4) wurden außerdem (in 1,05 ml Gesamtvolumen) 10 μMole Phosphoenolpyruvat, 1 μMol Adenosintriphosphat, 0,25 μMole Guanosintriphosphat und ca. 60 μg dialysierte Pyruvatkinase zugesetzt und dabei folgende Endkonzentrationen eingestellt: 0,005 M Mg^{++} , 0,017 M K^+ , 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 und 0,25 M Saccharose. - Es wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß der Glycineinbau 120 Minuten lang etwa linear verläuft. Nach der Inkubation wurden 4 ml kaltes Wasser und 5 ml 20 % frische kalte Trichloressigsäure zu dem Inkubationsgemisch gegeben. Die aus-

Tab.4 : Inkubationsansatz für ^{14}C -Glycin-Einbau in Protein

^{14}C -Glycin	1 μCi (0,36 bzw. 0,014 μMol)
Phosphoenolpyruvat (PEP)	10 μMol
Adenosintriphosphat (ATP)	1 μMol
Guanosintriphosphat (GTP)	0,25 μMol
Pyruvatkinase	ca.60 μg
15 000 x g Überstand von Schweinenebnennieren	80 mg -Äquivalent
Testlösung	z.B. Medium A
$\Sigma\text{V} = 1,05 \text{ ml} \quad , \quad 37^\circ\text{C} \quad , \quad 60 \text{ Min.}$	

gefällten Proteine wurden nach 15 Minuten (0°C) sedimentiert und folgender Waschprozedur unterzogen: je 10 ml absol. Alkohol, 2 x 10 ml 5 % TCE bei 90°C zur Extraktion der Nucleinsäuren (199), 10 ml kalte 5 % TCE, 10 ml Äthylacetat zur Lipidextraktion und 10 ml absol. Alkohol. Die Proteinrück-

stünde wurden unter Vakuum getrocknet, über Nacht in 2 ml Hyaminehydroxide (Packard Instr.) bei 60°C gelöst und schließlich mit 18 ml Scintillationsflüssigkeit (0,3 % PPO= 2,5-diphenyloxazol, 0,06 % Dimethyl-POPOP = 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol in Toluol) in Zählgläser überführt und im Flüssigkeitsscintillationszähler (Nuclear-Chicago, bzw. Packard Instr.) bei einer Zählausbeute von ca. 65 % gezählt. Blindwerte, d.h. Inkubationsansätze, denen TCE sofort nach dem Start zugesetzt wurde, liefen bei jedem Versuch mit und wurden von den Ergebnissen subtrahiert.

Unberücksichtigt blieb bei dieser Versuchsanordnung die Tatsache, daß etwa 1/20 der Rattennebenniere Nebennierenmark (200) ist und daß erhebliche Unterschiede der ACTH-Wirkung auf die verschiedenen Zonen der Nebennierenrinde bestehen (265 - 267, 270, 275). Würde man die gefundene Änderung der Aktivität der Aminoacyltransferase (s.u.) auf spezifisch durch ACTH betroffene Strukturen beziehen können, so wäre damit zu rechnen, daß der beobachtete Effekt wesentlich deutlicher wäre.

d) VORVERSUCHE

Folgende Vorversuche sollten die Brauchbarkeit des geschilderten Systems für die Messung der in vitro Proteinsynthese überprüfen. Da sie z.T. bereits mitgeteilt wurden (284), fassen wir uns kurz. Ohne ATP und das ATP regenerierende System wurden nur 10 % des Einbaus des in Tab.4 angegebenen vollständigen Inkubationsansatzes mit Medium A als Testlösung gefunden. Zusatz der doppelten und dreifachen Menge an ATP, PEP und Pyruvatkinase steigert die Glycininkorporation nicht. Wurde GTP weggelassen, so fand sich keine Verminderung des Glycineinbaus, vermutlich weil GTP in der mikrosomenhaltigen Nebennierenfraktion ausreichend vorhanden oder im Inkubationsansatz gebildet wurde. Mit dialysiertem 15 000 x g Überstand von Schweine Nebennieren fanden

wir allerdings bei Weglassen des GTP eine nicht signifikante Abnahme von 10 - 15 % ($p < 0,2$). Es ist uns also nicht gelungen, die GTP-Abhängigkeit der in vitro-Proteinsynthese (212, 249) im Nebennierenhomogenat zu zeigen, obwohl diese orientierenden Versuche eine solche sicher nicht ausschließen. Zusatz von je $1/\mu\text{Mol}$ von 19 nicht markierten Aminosäuren (ohne Glycin) führte zu keiner Steigerung des Aminosäureeinbaus, woraus geschlossen werden darf, daß die Aminosäurekonzentration im Homogenat nicht geschwindigkeitsbestimmend für die Proteinsynthese war. Mit der doppelten Menge an 15 000 x g Überstand (Schweine Nebennieren) wurde etwa doppelt so viel ^{14}C -Glycin in Protein eingebaut, was noch einmal zeigt, daß alle Cofaktoren und Substrate in für die Proteinsynthese ausreichender Konzentration im Inkubationsansatz vorhanden waren. Reduziertes Glutathion (10^{-5}M) hatte keinen sicheren bzw. einen hemmenden (10^{-3}M) Einfluß auf die Proteinsynthese (284, 244, 249).

Ohne 15 000 x g Überstand, von Schweine Nebennieren wurde mit 0,4 ml 105 000 x g Überstand von Nebennieren ACTH-behandelter Ratten nur ca. 10 % (27 IPM) des ^{14}C -Glycineinbaus des in Tab.4 angegebenen Systems gefunden. - In weiteren Vorversuchen (mit P.KRAUSE) wurde gefunden, daß die in der Legende zu Tab.3 geschilderten Homogenisationsverfahren offenbar die Mitochondrien der Nebennieren nicht vollständig intakt lassen (192, 193). Der Gehalt an Glutamatdehydrogenase eines typischen Homogenats war durch zusätzliche Homogenisation mit dem Ultraturrax nur zu verdoppeln, und betrug auch bei einfacher Homogenisation von Ratten Nebennieren mit dem Potter-Elvehjem-Homogenisator bereits 50 % des Gehaltes der üblichen Schweine Nebennierenhomogenate. Der Gehalt des Schweine Nebennierenhomogenates an Lactatdehydrogenase änderte sich dagegen bei zusätzlicher Homogenisation mit dem Ultraturrax nicht.

e) EINLUSS VON ACTH AUF DIE AKTIVITÄT DER LÖSLICHEN
ZELLFRAKTION

Die Behandlung von Ratten mit den in der Legende zu Tab.3 angegebenen extrem hohen ACTH Dosen führte zu signifikanter Zunahme der die in vitro Proteinsynthese stimulierenden Aktivität in der löslichen Zellfraktion der Rattennebenniere (Tab.5).

Tab. 5: Stimulation des Einbaus von ^{14}C -Glycin in Protein in der mikrosomenhaltigen Zellfraktion ($15\ 000 \times \text{g } \ddot{\text{U}}$) von Schweine Nebennieren durch die lösliche Zellfraktion ($105\ 000 \times \text{g } \ddot{\text{U}}$) der Nebennieren von ACTH-behandelten und Kontrollratten

Testlösung	Medium A	Kontroll-Überstand	ACTH-Überstand
IPM ($\bar{x} \pm \sigma$)	207 \pm 24,9	631 \pm 60,7	1010 \pm 87,0
p	< 0,001		< 0,001

Die Gewinnung der Zellfraktionen und die Inkubationen sind in der Legende zu Tab.3 sowie im Text beschrieben. Angegeben sind die Mittelwerte von 9 Versuchen mit der Standardabweichung σ . Berechnung der Signifikanz mit dem t-Test (84).

Die Werte in der Tabelle wurden nach dreitägiger i.m. ACTH-Behandlung gefunden; diese Ergebnisse erhielten wir, allerdings nicht ganz so deutlich ausgeprägt, auch schon 12 Stunden nach i.m. ACTH-Behandlung. FARESE (286) hat in zwischen, wie unten noch näher ausgeführt, bereits 2 und 4 Stunden nach i.m. ACTH-applikation eine Steigerung der Aktivität in der löslichen Zellfraktion beschrieben. - Es ist wichtig, dem Nebennierengewicht der Ratte Beachtung zu schenken Die dreitägige i.m. ACTH-Behandlung führte im Mittel zu einem Anstieg des Nebennierengewichtes um 49 %

(10 Versuche mit insgesamt 124 Kontrolltieren und 86 ACTH-Ratten). Das Gewicht eines Nebennierenpaares der Kontrollratten sollte zwischen 30 und 35 mg liegen. Werden die Ratten unter ungünstigen Bedingungen (Kälte, Unruhe) gehalten, so finden sich z.T. wesentlich höhere Nebennierengewichte, welche bis nahe an die Gewichte der ACTH-behandelten Tiere heranreichen. Jeder "stress" führt bei der nicht hypophysektomierten Ratte zu ACTH-Ausschüttung, so daß es schließlich schwierig wird, die Wirkung des exogenen ACTH von der des endogenen zu unterscheiden. Aus diesem Grunde konnten wir die Kontrolltiere natürlich auch nicht mit Placebo-Injektionen behandeln.

Die Wirkung der i.m. ACTH-Behandlung auf die in vitro Proteinsynthese wurde sowohl bei Verwendung natürlicher ACTH-Präparate als auch einer Depotform des synthetischen S^{1-24} Corticotropins (Tab.3) gefunden. Daß wir tatsächlich einen für ACTH spezifischen Effekt studierten und nicht die Wirkung einer Verunreinigung in den ACTH-Präparaten wie z.B. Wachstumshormon (271), zeigen Versuche, bei denen hypophysektomierten Ratten über vier Stunden 2 E synthetisches (Triacosapeptid, 83) oder 1,5 E hochgereinigtes natürliches ACTH (Oxycel-ACTH, Wilson) infundiert wurde (Tab.6).

Tab.6: Einfluß von ACTH-Infusionen bei hypophysektomierten Ratten auf die lösliche Zellfraktion der Nebenniere.

Testlösung	Glycineinbau
0,4 ml Medium A	183 ⁺ ₋ 3 IPM
0,35 ml 105 000 x g Ü von Placebo- infundierten Tieren	356 ⁺ ₋ 10,7 IPM
0,35 ml 105 000 x g Ü von ACTH infun- dierten Tieren	527 ⁺ ₋ 19,5 IPM

Inkubationsbedingungen wie in der Legende zu Tab.3 und im Text beschrieben. Die Ratten wurden 14 Tage vorher hypophysektomiert. Weitere technische Einzelheiten wie Methodik der Infusion in die V. jugularis etc. s.(284). IPM sind als $\bar{x} \pm \sigma_{\bar{x}}$ (84) angegeben ($002 > p > 0,01$).

f) NATUR DES STIMULIERENDEN FAKTORS IN DER LÖSLICHEN
ZELLFRAKTION

Es galt nun zunächst die Frage zu klären, welcher Natur der Faktor in der löslichen Zellfraktion ist. Dabei stand, nachdem Farese und REDDY (278) bereits gezeigt hatten, daß die Bildung von Aminoacyl-t-RNS in Rattennebennierenhomogenaten mit und ohne ACTH-Vorbehandlung gleich schnell abläuft, für uns die Frage im Vordergrund, ob der Faktor, der nicht dialysierbar war und bei 55°C inaktiviert wurde, ein Enzymprotein, also z.B. Aminoacyltransferase oder eine Messenger-Ribonucleinsäure, also ein Nucleoprotein, in der löslichen Zellfraktion sei. Im folgenden seien unsere Befunde (284) zu diesem Punkt dargestellt.

Es sei vorausgeschickt, daß zwischen den 105 000 x g-Überständen der Nebennierenhomogenate ACTH- und unbehandelter Ratten bezüglich des Gehaltes an stimulierendem Faktor kein qualitativer, sondern nur ein quantitativer Unterschied besteht. Wie Tab.5 zeigt, ist der Faktor nach ACTH-Behandlung in etwa doppelter Aktivität, bezogen auf das gleiche Nebennierengewicht, vorhanden. Alle im folgenden geschilderten Charakteristika gelten sowohl für die kleinere Aktivität im Kontrollüberstand als auch für die größere Aktivität im 105 000 x g-Überstand der Nebennieren ACTH-behandelter Ratten.

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation ließ sich zeigen, daß der für die Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmende Faktor etwas vor dem Hauptanteil der bei 260 und 280 nm absorbierenden Bestandteile der löslichen Zellfraktion sedimentiert (Abb. 18). - Eine grob angenäherte Bestimmung des Molekulargewichtes dieses Faktors wurde mittels der vergleichenden Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Diese von MARTIN und AMES (194) vorgeschlagene Technik erlaubt die Berechnung des Molekulargewichtes einer unbekannt Substanz aus der Sedimentation gleichzeitig zentrifugierter Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (vgl.

Abb. 18: Sedimentation des stimulierenden Faktors im 105 000 x g-Überstand bei Dichtegradientenzentrifugation.

Der 105 000 x g-Überstand von 200 mg Nebenniere ACTH-behandelter Ratten wurde auf einem 6 - 20 %igen Dichtegradienten 19 Stunden lang bei + 1°C und 37500 RPM im SW 39 Rotor zentrifugiert. Die Technik der Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender Fraktionierung des Gradienten ist unter "METHODEN" beschrieben. Die Absorption der gewonnenen Fraktionen bei 260 und 280 nm und die Stimulation des ¹⁴C-Glycineinbaus in Protein in dem in Tab.4 geschilderten System nach Zusatz von 0,3 ml jeder Fraktion des Dichtegradienten sind in dieser Abbildung dargestellt.

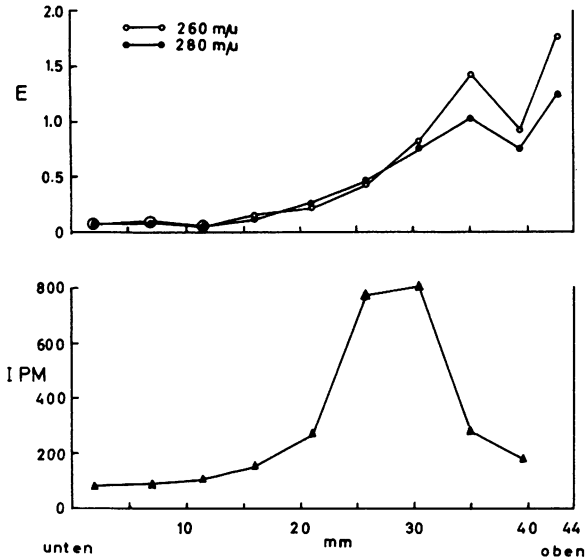


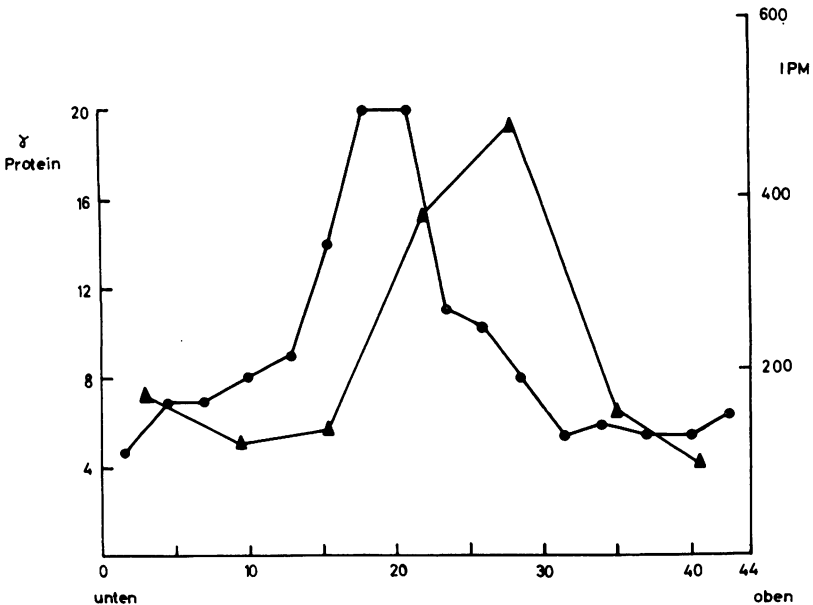
Abb.14). Unter der Voraussetzung, daß das spezifische Teilchenvolumen der unbekanntes und der Bezugssubstanzen gleich ist, was gerechtfertigt erscheint, da die meisten Proteine spezifische Teilchenvolumen zwischen 0,70 und 0,75 cm³/g haben (194 - 197), gilt die Gleichung:

$$\frac{S\text{-Wert}_1}{S\text{-Wert}_2} = \left[\frac{MG_1}{MG_2} \right]^{\frac{2}{3}}$$

Wir verwandten als Bezugsproteine Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase (Abb.19).

Abb.19: Molekulargewichtsbestimmung durch vergleichende Dichtegradientenzentrifugation.

Auf Saccharosedichtegradienten (5-13 %), die wie unter "METHODEN" beschrieben, hergestellt wurden, wurde 105 000 x g-Überstand von Nebennieren ACTH-behandelter Ratten - in anderen Versuchen auch von Kontrollratten - und dialysierte Pyruvatkinase 16 1/2 Stunden bei 37500 RPM und + 1°C zentrifugiert. Die Bestimmung der Beschleunigung des 14-C-Glycineinbaus in Protein erfolgte wie in der Legende zu Tab.3, 4 angegeben. Die Bestimmung des Enzymproteins erfolgte mit der LOWRY-Methode (189). Für die Pyruvatkinase wurde ein Molekulargewicht von 237 000 und ein $S_{20,W}$ -Wert von 10,04 (197) angenommen. In entsprechenden $S_{20,W}$ Versuchen wurde dialysierte Laktatdehydrogenase benutzt, für die ein Molekulargewicht von 140 000 und ein $S_{20,W}$ -Wert von 7,2 angegeben ist (195, 196).



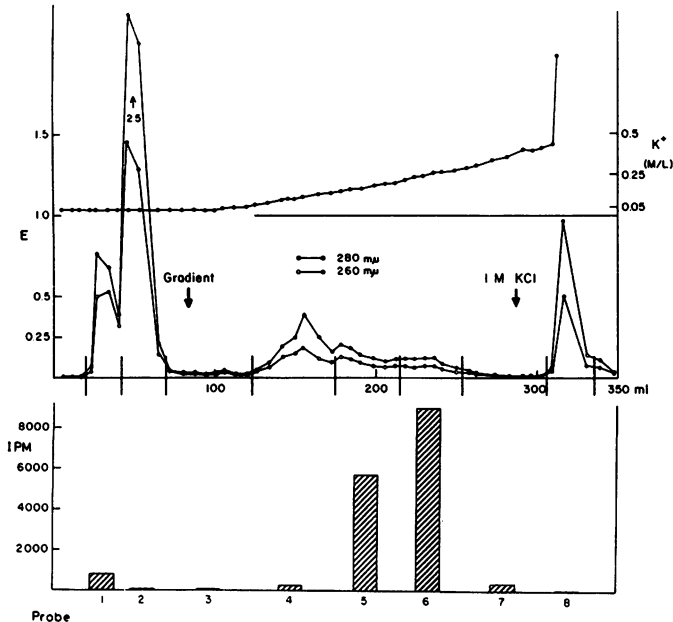
Nach dieser Methode liegt das Molekulargewicht des für die in vitro Proteinsynthese geschwindigkeitsbestimmenden Faktors zwischen $1,0$ und $1,4 \times 10^5$ und der $S_{20, w}$ -Wert (Sedimentationskoeffizient) zwischen 6 und 7 , also wesentlich niedriger als das für m-RNS angegebene (205) Molekulargewicht von $500\ 000$. - Weitere Versuche (284) zeigten, daß der Faktor durch Vorinkubation mit Trypsin inaktiviert werden konnte, während Vorinkubation mit Ribonuclease die Aktivität nicht zerstörte. -

Nachdem die geschilderten Versuche dafür sprachen, daß der Faktor ein Protein war, haben wir den dialysierten $105\ 000 \times g$ -Überstand von Nebennieren ACTH behandelte Ratten mittels Anionenaustauschchromatographie auf Diäthylaminoäthylcellulosesäulen (198) aufgetrennt. Dieses System war von TAKANAMI ($248 - 250$) für die Reinigung von Leberaminoacyltransferase angegeben. Abb. 20 zeigt, daß der geschwindigkeitsbestimmende Faktor für den ^{14}C -Glycineinbau in unserem System sich auf DEAE-Cellulose-Säulen wie Leberaminoacyltransferase ($217, 218, 248 - 250$) verhielt und bei Gradientenelution zwischen $0,17$ und $0,3$ molarem Chlorid hinter dem Hauptanteil der Proteine von der Säule eluiert wurde. Etwa $95\ %$ der wiedergefundenen Aktivität fanden sich in diesem Bereich. Die Ausbeute lag bei dieser Chromatographie zwischen 53 und $70\ %$ bei einer $3-7$ -fachen Anreicherung im Vergleich zu dialysiertem $105\ 000 \times g$ -Überstand. Die Aktivität ist bei $0^\circ C$ tagelang haltbar, eingefroren dagegen nicht.

Die chemische Untersuchung des mittels Anionenaustauschchromatographie auf DEAE-Cellulose-Säulen gewonnenen Faktors zeigte, daß praktisch das gesamte Trockengewicht als Protein bestimmbar war und daß Ribonucleinsäurebestimmungen Nullwerte ergaben, so daß nach der Empfindlichkeit der Methode behauptet werden kann, daß dieses Präparat

Abb. 20: DEAE-Cellulosechromatographie der löslichen Zellfraktion von Nebennieren ACTH-behandelter Ratten

105 000 x g-Überstand des Homogenats von 1473 mg Nebennieren ACTH-behandelter Ratten (vgl. Legende Tab.3) wurde dialysiert und auf die Diäthylaminoäthylcellulose-Säulen aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer I (Abb.21). Nach dem Vorlauf wurde eine Gradientenelution mit KCl, deren Linearität durch flammenphotometrische Kaliumbestimmungen geprüft wurde, und schließlich ein Nachwaschen mit 1 M KCl-Lösung angeschlossen (Abb.21). Die Bestimmung der Extinktion bei 260 und 280 nm und der Beschleunigung des 14-C-Glycineinbaus in dem unter Tab.4 angegebenen System zeigte, daß die Aktivität in den Proben Nr.5 und 6 eluiert wurde, in welchen die Absorption bei 280 nm höher war als die bei 260 nm (Quotient = 1,7). Die höchste spezifische Aktivität fand sich in Fraktion 6. Der untere Teil dieser Abb. gibt die Gesamtaktivität wieder, der Proteingehalt war in Probe Nr. 5 : 5,0 mg und in Probe Nr.6: 3,36 mg (284). In Probe 8 wurden durch 1 M KCl Nucleinsäuren eluiert.



weniger als 1 % Ribonucleinsäure enthielt (Tab. 7).

Tab.7: Proteingehalt des stimulierenden Faktors nach DEAE-Cellulose Chromatographie

Vor Extraktion		Nach Extraktion
Trockengewicht	2,6 mg	2,7 mg
LOWRY-Protein	2,5 mg	2,4 mg

Nach Bestimmung des Trockengewichtes einer Mischung aus Probe 5 und 6 (Abb.20) wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen, in 5 %iger kalter Trichloressigsäure gefällt, mit absolutem Alkohol und Äthylacetat gewaschen, 2 x 15 Minuten bei 90°C mit 5 %iger Trichloressigsäure extrahiert (199) und noch einmal mit Äthylalkohol gewaschen. Darauf folgte die Bestimmung des Trockengewichtes und des Proteingehaltes (LOWRY-Methode, 189). Die kalten und heißen Trichloressigsäureextrakte wurden mit der Methode von SCHNEIDER (199) bzw. DISCHE (199a) auf ihren Gehalt an RNS untersucht.

Schließlich fand sich, daß der Einbau von ¹⁴C-Leucin in analoger Weise wie der von ¹⁴C-Glycin beschleunigt wurde (284). Wurden dem in Tab.4 angegebenen vollständigen System steigende Mengen des mittels Anionenaustauschchromatographie gewonnenen Faktors zugesetzt, so ließ sich die in vitro Proteinsynthese linear zu der zugegebenen Menge um eine Zehnerpotenz steigern.

Diese Ergebnisse zeigen, daß wir hier ein Beispiel für die Stimulation der in vitro Proteinsynthese im Homogenat eines Organs durch vorausgehende in vivo-Behandlung mit einem Hormon haben, bei der die Beteiligung einer Messenger-Ribonucleinsäure zunächst nicht nachweisbar ist.

g) EINFLUSS VON ACTH AUF DIE AKTIVITÄT DER MIKROSOMEN

An diesem Punkte mußte man die Aufmerksamkeit wieder den Untersuchungen über die Aktivität der Mikrosomen der Nebenniere nach ACTH-Behandlung zuwenden. FARESE (282) hatte zeigen können, daß nach ACTH-Behandlung die Aktivität der Mikrosomen für den ^{14}C -Glycineinbau zunimmt und nicht, wie ursprünglich mitgeteilt (278), konstant bleibt. Danach war klar, daß nach ACTH-Behandlung (3 Tage) sowohl die lösliche Zellfraktion der Nebenniere, als auch die Mikrosomen, sowie durch Desoxychololbehandlung gewonnene Ribosomen bei kreuzweiser Inkubation den Glycineinbau gegenüber Kontrollen beschleunigten. Weitere Untersuchungen (285) ergaben, daß die ACTH-Behandlung sowohl den Gehalt der Nebenniere an Ribosomen als auch an Polysomen, welche als durch m-RNS zusammengehaltene Polymere der Ribosomen (229 - 231) aufgefaßt werden (s.o.) steigert. Daraus wurde geschlossen, daß ACTH die Menge der für die Ribosomen verfügbaren m-RNS erhöht. Wir haben uns daher mit der Frage beschäftigt, ob und wenn welche Faktoren der löslichen Zellfraktion für die Aktivität einer gegebenen Menge an Polysomen und damit an m-RNS verantwortlich sind. Wir fanden, daß bei Inkubation der etwa doppelten Menge von Polysomen, wie sie im üblichen Zellhomogenat (15 000 x g Überstand) zu erwarten ist, mit einem 105 000 x g Überstand, der die für die Proteinsynthese notwendige Aminoacyl-t-RNS offensichtlich in ausreichender Menge synthetisierte, der Aminosäureeinbau in Protein durch den von uns als Aminoacyltransferase angesprochenen Faktor linear zur zugesetzten Menge stimuliert wurde.

h) KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN MIT AMINOACYLTRANSFERASE UND POLYSOMEN AUS SCHWEINENEBENNIEREN

Ein etwas anderer experimenteller Weg mußte gewählt werden, um die quantitativen Beziehungen zwischen Polysomen und Aminoacyltransferase zu untersuchen. Wie oben gezeigt (Tab. 3, 5), ist der stimulierende Faktor im 105 000 x g Überstand von Nebennieren von Kontrollratten, wenn auch in

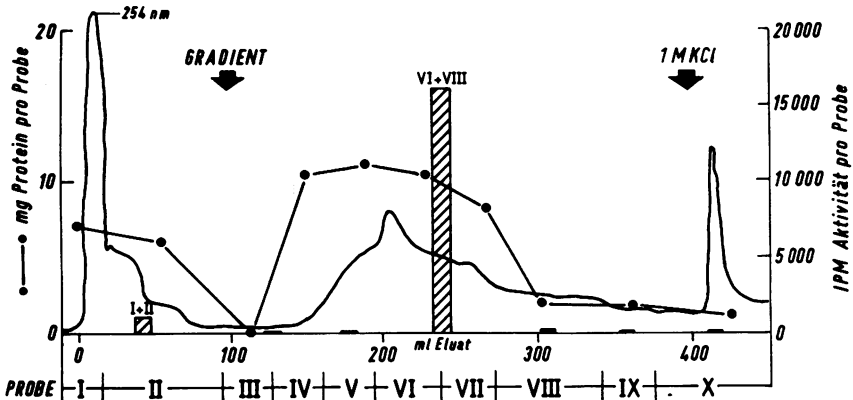
geringerer Aktivität als nach ACTH-Behandlung vorhanden. Desgleichen ist er im 105 000 x g Überstand von Schweine-
nebennieren nachweisbar. Unser erstes Ziel war daher, die-
sen Faktor aus den in beliebiger Menge zugänglichen Schweine-
nebennieren anzureichern. Dazu haben wir zunächst
105 000 x g Überstand mit einer Ultrafiltrationsmethode
unter Verwendung von Kollodiumhülsen (191) eingengt. Die
durch diese Konzentration zu erzielende Anreicherung ergab
ein Präparat, das den Glycineinbau in der mikrosomenhaltigen
Zellfraktion von Schweine nebennieren angenähert proportional
zur eingesetzten Menge stimulierte. Die Mengen und der Rein-
heitsgrad des stimulierenden Faktors wurden jedoch als un-
zureichend betrachtet.

Deshalb modifizierten wir das oben beschriebene chromato-
graphische Verfahren zur Anreicherung der Aminoacyltrans-
ferase:

Es wurden 13,7 g frische Schweine nebennieren, wie in der
Legende zur Tab.3 beschrieben, in 68,5 ml Medium A (Tab.3)
homogenisiert und der 105 000 x g x 90 Min. Überstand her-
gestellt. Davon wurden 3 x 15 ml (75 %) auf Sephadex-G-25
Säulen (h = 20 cm, d = 1,2 cm) aufgetragen und mit Puffer I
(0,03 M KCl, 0,02 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5) eluiert; es
wurden je 25 ml Eluat gesammelt, wobei die Absorption bei
254 nm mit dem Uvicord-Ultraviolet-Absorptiometer (LKB)
registriert wurde. Jedes Eluat wurde darauf mit der o.g.
Ultrafiltrationsmethode unter Verwendung von Kollodiumhül-
sen der Fa. Membran Filtergesellschaft Göttingen (191) bei
einem Vakuum von ca. 50 mm Hg (Ölpumpe) auf ca. 2ml einge-
engt. Die Konzentrate wurden 20 Min. bei 105 000 x g zentri-
fugiert und der Überstand auf einer DEAE-Cellulosesäule
mittels Gradientenelution fraktioniert. Nach 100 ml Vorlauf
(Puffer I) wurde ein Gradient aus gleichen Mengen (je
150 ml Puffer I und Puffer II: 0,5 M KCl, 0,02 M Tris-HCl-
Puffer pH 7,5) angeschlossen, dessen Linearität mit einem
Leitfähigkeitsanzeigergerät überprüft wurde. Schließlich
wurde noch mit 1 M KCl (50 ml) nachgewaschen. Das Eluat der
DEAE-Cellulosesäule wurde mit einem Radi-Rac (LKB) frak-
tioniert (41 Fraktionen a 11 ml) und die Absorption bei
254 nm mit dem Uvicord registriert. Die Fraktionen wurden
- wie aus der Abb.21 ersichtlich - rekombiniert (Proben
I - X) und mittels Ultrafiltration (s.o.) auf ca. 1 ml einge-
engt. Die Proben I - X wurden schließlich gegen Medium A
dialysiert, mit Medium A auf 2 ml aufgefüllt und der Protein-
gehalt der Proben nach LOWRY (189) ermittelt. Alle bisher
angegebenen Schritte erfolgten bei 0 bis 2°C. Zirka 60 Stunden

Abb. 21: DEAE-Cellulose-Chromatographie von Aminoacyltransferase aus Schweinenebennieren

Erklärung im Text.



nach Versuchsbeginn, h.d. nach dem Schlachten der Schweine wurden aliquote Mengen (etwa 1/10 der Proben, z.T. kombiniert), mit dem in Tab.4 beschriebenen System (mikrosomenhaltige Zellfraktion von Schweinenebennieren) getestet. Die Abb.21 gibt die Gesamtaktivität der Proben I bis X wieder, d.h. die errechnete Gesamtstimulation des 14-C-Glycineinbaus. - Vorversuche unter Verwendung von DEAE-Sephadex für die Anionenaustauschchromatographie zeigten, daß diese Säule weniger geeignet war, den stimulierenden Faktor anzureichern.

Sodann haben wir uns mit der Isolierung von Polysomen aus Schweinenebennieren beschäftigt (siehe METHODEN). Diese wurden bei den im folgenden beschriebenen Versuchen dann natürlich parallel zu dem Transferfaktor präpariert.

Zunächst wurden mit konstanter Menge 105 000 x g Überstand (lösliche Zellfraktion) steigende Mengen von Polysomen inkubiert (Tab.8). Mit steigenden Mengen an Polysomen fand sich nur ein mäßiger Anstieg des Glycineinbaus, woraus wir

geschlossen, daß ein Faktor des 105 000 x g Überstandes geschwindigkeitsbestimmend war.

Tab.8: ¹⁴C-Glycineinbau durch Polysomen bei Inkubation mit 105 000 x g Überstand von Schweinenebennieren.

Polysomen, ml	-	0.1	0.2	0.4
IPM	179	240	269	337

Präparation der Polysomen siehe "METHODEN". 0,1 ml Polysomen - entsprechend 160 mg Schweinenebennieren - wurden mit 0,4 ml 105 000 x g Überstand von frischen Schweinenebennieren inkubiert. Inkubationsbedingungen wie in Tab.4 unter Weglassen des 15 000 x g Überstandes. Bestimmung des ¹⁴C-Glycineinbaus wie oben beschrieben, angegeben sind Mittelwerte von zwei Inkubationen.

Dann haben wir konstante Mengen von Polysomen mit konstanten Mengen der löslichen Zellfraktion (105 000 x g Überstand) und verschiedenen Mengen der mittels Anionenaustauschchromatographie (Abb.21) angereicherten Aminoacyltransferase inkubiert (Tab.9). Wie die Tabelle zeigt, ist unter den gewählten Inkubationsbedingungen die Aminoacyltransferase für den Glycineinbau durch Polysomen geschwindigkeitsbestimmend. - Dieses Ergebnis wurde bei Inkubation von Polysomen mit Transferfaktor, welcher, wie oben beschrieben, aus Nebennieren ACTH behandelter Ratten gewonnen wurde, bestätigt. Wir kommen zu dem Schluß, daß ACTH die Proteinsynthese, als Einbau markierter Aminosäuren erfaßt, im Nebennierenhomogenat beschleunigt, indem zunächst die Aktivität an Aminoacyltransferase in der Nebenniere zunimmt, und erst später die Aktivität und Menge der Polysomen ansteigt, für die allerdings der Gehalt an Aminoacyltransferase weiter geschwindigkeitsbestimmend bleibt. Unter der Voraussetzung, daß die im Inkubationsansatz in Sättigung angebotenen Substrate und Cofaktoren der Proteinsynthese auch in vivo in der Zelle nicht geschwindigkeitsbestimmend sind, ist also die Zunahme der Proteinsynthese nach ACTH-Behandlung

Tab.9: ¹⁴C-Glycineinbau durch Polysomen, Stimulierung durch "Aminoacyltransferase".

Probe Nr. (Abb.21)	Polysomen	Probe eingesetzt	
		0,2 ml	0,4 ml
V	+	270	208
	-	(55)	∅
VI	+	515	1288
	-	176	∅
VII	+	754	1835
	-	342	∅
VIII	+	210	331
	-	108	∅
IX	+	225	∅
	-	206	∅

Es wurden 0,1 ml Polysomen (Präparation siehe METHODEN), die 160 mg frischen Schweine Nebennieren entsprachen und 0,78 mg Protein (LOWRY, 189) sowie ca. 1,8 mg RNS (199, 199a) enthielten mit 0,3 ml 105 000 x g Überstand von frischen Schweine Nebennieren (= 60 mg Äquivalent) inkubiert. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen von Tab.4 unter Weglassen des 15 000 x g Überstandes von Schweine Nebennieren. Von den Proben V bis IX (Abb.21) wurden 0,2 ml und 0,4 ml zugesetzt. Die Proben enthielten V: 3,8 mg, VI: 3,5 mg, VII: 2,8 mg, VIII: 0,33 mg, IX: 0,3 mg Protein pro ml. Bestimmung des ¹⁴C-Glycineinbaues (IPM) wie oben beschrieben. Auf das Gesamtvolumen von 1,05 ml wurde mit Medium A ergänzt. 105 000 x g Überstand alleine: 335 IPM, Polysomen + 105 000 x g Ü: 209 IPM, Polysomen alleine 5 IPM. - Entsprechende Ergebnisse fanden sich bei Verwendung einer "Aminoacyltransferase", die unter Weglassen der Gelfiltration (Sephadex-G 25) gewonnen wurde.

linear von der Zunahme der Aminoacyltransferase-Aktivität abhängig. - Es wurde bisher nicht geklärt, ob eine Aktivitäts- oder Mengenzunahme, also Neusynthese, der Aminoacyl-

transferase vorliegt. Diese Frage könnte man mit Versuchen angehen, bei denen die Proteinsynthese in vivo z.B. durch Puromycin blockiert und dann die ACTH-wirkung auf die Aminoacyltransferase geprüft würde. Solche Versuche scheitern bisher an der Toxizität des Puromycin in vivo.

2. BEZIEHUNGEN ZWISCHEN PROTEINSYNTHESE UND CORTICOSTEROIDSYNTHESE

a) EINFLUSS VON ACTH UND CYKLISCHEM 3',5'-ADENOSINMONOPHOSPHAT IN VITRO

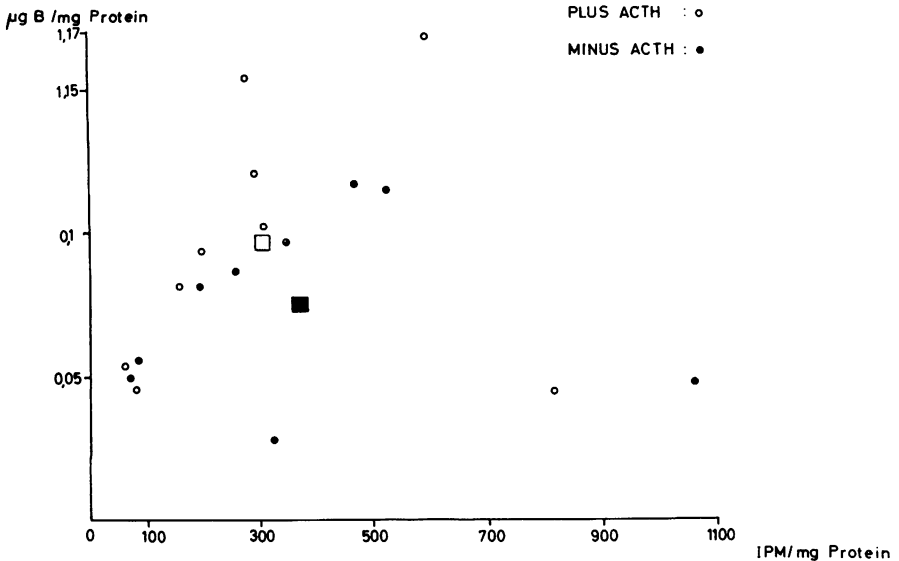
Die Frage nach der Beziehung zwischen dem Mechanismus durch den ACTH die Corticosteroidsynthese steigert und der Wirkung des ACTH auf die Proteinsynthese der Nebenniere ist in der EINLEITUNG schon gestellt worden. Zum Verständnis der eigenen Befunde sei hier noch einmal kurz auf die Literatur eingegangen. FERGUSON und andere Autoren (291 - 296) hatten zeigen können, daß nach Blockierung der Proteinsynthese durch Puromycin in Nebennierenschnitten ACTH in vitro die Corticosteroidsynthese nicht stimuliert. FERGUSON schloß aus seinen Ergebnissen, daß die Proteinsynthese für die Beschleunigung der Corticosteroidsynthese durch ACTH notwendig sei. - BRANSOM und REDDY (297) hatten, wie ältere Autoren (298), in einer ähnlichen Versuchsanordnung mit viergeteilten Rattennebnieren, die mit ACTH inkubiert wurden, gefunden, daß ACTH bei diesen Inkubationen den Einbau radioaktiver Aminosäuren in Nebennierenprotein beschleunigt. Auffälligerweise war dieser Befund nur zu erheben, wenn das Inkubationsmedium keine Glukose enthielt. - In letzter Zeit haben HALKERSTONE und Mitarb. (299, 300) gerade das Gegenteil berichtet, nämlich daß ACTH in diesem System (Inkubation von viergeteilten Rattennebnieren) eine Steigerung der Corticosteroidausschüttung (und Synthese, 293, 301, 302) bewirkt und den Einbau von radioaktiven

Aminosäuren vermindert. Das gleiche Ergebnis wurde für die Inkubation von Rattennebennieren Vierteln mit cyclischem 3', 5'-Adenosinmonophosphat mitgeteilt. -

Auch wir wissen schon seit einiger Zeit, daß bei der Inkubation von Rattennebennieren Vierteln ACTH den Einbau von radioaktiven Aminosäuren nicht beschleunigt, sondern eher leicht senkt, während die Corticosteroidausschüttung beschleunigt wird (Abb. 22).

Abb. 22: Einfluß des ACTH auf die Corticosteronausschüttung und den Einbau von ^{14}C -Glycin in Protein bei in vitro Inkubation von Rattennebennieren Vierteln.

Rattennebennieren wurden von Fett und Bindegewebe befreit und in 0,9 %iger NaCl (0°C) gesammelt und im Gefäß gewogen. Nach einiger Übung lassen sich die Nebennieren mit Rasierklingen in etwa gleich große Viertel schneiden. Die Viertel wurden systematisch auf die Inkubationsgefäße verteilt (8 Viertel pro Gefäß) und in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer, dessen pH durch Begasung mit 95 % O_2 , 5 % CO_2 auf pH 7,5 gebracht wurde, inkubiert. Das Inkubationsmedium enthielt $1 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Glycin. Die ACTH-Konzentration (β^{1-24} -Corticotropin, Ciba) war 0,5 E/ml Inkubationsmedium. Der Glycineinbau



(IPM/mg Rattennebennieren) wurde wie oben beschrieben (S.39) bestimmt. Nach der Inkubation (60 Minuten, 37°C) wurde 1 ml

Inkubationsmedium mit 15 ml Chloroform extrahiert und fluorimetrisch die Corticosteronkonzentration bestimmt (siehe Methoden der ACTH-Bestimmung). - Bei einigen Versuchen wurden die Nebennierenviertel zuerst eine Stunde ohne ACTH und 14-C-Glycin aber mit 100 mg% Glukose vorinkubiert, dann das Medium gewechselt und wie oben inkubiert.

Die Abbildung zeigt Inkubationen von Rattennebennierenvierteln ohne Glukose. Entsprechende Werte fanden sich bei Inkubation von Rattennebennierenvierteln mit ACTH oder cyklischem 3',5'-AMP ($1,3 \times 10^{-3}M$) bei Zusatz von Glukose (100 mg %).

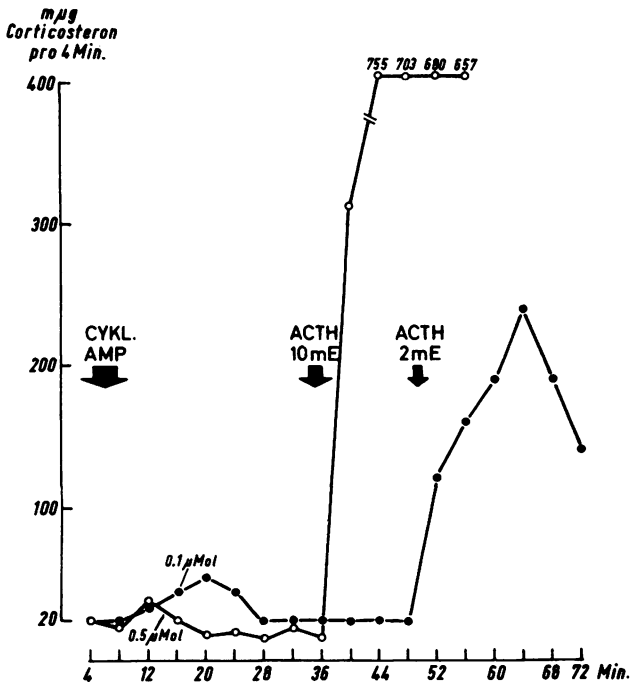
Weitere Autoren (292, 293, 295, 303) fanden entweder keine Beschleunigung des Aminosäureeinbaus in Protein oder sogar eine mehr oder weniger deutliche Hemmung in diesem in vitro System. Man sieht daraus, wie schwierig die Interpretation solcher in vitro-Inkubationen (291 - 306) sein kann und wie schwierig es manchmal ist, die Ergebnisse anderer Autoren auch bei peinlicher Beachtung der methodischen Details zu reproduzieren. Wir waren mit der Reproduzierbarkeit des Glycineinbaus und der Corticosteroidproduktion bei den hier angeführten in vitro Inkubationen nicht recht zufrieden und bauen unseren Schluß, daß die Stimulierung der Corticosteroidsynthese zumindest nicht auf einer Beschleunigung der Gesamtproteinsynthese der Nebenniere durch ACTH beruht, auf weitere Befunde (s.u.).

Die Wirkung von cyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat auf die Nebenniere ist interessant, seit HAYNES und BERTHET (301) ihre Hypothese präsentierten, daß ACTH über eine Steigerung der Konzentration an cyklischem 3',5'-AMP, eine Aktivierung der Phosphorylase und eine Erhöhung des Gehaltes an NADPH wirke (301, 307). Daß NADPH für die Hydroxylierungen in der Nebennierenrinde erforderlich ist, weiß man seit 1955 (329, 308). Zahlreiche Autoren haben diese Hypothese geprüft und haben entweder Ergebnisse erhalten, die zu ihr passen (309 - 315) oder nicht ohne weiteres mit ihr vereinbar sind (316 - 326). Eine ausführliche Diskussion dieser Befunde ist in diesem Rahmen nicht möglich. Wie schon früher von uns referiert (261), spricht vieles gegen die Annahme, daß die Erhöhung des Angebotes an NADPH allein die Beschleunigung der Corticosteroidsynthese bewirkt. Wichtiger erscheint die Tatsache, daß cyklisches 3',5'-AMP und ACTH

in vieler Hinsicht gleichartig wirken und unseres Wissens bisher kein Effekt des ACTH auf die Nebenniere bekannt ist, der durch cyklisches AMP nicht zu immitieren gewesen wäre. Man weiß also schon seit längerer Zeit, daß cyklisches AMP *in vitro* die Corticosteroidsynthese in Nebennierenschnitten erhöht. In jüngster Zeit haben japanische Autoren zeigen können, daß sehr hohe Konzentrationen (20 mg in 12 Minuten) an cyklischem AMP bei hypophysektomierten Ratten also in vivo die Corticosteronausschüttung steigern (327). Bei einer etwa 600-fach (120-fach) niedrigeren Dosis, die allerdings immer noch 0,1 bzw. 0,5 μ Mol betrug, fanden wir geringfügige Anstiege der Ausschüttung an Corticosteron im Nebennierenvenenblut der hypophysektomierten Ratte (Abb.23).

Abb.23: Einfluß von cyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat auf die Corticosteron-Inkretion der hypophysektomierten Ratte

Der akut hypophysektomierten Ratte (s.METHODEN) wurde cyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat der Firma Sigma Chemical Comp., wie durch den Pfeil veranschaulicht, in die Aorta infundiert (Abb.8). Bestimmung der Corticosteronausschüttung im Nebennierenvenenblut der Ratte, wie unter METHODEN beschrieben. Die Ansprechbarkeit der Ratte auf sehr hohe ACTH-Dosen war normal (vgl. Abb.10).



Wie ausgeführt, beschleunigt cyclisches AMP bei Inkubation von Rattennebennierenvierteln den Einbau von Aminosäuren nicht. Auch im dialysierten mikrosomenhaltigen Überstand von Schweinenebennieren (15 000 x g-Überstand) findet sich keine Steigerung der Proteinsynthese nach Zusatz von cyclischem AMP (Tab.10). Der Einfluß von in vivo-Injektionen von cyclischem AMP auf die Proteinsynthese im Rattennebennieren-homogenat wird z.Zt. von REDDY und Mitarb. (persönliche Mitteilung) untersucht.

Tab.10: Einfluß von cyclischem 3',5'-Adenosinmonophosphat auf die 14-C-Glycininkorporation im 15 000 x g Ü

cyclisches AMP	-	+
dialysierte mikro-somenhaltige Zell-fraktion	225	240
nicht dialysierte mikro-som.haltige Zellfraktion	279	244

Dem üblichen Testsystem (Tab.4) wurde cyclisches AMP (10^{-4} M) der Firma Sigma Chemical Comp. zugesetzt. Bei dem Versuch mit dialysiertem 15 000 x g Überstand von Schweinenebennieren wurden je $1 \mu\text{Mol}$ von 19 Aminosäuren zugegeben. Angegeben sind Mittelwerte von je 2 Inkubationen.

b) CORTICOSTEROID- UND PROTEINSYNTHESE NACH HYPOPHYSEKTOMIE

Nach Hypophysektomie der Ratte sinkt die Corticosteroninkretion innerhalb von 60 bis 90 Minuten auf sehr niedrige Spiegel ab (112, 323, 324), wie auch wir es fanden (Abb.9). Weiter nimmt die Ansprechbarkeit der Corticosteroninkretion auf ACTH bei der Ratte nach Hypophysektomie innerhalb von Stunden bereits erheblich ab (101, 115, 119). Wir fanden dagegen bei Inkubation der löslichen Zellfraktion (105 000 x g-Überstand) der Nebennieren hypophysektomierter

Ratten 30 Std. nach der Hypophysektomie mit mikrosomenhaltiger Fraktion (15 000 x g-Überstand) von Schweinenebenieren eine Beschleunigung des ^{14}C -Glycineinbaus, wie wir sie sonst nur nach ACTH-Behandlung von Ratten sahen. Der Gehalt an stimulierendem Faktor in der löslichen Zellfraktion war zudem 30 Std. nach der Hypophysektomie durch ACTH-Infusionen nicht weiter zu erhöhen (Tab.11). Wir schließen daraus, daß der "Stress" der Hypophysektomie (105) und die dabei erfolgende ACTH-Ausschüttung zu einer zumindest 30 Stunden anhaltenden Steigerung der Proteinsynthese führt, während die Corticosteronsynthese schon sehr viel eher abnimmt. -

Tab.11: Aktivität der löslichen Zellfraktion der Nebenniere 30 Stunden nach Hypophysektomie

Testlösung	Medium A	lösliche Zellfraktion	
		Placebo	ACTH
IPM	197	848	786

30 Stunden nach Hypophysektomie wurden Ratten je 1,7 E Oxycel-ACTH (Wilson), bzw. Placebo innerhalb von 210 Minuten in die V.jugularis infundiert. Die lösliche Zellfraktion wurde, wie in der Legende zu Tab.3 beschrieben, mit dem üblichen Inkubationssystem (Tab.4) getestet. Angegeben sind Mittelwerte von je 2 Inkubationen.

Andererseits fanden wir bei Ratten, die 14 Tage vorher hypophysektomiert wurden, nach ACTH-Infusion eine deutliche Zunahme der Aminoacyltransferase - Aktivität (Tab.6), also eine "corticotrophe" Wirkung auf die Proteinsynthese, während nach den Untersuchungen von STAEBELIN und Mitarb. (119) 10 Tage nach Hypophysektomie 3 E ACTH/kg i.v. keinen Anstieg der Corticosteronausschüttung bewirkten.

Die im vorangehenden geschilderten Befunde sprechen unseres Erachtens gegen eine Beteiligung der "über alles"-Protein-

synthese, d.h. also der mittels des ^{14}C -Aminosäureeinbaus zu messenden Summe von Proteinsynthese und -abbau, an der Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß ACTH zu einer Steigerung der Synthese einzelner Enzyme, welche für die Beschleunigung der Corticosteroidsynthese direkt oder indirekt erforderlich sind (309, 312, 321, 328), führt und auf diesem Wege die Proteinsynthese doch für die Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH notwendig ist.

III. SUPPRESSION DER ENDOGENEN CORTICOSTEROIDINKRETION DURCH KURZZEITIGE CORTICOID-THERAPIE

Die Glukosetoleranz von Patienten, die unter einer oralen Corticoidtherapie standen, haben wir mit Hilfe der i. v. Glukosebelastung unter Berechnung der sog. Glukoseassimilationskoeffizienten (k_G -Werte), wie unter METHODEN beschrieben, untersucht. Acht Patienten erhielten 30 mg Prednisolon pro Tag über einen Zeitraum von 9 Tagen. Es wurde darauf geachtet, daß die Patienten jeden Morgen um 6 Uhr 10 mg und dann in 4-stündigen Abständen je 5 mg einnahmen. Die letzte Tablette erhielten die Patienten somit um 22 Uhr. Es handelte sich um stationäre Patienten, die vor den Glukosebelastungen nüchtern blieben und ihr Bett nicht verlassen durften, bis der Glukosetoleranztest beendet war. Eine erste i. v. Glukosebelastung (I) wurde vor dem Beginn der Prednisolon-Behandlung durchgeführt. Eine zweite i.v. Glukosebelastung (II) folgte am 4.Tag der Corticoidtherapie morgens um 8 Uhr, das war zwei Stunden nach der letzten Prednisolon-Gabe (6 Uhr morgens, 10 mg). Eine dritte (III) i.v. Glukosebelastung wurde am 7.Tag der Corticoidtherapie ebenfalls um 8 Uhr morgens durchgeführt, nachdem am vorausgehenden Abend um 18 Uhr die letzte Prednisolon-Tablette (5 mg) eingenommen worden war. Die Glukosebelastung II fand somit zwei Stunden nach Corticoidentzug, die Glukosebelastung III ca 14 Stunden nach Corticoidentzug statt.

Tab. 12 zeigt, daß die Verabreichung von 30 mg Prednisolon pro Tag, in der beschriebenen Weise, keinen signifikanten Einfluß auf die k_G -Werte, d.h. auf die Glukosetoleranz, hatte, wenn die letzte Prednisolon-Dosis zwei Stunden vor der i.v. Glukosebelastung gegeben wurde (II). Ca. 14 Stunden nach der letzten Prednisolon-Gabe waren die k_G -Werte gegenüber den Ausgangswerten jedoch signifikant erhöht (III). Einige Werte lagen dabei erheblich über dem Normalbereich (Mittelwert mit zweifacher Standardabweichung) der sog. Glucoseassimilationskoeffizienten, der von uns bei einem Normalkollektiv ermittelt wurde und zwischen 1,04 und 2,16

Tab. 12: Wirkung von Prednisolon-Behandlung und -Entzug auf die Glukosetoleranz (k_G -Werte)

TAG	1	4	7
i.v.Glukosebelastung	I	II	III
Prednisolon	kein	bis 2 Std. vor i.v.GB	bis 14 Std. vor i.v.GB
$k_G \pm \sigma$	1.59 \pm 0.58	1.37 \pm 0.30	2.33 \pm 0.65
Signifikanz der mittleren Differenzen	I - II	II - III	. III
p-Werte	> 0.1	< 0.0025	< 0.025

Die Prednisolon-Behandlung ist im Text angegeben, die Durchführung der i.v. Glukosebelastung und die Berechnung der k_G -Werte sind unter METHODEN beschrieben. Mittelwerte der k_G -Werte mit der einfachen Standardabweichung und die Signifikanz (p-Werte) wurden nach (84) berechnet. - In weiteren Versuchen erhielten 12 andere Patienten nach dem im Text beschriebenen Schema Prednisolon. Die Glukosebelastungen II und III wurden bei einigen dieser Patienten in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt, ohne daß eine Änderung des Ergebnisses eintrat. Bei diesen Patienten war die Glukosetoleranz (k_G -Werte) 26 Stunden nach Beendigung einer 9-tägigen Prednisolon-Behandlung wieder normal, d.h. nicht signifikant von den Ausgangswerten verschieden. Erhöhte k_G -Werte wurden auch bei manchen, aber nicht bei allen Patienten 12 - 15 Stunden nach Beendigung einer Langzeitbehandlung (mehrere Wochen bis Monate) mit Prednisolon gefunden.

liegt (80). Eine erhöhte Glukosetoleranz ist ein Zeichen der manifesten oder latenten Nebennierenrindeninsuffizienz (81), wie das dem Kliniker ja schon lange geläufig ist. Wir fanden diese Erhöhung der Glukosetoleranz ca. 14 Stunden

nach Entzug einer über wenige Tage gehenden Prednisolon-Behandlung, also zu einem Zeitpunkt, zu dem keiner der untersuchten Patienten irgendwelche sonstigen Zeichen der Nebenniereninsuffizienz bot. Wir müssen demnach das Ansteigen der Glukosetoleranz als ein Frühzeichen der Nebennierenrindeninsuffizienz auffassen (78, 81). In dieser Auffassung werden wir bestärkt durch Ergebnisse unseres Arbeitskreises (82), die zeigten, daß die fluorimetrisch bestimmten sog. 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma (siehe METHODEN) für ca. 24 Stunden nach Beendigung einer 3-tägigen Behandlung mit 30 mg Prednisolon pro Tag noch supprimiert waren bzw. zu diesem Zeitpunkt wieder anstiegen. Fluorimetrisch werden bekanntlich im wesentlichen die endogenen Corticosteroide erfaßt (74). Die exogenen Corticoide haben eine biologische Halbwertszeit von der Größenordnung weniger Stunden (73), so daß man tatsächlich mit einer latenten Nebennierenrindeninsuffizienz um die 14. Stunde nach Corticoid-Entzug rechnen kann.

Selbstverständlich wird die Glukosetoleranz von einer ganzen Reihe anderer Faktoren wie z.B. vom Insulin beeinflusst. In diesem Zusammenhang seien Untersuchungen erwähnt, die zeigten, daß ACTH beim adrenaletomierten Tier eine Steigerung der Insulinsekretion bewirken und zu Hypoglykämien führen kann (75 - 77).

D I S K U S S I O N

Die klinische Bedeutung der Bestimmung von ACTH-Spiegeln im Plasma aus dem Bulbus cranialis venae jugularis und aus der Vena cubitalis wurde bereits unter ERGEBNISSEN besprochen. Wir haben uns hier noch mit den dynamischen Gesichtspunkten der ACTH-Inkretion zu beschäftigen. Die folgenden Ausführungen sollen weniger als genaue Bestimmungen der biologischen Halbwertszeit und der Inkretionsrate des endogenen ACTH aufgefaßt werden, als vor allem erklären, warum keine Differenzen zwischen den Plasmaspiegeln aus dem Bulbus cran. vae. jug. und aus der V. cubit. bei normaler ACTH-Inkretion zu finden waren. Betrachten wir zunächst die Probleme, die mit der Bestimmung der biologischen Halbwertszeit des ACTH zusammenhängen.

Das Produkt aus Verteilungsvolumen für ACTH (152) und ACTH-Spiegel in mE/l Plasma ergibt die Gesamtmenge an ACTH (mE) im Verteilungsvolumen. Durch Multiplikation mit 0,5 erhält man die Menge an ACTH in mE, die in einer Halbwertszeit eliminiert wird (= Zähler). Diese ACTH-Menge wird im Gleichgewicht pro Halbwertszeit von der Hypophyse ersetzt und verteilt sich auf diejenige Plasmamenge, die in einer HWZ durch das Hirnkreislaufgebiet fließt und als Produkt von HWZ, Hämatokrit und Hirndurchblutungsvolumen (0,8 l Blut pro Min. nach KETY und SCHMIDT (138) und BERNSMEIER und Mitarbeitern (139)) berechnet wird. Die Differenz der ACTH-Spiegel aus Bulbus cran. vae. jugul. und V. cubit. errechnet sich dann nach der Formel:

$$\Delta \text{ ACTH} = \frac{\text{Vol. ACTH} \times \text{ACTH}_{\text{Plasma}} \times 0,5}{\text{HPl} \times \text{HWZ}_{\text{ACTH}}} \left[\frac{1 \times \frac{\text{mE}}{1}}{\frac{1}{\text{Min}} \times \text{Min}} \right]$$

$$\Delta \text{ ACTH} = \frac{27,5 \times 0,5 \times \text{ACTH}_{\text{Plasma}}}{0,44 \times \text{HWZ}_{\text{ACTH}}} \left[\frac{\text{mE}}{1} \right]$$

$$\Delta \text{ACTH} = \frac{31,25 \times \text{ACTH}_{\text{Plasma}}}{\text{HWZ}_{\text{ACTH}}} \left[\frac{\mu\text{E}}{\text{ml}} \right]$$

Dabei ist:

ΔACTH = Zunahme des ACTH-Spiegels im Hirnkreislauf in mikro E pro ml oder mE/l.

Vol_{ACTH} = Verteilungsvolumen für ACTH nach WOLF und Mitarbeitern (152) für $^{131}\text{J}-\beta^{1-24}$ -Corticotropin 43 % des Körpergewichts, also bei 64 kg = ca. 27,5 Liter. (64 kg war das mittlere Körpergewicht der fünf Patienten (Tab.2) mit erhöhten ACTH-Plasmaspiegeln.)

Hkrit. = Hämatokrit = ca. 45 %

$\text{ACTH}_{\text{Plasma}}$ = peripherer Plasmaspiegel an ACTH $\frac{\text{mE}}{\text{l}}$

HPl = Plasmadurchfluß pro Min. durch das Schädelinnere
= Hirndurchblutung $\times \left(\frac{100 - \text{Hkrit}}{100} \right) = 0,8 \times \frac{55}{100}$ l
pro Min. (138, 139)

HWZ_{ACTH} = biologische Halbwertszeit des ACTH in Minuten.

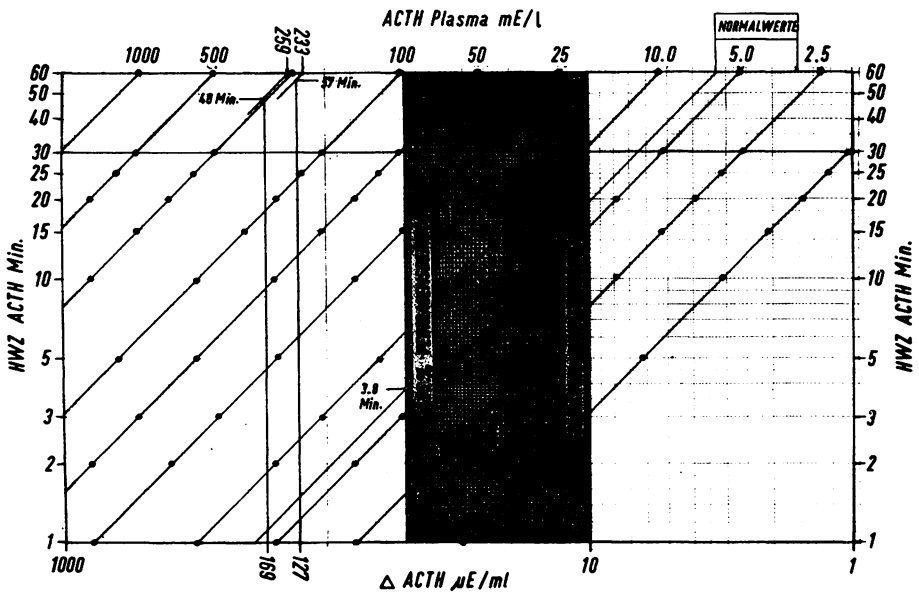
Vorausgesetzt wird, daß der ACTH-Spiegel im Plasma aus der Vena cubitalis repräsentativ für das gesamte Verteilungsvolumen ist. Diese Annahme ist ja Voraussetzung für die Berechnung des fiktiven Verteilungsvolumens durch retrograde Extrapolation aus dem Abfall der Plasmakonzentration des ^{131}J -ACTH (152). Dieses Verteilungsvolumen ist eine rechnerische Größe, die anatomisch nicht ohne weiteres zu definieren ist. Wir haben hier die Angabe von WOLF und Mitarbeitern übernommen, das Verteilungsvolumen für ACTH sei 43 % des Körpergewichts (152), was vielleicht etwas viel erscheint. Für Parathormon wurde allerdings ein ähnliches Verteilungsvolumen angegeben, nämlich 36,4 % des Körpergewichts (151). Selbstverständlich ist das Verteilungsvolumen für ACTH nicht bei jedem Patienten = 27, 5 l. Wir müssen also ferner voraussetzen, daß Vertei-

lungsvolumen für ACTH und Hirndurchblutung in ähnlicher Weise vom Gewicht, bzw. der Körperoberfläche abhängen, um auf eine Korrektur dieses Fehlers verzichten zu können. Schließlich muß man voraussetzen, daß alles ACTH den Schädelinnenraum über die Bulbi craniales vae. jugul. verläßt und sich in der kurzen Zeit bis zur Passage des Bulbus lediglich im Plasma verteilt. Sollte ein ins Gewicht fallender Teil des venösen Blutes aus dem Hypophysenvorderlappen auf anderen Wegen (z.B. Rete venosum foram. oval.) das Schädelinnere verlassen, so würden wir zu lange Halbwertszeiten für endogenes ACTH berechnen. Weitere Voraussetzungen sind, daß der Verteilungsraum von endogenem ACTH gleich dem vom ^{131}J -ACTH ist und die Plasmaspiegel im venösen Blut nach Passage der terminalen Hirnstrombahn nicht höher oder niedriger als z.B. in der Vena cubitalis sind. Treffen alle diese Voraussetzungen zu, was zumindest bei einigen Gegenstand des Zweifels sein kann, so bestünde hier eine Möglichkeit, die Halbwertszeit des endogenen ACTH zu ermitteln (Abb.24).

Wir haben in vollem Bewußtsein der Unsicherheiten dieser Überlegungen aus der bei vier Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (Tab.2) gemessenen mittleren Differenz zwischen Bulbus cranialis venae jugularis und Vena cubitalis eine mittlere Halbwertszeit von 48 Minuten für endogenes ACTH ausgerechnet (Abb.24). Dieser Wert stimmt mit denen der Literatur für exogenes markiertes oder nichtmarkiertes, also biologisch gemessenes ACTH größenordnungsmässig nur z.T. überein, die meisten mitgeteilten Halbwertszeiten waren kürzer (102, 133, 142 - 152). Immerhin fanden PFEIFFER und Mitarbeiter (102) bei Infusion von 25 E artfremden ACTH in 4 Std., unter Verwendung einer biologischen Bestimmungsmethode, welche der unseren ähnlich ist, eine Halbwertszeit von 29 Min. und berichteten ferner, daß die Halbwertszeit von injiziertem ACTH kürzer und dosisabhängig sei. -

Abb. 24: Diagramm zur Ermittlung der biologischen Halbwertszeit von endogenem ACTH aus dem peripheren ACTH-Spiegel und dessen Differenz zum ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis

Die Überlegungen, die zur Anlage dieses Diagramms führten, sind im Text ausgeführt. Setzt man den mittleren pathologischen erhöhten ACTH-Plasma-Spiegel der vier Patienten (B.S., G.J., E.L. und W.F., Tab.2) mit 259 mE/l Plasma (aus der V.cubit.) und die mittlere positive Differenz mit 169 μ E/ml Plasma (im Bulbus c.v.j.) ein ($p < 0,05$), so berechnet sich eine biologische Halbwertszeit von 48 Minuten. - Bei einem "normalen" ACTH-Spiegel von 0,006 mE pro ml Plasma hätten wir eine meßbare Differenz im Bulbus c.v.j. finden müssen, wenn die Halbwertszeit kürzer als 3,8 Minuten wäre.



NELSON und Mitarbeiter (142, 167) berichten, daß die Halbwertszeit für Schweine-ACTH etwas länger als wenige Minuten sei und unterschieden zwischen einer "ersten Phase", die

einer anfänglichen Verteilung des exogenen Corticotropins entsprechen könnte, und einer zweiten Phase des Corticotropin-Schwundes, aus der sich eine etwas längere Halbwertszeit auch für exogenes ACTH ermitteln lasse. - YALOW und Mitarbeiter (133) maßen mit Hilfe der von ihnen angegebenen radioimmunologischen Bestimmungsmethode für ACTH die Geschwindigkeit, mit der sich bei einem adrenaletomierten Patienten mit anfänglich hohen ACTH-Spiegeln nach Cortisol-Applikation ein niedrigerer ACTH-Spiegel einstellte und errechneten unter der Annahme, daß diese Cortisolgabe die ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens schlagartig abstellte, eine Halbwertszeit für ACTH von ca. 10 bis 15 Minuten. - Wir halten die Annahme, daß Cortisol oder, wie bei uns, Dexamethason-Gaben die ACTH-Inkretion des Hypophysenvorderlappens plötzlich und vollständig unterbreche, für sehr anfechtbar. Unterstellt man aber wie YALOW und Mitarbeiter (133) diese Annahme, so sieht man, daß beim Vergleich des Mittelwertes der Plasma-ACTH-Spiegel im Blut aus der Vena cubitalis, welcher bei den fünf von uns untersuchten Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (Tab. 2) 0,233 mE/ml betrug, mit dem Mittelwert der ACTH-Spiegel eine Stunde nach Dexamethasongabe (4 mg), welcher 0,089 mE/ml war, eine biologische Halbwertszeit von ca. 50 Minuten für endogenes ACTH nicht ganz unwahrscheinlich ist. Wir möchten den von uns errechneten Wert von ca. 40 - 50 Minuten dennoch nur als größenordnungsmäßige Abschätzung der Halbwertszeit (86) von endogenem ACTH verstanden wissen.

Gelten für normale, also wesentlich niedrigere ACTH-Spiegel die gleichen Halbwertszeiten wie für erhöhte Spiegel, was nach der Literatur über hohe Dosen von exogenem ACTH fraglich ist (102, 149), so kann es nach Abb. 24 nicht verwundern, daß bei der mangelnden Empfindlichkeit der Bestimmungsmethode für ACTH im Bulbus cranialis venae jugularis keine signifikant höheren Werte als in der Peripherie (Vena cubitalis) gefunden wurden. Es erscheint umgekehrt der Schluß gerechtfertigt, daß die biologische Halbwertszeit

von endogenem ACTH bei normal hohen Spiegel größer als 3,8 Min. sein muß (Abb.24), da wir sonst Differenzen hätten finden müssen.

Wir berechneten bei fünf Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln (B.S., G.J., E.L., M.E., W.P., Tab.2) einen mittleren Plasma-ACTH-Spiegel von 0,233 mE ACTH pro ml Plasma aus der Vena cubitalis. Im Plasma aus dem Bulbus cranialis vae. jugul. waren die ACTH-Spiegel bei diesen Patienten im Mittel um 0,127 mE ACTH pro ml höher ($p < 0,05$). Unter Verwendung der oben beschriebenen Formel errechnet sich unter Annahme einer Hirndurchblutung von 0,8 l pro Min. (138, 139) eine ACTH-Inkretion von ca. 80 E pro Tag. Die naturgemäß wesentlich niedrigere ACTH-Inkretionsrate bei normalen ACTH-Spiegeln (150) können wir, wie ausgeführt, nicht errechnen.

Der Wirkungsmechanismus des ACTH hat schon sehr viele Forscher interessiert. Anatomen, Physiologen, Biochemiker und nicht zuletzt Endokrinologen haben an diesem Thema gearbeitet. Wir wollen im folgenden versuchen, die Gründe für den klinischen Endokrinologen zu verdeutlichen, die ihn über die allgemeine Notwendigkeit, die Erkenntnisse der Grundlagenforschung auf ihre klinische Anwendbarkeit hin im Auge zu behalten, hinaus dazu veranlassen, sich selbst aktiv mit diesen Fragen auseinanderzusetzen.

Welche Möglichkeiten für den Wirkungsmechanismus des ACTH kann man sich theoretisch vorstellen ?

1. Es könnte sein, daß ACTH die Permeabilität der Zellmembran ändert und dieser Effekt zur Entfernung eines Hemmfaktors der Corticosteroidsynthese oder zu gesteigerter Zufuhr eines erforderlichen Substrates führt. HECHTER und Mitarb. haben tatsächlich Permeabilitätsänderungen der Zellmembran unter dem Einfluß von ACTH beobachtet (259). Im Zusammenhang mit dieser Hypothese ist natürlich dem schon seit vielen Jahren bekannten hohen Gehalt der Nebenniere an

Ascorbinsäure immer wieder Beachtung geschenkt worden (288 - 290). Schon eine Minute nach intravenöser Verabfolgung von ACTH steigt der Ascorbinsäuregehalt im Nebennierenvenenblut steil an, während die Corticosteroide etwa 3 Minuten nach der ACTH-Verabfolgung vermehrt ausgeschüttet werden (287). Es hat sich jedoch bisher nicht zeigen lassen, daß Ascorbinsäure der postulierte Hemmfaktor, nach dessen Entfernung die Corticosteroidsynthese beschleunigt ist, wäre. So bewirken wiederholte ACTH-Gaben immer wieder einen Anstieg der Corticosteroidsynthese und -inkretion, ohne daß die Nebenniere, die bei der ersten ACTH-Gabe ausgeschüttete Ascorbinsäure bereits wieder gespeichert hat. Nach Hypophysektomie kommt es innerhalb von Stunden zu einem Absinken der Empfindlichkeit, mit der die Nebenniere auf kleine ACTH-Dosen mit einer Steigerung der Ausschüttung an Corticosteroiden reagiert, während ACTH noch 10 Tage nach der Hypophysektomie eine Steigerung der Ascorbinsäureausschüttung sowie der Durchblutung der Nebennierenrinde bewirkt (119). - STAUDINGER kommt in seiner Übersicht (288) zu dem Schluß, daß die Ascorbinsäure keine Bedeutung für die Steroidhydroxylierungen in der Nebenniere hat und daß die akute ACTH-Reaktion der Nebennierenrinde nicht von der Ascorbinsäurekonzentration abhängig ist. - Es sei noch erwähnt, daß ACTH keineswegs nur die Ausschüttung von Corticosteroiden, sondern auch die Synthese steigert (293, 301, 302). - Es fehlt bisher also der Beweis für den Zusammenhang zwischen Permeabilitätssteigerung durch ACTH und Anstieg der Corticosteroidsynthese.

2. Viel Beachtung ist der Möglichkeit geschenkt worden, daß ACTH in der Nebennierenrindenzelle vermehrt für die Corticosteroidsynthese notwendige Substrate bereitstellt (258, 316). Nachdem bei Perfusionsuntersuchungen gefunden wurde, daß ACTH in erster Linie an der Umwandlung von Cholesterin in Delta-5-Pregnenolon angreift (258), diskutiert man die Möglichkeit, daß z.B. mitochondriales Cholesterin unter der Wirkung von ACTH vermehrt zur Verfügung stehe. Das führt zu der Frage, durch welche Mechanismen

möglicherweise Substrate für die Corticosteroidsynthese vermehrt zur Verfügung stehen könnten.

3. Die verschiedenen Schritte der Synthese der Corticosteroide finden offensichtlich in verschiedenen subzellulären Räumen statt (290, 308, 329). Man kann sich vorstellen, daß ACTH zu Änderungen der Beziehungen zwischen den intrazellulären Räumen führt und auf diese Weise den Austausch von Substraten verbessert und die Corticosteroidsynthese beschleunigt. In diesem Zusammenhang seien elektromikroskopische Befunde, wie eine "Verlängerung" von Mitochondrien und Bläschenbildung des endoplasmatischen Reticulums nach ACTH erwähnt (267).

4. Besondere Aufmerksamkeit hat man der Möglichkeit gewidmet, daß ACTH Cofaktoren, welche für die Corticosteroidsynthese notwendig sind, in vermehrter Menge bereitstellt. Die Hypothese von HAYNES (301, 307), daß ACTH über eine Aktivierung der Phosphorylase, vermittelt durch einen Anstieg von cyclischem Adenosinmonophosphat, den Gehalt an reduziertem Nikotinadeninucleotidphosphat, welches für die Steroidhydroxylierung erforderlich ist, vermehrt, wurde im Ergebnisteil bereits erwähnt. Hier seien noch einmal Befunde, welche gegen diese Hypothese sprechen zusammengestellt. KORITZ und PERON zeigten, daß die Steigerungen der Corticosteroidsynthese durch NADPH und durch ACTH additiv sind (316, 320). Die Oxydation von ^{14}C -Glukose zu $^{14}\text{CO}_2$ wird durch ACTH nicht beeinflußt (317) oder gering gesteigert (318), während bei vermehrtem Anfall von endogenem Glukose-6-Phosphat eher eine Abnahme der $^{14}\text{CO}_2$ Produktion zu erwarten wäre. Während einige Autoren nach ACTH eine Abnahme des Glykogengehaltes der Nebenniere sahen (310), fanden andere Autoren keine Abnahme (293, 318). Nach Hypophysiektomie sinkt die Corticosteronausschüttung bei der Ratte innerhalb von einer halben bis einer Stunde ab, während der Gehalt an reduziertem NADP sich 72 Stunden lang nicht ändert (323, 324). Schließlich wird durch Puromycin die

Steigerung der Corticosteroidsynthese und -ausschüttung durch ACTH und durch cyklisches Adenosinmonophosphat, nicht aber durch NADPH-Zusatz blockiert (293).

5. So bleibt schließlich noch die Möglichkeit zu erwägen, ob ACTH die Aktivität oder den Gehalt an Enzymen, die für die Steroidsynthese notwendig sind, beeinflussen kann. Diese Möglichkeit ergibt sich u.a. aus Beobachtungen, daß ACTH z.B. die 11-Beta-Hydroxylierung z.T. sogar selektiv beschleunigt (313, 328). Es ist auch berichtet worden, daß sich unter ACTH das Verhältnis von Cortisol- zu Corticosteronausschüttung ändern kann (331, 332). Wie erwähnt, ist im Prinzip sowohl die Aktivierung eines Enzyms, als auch seine Neusynthese unter dem Einfluß von ACTH denkbar.

Nach diesen grundsätzlichen Erwägungen über theoretisch denkbare Mechanismen, durch die ACTH die Corticosteroidsynthese beschleunigen könnte, muß man feststellen, daß trotz aller Bemühungen, den Wirkungsmechanismus des ACTH aufzuklären, dieser in wesentlichen Punkten immer noch völlig unklar ist.

Unser besonderes Interesse galt der letzten der erwähnten Möglichkeiten. FERGUSON hatte gezeigt, daß die Blockierung der Neusynthese von Protein durch Puromycin eine Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH verhindert (291 - 294). Dabei schien uns interessant, daß einerseits Puromycin den Transfer von Aminoacylgruppen von Aminoacyl-t-Ribonucleinsäure auf Ribosomen blockiert (251, 252), und andererseits der für die Proteinsynthese im Homogenat von Nebennieren geschwindigkeitsbestimmende Schritt, welcher durch ACTH-Behandlung beschleunigt wird (278, 284), eben dieser Aminoacyltransfer ist. - Bei Blockierung der Ribonucleinsäuresynthese durch Actinomycin ist die Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH interessanterweise nicht blockiert (294).

Hier sei noch eine kurze Bemerkung über zwei wichtige Prinzipien, nach der alle Beobachtungen über Wirkungen und

Wirkungsmechanismen von Hormonen beurteilt werden, eingeschoben. Gemeint sind die Beachtung der zeitlichen Reihenfolge der verschiedenen durch das Hormon ausgelösten Effekte und schließlich der Dosis, durch welche sie ausgelöst werden können. ACTH bewirkt schon wenige Minuten nach intravenöser Verabfolgung eine Steigerung der Corticosteroidausschüttung und -Synthese in der Nebennierenrinde, die man auch schon bei "physiologischen" Dosen sieht. Alle uns bekannten Befunde über Wirkungen des ACTH auf das Gewicht und auf den Gehalt an Protein, Ribonucleinsäure und Desoxyribonucleinsäure der Nebenniere stammen aus Untersuchungen, bei denen hohe, pharmakologische Dosen verwandt wurden. Das geschah häufig absichtlich, um eindeutige Effekte zu erzielen, sollte aber bei Überlegungen über den "physiologischen" Wirkungsmechanismus nicht vergessen werden.

Man sollte ferner an die Möglichkeit denken, daß das ACTH nicht nur eine Primärwirkung, deren Folge alle späteren Veränderungen in der Nebenniere sind, sondern mehrere, unter Umständen voneinander unabhängige, Effekte hat. So wurde in der Literatur auch zwischen Soforteffekten auf die Corticosteroidsynthese und -Ausschüttung und Späteffekten, wie z.B. die "adrenocorticotrophe" Wirkung auf das Gewicht, sowie den Gehalt an Protein, Ribonucleinsäure, Desoxyribonucleinsäure, unterschieden.

Wie im Ergebnisteil näher ausgeführt, kann die von FERGUSON (291 - 293) gegebene Interpretation, die Steigerung der Corticosteroidinkretion durch ACTH sei nur bei erhaltener Proteinsynthese möglich, nur modifiziert aufrecht erhalten werden. Selbst bei vorsichtiger Auslegung der in vitro Versuche mit Inkubation von Nebennierenschnitten muß man feststellen, daß es möglich ist, in vitro die Corticosteroidsynthese zu beschleunigen ohne Zunahme der Aminosäureinkorporation in Protein, bzw. bei Abnahme dieser. Die Möglichkeit, daß ACTH die Synthese eines spezifischen Enzymproteins steigert und auf diesem Wege die Corticosteroidsynthese

steuert, ist durch die Beobachtung nicht ausgeschlossen, daß die Bilanz der Proteinsynthese negativ ist, wie das aus der Minderung des Einbaues radioaktiver Aminosäuren in Protein im in vitro-Versuch zu folgern ist.

Damit erhebt sich die Frage, welche biochemischen Mechanismen für die bei in vivo Verabreichung von ACTH zweifellos zu beobachtende Steigerung der Proteinsynthese zugrunde liegen. ACTH und Nebenniere bieten ein besonders schönes Beispiel für die Untersuchung der "trophen" Wirkung eines Hormons auf sein Zielorgan, dessen Proteinsynthese nur der Erhaltung seiner Struktur bzw. der Anpassung an erhöhte Anforderungen dient und nicht, wie z.B. im Falle der Leber, die Aufgabe hat, Proteine für nicht zelleigene Aufgaben zu synthetisieren. Man kann die Proteinsynthese nicht ohne Beachtung des Nucleinsäurestoffwechsels besprechen. Wenn man sich an die zeitliche Reihenfolge des Auftretens der biochemischen Veränderungen halten will, so muß man zunächst die Ergebnisse von BRANSOM und CHARGAFF (274) erwähnen, die 30 Minuten nach intraperitonealer Injektion von 20 E ACTH eine Beschleunigung der Ribonucleinsäuresynthese sahen. - Die Beschleunigung der Proteinsynthese im Homogenat ist 2 Stunden nach intramusculärer ACTH-Injektion (286) und 4 Stunden nach Infusion eines synthetischen ACTH-Peptides (284) beobachtet worden, wobei in beiden Fällen frühere Zeitpunkte nicht untersucht wurden. Zu diesem Zeitpunkt ist die Beschleunigung der Proteinsynthese im Nebennierenrindenhomogenat ausschließlich auf eine Zunahme der Aktivität eines nicht dialysierbaren Faktors in der löslichen Zellfraktion zu beziehen, welcher den Aminocyltransfer von t-RNS auf Ribosomen beschleunigt (278, 284, 286). Die im Ergebnisteil dargestellte Charakterisierung dieses Faktors - Inaktivierung bei 55°C oder durch Trypsin, Stabilität gegen Ribonuclease, Molekular-Gewicht und Sedimentationskoeffizient, chromatographisches Verhalten auf DEAE-Cellulosesäulen und Proteinnatur - spricht dafür, daß es sich um Aminoacyltransferase handelt. Es ist uns aller-

dings nicht gelungen, in Versuchen, bei denen wir ^{14}C -Leucyl-t-Ribonucleinsäure, die wir mittels Phenol-extraktion und Alkoholfällung präparierten (210, 218), mit mikrosomenhaltiger Zellfraktion von Schweine-nieren inkubierten, den Transfer von ^{14}C -Leucylgruppen direkt zu zeigen, vermutlich weil in diesem Inkubations-ansatz eine sehr schnelle Hydrolyse des Aminoacylribo-nucleinsäureesters ablief. FARESE (286) konnte kürzlich mit genau dieser Versuchsanordnung tatsächlich eine mäßige Beschleunigung des Leucintransfers beobachten.

In den ersten 2 - 4 Stunden nach intramusculärer ACTH-Injektion sinkt nach FARESE (286) die Aktivität der Mikro-somen und der ribosomale RNS-Gehalt leicht ab, um dann ab der 6. Stunde anzusteigen. Zu späteren Zeitpunkten ist dann sowohl die Aktivität, als auch der Ribonucleinsäure-gehalt der Ribosomen gesteigert (281, 282). Diese Steige-rung der mikrosomalen Aktivität scheint auf einer Zunah-me an Polysomen (285) zu beruhen, die man, wie erwähnt, als Polymere der Ribosomen, die an einer Messenger-Ribonucleinsäure zusammengehalten werden, auffaßt. Viel-leicht ist die Spekulation nicht ganz abwegig, daß nach ACTH in der Nebenniere zunächst keine qualitativ anderen Proteine synthetisiert werden müssen, so daß eine Steige-rung des Gehaltes oder der Aktivität an Aminoacyltransferase den Bedürfnissen gerecht wird. Im folgenden kommt es dann, bei länger einwirkenden hohen ACTH-Spiegeln, zur Notwendig-keit auch qualitativ neue Proteine zu synthetisieren, was die Synthese von Messenger-Ribonucleinsäure und die vermeh-rte Bildung von Polysomen erforderlich macht.

Erst nach relativ langdauernder Verabfolgung von ACTH kommt es zu einem chemisch nachweisbaren Anstieg des Desoxy-ribonucleinsäuregehaltes der Nebenniere (268, 269, 271). Man benötigt etwa 5 - 7 Tage intramusculärer ACTH-Behandlung, ehe sich der Desoxyribonucleinsäuregehalt dann allerdings sprunghaft verdoppelt. Der Desoxyribonucleinsäuregehalt eines Gewebes gilt als gutes Maß für die Zahl der vorhandenen Zell-

kerne. Histologische und biochemische Befunde stimmen dahingehend überein, daß das ACTH zunächst eine Hyper-trophie und dann eine Hyperplasie der Nebenniere bewirkt. Dazu passen die Befunde, daß in Adenomen der Nebennierenrinde Desoxyribonucleinsäure erhöht ist (273).- Für die Klinik ist ferner wichtig, daß eine Corticoidtherapie den Ribonucleinsäuregehalt der Nebenniere noch ausgeprägter als das Gewicht der Nebenniere senkt (273). Die Therapie mit Corticoiden bewirkt also zunächst eine funktionelle Suppression der Nebennierenrinde, erkenntlich an der verminderten Corticosteroidausschüttung nach ACTH oder Stress, sodann stellt sich eine "biochemische" Suppression - Absinken des RNS-Gehaltes u.a. - ein, und schließlich kommt es zur morphologischen-strukturellen Atrophie und Gewichtsabnahme der Nebennierenrinde.

Im Kapitel EINLEITUNG und ERGEBNISSE wurde bereits erwähnt, wie lang die Suppression der Corticosteroidproduktion der Nebennierenrinde nach langandauernder endogener oder exogener Erhöhung der Corticosteroid- oder Corticoid-Spiegel im Plasma anhalten kann (67 - 72, 137, 166). Für den Kliniker ist die Suppression der Funktion des Hypophysen-Nebennierenrindensystems unter kurzzeitiger Corticoidtherapie ebenfalls wichtig (67, 68, 81, 82). Wie im Ergebnisteil ausgeführt, läßt sich letztere mittels fluorimetrischer Bestimmung der endogenen Corticosteroidproduktion und in einem Teil der Fälle auch als Erhöhung der Glukosetoleranz bzw. der sog. Glukoseassimilationskoeffizienten erfassen. Zu erhoffende Verbesserungen der endokrinologischen Methoden, insbesondere auch der ACTH-Bestimmung, werden in Zukunft vermutlich weiteres Licht in diese interessanten Zusammenhänge bringen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Eine biologische Bestimmungsmethode für ACTH-Spiegel im menschlichen Plasma wurde geprüft. Gemessen wurde der ACTH-bedingte Anstieg der Corticosteron-Inkretion im Plasma aus der Nebennierenvene der akut hypophysektomierten Ratte. Die Methode wurde insofern modifiziert, als versucht wurde, die Empfindlichkeit durch Infusion der Testlösungen in die Aorta der Ratte zu verbessern und die Genauigkeit durch Berücksichtigung der individuellen ACTH-Empfindlichkeit der hypophysektomierten Ratte zu erhöhen. Die statistische Auswertung der Ergebnisse eines großen Versuchsmaterials, (mehr als 250 Standard-Bestimmungen) zeigt, daß die Empfindlichkeitsschwelle der Methode zwischen 0,01 und 0,015 mE ACTH liegt. Damit sind Normalspiegel im menschlichen Plasma direkt nicht oder nur ungenau zu erfassen. Der Genauigkeitsindex der Methode war mit $\lambda = 0,07$ vergleichsweise recht zufriedenstellend.
2. Es wurde versucht, die diagnostische Brauchbarkeit der Methode dadurch zu verbessern, daß neben peripherem Blut vom Patienten (Vena cubitalis) Blut aus dem Bulbus cranialis venae jugularis untersucht wurde. Im Bulbus cranialis venae jugularis ist das venöse Blut aus dem Hypophysenvorderlappen erst durch ca. 15 % des Herzminutenvolumens verdünnt. Es konnte eine Beziehung zwischen Differenz der ACTH-Spiegel im Blut des Bulbus cranialis venae jugularis und der Vena cubitalis, den Plasmaspiegeln in der Vena cubitalis und der biologischen Halbwertszeit des endogenen ACTH aufgestellt werden. Aus der Tatsache, daß wir bei normalen ACTH-Spiegeln in der Vena cubitalis keine signifikant höheren ACTH-Spiegel im Bulbus cranialis venae jugularis fanden, läßt sich an Hand der Empfindlichkeitsgrenze der Methode schließen, daß die biologische

Halbwertszeit des endogenen ACTH größer als 3,8 Min. sein muß.

3. Klinisch interessante Beobachtungen ließen sich bei Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln machen. Berichtet wird über zwei Addison-Patienten, eine Patientin mit einem adreno-genitalen Syndrom und zwei Patienten mit totaler Adrenalektomie wegen eines Cushing-Syndroms, von denen einer die Zeichen eines ACTH-produzierenden chromophoben Hypophysenvorderlappenadenoms aufwies. Eine Patientin mit einem Cushing-Syndrom mit bilateraler adenomatöser Hyperplasie und ein Patient mit einer sekundären Nebennierenrindeninsuffizienz hatten nicht sicher meßbare ACTH-Spiegel.
4. Aus den Differenzen der ACTH-Spiegel zwischen Bulbus cranialis venae jugularis und Vena cubitalis ließen sich bei der Gruppe der Patienten mit erhöhten ACTH-Spiegeln größenordnungsmäßig eine mittlere biologische Halbwertszeit für endogenes ACTH von 48 Min. und eine mittlere tägliche Inkretionsrate von 80 E ACTH errechnen.
5. Versuche zum biochemischen Mechanismus der Stimulation der Proteinsynthese der Nebenniere durch ACTH zeigten, daß ein hitzelabiler (55°C), nichtdialysierbarer, durch Trypsin, aber nicht durch Ribonuclease inaktivierbarer Faktor mit einem ungefähren Molekulargewicht (vergleichende Dichtegradienten - Zentrifugation) von $1,0 - 1,4 \times 10^5$ (Sedimentationskonstante = S-Wert 6 - 7), der sich bei Anionenaustausch-Chromatographie auf DEAE-Cellulosesäulen wie Leber-Aminoacyltransferase verhielt, für den Einbau von 14-C-Aminosäuren im Nebennierenhomonat geschwindigkeitsbestimmend ist. Weitere Ergebnisse sprechen dafür, daß dieser Faktor Aminoacyltransferase ist. ACTH-Behandlung von Ratten verdoppelt die Aktivität

dieses Faktors in der löslichen Zellfraktion der Rattennebenniere. Die Spezifität dieses Effektes wurde in Versuchen mit synthetischen ACTH-Peptiden überprüft.

6. Eine Beteiligung von Messenger-Ribonucleinsäure an der gesteigerten Proteinsynthese im Homogenat konnte dagegen direkt nicht gezeigt werden. Der Einbau von 14-C-Glycin in Protein durch Polysomen aus Schweinenebennieren, welche bekanntlich als mit einem Molekül mRNS zusammengehaltene Polymere von Ribosomen aufgefaßt werden, wird bei Zusatz von Aminoacyltransferase aus Schweinenebennieren linear zur zugesetzten Menge stimuliert.

7. Versuche über die Beziehungen der Corticosteroid- und Proteinsynthese in der Nebenniere unter dem Einfluß von ACTH sprechen gegen eine obligate Beteiligung der als Einbau von 14-C-Aminosäuren faßbaren Summe von Proteinsynthese und -abbau an der Steigerung der Corticosteroidsynthese durch ACTH. So läßt sich bei in vitro Inkubationen von Rattennebennieren-Vierteln mit ACTH die Corticosteroidsynthese stimulieren, bei gleichzeitiger Abnahme der 14-C-Aminosäure-Inkorporation in Protein. 30 Stunden nach Hypophysektomie ist die Proteinsynthese durch den Stress der Operation noch stimuliert bzw. die Aminoacyltransferase-Aktivität durch ACTH nicht zu steigern, während die Corticosteroid-Inkretion schon längst abgefallen ist. 14 Tage nach Hypophysektomie ist die Aminoacyltransferase-Aktivität durch ACTH-Infusionen zu verdoppeln, während die Corticosteroid-Inkretion gegen ACTH refraktär ist. Die Dissoziierbarkeit der Effekte spricht u.E. gegen eine unmittelbare kausale Verknüpfung von Corticosteroid- und Proteinsynthese, obwohl natürlich die Synthese eines spezifischen für die Corticosteroidsynthese erforderlichen Enzymproteins in der negativen Bilanz der Proteinsynthese nicht erkennbar sein muß. Ein "primärer" ACTH-Effekt, der allen anderen

bisher bekannten Effekten kausal übergeordnet wäre, ist noch nicht bekannt.

8. Während eine langdauernde Corticoidtherapie oder die Hypophysektomie zu einer strukturellen Atrophie der Nebennierenrinde mit länger anhaltender Resistenz der Corticosteroid-Inkretion gegen ACTH führen, bewirkt eine Kurzzeit-Behandlung mit Corticoiden bei Patienten nur eine flüchtige funktionelle Suppression der Nebennierenrinde. Nach dem Absetzen dieser Behandlung persistiert die Senkung der fluorimetrisch meßbaren endogenen Corticosteroid-Inkretion für etwa 24 Stunden. Parallel dazu wird vorübergehend eine erhöhte Glukosetoleranz bei der i.v. Glukosebelastung erkennbar, die als Ausdruck einer latenten Nebennierenrindeninsuffizienz interpretiert wird.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

E I N T E I L U N G :

REGULATION DER ACTH-INKRETION	: Nr. 1 - 24 und 64 - 86
WIRKUNGSMECHANISMUS ANDERER HORMONE	: Nr. 25 - 63
(Übersichten)	: Nr. 25 - 31
ACTH-BESTIMMUNG : METHODEN UND KLINIK	: Nr. 101 - 183
(Übersichten)	: Nr. 101 - 103
SONSTIGE METHODEN	: Nr. 184 - 200
BIOCHEMIE DER PROTEINSYNTHESE	: Nr. 201 - 257
(Übersichten)	: Nr. 201 - 210
WIRKUNGSMECHANISMUS DES ACTH	: Nr. 258 - 332
(Übersichten)	: Nr. 258 - 262

1. WIENER, N.: Cybernetics, J.Wiley, New York, N.Y.(1948)
2. HOLZER, H.: Intrazelluläre Regulation des Stoffwechsels, Naturwissensch. 50, 260 (1963)
3. HARRIS, G.W.: Entwicklung und heutiger Stand der Neuroendokrinologie, Dt. med. Wschr. 90, 61 (1965)
4. GUILLEMIN, R.: Biochemie und Physiologie der hypothalamischen Hormone, Referat. Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 71, 61 (1965)
5. McSHAN, W.H. and M.W. HARTLEY: Production, storage and release of anterior pituitary hormones, Ergebn. Physiol. 56, 246 (1965)
6. SAFFRAN, M., A.V. SCHALLY and B.G. BENFEY: Stimulation of the release of ACTH from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor, Endocrinology 57, 439 (1955)
7. GUILLEMIN, R., W.E. DEAR, B. NICHOLS and H.S. LIPSCOMB: ACTH releasing activity in vivo of a CRF preparation and of lysine vasopressin, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 107 (1959)
8. SCHALLY, A.V., H.S. LIPSCOMB and R. GUILLEMIN: Isolation and amino acid sequence of (α_2 - CRF) from hog pituitary glands, Endocrinology: 71, 164 (1962)
9. VERNIKOS - DANELLIS, J.: Effect of rat median eminence extracts on pituitary ACTH content in normal and adrenalectomized rats, Endocrinology 76, 240 (1965)
10. ders.: Effect of stress, adrenalectomy, hypophysectomy and hydrocortisone on the corticotropin-releasing activity of rat median eminence, Endocrinology 76, 122 (1965)
11. SAKIZ, E. and R. GUILLEMIN: Inverse effects of purified hypothalamic TRF on the acute secretion of TSH and ACTH, Endocrinology: 77, 797 (1965)

12. KENNEDY, G.C. and R.A. PARKER: Permanent isolation of the adenohipophysis from hypothalamic control in rats with diabetes insipidus, J. Endocrinology: 30, 377 (1964)
13. KENDALL, J.W., C. ALLEN and M.A. GREER : ACTH secretion in midbrain-transected rats. Endocrinology: 77, 1091 (1965)
14. BRODISH, A.: Delayed secretion of ACTH in rats with hypothalamic lesions, Endocrinology: 74, 28 (1964)
15. CORBIN, A., G. MANGILI, M. MOTTA and L. MARTINI: Effect of hypothalamic and mesencephalic steroid implantation on ACTH feedback mechanisms , Endocrinology: 76, 811 (1965)
16. ADAMS, J.H., P.M. DANIEL and M.M.L. PRICHARD: Distribution of hypophysial portal blood in the anterior lobe of the pituitary gland, Endocrinology: 75, 120 (1964)
17. LANDEN, J., V.H.T. JAMES and D.J. STOKER: Plasma-cortisol response to lysine-vasopressin. Comparison with ether tests of human pituitary adrenocortical function. Lancet, 1156 (1965) II
18. CLAYTON, G.W., L. LIBRIK, R.I. GARDNER and R. GUILLEMIN: Studies on the circadian rhythm of pituitary ACTH release in man. J. clin. Endocrinol. 23, 975 (1963)
19. CLAYTON, G.W., L. LIBRIK, A. HORAN and L. SUSSMANN: Effect of corticosteroid administration on vasopressin-induced adrenocorticotropin release in man. J. clin. Endocrinol. 25, 1156 (1965)
20. DAVIDSON, J.M., I. CHOWERS and S. FELDMAN: ACTH secretion in rats with intracerebral hydrocortisone implants. Fed. Proc. 22, No. 2455 (1963)
21. SUSSMAN, L., L. LIBRIK and G.W. CLAYTON: Effect of prior ACTH administration on ACTH release in man. Metabolism 14, 583 (1965)
22. MOTTA, M., G. MANGILI and L. MARTINI: A short feedback loop in the control of ACTH secretion. Endocrinology 77, 392 (1965)
23. KRACHT, J., U. HACHMEISTER, H. J. BREDDSTEDT and K. FISCHER: Immunohistological studies on the pituitary ACTH production sites using anti- β 1-24 corticotropine. Acta Endocrinol. Suppl. 100, 36 (1965)
24. SIPERSTEIN, E.R. and V.F. ALLISON: Fine structure of the cells responsible for secretion of adrenocorticotrophin in the adrenalectomized rat. Endocrinology: 76, 70 (1965)
25. KARLSON, P.: Biochemische Wirkungsweise der Hormone. Dt. med. Wschr. 86, 668 (1961)

26. KORNER, A.: Action of hormones at the cellular level. The effect of growth hormone on protein synthesis, in "Protein Metabolism", Hrsrg. F. Gross, Ciba Symposium Leyden, 1962, Springer (1962)
27. SEGAL, S.: Hormones, amino acid transport and protein synthesis. Nature 203, 17 (1964)
28. KIDSON, C. and K.S. KIRBY: Selective alterations of mammalian messenger RNA synthesis: Evidence for differential action of hormones on gene transcription. Nature 203, 599 (1964)
29. KÖRNER, A.: Hormonal control of protein biosynthesis. Acta Endocrinol. Suppl. 100, 20 (1965)
30. SEKERIS, C. E.: Neuere Ergebnisse zum Wirkungsmechanismus von Nebennierenrindenhormonen. Dt. med. Wschr. 90, 1727 (1965)
31. DREWS, J. und A. WACKER: Zum Wirkungsmechanismus der Steroidhormone. Dt. med. Wschr. 91, 178 (1966)
32. BUTENANDT, A., H. GÜNTHER und F. TURBA: Zur primären Stoffwechselwirkung des Testosterons. Z. Physiol. Chemie 322, 28 (1960)
33. LIAO, S. and H.G. WILLIAMS-ASHMAN: An effect of testosterone on amino acid incorporation by prostatic ribonucleo-protein particles. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1956 (1962)
34. KOBLET, H. und G. RIVA: Beschleunigung der Aminosäureninkorporation in Zellkernweiße durch Androgene. Schweiz. med. Wschr. 93, 1811 (1963)
35. LIAO, S.: Influence of testosterone on template activity of prostatic ribonucleic acids. J. biol. Chem. 240, 1236 (1965)
36. LIAO, S., K.R. LEININGER, D. SAGHER and R.W. BARTON: Rapid effect of testosterone on ribonucleic acid polymerase activity of rat ventral prostate. Endocrinology, 77, 763 (1965)
37. MUELLER, G.C.: Some biochemical studies on the mechanism of action of estrogens. Cancer 10, 716 (1957)
38. MUELLER, G.C., J. GORSKI and Y. AIZAWA: The role of protein synthesis in early estrogen action. Proc. Nat. Acad. Sci. 47, 164 (1964)
39. HAMILTON, T.H.: Isotopic studies on estrogen-induced accelerations of RNA and protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 373 (1963)
40. WILSON, J.D.: Influence of estradiol administration on protein synthesis in homogenates of hen oviduct. Biochem. Biophys. Res. Commun. 8, 175 (1962)

41. SCHMIDT, H.,
H. WALTHER and
K.D. VOIGT: The influence of estradiol on the nucleic acid, protein and enzyme activity content of the rat uterus. *Acta Endocrinol. Suppl.* 100, 126 (1965)
42. GOLDSTEIN, L.,
E.J. STELLA and
W.F. KNOX: The effect of hydrocortisone on tyrosine- α -ketoglutarate transaminase and tryptophan pyrrolase activities in the perfused rat liver. *J. biol. Chem.* 237, 1723 (1962)
43. HÜBENER, H.J.: Die physiologische Funktion der NNR-Hormone als Enzyminduktoren. *Dt. med. Wschr.* 87, 438 (1962)
44. HENNING, H.V.,
I. SEIFFERT und
W. SEUBERT: Cortisol-induzierter Anstieg der Pyruvat-carboxylaseaktivität in der Rattenleber. *Biochim. Biophys. Acta* 77, 345 (1963)
45. LANG, N. und
C.E. SEKERIS: Zum Wirkungsmechanismus der Hormone III. Einfluß von Cortisol auf den Ribonuclein-säure- und Proteinstoffwechsel in Rattenleber. *Zschr. Physiol. Chem.* 339, 238 (1964)
46. SCHMID, W.,
P.P. DUKES und
C.E. SEKERIS: Einfluß von Steroid-Hormonen auf die RNS-Synthese in isolierten Zell-Kernen. *Z. Klin. Chem.* 3, 211 (1965)
47. SEUBERT, W. und
W. PRINZ: Zur Rolle des Acetyl-CoA als Regulator der Gluconeogenese. *Z.Klin. Chem.* 3, 210 (1965)
48. SOKOLOFF, C.,
P.L. CAMPBELL,
C.M. FRANCIS and
C.B. KLEE: Thyroxine stimulation of amino acid incorporation into ribosomal protein. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 329 (1963)
49. SOKOLOFF, C.,
S. KAUFMANN,
P.L. CAMPBELL,
C.M. FRANCIS and
H.V. GELBOIN: Thyroxine stimulation of amino acid incorporation into protein. Localisation of the stimulated step. *J. biol. Chem.* 238, 1432 (1963)
50. SOKOLOFF, C.,
C.M. FRANCIS and
P.L. CAMPBELL: Thyroxine stimulation of amino acid incorporation into protein independent of any action on messenger RNA synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 52, 728 (1964)
51. SELLINGER, O.Z.
and K.L. LEE: The induction of mitochondrial α -glycerophosphate-DH by thyroid hormone: Evidence for enzyme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 91, 183 (1964)
52. LEE, Y.F. and
H.A. LARDY: Influence of thyroid hormones on L- α -glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J. biol. Chem.* 240, 1427 (1965)

53. TISHLER, P.V. and S.H. INGBAR: Correlative effects of puromycin on ¹³¹I metabolism and amino acid incorporation by calf thyroid slices. *Endocrinology*, 76, 295 (1965)
- 53a. RUEGAMER, W.R., G.H. NEWMAN, D.A. RICHERT and W.W. WESTERFIELD: Specificity of the α -glycerophosphate dehydrogenase and malic enzyme response to thyroxine. *Endocrinology*, 77, 707 (1965)
54. WESTERFIELD, W.W., D.A. RICHERT and W.R. RUEGAMER: New assay procedure for thyroxine analogs. *Endocrinology*, 77, 802 (1965)
55. KRAHL, M.E.: Incorporation of ¹⁴C-amino acid precursors into adipose tissue protein. An insulin stimulation not involving glucose or amino acid transport. *Biochim. Biophys. Acta* 35, 556 (1959)
56. MANCHESTER, K.L. and I.G. WOOL: Insulin and incorporation of amino acids into protein of muscle. *Biochem. J.* 89, 202 (1963)
57. CARLIN, H. and O. HECHTER: Insulin action and protein synthesis in diaphragm muscle. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 115, 127 (1964)
58. WOOL, I.G.: Effect of insulin on accumulation of radioactivity from amino acids by isolated rat diaphragm. *Nature* 202, 196 (1964)
59. FRITZ, G.R. and E. KNOBIL: Amino acid transport and protein synthesis in muscle. Action of insulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116, 873 (1964)
60. WEBER, G., N.B. STAMM and E.A. FISHER: Insulin: inducer of pyruvate kinase. *Science* 149, 65 (1965)
61. KORNER, A.: Effect of hypophysectomy on the ability of rat liver microsomes in a cell-free system to incorporate radioactive amino-acids into their proteins. *Nature* 181, 422 (1958)
62. KOSTYO, J.L.: Separation of the effects of growth hormone on muscle amino acid transport and protein synthesis. *Endocrinology*, 75, 113 (1964)
63. KORNER, A.: Regulation of the rate of synthesis of messenger ribonucleic acid by growth hormone. *Biochem. J.* 92, 449 (1964)
64. CREEK, R.O.: Effect of thyrotropin on the weight, protein, ribonucleic acid and the radio-active phosphorus uptake of chick thyroids. *Endocrinology*, 76, 1124 (1965)

65. EGDAHL, R.H.: The acute effects of steroid administration on pituitary adrenal secretion in the dog. *J. clin. Invest.* 43, 2178 (1964)
66. BIERICH, J.R., D.SCHÖNBERG und E. ECKLER: Untersuchungen zur Dynamik des Hypophysen-Nebennierenrindensystems. *Dt. med. Wschr.* 87, 8 u. 84 (1962)
67. RAIMONDO, V.C.D., and P.H.FORSHAM: Pharmacophysiologic principles in the use of corticoids and adrenocorticotropin. *Metabolism*, 7, 5 (1958)
68. NICHOLS, T., C.A. NUGENT and F.H. TYLER: Diurnal variation in suppression of adrenal function by glucocorticoids. *J.Clin.Endocrinol.* 25, 343 (1965)
69. JANCHES, M., U.GOLDBERG, L.SEGAL, L. JAIMOVICH, P.CATOGGIO and F.A.de la BALZE: Use of Methopyrapone (SU-4885) in the study of pituitary-adrenal response in patients under corticosteroid treatment. *J.Clin.Endocrinol.* 25, 534 (1965)
70. LANDON, J., V.WYNN, V.H.T. JAMES and J.B.WOOD: Adrenal response to infused corticotropin in subjects receiving glucocorticoids. *J.Clin.Endocrinol.* 25, 602 (1965)
71. DANOWSKI, T.S., J.V.BONESSI, G. SABEH, R.D. SUTTON, M.W. WEBSTER and M.E. SARVER: Probabilities of pituitary-adrenal responsiveness after steroid therapy. *Ann. Int. Med.* 61, 11 (1964)
72. GRABER, A.L., R.L. NEY, W.E. NICHOLSON, D.P. ISLAND and G.W. LIDDLE: Natural history of pituitary-adrenal recovery following long-term suppression with corticosteroids. *J.Clin.Endocrinol.* 25, 11 (1965)
73. RAITH, L. und H.J. KARL: Biologische Halbwertszeit, Abbau und Ausscheidung von 16-Methylenprednisolon. *Klin. Wschr.* 44, 298 (1966)
74. VOGEL, H.G.: Intensität und Dauer der Wirkung von 6 α -Methylprednisolon und seinen Estern an der Ratte. *Acta Endocrinol.* 50, 621 (1965)
75. GENUTH, S., and H.E. LEOVITZ: Stimulation of insulin release by corticotropin. *Endocrinology* 76, 1093 (1965)
76. LOVE, T.A., K.E. SUSSMANN and R.F. TIMMER: The effect of adrenocorticotrophic hormone on plasma insulin and blood glucose in the adrenalectomized rat. *Metabolism*, 14, 632 (1965)
77. WOEBER, K.A. and R.ARKY: Hypoglycaemia as the result of isolated corticotrophin-deficiency. *British Med. J.* 857 (1965)

78. CONARD, V.: Mesure de l'assimilation du glucose. Bases théoriques et application clinique. Acta Gastro-Enterol. Belg. 18, 803 (1955)
79. SCRIBA, P.C. und K. SCHWARZ: Zur Früherfassung einer latenten diabetischen Stoffwechsellaage. Mchn. Med. Wschr. 106, 1522 (1964)
80. SCRIBA, P.C. K. SCHWARZ und G.G. HOFMANN: Vergleich klinischer Methoden zur Erfassung des latenten Diabetes mellitus. Dt. med. Wschr. 91, 753 (1966)
81. SCHWARZ, K., P.C. SCRIBA und G.G. HOFMANN: Die Intravenöse Glucose Belastung und die Erfassung einer latenten Nebennierenrindeninsuffizienz während und nach Corticosteroidtherapie. Verh. Dt.Ges. Inn. Med. 71, 360 (1965)
82. HOCHHEUSER, W., M.MÜLLER-BARDORFF, P.G. SCRIBA und K. SCHWARZ: Fluorimetrische Bestimmung der 11-Hydroxycorticosteroide im Plasma unter der Therapie mit Corticoiden. 12. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol., Wiesbaden, Springer, (1966) im Druck
83. HOFMANN, K.: Synthetic pituitary hormones. Rec. Progr. Horm. Res. 18, 41 (1962)
84. DIEM, K.: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen. 6.Auflage, J.R. Geigy, S.A., Basel 1960
85. GADDUM, J.H.: Bioassay and mathematics. Pharmacolog. Rev. 2, 87 (1953)
86. WILBRANDT, W.: Die biologische Halbwertszeit von Medikamenten, ihre Ermittlung und Bedeutung. Schwz. med. Wschr. 94, 737 (1964)
101. LIDDLE, G.W., D. ISLAND and C.K. MEADOR: Normal and abnormal regulation of corticotropin secretion in man. Rec. Progr. Horm. Res. 18, 125 (1962)
102. PFEIFFER, E.F., F. GARMENDIA, E. VAUBEL und K. RETIENE: Exogene und endogene ACTH-Aktivitäten im nativen Plasma des Menschen. Erg. Inn. Med., N.F. 20, 127 (1963)
103. HEDNER, P.: Adrenocortical activity studied by determining plasma corticosteroids. Acta Endocrin. Suppl. 86, (1963)
104. FREUD, J.: Die Hypophysektomie. in "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden", Hrg. E.ABDERHALDEN, Abt.V, Teil 3B II S.1442, Urban und Schwarzenberg, Berlin (1938)
105. SYDNOR, K.L. and G. SAYERS: Blood and pituitary ACTH in intact and adrenalectomized rats after stress. Endocrinology, 55, 621 (1954)

106. LIPSCOMB, H.S. and A sensitive biologic assay for ACTH.
D.H. NELSON: Endocrinology, 71, 13 (1962)
107. GIRARD, F. and Modification of the Lipscomb-Nelson
V.K. VANCE: bio-assay for ACTH.
Endocrinology, 71, 325 (1962)
108. VANCE, V.K., ACTH in human plasma.
W.J. REDDY, J. clin. Invest. 41, 20 (1962)
D.H. NELSON and
G.W. THORN:
109. NEY, R.L., Correlation of plasma ACTH concentration
N. SHIMIZU, with adrenocortical response in normal
W.E. NICHOLSON, human subjects, surgical patients, and
D.P. ISLAND and patients with Cushing's disease.
G.W. LIDDLE: J. clin. Invest. 42, 1669 (1963)
110. WILLIAMS, W.L., Blood corticotropin (ACTH) levels in
D. ISLAND, Cushing's disease.
R.A.A. OLDFIELD, J. clin. Endocrin. 21, 426 (1961)
and G.W. LIDDLE:
111. DAVIES, B.M.A.: Blood corticotrophin in normal adults
and in patients with Cushing's syndrome.
Acta Endocrin. 45, 55 (1964)
112. PFEIFFER, E.F., ACTH-Bestimmung mittels Messung des
W.E. VAUBEL, Plasma-Corticosterons der mit Dexamethason
K. RETIENE, D.BERG hypophysenblockierten Ratte.
und H. DITSCHUNEIT: Klin. Wschr. 38, 980 (1960)
113. RETIENE, K., Corticotropin-Bestimmung anhand des
H. DITSCHUNEIT, Corticosteron Anstieges in Nebennieren-
M. FISCHER, K.KOPP venenblut hypophysektomierter Ratten.
und E.F. PFEIFFER: Vergleich von Dexamethasonblockade und
Hypophysektomie.
Acta Endocrin. 41, 24 (1962)
114. PURVES, H.D. and Assay of corticotrophin in dexamethasone-
N.E. SIRETT: treated rats.
Endocrinology, 77, 366 (1965)
- 114a. RETIENE, K., Über das Verhalten von ACTH und Cortisol
A. ESPINOZA, im Blut von Normalen und von Kranken mit
K.H. MARX und primärer und sekundärer Störung der
E.F. PFEIFFER: Nebennierenrindenfunktion.
Klin. Wschr. 43, 205 (1965)
115. OHSAWA, N.: Effect of administration of ACTH on
adrenal responsiveness of hypophysectomized
rats. Endocrinology, 77, 461 (1965)
116. HARRISON, R.G. The adrenal circulation.
and M.J. HOEY: Blackwell Scientif. Public. Oxford (1960)
117. URQUHART, J.: Adrenal blood flow and the adrenocortical
response to corticotropin.
Amer. J. Physiol. 209, 1162 (1965)

118. PORTER, J.C. and M.S.KLAIBER: Corticosterone secretion in rats as a function of ACTH input and adrenal blood flow.
Amer. J. Physiol. 209, 811 (1965)
119. STAEHELIN, M., P. BARTHE and P.A. DESAULLES: On the mechanism of the adrenal gland response to adrenocorticotrophic hormone in hypophysectomized rats.
Acta Endocrin. 50, 55 (1965)
120. STARK, E., B.VARGA, Z.ACS and M.PAPP: Adrenal blood flow response to adrenocorticotrophic hormone and other stimuli in the dog.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 285, 296 (1965)
121. BUSH, I.E.: Species differences in adrenocortical secretion.
J. Endocrin. 9, 95 (1953)
122. ZENKER, N. and D.E. BERNSTEIN: The estimation of small amounts of corticosterone in rat plasma.
J. biol. Chem. 231, 695 (1958)
123. MUNSON, P.L. and W. TOEPEL: Detections of minute amounts of adrenocorticotrophic hormone by the effect on adrenal venous ascorbic acid.
Endocrinology, 63, 785 (1958)
124. SCHULER, W., B. SCHÄR und P. DESAULLES: Zur Pharmakologie eines ACTH-wirksamen, vollsynthetischen Polypeptids des β 1-24-Corticotropins, Giba 30920-Ba, Synacthen.
Schweiz. Med. Wschr. 93, 1027 (1963)
125. SCHWYZER, R. und H.KAPPELER: Synthese eines Tetracosapeptides mit hoher corticotroper Wirksamkeit: β 1-24-Corticotropin.
Helvetica Chim. Acta. 46, 1550 (1963)
126. SCHWYZER, R. und P. SIEBER: Total Synthesis of adrenocorticotrophic hormone.
Nature 199, 172 (1963)
127. BARTHE, P., P.A. DESAULLES, B. SCHÄR and M. STAEHELIN: Biological activity of synthetic β -corticotropin.
Nature 202, 908 (1964)
128. KARL, H.J.: Adrenocorticotrope Wirkung eines vollsynthetischen Tetracosapeptides - β 1-24 Corticotrophin - beim Menschen.
Klin. Wschr. 41, 633 (1963)
129. WIEBEL, J. und J.R. BIERICH: Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit eines synthetischen Corticotropins β 1-24.
Dt. Med. Wschr. 90, 1133 (1965)
130. RERUP, C.: The bioassay of corticotrophin A. With special regard to the effect after subcutaneous administration.
Acta Endocrin. Suppl. 42 (1958)

131. REDGATE, E.S.,
N.O. OHSAWA, J. BUTTE
and C.K. PHEBUS: Sources of error in the bio-assay of
ACTH in the rat.
Endocrinology, 78, 644 (1966)
132. GUILLEMIN, R.,
C. FORTIER and
H.S. LIPSCOMB: Comparison of in vitro and in vivo assay-
ing procedures for rat adenohipophyseal
corticotrophin.
Endocrinology, 64, 310 (1959)
133. YALOW, R.S.,
S.M. GLICK, J. ROTH
and S.A. BERSON: Radioimmunoassay of human plasma ACTH.
J. clin. Endocrin. 24, 1219 (1964)
134. FELBER, J.P.,
A.J. MOODY,
A. VILLANUEVA et
A. VANOTTI: Determination radio-immunologique der
l'insuline et de l'ACTH en clinique.
Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 21,
261 (1965)
135. IMURA, H.,
L.L. SPARKS,
G.M. GRODSKY and
P.H. FORSHAM: Immunologic studies of adrenocorticotropic
hormone (ACTH). Dissociation of biologic
and immunologic activities.
J. clin. Endocrin. 25, 1361 (1965)
136. GALICICH, J.H.,
F. HALBERG,
L.A. FRENCH and
F. UNGAR: Effect of cerebral ablation on a
circadian pituitary adrenocorticotropic
rhythm in C mice.
Endocrinology, 76, 895 (1965)
137. GRABER, A.L.,
J.R. GIVENS,
W.E. NICHOLSON,
D.P. ISLAND and
G.W. LIDDLE: Persistence of diurnal rhythmicity in
plasma ACTH concentrations in cortisol-
deficient patients.
J. clin. Endocrinol. 25, 804 (1965)
138. KETY, S.S. and
C.F. SCHMIDT: The nitrous oxide method for the
quantitative determination of cerebral
blood flow in man: Theory, procedure and
normal values.
J. clin. Invest. 27, 476 (1948)
139. BERNSMEIER, A.,
U. GOTTSTEIN und
W. RUDOLPH: Herzkrankheiten als Ursache zerebraler
Zirkulationsstörungen.
Dt. med. Wschr. 87, 16 (1962)
140. ANDERSON, E.: The hypothalamus and adrenocorticotrophic
hormone release. in "The adrenal cortex",
Ed. H. D. Moon, P. B. Hoeber Inc.,
N.Y. (1961), 189.
141. v. LANZ, T. und
W. WACHSMUTH: Praktische Anatomie. Bd. I, 2.
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-
Heidelberg (1955), 31.
142. MEAKIN, J.W.,
J.E. BETHUNE,
R.H. DESPOINTEs
and D.H. NELSON: The rate of disappearance of ACTH
activity from the blood of humans.
J. clin. Endocrinol. 19, 1491 (1959)
143. MEAKIN, J.W.,
W.H. TINGEY and
D.H. NELSON: The catabolism of ACTH:
Stability in blood, plasma, serum, saline.
Endocrinology, 66, 59 (1960)

144. MEAKIN, J.W. and D.H. NELSON: The Catabolism of ACTH: Some characteristics of an ACTH inactivating system in plasma. *Endocrinology*, 66, 73 (1960)
145. RICHARDS, J.B. and SAYERS, G.: Fate and excretion of adrenocorticotropic hormone. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.* 77, 87 (1951)
146. van DYKE, D.C., M.E. SIMPSON, C.H. LI and S.M. EVANS: Survival in the circulation of the growth and adrenocorticotropic hormone as evidenced by parabiosis. *Amer. J. Physiol.* 163, 297 (1950)
147. GREENSPAN, F.S., C.H. LI and H.M. EVANS: Disappearance rate of ACTH from rat's plasma after i. v. injection. *Endocrinology*, 46, 261 (1950)
148. SYDNOR, K.L. and G. SAYERS: Biological half-life of endogenous ACTH. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 729 (1953)
149. RETIENE, K., M. FISCHER, H. DITSCHUNEIT und E.F. PFEIFFER: Biologische Halbwertszeit von exogenem ACTH im menschlichen Blut. 9.Sympos. Dt. Ges. Endocrinol. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)
150. PORTER, J.C. and M.S. KLAIBER: Relationship of input of ACTH to secretion of corticosterone in rats. *Amer. J. Physiol* 207, 789 (1964)
151. MELICK, R.A., G.D. AURBACH and J.T. POTTS: Distribution and half-life of 131-I-labeled parathyroid hormone in the rat. *Endocrinology*, 77, 198 (1965)
152. WOLF, R.L., M. MENDLOWITZ, L.J. SOFFERS, J. ROBOZ and S.E. GILTOW: Metabolism of corticotropin in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 119, 244 (1965)
153. LITTLE, G.W., D.P. ISLAND, E.M. LANCE and A.D. HARRIS: Alterations of adrenal steroid patterns in man resulting from treatment with a chemical inhibitor of 11 β -hydroxylation (SU 4885) *J. clin. Endocrinol.* 18, 906 (1958)
154. GARMEDIA, F., W.E. VAUBEL and E.F. PFEIFFER: Über das Verhalten der endogenen ACTH Aktivität im menschlichen Plasma nach enzymatischer Blockade der Cortisol Synthese mit Metopiron (SU 4885) *Klin. Wschr.* 41, 317 (1963)
155. CUSHMAN, P., C.D. WESTERMANN, W.J. ATHOS and J.G. HILTON: Increased plasma ACTH-like activity following methypirapone administration in the dog. *Endocrinology*, 73, 529 (1963)

156. MARGUTH, F.: Differentialdiagnostik der Geschwülste im Bereich des Türkensattels
Dt. med. Wschr. 89, 1839 (1964)
157. BATES, R.W., S. MILKOVIC and M.M. GARRISON: Effects of prolactin, growth hormone and ACTH, alone and in combination, upon organ weights and adrenal function in normal rats.
Endocrinology, 74, 714 (1964)
158. MAUTALEN, C.A. and R.C. MELLINGER: Nonsuppressible adrenocortical function in a patient with untreated acromegaly.
J. clin. Endocrin. 25, 1423 (1965)
159. NELSON, D.H., J.W. MEAKIN, J.B. DEALY, D.D. MATSON, K. EMERSON and G.W. THORN: ACTH-producing tumor of the pituitary gland.
New England J. Med. 259, 161 (1958)
160. NELSON, D.H., J.W. MEAKIN and G.W. THORN: ACTH-producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing's syndrome.
Ann. Intern Med. 52, 560 (1960)
161. LIDDLE, G.W.: Test of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's syndrome.
J. clin. Endocrinol. 20, 1539 (1960)
162. DRUCKER, W.D., M.S. ROGINSKY and N.P. CHRISTY: Persistence of abnormal pituitary-adrenal relationship in patients with Cushing's disease partially corrected by bilateral subtotal adrenalectomy.
Am. J. Med. 38, 522 (1965)
163. VAGNUCCI, A.I., M.E. HESSER, G.P. KOZAK, G.L. PAUK, D.P. LAULER and G.W. THORN: Circadian cycle of urinary cortisol in healthy subjects and in Cushing's syndrome.
J. clin. Endocrinol. 25, 1331 (1965)
164. RETIENE, K., A. ESPINOZA, Y. ABDEL RAHMAN K.H. MARX und E.F. PFEIFFER: Untersuchungen über den Transport und die Tagesrhythmik von endogenem ACTH im Blut bei Stoffwechselgesunden und Cushing-Kranken.
10. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963), 231
165. NUGENT, C.A., K. EIK-NES, H.S. KENT, L.T. SAMUELS and F.H. TYLER: A possible explanation for Cushing's syndrome associated with adrenal hyperplasia.
J. clin. Endocrinol. 20, 1259 (1960)
166. TUCCI, J.R., C.R. MELONI, G.G. CARREON and J.J. CANARY: Pituitary-adrenal functional abnormalities in corticogenic adrenal atrophy.
J. clin. Endocrin. 25, 823 (1965)

167. NELSON, D.H.: Corticotropin in human plasma:
Clin. Endocrinol. I, 626 (1960)
Grune & Stratton, Inc. N.Y.
168. KASTIN, A.J.,
A.V. SCHALLY,
H. YAJIMA and
K. KUBO: Melanocyte-stimulating hormone activity
of synthetic MSH and ACTH peptides, in
vivo and in vitro.
Nature 207, 978 (1965)
169. SHIMIZU, N.,
E. OGATA,
W.E. NICHOLSON,
D.P. ISLAND,
R.L. NEY and
G.W. LIDDLE: Studies on the melanotropic activity of
human plasma and tissues.
J. clin. Endocrin. 25, 984 (1965)
170. ISLAND, D.P.,
N. SHIMIZU,
W.E. NICHOLSON,
K. ABE, E. OGATA
and G.W. LIDDLE: A method for separating small quantities
of MSH and ACTH with good recovery of
each.
J. clin. Endocrinol. 25, 975 (1965)
171. SORGE, F.,
H.E. MENTZEL,
G. SCHUMANN,
A. BRENDEL und
E.F. PFEIFFER: Sekretionsrhythmik von ACTH und
Cortisol im Blute von Stoffwechselfe-
sunden, Prädiabetikern und Fettsüchtigen.
Diabetologia 1, 151 (1965)
172. SCHWARZ, K. und
P.C. SCRIBA: Endokrin bedingte Encephalopathien. Referat
Verh. Dt. Ges. Inn. Med. 72, (1966) im Druck
173. SCRIBA, P.C.,
R. HACKER,
P. DIETERLE und
K. SCHWARZ: Manuskript in Vorbereitung.
174. HACKER, R.: Dissertation, Universität München,
in Vorbereitung.
175. DE MOOR, P. and
O. STEENO: Comparison of three techniques for the
fluorimetric determination of plasma
corticosteroids.
J. Endocrinol. 28, 59 (1963)
176. MATTINGLY, D.,
P.M. DENNIS,
J. PEARSON and
C.L. COPE: A simple fluorimetric method for the
estimation of free 11-hydroxycorticoids
in human urine.
Lancet 1946, (1964) II
177. STEENBURG, R.W.,
B.H. THOMASSON: Fluorometric determination of
corticosteroids in human blood:
Comparison of results with the Silber-
Porter method.
J. clin. Endocrinol. 24, 875 (1964)
178. DÖRNER, G. und
F. STAHL: Eine einfache fluorometrische Methode
zur Routinebestimmung von freiem
Cortisol und Corticosteron im Harn.
Acta biol. med. germanica 12, 606 (1964)

179. DÖRNER, G. und
F. STAHL: Die diagnostische Bedeutung einer einfachen fluorimetrischen Routinemethode zur Beurteilung der Nebennierenrindenfunktion.
Dt.med.Wschr. 90, 1917 (1965)
180. SPENCER-PEET, J.,
J.R. DALY and
V. SMITH: A simple method for improving the specificity of the fluorimetric determination of adrenal corticosteroids in human plasma.
J. Endocrinol. 31, 235 (1965)
181. BETHGE, H.,
W. WINKELMANN und
H. ZIMMERMANN: Die Beurteilung der gestörten Nebennierenrindenfunktion mit einer einfachen Methode der Bestimmung der 11-Hydroxycorticoide im Plasma.
Klin. Wschr. 43, 1274 (1965)
182. ESPINER, E.A.: The relation between free cortisol in urine and "urinary free 11-hydroxycorticosteroids" as measured by fluorescence.
J. Endocrinol. 32, 233 (1965)
183. ABRAHAM, R., und
H.J. STAUDINGER: Spektroskopische Untersuchungen zur fluorometrischen Steroidanalyse.
Zschr.Klin. Chem. 2, 16 (1964)
184. PALADE, G.E. and
P. SIEKEVITZ: Livermicrosomes, an integrated morphological and biochemical study.
J.Biophys.Biochem.Cytol. 2, 171 (1956)
185. SCHNEIDER, W.C. and
G.H.HOGEBOOM: Cytochemical studies of mammalian tissues: The isolation of cell components by differential centrifugation: A review.
Cancer Res. 11, 1 (1951)
186. SCHNEIDER, W.C. and
G.H. HOGEBOOM: Intracellular distribution of enzymes.
J.biol.Chem. 183, 123 (1950)
187. BRITEN, R.J. and
R.B.ROBERTS: High resolution density gradient sedimentation analysis.
Science 131, 32 (1960)
188. POTTER, V.R. and
C.A.ELVEJHEM: A modified method for the study of tissue oxydations.
J.biol.Chem. 114, 495 (1936)
189. LOWRY, O.R.,
N.J. ROSEBROUGH,
A.L. FARR and
R.V.RANDALL: Protein measurement with the FOLIN phenol reagent.
J.biol.Chem. 193, 265 (1951)
190. KNAUFF, H.G. und
F.BÖCK: Über die freien Gehirnaminosäuren und das Äthanolamin der normalen Ratte, sowie über das Verhalten dieser Stoffe nach experimenteller Insulinhypoglykämie.
J. Neurochemistry 6, 171 (1961)

191. PETTE, D.: Mikroelektrophorese von Liquor cerebrospinalis in Agar-gel. Klin. Wschr. 36, 1106 (1958)
192. BÜCHER, T. und M. KLINGENBERG: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. Angew. Chemie 70, 552 (1958)
193. PETTE, D.: Mitochondrial enzyme activities. in "Regulation of metabolic processes in mitochondria". Hrsg. J.M.TAGER, S.PAPA, E.QUAGLIARIELLO and E.C. SLATER Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1966
194. MARTIN, R.G. and B.N. AMES: A method for determining the sedimentation behavior of enzymes. Application to protein mixtures. J.biol.Chem. 236, 1372 (1961)
195. PESCE, A., F.STOLZENBACH, I.FREEDBERG and N.O, KAPLAN: Comparative enzymology of various latic dehydrogenases. Feder. Proceed. 22, No 486 (1963)
196. NEILANDS, J.B.: Studies on lactic dehydrogenase of heart. J.biol. Chem.199, 373 (1952)
197. WARNER, R.C.: Physical properties of crystalline "fluorokinase". Arch.Biochem.Biophys. 78, 494 (1958)
198. PETERSON, E.A. and H.A. SOBER: Column chromatography of proteins: Substituted celluloses. in "Methods in enzymology" Band V (1962) Hrsg. S. COLOWICK und N.O.KAPLAN
199. SCHNEIDER, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxyptentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J.biol.Chem.161, 293 (1945)
- 199a.DISCHE, Z.: Color reactions of necleic acid components. in "The nucleic acids" Hrsg. E.CHARGRAFF and J.N.DAVIDSON, Academic Press, New York, (1955) 301.
200. ELLIOT, T.R. and I.TUCKETT: Cortex and medulla in the suprarenal glands. J.Physiol. 34, 332 (1906)
201. COHEN, G.N. and F. GROS: Protein Biosynthesis. Ann.Rev. Biochem. 29, 525 (1960)
202. BERG, P.: Specifity in protein Synthesis. Ann.Rev.Biochem. 30, 293 (1961)
203. ARNSTEIN, H.R.V.: Mechanism of Protein Biosynthesis. Brit.Med.Bull. 21, 217 (1965)

204. BROWN, G.L. and S. LEE: Amino acid transfer ribonucleic acid: Structure and function. Brit.Med.Bull. 21, 236 (1965)
205. GROS, F., W. GILBERT, H.H.HIATT, G.ATTARDI, P.F.SPAHR and J.D. WATSON: Molecular and biological characterization of messenger RNA. Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol. 26, 111 (1961)
206. SMELLIE, R.M.S.: Biochemistry of DNA and RNA replication. Brit.Med.Bull. 21, 195 (1965)
207. OCHOA, S.: Chemical basis of heredity, the genetic code. Experientia 20, 57 (1964)
208. JACOB, F. and J. MONOD: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of protein. Review article. J. molec. Biol. 3, 318 (1961)
209. FRIEDRICH, W.: Biochemischer Wirkungsmechanismus der wichtigeren Antibiotika. Med. Welt. (1963) 259P
210. DREWS, J.: Antibiotika: Hemmstoffe der Proteinsynthese. Med.Klinik 61, 81 (1966)
211. HOAGLAND, M.B., E.B. KELLER and P.C. ZAMECNIK: Enzymatic carboxyl activation of amino acids. J.biol.Chem. 218, 345 (1956)
212. KELLER, E.B. and P.C. ZAMECNIK: The effect of GDP and GTP on the incorporation of labeled amino acids into proteins. J. biol. Chem. 221, 45 (1956)
213. HOAGLAND, M.B., M.L. STEPHENSON, J.F. SCOTT, L.I. HECHT and P.C. ZAMECNIK: A soluble RNA intermediate in protein synthesis. J. biol. Chem. 231, 241 (1958)
214. HECHT, L.I., P.C. ZAMECNIK, M.L. STEPHENSON and J.F. SCOTT: Nucleoside triphosphates as precursors of RNA endgroups in a mammalian system. J. biol. Chem. 233, 954 (1958)
215. ZACHAU, H.G., G.ACS and F.LIPMANN: Isolation of adenosin amino acid esters from a RNase digest of soluble liver RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 44, 885 (1958)
216. BERGMANN, F.H., P.BERG and M.DIECKMANN: The enzymic synthesis of amino acyl derivatives of RNA. II. The preparation of leucyl-, valyl-, isoleucyl-, methionyl-RNA synthetases from E.coli. J. biol. Chem. 236, 1735 (1961)
- 216a. HAYASHI, H. and K.MIURA: Functional sites in transfer ribonucleic acid. Nature 209, 376 (1966)

217. NATHANS, D. and F. LIPMANN: Amino acid transfer from aminoacyl-RNA to protein on ribosomes of *E.coli*. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 47, 497 (1961)
218. LAMMFROM, H. and R.F. SQUIRES: Studies on transfer of amino acids to ribosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 61, 421 (1962)
219. LITTLEFIELD, J.W. and E.B.KELLER: Incorporation of ^{14}C -amino acids into ribonucleoprotein particles from the EHRLICH mouse ascites tumor. *J.biol.Chem.* 224, 13 (1957)
220. KORNER, A.: Incorporation in vitro of ^{14}C -amino acids into proteins of rat liver microsomal particles. (PN) *Biochim.Biophys.Acta* 35, 554 (1959)
221. KURLAND, C.G.: Molecular characterization of RNA from *E.coli* ribosomes. *J.molec.Biol.* 2, 83 (1960)
222. CAMPBELL, P.N., C. COOPER and M. HICKS: Studies on the role of the morphological constituents of the microsome fraction from rat liver in protein synthesis. *Biochem.J.* 92, 225 (1964)
223. TISSIERES, A., D.SCHLESSINGER and F.GROS: Amino acid incorporation into proteins by *E.coli* ribosomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 46, 1450 (1960)
224. HUXLEY, H.E. and GZUBAY: Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *E.coli*. *J.molec.Biol.* 2, 10 (1960)
225. SPYRIDES, G.J. and F.LIPMANN: Polypeptide synthesis with sucrose gradient fractions of *E.coli* ribosomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 48, 1977 (1962)
226. LAMMFROM, H. and E.R. GLOWACKI: Controlled dissociation of rabbit reticulocyte ribosomes and its effect on hemoglobin synthesis. *J.molec. Biol.* 5, 97 (1962)
227. BISHOP, J.O.: Reticulocyte ribosome fraction with an exceptional capacity for polyphenyl-alanine synthesis. *Nature* 208, 361 (1965)
228. RISEBROUGH, R.W., A. TISSIERES and J.D. WATSON: Messenger-RNA attachment to active ribosomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 48, 430 (1962)
229. JACKSON, R.J., A.J. MUNRO and A. KORNER: Assay of polysomes and ribosomes in particle preparations. *Biochem. J.* 89, 11 P (1963)
230. WETTSTEIN, F.O., T.STABELIN and H.NOLL: Ribosomal aggregate engaged in protein synthesis. Characterization of the ergosome. *Nature* 197, 430 (1963)
- 230a. GIERER, A.: Function of aggregated reticulocyte ribosomes in protein synthesis. *J.Mol.Biol.* 6, 148 (1963)

231. CAMPBELL, P.N.,
G. SERCK-HANSEN
and E. LOWE: Studies on the protein synthesizing activity of the ribosomes of rat liver. The activity of free polysomes. *Biochem. J.* 97, 422 (1965)
232. VOLKIN, E. and
L. ASTRACHAN: Phosphorus incorporation in E.coli RNA after infection with bacteriophage T₂. *Virology* 2, 149 (1956)
233. BRENNER, S.,
F. JACOB and
M. MESELSON: An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190, 576 (1961)
234. HALL, B.D. and
S. SPIEGELMANN: Sequence complementarity of T₂-DNA and T₂-specific RNA. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 47, 137 (1961)
235. RUECKERT, R.R. and
W. ZILLIG: Biosynthesis of virus protein in E.coli C in vivo following infection with bacteriophage Phi Chi 174. *J. molec. Biol.* 5, 1 (1962)
236. GIERER, A. and
G. SCHRAMM: Infectivity of RNA from tobacco mosaic virus. *Nature* 177, 702 (1956)
237. SPEYER, J.F.,
P. LENGYEL,
C. BASILIO and
S. OCHOA: Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 48, 441 (1962)
238. SCOTT, R.B. and
R.A. MALT: Stable messenger RNA in nucleated erythrocytes. *Nature* 203, 497 (1965)
239. SIBATANI, A.,
S.R. de KLOET,
V.G. ALLFREY and
E.E. MIRSKY: Isolation of a nuclear RNA fraction resembling DNA in its base composition. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 48, 471 (1962)
240. NIU, M.C.,
C.C. CERDOVA,
L.C. NIU and
C.L. RADBILL: RNA-induced biosynthesis of specific enzymes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 48, 1964 (1962)
241. M.B. HOAGLAND: Some factors influencing protein synthetic activity in a cell free mammalian system. *Gold Spring Harbor Sympos. Quant.Biol.* 26, 153 (1961)
242. HOAGLAND, M.B.
and B.A. ASKONAS: Aspects of control of protein synthesis in normal and regenerating rat liver. I.A. cytoplasmic RNA-containing fraction that stimulates amino acid incorporation. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 49, 130 (1963)

243. BISHOP, J.O.
and R.S.SCHWEET: Participation of two enzyme fractions in the transfer of amino acids from aminoacyl-RNA to reticulocyte ribosomes. *Biochim.Biophys.Acta.* 54, 617 (1961)
244. FESSENDEN, J.M.
and K.MOLDAVE: Studies on amino acyl transfer from soluble RNA to rat liver ribonucleo-protein-particles: Effect of soluble and microsomal extracts. *Biochemistry* 1, 485 (1962)
- 244a. FESSENDEN, J.M.
and K.MOLDAVE: Studies on amino acyl transfer from soluble ribonucleic acid to ribosomes. *J.biol.Chem.* 238, 1479 (1963)
245. FESSENDEN, J.M.,
J.CAIRNCROSS and
K. MOLDAVE: Studies on polynucleotide-stimulated amino acyl transfer from soluble RNA to rat liver ribosomes. *Proc.Nat.Acad.Sci.* 49, 82 (1963)
246. SLAPIKOFF, S.,
J.M. FESSENDEN and
K.MOLDAVE: Enzymatic incorporation of amino acid from amino acyl soluble ribonucleic acid into ribosomal nucleic acid and ribosomal protein. *J.biol.Chem.* 238, 3670 (1963)
247. GASIOR, E. and
K.MOLDAVE: Resolution of aminoacyl-transferring enzymes from rat liver by molecular sieve chromatography. *J.biol.Chem.* 240, 3346 (1965)
248. TAKANAMI, M. and
T. OKAMOTO: Isolation of an enzyme catalyzing the transfer of amino acids from soluble RNA to microsomal ribonucleoprotein. *Biochim. Biophys.Acta* 44, 379 (1960)
249. TAKANAMI, M.: Transfer of amino acids from soluble RNA to ribosome. I. Isolation of an enzyme catalysing the transfer reaction. *Biochim.Biophys.Acta* 51, 85 (1961)
250. TAKANAMI, M.: Transfer of amino acids from soluble RNA to ribosome. *Biochim.Biophys.Acta* 61, 432 (1962)
251. YARMOLINSKY, M.B.
and G.L.de la HABA: Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein (*Str.alboniger*) *Proc.Nat.Acad.Sci.* 45, 1721 (1959)
252. ZAMECNIK, P.C.: Unsettled questions in the field of protein synthesis. *Biochem.J.* 85, 257 (1962)
253. FRANKLIN, T.J.: The effect of chlortetracycline on the transfer of leucine and "transfer" ribonucleic acid to rat-liver ribosomes in vitro. *Biochem.J.* 90, 624 (1964)
254. DECKER, K.,
H.E.FRANZ und
M.FRANZ Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Puromycin und Aminonucleosid auf die Proteinsynthese. *Klin.Wschr.* 42, 583 (1964)

255. FREEMAN, K.B.: Protein synthesis in mitochondria. Biochem. J. 94, 494 (1965)
256. KAJI, A., H.KAJI and G.D.NOVELLI: Soluble amino acid-incorporating system. I.Preparation of the system and nature of the reaction.
257. ders. II.Soluble nature of the system and the characterterization of the radioactive product. J.biol.Chem. 240, 1185 and 1192 (1965)
258. SABA, N.: Mechanism of corticotrophin action. in "The biosynthesis and secretion of adrenal cortical steroids", Biochem.Soc. Sympos. Hrsg. CLARK, F. and J.K. GRANT. Cambridge 1960, S.96
259. HECHTER, O. and G.LESTER: Cell permeability and hormone action. Rec. Progr. Horm. Res. 16, 139 (1960)
260. FORTIER, C.: Adenohypophysis and adrenal cortex. Ann. Rev. Physiol. 24, 224 (1962)
261. SCRIBA, P.C.: Zum biochemischen Wirkungsmechanismus des adrenocorticotropen Hormons: Einfluß auf die Synthese von Eiweiß in der Nebenniere. Klin.Wschr. 42, 463 (1964)
262. HILF, R.: Mechanism of action of ACTH. New Engl.J.Med. 273, 798 (1965)
263. EVANS, H.M.: Present position of our knowledge of anterior pituitary function. J.Amer.Med.Ass. 101, 425 (1933)
- 263a. ANSELMINO, K.J., F. HOFFMANN und L. HEROLD: Über das corticotrope Hormon des Hypophysenvorderlappens. Klin.Wschr. 12, 209 (1934)
- 263b. COLLIP, J.B., E.M. ANDERSON and D.L. THOMSON: The adrenotropic hormone of the anterior pituitary lobe. Lancet, 347 (1933) II
264. WEBER, G., R.L. SINGHAL, S.K. SRIVASTAVA, H.J.HIRD and J. FURTH: Behavior of hepatic gluconeogenic enzymes, RNA metabolism and amino acid level in rats carrying transplantable ACTH-secreting pituitary tumors. Endocrinology 76, 902 (1965)
- 264a. WEXLER, B.C.: Changes in the adrenal glands and other organs of intact and hypophysectomized rats following ACTH and adrenal steroids. Acta endocrin. 43, Suppl.82 (1963)
265. STUDZINSKI, G.P., D.C.F. HAY and T.SYMMINGTON: Observations on the weight of the human adrenal gland and the effect of preparations of corticotrophin of different purity on the weight and morphology of the human adrenal gland. J.clin.Endocrin. 23, 248 (1963)

266. GRIFFITH, K.,
J.K. GRANT and
T.SYMINGTON: A biochemical investigation of the
functional zonation of the adrenal
cortex in man.
J.clin.Endocrin. 23, 776 (1963)
267. GREEP, R.O.: The structure of the adrenal cortex.
in "The adrenal cortex" Hrsg. H.D.MOON,
1961 Paul Hoeber, N.Y.
268. FARESE, R.V. and
W.J. REDDY: Observations on interrelations between
adrenal protein, RNA and DNA during
prolonged ACTH administration.
Biochim. Biophys. Acta 76, 145 (1963)
269. FIALA, S.,
E.E. SPROUL and
A. FIALA: The action of ACTH on nucleic acids
and subcellular elements of the adrenal
cortex.
J.Biophys. Biochem. Cytol. 2, 115 (1956)
270. BRUNS, J.D. and
A.F. HALE: The distribution of ribonucleic acid
and some other substances in adrenal
cortex after administration of adreno-
corticotrophin.
J.Physiol. 146, 465 (1959)
271. BRANSOME, E.D. and
REDDY, W.J. Studies of adrenal nucleic acids: The
influence of ACTH, unilateral adrenalectomy and GH upon adrenal RNA and DNA in
the dog.
Endocrinology 69, 997 (1961)
272. BRANSOME, E.D. and
W.J. REDDY: Incorporation of amino acids into rat
adrenal nucleic acids:
Effects of ACTH and GH.
Endocrinology 73, 540 (1963)
273. BRANSOME, E.D. and
W.J. REDDY: Studies of adrenal nucleic acids, RNA,
DNA and total protein in human adrenal
dysfunction.
Metabolism 12, 27 (1963)
274. BRANSOME, E.D. and
E. CHARGAFF: Synthesis of ribonucleic acids in the
adrenal cortex: Early effects of
adrenocorticotrophic hormone.
Biochim. Biophys. Acta 91, 180 (1964)
275. BURY, H.P.R. and
W.A.J. CRANE: Effect of age and hormonal state on the
numbers of DNA synthesizing nuclei in
rat adrenal cortex.
Nature 205, 301 (1965)
276. SIGEL, M.B. and
J.T. DOWLING: Specificity of corticotrophin induced
increase in mitochondrial ribonucleic
acid.
Am.J.Physiol. 206, 1156 (1964)
277. GANIS, F.M.,
L.L. MILLER and
L.R. AXELROD: Effect of ACTH on protein synthesis in
isolated perfused beef adrenal gland.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 89, 634 (1955)

278. FARESE, R.V. and W.J. REDDY: Effect of ACTH on adrenal protein synthesis. *Endocrinology* 73, 294 (1963)
279. SCRIBA, P.C. and W.J. REDDY: ACTH and adrenal protein synthesis. *Feder. Proceed* 22, No.30 (1963)
280. SCRIBA, P.C. and W.J. REDDY: Zum biochemischen Mechanismus der Stimulation der Proteinsynthese der Nebenniere durch adrenocorticotropes Hormon. 11. Sympos. Dt. Ges. Endokrinol. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 206 (1964)
281. FARESE, R.V.: Changes in ¹⁴C-glycine-incorporating activities of rat adrenal microsomes and soluble cell fraction during prolonged adrenocorticotropin administration. *Biochim.Biophys.Acta.* 91, 515 (1964)
282. FARESE, R.V.: Further studies on the stimulation of adrenal protein synthesis by ACTH: An effect on microsomes and ribosomes. *Endocrinology* 74, 579 (1964)
283. FARESE, R.V.: Quantitative comparison of the effects of ACTH administration on the activities of soluble cell fraction and microsomes for incorporation of amino acid into protein. *Endocrinology* 76, 795 (1965)
284. SCRIBA, P.C. and W.J. REDDY: Adrenocorticotrophin and adrenal protein synthesis. *Endocrinology* 76, 745 (1965)
285. FARESE, R.V.: Changes in adrenal polysomes following ACTH administration. *Endocrinology* 77, 128 (1965)
286. FARESE, R.V.: Early effects of ACTH on adrenal protein synthesis. *Endocrinology* 78, 125 (1966)
287. LIPSCOMB, H.S. and D.H. NELSON: Dynamic changes in ascorbic acid and corticosteroids in adrenal vein blood after ACTH. *Endocrinology* 66, 144 (1960)
288. SCHNEIDER, W. und H.J. STAUDINGER: Zum Wirkungsmechanismus von Vitamin C. *Klin.Wschr.* 42, 879 (1964)
289. SHARMA, S.K., R.M. JOHNSTONE and J.H. QUASTEL: Corticosteroids and ascorbic acid transport in adrenal cortex in vitro. *Biochem. J.* 92, 564 (1964)

290. SWEAT, M.L. and M.J. BRYSON: Steroid 11- β oxygenation, ascorbic acid, epinephrine and adrenochrome interrelations in the adrenal gland. *Endocrinology* 76, 773 (1965)
291. FERGUSON, J.J.jr.: ACTH-responsiveness, protein synthesis and puromycin. *Feder. Proc.* 22, No. 2211 (1963)
292. FERGUSON, J.J.jr.: Puromycin and adrenal responsiveness to ACTH. *Biochim.Biophys.Acta.* 57, 616 (1962)
293. FERGUSON, J.J.jr.: Protein synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *J.biol.Chem.* 238, 2754 (1963)
294. FERGUSON, J.J.jr. and Y.MORITA: RNA-synthesis and adrenocorticotropin responsiveness. *Biochim.Biophys.Acta* 87, 348 (1964)
295. FARESE, R.V.: Inhibition of steroidogenic effect of ACTH and incorporation of amino acid in rat adrenal protein in vitro by chloramphenicol. *Biochim.Biophys.Acta* 87, 699 (1964)
296. KITTINGER, G.W.: Puromycin inhibition of in vitro cortical hormone production by rat adrenal gland. *Steroids* 4, 539 (1964)
297. BRANSOME, E.D. and W.J.REDDY: Hormonal effects in vitro on amino acid incorporation into rat adrenal protein: ACTH and growth hormone. *Arch.Biochim.Biophys.* 101, 21 (1963)
298. DAVISON, C. and F.G. HOFMANN: Effect of ACTH on uptake of S³⁵-labeled cysteine by rat adrenal glands. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 92, 151 (1956)
299. HALKERSTONE, I.D.K., M. FEINSTEIN and O.HECHTER: Inhibition of protein synthesis in rat adrenal glands by adrenocorticotrophin and cyclic 3',5'-adenosin monophosphate. *Endocrinology* 74, 649 (1964)
300. HALKERSTONE, I.D.K., M. FEINSTEIN and O. HECHTER: Further observations on the inhibition of adrenal protein synthesis by ACTH in vitro. *Endocrinology* 76, 801 (1965)
301. HAYNES, R.C.jr. and L. BERTHET: Studies on the mechanism of action of ACTH. *J.biol.Chem.* 225, 115 (1957)
302. PÉRON, F.G. and S.B. KORITZ: On the exogenous requirements for the action of ACTH in vitro on rat adrenal glands. *J.biol.Chem.* 233, 256 (1958)
303. KORITZ, S.B., F.G.PÉRON and R.I.DORFMANN: Influence of ACTH on corticoid production and glycine-1-C¹⁴ incorporation into protein by rat adrenals. *J.biol.Chem.* 226, 643 (1957)

304. PÉRON, F.G. and S.B. KORITZ: On the localization of stimulation in vitro by calcium ion and freezing of corticoid production by rat adrenal homogenates. *J.biol.Chem.* 235, 1625 (1960)
305. SAFFRAN, M. and A.V. SCHALLY: In vitro bioassay of corticotropin: Modification and statistical treatment. *Endocrinology* 56, 523 (1955)
306. PÉRON, F.G.: Effect of calcium ions on corticosteroidogenesis. *Biochim.Biophys.Acta.* 90, 62 (1964)
307. HAYNES, R.C.: The activation of adrenal phosphorylase by ACTH. *J.biol.Chem.* 233, 1220 (1958)
308. GRANT, J.K. and A.C. BROWNIE: Role of fumarate and TPN in steroid 11- β -hydroxylation. *Biochim.Biophys.Acta* 18, 433 (1955)
309. HILF, R., C. BREUER, and A.BORMAN: Adrenals adenine nucleotide metabolizing enzymes: alterations induced by ACTH treatment. *Arch.Biochem.Biophys.* 94, 319 (1961)
- 309a. HILTON, J.G., O.R. KRUESI, R.I. NEDELJKOVIC and L.F. SCIAN: Adrenocortical and medullary responses to adenosin-3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 68, 908 (1961)
310. GREENBERG, L.J. and D.GLICK: Studies in histochemistry. 68. Determination of glycogen in microgramm samples of tissues. Quantitative histologic distribution in the rat adrenal and influence of ACTH. *Biochemistry* 1, 452 (1962)
311. WILLIAMS, H.E., P.L.JOHNSON and J.B. FIELD: In vitro studies on the effect of ACTH in rat and bovine adrenal glands. *Endocrinology* 71, 293 (1962)
312. PALCOVIC, M., L. MACHO and J. POOR: Effect of ACTH on the activity of adrenal glucose-6-phosphate metabolizing enzymes in the rat. *Physiologia Bohemoslovenica* 13, 358 (1964)
313. ROBERTS, S., J.E. CREANCE and D.D.FOWLER: Stimulation of steroid C-11 β -hydroxylase activity in adrenal homogenates by cyclic 3',5'-adenosin monophosphate. *Nature* 203, 759 (1964)
314. SUTHERLAND, E.W. and T.W.RALL: The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺⁺ and epinephrine or glucagon. *J.Amer.Chem.Soc.* 79, 3608 (1957)
315. MCKERNS, K.W.: Additional studies on the mechanism of action of ACTH. *Canad.J.Biochem.* 43, 923 (1965)

316. KORITZ, S.B. and F.G. PERON: Studies on the mode of action of adrenocorticotrophic hormone. *J.biol.Chem.* 230, 343 (1958)
317. FIELD, J.B., I. PASTAN, B. HERRING and P. JOHNSON: Studies of pathways of glucose metabolism of endocrine tissues. *Endocrinology* 67, 801 (1960)
318. VANCE, V.K., F. GIRARD and G.F. CAHILL: Effect of ACTH on glucose metabolism in rat adrenal in vitro. *Endocrinology* 71, 113 (1962)
319. CHANCE, B., B. SCHOENER and J.J. FERGUSON, jr.: In vivo induced oxydation by ACTH of reduced pyridine nucleotide. *Nature* 195, 776 (1962)
320. KORITZ, S.B.: Some observations on stimulation in vitro of corticoid production by adenosine 3,5²-monophosphate in rat adrenals. *Biochim.Biophys. Acta* 60, 179 (1962)
321. HILF, R. and F.F. BURNETT: Triphosphopyridine nucleotide-linked enzymes in the regenerating rat adrenal gland: Effect of adrenocorticotrophin. *Arch.Biochem.Biophys.* 104, 106 (1964)
322. KUHN, G. and J.M.KISSANE: Quantitative histochemistry of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in rat adrenal cortex: Effect of ACTH, cortisone and sodium deprivation. *Endocrinology* 75, 741 (1964)
323. HARDING, W.B. and D.H. NELSON: Effect of hypophysectomy on NADP and NADPH concentration and corticosteroid secretion in rat adrenal. *Endocrinology* 75, 501 (1964)
324. HARDING, W.B. and D.H. NELSON: Effect of ~~Effect of~~ hypophysectomy on several rat adrenal NADPH-generating and oxidizing systems. *Endocrinology* 75, 506 (1964)
325. LANDAU, B.R.: Mechanism of action of ACTH. *New Engl.J.Med.* 273, 1286 (1965)
326. COHEN, R.B. and L.A. FAGUNDES: Observations on phosphorylase activity distribution in the adrenal cortex: Effect of ACTH. *Endocrinology* 78, 220 (1966)
327. IMURA, H., S. MATSUKURA, H. MATSUYAMA, T. SETSUDA and T. MIYAKE: Adrenal steroidogenic effect of adenosine 3,5²-monophosphate and its derivatives in vivo. *Endocrinology* 76, 933 (1965)

328. GRANT, J.K. and T. SYMINGTON: Effect of ACTH therapy on the in vitro 11- β hydroxylation of the desoxycorticosterone by human adrenal homogenates. *J.clin.Endocrin.* 17, 933 (1957)
329. SWEAT, M.L. and M.D. LIBSCOMB: A transhydrogenase and reduced triphosphopyridine nucleotide involved in oxidation of desoxycorticosterone to corticosterone by adrenal tissue. *J.Amer.Chem.Soc.* 77, 5185 (1955)
330. DORFMANN, R.I.: Metabolism of adrenal cortical hormones. in "The adrenal cortex" Hrsg. H.D.MOON, P.Hoeber Inc., New York 1961
331. KARL, H.J. und L.RAITH: Die Corticosteronsekretion beim Menschen. III. Die Sekretionsraten von Corticosteron und Cortisol bei Stimulierung der Nebennierenrinde mit ACTH. *Klin.Wschr.* 44, 303 (1966)
332. KRUM, A.A. and R.E. GLENN: Adrenal steroid secretion in rabbits following prolonged ACTH administration. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 118, 225 (1965)

Lebenslauf

Als erstes Kind des Prof.Dr.med.Karl Scriba (Direktor des Pathologischen Institutes der Städtischen Krankenanstalten Bremen) und seiner Ehefrau Editha, geb.Lueg wurde ich am 19.8.1935 in Hamburg geboren. Das Abitur bestand ich Ostern 1954 nach Besuch des Johanneums in Hamburg.

Das Physikaum bestand ich im August 1956 in Hamburg mit der Note gut, das medizinische Staatsexamen im Sommer 1959 in Freiburg mit der Note sehr gut. Meine Promotion erfolgte im November 1959 mit der Note summa cum laude. Der Titel der Dissertation lautete:"Versuche zum biochemischen Wirkungsmechanismus von carzinostatisch wirksamen Äthyleniminverbindungen".

Vom Sommer 1957 bis Anfang 1961 war ich zunächst als Doktorand, später als Assistent im Biochemischen Institut der Universität Freiburg Mitarbeiter von Herrn Prof.Dr.H.Holzer. Seit Dezember 1961 bin ich wissenschaftlicher Assistent an der II.Medizinischen Klinik der Universität München.

Von Juni 1962 bis Juli 1963 war ich als post doctoral research fellow des U.S.Public Health Service ein Jahr in Boston,Mass. Ich habe dort als research assistant an der Harvard Medical School im Laboratorium von Dr.George W.Thorn im Peter Bent Brigham Hospital als Mitarbeiter von Dr.William J.Reddy gearbeitet. Im Oktober 1962 habe ich das Examen des Educational Council for Foreign Medical Graduates bestanden.

Seit August 1963 bin ich wieder wissenschaftlicher Assistent und Stationsarzt an der II.Medizinischen Klinik der Universität München. Seit Ende 1963 habe ich ausserdem ein Laboratorium, in dem klinische und experimentelle endokrinologische Fragen bearbeitet werden. Seit Mai 1966 bin ich zusätzlich mit der Leitung des klinisch-chemischen Laboratoriums der Klinik betraut.

Ich bin seit 1961 verheiratet, meine Frau Marisa,geb.Mikorey, und ich haben drei Kinder.

