

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München

**Die Androgenbindung des Sexualhormon-bindenden
Globulins
bei männlichen Patienten mit Leberzirrhose**

Markus Alexander Thaler

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar
der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier)

Die Androgenbindung des Sexualhormon-bindenden Globulins bei männlichen Patienten mit Leberzirrhose

Markus Alexander Thaler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. P. B. Lippa
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 26.02.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät für Medizin am 27.06.2007 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht unter:

1. Thaler M, Metzger J, Schreiegg A, Denk B, Gleixner A, Hauptmann H, Luppä PB. Immunoassay for sex hormone-binding globulin in undiluted serum is influenced by high-molecular-mass aggregates. *Clin Chem* 2005; 51:401-407.

2. Luppä PB, Thaler M, Schulte-Frohlinde E, Schreiegg A, Huber U, Metzger J. Unchanged androgen-binding properties of sex hormone-binding globulin in male patients with liver cirrhosis. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:967-973.

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	S. 7
1. Einleitung	S. 11
1.1. Physiologie des SHBG	S. 11
1.1.1. Vorkommen beim Menschen	S. 11
1.1.2. SHBG-Gen	S. 11
1.1.3. Proteinchemischer Aufbau	S. 12
Glykosilierung	S. 13
Dimerisierungsdomäne und räumliche Struktur des Dimers	S. 14
Steroidbindung und Steroidbindungsdomäne	S. 15
Rezeptorbindungsdomäne	S. 18
1.1.4. Regulation der SHBG-Konzentration	S. 19
Nichthormonale Regulation	S. 19
Hormonale Regulation	S. 19
Abbau des SHBG	S. 20
1.1.5. SHBG-Spiegel unter physiologischen Bedingungen	S. 20
1.1.6. SHBG-Membranrezeptor	S. 22
1.1.7. Biologische Funktionen des SHBG	S. 23
Plasmafunktion	S. 23
Membran- und Zellfunktion	S. 25
1.2. SHBG und Erkrankungen außer Leberzirrhose	S. 25
1.2.1. Allgemeines	S. 25
1.2.2. Hyperandrogenismus bei Frauen	S. 26
1.2.3. Hypogonadismus bei Männern	S. 26
1.2.4. Schilddrüsenerkrankungen	S. 27
1.2.5. Hypophysenerkrankungen	S. 27
1.2.6. Metabolisches Syndrom	S. 28
1.2.7. Medikamente und Alkohol	S. 29
1.3. Leberzirrhose	S. 29
1.3.1. Einführung	S. 29
1.3.2. Serum-Androgenspiegel bei Leberzirrhose	S. 32
1.3.3. Serum-Estrogenspiegel bei Leberzirrhose	S. 33

1.3.4.	Hepatischer Androgen- und Estrogenmetabolismus bei Leberzirrhose	S. 33
1.3.5.	Gonadotropine und Prolaktin bei Leberzirrhose	S. 35
1.3.6.	Serum-SHBG-Spiegel bei Leberzirrhose	S. 36
1.3.7.	Klinische Relevanz der Hormonveränderungen	S. 37
1.4.	Biosensorik	S. 38
1.4.1.	Prinzip und Aufbau des Surface Plasmon Resonance-Biosensors	S. 38
1.4.2.	Meßsystem für die Androgen-SHBG-Interaktion	S. 39
1.5.	Zielsetzung der Arbeit	S. 41
2.	Patienten und Probanden, Material und Methoden	S. 43
2.1.	Patienten und Probanden	S. 43
2.2.	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	S. 44
2.3.	Chemikalien	S. 45
	Allgemeine Reagenzien	S. 45
	Allgemein verwendete Lösungen und Puffer	S. 45
2.4.	Aufgereinigtes SHBG und PNGase-Verdau	S. 45
	Rekonstitution des Lyophilisats	S. 46
	PNGase-Verdau	S. 46
2.5.	Gelfiltrationschromatographie	S. 46
	Prinzip	S. 46
	Durchführung der Gelfiltration	S. 47
2.6.	Gelelektrophorese	S. 48
	Prinzip	S. 48
	Gießen der Gele	S. 49
	Vorbehandlung der Gelfiltrationsfraktionen für die Gelelektrophorese	S. 50
	Durchführung der Gelelektrophorese	S. 50
2.7.	Western-Blot	S. 51
	Prinzip	S. 51
	Transfer	S. 52
	Entwicklung der Blots	S. 54
2.8.	Biosensor-Messungen	S. 55
	Allgemeines	S. 55
	Beladung des CM-Dextran-Chips	S. 55
	Messung der Gelfiltrationsfraktionen der Seren	S. 57

	Ermittlung der Chip-spezifischen Kalibrationskurven für die SHBG-Anbindung	S. 58
	Auswertung der Biosensormessungen	S. 59
2.9.	Protein-, Enzym- und Hormonmessungen	S. 59
	SHBG-Messungen	S. 59
	Andere Bestimmungen	S. 59
2.10.	Statistische Auswertung	S. 61
3.	Ergebnisse	S. 62
3.1.	Biosensorisch-experimenteller Teil	S. 62
3.1.1.	Gelfiltration, Gelelektrophorese und Western-Blot	S. 62
3.1.2.	Biosensormessungen der Seren	S. 65
3.1.3.	SHBG-Kalibrationskurven der Biosensorchips	S. 67
3.1.4.	Zusammenhang zwischen SHBG-Serum-Konzentration und funktionaler SHBG-Aktivität	S. 70
3.2.	Laboratoriumsmedizinisch-statistischer Teil	S. 73
3.2.1.	Zusammensetzung der Studiengruppen und Erfüllung der Einschlusskriterien	S. 73
3.2.2.	Leberfunktionsparameter	S. 76
3.2.3.	Sexualsteroiden und FSH	S. 78
3.2.4.	Transportproteine	S. 80
4.	Diskussion	S. 82
4.1.	Fragestellung	S. 82
4.2.	Biosensoruntersuchungen	S. 82
4.2.1.	Kombination aus Gelfiltration und SPR-Biosensor	S. 82
4.2.2.	Biosensormessungen	S. 84
4.3.	Hormonanalysen	S. 85
4.3.1.	Ein- und Ausschlusskriterien und Bestimmungsmethoden	S. 85
4.3.2.	Leberfunktionsparameter	S. 88
4.3.3.	Sexualsteroiden und FSH	S. 88
4.3.4.	Transportproteine	S. 90

4.4.	Wertung der gewonnenen Erkenntnisse zur Pathogenese der hormonellen Störungen bei Leberzirrhose	S. 92
4.4.1.	Allgemeines	S. 92
4.4.2.	Synthese und Metabolismus	S. 92
4.4.3.	Feedback-Regulation	S. 95
4.4.4.	Plasma-Transport	S. 95
4.4.5.	Folgerungen	S. 98
4.5.	Ausblick	S. 99
5.	Zusammenfassung	S. 101
6.	Danksagung	S. 103
7.	Abkürzungen	S. 104
8.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	S. 108
8.1.	Tabellenverzeichnis	S. 108
8.2.	Abbildungsverzeichnis	S. 108
9.	Literaturverzeichnis	S. 110

1. Einleitung

1.1. Physiologie des SHBG

1.1.1. Vorkommen beim Menschen

Das humane Sexualhormon-bindende Globulin (SHBG) ist ein Serumprotein, dass Androgene und Estrogene mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Es wird in der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert, wo es sich in der β -Globulin-Fraktion findet [68 (S. 198); 108 (S. 703); 109 (S. 533)]. Neben den Leberparenchymzellen wurde SHBG auch in vielen weiteren, vor allem Sexualsteroid-sensitiven Zellen und Geweben nachgewiesen. Dazu zählen u.a. die Sertoli-Zellen, der Ductus epididymis, Prostatazellen und –gewebe, Ovarialfollikelzellen und Follikelflüssigkeit, Endometrium, Brustdrüsengewebe, Plazenta, Zellen der Nebennierenrinde, Astrozyten und andere neuronale Zellen [22 (S. 5680f); 68 (S. 256ff); 69 (S. 118)]. SHBG ist dabei vornehmlich zytoplasmatisch lokalisiert [22 (S. 5680); 64 (S. 26620)]. In der Prostata wird SHBG hauptsächlich von den epithelialen Zellen synthetisiert und sezerniert [64 (S. 26620f)]. Für die anderen Gewebe ist allerdings bislang ungeklärt, ob SHBG tatsächlich lokal exprimiert oder nur aus dem Plasma internalisiert wird und ob es sich um leberspezifisches SHBG oder um eine veränderte Form des Proteins handelt [22 (S. 5681); 64 (S. 26621f); 69 (S. 118)].

1.1.2. SHBG-Gen

SHBG wird beim Menschen von einem einzelnen Gen (*Shbg*) auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 in der Region p12-p13 kodiert [15 (S. 66); 51 (S. 197); 68 (S. 240); 69 (S.113); 108 (S. 706)] und nach den Mendel'schen Gesetzen einfach autosomal vererbt [15 (S. 65); 55 (S. 74); 108 (S. 706); 127 (S. 233)]. Die beiden kodominanten Allele SHBG¹ und SHBG² kommen mit einer Frequenz von 85-99% bzw. 1-15% vor und kodieren für Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht (MG) [siehe unten; 31 (S. 236); 120 (S. 137f)]. *Shbg* setzt sich aus 8 zwischen 90 und 208 Basenpaaren (bp) langen Exons und ungewöhnlich kleinen Introns mit einer Länge zwischen 133 und 331 bp zusammen. Die einzige Ausnahme hiervon bildet das 733 bp umfassende Intron zwischen Exon 7 und 8. Damit wird die gesamte Gen-kodierende Region mit nur 3,2 Kilo-Basen (kb) incl. der Introns extrem kurz [53 (S. 1871); 68 (S. 246); 69 (S. 113)]. Es wird angenommen, dass eine hochkonservierte, 600 bp lange Region unmittelbar upstream des kodierenden Bereichs die wichtigsten regulatorischen Elemente enthält [68 (S. 246)]. Ein eindeutiger Promotor konnte jedoch noch nicht identifiziert werden [55 (S. 75); 100 (S. 744)]. So finden sich in der 5'-flankierenden Region der kodierenden Sequenz keine

TATA- oder CAAT-Boxen [55 (S. 75); 100 (S. 744)]. 115 bp 5'-wärts des Initiationscodons befindet sich eine Sequenz, die mit dem Leber-spezifischen Enhancer im Promotor des menschlichen α 1-Proteinase-Inhibitor-Gens verwandt ist. Diese Region könnte für die SHBG-Expression in der menschlichen Leber verantwortlich sein [53 (S. 1871)]. Eine Sequenz des P450-Aromatase-Gens ist ebenfalls im SHBG-Gen konserviert und könnte als spezifischer Sertoli-Zell-Enhancer für die Bildung von Androgen-bindendem Protein (ABP), einem SHBG-homologen Protein, im Hoden sorgen [68 (S. 246)]. Darüber hinaus befinden sich in der vermuteten Promotorregion viele weitere Proteinbindungsstellen, z.B. für den Hepatocyte nuclear factor-4 und für Stimulating protein-1 (SP-1) [68 (S. 246); 69 (S. 113)]. Nach der Translation der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) kann das Produkt von Shbg unterschiedlich, möglicherweise in Zelltyp-spezifischer Weise glykosiliert werden [50 (S. 545)]. Das SHBG-Gen kodiert neben SHBG und ABP auch für zwei weitere testikuläre mRNAs [15 (S. 65)]. Diese weisen beide veränderte Exon 1-Sequenzen auf. Bei einem der Transkripte fehlt Exon 7 [53 (S. 1870)]. Die zwei alternativen Exon 1-Sequenzen sind etwa 2 kb 5'-wärts des regulären Initiationscodons gelegen [68 (S. 251)] und sollen durch andere, bisher nicht näher charakterisierte Promotoren kontrolliert werden [69 (S. 113)]. Die zugehörigen Proteine wurden nie in Blut, Samenflüssigkeit oder Gewebshomogenisaten nachgewiesen und ihre biologische Funktion ist unklar [51 (S. 197)].

1.1.3. Proteinchemischer Aufbau

Natives SHBG ist ein homodimeres Glykoprotein [125 (S. 7589)] mit einem MG von etwa 90 Kilo-Dalton (kDa) [127 (S. 246)]. Das MG des Monomers beträgt etwa 50 kDa [127 (S. 246)], wovon der Peptidanteil 40 499 Dalton (Da) ausmacht [108 (S. 704); 112 (S. 520)].

SHBG geht aus einem 402 Aminosäuren (AS) umfassenden Vorläuferpeptid hervor, von dem die ersten 29 AS ein Signalpeptid bilden [50 (S. 544); 51 (S. 197)]. Nach dessen Abspaltung besteht das fertige Protein dann aus 373 AS-Resten [50 (S. 544); 51 (S. 197); 112 (S. 520)]. Der N-Terminus von aufgereinigtem SHBG ist aufgrund eines teilweisen proteolytischen Abbaus während Lagerung und/oder Aufreinigung heterogen: mit gleicher relativer Häufigkeit finden sich eine längere und eine kürzere aminoterminal Peptidsequenz, die sich nur durch das Fehlen von bis zu drei der endständigen AS unterscheiden [50 (S. 544); 52 (S. 822f); 125 (S. 7589)]. Von Leucin (Leu)-267 bis Glycin (Gly)-281 ist ein ungewöhnliches Muster alternierender Leucine in der Sequenz vorhanden. An den Positionen 164, 188, 333 und 361 des SHBG befinden sich Cystein (Cys)-Reste. Zwischen Cys-164 und -188 und zwischen Cys-333 und -361 bilden sich jeweils Disulfidbrücken aus, die für die richtige Faltung des Proteins und die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur sorgen [19 (S. 10628); 68 (S. 213)]. Hinsichtlich der Sekundärstruktur setzt sich SHBG v.a. aus einer großen Anzahl an β -Faltblättern zusammen, wovon 99% antiparallel verlaufen [11 (S. 341)].

Das SHBG-Monomer wird durch Prolin (Pro)-200 [54 (S. 103)] in zwei Teile geteilt [11 (S. 345)], die eine Tandem-Wiederholung von Laminin-G-ähnlichen Domänen darstellen [47 (S. 504f)]. Die N-terminale G-Domäne (AS-Reste 1-200) nimmt eine kugelige Form an und besteht aus zwei siebensträngigen, antiparallel aufeinander liegenden β -Faltblättern. Die β -Stränge 1-4 und 11-14 bilden ein „Schweizerrolle-Motiv“, während sich 5-7 und 8-10 mit ihren unmittelbaren Nachbarn zu einem antiparallelen β -Faltblatt verbinden. Daneben existieren zwei einfache Windungen α -helikaler Segmente innerhalb des „Schweizerrolle-Motivs“: eine stellt mit 15 AS-Resten die Verbindung der β -Stränge 11 und 12 her, bei der anderen handelt es sich vermutlich um die zwischen den Faltblättern kreuzende Verbindung der β -Stränge 10 und 11. N- und C-terminale G-Domäne werden nur durch ein 5 AS-Reste kurzes Stück verbunden, so dass die Beweglichkeit der C-terminalen Domäne stark eingeschränkt ist [47 (S. 505ff)].

Glykosilierung

Kohlenhydrate machen etwa 14% des gesamten MG des SHBG aus [100 (S. 736)]. An jedes SHBG-Monomer sind drei Kohlenhydratketten angeheftet. Dabei handelt es sich zum einen um zwei biantennäre Oligosaccharide, die N-glykosidisch mit den Asparagin (Asn)-Resten an den Positionen 351 und 367 verknüpft sind [50 (S. 544); 54 (S. 102); 68 (S. 212); 112 (S. 519f); 125 (S. 7589)]. Zum anderen findet sich ein O-glykosidisch verknüpfter Kohlenhydratrest am Threonin (Thr) in Position 7 [54 (S. 102); 68 (S. 210); 112 (S. 519f); 125 (S. 7589)]. Die Oligosaccharidketten setzen sich hauptsächlich aus N-Acetylglucosamin, Mannose, Sialinsäure, Galactose sowie einem variablen Gehalt an Fucose zusammen [52 (S. 821); 112 (S. 520)].

Unter der Mikroheterogenität des SHBG versteht man, dass sich die SHBG-Monomere eines Individuums in definierte, relativ ähnliche, jedoch nicht identische Subpopulationen auftrennen lassen [73 (S. 471)]. Beim häufigsten Genotyp SHBG 1-1 teilt sich das SHBG in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) im Verhältnis von 10:1 in eine schwere Hauptbande von etwa 50 bis 55 kDa und in eine leichte Nebenbande von etwa 46 bis 50 kDa auf (sog. zwei-bandiges SHBG). Ursache ist eine unterschiedliche Glykosolierung der SHBG-Protomere: je nachdem, ob eine oder zwei N-glykosidische Oligosaccharidketten an das Monomer angeheftet werden, entstehen leicht unterschiedliche MG der Monomere. Das Dimer ist dann eine Mischung von Untereinheiten verschiedenen MG, wobei die schweren Isoformen vorherrschen [32 (S. 2815); 38 (S. 8432); 55 (S. 71); 68 (S. 212f); 73 (S.467); 108 (S. 703); 120 (S. 138)].

Bei Menschen mit den Genotypen SHBG 1-2 und SHBG 2-2 teilt sich SHBG in der SDS-PAGE in drei Banden mit einer zusätzlichen Bande bei 56 kDa auf (sog. drei-bandiges SHBG). Beim SHBG 1-2 sind beide schweren Banden annähernd gleich stark und wesentlich stärker als die leichte Bande gefärbt, beim SHBG 2-2 zeigt die schwerste Bande bei 56 kDa mit Abstand die intensivste

Färbung [38 (S. 8432ff); 120 (S. 138)]. Die zusätzliche Bande bei 56 kDa entsteht durch eine Punktmutation im Allel SHBG², die zum Austausch der Asparaginsäure (Asp) an Position 327 durch Asn führt. An diese neue N-Glykosilierungsstelle wird eine weitere bisialysierte Polysaccharidkette angehängt und es entstehen SHBG-Monomere mit einem höheren MG [102 (S. 1068f)]. Trotzdem finden sich bei der drei-bandigen Form die gleichen Steroidbindungscharakteristika wie bei zwei-bandigem SHBG [68 (S. 219f); 102 (S. 1068); 120 (S. 138)].

Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine veränderte Glykosilierung weder Einfluss auf die Dimerisierung des SHBG noch auf die Affinität und Spezifität seiner Steroidbindung hat [32 (S. 2816); 50 (S. 545); 51 (S. 199); 68 (S. 213); 112 (S. 527, S. 530)]. Evtl. weisen aber die einzelnen Isoformen unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen Steroide auf [116 (S. 642)]. Mindestens eine N-Glykosilierung scheint für die effiziente Produktion und/oder Sekretion von SHBG notwendig zu sein [50 (S. 547); 51 (S. 198)]. Des Weiteren modulieren die Kohlenhydratketten die Bindung von SHBG an verschiedene Oligosaccharidrezeptoren, insb. den hepatischen Asialoglykoproteinrezeptor, und beeinflussen damit die SHBG-Elimination und dessen biologische Halbwertszeit (HWZ) [31 (S. 238f); 102 (S. 1069)]. Die Integrität der Oligosaccharidketten ist auch essentiell für die Bindung des SHBG an seinen Membranrezeptor [51 (S. 200); 112 (S. 527, S. 530)] und könnte eine differenzierte Regulation der Hormonbelieferung von Geweben ermöglichen [112 (S. 531)]. Unterschiedliche biologische Funktionen der SHBG-Isoformen sind also nicht auszuschließen [50 (S. 547f)].

Dimerisierungsdomäne und räumliche Struktur des Dimers

Die Dissoziationskonstante für die nicht-kovalente Assoziation der SHBG-Untereinheiten zum Dimer liegt als Hinweis auf eine sehr starke Interaktion in der Größenordnung von 10^{-11} bis 10^{-12} M [6 (S. 34453); 50 (S. 546); 68 (S. 207)]. Das Protein liegt entsprechend im Blut bei physiologischen SHBG-Konzentrationen nahe 10^{-7} mol/l fast ausschließlich als Dimer vor [50 (S. 546); 68 (S. 207); 100 (S. 736f); 112 (S. 523)]. Sowohl mit hoher Affinität bindende Steroide (z.B. 5 α -Dihydrotestosteron (17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-on, DHT), Testosteron (17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on, T) oder Estradiol (3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien, E2)) als auch divalente Kationen wie Calcium und Zink fördern die Assoziation der Monomere und stabilisieren das Dimer, wahrscheinlich über voneinander unabhängige Mechanismen [19 (S. 10628); 51 (S. 199); 100 (S. 737, S. 740)].

Da AS-Substitutionen zwischen den Resten Methionin (Met)-139 und Phenylalanin (Phe)-148 zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Dimerisierungsfähigkeit führen, war klar, dass dieser Proteinabschnitt eine wichtige Komponente der Dimerisierungsstelle bildet [19 (S. 10627); 50 (S. 550)]. Kristallstrukturanalysen zufolge wird sie von vier verschiedene Segmenten der N-terminalen G-Domäne des SHBG gebildet: den Strängen β 7 und β 10 sowie den Verbindungen zwischen den

Strängen $\beta 5/\beta 6$ und $\beta 11/\beta 12$ [6 (S. 34454)]. Der β -Strang 7 eines Monomers liegt dabei dem β -Strang 10 des zweiten Monomers an und umgekehrt [47 (S. 506f)].

Je 24 AS-Reste von jedem Monomer [6 (S. 34454)] nehmen unter Ausbildung von insgesamt 8 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Hauptketten an der Dimerisierung teil [47 (S. 506)]. Die β -Faltblätter dehnen sich dabei über die Dimerisierungsstelle hinweg aus, so dass sich zwei durchgängige 14-strängige β -Blätter ergeben [47 (S. 506)]. Im Zentrum der Kontaktstelle lagern sich die hydrophoben Seitenketten der phylogenetisch hochkonservierten AS-Reste Alanin (Ala)-85, Leu-87, Valin (Val)-89, Ala-91, Val-121, Leu-122 und Leu-124 dicht aneinander an [6 (S. 34454f)]. Dieser hydrophobe Kern spielt die zentrale Rolle bei der Homodimerisierung. Er wird durch die Zwischen- β -Faltblatt-Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine Vielzahl polarer Interaktionen, wie etwa zwei symmetrische Salzbrücken zwischen Asp-73 und Arginin (Arg)-125, ergänzt [6 (S. 34455); 47 (S. 506)].

Die C-terminalen G-Domänen jedes Monomers befinden sich rechts und links der dimerisierten N-terminalen G-Domänen, so dass sich für das SHBG-Dimer eine elongierte, zylindrische Form ähnlich einem kurzen Stab ergibt. Jede der vier globulären Untereinheiten hat einen Durchmesser von 4,3 nm. In der Elektronenmikroskopie ist das Dimer etwa 19 nm lang und 3 nm dick [11 (S. 344); 47 (S. 507f)].

Steroidbindung und Steroidbindungsdomäne

Steroidbindung

Humanes SHBG bindet Sexualsteroid. Die Stärke der SHBG-Steroid-Interaktion nimmt bei den natürlichen SHBG-Liganden in der Reihenfolge DHT, 2-Methoxy-Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-2,3,17 β -triol 2-methyl ether, 2MeOE2), T, Androstendiol, Androstandiol, E2, Estron (3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-on, E1) ab. Alle diese Liganden binden mit relativ hoher Affinität (Assoziationskonstante (K_a) $> 10^8 \text{ M}^{-1}$) [34 (S. 60); 68 (S. 215)]. Andere natürliche Steroide werden nur mit sehr viel geringeren Affinitäten gebunden [68 (S. 215)]. Die in der Literatur beschriebenen K_a der wichtigsten drei physiologischen Liganden des SHBG liegen für T etwa bei $0,5$ bis $1,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ [2 (S. 72); 34 (S. 59); 38 (S. 8430); 45 (S. 7612); 88 (S. 59); 127 (S. 250)], für DHT bei $2,0$ bis $3,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ [38 (S. 8430); 45 (S. 7612); 63 (S. 6049); 88 (S. 59); 127 (S. 250)] und für E2 bei $2,2$ bis $7,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ [34 (S. 59); 38 (S. 8430); 45 (S. 7612); 88 (S. 59); 127 (S. 250)]. Die Dissoziationskonstanten (K_d) der Steroide korrelieren invers mit den Assoziationskonstanten [127 (S. 251)] und betragen für DHT $0,27$ bis $1,5 \times 10^9 \text{ M}$ [20 (S. 1724); 100 (S. 736); 108 (S. 704); 124 (S. 901f)], für T $0,31$ bis $2,1 \times 10^9 \text{ M}$ [108 (S. 704); 124 (S. 901f)] und für E2 $0,3 \times 10^{10}$ bis $4,8 \times 10^8 \text{ M}$ [108 (S. 704); 124 (S. 901f)]. Die Dissoziation folgt dabei einer Kinetik 1. Ordnung [127 (S. 251)]. Bei

niedrigen Temperaturen ist die Affinität des SHBG zu den Steroiden größer als bei hohen Temperaturen, da mit sinkender Temperatur die Dissoziationskonstanten stärker abfallen als die Assoziationskonstanten [2 (S. 74)]. Bei Temperaturen > 60 °C sowie bei pH-Werten < 5 wird die Steroidbindungsaktivität irreversibel zerstört [109 (S. 532f)]. Es existiert jedoch kein scharfes pH-Optimum für eine hochaffine Steroidbindung, welche zwischen pH 5,4 und 11,2 erfolgen kann [127 (S. 251)]. Daneben wurde beschrieben, dass gesättigte, unveresterte Fettsäuren (FS) die Steroidbindung an SHBG verstärken, während ungesättigte FS sie hemmen [68 (S. 226)].

Für eine hochaffine Bindung an SHBG sind folgende drei Hauptmerkmale in der Steroidstruktur notwendig:

1. eine planare A- und B-Ring-Konformation [19 (S. 10622); 50 (S. 545)] mit einem möglichst kleinen Beugungswinkel zwischen Ring A und der Ebene der Ringe B, C und D [127 (S. 260)],
2. eine freie 17 β -Hydroxylgruppe [19 (S. 10622); 50 (S. 545); 88 (S. 58)] und
3. eine elektronegative, funktionelle Gruppe am C3 [19 (S. 10622); 50 (S. 545)], wobei sowohl Steroide mit axialer oder äquatorialer Hydroxylgruppe als auch Steroide mit einer Oxogruppe binden [88 (S. 58f); 127 (S. 261)].

Abgesehen von C17 und C3 führen Substitutionen an anderen Kohlenstoff-Atomen (C-Atomen) der hochaffinen SHBG-Liganden in den meisten Fällen zu einer Verminderung der Affinität, die bei den einzelnen Steroiden, abhängig von Größe und Polarität der Substituenten, unterschiedlich stark ausgeprägt ist [100 (S. 741); 127 (S. 261ff)]. Auch die Einführung einer oder mehrerer Doppelbindungen hat an den meisten Stellen eine Verminderung der Affinität zur Folge [127 (S. 263)].

Lange Zeit war unumstritten, dass das homodimere SHBG nur eine einzige, hochaffine Ligandenbindungsstelle besitzt [68 (S. 207); 112 (S. 523)] und entsprechend 1 mol Dimer 1 mol Steroid bindet [68 (S. 207); 108 (S. 703); 112 (S. 523)]. Hierbei wurde angenommen, dass beide Monomere als „Sandwich“ zusammen die Bindungsstelle bilden und das Steroid genau an der Dimerisierungsstelle bindet [68 (S. 207); 100 (S. 740)]. Alternativ wurde ein negativ kooperativer Effekt vorgeschlagen [68 (S. 207); 112 (S. 523)], bei dem die Bindung des Steroids an eine der Untereinheiten zu einer Konformationsänderung führt, die die Bindung eines weiteren Steroids an die andere Untereinheit verhindert [19 (S. 10628); 73 (S. 471); 112 (S. 523)]. In letzter Zeit konnte jedoch mittels verschiedener Techniken gezeigt werden, dass zwei mol Steroid pro mol Dimer gebunden werden [6 (S. 34455f); 47 (S. 506f); 91 (S. 13743f)]. Trotz gewisser methodischer Einwände [47 (S. 507); 91 (S. 13744)] scheint es also wahrscheinlich, dass jedes SHBG-Homodimer zwei gleich aktive Steroidbindungsstellen enthält [6 (S. 34456)].

Steroidbindungsdomäne

Nach gängiger Meinung konkurrieren alle SHBG-Liganden um die gleiche Bindungsstelle am SHBG [45 (S. 7609); 46 (S. 32086)]. Es sei allerdings erwähnt, dass auch Hinweise gefunden wurden, T und E2 könnten an unterschiedliche SHBG-Isoformen binden [116 (S. 642)]. Mit Photoaffinitätsmarkierungen wurden zunächst ein hydrophobes Fragment in der Nähe des C-Terminus zwischen den AS-Resten 296 und 338, Histidin (His)-235, Met-139 sowie Lysin (Lys)-134 als mögliche in die Steroidbindung involvierte AS identifiziert [45 (S. 7618); 50 (S. 545); 54 (S. 102ff); 94 (S. 18348); 100 (S. 741f)]. In nachfolgenden gezielten molekularbiologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die hydrophile, phylogenetisch schlecht konservierte Region im Bereich der AS-Reste 134-138 unmittelbar an der Steroidbindung beteiligt ist [19 (S. 10627); 21 (S. 228f); 50 (S. 549f)]. Als das für eine annähernd normale Steroidbindung benötigte kürzeste Peptid wurde die Sequenz von Leu-18 bis Isoleucin (Ile)-177 ermittelt [60 (S. 3234)]. Die beiden SHBG-Monomere sollten demnach, wie oben bereits beschrieben, eine AB zu BA „Sandwich“-Struktur mit einer hochaffinen Steroidbindungstasche an ihrer Berührungsstelle ausbilden [11 (S. 345); 19 (S. 10628); 20 (S. 1727); 50 (S. 550); 51 (S. 199); 52 (S. 823); 94 (S. 18349); 100 (S. 741)]. Die AS-Reste 134-139 könnten dann mit den A/B-Ring-Konformationen der Steroidliganden interagieren [19 (S. 10628)] und die Bindung hauptsächlich über hydrophobe Kräfte, daneben aber auch über van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen [88 (S. 58); 109 (S. 532)].

Durch Kristallstrukturanalysen konnte die Steroidbindungstasche des SHBG charakterisiert und damit obiges klassisches Modell widerlegt werden. Die Steroide interkalieren so im hydrophoben Kern der N-terminalen G-Domäne des SHBG zwischen die beiden β -Blätter, dass sich optimale Wasserstoffbrücken-Netzwerke mit den funktionellen Gruppen am C3 und C17 ausbilden. Daraus resultieren unterschiedliche Orientierungen für C18- und für C19-Steroide in der Bindungstasche. Die hydrophoben Interaktionen zwischen Steroid und den AS-Seitenketten hingegen können sich flexibel an verschiedene Liganden anpassen [46 (S. 32090)]. C19-Steroide, wie z.B. DHT und T, zeigen mit ihrer elektronegativen funktionellen Gruppe am C3 in das Innere des Proteins und sind am Serin (Ser)-42 mittels einer Wasserstoffbrückenbindung verankert. Zwischen der OH-Gruppe am C17 und Asp-65 und Asn-82 bilden sich ebenfalls Wasserstoffbrücken aus, die beide signifikant zur Bindung beitragen. Die hydrophobe Bindungstasche selbst ist von AS-Resten aus acht β -Strängen umgeben. Als wichtigste AS werden hier Phe-67, Met-107 und Met-139 angesehen. Die AS-Reste 130-135 bilden eine Art Deckel über der Steroidbindungsstelle. Konformationsänderungen dieser Schleifenstruktur im Rahmen der Ligandenbindung führen zu den unterschiedlichen Bindungskonstanten bei den verschiedenen Steroiden [46 (S. 32088f); 47 (S. 508)].

C18-Steroide, wie z.B. E2, besetzen die Bindungstasche genau in umgekehrter Richtung wie C19-Steroide. Das Ser-42 bildet in diesem Fall eine Wasserstoffbrückenbindung mit der OH-Gruppe am C17 aus. Daneben ist die Hydroxylgruppe am C17 des E2 als Wasserstoffbrückendonator noch

über eine zusätzliche Wasserstoffbrücke mit dem Peptidcarbonyl des Val-105 verbunden, wobei diese Wasserstoffbrücke wahrscheinlich funktionell sogar wichtiger ist als diejenige zum Ser-42. Entsprechend der Orientierung in der Bindungstasche bilden C18-Steroide eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen der C3-OH-Gruppe und Asp-65 aus. Die Interaktion mit Asn-82 ist beim E2 dagegen nur relativ schwach ausgeprägt [46 (S. 32089f)]. Die umgekehrte Lokalisation des E2 in der Steroidbindungsstelle führt dazu, dass das Schleifensegment Leu-131 bis His-136 in die Bindungstasche hinein gezogen wird und es in der Folge zu einer dezenten Konformationsänderung des Proteins kommt [46 (S. 32090f)]. Die Flexibilität der Schleifenstruktur, die durch die beiden flankierenden Pro-130 und -137 vermindert wird, beeinflusst entsprechend die Bindung von C18-Steroiden [5 (S. 45224); 46 (S. 32092)].

Metallbindung des SHBG und ihr Einfluss auf die Steroidbindung

Jedes SHBG-Monomer besitzt drei Metallbindungsstellen. An Stelle I wird Ca^{2+} koordinativ gebunden, was zur Stabilisierung des Dimers beiträgt. Sie befindet sich am Rand des β -Blatt-Sandwiches genau gegenüber und damit weit entfernt von der Steroidbindungsstasche. Ein Einfluss auf die Steroidbindung ist daher nicht anzunehmen [7 (S. 25920f); 47 (S. 507)]. Bei Metallbindungsstelle II handelt es sich um eine Zn^{2+} -Bindungsstelle. Das Zinkion ist dabei in der Nachbarschaft der Schleife über der Steroidbindungsstasche lokalisiert und soll für den spezifischen inhibitorischen Effekt von Zn^{2+} auf die E2- und 2MeOE2-Bindung verantwortlich sein. In Anwesenheit von Zn^{2+} wird das optimale Wasserstoffbrückennetzwerk der E2- und 2MeOE2-Bindung zerstört, da sich die Seitenkette von Asp-65 nach außen und damit weg vom Steroid dreht und zusammen mit His-83 und His-136 an der Zinkbindung teilnimmt [7 (S. 25920f, S. 25923f)]. Metallbindungsstelle III ist eine weitere Zn^{2+} -Bindungsstelle des SHBG. Das dort gebundene Zinkion interkaliert zwischen die beiden Verbindungsstränge $\beta 7/\beta 8$ und $\beta 9/\beta 10$ und vergrößert damit den Abstand der Salzbrücke zwischen den funktionellen Gruppen von His-101 und Asp-117. Da Stelle III nahe des Dimer-Interface gelegen ist, dient auch sie möglicherweise der Gesamtstabilisierung des Monomers [7 (S. 25922ff)].

Rezeptorbindungsdomäne

Als Region für die Interaktion von SHBG mit einem möglichen Membranrezeptor wurde das Peptid von AS-Rest 48 bis 57 vorgeschlagen [68 (S. 218); 69 (S. 114)], was sich experimentell aber nicht eindeutig beweisen ließ [11 (S. 339); 47 (S. 508)]. Da die Liganden-abhängigen Konformationsänderungen der Schleifenregion eine steroidspezifische Interaktion mit Plasmamembranrezeptoren ermöglichen würden, wird neuerdings die unmittelbare Nachbarschaft der

Steroidbindungstasche als mögliche Rezeptorbindungsdomäne diskutiert [5 (S. 45224); 46 (S. 32091); 47 (S. 508)].

1.1.4. Regulation der SHBG-Konzentration

Nichthormonale Regulation

Energiebilanz und Körperfettzusammensetzung, die wiederum von Nahrungsaufnahme und körperlicher Belastung abhängen, sind offensichtlich bei gesunden Menschen die wichtigsten Regulatoren des SHBG-Plasmaspiegels [105 (S. 242f)]. Die SHBG-Konzentrationen korrelieren dabei selbst bei normalgewichtigen Personen negativ mit dem Body-Mass-Index (BMI), der Waist-to-Hip-Ratio (WHR) und dem Körpergewicht [83 (S. 294)]. Die Zusammensetzung der Nahrung beeinflusst ebenfalls die SHBG-Spiegel. So führt eine niedrige Proteinaufnahme, möglicherweise vermittelt über Insulin, genauso wie ein niedriger Fettgehalt der Nahrung zu einer Erhöhung des SHBG [83 (S. 294); 104 (S. 153); 105 (S. 241); 109 (S. 533)]. Ein niedriger Kohlenhydrat- bzw. Ballaststoffgehalt der Nahrung hingegen vermindert das SHBG [83 (S. 294); 104 (S. 153); 105 (S. 241)]. Auch die Kalorienaufnahme an sich könnte ein wichtiger regulierender Faktor des SHBG-Spiegels sein [105 (S. 241)].

Hormonale Regulation

Hormone sind entscheidend an der Regulation des SHBG-Spiegels beteiligt [105 (S. 242)]. Bei HepG2-Zellen, einer humanen Hepatoblastom-Zelllinie [86 (S. 791); 108 (S. 705)], sind folgende Hormoneffekte zu beobachten:

- Estrogene und Thyroxin steigern die SHBG-Produktion, während
- Androgene, Insulin, Insulin like growth factor-1 (IGF-1), Prolaktin, Epidermal Growth Factor (EGF) und Transforming Growth Factor- α (TGF- α) diese vermindern [68 (S. 254); 86 (S. 793); 98 (S. 280); 104 (S. 149); 108 (S. 705f); 109 (S. 533); 128 (S. 84)].

Rückschlüsse auf die *in vivo*-Wirkung der jeweiligen Hormone bleiben aber schwierig. So sind Androgene *in vivo* zwar meist mit einem verminderten Plasma-SHBG assoziiert [108 (S. 706); 127 (S. 231)], abweichend von der *in vitro*-Situation gelang es aber zum Teil nicht, einen Effekt dieser Hormonklasse auf den SHBG-Spiegel zu zeigen [128 (S. 85)]. Estrogene sollen für die höhere SHBG-Konzentration bei Frauen, den leichten Unterschied in den SHBG-Spiegeln zwischen Luteal- und Follikelphase und den SHBG-Anstieg während der Schwangerschaft (SS) verantwortlich sein [108 (S. 706)]. Offensichtlich müssen sie aber *in vivo* eine bestimmte Grenzkonzentration überschreiten, bevor

sie die hepatische SHBG-Synthese induzieren können [127 (S. 230)]. Daher wird vermutet, dass Sexualsteroiden nur dann einen merklichen Effekt auf die SHBG-Produktion haben, wenn die Hepatozyten gegenüber supraphysiologischen Konzentrationen exponiert sind [128 (S. 85)].

Insulin und IGF-1 inhibieren die SHBG-Produktion von HepG2-Zellen. Außerdem konnten verschiedene *in vivo*-Studien eine negative Korrelation zwischen Insulinspiegel und SHBG zeigen [98 (S. 280f); 104 (S. 152); 108 (S. 707); 115 (S. 530); 128 (S. 84)]. Andererseits ist der Effekt von Insulin/IGF-1 auf SHBG in der Zellkultur relativ unspezifisch [104 (S. 152)] und es existieren genauso Studien am Menschen, in denen keine Assoziation zwischen Insulin- und SHBG-Spiegeln gefunden wurde [98 (S. 281)]. So ist die *in vivo*-Wirkung von Insulin auf den SHBG-Spiegel umstritten. Da die SHBG-Konzentration negativ mit der Häufigkeit der Insulinimpulse korreliert, spielt möglicherweise die Pulsatilität der Insulinfreisetzung die entscheidende Rolle. Der Abfall des SHBG mit häufigeren Impulsen könnte durch einen ineffizienten Rezeptor-Kreislauf erklärt werden, der zu einer prolongierten Inhibition der SHBG-Synthese führt [98 (S. 281)].

Bei den Schilddrüsen-Hormonen und Insulin ist eine direkte Regulation auf Ebene der Gene denkbar, wurde aber noch nicht eindeutig nachgewiesen [3 (S. 249); 68 (S. 255); 70 (S. 502)]. Bei den übrigen Hormonen sind wohl andere Mechanismen beteiligt. So könnten Sexualhormone ihre Effekte über posttranskriptionale Regulation oder wahrscheinlicher auf Ebene der Clearance ausüben [68 (S. 255f)]. Ihre Wirkung könnte auch kombiniert, teils direkt mediiert, teils durch Veränderungen der metabolischen Clearance-Rate, evtl. sogar durch eine intermediäre Substanz wie IGF-1, das über die Growth Hormon (GH)-Sekretion durch Sexualhormone beeinflusst wird, entstehen [108 (S. 707)].

Abbau des SHBG

Die Sialinsäurereste des SHBG verhindern einen schnellen hepatischen Abbau des Proteins [109 (S. 534)], werden jedoch im Laufe seiner Lebenszeit zunehmend entfernt. Das Asialoglykoprotein könnte dann an den hepatischen Asialoglykoproteinrezeptor binden und internalisiert werden. Die Plasmahalbwertszeit von SHBG beträgt dabei etwa 5 bis 6 Tage [108 (S. 704); 127 (S. 232)].

1.1.5. SHBG-Spiegel unter physiologischen Bedingungen

Folgende Werte können als Anhaltspunkte für normale SHBG-Plasmaspiegel gelten:

- Kinder (Mädchen und Jungen): etwa 85 nmol/l [127 (S. 228)]
- Männer: etwa 30 nmol/l [2 (S. 85)]
- Frauen: etwa 70 nmol/l [2 (S. 85)]

Im Laufe des Lebens kommt es beim Menschen zu physiologischen Änderungen des SHBG-Spiegels. So haben zum Zeitpunkt der Geburt Kinder beider Geschlechter niedrige SHBG-Spiegel im Bereich von gesunden Männern [2 (S. 82); 55 (S. 70); 123 (S. 1472)], da die fetalen Androgene aus der Nebennierenrinde (NNR) die SHBG-Synthese trotz hoher Estrogen-Spiegel inhibieren [2 (S. 82)]. Schon bald nach der Geburt steigt das SHBG an [2 (S. 82)] und erreicht vor der Pubertät bei Mädchen und Jungen dann sehr ähnliche, relativ hohe Konzentrationen von bis zu 90 nmol/l mit einem Maximum zwischen 5 und 7 Jahren [2 (S. 80); 55 (S. 70); 109 (S. 534); 127 (S. 227f)]. Aufgrund der geringen präpubertären Produktion von T und E2 wird in diesem Lebensabschnitt die SHBG-Synthese wohl nicht durch Sexualhormone beeinflusst, sondern eher durch die Schilddrüsen-Hormonspiegel bestimmt [2 (S. 80f)].

Während der Pubertät kommt es zu einem Abfall des SHBG, der bei Jungen deutlicher ausgeprägt ist als bei Mädchen [2 (S. 80); 104 (S. 152)]. Die einsetzende adrenale und gonadale Androgenproduktion ist hierfür verantwortlich. Da bei Frauen gleichzeitig auch die Estrogensynthese ansteigt, fällt bei ihnen das SHBG nicht so stark ab wie bei Männern [2 (S. 81)]. Der Erwachsenen-SHBG-Spiegel wird bei Frauen im Alter von 20 Jahren, bei Männern im Alter von 18 Jahren erreicht [109 (S. 535)] und ist bei Frauen etwa doppelt so hoch wie bei Männern [2 (S. 80); 30 (S. 387)]. Die SHBG-Spiegel erhöhen sich bei beiden Geschlechtern mit Erreichen des Erwachsenenalters wieder langsam [109 (S. 535)].

Bei Männern bleibt das SHBG bis zur 6. Lebensdekade annähernd konstant und beginnt dann deutlicher anzusteigen [2 (S. 81); 80 (S. 691)]. Ursache hierfür ist, dass mit zunehmendem Lebensalter bei Männern das Gesamt-Testosteron (GT) abfällt und das Gesamt-Estradiol (GE2) ansteigt. Der SHBG-Anstieg sorgt dafür, dass in dieser Lebensphase das freie Testosteron (fT) im Verhältnis zum GT noch stärker abfällt [80 (S. 692); 83 (S. 293); 104 (S. 152); 127 (S. 229)]. Bei Frauen wird eine Veränderung des SHBG-Spiegels im Rahmen der Menopause aufgrund des relativen Androgenüberschusses diskutiert. In dieser Lebensphase wurden aber sowohl unveränderte als auch erhöhte und erniedrigte SHBG-Spiegel beschrieben [25 (S. 2833); 115 (S. 530); 127 (S. 229)]. Als wichtigste Regulatoren des SHBG bei postmenopausalen Frauen gelten Fettmasse, körperliche Aktivität, Alkoholaufnahme, E2 und IGF-1, die allesamt den SHBG-Spiegel vermindern [128 (S. 84)].

Als Sonderfall ist die SS zu nennen, in der es von der 7. bis zur 30. Woche zu einer merklichen Zunahme der SHBG-Konzentration auf etwa 250-500 nmol/l kommt [2 (S. 81); 88 (S. 62); 109 (S. 535); 127 (S. 231)]. SHBG bleibt bis zu Geburt hoch [2 (S. 81); 127 (S. 231)] und fällt danach entsprechend seiner HWZ wieder auf Normalwerte ab [2 (S. 81)]. Dieser ausgeprägte SHBG-Anstieg beruht wahrscheinlich auf den hohen Estrogenspiegeln während der SS [123 (S. 1478)].

1.1.6. SHBG-Membranrezeptor

SHBG interagiert mit Proteinen auf der Plasmamembran einer Vielzahl von Androgen- und Estrogen-sensitiven Zellen und Geweben [35 (S. 661); 67 (S. 579); 68 (S. 232); 108 (S. 709)]. Dazu zählen die Brustkrebszelllinie MCF-7, die Prostatakarzinomzelllinie LnCaP, Brustgewebe, Lebergewebe, deziduales und prämenopausales Endometrium, Synzytiotrophoblast der Plazenta, männliche Keimzellen, Testes, Epididymis, Prostatagewebe und Gewebe von benigner Prostatahyperplasie [67 (S. 579); 68 (S. 229); 108 (S. 709)]. Das MG des SHBG-Rezeptors wurde zu etwa 170 kDa bestimmt, ansonsten konnte er auf molekularer Ebene noch nicht näher charakterisiert werden [68 (S. 230)]. Möglicherweise wird das SHBG für die Bindung an den Membranrezeptor von den rezeptortragenden Zellen selbst synthetisiert, was eine lokale Regulation dieses Signaltransduktionsweges ermöglichen würde [64 (S. 26622)].

Zur Steroidabhängigkeit der SHBG-Membranrezeptorinteraktion wurden stark widersprüchliche Ergebnisse präsentiert. In vielen Studien wurde gezeigt, dass nur mit spezifischen Steroidliganden beladenes SHBG an den zellulären Rezeptor bindet [100 (S. 746); 108 (S. 710); 111 (S. 462); 112 (S. 526)]. Durch die Bindung des Liganden sollen bestimmte strukturelle Elemente des SHBG eine ligandenspezifische räumliche Anordnung annehmen, welche dann durch für genau diese Determinante spezifische Membranrezeptoren auf den Zielzellen des jeweiligen Steroids erkannt wird. Nach Bindung an den Rezeptor dissoziiert der SHBG-Steroid-Komplex und das gebundene Steroid kann in die Zelle gelangen, während SHBG die Membran wieder verlässt [111 (S. 463); 112 (S. 529f)]. Mit Hilfe dieses Shuttle-Mechanismus könnten die Zielzellen zusätzlich selektiv auch die SHBG-gebundene Hormonfraktion aufnehmen [111 (S. 465)].

Allerdings wird auch in zahlreichen Studien beschrieben, dass nur unbeladenes SHBG an den Membranrezeptor bindet und erst die nachfolgende Bindung eines Steroids zur biologischen Wirkung führt [35 (S. 665); 63 (S. 6050f); 92 (S. 403)]. Der SHBG-Rezeptor scheint sein Signal dabei über ein G-Protein und eine Adenylatcyclase (AC) zu übertragen [35 (S. 666f); 93 (S. 214f)]. Sowohl aktive als auch inaktive Steroide mit hoher Affinität zu SHBG können die Bindung an den Membranrezeptor inhibieren. Die Induktion der AC-Aktivität ist jedoch beschränkt auf Steroide mit biologischer Aktivität [63 (S. 6049f); 92 (S. 403); 108 (S. 712)]. Entsprechend dieser Theorie ist SHBG ein allosterisches Protein, bei dem die Besetzung der Steroidbindungstasche zu einer Konformationsänderung führt, durch die die Rezeptorbindungsdomäne maskiert wird. Nur unbeladenes SHBG kann mit dem Rezeptor interagieren und dann auch weiterhin Steroide binden. Bindet ein biologisch aktives Steroid an den SHBG-Rezeptor-Komplex, so wird vermittelt über G-Proteine die AC induziert und es kommt zu einem intrazellulären Anstieg von 3'-5'-cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) [35 (S. 665); 63 (S. 6053f); 69 (S. 114f); 92 (S. 402f); 108 (S. 711f)]. Das SHBG-Rezeptor-Cyclase-System könnte somit ein vom Steroid-Rezeptor unabhängiger, 2nd-Messenger vermittelter Wirkungsmechanismus für Steroidhormone sein [92 (S. 403)].

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich beim SHBG-Rezeptor um Megalin handeln könnte [49 (S. 758)]. Megalin ist ein Mitglied der Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptor-Genfamilie und wird in vielen Steroid-sensitiven Geweben, insb. den Reproduktionsorganen, exprimiert [49 (S. 751)]. Es konnte gezeigt werden, dass Megalin als endozytotischer Rezeptor mit SHBG unabhängig von evtl. gebundenen Steroiden interagiert, dann internalisiert und in Lysosomen abgebaut wird. Falls das SHBG mit Steroiden beladen war, werden diese dabei freigesetzt und können Steroid-sensitive Gene induzieren. Auf diese Weise würde die Zelltyp-spezifische Aufnahme von proteingebundenen Sexualsteroiden ermöglicht [49 (S. 758, S. 760)].

1.1.7. Biologische Funktionen des SHBG

Um die Funktionen des SHBG zu verstehen, muss zunächst auf die Theorien zu den Wirkungsweisen der Steroidhormone eingegangen werden. Im Blut verteilen sich Steroidhormone auf eine frei zirkulierende und eine proteingebundene Fraktion [2 (S. 72); 62 (S. 629)]. Sexualsteroiden werden dabei im Plasma von Albumin mit geringer Spezifität und Affinität, jedoch hoher Bindungskapazität [2 (S. 72); 68 (S. 225)] und von SHBG mit hoher Spezifität und Affinität, aber niedriger Bindungskapazität gebunden [68 (S. 225)].

Nur freie Steroide können passiv aus dem Plasma durch die Zellmembran diffundieren. Die klassische „freie Hormon-Hypothese“ postuliert daher, dass nur diese Fraktion als biologisch aktiv anzusehen ist [2 (S. 72); 68 (S. 225); 96 (S. 173); 108 (S. 697); 127 (S. 199)]. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass nicht nur die freie Hormonfraktion die Zellen mit Steroiden versorgt [62 (S. 630); 96 (S. 173f); 111 (S. 459)]. Entsprechend wurde die sog. „proteingebundene Hormon-Hypothese“ entwickelt, nach der eine oder mehrere der proteingebundenen Formen, wahrscheinlich insb. die Albumin-gebundene Fraktion, für den Transport über biologische Membranen zur Verfügung stehen [62 (S. 630); 96 (S. 173f)]. Welche der beiden Hypothesen richtig ist, lässt sich augenblicklich noch nicht endgültig beurteilen.

SHBG ist ein Serumprotein und bindet DHT, T und E2 mit hoher Affinität im Blut. Aus dieser Tatsache resultieren mehrere seiner Funktionen.

Plasmafunktion

Zunächst fungiert SHBG als Transportprotein für die hydrophoben Estrogene und Androgene in einem wässrigen Kompartiment des Organismus, dem Blut [61 (S. 609)]. Allgemein akzeptiert ist, dass es sich bei SHBG um das Haupttransportprotein für DHT, T, Androstandiol und Androstendiol handelt [34 (S. 66)]. Die quantitative Bedeutung des SHBG für den Transport von E2 ist noch nicht definitiv

geklärt [124 (S. 902f)], wahrscheinlich spielt es aber auch hier eine wichtige Rolle [34 (S. 66); 127 (S. 257, S. 260)].

Da aufgrund der hohen Dissoziationsraten bei physiologischen Temperaturen die gebundenen Steroide schnell für die Zielzellen verfügbar gemacht werden können, wirkt SHBG darüber hinaus als Reservoir und Puffer für bioverfügbare Sexualsteroiden [68 (S. 225); 88 (S. 65); 109 (S. 534); 112 (S. 528f)]. Hierdurch werden schnell verlaufende Schwankungen des freien Hormons, z.B. durch verstärkte Aufnahme in die Zellen, ausgeglichen bzw. verlangsamt und eine akkurate Überwachung durch den Hypothalamus erst ermöglicht [2 (S. 73); 26 (S. 39); 88 (S. 65); 112 (S. 528)].

Aufgrund seiner hohen Affinität gegenüber den Sexualsteroiden reguliert SHBG das Verhältnis der einzelnen Hormonfraktionen (frei, SHBG-gebunden, Albumin-gebunden) untereinander und beeinflusst damit über die Größe der freien Fraktion auch die zelluläre Verfügbarkeit der Sexualsteroiden [67 (S. 579); 68 (S. 225)]. Einigkeit besteht darin, dass SHBG der Regulation der freien Konzentrationen von T, DHT und anderen 17 β -Hydroxy-Androgenen (17-OHA) dient. Umstritten ist hingegen, ob es angesichts der geringeren Affinität in kleinerem Ausmaß auch die freie Fraktion des E2 beeinflusst [68 (S. 226); 124 (S. 902f)].

Durch die unterschiedlichen Affinitäten von Androgenen und Estrogenen reguliert SHBG auch das Verhältnis von fT zu freiem Estradiol (fE2) und beeinflusst damit die Geschlechtshormon-Balance [127 (S. 200)]. Da SHBG T mit höherer Affinität bindet als E2 und die SHBG-Konzentration selbst vom Estrogen-Androgen-Verhältnis abhängt, wirkt SHBG als Verstärker der Sexualhormonwirkung. Ist das E2 erhöht, dann steigt das SHBG und das Verhältnis fT/fE2 sinkt. Dies führt wiederum zu einer verstärkten Estrogenwirkung. Sind jedoch die Androgene erhöht, so sinkt der SHBG-Spiegel, der Quotient aus fT und fE2 steigt an und die Testosteronaktivität dominiert noch stärker [2 (S. 77f); 26 (S. 39f); 88 (S. 65)]. Werden die Änderungen der SHBG-Konzentration durch Androgene oder Estrogene ausgelöst, entsteht dadurch ein sich selbst verstärkender Mechanismus [26 (S. 40)].

Als weitere wichtige Plasmafunktion des SHBG ist sein Effekt auf die metabolische Clearance rate (MCR) der Sexualsteroiden zu nennen [99 (S. 742f)]. Durch die Bindung an SHBG wird der hepatische Abbau der Steroide vermindert und damit deren MCR kontrolliert [2 (S. 78); 68 (S. 225); 104 (S. 149)]. Es besteht dabei eine inverse Beziehung zwischen MCR und Affinität zu SHBG, so dass die MCR von Androstendion > E2 > T > DHT [2 (S. 78)]. SHBG erfüllt damit eine Art „ökonomische Funktion“: es vermindert die notwendigen Steroid-Produktionsraten zur Aufrechterhaltung eines bestimmten freien Hormonspiegels [2 (S. 73)]. Es ist allgemein akzeptiert, dass SHBG in der Regulation der MCR von T eine wichtige Rolle spielt [99 (S. 743f)]. Weniger klar sind hingegen die Effekte von SHBG auf die MCR des E2 [101 (S. 311)]. Neben SHBG wird die MCR auch noch von anderen Faktoren, wie z.B. den Steroid-metabolisierenden Enzymen, beeinflusst. Bei E2 scheint der Einfluss dieser Faktoren größer zu sein als bei T [99 (S. 744); 101 (S. 313, S. 316)].

Membran- und Zellfunktion

Die Existenz von SHBG-Membranrezeptoren legt nahe, dass SHBG neben seinen Aufgaben im Blutplasma weitere, zelluläre Funktionen erfüllt. Die gängigste Vermutung besteht darin, dass es mit Hilfe der Membranrezeptoren am Transport von Sexualsteroiden über die Zellmembran beteiligt ist [100 (S. 745ff); 112 (S. 529f)]. Dabei könnte es sich um einen, zusätzlich zur passiven Diffusion vorhandenen, aktiven Transportmechanismus handeln, der durch die Zelle selbst reguliert werden kann und die Möglichkeit einer selektiven Versorgung von Zielzellen mit Sexualhormonen bietet [68 (S. 226f); 99 (S. 744)]. Darüber hinaus moduliert SHBG möglicherweise auch zusätzlich das Signal des Hormons: die SHBG-Interaktion mit den Rezeptoren an der Zellmembran könnte über die beschriebenen G-Proteine und cAMP zu einer Signaltransduktion via Proteinkinase A führen, die wiederum eine Translokation oder Aktivierung nukleärer Steroid-Rezeptoren bewirkt [67 (S. 584)]. Die vermutete SHBG-Produktion in Prostata- und Brustzellen deutet auf einen Effekt des SHBG bei der lokalen Modifikation der Steroidhormoneffekte hin. Das durch die lokal regulierte, intrazelluläre Synthese und Sekretion in den Zielzellen entstehende SHBG könnte an der Signaltransduktion über den SHBG-Rezeptor unabhängig vom Plasma-SHBG teilnehmen oder die intrazellulären freien Hormonspiegel kontrollieren und dadurch den Zugang der entsprechenden Steroide zu den intrazellulären Hormonrezeptoren beeinflussen [64 (S. 26622); 69 (S. 118)]. Über die tatsächliche biologische Wirkung der Signalübertragung durch den SHBG-Rezeptor ist wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass der SHBG-Signaltransduktionsweg mit einem Androgen-Rezeptor vermittelten Ereignis verbunden ist. Daneben scheint die SHBG-Signalkaskade auch das Zellwachstum zu beeinflussen [69 (S. 115, S. 118)].

1.2. SHBG und Erkrankungen außer Leberzirrhose

1.2.1. Allgemeines

Im Folgenden sollen kurz SHBG-Veränderungen bei verschiedenen pathologischen Zuständen beschrieben werden. Auf den Zusammenhang von SHBG und Leberzirrhose (Lci) wird im Anschluss daran separat und ausführlicher eingegangen. Grundsätzlich gilt, dass hohe SHBG-Spiegel eher einen feminisierenden Einfluss, niedrige SHBG-Spiegel eher eine maskulinisierende Wirkung haben [26 (S. 40)]. Aufgrund der hohen Affinität zu T ist der Einfluss von SHBG auf dieses Steroid besonders ausgeprägt [109 (S. 534)]. Finden die SHBG-Veränderungen in einem geschlossenen System mit intaktem Regelkreis aus Hypothalamus, Hypophyse und Hoden statt, dann kann durch eine adäquate Gegenregulation der Gonadotropine das fT im normalen Bereich gehalten werden [37 (S. 385)]. Die diagnostische Bedeutung des SHBG liegt v.a. in der Abschätzung des bioverfügbaren T und damit des

Androgenstatus und der peripheren Androgenaktivität [109 (S. 537)]. Die alleinige Bestimmung des GT ist hierzu nicht ausreichend [62 (S. 634)]. Mit Hilfe des sog. freien Androgen-Indexes (FAI) = $(\text{GT}/\text{SHBG}) \times 100$ erhält man jedoch ein sensitives Maß für den Androgenstatus [109 (S. 536)].

1.2.2. Hyperandrogenismus bei Frauen

Ein Hyperandrogenismus tritt bei Frauen häufig im Rahmen eines Polyzystischen Ovarialsyndroms (PCOS) auf und äußert sich klinisch in Form von Akne, Hirsutismus und Virilisierungerscheinungen [109 (S. 536)]. Nur bei etwa der Hälfte der Patientinnen findet sich ein erhöhtes GT und fT, bei in fast allen Fällen normalem fE2 [2 (S. 82); 10 (S. 899); 27 (S. 258); 109 (S. 536); 127 (S. 237f)]. Die Androgen-Estrogen-Imbalance entsteht also durch einen Anstieg des fT [127 (S. 238)]. 60% der Frauen mit Hyperandrogenismus, insb. jene mit normalem GT, weisen unterschiedlich stark erniedrigte SHBG-Spiegel von etwa 35 nmol/l auf [2 (S. 82); 27 (S. 257); 104 (S. 151); 108 (S. 707); 109 (S. 536); 123 (S. 1473); 127 (S. 237)]. Entsprechend steigt das Konzentrationsverhältnis 17-OHA/SHBG und der T/SHBG-Index an und die MCR des T erhöht sich [2 (S. 82); 10 (S. 900); 27 (S. 257); 109 (S. 536); 127 (S. 237f)]. Das verminderte SHBG ist zumindest teilweise durch die erhöhten Androgene zu erklären [108 (S. 707)], könnte aber auch durch den erhöhten BMI und die erhöhten Insulinspiegel bedingt sein [104 (S. 151)].

Der diagnostische Wert eines Anstieges von Parametern wie GT/SHBG oder nicht-SHBG-gebundenes T ist größer als der des GT-Anstieges, da GT/SHBG und SHBG bei Hyperandrogenismus häufiger abnormale Werte zeigen als GT oder fT. Die höhere diagnostische Genauigkeit von GT/SHBG gegenüber dem fT erklärt sich wahrscheinlich aus einer beträchtlichen biologischen Aktivität der Albumin-gebundenen T-Fraktion, deren Größe wiederum durch den SHBG-Spiegel mitbestimmt wird [27 (S. 260); 104 (S. 151f); 127 (S. 236)]. Darüber hinaus kann der SHBG-Spiegel oder noch besser der 17-OHA/SHBG-Quotient zur pathogenetischen Einordnung des Hirsutismus verwendet werden: sinkt das SHBG bzw. steigt 17-OHA/SHBG an, so ist eine primär hormonale Abnormalität zu vermuten; ist das SHBG bzw. das 17-OHA/SHBG-Verhältnis dagegen normal, handelt es sich eher um eine verstärkte Androgen-Sensitivität der Haut bei normalen Androgenspiegeln [2 (S. 82); 109 (S. 536f)].

1.2.3. Hypogonadismus bei Männern

Hypogonade Männer weisen durch die Gonadeninsuffizienz niedrige Spiegel an GT auf. Dies führt zu einem ausgeprägten Anstieg des SHBG auf etwa 100 nmol/l. Niedriges GT und hohes SHBG bedingen zusammen ein deutlich erniedrigtes fT mit starker Beeinträchtigung der T-Wirkung in den

Zielzellen [2 (S. 86); 109 (S. 535); 123 (S. 1472f); 127 (S. 233)]. Bei Therapie des männlichen Hypogonadismus mittels Androgen-Ersatztherapie oder humanem Choriongonadotropin (hCG) sinkt das SHBG [109 (S. 535); 127 (S. 234)].

1.2.4. Schilddrüsenerkrankungen

Bei einer latenten Hyperthyreose steigt das SHBG tendenziell, bei einer manifesten Hyperthyreose signifikant gegenüber Euthyreoten an [30 (S. 387); 56 (S. 758)]. Die Größe des Anstieges ist dabei unabhängig vom Vorhandensein etwaiger Schilddrüsen-Autoantikörper [3 (S. 251f); 56 (S. 758)] und der Geschlechtsunterschied der SHBG-Spiegel bleibt erhalten [30 (S. 388)]. Eine Thyreotoxikose führt zu SHBG-Spiegeln von etwa 140 nmol/l bei Männern und 170 nmol/l bei Frauen [127 (S. 234)]. Das erhöhte SHBG bedingt einen Abfall der MCR von T und E2 bei Hyperthyreose [124 (S. 903)]. Selbst die hohen SHBG-Spiegel im Rahmen einer Thyreotoxikose können durch thyreostatische Behandlung wieder normalisiert werden [2 (S. 88f); 108 (S. 706)].

Ein weiter Bereich möglicher SHBG-Werte von normal bis schwach erniedrigt wurde bei Hypothyreose gemessen [2 (S. 86); 56 (S. 759); 104 (S. 150); 108 (S. 706); 127 (S. 234)]. Der nur geringe Einfluss der Hypothyreose auf die SHBG-Spiegel könnte dadurch entstehen, dass ein größerer Anteil an SHBG-Isoformen mit einem höheren Gehalt an Sialinsäure vorliegt, der zu einem Anstieg der HWZ führt [24 (S. 101)]. Bei sämtlichen hypothyreoten Zuständen normalisiert sich das SHBG durch die Substitution von Schilddrüsen-Hormon [2 (S. 86); 56 (S. 759); 108 (S. 706)].

1.2.5. Hypophysenerkrankungen

Der hemmende Einfluss von Prolaktin und dem GH-assoziierten IGF-1 auf die hepatische SHBG-Produktion bedingt SHBG-Veränderungen bei Hypophysenerkrankungen.

Beim Prolaktinom findet sich entsprechend bei beiden Geschlechtern ein vermindertes SHBG (Männer etwa 17 nmol/l, Frauen etwa 43 nmol/l) [108 (S. 708); 109 (S. 535f); 127 (S. 234)]. Trotz niedriger GT-Spiegel ist der prozentuale Anteil des fT durch das verminderte SHBG erhöht, so dass die MCR von T und DHT ansteigt [127 (S. 234)]. Durch Behandlung mit Bromocriptin kann der SHBG-Spiegel wieder normalisiert werden [108 (S. 708); 127 (S. 234)].

Die vermehrte GH-Sekretion bei Akromegalie vermindert den SHBG-Spiegel bei Männern auf etwa 20 nmol/l und bei Frauen auf etwa 25 nmol/l [109 (S. 535f); 127 (S. 232)]. In der Folge kommt es zu einem Anstieg des fT, der zum einen das niedrige GT durch negative Rückkopplung auf die Hypophyse erklärt [127 (S. 232)] und zum anderen bei Frauen den bei dieser Erkrankung häufig zu beobachtenden Hirsutismus induziert [2 (S. 86)].

1.2.6. Metabolisches Syndrom

Mehrere der Komponenten des metabolischen Syndroms weisen eine Assoziation mit dem SHBG-Spiegel auf. So werden entsprechend der schon bei Normalgewichtigen zu beobachtenden negativen Korrelation zwischen SHBG und Körpergewicht bei beiden Geschlechtern mit bis zu 8,5 nmol/l bei stark Fettleibigen die niedrigsten SHBG-Spiegel überhaupt beobachtet [79 (S. 150); 105 (S. 238); 108 (S. 707); 109 (S. 536); 127 (S. 235)]. Als mögliche Ursache wird die begleitende Hyperinsulinämie oder eine veränderte Insulinpulsatilität diskutiert [98 (S. 281); 108 (S. 707f); 115 (S. 531)]. Durch Gewichtsreduktion kann das SHBG wieder erhöht werden [105 (S. 238); 108 (S. 707); 109 (S. 533)]. Der SHBG-Abfall führt zu einer verstärkten Elimination des T und könnte damit das verminderte GT und fT bei adipösen Männern erklären [70 (S. 505); 77 (S. 605); 108 (S. 707); 115 (S. 527f)]. Bei Frauen hingegen ist Fettleibigkeit mit einem mehr androgenen Geschlechtshormonprofil assoziiert [115 (S. 530)]. Dies könnte bei adipösen Frauen eine zusätzliche Erklärung für die beobachtete Verminderung des SHBG sein [105 (S. 239)].

Darüber hinaus zeigt sich in den meisten Studien eine positive Korrelation zwischen SHBG und High Density Lipoprotein (HDL) bzw. Apolipoprotein-A1 und eine negative mit den Triglyceridspiegeln [70 (S. 505); 79 (S. 148); 105 (S. 242); 108 (S. 708f); 115 (S. 530)]. Dies liegt wohl an der Wirkung des SHBG auf das Estrogen-Androgen-Gleichgewicht, das wiederum die Konzentration der Lipoproteine und Apolipoproteine des Serums mitbestimmt [105 (S. 242)]. Beispielsweise könnte SHBG die hepatische Lipasesynthese modulieren, indem es das Verhältnis der Synthese-stimulierenden Androgene und der Synthese-hemmenden Estrogene reguliert [115 (S. 531)].

Ein niedriges SHBG ist auch mit Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und Glucoseintoleranz assoziiert und damit ein unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten von Diabetes mellitus Typ 2 [70 (S. 505); 77 (S. 601); 98 (S. 279); 104 (S. 153); 115 (S. 530)]. Dies passt gut zur negativen Korrelation zwischen SHBG und Adipositas, die ja ebenfalls einen Risikofaktor für die Entwicklung des Typ 2-Diabetes darstellt [70 (S. 505)].

Bei Männern mit einem nicht-diabetischen metabolischen Syndrom finden sich insgesamt niedrigere Spiegel an GT, fT und SHBG und folglich häufiger ein Hypogonadismus als bei gesunden Männern [70 (S. 506); 77 (S. 605)]. Nicht-diabetische Männer mit niedrig-normalem GT, fT und SHBG weisen entsprechend ein erhöhtes Risiko für das metabolische Syndrom auf. Der milde Hypoandrogenismus kann daher als frühes Symptom des metabolischen Syndroms betrachtet werden. Die Ursache hierfür liegt in der biologischen Wirkung des T. Es führt zum Anstieg der Muskelmasse auf Kosten der Fettmasse, so dass sich die Insulinsensitivität erhöht und die abdominelle Fettleibigkeit durch Hemmung der Lipoproteinlipase sinkt [77 (S. 605f)].

1.2.7. Medikamente und Alkohol

Zahlreiche Medikamente verändern über eine Beeinflussung der Syntheserate den SHBG-Spiegel [109 (S. 535)]. So steigt nach Thyroxin-Gabe die SHBG-Sekretion an [108 (S. 705)]. Auch exogen verabreichte Estrogene führen zu einem SHBG-Anstieg bis auf 350 nmol/l. Dabei ist der Anstieg bei peroraler Administration ausgeprägter als bei perkutaner Gabe, da bei ersterer das Estrogen direkt in das Portalsystem gelangt und damit die Leber sehr hohen Konzentrationen ausgesetzt wird [104 (S. 151); 108 (S. 706); 109 (S. 535); 127 (S. 231)]. Androgengabe bei hypogonaden Männern führt zu einem SHBG-Abfall, an dem wahrscheinlich noch andere regulierende Faktoren wie z.B. Insulin oder IGF-1 beteiligt sind [104 (S. 151)]. Antiestrogene wie Tamoxifen oder Clomifen haben durch eine inhärente, schwache, estrogene Aktivität einen SHBG-Anstieg auf etwa 80 nmol/l zur Folge [104 (S. 151); 127 (S. 233)]. Das Antiandrogen Cyproteron-Acetat führt aufgrund seiner Androgen-ähnlichen Wirkung und/oder der zusätzlichen gestagenen Eigenschaften zu einem SHBG-Abfall auf etwa 25 nmol/l [104 (S. 151); 127 (S. 233)]. Danazol, welches zur Suppression des Hypophysenvorderlappens (HVL) verwendet wird, bewirkt langfristig ebenfalls einen drastischen Abfall des SHBG [127 (S. 233)]. Daneben erhöhen hepatische Enzyminduktoren, wie z.B. Phenytoin, Barbiturate und Rifampicin, den SHBG-Spiegel, während Glucocorticoide ihn senken [70 (S. 502); 108 (S. 705); 109 (S. 535); 123 (S. 1476)].

Bei mäßiger Alkoholaufnahme wurden erniedrigte SHBG-Spiegel gemessen, die vermutlich in Zusammenhang mit der Alkohol-induzierten verstärkten Aromatisierung von T stehen [105 (S. 243); 128 (S. 85)]. Nicht-zirrhose Alkoholiker weisen hingegen erhöhte SHBG-Konzentrationen (etwa 130 nmol/l) mit einer veränderten Kohlenhydratzusammensetzung des Bindungsproteins auf. So enthält das SHBG bei Alkoholikern komplexere Oligosaccharidketten und/oder einen höheren Anteil unglykosilierter Formen. Wahrscheinlich beeinträchtigt die chronische Alkoholaufnahme die Glykosylierung im Rahmen der SHBG-Synthese, z.B. durch Hemmung der Sialyltransferase der Hepatozyten [119 (S. 278f)]. Die erhöhten SHBG-Konzentrationen könnten zu dem bei Alkoholikern häufig zu beobachtenden Hypoandrogenismus beitragen [119 (S. 276)].

1.3. Leberzirrhose

1.3.1. Einführung

Bei der Lci handelt es sich um eine chronische, diffuse Lebererkrankung, bei der es durch eine entzündliche Fibrose mit Ausbildung bindegewebiger Septen zur Zerstörung der Läppchen- und Gefäßstruktur der Leber kommt [59 (S. 461); 103 (S. 641)].

Die Lci ist die gemeinsame Endstrecke verschiedenster Noxen, die zu einem chronischen Untergang von Leberzellen führen. In Europa und Nordamerika steht Alkoholabusus an erster Stelle der Ursachen, gefolgt von den chronischen Virushepatitiden B, C und D. Daneben kann noch eine Vielzahl anderer Erkrankungen ebenfalls zur Lci führen [59 (S. 461); 103 (S. 642); 106 (S. 1296)].

Die Symptomatik der Lci ist vielgestaltig. Häufig finden sich unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Leistungsminderung, Druck- und Völlegefühl im Oberbauch und Gewichtsabnahme. Außerdem sind meist Leberhautzeichen vorhanden. Dazu zählen u.a. Spider naevi, Palmar- und Plantarerythem, „Lacklippen“ und „Lackzunge“. Typischerweise weisen die Patienten auch Zeichen hormoneller Störungen auf. So leiden Männer häufig an Hypogonadismus- und Feminisierungssymptomen: verminderte Libido, Potenzstörungen, Verlust der männlichen Sekundärbehaarung (Bauchglatze) und Gynäkomastie [59 (S. 461); 70 (S. 502); 103 (S. 641)]. Häufig findet sich dabei eine Hodenatrophie mit verminderter Spermatogenese und peritubulärer Fibrose [70 (S. 502)]. Diese Auffälligkeiten deuten auf eine verminderte androgene und eine erhöhte estrogene Aktivität hin [72 (S. 749); 121 (S. 87)]. Auch Frauen zeigen endokrine Symptome und klagen über Menstruationsstörungen und sekundäre Amenorrhoe [59 (S. 461); 103 (S. 641)]. Der Schweregrad und damit auch die Prognose der Lci kann mit Hilfe des **Child-Pugh-Scores** abgeschätzt werden. Mit den Kriterien Albuminspiegel, Bilirubinspiegel, Quick-Wert und Vorhandensein und Schwere von Aszites und Enzephalopathie wird zunächst ein Punktwert errechnet. Anhand dessen erfolgt dann eine Einteilung in die Klassen A, B oder C, wobei von Klasse A zu Klasse C die Schwere der Erkrankung zunimmt [59 (S. 462f); 106 (S. 1298f)].

Die Prognose der Lci wird zum einen durch die Ätiologie und die daraus resultierenden Möglichkeiten einer ursächlichen Behandlung bestimmt. So zeigt die alkoholtoxische Lci bei Abstinenz einen verhältnismäßig günstigen Verlauf. Zum anderen bestimmen die Schwere der Lci und das Auftreten von Komplikationen entscheidend die Prognose. Patienten im Stadium Child A überleben im Durchschnitt zwischen 5 und 10 Jahre, während Child C-Patienten nur eine mittlere Überlebenszeit von mehreren Monaten haben. Die häufigsten Todesursachen sind Leberversagen, Varizenblutung und das Leberzellkarzinom [59 (S. 463); 106 (S. 1299)].

Sowohl bei Männern als auch bei Frauen mit Lci finden sich also Symptome, die auf das Vorhandensein hormoneller Störungen hinweisen. Entsprechend des sich stark unterscheidenden Hormonhaushalts von Männern und Frauen ist anzunehmen, dass auch die hormonellen Störungen bei Lci voneinander abweichen. In dieser Arbeit wurde die Androgenbindung von männlichen Leberzirrhotikern untersucht. Dementsprechend beziehen sich alle folgenden Ausführungen ausschließlich auf Männer. Einen Überblick über die wichtigsten Parameter des Sexual-Hormonhaushaltes, wie sie in bisherigen Studien bei männlichen Patienten mit Lci bestimmt wurden, gibt Tabelle (Tab.) 1.

Parameter	GT (nmol/l)	FT (pmol/l)	Androstendion (nmol/l)	DHEAS (nmol/l)	GE2 (pmol/l)	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	Prolaktin (mIU/ml)	SHBG (nmol/l)
gesunde Männer	10,4-34,7 [1 (S. 59)]	20-39: 31-94 40-59: 25-80 60-80: 19-68 [Herstellerangaben]	4,2-16,8 [1 (S. 47)]	35-54: 1190-11500 ab 55: 434-3800 [1 (S. 50)]	36,7-110,1 [1 (S. 56)]	1,0-7,0 [1 (S. 56)]	1,0-10,0 [1 (S. 52)]	< 0,504 [1 (S. 58)]	20-50 [1 (S. 59)]
Lci ohne nähere Angabe [36 (S. 99); 41 (S. 566f); 48 (S. 204); 75 (S. 1022f); 84 (S. 630); 95 (S. 820); 114 (S. 5107)]	11,8-21,9	36,4-43,4	3,5-20,2	1670	91,8-201,9	4,7	5,7	o. A.	58,9-168,8
nach Ätiologie									
alkoholische Lci [72 (S. 747); 122 (S. 41ff); 126 (S. 533)]	10,8-20,8	51,0	15,0	1190	135,8-223,9	7,6-22,0	9,7-20,0	0,263	68
virale Lci [72 (S. 747); 122 (S. 41ff); 126 (S. 533)]	10,4-25,3	66,6	15,0	1520	128,5-220,2	7,3-26,6	11,0-28,1	0,233	66
nach Schwere									
Child A [12 (S. 369)]	23,1	170	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	166
Child B [12 (S. 369)]	15,8	140	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	194
Child C [12 (S. 369)]	6,0	100	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	o. A.	189
Lci ohne Aszites [33 (S. 275)]	19,2	89,5	6,98	o. A.	97,6	11	18,8	0,142	73,5
Lci mit Aszites [33 (S. 275)]	8,0	38,8	5,7	o. A.	86,6	13,2	11,9	0,214	49,9
Lci mit Aszites und Enzephalopathie [33 (S. 275)]	5,5	36,4	1,39	o. A.	106	19,9	14,7	0,485	50,8
Endstadium vor Transplantation [89 (S. 463)]	8,4	4,9	o. A.	o. A.	206,7	4,2	4,3	0,430	63,1

Tab. 1: Hormonhaushalt bei Männern mit Lci (Mittelwerte; o. A., ohne Angabe).

1.3.2. Serum-Androgenspiegel bei Leberzirrhose

Bei Lci wurden ein vermindertes [8 (S. 153); 42 (S. 1020); 48 (S. 206); 70 (S. 502); 84 (S. 631); 89 (S. 463); 126 (S. 533)], niedrig-normales [8 (S. 153); 33 (S. 273); 65 (S. 370)], normales [41 (S. 566); 72 (S. 747)] und, zumindest in den kompensierten Stadien, sogar ein erhöhtes GT [40 (S. 376)] gemessen (siehe Tab. 1). Typischerweise zeigt sich, dass die GT-Spiegel stärker als bei gesunden Männern variieren [40 (S. 375); 41 (S. 566)]. Teilweise wurde eine verminderte T-Synthesekapazität der Testes festgestellt [75 (S. 1021)], die insb. bei Gabe von hCG deutlich wird [8 (S. 165, S. 168)]. Folglich muss ein höherer Anteil des Plasma-T aus der peripheren Konversion von Androstendion stammen [42 (S. 1022)]. Angesichts der verminderten testikulären T-Synthese wurde eine evtl. erhöhte T-Konzentration durch die mit der Leberzirrhose assoziierte SHBG-Erhöhung erklärt, die zu einer Verminderung der MCR von T führt. Daneben soll bei Männern mit alkoholischer Lci T bedingt durch das Ethanol insgesamt langsamer metabolisiert werden [40 (S. 376)]. Das GT korreliert bei Lci positiv mit dem fT, Androstendion, Albumin und Triiodthyronin (T₃), wobei es sich bei den letzten beiden Parametern um eine Kovariation mit der Schwere des Leberschadens handelt [12 (S. 371); 33 (S. 273); 41 (S. 566)]. Charakteristischerweise vermindert sich mit zunehmender Schwere der Lci sowohl das GT als auch das nicht-SHBG-gebundene T [12 (S. 369); 40 (S. 376); 65 (S. 370)]. Dabei fällt die Produktionsrate (PR) des T auf ein Viertel und die Konversion des Androstendions in T wird deutlich gesteigert. Gleichzeitig vermindert sich auch die Eliminationsrate des T [65 (S. 370)].

Einheitlicher stellt sich die Situation bei den fT-Spiegeln dar (siehe Tab. 1), die in fast allen Studien als vermindert ermittelt wurden [8 (S. 156); 33 (S. 273); 36 (S. 100); 40 (S. 375); 41 (S. 566); 65 (S. 370); 72 (S. 747); 89 (S. 463)], z.T. auch kombiniert mit einem erniedrigten nicht-SHBG-gebundenem T [40 (S. 375); 41 (S. 566)]. Ein etwaiger Abfall des GT bei Lci wird zusätzlich durch das erhöhte SHBG verstärkt, so dass der Abfall des freien, biologisch aktiven T größer ist als der Abfall des GT vermuten lässt [8 (S. 149); 84 (S. 632); 89 (S. 465)]. Auch das fT vermindert sich bei abnehmender Leberfunktion [33 (S. 273); 40 (S. 376); 41 (S. 566); 65 (S. 371); 72 (S. 747)].

Androstendionmessungen bei männlichen Leberzirrhosekranken (siehe Tab. 1) zeigten z.T. Erhöhungen des Hormons [9 (S. 258); 33 (S. 273); 42 (S. 1020); 48 (S. 206); 72 (S. 747)], z.T. aber auch keinen Unterschied zu gesunden Männern [84 (S. 631)]. Eine erhöhte Aktivität des 17-Oxidoreduktase-Weges, eine vermehrte adrenale Produktion oder eine vermehrte periphere Konversion von anderen Vorläufern als T könnten die Androstendionerhöhung erklären [42 (S. 1023f)]. Bei sehr fortgeschrittener Erkrankung ist ein abrupter Abfall des zunächst supranormalen Androstendions auf stark erniedrigte Werte zu beobachten [33 (S. 273)]. Da eine verstärkte periphere Konversion von T zu Androstendion bei Lci bekannt ist, könnte die verminderte T-Produktion bei schwerer zirrhotischer Leberschädigung die Ursache für diesen Androstendion-Abfall sein [33 (S. 273f)].

Bei Lci wurde weiterhin ein mit $6,6 \pm 3,1$ nmol/l vermindertes Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on, DHEA) gefunden (Normalwert: 13,9-24,3 nmol/l) [48 (S. 204); 70 (S.

502)]. Da es sich bei DHEA um den Precursor des Dehydroepiandrosteron-Sulfats (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on-sulfat, DHEAS) handelt [81 (S. 3)], verwundert es nicht, dass bei männlichen Leberzirrhose, insb. in fortgeschrittenen Stadien, auch z.T. erniedrigte DHEAS-Spiegel gemessen wurden [9 (S. 258f); 72 (S. 747); 85 (S. 306f)]. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Zeichen einer erschöpften adrenalen Reserve [13 (S. 437)]. Die genaue Ursache der DHEAS-Verminderung bei Lci sowie ihre Folgen konnten bisher noch nicht geklärt werden.

1.3.3. Serum-Estrogenspiegel bei Leberzirrhose

Bei männlichen Lci-Patienten wurden für GE2 Werte von normal [8 (S. 152); 33 (S. 273); 65 (S. 371)] über mäßig bis deutlich erhöht [8 (S. 152); 36 (S. 100); 41 (S. 568); 48 (S. 206); 65 (S. 371); 70 (S. 205); 72 (S. 747); 84 (S. 631); 126 (S. 533)] beschrieben (siehe Tab. 1). Dabei waren in den meisten, jedoch nicht in allen Studien, sowohl die Konzentrationen des fE2 als auch des nicht-SHBG-gebundenen E2 erhöht [2 (S. 86); 8 (S. 156); 39 (S. 385)]. Der Anteil des fE2 am GE2 ist vermindert [8 (S. 156)], was wahrscheinlich durch das erhöhte SHBG bedingt ist.

Eine Erhöhung des Gesamt-Estrons (GE1), die wesentlich deutlicher ausfällt als eine evtl. GE2-Erhöhung, ist bei männlichen Lci-Patienten ein relativ konsistenter Befund [33 (S. 273); 48 (S. 204); 65 (S. 371); 84 (S. 631)]. Da bei Lci die MCR sowohl von Estradiol als auch z. T. von E1 als normal bestimmt wurden [84 (S. 631); 121 (S. 90)], vermutet man, dass der erhöhte Spiegel des E1-Vorläufers Androstendion und die verstärkte Konversion von Androstendion zu E1 bei gleichbleibender Konversion von T zu E2 für die stärkere Erhöhung des GE1 im Vergleich zum GE2 verantwortlich ist [48 (S. 207); 121 (S. 90)]. Auch eine Erhöhung des Estriols ist über die verschiedenen Studien hinweg ein relativ konstanter Befund bei Lci [9 (S. 258)].

Mit zunehmendem Leberschaden steigt der Spiegel von E1 und E2 deutlich an [33 (S. 273); 41 (S. 568); 65 (S. 371); 72 (S. 747); 75 (S. 1022)].

1.3.4. Hepatischer Androgen- und Estrogenmetabolismus bei Leberzirrhose

Die Abnormalitäten der Sexualhormonspiegel bei Lci entstehen durch eine Kombination von Veränderungen der PR, des peripheren Metabolismus und der hepatischen Elimination [48 (S. 206f)]. Der periphere Metabolismus gewinnt bei Lci an Bedeutung, da bei normaler Auswurfleistung des Herzens und einem geringeren Blutfluss durch die Leber der periphere Blutfluss und damit auch der Steroidmetabolismus durch diese Gewebe ansteigt [84 (S. 632)].

Die PR des T ist bei Lci signifikant erniedrigt, so dass eine verminderte testikuläre Sekretion angenommen wird [8 (S. 158); 42 (S. 1020); 84 (S. 631f)]. Ein wesentlich größerer Anteil des T

stammt dabei aus der peripheren Konversion von Androstendion [42 (S. 1022)]. Bei Lci wurde meist eine Verminderung der MCR des T nachgewiesen [8 (S. 158); 42 (S. 1020); 84 (S. 631)], die durch den Anstieg des SHBG-gebundenen T, das dem Metabolismus nicht sofort zur Verfügung steht, und den bei Lci verminderten Blutfluss durch die Leber zu begründen ist [84 (S. 632)]. Entsprechend besteht eine negative Korrelation zwischen der MCR von T und der SHBG-Bindungskapazität [8 (S. 161)]. Beim Androstendion hingegen ist die PR bei Lci als normal [84 (S. 631)] bzw. erhöht [42 (S. 1020)] beschrieben worden. Da dieses Androgen zu einem größeren Anteil aus der NNR stammt als T, ist seine Synthese durch eine bei Lci möglicherweise vorliegende testikuläre Funktionsstörung weniger betroffen [84 (S. 632)]. Die MCR von Androstendion ist bei Lci normal [42 (S. 1020); 84 (S. 631)].

Bei den Estrogenen zeigt sich, dass die PR sowohl von E1 als auch von E2 erhöht ist, wobei analog zu den Konzentrationen auch diejenige von E1 stärker ansteigt. Dieser Unterschied erklärt sich durch die normale PR von Androstendion, dem Hauptvorläufer des E1, und die verminderte PR von T, dem Hauptvorläufer von E2 [84 (S. 631)]. Die MCR von E1 ist bei Lci größer als bei gesunden Männern, die von E2 zeigt keinen signifikanten Unterschied [8 (S. 158); 42 (S. 1025); 84 (S. 631); 96 (S. 184); 105 (S. 243); 124 (S. 903); 127 (S. 235)]. Für den „Hyperestrogenismus“ bei Lci ist also eher eine verstärkte Estrogenproduktion als ein verminderter Estrogenabbau verantwortlich [84 (S. 632)].

Die differenzierten Veränderungen der MCR der einzelnen Steroide bei Lci entstehen durch den SHBG-Anstieg. Androstendion, E1 und E2 werden nur schwach an SHBG gebunden und die MCR bleibt gleich bzw. steigt bei E1 sogar an, während die MCR des T, das eine hohe Affinität zu SHBG aufweist, absinkt [84 (S. 632f)]. Für die normale MCR des E2 wird daneben noch eine Vielzahl an anderen möglichen Erklärungen diskutiert. So könnte der Abfall des Albumins den Effekt des SHBG-Anstiegs ausgleichen [2 (S. 86)], SHBG-gebundenes E2 teilweise für den Transport in die peripheren Gewebe zur Verfügung stehen und dort metabolisiert werden [8 (S. 169); 105 (S. 243); 127 (S. 235)] oder die selektive Veränderung der E2-bindenden Isoformen des SHBG bei Lci die normale MCR bedingen [70 (S. 502); 116 (S. 643)]. Die absolute hepatische Extraktionsrate der einzelnen Steroide wird darüber hinaus auch vom Ausmaß des Leberschadens mitbestimmt, da eine verminderte Hepatozytenzahl sowie intrahepatische Shunts ebenfalls die MCR verringern [48 (S. 205f)].

Bei Lci bestehen zusätzlich gravierende Veränderungen im peripheren Metabolismus der Sexualsteroiden. Die Konversionsraten von Androstendion zu E2 und von T zu E1 sind bei Lci erhöht, die der Estrogene E1 und E2 untereinander bleiben unverändert. Demgegenüber wurde die Konversion von Androstendion zu T als normal bis erhöht und von T zu Androstendion als erhöht gemessen. Die Aromatisierungsrate von T zu E2 wurde teils als normal, teils als erhöht, diejenige von Androstendion zu E1 immer als erhöht beschrieben [42 (S. 1019f); 84 (S. 631f)]. Ursache hierfür ist die SHBG-Erhöhung, die dazu führt, dass das T trotz erhöhten Blutflusses weniger für den Eintritt in die aromatisierenden Gewebe zur Verfügung steht. Damit entsteht auch weniger E2 in der Peripherie. Androstendion hingegen wird nicht an SHBG gebunden, steht vollständig für den Eintritt in die

Gewebe zur Verfügung und wird dementsprechend auch verstärkt zu E1 aromatisiert [84 (S. 633)]. Damit trägt Androstendion bei männlichen Leberzirrhotikern maßgeblich zu den erhöhten Estrogenspiegeln bei und ist aufgrund seiner bei Lci meist erhöhten Konzentration im Vergleich zu gesunden Männern ein wesentlich wichtigerer Vorläufer des T [42 (S. 1022)].

Aus den Veränderungen der Hormonspiegel resultiert bei Lci eine Verschiebung des Estrogen-Androgen-Gleichgewichts: das GE2/GT- und das GE1/GT-Verhältnis ist erhöht. Die androgene Aktivität vermindert sich weitgehend parallel zur Verschlechterung der Leberfunktion, während die Korrelation zwischen Zunahme der estrogenen Aktivität und der Schwere der Leberdysfunktion wesentlich schwächer ist. Trotzdem steigt mit zunehmender Einschränkung der Leberfunktion der Estrogen/Androgen-Quotient zunehmend an, d.h. das Estrogenübergewicht verstärkt sich [9 (S. 258); 12 (S. 369); 33 (S. 273); 40 (S. 376); 41 (S. 568); 65 (S. 371); 70 (S. 502); 72 (S. 747)]. Darüber hinaus ist auch das für die biologische Wirkung entscheidende fE2/fT-Verhältnis erhöht und könnte für die regelmäßig zu beobachtende Feminisierung verantwortlich sein. So fand sich ein erhöhtes fE2/fT-Verhältnis insbesondere bei Patienten mit zusätzlicher Gynäkomastie [90 (S. 435)].

1.3.5. Gonadotropine und Prolaktin bei Leberzirrhose

Bei chronischem Leberversagen kommt es zu einer hypothalamischen Dysfunktion mit gestörter Gonadotropin Releasing-Hormon (GnRH)-Sekretion [89 (S. 461)]. Die resultierenden Spiegel an Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikelstimulierendem Hormon (FSH) zeigt Tab 1. Bei männlichen Leberzirrhotikern wurden sowohl normale [42 (S.1022); 65 (S. 370)] als auch erhöhte LH-Spiegel [8 (S. 154); 65 (S. 370)] sowie eine aufgehobene LH-Pulsatilität gefunden [9 (S. 260)]. Auch für FSH wurden normale [42 (S. 1022); 72 (S. 747)] bis erhöhte Spiegel gemessen [8 (S. 154); 41 (S. 568); 75 (S. 1023)]. Für beide Hormone gilt aber, dass, selbst wenn eine Erhöhung ihrer Konzentration beobachtet wurde, der Anstieg bezogen auf den Abfall des fT inadäquat niedrig ist [33 (S. 273); 41 (S. 568); 65 (S. 370); 72 (S. 749); 75 (S. 1024); 126 (S. 534)]. Dieser relative Gonadotropinmangel ist wohl hauptsächlich durch die erhöhten Estrogene bedingt, die über negative Feedback-Mechanismen LH und FSH supprimieren [70 (S. 502); 75 (S. 1023); 89 (S. 464f); 126 (S. 534)].

Von Prolaktin wurden bei Lci sowohl normale [72 (S. 747)] als auch erhöhte [89 (S. 463); 126 (S. 533)] Spiegel berichtet (siehe Tab. 1), wobei letztere v.a. in Fällen mit schwerer hepatischer Dekompensation vorkamen [33 (S. 273); 89 (S. 462f)]. Möglicherweise führt die portalsystemische Enzephalopathie zu einer Veränderung verschiedener Neurotransmitter der Prolaktinregulation und im Endeffekt zu einer Hyperprolaktinämie [33 (S. 275)].

1.3.6. Serum-SHBG-Spiegel bei Leberzirrhose

Für gewöhnlich werden bei Männern mit Lci erhöhte SHBG-Spiegel gefunden [siehe Tab. 1; 8 (S. 156); 33 (S. 273); 36 (S. 100); 40 (S. 375); 65 (S. 370); 71 (S. 139); 72 (S. 747); 89 (S. 463); 105 (S. 242)]. SHBG korreliert dabei positiv mit der Cholinesterase [90 (S. 435)] und mit dem GT, zeigt aber keine negative Assoziation mit dem fT [33 (S. 273); 40 (S. 375)]. Das T/SHBG-Verhältnis ist vermindert und zeigt eine positive Korrelation mit dem fT [90 (S. 435)]. Unter der Annahme, dass E2 und T an verschiedene Isoformen des SHBG binden, konnte gezeigt werden, dass es bei Lci zu einer Verschiebung selektiv der E2-bindenden Isoformen in Richtung Anode mit isoelektrischen Punkten (IEP) in saureren Bereichen kommt. Dies könnte erklären, warum bei Lci offensichtlich das SHBG-gebundene E2, aber nicht das SHBG-gebundene T für die Aufnahme in die Gewebe zur Verfügung steht [70 (S. 502); 96 (S. 184); 116 (S. 642f)].

Da bei Lci erhöhtes SHBG, testikuläre Unterfunktion und erhöhte Estrogen-Spiegel gleichzeitig vorkommen, ist es schwierig zu klären, ob der SHBG-Anstieg in der Leberdysfunktion selbst oder in den endokrinen Nebeneffekten der Lci begründet ist [105 (S. 243)]. Bisher ist es auch nicht gelungen, bei Lci eine klare Assoziation zwischen SHBG- und Sexualhormonspiegeln nachzuweisen [8 (S. 171); 33 (S. 274f); 36 (S. 100); 71 (S. 142)]. Auch die Schilddrüsen-Hormone können den SHBG-Anstieg bei Lci nicht erklären [12 (S. 370f)]. Bis jetzt ist daher die genaue Ursache der SHBG-Erhöhung bei Lci unklar. Am wahrscheinlichsten ist wohl eine hepatische Synthesesteigerung durch das Ungleichgewicht zwischen Androgenen und Estrogenen [2 (S. 87); 127 (S. 235)], die zu variablen Anteilen auch durch die Leberdysfunktion mitbeeinflusst wird, so dass die Assoziationen zwischen SHBG und Sexualhormonen maskiert werden [8 (S. 171)].

Zum Einfluss des Schweregrades der Lci auf den SHBG-Spiegel wurden widersprüchliche Resultate ermittelt. Trotz mancher gegenteiliger Untersuchungen, in denen die SHBG-Konzentrationen nicht vom Grad der Leberdysfunktion abhängen [8 (S. 162); 12 (S. 370); 40 (S. 376)] bzw. in fortgeschrittenen Stadien sogar ansteigen [71 (S. 140); 72 (S. 747)], erscheint ein Absinken des SHBG-Spiegels mit zunehmender Einschränkung der Lebersyntheseleistung am plausibelsten [33 (S. 273); 90 (S. 435)]. Dabei könnte der Anstieg zu Beginn der Erkrankung durch das Androgen-Estrogen-Ungleichgewicht oder eine gestörte Clearance des SHBG entstehen, während in späteren Stadien die verminderte hepatische Syntheseleistung ein größeres Gewicht erlangt [33 (S. 275); 89 (S. 465)].

Unumstritten sind dagegen die Folgen des erhöhten SHBG. Bei intakter Steroidbindung würden die biologisch aktiven Fraktionen fT und nicht-SHBG-gebundenes T absinken [12 (S. 367); 41 (S. 566)]. Dadurch erklärt sich die oben beschriebene Verminderung der MCR des T [41 (S. 568); 65 (S. 370)]. Außerdem würden die bei Lci sowieso schon zumindest grenzwertig niedrigen GT-Spiegel durch die SHBG-Erhöhung verstärkt und der Abfall des fT wäre noch ausgeprägter als der des GT [84 (S. 632); 89 (S. 465)]. Da SHBG aufgrund seiner unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zu den einzelnen

Steroiden bei einer Erhöhung zudem zu einer Verschiebung des Estrogen/Testosteron-Verhältnisses zugunsten der Estrogene führt [41 (S. 568); 65 (S. 371); 71 (S. 143)], scheint es in der Pathogenese von Hypogonadismus und Feminisierung bei männlichen Lci-Patienten eine entscheidende Rolle zu spielen [72 (S. 749)]. Allerdings reicht der erhöhte SHBG-Spiegel allein nicht aus, um die endokrinen Symptome zu erzeugen. Hierfür sind zusätzlich die oben beschriebenen Störungen des Sexualsteroid-metabolismus notwendig, die dann durch das hohe SHBG in beträchtlichem Maße verstärkt werden [26 (S. 39f); 71 (S. 143)].

1.3.7. Klinische Relevanz der Hormonveränderungen

Die klinischen Folgen des abnormalen Hormonhaushalts wurden kontrovers diskutiert, da es lange nicht gelang, eine Assoziation zwischen den Veränderungen der Sexualhormonspiegel und der endokrinen Symptomatik herauszuarbeiten [8 (S. 173f); 9 (S. 258f); 33 (S. 273); 41 (S. 568f); 65 (S. 371); 84 (S. 633)]. In neueren Studien mit größeren Fallzahlen konnte jedoch genau dieser Zusammenhang gezeigt werden. So weisen männliche Leberzirrotiker mit Gynäkomastie höhere SHBG-, E1-, GE2- und Androstendion- sowie niedrigere GT-Spiegel auf als Erkrankte ohne Gynäkomastie [71 (S. 139)]. Die hormonellen Symptome bei Lci resultieren dabei wohl eher aus einem Abfall des fT als aus einem Anstieg des fE2 [2 (S. 87)]. Die Schwere der endokrinen Symptomatik nimmt ähnlich der Ausprägung der hormonellen Veränderungen mit sich verschlechternder Leberfunktion zu [41 (S. 569)].

Das Sexualhormonungleichgewicht mit erhöhtem E1 und E2 und vermindertem T, das zusätzlich durch die SHBG-Erhöhung verstärkt wird, ist also offensichtlich für die bei chronischen Lebererkrankungen zu beobachtende Gynäkomastie und den Hypogonadismus verantwortlich [74 (S. 275)]. Es scheint so, dass die Feminisierungssymptome weniger mit den Plasma-Estrogenspiegeln assoziiert sind, sondern dass das Estrogen-Androgen-Verhältnis und die stark unterschiedliche Sensitivität von männlichem Brustgewebe auf Estrogene viel wichtigere Faktoren sind [65 (S. 371); 70 (S. 502)]. Bei Lci könnten daneben auch die erhöhten Prolaktinspiegel oder zyklische Veränderungen der Schwere der Lebererkrankung im Sinne einer Wiederauffütterungsgynäkomastie zur Symptomatik beitragen [8 (S. 172; S. 174); 70 (S. 502)].

1.4. Biosensorik

1.4.1. Prinzip und Aufbau des Surface Plasmon Resonance-Biosensors

Ein Biosensor ist eine analytische Einheit aus einem Festphasen-gebundenem biologischen Element, das zur reversiblen biospezifischen Interaktion mit einem Analyten zur Verfügung steht, und einem Signalwandler zur Detektion dieser Interaktion [87 (S. 5)]. Für die vorliegende Arbeit wurde ein optischer Biosensor verwendet, der nach dem sog. Surface Plasmon Resonance (SPR)-Prinzip arbeitet und die durch biospezifische Interaktionen ausgelösten Konzentrationsänderungen an einer Messchip-Oberfläche anhand der dabei entstehenden Veränderungen des Refraktionsindex (RI) quantifiziert.

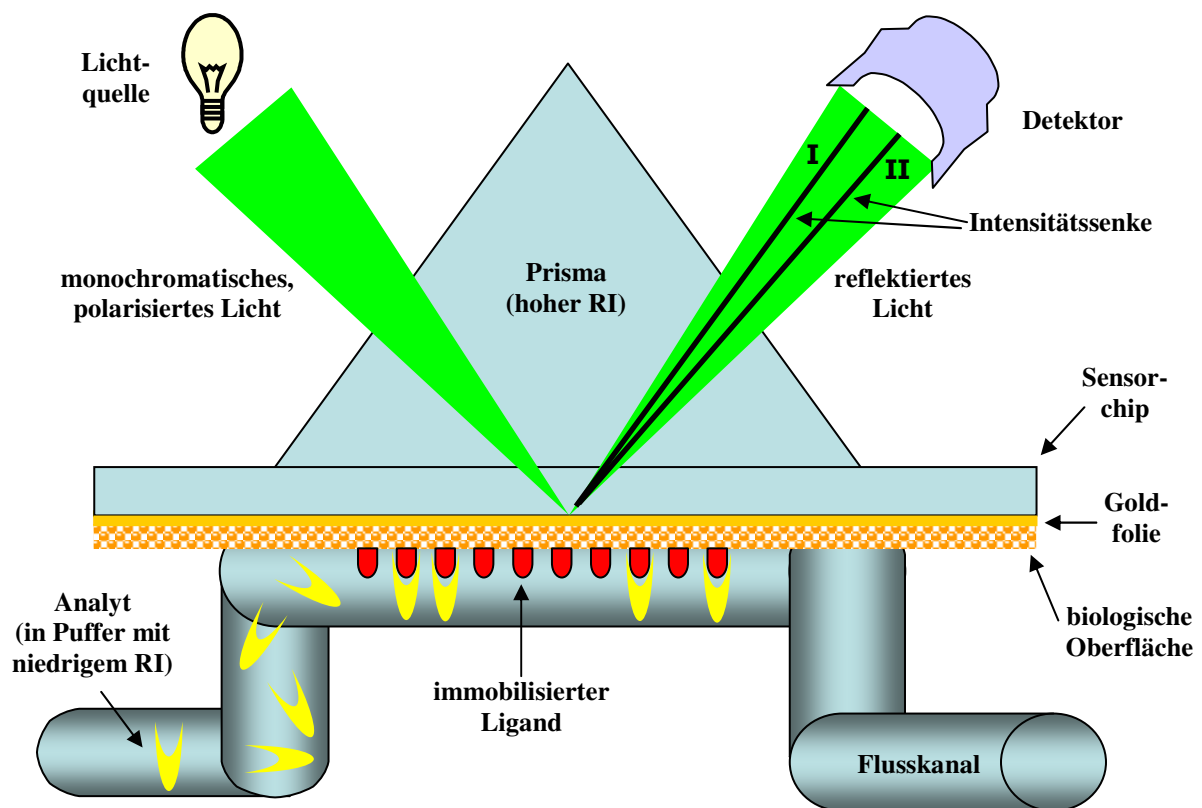


Abb. 1: Prinzip des SPR-Effektes. Bei biospezifischer Interaktion an der Sensorchipoberfläche verschiebt sich die Intensitätssenkung des reflektierten Lichtes von Position I in Position II.

Zum Phänomen der SPR kommt es, wenn monochromatisches, polarisiertes Licht unter den Bedingungen der Totalreflexion von einem Medium mit höherem RI in ein Medium mit niedrigerem RI eingestrahlt wird und sich an deren Kontaktstelle eine dünne Schicht aus sog. freiem Elektronen-Metall befindet. Dabei tritt bei einem bestimmten Einfallswinkel eine Intensitätssenkung des reflektierten Lichtes auf (siehe Abbildung (Abb.) 1). Ursache hierfür ist, dass die eingestrahlte Lichtenergie die Oberflächen-Elektronen des Metallfilms (Plasmonen) zu Oszillationen anregt. Dabei entsteht eine

exponentiell abfallende elektromagnetische Welle, die sog. evaneszente Welle, welche etwa eine Wellenlänge weit in das Medium mit niedrigerem RI eindringt. Der Energiegehalt der evaneszenten Welle erklärt den Intensitätsverlust des reflektierten Lichtes [18 (S. 4-1ff); 66 (S. 297f); 87 (S. 11)].

Der Winkel der Intensitätssenke des reflektierten Lichtes (sog. Resonanzwinkel) reagiert sehr sensitiv auf Veränderungen des RI einer dünnen Schicht zwischen Metall und Medium mit niedrigerem RI. Werden dort Biomoleküle adsorbiert oder interagieren sie mit schon immobilisierten Liganden, so vergrößert sich der Resonanzwinkel (Abb. 1) und ermöglicht damit eine Echtzeit-Messung der Konzentrationsänderungen an der Oberfläche [18 (S. 4-3f); 66 (S. 298); 87 (S. 11)].

Zum Aufbau des Biosensors: zwischen einem Glasprisma mit hohem RI und der Pufferlösung mit niedrigem RI befindet sich eine dünne Goldfolie (50 nm), auf deren der Pufferlösung zugewandten Seite der Ligand immobilisiert ist. Die Pufferlösung mit dem Analyten fließt kontinuierlich über die Goldoberfläche, so dass Analyt und Ligand miteinander interagieren können (Abb. 1). Hält man alle anderen Faktoren, die den Resonanzwinkel beeinflussen, konstant, dann gibt dieser Auskunft über den RI der wässrigen Schicht unmittelbar über der Goldoberfläche [18 (S. 4-3); 87 (S. 11)].

Zur Detektion des Resonanzwinkels wird mit einer Leuchtdiode und einem Linsensystem ein keilförmiger Lichtstrahl mit einer Wellenlänge nahe des Infrarotspektrums generiert. Dieser trifft mit einem festgelegten Bereich von Einfallswinkeln zwischen 66° und 69° auf die Goldoberfläche des Sensorchips. Der eingestrahlte Lichtstrahl wird entsprechend den Bedingungen der Totalreflexion reflektiert und auf die Bildpunktzeilen der Photodetektoreinheit projiziert (Abb. 1). Jede Reihe entspricht dabei einem definierten Punkt auf der aktiven Fläche der biospezifischen Kontaktstelle. Aus den Informationen der Detektoreinheit kann dann die Lage des Resonanzwinkels errechnet werden. Die Darstellung der Messung erfolgt in einem sog. Sensorgramm, in dem der Resonanzwinkel, ausgedrückt in der willkürlich festgelegten Einheit Resonance Unit (RU), als Funktion der Zeit aufgetragen wird. Im Sensorgramm lassen sich damit in Echtzeit die fortschreitenden Interaktionen an der Chipoberfläche verfolgen. Eine Verschiebung der Position der Intensitätssenke um $0,1^\circ$ führt zu einer Änderung des SPR-Signals von 1000 RU, was etwa einer Änderung der Proteinkonzentration an der Chipoberfläche von 1 ng/mm^2 entspricht. Dies gilt für alle Proteine außer Glyko- und Lipoproteine, bei denen das SPR-Signal bei Anbindung an die Oberfläche weniger stark zunimmt [18 (S. 4-3ff); 66 (S. 306ff)].

1.4.2. Meßsystem für die Androgen-SHBG-Interaktion

Zur Untersuchung der Androgenbindung von SHBG bei Lci sollte ein Androgen auf der Chipoberfläche eines SPR-Biosensorsystems immobilisiert und dessen Interaktion mit aus den entsprechenden Seren stammendem SHBG analysiert werden. In [57 (S. 631ff)] und [91 (S. 13737)] wurde eine Methodik beschrieben, mit der das DHT-Derivat 1α -Aminoethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstano-3-on

(1 α -C6-DHT; siehe Abb. 2) synthetisiert und mittels N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) auf einem Carboxymethyl (CM)-Dextran-Sensorchip immobilisiert werden kann. Da 1 α -C6-DHT eine relativ hohe Affinität zu SHBG aufweist und die damit beladene Chipoberfläche äußerst stabil ist [57 (S. 636); 91 (S. 13739)], schien dies das geeignete Steroid für die geplanten Messungen zu sein.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der EDC/NHS-Chemie ist, dass der Ligand ungeladene Aminogruppen enthält. Dies trifft auf 1 α -C6-DHT zu, das in der α -Position der Hexylgruppe am C1 eine solche besitzt. Im ersten Schritt der Aminkopplung wird eine Mischung aus EDC und NHS auf die Dextranoberfläche gegeben. Zunächst aktiviert das EDC die Carboxylgruppen des CM-Dextrans. Das NHS kann dann das EDC von den Carboxylgruppen verdrängen und mit ihnen einen NHS-Ester bilden. Diese Succinimid-Ester sind sehr reaktiv und reagieren spontan mit ungeladenen, primären Aminogruppen. Entsprechend erfolgt im zweiten Schritt die Immobilisation des Liganden. Gibt man 1 α -C6-DHT zu, so reagiert dessen Aminogruppe mit der Carboxylgruppe des CM-Dextrans unter Abspaltung des NHS zu einem stabilen Säureamid (Abb. 2). In einem abschließenden, dritten Schritt werden dann mittels Ethanolamin die verbleibenden Ester durch Abspaltung von NHS inaktiviert und es bildet sich anstelle der aktivierten Gruppe ein Hydroxyethylamid [16 (S. 4-3f); 17 (S. 37ff); 66 (S. 319f)].

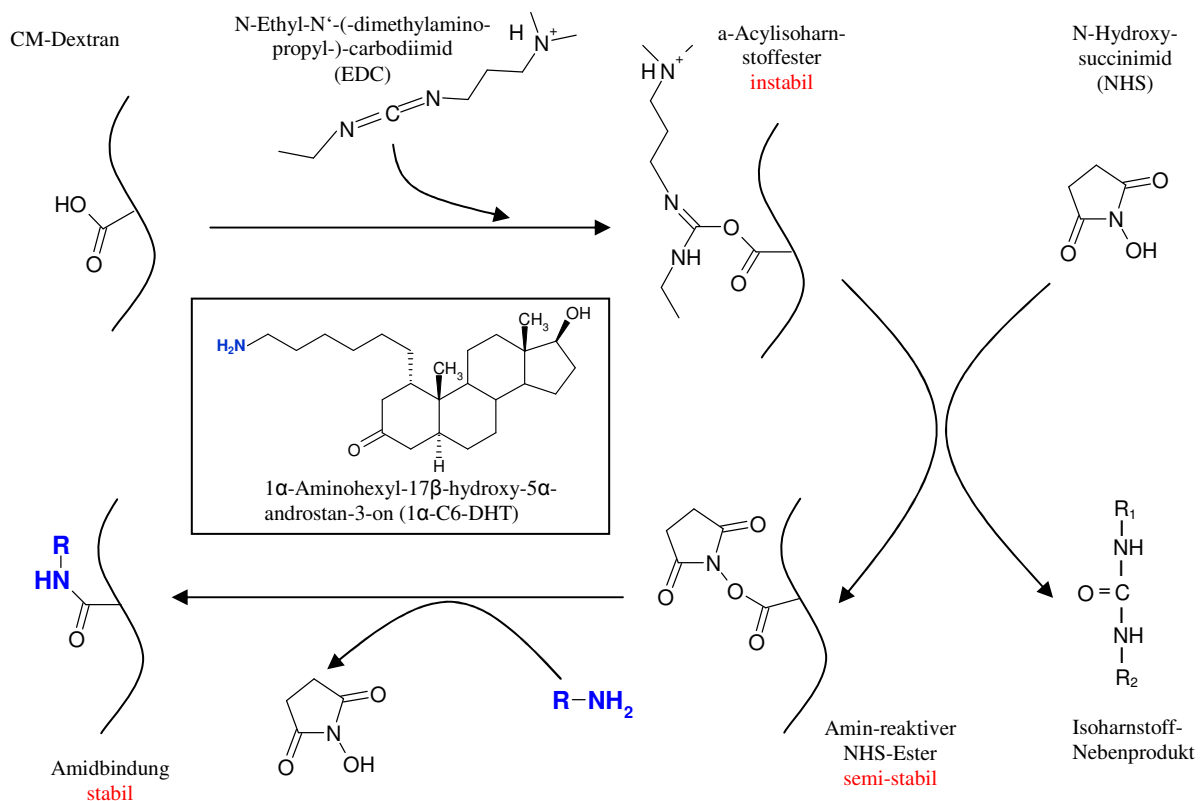


Abb. 2: Prinzip der Aminkopplung von 1 α -C6-DHT an CM-Dextran mittels EDC/NHS-Chemie [17 (S. 37f); 58 (S. 139f; S. 170f); 66 (S. 319f); 91 (S. 13737)].

1.5. Zielsetzung der Arbeit

In der Pathogenese der hormonellen Störungen bei Lci wird dem Anstieg des SHBG-Spiegels [siehe Tab. 1; 8 (S. 156); 40 (S. 376); 65 (S. 370f); 71 (S. 143); 72 (S. 749); 89 (S. 465); 105 (S. 243)] eine zentrale Rolle zugeschrieben. Aufgrund der hohen Affinität zu T und der niedrigen Affinität zu E2 soll das erhöhte SHBG die vorhandenen Störungen des Sexualsteroidmetabolismus verstärken [26 (S. 39f); 41 (S. 568)]. Vom GT, das meist ohnehin schon erniedrigt ist, werde ein größerer Anteil durch SHBG gebunden, so dass das fT stärker absinke als es die GT-Spiegel vermuten lassen [71 (S. 138); 84 (S. 632); 89 (S. 465)]. Umgekehrt werde von den sowieso schon erhöhten Estrogenen nur ein geringerer Anteil durch SHBG gebunden und das fE2 steige ungleich stärker an als das GE2 [41 (S. 568)]. Da die freie Fraktion der jeweiligen Hormone deren biologische Aktivität bestimmt, ist anzunehmen, dass die SHBG-Spiegel entscheidend an der Entwicklung von Hypogonadismus und Feminisierung beteiligt sind [72 (S. 749)]. Daneben führen im Sinne eines sich selbst verstärkenden Mechanismus erniedrigtes fT und erhöhtes fE2 wiederum zu einer Steigerung der SHBG-Synthese, so dass sich dessen Spiegel weiter erhöhen und die Symptome sich zunehmend verschlimmern würden [26 (S. 39f)]. SHBG wäre damit entscheidend an der Aufrechterhaltung der hormonellen Störungen beteiligt.

Voraussetzung für diese zentrale Rolle des SHBG ist, dass dessen Steroidbindung voll funktional ist. Da bei der Lci mit der Leber der Ort der SHBG-Synthese [68 (S. 198); 108 (S. 703); 109 (S. 533)] geschädigt ist, kann aber eine physiologische SHBG-Steroid-Interaktion bei diesem Krankheitsbild nicht automatisch als gegeben angenommen werden. So ist bekannt, dass bei Lebererkrankungen die hepatische Synthese von Serumglykoproteinen mit der Folge einer veränderten Kohlenhydratzusammensetzung gestört ist. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass bei alkoholischer Lci ein Anteil des Haptoglobins, des α 1-Antitrypsins und des Albumins eine veränderte Glykosylierung aufweist [44 (S. 83f)]. Im Zusammenhang mit chronischem Leberschaden ist auch das bei Alkoholikern vermehrt vorkommende Carbohydrate-deficient Transferrin zu nennen, bei dem negativ geladene Sialinsäure-, Galactose- und N-Acetylglucosamin-Reste am Ende der Glykankette fehlen [44 (S. 80ff)]. Allgemein scheint bei Lci der Anteil der Asialoglykoproteine erhöht zu sein [4 (S. 2361)]. Da schon bei nichtzirrhotischen, asymptomatischen Alkoholikern eine Veränderung des Kohlenhydratgehaltes von SHBG nachgewiesen werden konnte [119 (S. 279)], ist es angesichts vorgenannter Erkenntnisse sehr wahrscheinlich, dass auch bei Leberzirrhotikern die Glykosylierung des SHBG verändert ist. Dass dies Folgen auf die Steroidbindungsaktivität haben kann, wird dadurch illustriert, dass es bei Lci zur anodalen Verschiebung der E2-bindenden SHBG-Isoformen kommt. Dies könnte als Hinweis auf Abnormalitäten in der Struktur und Funktion des SHBG bei Lci gewertet werden [116 (S. 462f)]. Zudem beobachteten De Besi et. al., dass es in kompensierten Stadien der Lci bei normalem GT trotz Anstieg des SHBG-Spiegels nicht zu einem Abfall des fT kommt [33 (S. 275)], ebenfalls ein Befund, der nicht zu den typischen Steroidbindungseigenschaften des SHBG passt. Da die Ursache der SHBG-Erhöhungen bei Lci bislang noch nicht geklärt ist [105 (S. 243)], besteht

weiterhin die Möglichkeit, dass die erhöhten SHBG-Spiegel durch eine gestörte hepatische Clearance [33 (S. 275); 89 (S. 465)] mit resultierendem Vorhandensein überalterter SHBG-Formen im Blut oder durch die Leberzellschädigung mit Freisetzung unreifer SHBG-Vorläuferpeptide entstehen. Auch in diesen Fällen ist eine normale Steroidbindung nicht als selbstverständlich vorauszusetzen.

Einerseits tragen also die erhöhten SHBG-Spiegel bei Lci entscheidend zur Entstehung der endokrinen Symptomatik bei, andererseits wurde bisher noch nie der Frage nachgegangen, ob die Steroidbindung des in den Zirrhosegraden Child-Pugh A und B erhöhten SHBG auch tatsächlich unverändert ist. Dieses ist aber eine unabdingbare Voraussetzung für vorgenannte zentrale Rolle des SHBG in der Pathogenese der hormonellen Störungen und ist aufgrund der oben dargestellten experimentellen Hinweise anzuzweifeln. Ziel dieser Arbeit war es daher, für den Bereich der Androgene zu klären, ob bei Lci die Steroidbindung an SHBG normal ist oder in irgendeiner Form Abnormalitäten aufweist. Zusätzlich sollten die sich daraus ergebenden Folgen für den Sexualhormonhaushalt untersucht werden.

Hierfür wurde zunächst mit Hilfe eines für hochaufgereinigtes SHBG schon etablierten Biosensorsystems die Anbindungscharakteristik des SHBG aus individuellen Seren an ein Testosteronderivat ermittelt. Die verwendeten Seren stammten zum einen von Lci-Patienten, zum anderen von Personen mit anderen physiologischen und pathologischen Zuständen, bei denen keine Veränderungen der Steroidbindung des SHBG zu erwarten sind, so dass die Anbindungskurven miteinander verglichen werden konnten. Hierzu war es auch notwendig, einen möglichst wenig zeitintensiven Aufreinigungsschritt der Seren vorzuschalten und das Biosensorsystem hinsichtlich der Messung von nur partiell aufgereinigtem SHBG anzupassen. Um die Ergebnisse der Biosensoruntersuchungen in die hormonelle Gesamtsituation bei Lci einordnen zu können, wurden anschließend im Hinblick auf Hypogonadismus, Feminisierung und Lci relevante Laborparameter bestimmt. Auf diese Weise sollte der Sexualhormonhaushalt der Leberzirrotiker analysiert und hinsichtlich der SHBG-Konzentrationen interpretierbar werden. In der Zusammenschau aller Befunde sollte sich die Funktionalität der Androgenbindung von SHBG bei Lci und ihre Bedeutung für die Entstehung der endokrinen Symptomatik klären lassen. Für die Studie wurden als Lci-Patienten nur Männer ausgewählt, da die zyklischen Schwankungen der Sexualhormone bei Frauen eine Interpretation der Messungen erheblich erschweren würden.

2. Patienten und Probanden, Material und Methoden

2.1. Patienten und Probanden

Für die Untersuchungen wurden Serumproben von männlichen Lci-Patienten und von gesunden Männern gleichen Alters verwendet.

Die Seren der Leberzirrhotiker stammten aus der Abteilung für Hepatologie der II. Medizinischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (MRI). Einschlusskriterien für die Rekrutierung der Patienten waren männliches Geschlecht, Alter zwischen 35 und 75 Jahre und histologisch nachgewiesene Leberzirrhose im Child-Pugh-Stadium A oder B. Einen Überblick zur Ermittlung des Child-Pugh-Stadiums gibt Tab. 2. Ausgeschlossen wurden Leberzirrhotiker mit Hämochromatose, vorbestehendem Hypogonadismus anderer Genese, insulinabhängigem Diabetes mellitus oder aktiver Hyperthyreose.

Parameter	Punktezahl		
	1	2	3
Albumin (g/dl)	> 3,5	2,8 bis 3,5	< 2,8
Bilirubin (mg/dl)	< 2,0	2,0 bis 3,0	> 3,0
Quick-Wert (%)	> 50	30 bis 50	< 30
Aszites	kein	wenig	moderat
Enzephalopathie	keine	Grad I oder II	Grad III oder IV

Child-Pugh-Stadium	Punktezahl
A	5 bis 6
B	7 bis 9
C	10 bis 15

Tab. 2: Ermittlung der Child-Pugh-Score [106 (S. 1298)].

Als altersgematchte Kontrollgruppe dienten gesunde Männer im Alter zwischen 35 und 75 Jahren. Mittels klinischer Untersuchung und laborchemischer Analysen wurden akute oder chronische Erkrankungen ausgeschlossen. Die Kontrollpersonen mussten hierbei im hämatologischen, hämostaseologischen und serumchemischen Routinebefund in allen Parametern innerhalb des Referenzbereichs liegen und einen SHBG-Spiegel unter 60 nmol/l aufweisen.

Die Blutentnahme erfolgte in beiden Gruppen mittels Venenpunktion am nüchternen Patienten zwischen 8 und 9 Uhr morgens. Das Serum der gewonnenen Proben wurde innerhalb der nächsten Stunde durch Zentrifugation bei $2000 \times g$ abgetrennt. Anschließend wurden alle klinisch-chemischen

Routineparameter bestimmt. Für die Hormonanalysen und Biosensormessungen wurden Aliquots der Serumproben bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und unmittelbar vor ihrer Verwendung wieder aufgetaut.

Die Ethikkommission des MRI unter dem Vorsitz von Prof. Dr. Albert Schömig hat der Studie zugestimmt. Alle Studienteilnehmer gaben schriftlich ihre Einwilligung zu den entsprechenden Untersuchungen ihrer Blutproben. Es wurde keine Aufwandsentschädigung gewährt.

Um das Anbindungsverhalten von SHBG über einen weiten Konzentrationsbereich verfolgen zu können, wurden zusätzliche Serumproben mit einem SHBG-Spiegel von über 100 nmol/l am Biosensor vermessen. Hierfür wurden Seren von Schwangeren und Hyperthyreoten verwendet. Bei den Schwangeren handelte es sich um Patientinnen der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie des MRI im zweiten Trimenon. Die Seren der Hyperthyreotiker wurden von der nuklearmedizinischen Klinik des MRI zur Verfügung gestellt. Aufnahmekriterium bei diesen Patienten war eine manifest-hyperthyreote Stoffwechsellage: erhöhtes freies Triiodthyronin (fT_3 ; $> 6,5\text{ pmol/l}$) und erhöhtes freies Thyroxin (fT_4 ; $> 23\text{ pmol/l}$) bei gleichzeitig erniedrigtem Thyreoidea-stimulierenden Hormon (TSH; $< 0,1\text{ }\mu\text{IU/ml}$). Die Werte dieser drei Stoffwechselfparameter wurden von Labors der nuklearmedizinischen Klinik bestimmt. Für die Messungen der Hyperthyreotiker und der Schwangeren wurde anonymisiertes Restmaterial im Rahmen der klinischen Routineuntersuchungen benutzt.

Insgesamt wurden die Seren von 33 männlichen Leberzirrhotikern, 32 gesunden Männern, 19 Schwangeren und 20 Hyperthyreotikern in die Studie einbezogen.

2.2. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Destilliertes Wasser wurde mit Hilfe der Milli-Q-Plus-Anlage von Millipore (Billerica, MA, USA) gewonnen. Zur Temperatureinstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde das Wasserbad Typ 3043 von Köttermann (Uetze-Hänigsen, Deutschland) verwendet. Die benutzten Eppendorfreaktionsgefäße $1,5\text{ ml}$ stammten von der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland). Alle für die Versuche benötigten Glaswaren wurden von Schott (Mainz, Deutschland) bezogen.

2.3. Chemikalien

Allgemeine Reagenzien

KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl und Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft, während Methanol (HPLC-Qualität), Ethanol, Eisessig, HCl 37%, NaOH -Plätzchen, KCl und Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) von Merck (Darmstadt, Deutschland) stammten.

Allgemein verwendete Lösungen und Puffer

5 mol/l Natronlauge: 20 g NaOH -Plätzchen ad 100 ml destilliertes Wasser (Aqua dest.)

10% SDS-Stammlösung: 5 g SDS ad 50 ml Aqua dest.

Phosphate-buffered Saline (PBS)-Puffer:

- 2,6 mmol/l KCl (0,199 g/l)
- 138 mmol/l NaCl (8,06 g/l)
- 10 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (1,78 g/l)
- 1,8 mmol/l KH_2PO_4 (0,245 g/l)
- in Aqua dest.
- pH 7,55-7,65

Die Einstellung des pH-Wertes von Puffern und anderen Lösungen erfolgte mit HCl 37% und 5 mol/l Natronlauge.

2.4. Aufgereinigtes SHBG und PNGase-Verdau

Um bei den Biosensormessungen Unterschiede in der Chip-Beladung auszugleichen, wurden Titrationskurven mit SHBG-Lösungen bekannter Konzentration erstellt. Hierfür wurde kommerziell erhältliches, affinitätschromatographisch aufgereinigtes, humanes SHBG von Fitzgerald Industries International (Concord, MA, USA) verwendet.

Rekonstitution des Lyophilisats

Das in Form eines Lyophilisats vorliegende SHBG wurde mit zweifach destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 11 $\mu\text{mol/l}$ gebracht und in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

PNGase-Verdau

Um die Homogenität des aufgereinigten SHBG im Biosensor zu gewährleisten, wurde es mit Peptid N-Glykosidase (PNGase) verdaut [91 (S. 13737)]. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das N-glykosidische Kohlenhydratseitenketten von Glykoproteinen abspaltet. Wie in [91 (S. 13739)] beschrieben, wird die Bindungsaktivität des SHBG dadurch nicht beeinträchtigt.

Benötigte Lösungen und Materialien:

- Rekonstituiertes SHBG 11 $\mu\text{mol/l}$
- PNGase F 500 000 IU/l von New England BioLabs (Beverly, MA, USA)
- Reagenzglas
- Wasserbad

Das gewünschte Volumen der 11 $\mu\text{mol/l}$ -SHBG-Lösung wurde in ein Reagenzglas vorgelegt. Pro eingesetztem μg SHBG wurden dann fünf IU PNGase F zugegeben und diese Mischung für 30 min im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das N-deglykosilierte SHBG wurde direkt nach dem Verdau ohne weitere Zwischenlagerung in den entsprechenden Experimenten eingesetzt.

2.5. Gelfiltrationschromatographie

Prinzip

Um für die Biosensormessungen Proben zu erhalten, in denen das SHBG des zu messenden Serums spezifisch angereichert ist, wurde eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Mit dieser Methode können Proteine nach ihrem MG aufgetrennt werden. Hierfür wird das Proteingemisch auf eine Säule gegeben, die sich aus etwa 100 μm großen, porösen Kügelchen zusammensetzt, die aus einem unlöslichen, aber stark hydratisierten Polymer (wie z.B. die Kohlenhydrate Dextran oder

Agarose) oder Polyacrylamid bestehen. Die Kügelchen sind so beschaffen, dass kleine Moleküle im Unterschied zu großen leicht in sie eindringen können. Entsprechend verteilen sich kleine Moleküle in der wässrigen Lösung innerhalb und außerhalb der Kügelchen, während der Verteilungsraum größerer Moleküle auf die flüssige Phase außerhalb der Gelmatrix begrenzt ist. Wegen des kleineren Verteilungsvolumens passieren große Moleküle die Säule schneller, so dass diese früh, kleine Moleküle hingegen erst spät eluieren [14 (S. 89f); 82 (S. 62)].

Durchführung der Gelfiltration

benötigte Lösungen und Materialien:

- Serumprobe
- PBS-Puffer: siehe Abschnitt Chemikalien
- ÄKTA-Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)-Anlage mit Fraktionensammler Frac 900 von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland)
- Superdex 200 HR 10/30-Gelfiltrationssäule (hochgradig quervernetzte, poröse Agarose mit kovalent gebundenem Dextran) von Amersham Pharmacia Biotech
- Probenauffanggefäße für den Fraktionssammler
- Mikroliterspritze 500 µl von Hamilton (Bonaduz, Schweiz)

Die Gelfiltration wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, die Detektion der eluierenden Proteine erfolgte mit Hilfe einer Ultraviolett (UV)-Lampe bei einer Wellenlänge von 280 nm. Als Laufpuffer diente PBS. Zunächst wurde die Gelfiltrations-Säule in der FPLC-Anlage mit PBS gespült bis sich eine konstante Nulllinie des UV-Signals ergab. Dann wurde die Anlage bei einer Flussrate von 0,2 ml/min neu gestartet. Nach etwa 2 min wurden 300 bis 400 µl des Serums mit der Mikroliterspritze möglichst luftblasenfrei aufgezogen und in den Sample Loop injiziert, aus dem dann effektiv 100 µl auf die Säule aufgetragen wurden. Nach einer Laufzeit von 20 min wurde mit der Sammlung von 0,25 ml großen Fraktionen des Eluats begonnen. Nach vollständiger Elution der Proteine – erkennbar an der erneuten Nulllinie in der UV-Detektion - wurde der Fraktionssammler gestoppt und der Gelfiltrationslauf beendet. Die relevanten Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.6. Gelelektrophorese

Prinzip

Zum Nachweis von SHBG in den einzelnen Fraktionen der Gelfiltration wurden diese zunächst in einer SDS-PAGE nach Laemmli [78 (S. 680)] eingesetzt. Die SDS-PAGE ist ein schnelles und empfindliches Verfahren, um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Unter Elektrophorese versteht man das Phänomen, dass Moleküle mit einer Nettoladung im elektrischen Feld wandern. Da Proteine ebenfalls so gut wie immer positive oder negative Nettoladungen aufweisen, trifft dies auch auf sie zu. Als Matrix für die Elektrophorese von Proteinen eignet sich vor allem Polyacrylamid, das in Anwesenheit quervernetzender Substanzen wie z. B. N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin (TEMED) auspolymerisiert wird. Polyacrylamidgele besitzen folgende Vorteile: sie sind chemisch inert, leicht herzustellen und durch Variation der Konzentrationsverhältnisse zwischen Acrylamid und Quervernetzern lässt sich die Porengröße des Gels optimal auf die jeweiligen Erfordernisse einstellen. Meistens werden Elektrophoresen von Proteinen in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von SDS durchgeführt. SDS ist der Schwefelsäureester des Dodekanols und wirkt als anionisches Detergens. Etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste lagert sich mit seinem unpolaren, aliphatischen Rest an hydrophobe Bereiche des Proteins an, so dass fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört werden und sich das Molekül entfaltet. Außerdem werden alle Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Lipiden aufgehoben. Zusätzlich werden oft Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zugegeben. Beide Substanzen reduzieren Disulfidbrücken, so dass diese gespalten und etwaige dadurch stabilisierte Konformationen oder Verbindungen zwischen Proteinkomplexen zerstört werden. Durch das SDS lagern sich so viele negative Ladungsträger an das Protein an, dass die Eigenladung des Proteins vernachlässigbar wird und sich eine negative Gesamtladung ergibt. Die negative Ladung ist dabei der Masse des Proteins ungefähr proportional, so dass die Proteine nur aufgrund ihres MG aufgetrennt werden. Entsprechend ihrer Ladung wandern in der SDS-PAGE die SDS-Protein-Komplexe zur Anode. Dies erfolgt umso schneller, je kleiner das Molekül ist, weil es dann weniger durch das polymere Netzwerk in seiner Bewegung gehindert wird. Niedermolekulare Proteine kommen also am Ende der Elektrophorese in der Nähe der Anode zu liegen. Die Beweglichkeit der Proteine ist dabei dem Logarithmus der Masse indirekt proportional. Allerdings wandern manche kohlenhydratreichen Proteine oder Membranproteine in atypischer Weise, so dass in diesen Fällen o.g. Beziehung nicht unbedingt gelten muss [14 (S. 91ff); 82 (S. 65)]. Dem Trenngel, das der eigentlichen Auftrennung der Proteine dient, wurde in der vorliegenden Arbeit zur Konzentrierung der Proben und Erhöhung der Signalschärfe im nachfolgenden Western Blot ein Sammelgel vorgeschaltet.

Gießen der Gele

benötigte Lösungen und Materialien:

- Aqua dest.
- 40% Acrylamid-Lösung (19:1) von Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- 3 × Gelpuffer-Stammlösung:
 - 3,0 mol/l Tris (36,34 g/100 ml)
 - 0,3% SDS-Lösung (3 ml 10% SDS-Stammlösung/100 ml)
 - in Aqua dest.
 - pH 8,45
- Trenngel-Stammlösung (7,5%):
 - 10 ml 3 × Gelpuffer
 - 5,6 ml 40% Acrylamid-Lösung (19:1)
 - 4 g Glycerin von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
 - 10,4 ml Aqua dest.
- Sammelgel-Stammlösung:
 - 3,1 ml 3 × Gelpuffer
 - 1,2 ml 40% Acrylamid-Lösung (19:1)
 - 8,2 ml Aqua dest.
- 10% Ammonium Persulfat (APS)-Lösung: 80 mg APS von Sigma-Aldrich in 800 µl Aqua dest.
- TEMED von Bio-Rad
- 100% Ethanol
- Gelgießstand, Halterahmen, vorgeschliffene Glasplatten und Probenkamm aus dem MiniProtean 3 cell system von Bio-Rad
- Papiertücher

Die mit Ethanol und Aqua dest. gereinigten Glasplatten wurden entsprechend ihrem Schliff in den Rahmen eingespannt, und dieser wiederum im Gelgießstand festgeklemmt. Zur Herstellung des Trenngels wurden zu 5 ml Trenngel-Stammlösung 50 µl 10% APS-Lösung und 5 µl TEMED gegeben und diese Mischung unmittelbar nach der TEMED-Zugabe bis auf 2/3 der Plattenhöhe zwischen die Glasplatten eingefüllt. Anschließend wurden die Gele mit 100% Ethanol überschichtet, wodurch ein Austrocknen verhindert und der polymerisationshemmende Kontakt mit Luftsauerstoff vermieden wird. Nach Abschluss der Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol abgossen und die Geloberfläche mit Aqua dest. gespült. Alles Aqua dest. wurde anschließend mit einem Papiertuch entfernt. Für das Sammelgel wurden 3,5 ml Sammelgel-Stammlösung mit 50 µl 10% APS-Lösung und

5 µl TEMED versetzt. Wiederum unmittelbar nach dem Zusatz von TEMED wurde diese Mischung bis zur Oberkante der Glasplatten in die Gelkammer gefüllt und der Probenkamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm vorsichtig herausgezogen.

Vorbehandlung der Gelfiltrationsfraktionen für die Gelelektrophorese

benötigte Lösungen:

- Fraktionen aus der Gelfiltration
- Roti-Load reduzierend von Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- Eppendorfgefäße

Zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wurden aus den gewünschten Gelfiltrations-Fraktionen jeweils 37,5 µl abgenommen und in einem Eppendorfgefäß mit 12,5 µl reduzierendem Elektrophorese-Ladepuffer (Roti-Load) versetzt. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung in der SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

Durchführung der Gelelektrophorese

benötigte Lösungen und Materialien:

- mit Ladepuffer versetzte Proben aus der Gelfiltration
- geschliffene Glasplatten mit Gelen vom Gelgießen
- Kathodenpuffer:
 - 0,1 mol/l Tris (12,11 g/l)
 - 0,1 mol/l Tricin (17,92 g/l) von Roth
 - 0,1% SDS (10 ml 10% SDS-Stammlösung/l)
 - in Aqua dest.
 - pH 8,25
- Anodenpuffer:
 - 0,2 mol/l Tris (24,23 g/l)
 - in Aqua dest.
 - pH 8,9
- Rainbow-Marker von Amersham Pharmacia Biotech

- Elektrophoresekammer aus dem MiniProtean 3 cell system von Bio-Rad
- Netzgerät Power Pac 200 von Bio-Rad
- Heizblock Thermomixer 5433 von Eppendorf
- Draht

Die Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und das innere Kompartiment der Kammer mit Kathodenpuffer, das äußere Kompartiment mit Anodenpuffer aufgefüllt. Falls durch das Eingießen der Puffer Luftblasen in der Kammer entstanden waren, wurden diese zur Gewährleistung eines gleichmäßigen elektrischen Feldes mit Hilfe eines Drahtes entfernt. Anschließend wurden die Taschen der Gele mit Kathodenpuffer aus dem inneren Kompartiment gespült, um sie von evtl. vorhandenen Gelresten zu säubern. Dann wurden in der linken äußeren Tasche jedes Gels 15 µl Rainbow-Marker aufgetragen und in die restlichen Taschen jeweils 25 µl der zuvor für 5 min im Heizblock auf 95 °C erhitzten Proben eingebracht. Für die Passage durch das Sammelgel wurde mit Hilfe des Netzgerätes eine Spannung von 25 V angelegt. Mit Eintritt der Proben in das Trenngel, erkennbar an der beginnenden Auftrennung der farbigen Markerproteine, wurde diese auf 65 V erhöht. Sobald der blaue Farbstoff Bromphenolblau zur Markierung der Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Gele aus der Kammer herausgenommen.

2.7. Western Blot

Prinzip

Nach der Gelelektrophorese wurde zur Identifikation der SHBG-haltigen Fraktionen ein Western Blot durchgeführt. Der Western Blot dient dem Nachweis sehr geringer Mengen eines bestimmten Proteins mittels spezifischer Antikörper (Ak). Das Verfahren lehnt sich an den Southern Blot [110 (S. 503ff)] an, bei dem DNA aus Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert wird. Beim erstmalig 1979 beschriebenen Western Blot [107 (S. 3117)] wird analog ein „Abklatsch“ (engl. blot) der Proteine aus Gelen auf einer Trägermembran angefertigt. Heute verwendet man hauptsächlich die Variante des sog. ElektrobloTTings, bei der mittels Elektroelution versucht wird, eine möglichst quantitative Übertragung der Proteine zu erzielen [118 (S. 4350f)]. Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden vom Gel auf eine geeignete Polymerschicht wie z.B. Nitrocellulosepapier oder Nylonfolien transferiert (sog. Blotting), indem Gel und Membran in direkten Kontakt gebracht und über diese Kombination eine Spannung angelegt wird. Die Kathode liegt dabei dem Gel und die Anode der Membran an. Durch die SDS-bedingte negative Gesamtladung werden die Proteine in Richtung Anode gezogen und

gelangen dadurch vom Gel auf die Membran. Auf dieser bleiben sie durch unspezifische Wechselwirkungen fest gebunden und bilden so einen „Abklatsch“ des Gels. Zum Nachweis des gesuchten Proteins gibt man dann zunächst einen Primärantikörper auf die Membran, der gegen das gewünschte Protein gerichtet ist. Die dadurch auf der Polymerschicht entstehenden Antigen (Ag)-Ak-Komplexe lassen sich sichtbar machen, indem man einen markierten Sekundärantikörper hinzufügt, der den F_c-Teil des ersten Ak erkennt. Die Markierung der Ak kann mit radioaktiven Verbindungen erfolgen, so dass sich die Proteine auf einem auf den Blot aufgelegten Röntgenfilm als dunkle Bande darstellen. Alternativ besteht die Möglichkeit, einen Enzym-konjugierten Sekundär-Ak zu verwenden. Durch Hinzufügen eines chromogenen Farbstoffes entsteht dann ein farbiger oder fluoreszierender Niederschlag an der Stelle der Ag-Ak-Komplexbildung und identifiziert so das gewünschte Protein [14 (S. 112f); 82 (S. 322f)].

Transfer

benötigte Lösungen und Materialien:

- Aqua dest.
- Gele aus der Gelelektrophorese
- 10 × Transferpuffer-Stammlösung:
 - 250 mmol/l Tris (30 g/l)
 - 192 mmol/l Glycin (144 g/l) von Merck
 - 0,1% SDS (10 ml 10% SDS-Stammlösung/l)
 - in Aqua dest.
- 1 × Transferpuffer:
 - 100 ml 10 × Transferpuffer-Stammlösung
 - 200 ml Methanol
 - 700 ml Aqua dest.
- Methanol
- Coomassie-Destain:
 - 90 ml Methanol
 - 90 ml Aqua dest.
 - 10 ml Eisessig
- 1 × Tris-buffered Saline (TBS):
 - 20 mmol/l Tris (2,42 g/l)
 - 500 mmol/l NaCl (29,24 g/l)
 - in Aqua dest.

- pH 7,5
- 1 × Tween-Tris-buffered Saline (TTBS): 2 ml Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (TWEEN 20) von Sigma-Aldrich in 1l TBS
- Blocking-Solution:
 - 5% Skim Milk Powder (5 g/100 ml) von Fluka
 - 1% Polyvinylpyrrolidon 10.000 (1 g/100 ml) von Sigma-Aldrich
 - 1% Polyethylen-Glycol 3.350 (1 g/100 ml) von Sigma-Aldrich
 - in 1 × TTBS
- zwei Wattman-Papiere Mini Trans-Blot Filter Paper von Bio-Rad
- Polyvinyliden-Fluorid (PVDF)-Membran Immobilon-P Transfer Membrane von Millipore
- Gelhalterung, zwei Fiber-Pads und Blotting-Kammer aus dem MiniProtean 3 cell system von Bio-Rad
- Netzgerät Power Pac 200 von Bio-Rad
- Kunststoffschale
- Reagenzglas
- Reinstwasserleitung

Die Blotting-Kammer wurde bis auf die fehlenden Gelhalterungen komplett zusammengesetzt und mit Transferpuffer gefüllt. Dann wurde das Gel vorsichtig aus den Glasplatten herausgelöst und kurz mit 1 × Transferpuffer benetzt. Die PVDF-Membran wurde 1 min lang in Methanol gelegt und die Fiber-Pads und Wattman-Papiere mit Transferpuffer getränkt.

Danach wurde die Gelhalterung in folgender Reihenfolge zusammengebaut:

UNTEN: durchsichtige Fläche (Anode)
 Fiber Pad
 Wattman-Papier
 PVDF-Membran
 SDS-PAGE-Gel
 Wattman-Papier
 Fiber Pad
 OBEN: schwarze Fläche (Kathode)

Um Luftblasen zu vermeiden wurde die Gelhalterung in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale zusammengesetzt und der gesamte Aufbau vor Verschluss der Halterung mit einem Reagenzglas ausgewalzt. Nach Einsetzen der Gelhalterung in die Blotting-Kammer erfolgte der Transfer bei einer

mittels des Netzgerätes konstant gehaltenen Stromstärke von 0,3 A für 75 bis 90 min bei 4 °C in einem Kühlraum. Die Blot-Membran wurde anschließend zunächst 2 × 5 min mit Coomassie-Destain gewaschen, dann reichlich unter fließendem Reinstwasser gespült und abschließend nochmals 5 min mit TBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Inkubation des Blots mit 20 ml Blocking-Solution über Nacht bei 4 °C.

Entwicklung der Blots

benötigte Lösungen und Materialien:

- 1 × TTBS: siehe Abschnitt Transfer
- Primärantikörper-Lösung: 20 µl einer rabbit anti-human-SHBG Ak-Präparation von Dako A/S (Glostrup, Dänemark) in 20 ml Blocking-Solution (siehe Abschnitt Transfer)
- Sekundärantikörper-Lösung: 2 µl einer Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierten donkey anti-rabbit Ak-Präparation von Amersham Pharmacia Biotech in 20 ml Blocking-Solution (siehe Abschnitt Transfer)
- Entwickler-Lösung 1 (Luminol/Enhancer-Lösung) und Entwickler-Lösung 2 (Peroxid-Puffer) aus dem Super Signal West Dura Entwicklungs-Kit von Pierce (Rockford, IL, USA)
- Glatte, durchsichtige Prospekthüllen von Esselte-Leitz (Stuttgart, Deutschland)
- Filmkassette Hypercassette von Amersham Pharmacia Biotech
- Chemilumineszenz-Film Hyperfilm ECL von Amersham Pharmacia Biotech
- Film-Entwicklungsgerät Hyperprocessor von Amersham Pharmacia Biotech

Zunächst wurde die Blocking-Solution abgekippt. Direkt danach wurde der Blot bei Raumtemperatur zuerst vier Stunden mit der Primärantikörper-Lösung und dann für eineinhalb bis zwei Stunden mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert. Zwischen diesen beiden Inkubationsschritten sowie nach Ende der zweiten Inkubation wurden die Membranen jeweils 5 × 5 min mit 1 × TTBS gewaschen. Nachfolgend konnte der Blot entwickelt werden: die Entwicklerlösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und diese Mischung für 2 bis 3 min mit dem Blot inkubiert. Dieser wurde anschließend möglichst luftblasenfrei in die Prospekthülle und mit dieser in die Filmkassette gegeben. In einem dunklen Raum wurde dann zusätzlich der Chemilumineszenz-Film in die Filmkassette gelegt und solange belichtet, bis bei der nachfolgenden Entwicklung ein deutliches Signal zu erkennen war.

2.8. Biosensor-Messungen

Allgemeines

Zur Bestimmung des Bindungsverhaltens von SHBG an DHT in den einzelnen Serumproben wurde ein SPR-Biosensor benutzt. Auf das Prinzip der SPR-Messungen und die Theorie der Kopplung eines Amins an die CM-Dextran-Oberfläche eines Goldchips wurde in der Einleitung ausführlich eingegangen. Im Folgenden soll daher nur eine Darstellung der praktischen Durchführung der Beladung des Chips und der Messungen erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass 1 α -C6-DHT, ein an der 1 α -Position modifiziertes Derivat des DHT, mit einer K_a von $1,40 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ eine relativ hohe Bindungsaffinität zu SHBG hat [57 (S. 636f)]. Daher wurde für die Versuche dieser Studie 1 α -C6-DHT als immobilisierter Bindungspartner des SHBG ausgewählt. Im Biosensor wurden zum einen die SHBG-positiven Fraktionen der gefiltrierten Serumproben gemessen und zum anderen mit Hilfe des aufgereinigten, deglykosilierten SHBG Chip-spezifische Kalibrationskurven erstellt. Letzteres war notwendig, um die auf verschiedenen Chips durchgeführten Patientenbestimmungen miteinander vergleichen zu können.

Allgemein für die Biosensormessungen benötigte Lösungen und Materialien:

- Biacore X-Biosensor von Biacore AB (Uppsala, Schweden)
- 0,2 μm -Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S Filtereinheit von Schleicher & Schuell (Dassel, Deutschland)
- Helium aus Heliumgasflasche von SWF (Friedrichshafen, Deutschland)
- Eis aus Flockeneisbereiter
- 100 mmol/l H_3PO_4 : 580 μl Phosphorsäure 85% (v/v) von Fluka ad 100 ml Aqua dest.

Beladung des CM-Dextran-Chips

Die Beladung der CM-Dextran-Oberfläche des Chips mit 1- α -C6-DHT erfolgte mittels der aminreaktiven Crosslinker EDC und NHS wie von Metzger et al. beschrieben [91 (S. 13737)].

benötigte Lösungen und Materialien:

- 400 mmol/l EDC von Biacore AB
- 100 mmol/l NHS von Biacore AB
- 1 mol/l Ethanolamin-HCl von Biacore AB

- 99+% Ethanolamin von Sigma-Aldrich
- Methanol
- Boratpuffer:
 - 100 mmol/l Boratsäure (61,83 g/l) von Merck
 - in Aqua dest.
 - pH 9,0
- 1 α -C6-DHT-Lyophilisat: wurde von Hagen Hauptmann vom Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg entsprechend des in [57 (S. 631ff)] dargestellten Verfahrens synthetisiert
- Stocklösung 1: 400 μ mol/l Ethanolamin in Boratpuffer (1 μ l 99+% Ethanolamin/ 9011,5 μ l)
- Stocklösung 2: 200 μ mol/l 1 α -C6-DHT in Methanol-Boratpuffer-Mischung (77 mg 1 α -C6-DHT-Lyophilisat ad 200 ml Methanol, diese Lösung 1:5 verdünnt mit Boratpuffer)
- 1 α -C6-DHT/Ethanolamin-Gemisch:
 - 50 μ l Stocklösung 1
 - 100 μ l Stocklösung 2
- HEPES-buffered Saline mit Surfactant P-20 (HBS-P-Puffer) von Biacore AB, enthält:
 - 0,01 mol/l N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)
 - 0,15 mol/l NaCl
 - 0,005% Surfactant P20 (Polyoxyethylensorbitan)
 - in Aqua dest.
 - pH 7,4
- Testosteron-Antikörper-Lösung: monoklonaler Ak T3 (clone M211244) von Fitzgerald Industries International 0,04 mg/ml in HBS-P
- Estrogen-Antikörper-Lösung: monoklonaler Ak E2-3 (clone M40557) von Fitzgerald Industries International 0,04 mg/ml in HBS-P
- CM4-Chip von Biacore AB: Goldoberfläche, beschichtet mit stabiler CM-Dextran-Matrix mit niedrigem Carboxylierungsgrad

Zu Beginn der Beladung wurde der CM4-Chip in den Biosensor eingelegt und das Meßsystem auf den zuvor 0,2 μ m-sterilfiltrierten, dann 10 min mit Helium entgasten und auf Eis gestellten Laufpuffer HBS-P gesetzt. Alle für die Beladung verwendeten Reagenzien und Lösungen wurden ebenfalls mit Eis gekühlt. Die Messtemperatur wurde auf 25 °C eingestellt und zur Konditionierung der Chipoberfläche in beide Flusszellen bei einer Flussrate von 10 μ l/min drei Mal 10 μ l 100 mmol/l H₃PO₄ injiziert.

Dann erfolgte die Beladung der Referenzzelle (Fc1) bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 μ l/min. 400 mmol/l EDC und 100 mmol/l NHS wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 35 μ l von dieser Lösung

injiziert. Anschließend erfolgte eine Injektion von 40 µl 1 mol/l Ethanolamin und von 10 µl 100 mmol/l H₃PO₄.

Nachfolgend wurde die spezifische Meßzelle (Fc2) beladen. Wie bei der Beladung von Fc1 wurde die Flussrate auf 5 µl/min gesetzt und von einer 1:1 Mischung aus 400 mmol/l EDC und 100 mmol/l NHS 35 µl injiziert. Anschließend erfolgte die Injektion von 30 µl 1α-C6-DHT/Ethanolamin-Gemisch zur Ligandenkopplung. Angestrebt wurde dabei eine stabile Anbindung des Steroids von etwa 200 bis 300 RU. Als letzter Schritt wurden wie bei Fc1 40 µl 1 mol/l Ethanolamin und 10 µl 100 mmol/l H₃PO₄ injiziert.

Um die Qualität der Kopplung zu überprüfen, wurde nun bei einem Fluss von 10 µl/min die Anbindung je eines Testosteron- und Estradiol-spezifischen Ak aufgezeichnet. Hierzu wurden 50 µl der jeweiligen 0,04 mg/ml-Antikörperlösung injiziert. Durch nachfolgende zweimalige Injektion von 10 µl 100 mmol/l H₃PO₄ wurden an das Steroid gebundene Antikörper wieder abgespalten. Wenn das 1-α-C6-DHT wie gewünscht auf der Chipoberfläche immobilisiert worden war, sollte der Testosteron-Antikörper im Sensorgramm eine starke und der Estrogen-Antikörper eine deutlich schwächere Anbindung zeigen.

Messung der Gelfiltrationsfraktionen der Seren

benötigte Lösungen und Materialien:

- PBS-Puffer
- SHBG-positiv Fraktionen der gelfiltrierten Serumproben
- 1α-C6-DHT beladener CM4-Chip

Zunächst wurde der mit 1α-C6-DHT beladene Chip in den Biosensor eingelegt. Anschließend wurde der PBS-Puffer 0,2 µm-sterilfiltriert, 10 min lang heliumtast, auf Eis gestellt und an das Meßsystem angeschlossen. Die zu messenden Fraktionen wurden aufgetaut und ebenfalls mit Eis gekühlt. Für die folgenden Experimente wurde am Biosensorsystem die Flussgeschwindigkeit auf 10 µl/min und die Temperatur auf 25 °C gestellt. Zur Konditionierung des Chips erfolgte nun drei Mal eine Injektion von 10 µl 100 mmol/l H₃PO₄.

Sobald das Sensorgramm eine konstante Basislinie zeigte, wurden die einzelnen Proben, beginnend mit der niedrigsten Fraktion, nach folgendem Schema gemessen: von der jeweiligen Fraktion wurden 45 µl mit einer Dissoziationszeit von 300 s injiziert. Nach Ende der Dissoziationszeit erfolgte die Abspaltung des gebundenen SHBG durch zweimalige Injektion von 10 µl 100 mmol/l H₃PO₄. Die maximale Anbindung des SHBG in einer Probe an das immobilisierte 1α-C6-DHT wurde

als Differenz der RU-Werte zwischen der Basislinie und dem Umschlagspunkt beim Übergang von der Assoziations- in die Dissoziationsphase bestimmt.

Aufgrund des arbeitsaufwändigen Verfahrens wurden nicht alle gesammelten Seren von Leberzirrhotikern und gesunden Männern am Biosensor vermessen. Vielmehr wurden von den 33 Leberzirrhoseseren 23 und von den 32 Kontrollseren 20 zufällig ausgewählt, deren Anbindungsverhalten dann ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu wurden alle 19 Schwangeren- und alle 20 Hyperthyreoseseren untersucht.

Ermittlung der Chip-spezifischen Kalibrationskurven für die SHBG-Anbindung

benötigte Lösungen und Materialien:

- Aqua dest.
- HEPES-Laufpuffer:
 - 0,01 mol/l HEPES (2,38 g/l) von Sigma-Aldrich
 - 0,15 mol/l NaCl (8,78 g/l)
 - in Aqua dest.
 - pH 8,5
- aufgereinigtes, N-deglykosiliertes SHBG (Konzentration 11 µmol/l)
- 1α-C6-DHT beladener CM4-Chip

Analog zu den Messungen der Gelfiltrationsfraktionen wurde der Chip in den Biosensor eingelegt, der HEPES-Laufpuffer mit sterilen 0,2 µm-Filtern filtriert, 10 min mit Helium entgast, schließlich auf Eis gestellt und als Laufpuffer an den Biosensor angeschlossen. Für die Messungen wurde eine Flussrate von 10 µl/min und eine Temperatur von 25 °C gewählt. Dann erfolgte die Konditionierung der Chipoberfläche durch dreimalige Injektion von 100 mmol/l H₃PO₄.

Das aufgereinigte, deglykosilierte SHBG mit einer Konzentration von 11 µmol/l wurde 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und von dieser Lösung dann entsprechend dem Schema von Tab. 3 mit HEPES-Laufpuffer verschiedene Verdünnungsstufen erstellt. Diese wurden dann bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

Im Biosensor wurden die hergestellten Lösungen (SHBG-Gehalt von 25, 50, 100, 200, 400 und 800 nmol/l) vermessen, indem jeweils 45 µl mit 600 s Dissoziationszeit injiziert wurden. Nach Ende der Dissoziationszeit erfolgte die Regeneration der Chipoberfläche mit 100 mmol/l H₃PO₄. Bei den Sensorgrammen der einzelnen Verdünnungen wurde die maximale Anbindung in der gleichen Weise bestimmt, wie für die Messung der Fraktionen aus der Gelfiltration beschrieben.

SHBG-Lösung 1100 nmol/l	HEPES-Laufpuffer	resultierende SHBG-Konz.
58 µl	22 µl	800 nmol/l
29 µl	51 µl	400 nmol/l
14,5 µl	65,5 µl	200 nmol/l
7,2 µl	72,8 µl	100 nmol/l
3,6 µl	76,4 µl	50 nmol/l
1,8 µl	78,2 µl	25 nmol/l

Tab. 3: Verdünnungsschema für aufgereinigtes, deglykosiliertes SHBG.

Auswertung der Biosensormessungen

Die auf dem Biosensorsystem bei der Messung der Gelfiltrationsfraktionen und den Verdünnungsexperimenten erhaltenen Sensorgramme wurden mit Hilfe der BIAevaluation 3.2 RC1-Software von Biacore AB ausgewertet.

2.9. Protein-, Enzym- und Hormonbestimmungen

SHBG-Messungen

Bei allen Seren wurde die SHBG-Konzentration mittels eines Elektrochemilumineszenz-Immunoassays (ECLIA) nach dem Sandwich-Prinzip im Elecsys 2010 von Roche (Mannheim, Deutschland) bestimmt. Die Leistungsdaten des SHBG-ECLIA sind in Tab. 4 aufgeführt. Serumproben, die mit einer SHBG-Konzentration von mehr als 200 nmol/l außerhalb des Messbereichs lagen, wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers 1:10 mit Diluent Universal Elecsys von Roche verdünnt. Die verdünnte Probe wurde dann nochmals gemessen und zur Ermittlung des tatsächlichen SHBG-Gehalts der mit der Verdünnung erhaltene Wert mit dem Faktor 10 multipliziert.

Andere Bestimmungen

Zusätzlich zur SHBG-Bestimmung wurden bei allen Seren von männlichen Leberzirrhotikern und gesunden Männern zum Vergleich der endokrinen Verhältnisse weitere Protein-, Enzym- und Hormonmessungen durchgeführt. Alle verwendeten Meßsysteme sind kommerziell erhältlich und werden in der klinisch-chemischen Routinediagnostik eingesetzt.

Im Einzelnen wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gesamteiweiss, Albumin, Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und Pseudocholinesterase (PChE) auf dem Modular PP von Roche
- GT, GE2, FSH und TSH auf dem Elecsys 2010 und DHEAS auf dem Elecsys 1010, beides Geräte von Roche
- Androstendion auf dem Immulite-System von DPC Biermann (Bad Nauheim, Deutschland)
- fT mit Hilfe des kompetitiven Radioimmunoassays (RIA) Coat-A-Count freies Testosteron von DPC Biermann auf dem Gamma-Counter 14 70 Wizard der Firma Wallac (Turku, Finnland)
- 17 α -Hydroxy-Progesteron (17 α -Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion, 17-OHP) mit dem kompetitiven RIA DSL-5000 ACTIVE 17 α -OHP von DSL (Sinsheim, Deutschland), ebenfalls auf oben genanntem Gamma-Counter

Die Daten der Hersteller zu benutzter Messmethode, Messbereich und Interassay-Variationskoeffizient (Vk) sind Tab. 4 zu entnehmen.

Parameter	Methode	Messbereich	Interassay-Vk (Humanserum)
17-OHP	kompetitiver coated-tube RIA	0,30-60,60 nmol/l	6,3-10,8%
Albumin	Bromcresolgrün-Methode	1,0-7,0 g/dl	1,71%
ALT	enzymatischer Farb-Test nach IFCC bei 37°C	4-600 IU/l	4,4%
Androstendion	kompetitiver Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay	1,04-35 nmol/l	6,4-15,2%
AST	enzymatischer Farb-Test nach IFCC bei 37°C	4-800 IU/l	3,2%
DHEAS	ECLIA nach Kompetitionsprinzip	3-27000 nmol/l	2,4-4,7%
FSH	ECLIA nach Sandwichprinzip	0,100-200,0 mIU/ml	3,8-5,3%
fT	kompetitiver coated-tube RIA	1,9-173 pmol/l	8,0-18,3 %
GE2	ECLIA nach Kompetitionsprinzip	18,4-15781 pmol/l	2,3-6,2%
Gesamteiweiss	Biuret-Methode	0,2-15 g/dl	0,95%
GGT	enzymatischer Farb-Test nach IFCC bei 37°C	3-1200 IU/l	1,3%
GT	ECLIA nach Kompetitionsprinzip	0,069-52,00 nmol/l	1,7-7,4%
PChE	enzymatischer Farb-Test nach IFCC bei 37°C	35-16000 IU/l	1,4%
SHBG	ECLIA nach Sandwichprinzip	0,350-200 nmol/l	2,7-5,6%
TSH	ECLIA nach Sandwichprinzip	0,005-100,0 μ IU/ml	3,3-8,7%

Tab. 4: Leistungsdaten der Protein-, Enzym- und Hormonbestimmungen [Herstellerangaben; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine].

2.10. Statistische Auswertung

Zur Beurteilung eventueller Unterschiede im Hormonhaushalt von gesunden Männern und männlichen Leberzirrhotikern wurden die Biosensoranalysen sowie die Protein-, Enzym- und Hormonbestimmungen mit Hilfe des Add-in-Makros Analyse-it von Analyse-it Software (Leeds, Großbritannien) in der Tabellenkalkulation Windows-Excel der Firma Microsoft (Redmond, WA, USA) statistisch ausgewertet. Aus den erhaltenen Messdaten wurden die Mittelwerte (MW) mit ihrer Standardabweichung (SD), die Median- und Quartilwerte sowie die 95%-Konfidenzintervalle von MW und Median errechnet. Die graphische Darstellung erfolgte in Box-and-Whisker-Plots. Mittels des nicht-parametrischen U-Tests von Mann, Whitney und Wilcoxon wurden die Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen hinsichtlich der Hormonanalysen und der Biosensorergebnisse auf Signifikanz hin überprüft. Als Signifikanzniveau wurde 5% gewählt. Für die Regressionsanalyse der Chip-spezifischen Kalibrationskurven wurde ein exponentielles, für die Regressionsanalyse der Beziehung zwischen den am Biosensor ermittelten Max-exp-Werten (siehe Abschnitt 3.1.4. und Tab. 5) und der SHBG-Konzentration im Serum ein lineares Regressionsmodell verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Biosensorisch-experimenteller Teil

3.1.1. Gelfiltration, Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Untersuchungen im biosensorisch-experimentellen Teil zielten darauf ab, die Interaktion von SHBG mit einem immobilisierten Androgen individuell für jedes einzelne Serum am Biosensor zu vermessen. Angesichts der zahlreichen unterschiedlichen Serumproteine, von denen SHBG nur einen kleinen Bruchteil ausmacht, erschien eine direkte Injektion von Serum am Biosensor wenig erfolgversprechend. Daher wurde ein Aufreinigungsschritt in Form einer Gelfiltrationschromatographie vorgeschaltet, so dass bei der SHBG-1 α -C6-DHT-Wechselwirkung potentiell interferierende Proteine, insbesondere Albumin, stark abgereichert oder ganz entfernt wurden.

Entsprechend wurden jeweils 100 μ l des zu untersuchenden Serums auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Die mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 280 nm aufgezeichneten Elutionsprofile sind in Abb. 3 anhand je eines typischen Beispiels für jede der experimentellen Gruppen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Chromatogramme hinsichtlich Verteilung und Größe der einzelnen Peaks z.T. beträchtlich unterscheiden. Wie hier nicht dargestellt, waren auch innerhalb der einzelnen Studiengruppen deutliche Unterschiede bezüglich des Elutionsverhaltens festzustellen. Um zu klären, zu welchen Retentionszeiten das SHBG eluiert, wurden alle gesammelten Fraktionen anschließend in Gelelektrophorese und Western-Blot eingesetzt.

Im Western-Blot sind die SHBG-haltigen Fraktionen eindeutig durch eine dunkle Bande auf dem zugehörigen Chemilumineszenzfilm zu identifizieren (Abb. 3). Unabhängig von den starken Variationen des Gelfiltrationschromatogramms zeigt sich hier ein recht einheitliches Bild: bei allen untersuchten Seren und in jeder Gruppe eluiert das SHBG zwischen den Retentionszeiten 60 min und 72 min mit einem Konzentrationspeak bei ungefähr 65 min. Ein Vergleich mit affinitätschromatographisch hochaufgereinigtem SHBG zeigt, dass die Retentionszeit des Maximums damit genau derjenigen entspricht, zu der die Elution des SHBG bei der Gelfiltration aufgrund seines MG auch zu erwarten ist (Daten nicht dargestellt). Bei allen Seren befindet sich das maximale Western-Blot-Signal also ungefähr in der Senke zwischen den beiden letzten großen Peaks des Elutionsprofils und wird sowohl zu früheren als auch zu späteren Retentionszeiten hin zunehmend schwächer, bis es schließlich ganz verschwindet. Albumin eluiert mit dem vorletzten großen Peak, so dass dieses Protein in den SHBG-haltigen Fraktionen stark abgereichert ist.

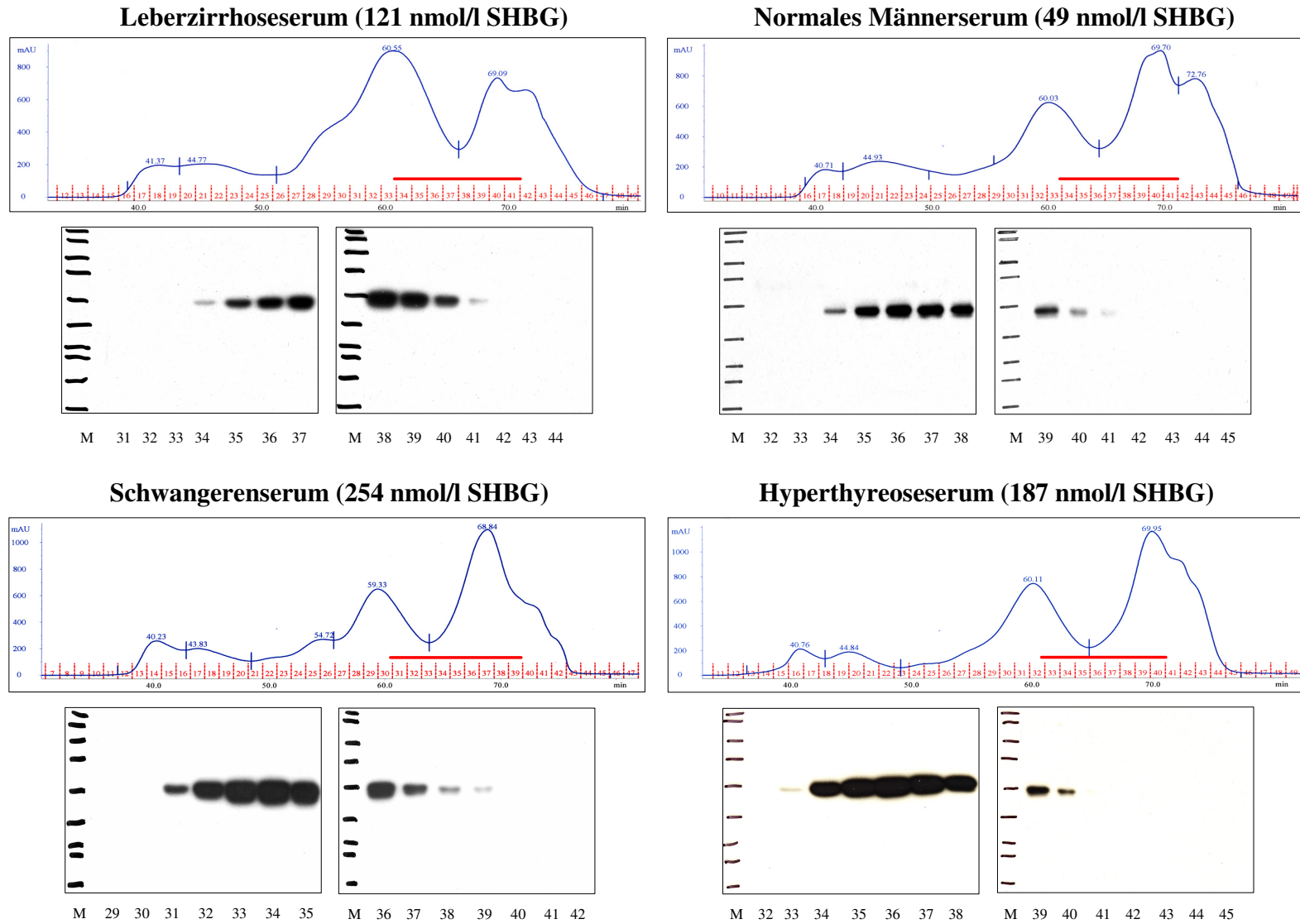


Abb. 3: Elutionsprofile und Western-Blots mit Fraktionsnummern für je ein typisches Lci-, normales Männer-, Schwangeren- und Hyperthyreose-Serum (M, Marker für Molekulargewicht). SHBG-Konzentrationen in Klammern. SHBG-haltige Fraktionen sind im Chromatogramm mit einem roten Balken markiert.

Die Signalstärke des Maximums im Western-Blot ist umso größer, je höher die SHBG-Konzentration im ursprünglichen Serum war: die Intensität des Maximums steigt von gesunden Männern über männliche Leberzirrhotiker und Hyperthyreote bis hin zu den Schwangeren an. Der Einfluss der SHBG-Serum-Konzentration auf die Breite des „SHBG-Peaks“ hingegen ist gering. So eluiert das Protein in allen Gruppen über etwa sieben bis neun Fraktionen verteilt, mit einer nur leichten Tendenz zur Elution in einer größeren Anzahl von Fraktionen bei höheren SHBG-Spiegeln im untersuchten Serum.

Bei einigen, jedoch nicht bei allen Schwangerenserum konnten im Western-Blot-Screening zusätzliche SHBG-haltige Gelfiltrationsfraktionen bei kürzeren Retentionszeiten nachgewiesen werden. Ein Beispiel für ein solches Schwangerenserum ist in Abb. 4 dargestellt. Dieses Serum zeigt intensiv gefärbte Banden im Bereich der Fraktionen 32 bis 45 und schwächere Western-Blot-Signale bei den Fraktionen 18 bis 25. Bei Zuordnung der Western-Blots zum Chromatogramm ergibt sich damit für dieses Schwangerenserum folgendes Bild: die Hauptmasse des Serum-SHBG eluiert bei Retentionszeiten zwischen etwa 60 min und 75 min und verteilt sich damit auf die beiden größten Peaks des Elutionsprofils bei 61 min und 70 min. Dies entspricht dem charakteristischen, durch das MG von etwa 90 kDa zu erwartenden Peak des homodimeren SHBG, wie er auch bei den anderen Seren zu detektieren ist. Daneben enthalten weiterhin die Fraktionen des breiten Peaks im hochmolekularen Bereich bei etwa 45 min, entsprechend einem MG von ungefähr 1000 kDa, das Bindungsprotein.

Schwangerenserum mit SHBG > 300 nmol/l:

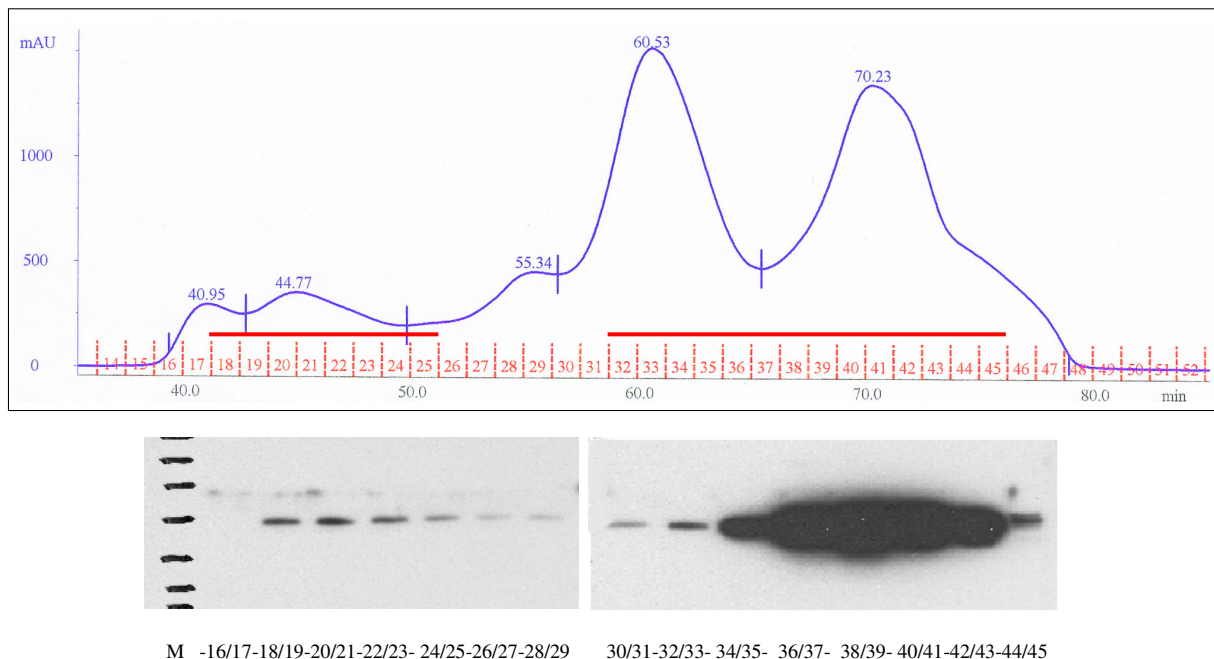


Abb. 4: Gelfiltrationschromatogramm eines Schwangerenserums mit zugehörigem Western-Blot, bei dem sich eine zusätzliche SHBG-Elution im hochmolekularen Bereich findet. SHBG-haltige Fraktionen sind im Chromatogramm mit einem roten Balken markiert.

3.1.2. Biosensormessungen der Seren

Zur Untersuchung der SHBG-Androgen-Interaktion bei Lci wurde im Biosensor das Anbindungsverhalten des in den jeweiligen Fraktionen der Gelfiltration enthaltenen SHBG an das auf dem Chip immobilisierte 1α -C6-DHT ermittelt.

Für je ein charakteristisches Serum aus jeder Studiengruppe sind die sich bei diesen Messungen ergebenden Sensorgramme beispielhaft in Abb. 5 gezeigt. In allen Gruppen und allen Fraktionen ist die grundsätzliche Form der Anbindungskurve nahezu gleich, bestehend aus einem steilen Anstieg des Biosensorsignals in der Assoziationsphase und einem verhältnismäßig langsamen Abfall in der Dissoziationsphase. Der glatte, hyperbole Verlauf der Anbindungskurven ist bei keiner der Gruppen durch Knicke oder Brüche gestört. Anhand der ermittelten Sensorgramme lässt sich das Fraktions-Anbindungsmaximum bestimmen. Unter Fraktions-Anbindungsmaximum wird im Folgenden die Biosensorsignaldifferenz zwischen der Basislinie am Beginn der Injektion und dem Umschlagspunkt von Assoziations- zu Dissoziationsphase im Sensorgramm, ausgedrückt als Δ RU, verstanden (Tab. 5). Die Fraktions-Anbindungsmaxima jedes untersuchten Serums steigen in allen Studiengruppen zunächst bis zu einem Maximalwert an, um dann wieder abzufallen bis schließlich gar keine Anbindung mehr zu detektieren ist. Notwendigerweise ergibt sich daraus eine entsprechende Zu- und Abnahme der Anstiegssteilheit des Sensorgramms in der Assoziationsphase (Abb. 5). Dieses Verhalten korrespondiert gut mit dem Verlauf der Stärke des Western-Blot-Signals. Es ist jedoch anzumerken, dass die Fraktion mit der maximalen Anbindung am Biosensor nicht zwangsläufig derjenigen mit dem maximalen Western-Blot-Signal entspricht, sondern dass sich letzteres zum Teil auch eine Fraktion früher oder später finden kann.

Fraktions-Anbindungsmaximum:

Biosensorsignaldifferenz zwischen der Basislinie am Beginn der Injektion und dem Umschlagspunkt von Assoziations- zu Dissoziationsphase im Sensorgramm (in Δ RU)

Serum-Anbindungsmaximum:

vom Betrag größtes Fraktions-Anbindungsmaximum aller Fraktionen eines Serums (in Δ RU)

SHBG-Konzentration:

im ECLIA gemessenen SHBG-Konzentration im ursprünglichen Serum (in nmol/l)

Max exp:

mit Hilfe der Chip-spezifischen Biosensor-Kalibrationskurven errechnete Konzentration an funktionalem SHBG in der Fraktion eines Serums mit dem Serum-Anbindungsmaximum (in nmol/l SHBG)

Tab. 5: Begriffserläuterungen zu den Biosensormessungen.

**Leberzirrhoseserum
(123 nmol/l)**

**Normales Männerserum
(32 nmol/l)**

**Schwangerenserum
(318 nmol/l)**

**Hyperthyreoseserum
(162 nmol/l)**

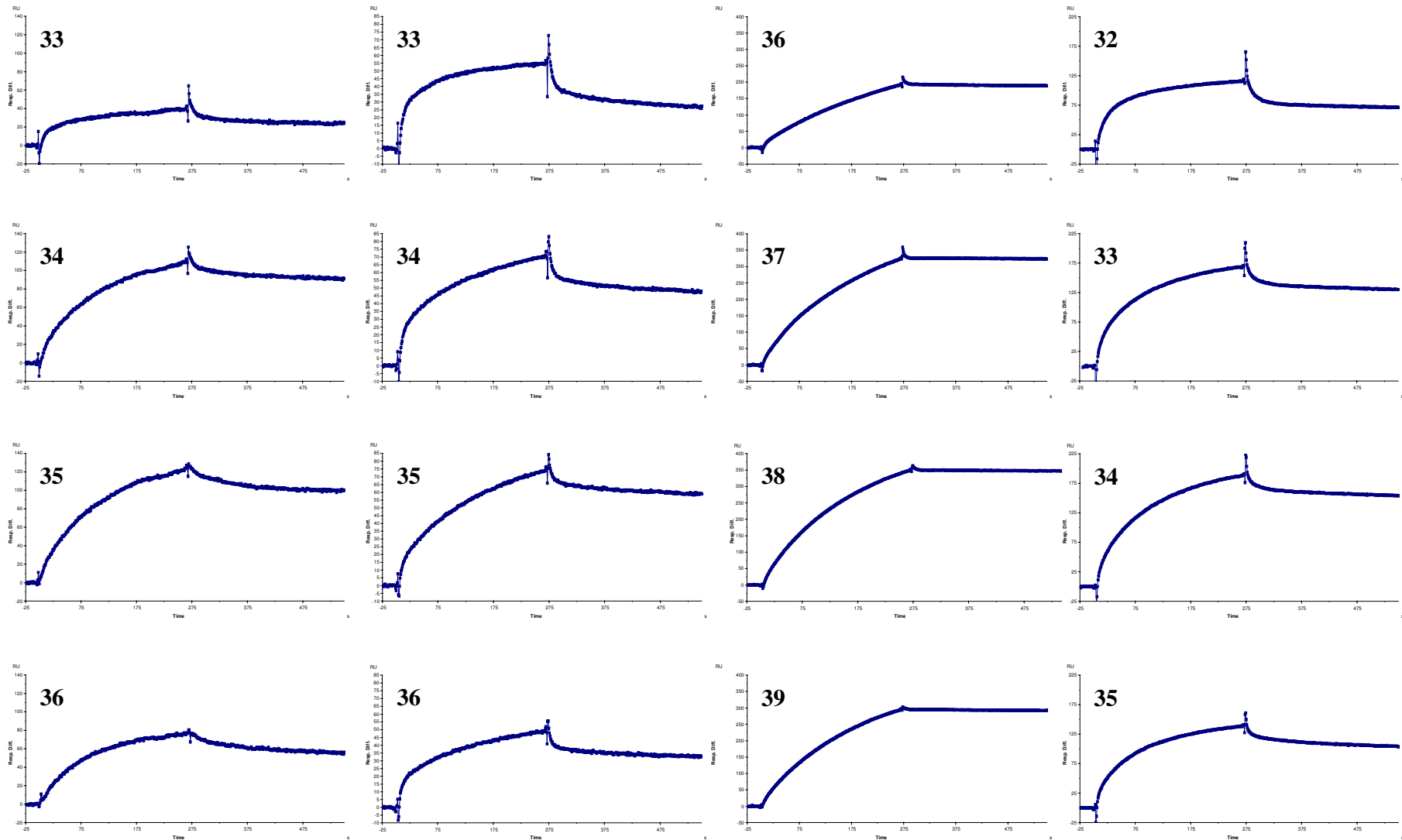


Abb. 5: Sensorgramme der vier Gelfiltrationsfraktionen mit den höchsten Anbindungen für je ein typisches Lci-, normales Männer-, Schwangeren- und Hyperthyreose-Serum. SHBG-Konzentrationen in Klammern, Fraktionsnummer oben links im Sensorgramm.

Die einzelnen Gruppen der Studie zeigen zwar alle die gleiche Form des Sensorgramms, jedoch ergeben sich deutliche Unterschiede beim Vergleich der Serum-Anbindungsmaxima. Als Serum-Anbindungsmaximum wurde in dieser Studie das vom Betrag her größte Fraktions-Anbindungsmaximum aller Fraktionen eines Serums bezeichnet, das daher genauso in Δ RU gemessen wird (Tab. 5). In Abb. 6 ist neben der gleichen Form der Anbindungskurve bei allen Studiengruppen zu erkennen, dass mit zunehmender SHBG-Ausgangskonzentration im Serum in der Reihenfolge gesunde Männer, männliche Leberzirrotiker, Hyperthyreotiker, Schwangere auch das Serum-Anbindungsmaximum ansteigt. Aufgrund der nur begrenzten Zahl an Seren, die auf einem einzelnen Chip vermessen werden können, bevor dieser unbrauchbar wird, war es nötig, für diese Studie insgesamt sieben verschiedene Chips zu beladen. Da die tatsächlich auf dem Chip immobilisierte Steroidmenge trotz einheitlichen Beladungsprotokolls variierte und ein Einfluss der Beladungsdichte auf die Fraktions-Anbindungsmaxima und damit auch auf die Serum-Anbindungsmaxima zu vermuten war, konnte der gefundene Zusammenhang zwischen SHBG-Serum-Konzentration und Serum-Anbindungsmaximum daher zunächst nur als Tendenz gewertet werden.

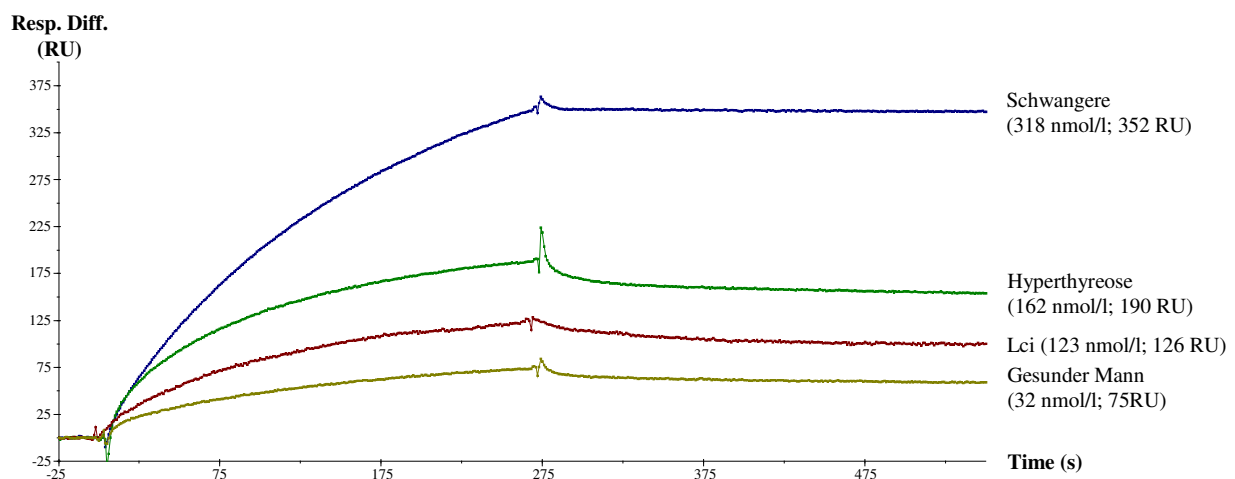


Abb. 6: Serum-Anbindungsmaxima in den verschiedenen experimentellen Gruppen. In Klammern SHBG-Konzentration und Serum-Anbindungsmaximum des jeweiligen Serums.

3.1.3. SHBG-Kalibrationskurven der Biosensorchips

Um die Messungen auf den einzelnen Chipoberflächen trotz unterschiedlicher 1α -C6-DHT-Immobilisationsraten vergleichen zu können, wurde jeder Chip mit hochaufgereinigtem, PNGase-verdaulichem SHBG kalibriert. Ziel war, jedem gemessenen Serum-Anbindungsmaximum eine definierte Konzentration an bioaktivem SHBG zuordnen zu können, die unabhängig von der Beladungsdichte des jeweiligen Messchips ist.

Zur Erstellung der Kalibrationskurven wurden SHBG-Lösungen bekannter Konzentration hergestellt, auf dem jeweiligen Chip vermessen und das Anbindungsmaximum für jede einzelne Verdünnungsstufe analog zur Bestimmung des Fraktions-Anbindungsmaximums ermittelt. Die Bestimmung der Kalibrationskurve ist am Beispiel des Chips CM4-53 illustriert, da auf ihm die größte Zahl an Seren untersucht wurde. Die für diesen Chip dabei erhaltenen Sensorgramme sind in Abb. 7 dargestellt. Auch hier ist wieder ersichtlich, dass, unabhängig von der injizierten SHBG-Konzentration, die Bindungskurven alle die gleiche, typische Form aufweisen. Diese entspricht im Wesentlichen dem schon bei der Vermessung der Gelfiltrationsfraktionen beobachteten Verlauf der Sensorgramme. Während sich in der Dissoziationsphase keine relevanten Abweichungen im Bindungsverhalten der einzelnen Verdünnungen ergeben, ist in der Assoziationsphase der Anstieg des Resonanzsignals umso größer, je höher konzentriert das SHBG eingesetzt wird. Entsprechend resultieren auch höhere relative Anbindungen am Ende der Assoziationsphase. Beim Vergleich dieser Anbindungsmaxima fällt auf, dass sich bei den Konzentrationen 25 nmol/l bis 200 nmol/l abhängig vom Anstieg der SHBG-Konzentration in etwa gleichem Maß auch die maximale Anbindung an die Chipoberfläche erhöht. Bei den 400 nmol/l-, 600 nmol/l- und 800 nmol/l-konzentrierten SHBG-Lösungen hingegen ist das Anbindungsmaximum im Verhältnis zur Erhöhung der SHBG-Konzentration zu niedrig. Ein einfacher, direkter Zusammenhang zwischen SHBG-Gehalt und Biosensormaximum ist bei diesen Verdünnungen somit nicht mehr gegeben. Dies hat Konsequenzen für die Auswertung der Sensorgramme bei Injektion von Lösungen mit einer SHBG-Konzentration von mehr als 200 nmol/l.

Um aus einem gemessenen Anbindungsmaximum den Gehalt an funktionalem SHBG der untersuchten Lösung bestimmen zu können, wurden die injizierten SHBG-Konzentrationen in Abhängigkeit von den ermittelten Δ RU am Ende der Assoziationsphase aufgetragen (Abb. 7). Hierbei ist noch klarer zu erkennen, dass das Biosensorsignal nicht linear mit der SHBG-Konzentration ansteigt. Vielmehr zeigten Regressionsanalysen, dass die Beziehung zwischen diesen beiden Größen am besten durch eine Exponentialfunktion beschrieben wird. Für das Beispiel des CM4-53-Chips ist die exponentielle Regressionskurve durch die Gleichung

$$y = 12,605 \times e^{0,0052 \times x}$$

charakterisiert, wobei es sich bei x um die maximale Anbindung in Δ RU und bei y um die SHBG-Konzentration der injizierten Probe handelt. Das Bestimmtheitsmaß (r^2) für die Regressionsfunktion beträgt im Falle des CM4-53-Chips 0,9949.

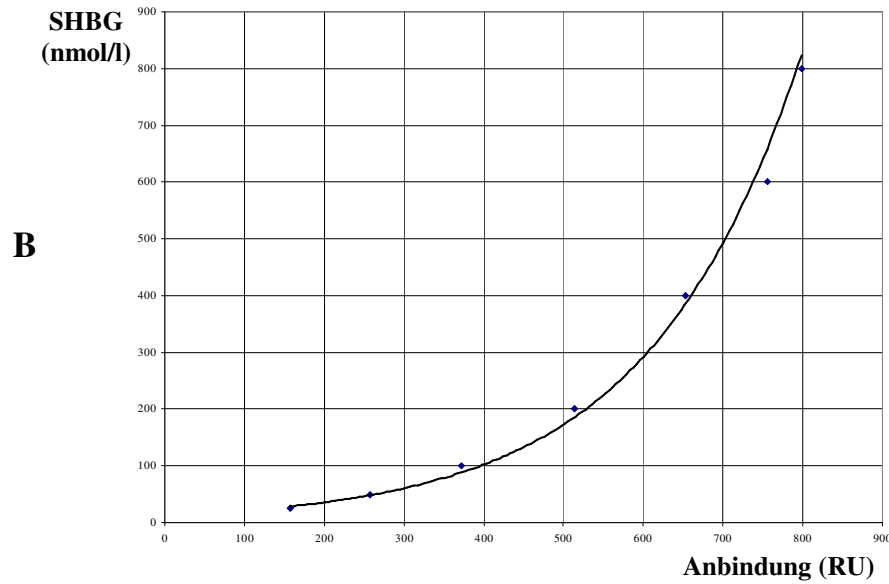
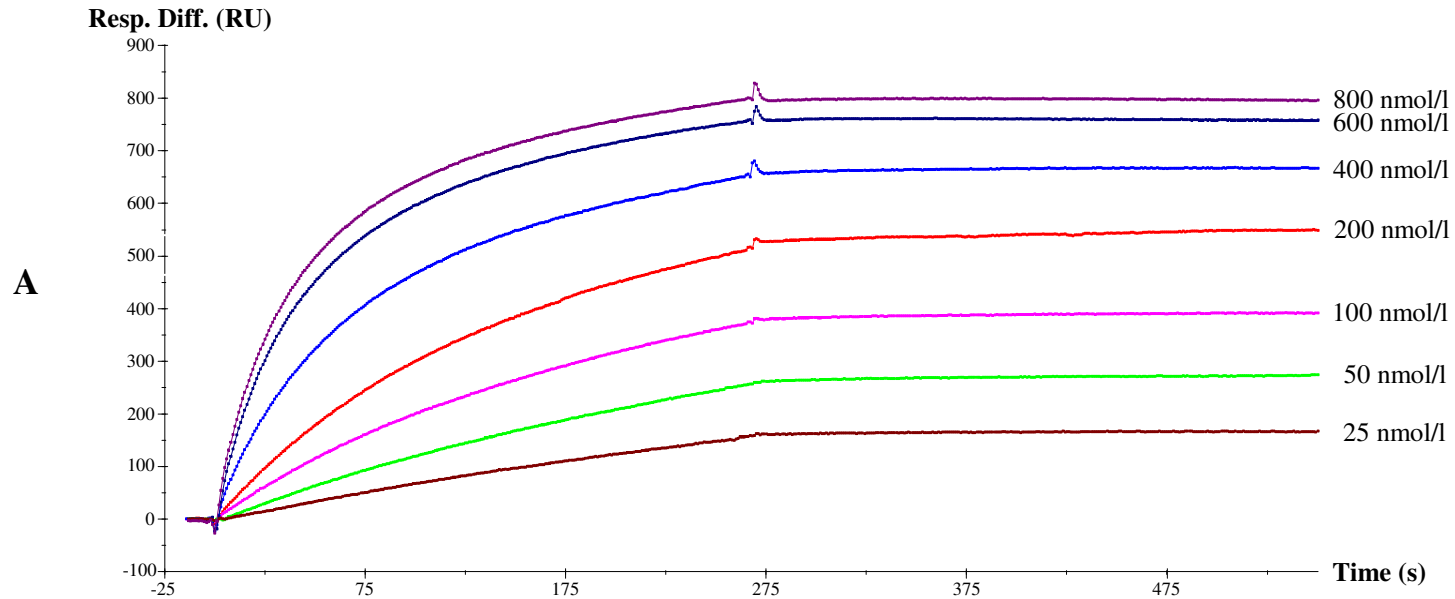


Abb. 7: Ermittlung der Chip-spezifischen Kalibrationskurve am Beispiel des CM4-53-Chips.

A: Sensorgramme bei Injektion von hochaufgereinigtem SHBG in verschiedenen Konzentrationen.

B: Exponentielle Regressionskurve der Sensorgrammdaten ($y = 12,605 \times e^{0,0052 \times x}$, $r^2 = 0,9949$).

In analoger Weise wurde die exponentielle Regression auch bei den anderen Chips auf die Messwerte der Verdünnungsreihen angewendet. Die Daten zur Steroidbeladung der Chips sowie die Ergebnisse für die Regressionskurven und r^2 sind in Tab. 6 dargestellt. Bei allen Chips wird der Verlauf der Kalibrationskurve durch eine Exponentialfunktion mit r^2 zwischen 0,9464 und 0,9978 sehr gut beschrieben. Mit der exponentiellen Regressionsfunktion bestand damit die Möglichkeit, für jeden Chip aus den gemessenen Anbindungsmaxima die Konzentration an funktionalem SHBG der jeweils injizierten Lösung zu berechnen. Durch diese Vorgehensweise konnten die Ergebnisse auf den verschiedenen Chipoberflächen untereinander verglichen und ein Maß für die Menge an bioaktivem SHBG erstellt werden.

<u>Chip</u>	<u>Beladung (RU)</u>	<u>exponentielle Regression</u>	<u>r^2</u>	<u>Männliche Lci</u>	<u>Gesunde Männer</u>	<u>Schwangere</u>	<u>Hyperthyreote</u>	<u>Seren insg.</u>
B1-31	112	$y = 13,17 \times e^{0,0093 \times x}$	0,9859	8	1	4	0	13
B1-40	242	$y = 8,993 \times e^{0,0043 \times x}$	0,9978	4	2	0	0	6
B1-CM4-41	569	$y = 6,751 \times e^{0,0103 \times x}$	0,9869	1	8	0	0	9
CM4-51	251	$y = 12,881 \times e^{0,0058 \times x}$	0,9926	2	3	4	6	15
CM4-53	244	$y = 12,605 \times e^{0,0052 \times x}$	0,9949	8	5	8	9	30
CM4-55	95	$y = 19,516 \times e^{0,0126 \times x}$	0,9464	0	1	2	5	8
CM4-56	262	$y = 18,888 \times e^{0,0013 \times x}$	0,9525	0	0	1	0	1
Summe:				23	20	19	20	82

Tab. 6: Biosensormesschips.

3.1.4. Zusammenhang zwischen SHBG-Serum-Konzentration und funktionaler SHBG-Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktionalität der Androgenbindung von SHBG bei männlichen Lci-Patienten untersucht werden. Als Vergleichsgruppen dienten neben den gesunden Männern auch schwangere Frauen und Hyperthyreote, da sie im Normalfall sehr hohe SHBG-Spiegel aufweisen [2 (S. 81); 30 (S. 387); 56 (S. 758); 109 (S. 535); 127 (S. 231)]. Wie oben beschrieben, ergab sich in der qualitativen Analyse der aufgenommenen Sensorgramme bei allen Gruppen die gleiche Anbindungscharakteristik von SHBG an 1α -C6-DHT. Die Chip-spezifischen Kalibrationskurven boten nun zusätzlich die Möglichkeit, unabhängig von der Steroidbeladung des jeweiligen Messchips, die Serum-Anbindungsmaxima quantitativ zu vergleichen.

Hierzu wurde zunächst für jedes Serum die Gelfiltrationsfraktion mit dem betragsmäßig größten Fraktions-Anbindungsmaximum ausgewählt. Dieses im Biosensor beobachtete Anbindungsmaximum wurde gleichgesetzt mit dem Serum-Anbindungsmaximum (siehe oben, Tab. 5). Mit Hilfe der exponentiellen Regressionsfunktion für den jeweiligen Messchip konnte dann die sich hieraus ergebende korrespondierende Konzentration an funktionalem SHBG in dieser Fraktion berechnet werden. Jeder Studienteilnehmer ist damit neben dem mittels ECLIA immunologisch in nmol/l im ursprünglichen Serum gemessenen SHBG-Spiegel, der im Folgenden als „SHBG-Konzentration“ bezeichnet wird (Tab. 5), durch einen zweiten Wert charakterisiert. Dieser wird für jedes Serum mit Hilfe der Chip-spezifischen Biosensor-Kalibrationskurven ermittelt und spiegelt die Konzentration an bioaktivem SHBG in der Fraktion mit dem Serum-Anbindungsmaximum wider. Er wird in dieser Arbeit „Max exp“ genannt und in nmol/l SHBG angegeben (Tab. 5).

Insgesamt wurden für diese Studie auf sieben verschiedenen Biosensorchips 82 Seren vermessen. Aufgrund der arbeitsaufwändigen Methodik wurden von den insgesamt 33 Lci- und 32 Kontrollseren normaler Männer zufällig 23 bzw. 20 Seren für die Biosensorexperimente ausgewählt, daneben noch zu Vergleichszwecken die Seren von 19 schwangeren Frauen und von 20 Hyperthyreose-Patienten (siehe Tab. 6, Tab. 7).

A. Anzahl der Seren in den beiden methodischen Ansätzen					
	<u>männliche Leberzirrhotiker</u>	<u>gesunde Männer</u>	<u>Schwangere</u>	<u>Hyperthyreote</u>	<u>insgesamt</u>
Biosensor	23 von 33	20 von 32	19	20	82
Statistik	33	32	keine	keine	65
B. Aufteilung der Lci-Gruppe					
Ätiologie:	Alkohol	12			
	Perchlorethylen +Alkohol	1			
	Hepatitis B	5			
	Hepatitis C	14			
	Autoimmunhepatitis	1			
Schweregrad:	Child-Pugh A	24			
	Child-Pugh B	9			
Therapie:	ohne Spironolacton:	22			
	mit Spironolacton:	11			

Tab. 7: Anzahl der gemessenen Seren.

Vergleicht man die ermittelten Max exp-Werte von Leberzirrhotikern und gesunden Männern miteinander, so stellt man fest, dass die MW in der Patientengruppe mit $28,5 \pm 8,0$ nmol/l SHBG (MW \pm SD) signifikant ($p < 0,0001$) höher liegen als bei der gesunden Kontrollgruppe mit $15,3 \pm 5,4$ nmol/l SHBG (Abb. 8, Tab. 8).

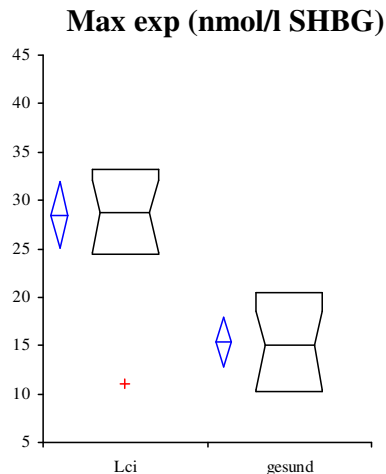


Abb. 8: Vergleich der Max exp-Werte von Lci-Patienten und gesunden Männern (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer).

Ein differenzierteres Bild ergibt sich, wenn man SHBG-Konzentration und Max exp für alle am Biosensor vermessenen Seren auf einer doppelt-logarithmischen Skala gegeneinander aufträgt. Dabei erhält man das in Abb. 9 dargestellte zweidimensionale Diagramm. In diesem ist zu erkennen, dass mit Zunahme der SHBG-Konzentration auch die an Max exp ablesbare funktionale SHBG-Aktivität zunimmt. Ein Spearman-Korrelationskoeffizient für diese Assoziation von 0,81 bestätigt statistisch den visuell nur zu vermutenden Zusammenhang. In der Regressionsanalyse zeigte sich, dass eine Gerade mit der Gleichung

$$\log(\text{SHBG}) = 0,8872 \times \log(\text{Max exp}) + 0,7275$$

bei einem r^2 von 0,6529 die Beziehung beider Größen am besten widerspiegelt.

Differenziert man die Messwerte nach den einzelnen Studiengruppen, so stellen sich diese als teilweise überlappende Punktwolken dar (Abb. 9). Aufgrund der niedrigsten SHBG-Konzentrationen und den gleichzeitig niedrigsten Max exp-Werten findet sich die Gruppe der gesunden Männer im Diagramm links unten, während die Schwangeren mit den höchsten Werten dieser beiden Größen rechts oben zu liegen kommen. Die männlichen Leberzirrhotiker und die Hyperthyreoten schließen entsprechend ihrer mittelhohen SHBG-Konzentrationen und mittleren Max exp-Werte mit ihren Punktwolken die Lücke zwischen diesen beiden Extremen. Es ist evident, dass sich die Messwerte der männlichen Leberzirrhotiker gut in den Verlauf der Messwerte der restlichen drei Studiengruppen einfügen und weder zu höheren noch zu niedrigeren Max exp-Werten verschoben sind. Auch die

Regressionsgerade liegt in unmittelbarer Nähe der Punkte von männlichen Leberzirrhotikern und beschreibt damit bei ihnen den Zusammenhang zwischen SHBG-Konzentration und Max exp und somit das Verhalten der funktionalen SHBG-Aktivität sehr gut.

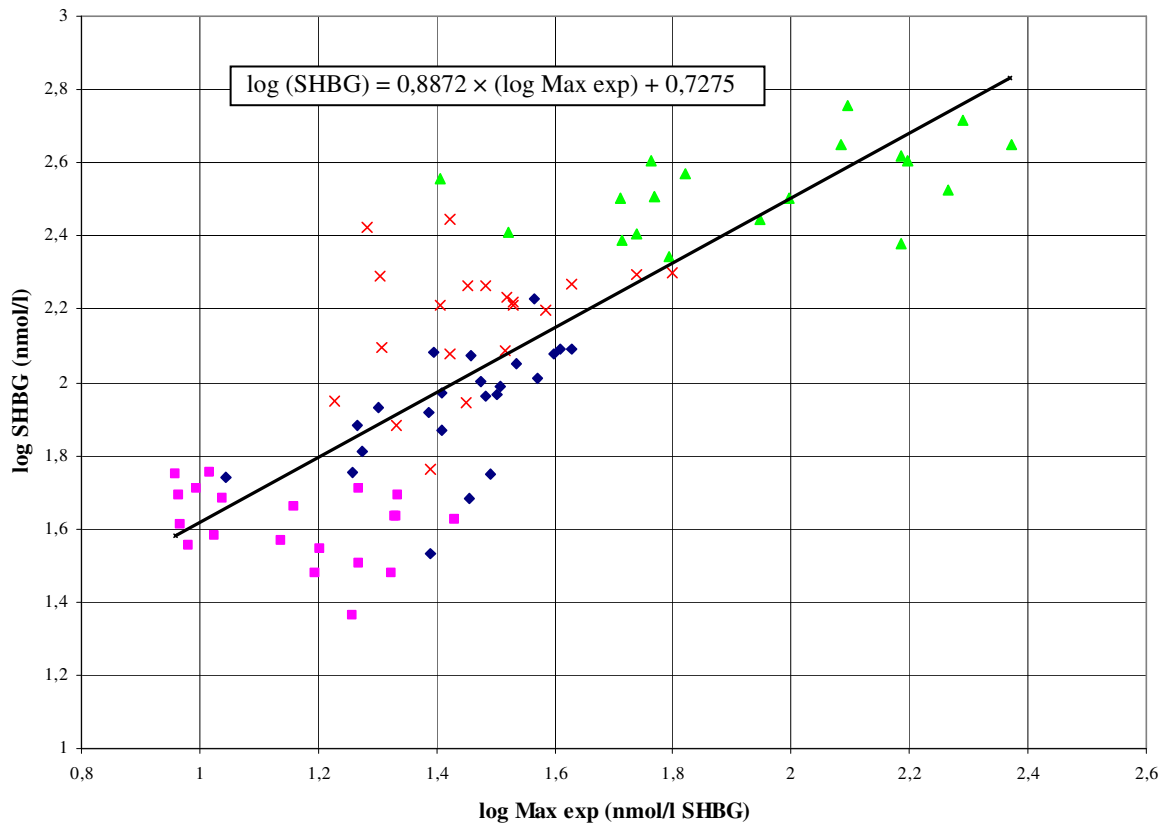


Abb. 9: Regressionanalyse des Zusammenhanges zwischen Max exp-Werten und SHBG-Konzentrationen. Regressionsgleichung im Diagramm dargestellt. Symbole: ■, gesunde Männer; ◆, Lci; ×, Hyperthyreote; ▲, Schwangere; Regressionsgerade in schwarz.

3.2. Laboratoriumsmedizinisch-statistischer Teil

3.2.1. Zusammensetzung der Studiengruppen und Erfüllung der Einschlusskriterien

Im laboratoriumsmedizinisch-statistischen Teil der Arbeit wurden Enzym-, Hormon- und Proteinmessungen eingesetzt, um die Ergebnisse der Biosensorexperimente in die hormonelle Gesamtsituation der Leberzirrhotiker einordnen zu können. Hierfür wurden relevante Laborparameter bei männlichen Lci-Patienten bestimmt und mit gesunden Männern als Normalkollektiv verglichen. Mit dem U-Test von Mann und Whitney wurde nach signifikanten Unterschieden zwischen beiden Studiengruppen gesucht. Die zugehörige statistische Auswertung der erhobenen Daten mit den charakteristischen Kennzahlen für jeden Parameter ist in Tab. 8 gezeigt.

		Leberzirrhotiker		gesunde Männer		p
		MW ± SD	Median	MW ± SD	Median	
Biosensormessungen	Anzahl	n = 23		n = 20		
	Max exp (nmol/l SHBG)	28,5 ± 8,0	28,8	15,3 ± 5,4	15,1	< 0,0001
Basischarakteristika	Anzahl	n = 33		n = 32		
	Alter (Jahre)	56,1 ± 9,4	57,0	54,5 ± 9,3	56,0	ns
	TSH (µIU/ml)	1,75 ± 0,90	1,71	1,32 ± 0,80	1,35	ns
Leberfunktionsparameter	ALT (IU/l)	79,3 ± 71,8	62,0	26,8 ± 11,1	25,0	< 0,0001
	AST (IU/l)	93,4 ± 92,1	62,0	27,9 ± 7,8	28,0	< 0,0001
	GGT (IU/l)	173,0 ± 169,9	100,0	33,6 ± 13,13	30,5	< 0,0001
	PChE (IU/l)	5610 ± 2505	5336	8413 ± 1789	8222	< 0,0001
Sexualsteroide	GT (nmol/l)	18,0 ± 8,6	15,3	15,6 ± 3,7	14,9	ns
	fT (pmol/l)	23,2 ± 14,4	21,5	37,2 ± 19,8	40,8	0,0047
	Androstendion (nmol/l)	10,5 ± 4,8	10,5	9,1 ± 3,4	7,5	ns
	DHEAS (nmol/l)	1493 ± 1410	1013	5099 ± 2844	4587	< 0,0001
	GE2 (pmol/l)	152 ± 60	138	96 ± 29	94	< 0,0001
	17-OHP (nmol/l)	5,7 ± 3,9	4,8	5,1 ± 2,5	4,3	ns
	GT/GE2-Verhältnis	134 ± 53	135	187 ± 78	166	0,0066
Gonadotropine	FSH (mIU/ml)	14,2 ± 19,6	7,1	6,7 ± 3,2	6,1	ns
Transportproteine	Albumin (g/dl)	3,89 ± 0,75	4,03	4,50 ± 0,45	4,57	0,0003
	SHBG (nmol/l)	91,6 ± 33,5	91,3	40,9 ± 10,5	41,5	< 0,0001
Sonstige	Gesamteiweiss (g/dl)	7,33 ± 0,79	7,49	7,34 ± 0,52	7,40	ns

Tab. 8: Statistische Kennzahlen zum Vergleich von männlichen Leberzirrhotikern und gesunden Männern (MW, Mittelwert; SD Standardabweichung; p, zweiseitiger p-Wert im U-Test nach Mann und Whitney; ns, nicht signifikant).

Entsprechend den im Teil Material und Methoden dargestellten Einschlusskriterien wurden insgesamt 65 Probanden in die statistische Untersuchung aufgenommen. Bei 32 dieser Individuen handelte es sich um gesunde Männer, die restlichen 33 Patienten litten unter einer Lci. Die häufigsten Ursachen der Lci waren Hepatitis C (14 Patienten) und Alkoholabusus (12 Patienten). Bei den restlichen Lci-Patienten konnte in 5 Fällen die Leberzirrhose ätiologisch auf eine Hepatitis-B-Virus-Infektion zurückgeführt werden, daneben in je einem Fall auf eine Autoimmunhepatitis und auf eine Kombination aus Alkoholabusus und beruflicher Perchlorethylenbelastung. 24 der Leberzirrhotiker befanden sich im Child-Pugh-Stadium A, 9 im Child-Pugh-Stadium B. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme standen elf der Leberzirrhose-Patienten unter diuretischer Therapie mit Spironolacton bzw. anderen Aldosteronantagonisten (siehe Tab. 7).

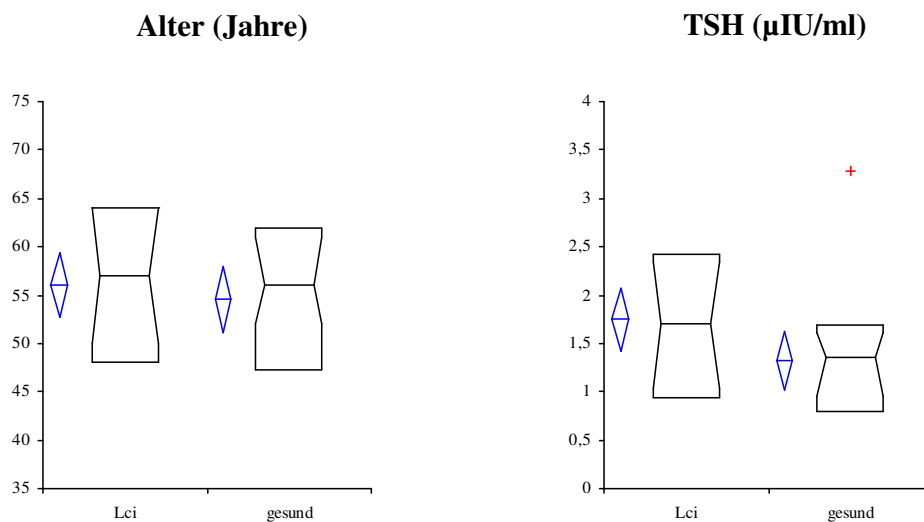


Abb. 10: Basischarakteristika der Studiengruppen (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer).

Voraussetzung für die Teilnahme des jeweiligen Probanden an der Studie war die Erfüllung der Einschlusskriterien. Um einen altersunabhängigen Vergleich der beiden Studienpopulationen zu gewährleisten, wurden nur Individuen im Alter zwischen 35 und 75 Jahren zugelassen. Das mittlere Alter der gesunden Männer betrug $54,5 \pm 9,3$ Jahre, das der Lci-Patienten $56,1 \pm 9,4$ Jahre, wobei der Unterschied entsprechend des Ergebnisses des U-Tests als nicht signifikant einzustufen ist (Abb. 10, Tab. 8). Damit kann von einer Altersgleichheit der Gruppen ausgegangen werden. Eine aktive Hyperthyreose galt als Ausschlusskriterium. Vergleicht man den mittleren TSH-Wert der Leberzirrhotiker von $1,75 \pm 0,90$ µIU/ml mit dem gesunder Männer von $1,32 \pm 0,80$ µIU/ml, so wird deutlich, dass die TSH-Spiegel bei Ersteren leicht höher liegen (Abb. 10). In beiden Studiengruppen befinden sich die MW jedoch innerhalb des Referenzbereichs und der Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Tab. 8). Entsprechend ist anzunehmen, dass die Forderung nach einer nicht-hyperthyreoten Stoffwechsel-

lage sowohl bei den Leberzirrhotikern als auch bei den gesunden Männern erfüllt ist und hinsichtlich der Schilddrüsenfunktion keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen existieren.

Die restlichen Ein- und Ausschlusskriterien der Leberzirrhosepatienten (histologisch nachgewiesene Leberzirrhose, Stadium Child-Pugh A oder B, kein vorbestehender Hypogonadismus, keine Hämochromatose, kein insulinabhängiger Diabetes mellitus) entzogen sich einer einfachen laboratoriumsmedizinischen Überprüfung, konnten aber durch Einsicht in die Krankenakten für jeden der teilnehmenden Leberzirrhotiker verifiziert werden. In der Kontrollgruppe der gesunden Männer ergaben sich bei der klinischen Untersuchung und den laborchemischen Routineanalysen keine Hinweise auf akute oder chronische Erkrankungen. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass seitens der Probanden alle Voraussetzungen für die Studie erfüllt waren.

3.2.2. Leberfunktionsparameter

Um die Syntheseleistung und Funktionsfähigkeit der Leber bei den männlichen Leberzirrhotikern und den gesunden Männern näher zu charakterisieren, wurden neben der Ermittlung der Hormonwerte auch mehrere leberspezifische Parameter bestimmt und die erhaltenen Daten statistisch evaluiert.

Als klassische Marker für eine Leberzellschädigung gelten die Aminotransferasen ALT und AST. Vergleicht man die erhaltenen Messwerte der beiden Studiengruppen, so stellt sich heraus, dass bei den Leberzirrhotikern für beide Enzyme die mittlere Enzymaktivität deutlich höher ist als bei den gesunden Männern (Abb. 11, Tab. 8): $79,3 \pm 71,8$ IU/l gegenüber $26,8 \pm 11,1$ IU/l bei der ALT bzw. $93,4 \pm 92,1$ IU/l gegenüber $27,9 \pm 7,8$ IU/l bei der AST. Aus Abb. 11 sowie aus den Standardabweichungen (Tab. 8) geht eindeutig hervor, dass bei beiden Aminotransferasen die Enzymaktivitäten der Lci-Patienten wesentlich stärker variieren. Bei gesunden Männern bewegen sich die gemessenen Aktivitäten innerhalb des Referenzbereichs von 10 bis 50 IU/l, während sich bei den Leberzirrhotikern die niedrigsten Messwerte im oberen Referenzbereich finden und die meisten ALT- bzw. AST-Aktivitäten diesen deutlich nach oben überschreiten. Insbesondere zeigen sich bei den Lci-Patienten auch einzelne stark erhöhte Aminotransferasenwerte zwischen 200 und 600 IU/l. Die schon visuell klar erkennbaren Differenzen zwischen beiden Gruppen spiegeln sich auch im Ergebnis des U-Tests wider: sowohl für die ALT als auch für die AST ist der p-Wert $< 0,0001$. Damit sind die Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen statistisch als hochsignifikant zu betrachten.

Vergleicht man als weiteren Parameter zur Einschätzung eines Leberschadens die GGT, so ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Aminotransferasen (Abb. 11): die GGT-Aktivität im Serum ist bei den Leberzirrhose-Patienten mit einem MW von $173,0 \pm 169,9$ IU/l höher als bei den gesunden Männern, bei denen die mittlere Aktivität $33,6 \pm 13,13$ IU/l beträgt (Tab. 8). Auch hier liegen die gemessenen Enzymaktivitäten bei den gesunden Männern im Referenzbereich. Bei den Leberzirrhotikern hingegen variieren die Messwerte stärker und erstrecken sich zum allergrößten Teil ober-

halb der Normwerte, mit nur vereinzelt hochnormalen GGT-Werten und einzelnen Patienten mit stark erhöhten GGT-Aktivitäten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der GGT ist mit einem p-Wert von $< 0,0001$ ebenfalls statistisch hochsignifikant.

Zusätzlich zu den oben genannten Enzymbestimmungen wurde bei allen Teilnehmern der Studie zur Abschätzung der Lebersyntheseleistung die PChE gemessen. Die mittlere PChE-Aktivität bei Leberzirrhotikern wurde mit 5610 ± 2505 IU/l niedriger bestimmt als bei den normalen Männern (8413 ± 1789 IU/l). Bei letzteren liegen bis auf einen Ausreißer nach oben alle Messwerte innerhalb des Normalbereichs. Die PChE-Aktivitäten bei den Leberzirrhotikern liegen entweder im unteren oder unterhalb des Referenzbereichs (Abb. 11). Auch im Falle der PChE sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen bei einem p-Wert von $< 0,0001$ hochsignifikant (Tab. 8).

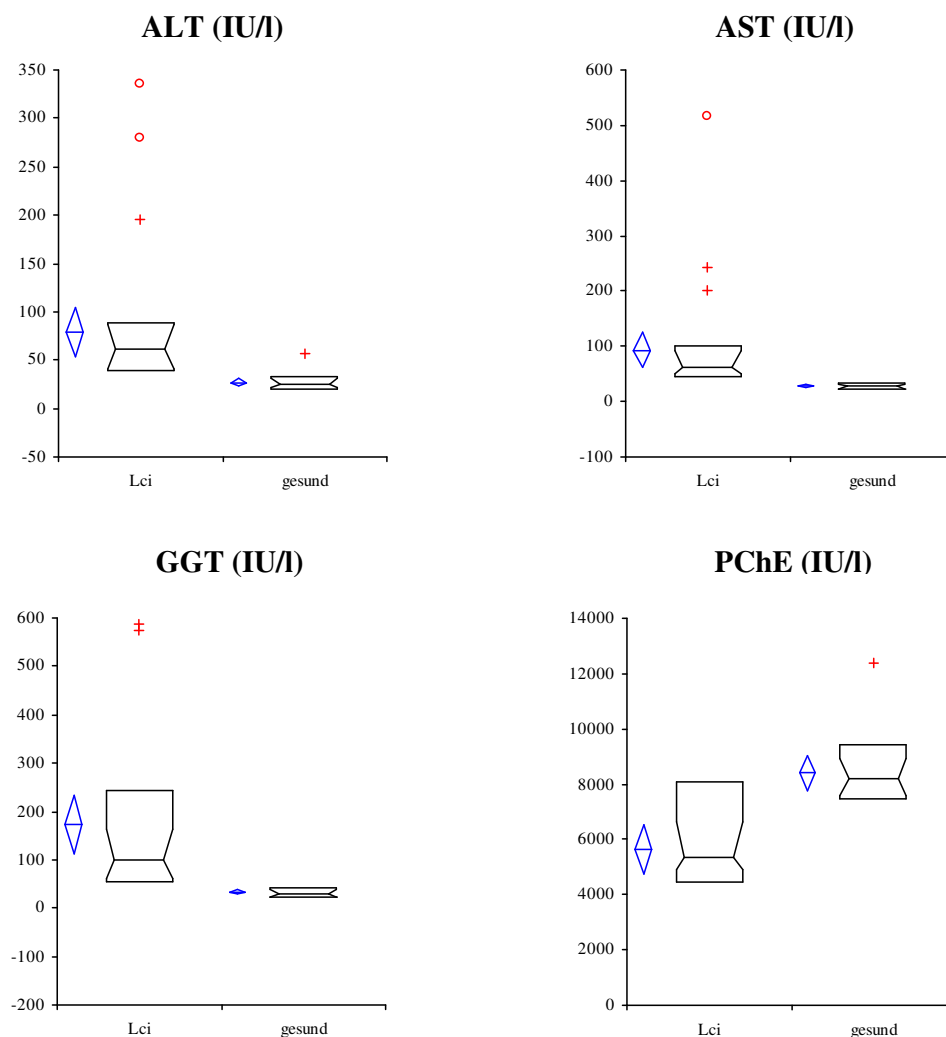


Abb. 11: Leberfunktionsparameter (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer; roter Kreis: weiter Ausreißer).

3.2.3. Sexualsteroidoide und FSH

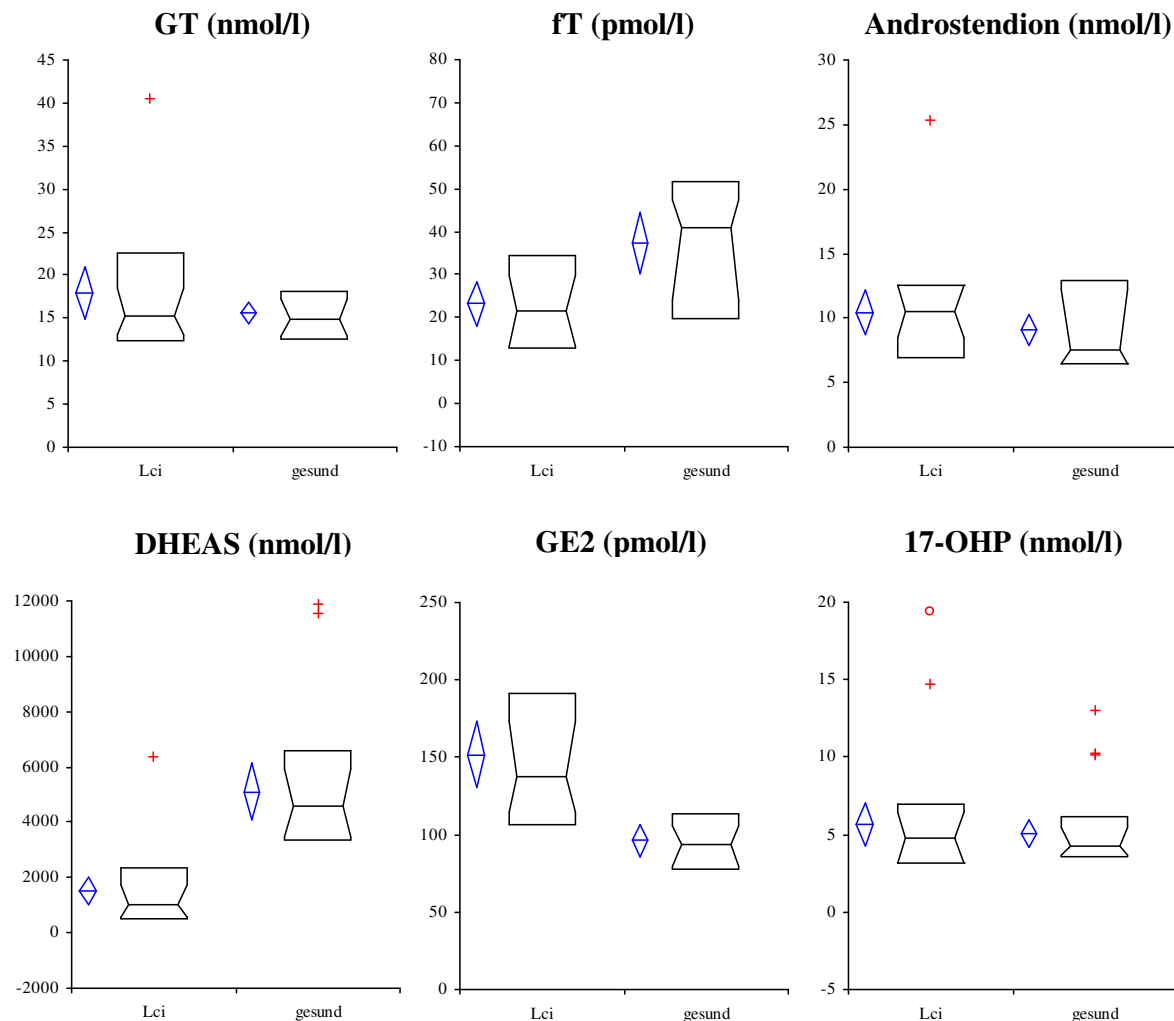


Abb. 12: Sexualsteroidoide (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer; roter Kreis: weiter Ausreißer).

Von entscheidender Bedeutung für die Ausprägung der endokrinen Symptomatik bei Lci sind die peripheren Spiegel der Sexualhormone. Die GT-Spiegel bei Lci sind mit einem MW von $18,0 \pm 8,6$ nmol/l nicht signifikant gegenüber normalen Männern verändert, die eine mittlere GT-Konzentration von $15,6 \pm 3,7$ nmol/l aufweisen. Allerdings verteilen sich bei den Leberzirrhotikern die Werte über einen größeren Bereich als bei Gesunden, was sich auch in der größeren SD widerspiegelt (Abb. 12, Tab. 8). Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen finden sich jedoch beim fT, welches mit einem MW von $23,2 \pm 14,4$ pmol/l bei Lci-Patienten deutlich niedriger ist als bei normalen Männern, deren mittlere fT-Spiegel zu $37,2 \pm 19,8$ pmol/l bestimmt wurden ($p = 0,0047$; Abb. 12, Tab. 8). Eine stärkere Variation der Konzentrationen bei Leberzirrhotikern wie beim GT kann jedoch im Fall des fT nicht festgestellt werden. Zur Beurteilung des Androgenstatus müssen

darüber hinaus auch die adrenalen Androgene berücksichtigt werden. Während die mittleren Androstendion-Spiegel in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe unverändert sind ($10,5 \pm 4,8$ nmol/l vs. $9,1 \pm 3,4$ nmol/l; nicht signifikant; Abb. 12, Tab. 8), zeigten sich für DHEAS ausgeprägte Unterschiede. Die Leberzirrotiker weisen in der vorliegenden Studie mit einer mittleren DHEAS-Konzentration von 1493 ± 1410 nmol/l deutlich niedrigere Spiegel auf als gesunde Männer mit 5099 ± 2844 nmol/l, wobei die Abweichung zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert $< 0,0001$ statistisch hochsignifikant ist (Abb. 12, Tab. 8).

Im Bereich der Estrogene wurden bei Lci mit einem MW von 152 ± 60 pmol/l signifikant höhere GE2-Spiegel ($p < 0,0001$) als bei gesunden Männern (96 ± 29 pmol/l) gefunden, wobei ähnlich dem GT auch beim GE2 die Spiegel bei der Patientengruppe stärker variieren (Abb. 12, Tab. 8). Hinsichtlich der Lage der Werte des wichtigen Gestagens 17-OHP waren jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Lci-Patienten und gesunden Männern nachzuweisen ($5,7 \pm 3,9$ nmol/l vs. $5,1 \pm 2,5$ nmol/l; nicht signifikant; Abb. 12, Tab. 8).

Als Maß für das Androgen-Estrogen-Gleichgewicht wurde aus den ermittelten Daten das molare Konzentrationsverhältnis von GT zu GE2 errechnet. Dieses ist bei den Leberzirrotikern mit 134 ± 53 gegenüber gesunden Männern mit 187 ± 78 signifikant erniedrigt ($p = 0,0066$; Abb. 13, Tab. 8).

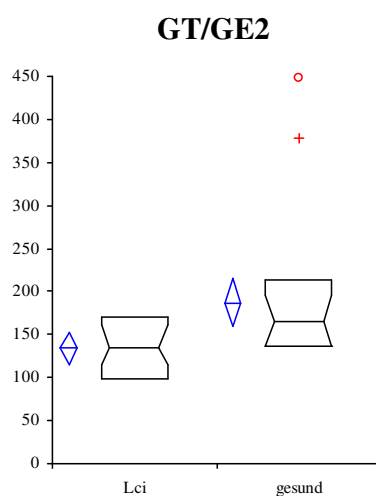


Abb. 13: Vergleich des GT/GE2-Quotienten von Lci-Patienten und gesunden Männern (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer; roter Kreis: weiter Ausreißer).

Für die Interpretation der peripheren Sexualhormonspiegel sind etwaige Veränderungen der Gonadotropine ebenfalls von Bedeutung. In dieser Studie wurde daher FSH bestimmt. Angesichts der mittleren FSH-Spiegel bei den gesunden Männern von $6,7 \pm 3,2$ mIU/ml schienen bei Lci-Patienten mit einem MW von $14,2 \pm 19,6$ mIU/ml tendenziell höhere Werte vorhanden zu sein. Allerdings entstehen die hohen MW bei Lci durch vereinzelte Ausreißer mit extrem erhöhten FSH-Spiegeln bis hin zu 100 mIU/ml. Entsprechend weichen die Medianwerte deutlich weniger voneinander ab ($7,1$

mIU/ml bei Lci vs. 6,1 mIU/ml bei gesunden Männern) und der Unterschied zwischen beiden Studien-
gruppen erweist sich als statistisch nicht signifikant (Abb. 14, Tab. 8).

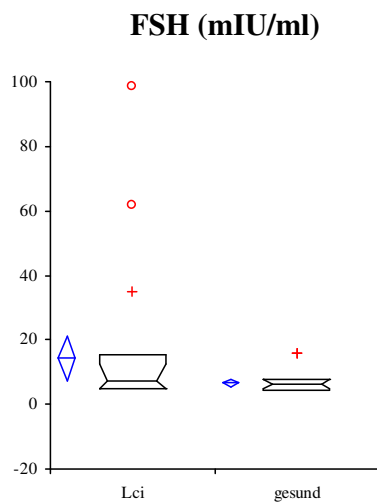


Abb. 14: Vergleich der FSH-Spiegel von Lci-Patienten und gesunden Männern (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer; roter Kreis: weiter Ausreißer).

3.2.4. Transportproteine

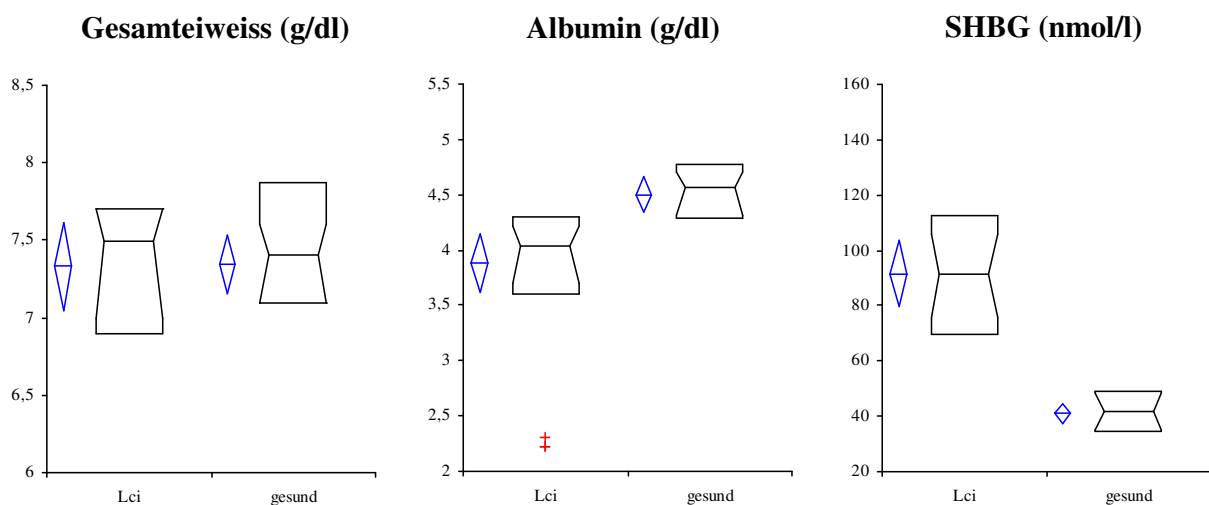


Abb. 15: Gesamteiweiss und Transportproteine für Sexualsteroiden (schwarz: Median und oberes und unteres Quartil, Konfidenzintervall des Medians in schrägen Linien; blau: Mittelwert mit Konfidenzintervall; rotes Kreuz: naher Ausreißer).

Die wichtigsten Transportproteine für Sexualsteroiden im Blut sind Albumin und SHBG, daneben in geringerem Maße auch Transcortin (CBG; siehe Abschnitt 4.3.4.). Während das Gesamteiweiss bei den Leberzirrhosepatienten dieser Studie im Vergleich zu den gesunden Männern nicht verändert war ($7,33 \pm 0,79$ g/dl vs. $7,34 \pm 0,52$ g/dl; nicht signifikant), wurden in der Patientengruppe mit $3,89 \pm 0,75$ g/dl

signifikant niedrigere ($p = 0,0003$) Albuminkonzentrationen gemessen als in der Kontrollgruppe, in der die mittleren Albuminspiegel $4,50 \pm 0,45$ g/dl betragen (Abb. 15, Tab. 8). Die Situation beim SHBG stellt sich genau umgekehrt dar. Hier wiesen die Lci-Patienten mit mittleren Spiegeln von $91,6 \pm 33,5$ nmol/l deutlich höhere Konzentrationen auf als die gesunden Männer mit $40,9 \pm 10,5$ nmol/l, wobei sich bei ersteren zusätzlich die SHBG-Spiegel über einen größeren Bereich verteilten. Auch hier war im U-Test der Unterschied zwischen beiden Gruppen hochsignifikant ($p < 0,0001$; Abb. 15, Tab. 8).

4. Diskussion

4.1. Fragestellung

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise auf eine gestörte hepatische Produktion von Serumglykoproteinen sowie auf ein atypisches Bindungsverhalten von Steroidliganden an SHBG bei Lci. Eine normale SHBG-Steroid-Interaktion kann daher bei dieser Erkrankung nicht als selbstverständlich angesehen werden, wäre aber die Voraussetzung schlechthin für die postulierte Schlüsselfunktion des SHBG in der Entwicklung der begleitenden hormonellen Störungen.

Bis dato existieren noch keine Studien, welche der Frage nachgehen, ob die erhöhte SHBG-Biosynthese in leichten und mittelschweren Zirrhosestadien mit einem veränderten Steroidtransport einhergeht. Ziel der Arbeit war daher, die Funktionalität der Androgenbindung von SHBG bei Lci zu untersuchen und den Einfluss der erhöhten SHBG-Spiegel auf den Hormonstatus bei diesem Krankheitsbild zu analysieren. Hierzu wurden Biosensormessungen und Hormonbestimmungen durchgeführt, die im Folgenden interpretiert und eingeordnet werden sollen.

4.2. Biosensoruntersuchungen

4.2.1. Kombination aus Gelfiltration und SPR-Biosensor

Für den SPR-Biosensor ist bereits eine Methodik entwickelt worden, mit der das funktionalisierte DHT-Derivat 1α -C6-DHT [57 (S. 631ff)] unter Zuhilfenahme von EDC und NHS stabil auf der Oberfläche eines CM-Dextran-Biosensorchips immobilisiert werden kann [91 (S. 13737)]. Bisher wurde in diesem System nur kommerziell erhältliches, affinitätschromatographisch hochaufgereinigtes SHBG aus gepoolten Schwangerenseren vermessen [91 (S. 13737)]. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sah jedoch vor, die Bindung des SHBG an das immobilisierte Androgenderivat in einer Vielzahl normaler und pathologischer Serumproben zu untersuchen. Die direkte Injektion nativer Seren am Biosensor erwies sich aufgrund einer Interferenz des Meßsystems mit anderen Serumproteinen, insb. dem Albumin, als nicht durchführbar. Daher wurde den Biosensormessungen eine Gelfiltrationschromatographie vorgeschaltet, bei der das SHBG zu einer definierten Retentionszeit eluiert (Abb. 3). Im Biosensor liefert das auf diese Weise partiell aufgereinigte SHBG qualitativ hochwertige Sensorgramme (Abb. 5). Das auf hochaufgereinigtes SHBG adaptierte Meßsystem [91 (S. 13737)] konnte dabei direkt zur Messung der Fraktionen aus der Gelfiltration verwendet werden und bedurfte keiner weiteren Optimierung.

Überraschenderweise fand sich bei Schwangerenserum mit sehr hohen SHBG-Konzentrationen in der Gelfiltration nicht nur der erwartete Elutionspeak, welcher der Retentionszeit des Dimers entspricht, sondern zusätzlich noch ein zweiter im hochmolekularen Bereich bei einem MG von etwa 1000 kDa (Abb. 4). Die Existenz von SHBG-Aggregaten in Seren mit hohen Spiegeln des Bindungsproteins erklärt das bei der Kalibration eines kommerziell erhältlichen SHBG-ECLIA beobachtete Phänomen, dass bei SHBG-Lösungen ab einer Konzentration von 200 nmol/l die erwarteten Signalstärken nicht mehr erreicht werden. Auch der in dieser Arbeit gefundene exponentielle Zusammenhang zwischen Biosensoranbindung und injizierter SHBG-Konzentration (Abb. 7) entsteht durch vorgenannte Aggregatbildung. Damit erfüllt die Gelfiltration neben der Abreicherung von in der SPR-Messung potentiell interferierenden Serumproteinen die weitere wichtige Funktion, möglicherweise im Serum vorhandene und bei den Biosensormessungen störende SHBG-Oligomere zu entfernen. Aufgrund der bei der Gelfiltration zwangsläufig auftretenden Verdünnung der Serumprobe ist im aufgefangenen Eluat keine SHBG-Aggregatbildung mehr zu erwarten. Da bei der Injektion von 100 μ l Serum das SHBG über ein Volumen von 2 ml von der Gelfiltrationssäule eluiert, liegt der errechnete Verdünnungsfaktor bei 20, so dass in keiner der Gelfiltrationsfraktionen die Grenzkonzentration für die Oligomerbildung von 200 nmol/l überschritten werden sollte.

Des Weiteren konnte durch Messung der T- und E2-Konzentration einzelner Seren vor und nach Gelfiltration gezeigt werden, dass durch diesen Schritt endogene Androgene und Estrogene komplett aus der SHBG-Bindungs-bucht entfernt werden (Daten nicht gezeigt). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das partiell aufgereinigte SHBG bei Injektion in den Biosensor keine gebundenen Steroide mehr enthält.

Folglich sollten die Messergebnisse am Biosensor weder durch die Interferenz von Serumproteinen noch durch die von SHBG-Oligomeren oder endogenen Steroiden gestört werden. Da es sich bei der Gelfiltrationschromatographie an der FPLC-Anlage aufgrund der niedrigen Drücke und der Verwendung eines Puffers mit annähernd physiologischem pH-Wert um eine besonders schonende Methode zur Aufreinigung von Proteinen unter Funktionserhalt handelt, ist eine Veränderung der strukturellen oder funktionellen Eigenschaften des SHBG durch diese Prozedur unwahrscheinlich. Entsprechend weist das messbare Signal am Biosensor darauf hin, dass es, zumindest für 1α -C6-DHT, durch die Gelfiltration zu keiner oder nur zu einer geringen Beeinträchtigung der Steroidbindungsaktivität des SHBG kommt.

Durch den der Biosensormessung vorgeschalteten Gelfiltrationsschritt war es möglich, das SHBG aus sehr geringen Probenmengen unter Erhalt seiner vollen Funktionalität zu isolieren. Dies wurde auch in Scatchard-Analysen mit radioaktivem T als Tracer bestätigt (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte die SHBG-Androgen-Interaktion in einer großen Zahl an Seren schnell und effizient untersucht werden. Die entsprechend des Verfahrens aus [91 (S. 13737)] erzeugten 1α -C6-DHT-konjugierten CM4-Chips wiesen dabei eine derart hohe Stabilität auf, dass für sämtliche Biosensormessungen dieser Studie insgesamt nur 7 verschiedene Chips beladen werden mussten (Tab. 6).

4.2.2. Biosensormessungen

Aufgrund der arbeitsintensiven und kostspieligen Methodik wurden nicht alle verfügbaren Seren am Biosensor vermessen. Vielmehr wurden die Seren von 23 Leberzirrhotikern und 20 gesunden Männern nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und untersucht. Zusätzlich wurde die Bindung von SHBG an 1α -C6-DHT auch bei 19 Schwangeren- und 20 Hyperthyreoseseren ermittelt. In der SS entsteht der SHBG-Anstieg durch eine Estrogen-induzierte [123 (S. 1478)], bei Hyperthyreose durch eine Thyroxin-induzierte Steigerung der hepatischen Synthese des Bindungsproteins [68 (S. 254); 108 (S. 705f); 109 (S. 533)]. Schwangere und Hyperthyreote eignen sich daher in besonderem Maß als Vergleichsgruppen zur Beurteilung einer möglicherweise veränderten Androgenbindung des SHBG bei Lci: in beiden Fällen tritt ebenfalls eine Erhöhung des SHBG-Spiegels auf, im Unterschied zur Lci gehen sie jedoch nicht mit einer Leberzellschädigung einher. Damit sind auch keine strukturellen oder funktionellen Störungen des vermehrt synthetisierten SHBG zu erwarten. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass das SHBG bei SS voll funktional ist [2 (S. 81)].

Ein Vergleich der am Biosensor erhaltenen Anbindungskurven zeigt, dass, abgesehen von unterschiedlich hohen Anbindungsraten, keine relevanten Unterschiede zwischen den Lci-Patienten und den anderen Gruppen auftreten (Abb. 5, Abb. 6). Zudem entspricht der Kurvenverlauf bei den partiell aufgereinigten Seren auch dem von affinitätschromatographisch hochaufgereinigtem SHBG (Abb. 7). Somit liefert die qualitative Analyse der SHBG- 1α -C6-DHT-Interaktion keine Hinweise auf eine veränderte Androgenbindung des SHBG bei Lci.

Durch Vergleich der maximalen Biosensorantwort jedes individuellen Serums mit einer Chip-spezifischen Kalibrationskurve, die mit Hilfe von kommerziell erhältlichem, hochaufgereinigtem SHBG erstellt wurde, konnte ein Max exp-Wert als Maß für die Konzentration an bioaktivem SHBG definiert werden. Während des langen und intensiven Aufreinigungsprozesses des käuflichen, hochreinen SHBG ist eine funktionelle Inaktivierung eines bestimmten Prozentsatzes des Proteins anzunehmen. Es sei daher darauf hingewiesen, dass trotz Angabe der Max exp-Werte in nmol/l SHBG, diese Größe mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht exakt der Konzentration an funktionalem Protein entspricht, sondern dass diese wohl, je nach Anteil des inaktivierten Proteins, etwas niedriger ist. In der vorliegenden Studie stellt dies jedoch kein Problem dar, da nicht die exakte Bestimmung der funktionellen Proteinkonzentration benötigt wurde, sondern lediglich ein Vergleichsmaßstab für die Menge an funktionellem Protein. Durch die Größe Max exp wird diese Anforderung trotz vorgenannter Einschränkungen klar erfüllt. Die Definition des Max exp-Wertes ermöglichte die quantitative Analyse der Biosensordaten, unabhängig von der Beladungsdichte des verwendeten Messchips.

Da sich die Messwerte für die SHBG-Konzentrationen und dadurch auch die errechneten Max exp-Werte über einen weiten Bereich erstreckten, wurde der Zusammenhang beider Größen auf einer doppelt-logarithmischen Skala dargestellt (Abb. 9). Die nachfolgend durchgeführte Regressionsanalyse offenbarte eine lineare Assoziation zwischen den jeweils logarithmierten Werten der mittels

ECLIA in nativen Serumproben bestimmten SHBG-Konzentration und Max exp. Dieser Zusammenhang gilt gleichermaßen für alle vier untersuchten Studiengruppen. Die Messwerte der Leberzirrhotiker passen dabei gut zum linearen Verlauf der Messwerte der anderen drei Gruppen. Sie weichen mit ihren Messpunkten auch nicht stärker von der Regressionsgerade ab als dies für gesunde Männer, Schwangere oder Hyperthyreote zu beobachten ist. SHBG bindet also bei Lci im Verhältnis zu seiner Serumkonzentration dieselbe Menge an Androgenen wie bei den Kontrollgruppen mit höheren oder niedrigeren SHBG-Spiegeln. Die genaue quantitative Auswertung der Biosensordaten bestätigt somit die bereits zuvor vermutete volle Funktionalität der Androgenbindung von SHBG bei Lci.

Es lässt sich daher festhalten, dass sowohl die qualitative als auch die quantitative Evaluation der SPR-Messungen bei Lci auf eine unveränderte, bivalente Interaktion des SHBG mit dem auf der Chipoberfläche immobilisierten Androgenliganden 1 α -C δ -DHT hindeuten, so wie es auch schon für hochaufgereinigtes SHBG in der Literatur beschrieben wurde [91 (S. 13739f)]. Obwohl Veränderungen der Oligosaccharidstruktur des SHBG bei Lci sehr wahrscheinlich sind, scheint dessen funktionelle Integrität, zumindest hinsichtlich der Androgenbindung, dadurch nicht beeinträchtigt zu sein. Dies deckt sich gut mit zahlreichen anderen Untersuchungen, in denen nachgewiesen werden konnte, dass Veränderungen der Glykosylierung keinen Einfluss auf Spezifität und Affinität der Steroidbindung haben [32 (S. 2816); 50 (S. 547); 51 (S. 199); 68 (S. 212, S. 219f); 112 (S. 527, S. 530); 119 (S. 279)].

4.3. Hormonanalysen

4.3.1. Ein- und Ausschlusskriterien und Bestimmungsmethoden

Ergänzend zu den Biosensormessungen wurden bei den 33 Lci-Patienten und den 32 gesunden Männern zur Abschätzung der durch die Androgenbindung von SHBG verursachten Veränderungen im Sexualhormonhaushalt weitere Kenngrößen im Serum bestimmt. Hinsichtlich der Lci bestanden als Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie eine histologische Sicherung der Diagnose sowie eine Einordnung in Stadium A oder B nach Child-Pugh. Es wurden sowohl Patienten mit alkoholischer als auch mit nicht-alkoholischer Lci in die Studie aufgenommen. Bei den Hormonanalysen wurde die Gruppe der Leberzirrhotiker nicht weiter nach der Ätiologie differenziert. Dieses Vorgehen wird im Folgenden näher begründet.

Der Einfluss der Ätiologie der Lci auf die Ausprägung der endokrinen Veränderungen wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Traditionell vertraten amerikanische Autoren die Meinung, dass Alkohol die Hauptursache für die hormonellen Störungen bei Lci sei [9 (S. 258); 122 (S. 44)]. Gestützt wurde dies durch die Erkenntnis, dass Alkohol auch ohne Lebererkrankung eine Dysfunktion der

Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse auslösen kann [122 (S. 39)] und dass Ethanol bei Ratten zu einer frühen und starken Verminderung des GT und damit zu einem Verlust von durch Androgene regulierten Leberfunktionen führt [113 (S. 1140)]. In einzelnen Studien konnte auch gezeigt werden, dass Feminisierung und Hypogonadismus bei alkoholischer Zirrhose häufiger und schwerer als bei nicht-alkoholischer Zirrhose auftreten [41 (S. 568); 122 (S. 42f)]. Nach diesem Modell sollte die Pathogenese der Lci-assoziierten Störungen des Hormonhaushalts je nach Ätiologie auf spezifischen, unterschiedlichen Mechanismen beruhen und nicht ausschließlich durch die Leberdysfunktion hervorgerufen werden [122 (S. 44)].

Allerdings war es nie möglich, klar nachzuweisen, ob vorgenannte Ergebnisse tatsächlich allein durch den Alkohol oder nur durch die bei Alkoholikern wesentlich häufiger vorkommenden, schwereren Ausprägungen der Lebererkrankung entstehen [8 (S. 167)]. Die Mehrzahl der europäischen Autoren ist daher der Ansicht, dass der Leberschaden an sich die entscheidende Rolle bei der Entwicklung der endokrinen Symptome spielt [9 (S. 258); 72 (S. 750)]. So wurde gefunden, dass ähnliche, wenn auch nicht so gravierende Hormonveränderungen wie bei der Lci zum Teil bei Patienten mit Fettleber sowie bei gesunden älteren Menschen auftreten [74 (S. 275)]. Auch zeigte sich, dass Störungen des Steroidhormonstoffwechsels bei kardialer und infektiöser Lci in gleicher Ausprägung wie bei alkoholischer Lci vorkommen [9 (S. 259); 33 (S. 272); 41 (S. 568); 71 (S. 139); 72 (S. 750); 84 (S. 633); 126 (S. 532f)]. Außerdem sind alle hormonellen Veränderungen, unabhängig von der Ätiologie, durch eine Lebertransplantation wieder voll reversibel: fT und GT steigen an, GE₂, Prolaktin und SHBG fallen ab, die Spermiedichte normalisiert sich und es kommt zu einer deutlichen Verbesserung der Sexualfunktion [76 (S. 358); 89 (S. 463)]. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass nach heutigem Stand die endokrinen Abnormalitäten bei Lci unabhängig von der jeweiligen Ätiologie sind und nur durch den Schweregrad der Leberdysfunktion bestimmt werden [72 (S. 750); 76 (S. 359); 89 (S. 463); 126 (S. 533f)]. Ethanol hat allenfalls durch seine direkt toxischen Wirkungen auf die Testes einen leichten Zusatzeffekt auf die durch den Leberschaden ausgelösten Sexualhormonverschiebungen [9 (S. 259)]. Aus diesen Gründen ist ein Vorgehen, bei dem in der Analyse der erhaltenen Hormondaten keine Unterteilung bezüglich der Ätiologie der Lci erfolgt, gerechtfertigt.

Eine symptomatische Therapie der Leberzirrhotiker mit Spironolacton war in der vorliegenden Studie erlaubt. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme stand ein Drittel der Lci-Patienten unter diuretischer Therapie mit dieser Substanz (Tab. 7). Auch hierauf muss näher eingegangen werden. Spironolacton ist ein bei Lci häufig verabreichter Rezeptorantagonist von Aldosteron und T, der auch Steroide vom SHBG verdrängen kann. Es soll zu einer Verminderung des GT und zu einem leichten Anstieg des GE₂ führen und könnte damit für die bei Lci oft zu beobachtende Impotenz und Gynäkomastie verantwortlich sein [8 (S. 175); 23 (S. 492); 65 (S. 371); 70 (S. 502)]. Diese Symptome treten jedoch nur bei Gabe von hohen Dosen über einen längeren Zeitraum auf [71 (S. 140)]. Zudem konnte in

mehreren Studien kein signifikanter Effekt von Spironolacton auf die hormonellen Störungen bei Lci gezeigt werden [8 (S. 175); 40 (S. 377); 41 (S. 567)]. Daher macht es keinen Sinn, Lci-Patienten unter Spironolactontherapie generell von Untersuchungen des Hormonhaushalts auszuschließen, insbesondere wenn ihnen, wie in dieser Studie, das Medikament nur für kurze Zeit verabreicht wurde. Das in der vorliegenden Arbeit bei der Lci-Gruppe unveränderte GT (Tab. 8) spricht dafür, dass bei diesen Patienten Spironolacton keinen bzw. noch keinen Effekt auf den Sexualhormonhaushalt hatte.

Bezüglich Alter und TSH-Spiegel bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen Lci-Patienten und gesunden Männern (Tab. 8), so dass man von zwei altersgleichen Gruppen mit unauffälliger Schilddrüsen-Funktion ausgehen kann. Die restlichen Ein- und Ausschlusskriterien wurden klinisch-anamnestisch sowie anhand der Krankenakte überprüft. Alle teilnehmenden Probanden erfüllten dabei die jeweiligen Voraussetzungen.

Sämtliche für die Protein-, Enzym- und Hormonbestimmungen eingesetzten Meßsysteme sind auch in der klinischen Routineanalytik erprobt. Bei fast allen ermittelten Parametern betragen die Interassay-Vk maximal etwa 10% (Tab. 4), was, v.a. bei den Hormonmessungen, ein akzeptabler Wert ist. Lediglich für Androstendion und fT können laut Hersteller die Interassay-Vk bis zu 15,2% bzw. 18,3% betragen. Mit Ausnahme des SHBG liegen alle gemessenen Konzentrationen und Aktivitäten innerhalb des zugelassenen Messbereichs des jeweiligen Assays (Tab. 4, Tab. 8). Auf den Sonderfall der SHBG-Bestimmung wird weiter unten eingegangen. Für die Messungen im Rahmen des laboratoriumsmedizinisch-statistischen Teils der Arbeit erfolgte eine Qualitätskontrolle entsprechend der Richtlinien der Bundesärztekammer. Es ist daher festzuhalten, dass für die Enzym-, Hormon- und Proteinbestimmungen geeignete und hochwertige Methoden Verwendung fanden, die auch technisch einwandfrei ausgeführt wurden.

Zur Ermittlung der SHBG-Konzentrationen ist im Hinblick auf die Auswertung der Biosensoruntersuchungen anzumerken, dass in dieser Studie im Biosensor auch Seren von Schwangeren und Hyperthyreose-Patienten mit einem SHBG-Spiegel von mehr als 200 nmol/l vermessen wurden. Da der Messbereich des SHBG-ECLIA nur bis 200 nmol/l ausgewiesen ist, wurde in einem solchen Fall das entsprechende Serum gemäß den Empfehlungen des Assay-Herstellers verdünnt. Wie oben beschrieben findet eine Oligomerbildung des SHBG erst ab einer Konzentration von 200 nmol/l statt und ist durch Verdünnung vollständig reversibel. Damit lassen sich durch dieses Vorgehen auch über den eigentlichen Messbereich des Assays hinausgehende SHBG-Spiegel bestimmen und eine Störung der Messung durch Bildung von SHBG-Aggregaten wird umgangen.

4.3.2. Leberfunktionsparameter

Bei der Analyse der Leberfunktionsparameter ergab sich das erwartete Bild. Die signifikant verminderte PChE (Tab. 8) in der Gruppe der Lci-Patienten resultiert aus der verminderten Syntheseleistung der zirrhotischen Leber [59 (S. 462); 103 (S. 642)]. Der gleichzeitige, in den meisten Fällen aber nur mäßige Anstieg der Indikatoren einer Leberzellschädigung AST, ALT und GGT deuten auf eine zum Zeitpunkt der Blutentnahme bestehende akute entzündliche Phase bei der Mehrzahl der Patienten hin [59 (S. 462); 103 (S. 642)]. Da die AST tendentiell stärker als die ALT ansteigt (Tab. 8), ist ein, bei Lci wenig verwunderlicher, schwererer Leberzellschaden zu vermuten. Die gemessenen ALT- und AST-Werte passen gut zu den Ergebnissen anderer Studien, bei denen ebenfalls moderate, aber doch signifikante Erhöhungen beider Enzyme in ähnlichen Aktivitätsbereichen beobachtet wurden [33 (S. 272); 72 (S. 746); 126 (S. 532)].

4.3.3. Sexualsteroidoide und FSH

Die Ergebnisse der Steroidhormonanalysen stimmen im Wesentlichen mit denen anderer Studien überein. In der vorliegenden Arbeit war das GT bei den Lci-Patienten gegenüber den gesunden Männern nicht signifikant verändert (Tab. 8). Auch in mehreren anderen Untersuchungen wurde in den frühen Stadien der Lci über ein unauffälliges GT in einem ähnlichen Konzentrationsbereich berichtet [33 (S. 273); 41 (S. 566); 72 (S. 747)]. Die bei Leberzirrhotikern bereits bekannte stärkere Variation des GT-Spiegels bei normalem MW [40 (S. 375); 41 (S. 566)] wurde auch bei den in dieser Studie untersuchten Patienten beobachtet (Abb. 12). Trotz unverändertem GT war bei den Lci-Patienten das fT im Vergleich zu normalen Männern signifikant erniedrigt (Tab. 8). Ein vermindertes fT ist über die verschiedenen Studien hinweg ein relativ konsistenter Befund bei Lci [8 (S. 156); 36 (S. 100); 40 (S. 375); 41 (S. 566); 72 (S. 747); 89 (S. 463)]. Allerdings ist anzumerken, dass der MW des fT in dieser Arbeit zu 23,2 pmol/l bestimmt wurde und damit niedriger liegt als in den meisten anderen Untersuchungen (Tab. 1). Nur durch Unterschiede im Schweregrad der Lci bei den Probanden der verschiedenen Studien lässt sich diese Diskrepanz nicht erklären, da insb. in den leichteren Stadien meist nochmals deutlich höhere fT-Spiegel ermittelt wurden. Möglicherweise sind die Abweichungen in der Methodik begründet, da bei den älteren Studien das fT mit weniger zuverlässigen Methoden bestimmt bzw. z. T. auch nur errechnet wurde.

Die bei Lci häufig berichtete Erhöhung des Androstendions [9 (S. 258); 33 (S. 273); 42 (S. 1020); 48 (S. 206); 72 (S. 747)] konnte in dieser Arbeit, ähnlich wie in einer Studie von Longcope et al. [84 (S. 631)], nicht nachgewiesen werden. Die Androstendion-Spiegel der in der vorliegenden Studie untersuchten Leberzirrhotiker waren gegenüber den gesunden Männern nicht signifikant verändert (Tab. 8). Angesichts des noch nicht endgültig geklärten Zusammenhangs von

Androstendion-Spiegel und Schwere der Lebererkrankung, könnte die Abweichung der hier vorgestellten Ergebnisse von der großen Mehrheit der Untersuchungen in der Einbeziehung unterschiedlicher Schweregrade der Lci in den jeweiligen Studien begründet sein.

Besser zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen passt die gefundene signifikante Erniedrigung des DHEAS bei den Leberzirrhotikern (Tab. 8). Bereits mehrmals wurden in der Literatur bei Männern mit fortgeschrittener Lci ähnlich verminderte DHEAS-Spiegel beschrieben [9 (S. 258f); 72 (S. 747); 85 (S. 306f)]. Ein DHEAS-Abfall in leichten und mittelschweren Stadien der Lci, wie bei den Teilnehmern dieser Studie, war jedoch bisher nicht bekannt. Bei sehr schweren Erkrankungen finden sich generell sowohl in der akuten als auch in der chronischen Phase extrem niedrige DHEAS-Spiegel in Assoziation mit hohen Cortisol-Werten [13 (S. 435f)]. Offensichtlich kommt es also zur Verschiebung des Pregnenolon-Metabolismus weg vom Mineralocorticoid- und Androgen- hin zum Glucocorticoidweg und damit, je nach Schweregrad, zu Cortisolerhöhungen und DHEAS-Verminderungen. Ursachen hierfür könnten eine verminderte 17,20-Desmolase-Aktivität oder eine stress-induzierte, prolongierte Sekretion von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) mit verminderter Stimulation der adrenalen Steroide sein [13 (S. 436); 85 (S. 309); 97 (S. 952)]. Insgesamt können die erniedrigten DHEAS-Spiegel bei schweren Erkrankungen als Zeichen einer erschöpften adrenalen Reserve interpretiert werden. Sie sind dabei wohl eher als sekundäres Phänomen und weniger als ein spezifischer Indikator schwerer oder chronischer Erkrankungen zu werten. Die genannten Verschiebungen des adrenocorticalen Steroidmetabolismus dienen der Maximierung der Cortisolproduktion, die für das Überleben notwendig ist. Gleichzeitig bedingen sie eine Minimierung des Pregnenolon-Verbrauchs für Mineralokortikoid- und Androgensynthese, da diese beiden Steroidgruppen schon in ausreichendem Maß vorhanden sind. Allerdings entsteht durch das Ungleichgewicht zwischen dem immunsuppressiven Cortisol und dem immunstimulatorischen DHEAS auch eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Infektionen. Entsprechend kann der DHEAS/Cortisol-Quotient möglicherweise als prognostischer Indikator für den Verlauf schwerer Erkrankungen verwendet werden [13 (S. 436f); 85 (S. 309); 97 (S. 952)]. Die genaue Ursache und die Folgen der DHEAS-Erniedrigung in frühen Stadien der Lci sind bisher noch nicht geklärt. Möglicherweise ist jedoch im Cortisol-DHEAS-Ungleichgewicht, wie oben beschrieben, teilweise die erhöhte Infektionsneigung der Lci-Patienten begründet. In jedem Fall ist die DHEAS-Verminderung aber ein weiterer Faktor, der zur Lci-assoziierten Hypoandrogenämie beiträgt [72 (S. 749)].

Im Bereich der weiblichen Sexualhormone war bei den Estrogenen das GE2 der Leberzirrhotiker signifikant erhöht (Tab. 8). Dies stimmt mit der Mehrzahl der Untersuchungen zum Hormonhaushalt bei Lci überein, in denen ebenfalls ein GE2-Anstieg von meist ähnlicher Größenordnung beschrieben wurde [Tab. 1; 8 (S. 153); 36 (S. 100); 41 (S. 568); 48 (S. 204); 65 (S. 371); 70 (S. 502); 72 (S. 747); 84 (S. 631); 126 (S. 533)]. Das resultierende Estrogenübergewicht wird durch die signifikante Verminderung des GT/GE2-Verhältnisses bei männlichen Leberzirrhotikern gegenüber gesunden

Männern illustriert (Tab. 8). Auch dieser Befund konnte bereits in einer anderen Studie erhoben werden [74 (S. 275)]. Das Überwiegen der estrogenen Aktivität bei Lci ist allerdings noch wesentlich stärker ausgeprägt, als es das Verhältnis GT/GE2 vermuten lässt, da im Gegensatz zu dem im Quotienten verwendeten, unveränderten GT das biologisch aktive fT vermindert ist. In Kombination führen niedrige fT- und hohe GE2-Spiegel zu einer vornehmlich estrogenen Umgebung und passen gut zu den Hypogonadismus- und Feminisierungssymptomen bei dieser Erkrankung.

Für das Gestagen 17-OHP wurde bei den Lci-Patienten eine mittlere Konzentration von 5,7 nmol/l bestimmt (Tab. 8). Diese entspricht in etwa dem von Nolte et al. ermittelten 17-OHP-Spiegel bei Leberzirrhotikern, liegt aber ungefähr doppelt so hoch wie der von Guechot et al. gemessene Wert [48 (S. 204); 95 (S. 820)]. Insgesamt scheint dieses Steroid jedoch für die endokrinen Störungen bei Lci nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, da sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Literatur [48 (S. 204)] kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollgruppe gefunden wurde (Tab. 8).

Exemplarisch für die Gonadotropine als wichtigstes Regulationssystem der Sexualsteroiden wurde in dieser Studie der FSH-Spiegel bestimmt. Dieser zeigte bei den Leberzirrhotikern, trotz einer scheinbaren Tendenz zu höheren Werten, keine signifikante Abweichung vom FSH-Spiegel gesunder Männer (Tab. 8). Normale FSH-Spiegel sind bei Lci zwar kein durchgängiger, aber doch ein regelmäßiger Befund [42 (S. 1022); 72 (S. 747)]. Bei der Patientengruppe dieser Studie spricht das normale FSH bei gleichzeitig vermindertem fT für eine inadäquate Feedback-Regulation von Seiten des Hypothalamus-Hypophysen-Systems. Dies könnte durch die erhöhten E2-Spiegel bedingt sein. Ein zusätzlicher, primärer hypothalamisch-hypophysärer Defekt kommt jedoch ebenfalls in Frage [8 (S. 172); 70 (S. 502); 75 (S. 1023); 89 (S. 464f); 126 (S. 534)].

4.3.4. Transportproteine

Steroidhormone verteilen sich im Blut auf eine freie und eine proteingebundene Fraktion, die entsprechend dem Massenwirkungsgesetz in einem dynamischen Gleichgewicht stehen [2 (S. 72); 109 (S. 534)]. Beim Menschen werden Androgene und Estrogene vornehmlich von SHBG und Albumin gebunden. Daneben erfolgt auch eine Bindung durch CBG und α_1 -Glykoprotein, die aber unter den meisten physiologischen und pathologischen Bedingungen vernachlässigt werden kann [88 (S. 58)]. Albumin besitzt beim Transport von Sexualsteroiden eine geringe Spezifität und Affinität, weist jedoch aufgrund seiner hohen Serumspiegel eine große Bindungskapazität auf [2 (S. 72); 68 (S. 225)]. Bei gesunden Männern stellt Albumin das Haupttransportprotein für fast alle wichtigen endogenen Steroide dar, wobei mehr als 99% der verfügbaren Bindungsstellen unbesetzt bleiben [34 (S. 62f)]. Im Gegensatz zu Albumin ist SHBG durch eine hohe Spezifität und Affinität für Sexualsteroiden bei niedriger Bindungskapazität charakterisiert [68 (S. 225)]. SHBG ist bei gesunden Männern das

bedeutendste Transportprotein für DHT und Androstendiol. Beim T-Transport hingegen erfüllt das Albumin die wichtigere Funktion. T besetzt 36,4%, Androstendiol 9,3% und DHT 3,6% der Bindungsstellen des SHBG und 44,3% bleiben frei [34 (S. 60f)].

Zur Beurteilung der Folgen der Androgenbindung durch SHBG bei Lci wurden sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe zusätzlich zu den Sexualhormonspiegeln die Konzentrationen ihrer wichtigsten Transportproteine, Albumin und SHBG, bestimmt. Bei den Lci-Patienten dieser Studie konnte im Vergleich zu gesunden Männern eine Verminderung des Albumins bei einem gleichzeitigen Anstieg des SHBG gefunden werden (Tab. 8). Ein Abfall des Albumins ist bei Lci ein wohlbekanntes Phänomen [41 (S. 564); 59 (S. 462); 103 (S. 642)]. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Albumin-Konzentrationen stimmen mit denen anderer Studien überein, in denen Patienten mit ähnlichem Schweregrad der Lci untersucht wurden [33 (S. 272); 95 (S. 820)]. Genau wie der Abfall der PChE (siehe oben) entsteht der erniedrigte Albumin-Spiegel durch eine eingeschränkte Syntheseleistung der Leber [59 (S. 462); 103 (S. 642)].

Wie in der Literatur vielfach beschrieben, sind auch die erhöhten SHBG-Spiegel ein typischer Befund bei der Lci [8 (S. 156); 33 (S. 273); 36 (S. 100); 40 (S. 375); 65 (S. 370); 71 (S. 139); 72 (S. 747); 89 (S. 463); 105 (S. 242)]. Das Ausmaß der gefundenen SHBG-Erhöhung unterscheidet sich allerdings z.T. beträchtlich. Die mittlere SHBG-Konzentration wurde in dieser Studie zu 91,6 nmol/l bestimmt. In anderen Studien hingegen wurden sowohl höhere [12 (S. 369); 40 (S. 375)] als auch niedrigere SHBG-Spiegel berichtet [33 (S.275); 36 (S. 98); 48 (S. 204); 72 (S. 747); 89 (S. 463); 95 (S. 820); 114 (S. 5107)]. Da diese Unterschiede auch dann fortbestehen, wenn man nur Patienten mit ähnlicher Einschränkung der Leberfunktion vergleicht, scheinen sie in methodischen Unterschieden bei der Bestimmung der SHBG-Konzentration begründet zu sein. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Ursache des SHBG-Anstiegs bei Lci bis heute noch nicht endgültig geklärt. In Anbetracht der euthyreoten Stoffwechsellage der untersuchten Leberzirrhotiker (Tab. 8) schließen die Daten dieser Studie einen durch Schilddrüsen-Hormone ausgelösten SHBG-Anstieg aus. Am wahrscheinlichsten erscheint daher, dass das Absinken der androgenen und der Anstieg der estrogenen Aktivität eine Steigerung der hepatischen SHBG-Synthese bedingt [70 (S. 502)]. Das Vorhandensein einer diese Veränderung begünstigenden hormonellen Situation wird durch den Abfall des GT/GE2-Verhältnisses bei den Leberzirrhotikern illustriert (Tab. 8).

Bei Lci kommt es also zu einer Verschiebung der Konzentrationen der Sexualhormonspezifischen Transportproteine. In den Biosensormessungen konnte zudem die Intaktheit der Androgenbindung von SHBG bei diesem Krankheitsbild nachgewiesen werden. Das Zusammenspiel der beiden vorgenannten Ergebnisse lässt ausgeprägte Effekte des SHBG auf die freien Hormonkonzentrationen vermuten. Da die freie Hormonfraktion entsprechend der „freien Hormon-Hypothese“ als biologisch aktive Fraktion betrachtet wird [2 (S. 72); 68 (S. 225); 96 (S. 173); 108 (S. 697); 127 (S.

199)], kommt diesen Veränderungen eine wichtige Rolle in der Entstehung der endokrinen Störungen bei Lci zu.

4.4. Wertung der gewonnenen Erkenntnisse zur Pathogenese der hormonellen Störungen bei Lci

4.4.1. Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit konnte durch SPR-Biosensormessungen gezeigt werden, dass SHBG im Serum von Männern mit kompensierter Lci unveränderte Androgenbindungseigenschaften aufweist. Gleichzeitig bestätigen die Daten dieser Studie bezüglich GT, fT und GE2 das Vorherrschen eines estrogenen Milieus bei männlichen Leberzirrhotikern, wie es auch schon in zahlreichen anderen Studien beschrieben wurde [8 (S. 167); 33 (S. 273); 36 (S. 100); 41 (S. 568); 48 (S. 206); 65 (S. 370f); 70 (S. 502); 72 (S. 747); 84 (S. 632); 89 (S. 463); 126 (S. 533)]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die fT-Spiegel durch den Anstieg des SHBG trotz unverändertem GT vermindern und es so zu einer zusätzlichen Verschiebung des Sexualhormon-Ungleichgewichts zugunsten der Estrogene kommt. Da SHBG auch die Konzentration des fE2 entscheidend mitbestimmt, scheinen die erhöhten SHBG-Spiegel eine der wichtigen Ursachen für das Auftreten von Hypogonadismus- und Feminisierungserscheinungen bei männlichen Leberzirrhotikern zu sein. Es wurden verschiedenste Hypothesen zur Pathogenese der endokrinen Abnormalitäten bei Lci kontrovers diskutiert [9 (S. 260); 28 (S. 5044f); 29 (S. 2532f); 41 (S. 568); 65 (S. 370ff); 70 (S. 502); 72 (S. 749); 75 (S. 1024); 121 (S. 89); 126 (S. 534)]. Im Folgenden soll versucht werden, die Erkenntnisse dieser Studie in das nach aktuellem Stand favorisierte Modell für die Entstehung der Hormonstörungen einzuordnen (Abb. 16). Die zugrunde liegenden, komplexen Mechanismen können dabei durch folgende drei Punkte spezifiziert werden: Synthese/Metabolismus, Feedback-Regulation und Plasma-Transport.

4.4.2. Synthese und Metabolismus

Um die hormonellen Veränderungen bei Lci richtig einschätzen zu können, ist es zunächst notwendig, die Gesamtspiegel der einzelnen Hormone zu betrachten, die sich aus dem Zusammenspiel von Synthese und Abbau des jeweiligen Steroids ergeben (Abb. 16).

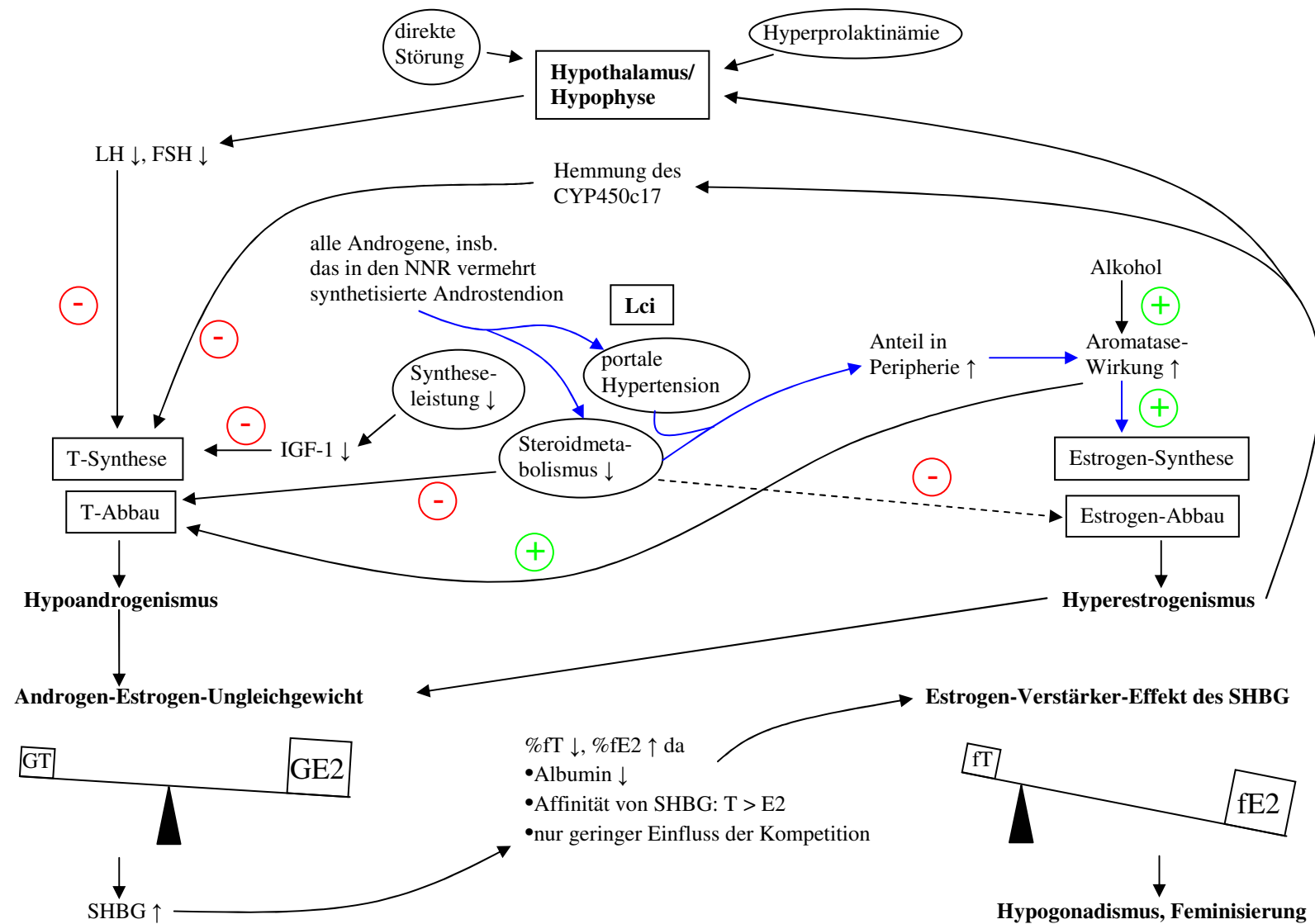


Abb. 16: Modell zur Pathogenese der hormonellen Störungen bei Lci (rotes -, hemmend; grünes +, fördernd; gestrichelter Pfeil, fraglich; blaue Pfeile, Weg der Androgene zur peripheren Aromatisierung; ↓, sinkt; ↑, steigt).

Nach heutigem Verständnis finden sich bei Lci durch eine verstärkte Synthese in den NNR und durch einen verminderten Metabolismus in der Leber hohe Spiegel an Androstendion und anderen schwachen Androgenen. Aufgrund der portalen Hypertension mit Verschiebung des Blutflusses von der Leber in die Peripherie und durch die verminderte hepatozelluläre Funktion entkommen diese Androgene dem unmittelbaren Abbau im portalvenösen Blut und erreichen den systemischen Kreislauf. Dort werden sie verstärkt durch die periphere Aromatase in Estrogene umgewandelt. Androstendion ist dabei der quantitativ wichtigste Androgen-Vorläufer für die Estrogenbildung. Die vermehrte Aromatisierung findet v.a. im Haut- und Unterhautgewebe sowie im Fett- und Muskelgewebe statt [9 (S. 260); 33 (S. 273); 40 (S. 377); 42 (S. 1024); 48 (S. 207); 65 (S. 370f); 72 (S. 749); 75 (S. 1022f); 84 (S. 632f); 89 (S. 465); 95 (S. 823); 121 (S. 89); 126 (S. 534)]. Da Alkohol die Aromatase-Aktivität zusätzlich steigert [43 (S. 20ff); 65 (S. 371)], führt er bei alkoholischer Lci wohl zu einer weiteren Erhöhung der Estrogen-Spiegel [65 (S. 372); 70 (S. 502)]. Möglicherweise werden durch die geschädigte Leber die Estrogene darüber hinaus auch in geringerem Ausmaß abgebaut [48 (S. 207); 65 (S. 371); 76 (S. 358); 89 (S. 462); 95 (S. 823)]. Da jedoch bei Lci keine Verminderung der MCR von E2 gefunden wurde [84 (S. 632)], scheint dieser Effekt, wenn überhaupt, nur wenig zum Estrogenanstieg beizutragen.

Bei Lci ist die systemische Eliminationsrate für T durch das erhöhte SHBG und die verminderte Leberfunktion erniedrigt [41 (S. 568); 84 (S. 632)]. Gleichzeitig sind aber verschiedene andere Mechanismen wirksam, die ein Absinken des GT verursachen können. So führt die verminderte Lebersyntheseleistung zu einem IGF-1-Mangel, der die Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität des Hodens beeinträchtigt. In der Folge vermindern sich zelluläre Proliferation und Spermatogenese im Hoden und es kommt zur testikulären Atrophie mit Einschränkung der T-Produktion [29 (S. 2532f); 70 (S. 503)]. Die testikuläre Funktion wird damit proportional zur Schwere der Erkrankung gestört. Auch der Estrogenüberschuss führt zu einer weiteren Verringerung von GT und fT. Durch die inhibitorische Wirkung von Estrogenen auf das Cytochrom-Isoenzym CYP450c17, das im Hoden für die T-Synthese benötigt wird, kommt es zu einer direkten, gonadalen Hemmung der T-Produktion der Leydig-Zellen [23 (S. 492); 40 (S. 377); 41 (S. 568)]. Neben diesen beiden Mechanismen, welche die T-Produktionsrate bei Lci vermindern, werden zusätzlich durch die vermehrte periphere Aromatisierung Androgene verstärkt verbraucht [23 (S. 493)]. Bei den Patienten dieser Studie wurden allerdings unveränderte GT-Konzentrationen gefunden (siehe Tab. 8). Es ist daher anzunehmen, dass in den kompensierten Stadien der Zirrhose diejenigen Mechanismen, die den T-Spiegel senken, ihre Wirkung noch nicht entfalten bzw. noch durch die zentrale Regulation kompensiert werden können (siehe unten).

Im Endeffekt ist bei Lci jedoch das Verhältnis der Gesamtkonzentrationen von E2 und T im Sinne eines Übergewichts der Estrogene verändert [41 (S. 571); 76 (S. 358)], wie es auch für die Patienten dieser Studie gezeigt werden konnte.

4.4.3. Feedback-Regulation

Veränderungen der peripheren Sexualhormon-Spiegel rufen in aller Regel eine Reaktion von Hypothalamus und Hypophyse hervor. Dementsprechend muss für das Verständnis der endokrinen Störungen bei Lci auch auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse eingegangen werden (Abb. 16).

Estrogene sind potente Inhibitoren der hypophysären Gonadotropin-Freisetzung, insb. der LH-Sekretion. Es wird daher angenommen, dass es bei Lci durch die erhöhten Estrogene nicht nur zu der oben beschriebenen, direkten, gonadalen, sondern auch zu einer indirekten, hypothalamisch-hypophysären Hemmung der T-Produktion durch die Leydig-Zellen kommt [23 (S. 492); 40 (S. 377); 41 (S. 568); 89 (S. 465); 126 (S. 534)]. Der mäßige Anstieg der peripheren Estrogenkonzentration scheint dabei v.a. die Pulsatilität der Gonadotropinfreisetzung und weniger deren Gesamtproduktion zu stören [9 (S. 260)]. Es sei allerdings erwähnt, dass von einigen Autoren die Feedback-Effekte von E2 auf die männliche Hypophyse in Frage gestellt bzw. als nicht relevant eingestuft werden [117 (S. 737)]. Auch die bei Lci häufig vorhandene Hyperprolaktinämie wirkt hemmend auf die Sekretion von LH und FSH [70 (S. 502)].

Daneben wurde bei Lci regelmäßig eine hypothalamisch-hypophysäre Störung identifiziert, die verhindert, dass die Hypophyse adäquat auf verminderte T-Spiegel reagieren kann [72 (S. 749)]. Es konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung des Hypogonadismus unabhängig von der Ätiologie nur durch den Schweregrad der Lci bedingt ist [72 (S. 750); 126 (S. 532f)]. Hieraus kann gefolgert werden, dass die testikuläre Funktion proportional zur Schwere der Leberschädigung beeinträchtigt und die GT-Spiegel vermindert sein müssten. Im Patientenkollektiv dieser Studie wurden jedoch trotz der eingeschränkten Leberfunktion normale GT-Spiegel gemessen (Tab. 8), was auf einen funktionierenden Feedback-Mechanismus der Androgene auf Hypothalamus und Hypophyse hindeutet. Auf der anderen Seite ist die Hypophyse jedoch offensichtlich nicht in der Lage, die verminderten fT-Spiegel auszugleichen (Tab. 8). Entsprechend bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine nur partiell intakte, zentrale Gegenregulation in kompensierten Stadien der Zirrhose und deuten auf einen möglichen beginnenden hypothalamischen oder hypophysären Schaden hin. Da auch die DHEAS-Sekretion durch ACTH stimuliert wird [81 (S. 2)], lässt sich zudem spekulieren, ob der beobachtete DHEAS-Abfall möglicherweise durch die Dysregulation von Hypothalamus und Hypophyse mit verursacht wird.

4.4.4. Plasma-Transport

Bei den Steroidhormonen wird nur die freie Fraktion als biologisch aktiv und damit für eine klinisch sichtbare endokrine Symptomatik als relevant angesehen [2 (S. 72); 68 (S. 225); 96 (S. 173); 108 (S.

697); 127 (S. 199)]. Der freie Hormonspiegel hängt dabei nach Selby [109 (S. 534)] von der Konzentration der Bindungsproteine, der Affinität des Steroids zu den Transportproteinen, dem Einfluss etwaiger um die Bindung kompetitiver Moleküle sowie der Gesamtkonzentration des jeweiligen Hormons ab. Das Verhalten der E2- und T-Spiegel bei Lci wurde bezüglich Synthese, Metabolismus und zentraler Regulation bereits diskutiert. Zur vollständigen Erfassung der endokrinen Dysfunktion müssen jedoch auch die beiden wichtigsten Transportproteine für T und E2 im Blut, SHBG und Albumin, in die Überlegungen mit einbezogen werden.

Hinsichtlich der Konzentrationen der Bindungsproteine ist bei Lci eine Kombination aus vermindertem Albumin- und erhöhtem SHBG-Spiegel, wie sie auch in dieser Studie gefunden wurde, charakteristisch. Jede dieser beiden Veränderungen würde schon für sich allein betrachtet zu einem Abfall der Albumin- und einem Anstieg der SHBG-gebundenen Hormonfraktion führen [34 (S. 64f)]. Kommt es sowohl zu einem Albumin-Abfall als auch zu einem SHBG-Anstieg, so ist entsprechend ein noch ausgeprägter Effekt bezüglich der vorgenannten Verschiebung des proteinabhängigen T- und E2-Transportes zu erwarten. Als Konsequenz steigt die Bedeutung des SHBG für die Lage des Androgen-Estrogen-Gleichgewichts bei Lci im Vergleich zu gesunden Männern deutlich an. Der Anteil der freien Fraktion eines Sexualhormons an der Gesamthormonkonzentration wird durch diese Veränderungen der Transportproteinspiegel unterschiedlich beeinflusst: während der Albumin-Abfall ihn erhöht, wird er durch den SHBG-Anstieg vermindert [34 (S. 64f)].

Um das Verhalten der freien Fraktion von T und E2 beurteilen zu können, müssen zusätzlich die Affinitäten dieser Steroide für die Transportproteine berücksichtigt werden. Albumin bindet E2 mit höherer Affinität als T [2 (S. 72); 68 (S. 226)], wodurch ein prozentual größerer Anteil des E2 an Albumin gebunden wird [34 (S. 61); 124 (S. 902)]. Aus der Erniedrigung des Albumins sollte daher ein stärkerer Anstieg des fE_2 als des fT resultieren. Beim SHBG stellt sich die Situation genau umgekehrt dar: es bindet T mit höherer Affinität als E2 [34 (S. 59); 68 (S. 215)] und ein prozentual größerer Anteil des T ist an SHBG gebunden [34 (S. 61); 124 (S. 902)]. Bei voller Funktionalität des SHBG bezüglich der Androgenbindung sollte die SHBG-Erhöhung daher zu einem stärkeren Abfall des prozentualen Anteils des fT gegenüber dem des fE_2 führen. Es lässt sich somit feststellen, dass durch den Abfall des Albumins weniger T, aber mehr E2 freigesetzt und durch das erhöhte SHBG mehr T und weniger E2 gebunden wird. Insgesamt ist daher anzunehmen, dass die freie Fraktion des T sinkt und die des E2 steigt.

Die Veränderungen von T, E2, Albumin und SHBG können jedoch nicht isoliert betrachtet werden. Auch die Konkurrenz von T und E2 um die Bindungsstellen am SHBG sowie die Konzentrationen und Affinitäten anderer SHBG-bindender Steroide müssen bei den Überlegungen berücksichtigt werden. Selbst bei Lci wird E2 trotz des deutlichen Anstiegs seiner Konzentration wohl nicht in der Lage sein, das höher affine T in nennenswerten Mengen vom SHBG zu verdrängen, da die GE2-Spiegel dann immer noch um etwa den Faktor 100 kleiner sind als die GT-Spiegel (Tab. 1, Tab. 8).

Als weitere natürliche Steroidhormone, die durch ihre hochaffine Bindung an SHBG Einfluss auf die freien Hormonfraktionen des T und E2 nehmen können, soll im Folgenden auf DHT, 2MeOE2, Androstendiol, Androstandiol und E1 näher eingegangen werden [34 (S. 60); 68 (S. 215)]. DHT weist von allen natürlichen Liganden die höchste Affinität für SHBG auf [88 (S. 58); 127 (S. 250f)]. Da die DHT-Konzentration bei Lci als normal [39 (S. 385)] bis eher niedrig beschrieben wurde [9 (S. 258); 84 (S. 631)] und selbst unter physiologischen Bedingungen nur 3,6% der SHBG-Bindungsstellen von DHT besetzt sind [34 (S. 60)], ist anzunehmen, dass in Anbetracht der hormonellen Besonderheiten bei Lci DHT nicht dazu in der Lage ist, T oder E2 in größeren Mengen vom SHBG zu verdrängen. Die Beurteilung der Wirkungen von 2MeOE2, Androstendiol und Androstandiol wird dadurch erschwert, dass bisher noch keine Studien existieren, in denen die Konzentrationen dieser drei Steroide bei Lci ermittelt wurden. 2MeOE2 könnte als Metabolit der bei Lci erhöhten Estrogene in größerem Ausmaß gebildet werden und aufgrund seiner sehr hohen Affinität zu SHBG zur Erhöhung der freien Fraktionen von T und E2 führen. Als Abbauprodukt von DHEAS und Androstendion, deren Spiegel in dieser Studie als erniedrigt bzw. normal bestimmt wurden (siehe Tab. 8), sollte Androstendiol bei Lci keine erhöhten Konzentrationen aufweisen. Außerdem wird es aufgrund seiner geringen Albuminbindung [34 (S. 61)] auch durch die Verminderung dieses Proteins nicht vermehrt freigesetzt. Ein signifikanter Einfluss des Androstendiols auf die fT- und fE2-Fraktion ist daher eher unwahrscheinlich. Androstandiol hingegen wird als Stoffwechselprodukt von T und DHT entsprechend der normalen bzw. erniedrigten Spiegel dieser beiden Steroide [8 (S. 153); 9 (S. 258); 41 (S. 566); 72 (S. 747); 84 (S. 631)] bei Lci zwar nicht in erhöhtem Maße produziert, könnte aber wegen eines relativ großen Albumin-gebundenen Anteils [34 (S. 61)] durch den Albumin-Abfall verstärkt freigesetzt werden. Wenn dies in ausreichend großem Umfang geschieht, könnte Androstandiol aufgrund seiner Affinität, die zwischen der von T und der von E2 und E1 liegt, selektiv die Estrogene vom SHBG verdrängen und damit deren freie Spiegel erhöhen, während die fT-Fraktion unverändert bleibt.

Klarer als bei den drei vorgenannten Steroiden stellt sich die Situation beim E1 dar. Bei Lci werden regelmäßig erhöhte Serumspiegel dieses Hormons gemessen [33 (S. 273); 65 (S. 371); 84 (S. 631)]. Trotz der Zunahme der Konzentration liegt der E1-Spiegel auch bei Lci immer noch deutlich niedriger als der GT-Spiegel, so dass E1, auch im Hinblick auf die höhere Affinität des T, wahrscheinlich nicht in der Lage ist, T vom SHBG zu verdrängen. Auch E2 wird durch E1 nicht von seinen Bindungsstellen am SHBG verdrängt, da die GE2-Konzentration ebenfalls, wenn auch nicht ganz so stark wie die GE1-Konzentration, ansteigt [36 (S. 100); 41 (S. 568); 48 (S. 204); 65 (S. 371); 72 (S. 747); 84 (S. 631); 126 (S. 533)] und E2 stärker an SHBG bindet [34 (S. 60); 68 (S. 215)]. Möglicherweise findet sogar umgekehrt eine Verdrängung des gebundenen E1 durch E2 statt, so dass sich die freie E1-Fraktion erhöht. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass neben T und E2 bei Lci noch weitere Steroide die freie Hormonfraktion dieser beiden Sexualhormone beeinflussen. Eine

genaue Beurteilung wird durch die dürftige Studienlage erschwert. Wahrscheinlich ist ihr Einfluss aber als eher gering einzustufen.

Aufgrund des bereits Gesagten ist anzunehmen, dass es bei Lci zu einem Abfall des Anteils des fT am GT sowie zu einem Anstieg des Anteils des fE2 am GE2 kommt. Für die eigentliche physiologische oder pathologische Wirkung der Sexualhormone ist aber nicht der Anteil der freien Fraktion am Gesamthormon entscheidend, sondern die tatsächliche Konzentration an freiem Hormon. In Anbetracht der sowohl in dieser als auch in vielen anderen Untersuchungen gefundenen Erhöhung des GE2 [Tab. 8; 8 (S. 153); 36 (S. 100); 41 (S. 568); 48 (S. 204); 65 (S.371); 72 (S. 747); 84 (S. 631); 126 (S. 533)] bei unverändertem GT [Tab. 8; 41 (S. 566); 72 (S. 747)] ergibt sich bei Lci das im Folgenden beschriebene Bild (Abb. 16). Durch die Verminderung des Albumins und die Erhöhung des SHBG kommt es über die oben vorgestellten Mechanismen zum Abfall des Anteils des fT und Anstieg des Anteils des fE2 am Gesamthormonspiegel. Dadurch wird das aufgrund veränderter Synthese- und Metabolismusraten sowie veränderter hypothalamisch-hypophysärer Regulation bei Lci ohnehin schon vorhandene Androgen-Estrogen-Ungleichgewicht bezüglich der Gesamt-Hormonspiegel verstärkt an die tatsächlichen freien Hormon-Spiegel weitergegeben. So sinkt, obwohl das GT noch normal ist, der fT-Spiegel schon signifikant ab. Dieses Phänomen konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in vielen anderen Studien beobachtet werden [36 (S. 98); 40 (S. 375); 41 (S. 566); 72 (S. 749)]. Andererseits steigt der fE2-Spiegel im Verhältnis zum fT-Spiegel noch viel stärker an, als es die GE2-Konzentrationen bereits vermuten lassen. Dazu passend wurde in vielen Studien bei Lci ein erhöhter fE2-Spiegel nachgewiesen [8 (S. 156); 39 (S. 385)].

4.4.5. Folgerungen

In der vorliegenden Untersuchung wurde mittels Biosensormessungen gezeigt, dass die Androgenbindung des bei Lci erhöhten SHBG voll intakt ist. Die Bedeutung dieser Tatsache für die Entstehung der hormonellen Veränderungen bei männlichen Leberzirrhotikern konnte dann mit Hilfe von Hormonanalysen herausgearbeitet werden.

Durch veränderte Synthese- und Clearanceraten sowie eine veränderte zentrale Regulation entsteht bei männlichen Leberzirrhotikern eine Verschiebung der T-E2-Balance hin zum Estrogen. Die Kombination aus erhöhtem Estrogen und vermindertem Androgen führt wahrscheinlich zum Anstieg des SHBG-Spiegels [41 (S: 567)]. Da gleichzeitig das Albumin durch die eingeschränkte hepatische Syntheseleistung vermindert ist [59 (S. 462)], kommt damit dem SHBG die entscheidende Bedeutung für die Regulation des Androgen-Estrogen-Gleichgewichts zu. Die Bindungsaffinität des SHBG ist für T größer als für E2, so dass das erhöhte GE2 kaum durch den SHBG-Anstieg beeinflusst wird, während das sowieso bereits verminderte T jetzt auch noch einer stärkeren SHBG-Bindung unterliegt.

Folglich ist die Verschiebung des Gleichgewichts von fT und fE2 zugunsten des Estrogens durch die Wirkung des SHBG noch wesentlich ausgeprägter als es das ohnehin vorhandene Ungleichgewicht der Gesamtkonzentrationen dieser beiden Sexualhormone vermuten lässt [Abb. 16; 2 (S.77f); 26 (S. 39f); 88 (S. 65)]. Burke und Anderson bezeichneten dieses Phänomen als Estrogen-Verstärker-Effekt des SHBG bei Estrogenüberschuss [26 (S. 39f)]. Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass, trotz einer aller Wahrscheinlichkeit nach veränderten Glykosilierung in der zirrhotisch geschädigten Leber, die Steroidbindung des SHBG intakt ist. Für den Bereich der Androgene konnte dies in der vorgelegten Studie gezeigt und damit die wichtige Rolle des SHBG in der Entstehung der hormonellen Störungen bei Lci bewiesen werden.

Die Wirkung des SHBG auf die freien Hormonfraktionen ist bedeutsam für das klinische Erscheinungsbild der Hormonstörungen bei Lci, da die freien Hormone die biologisch aktive Form eines Steroids darstellen [2 (S. 72); 68 (S. 225); 96 (S. 173); 108 (S. 697); 127 (S. 199)]. Hypoandrogenismus und Hyperestrogenismus führen zusammen zu den typischen Symptomen von Hypogonadismus und Feminisierung bei männlichen Leberzirrhotikern [8 (S. 149); 9 (S. 258); 70 (S. 502)]. Ohne die verstärkende Wirkung des erhöhten SHBG mit einer intakten Androgenbindung wären die endokrinen Symptome wesentlich weniger stark ausgeprägt.

4.5. Ausblick

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität des SHBG bezüglich der Androgenbindung bei Männern mit Lci nicht durch den zugrunde liegenden Leberzellschaden beeinträchtigt wird und entscheidend an der Entwicklung von Hypogonadismus und Feminisierung beteiligt ist. Entsprechend den vielschichtigen hormonellen Störungen dieses Krankheitsbildes sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um das Wechselspiel von SHBG, endokrinen Veränderungen und Leberdysfunktion besser zu verstehen.

Zunächst gilt es zu klären, ob auch die Estrogenbindung des SHBG bei Lci unverändert ist. Dies ist insb. von Interesse, da eine anodale Verschiebung der E2-bindenden Isoformen des SHBG bei Lci auf eine abnormale Struktur des Proteins hindeuten könnte [116 (S. 642f)]. Nur wenn auch die Estrogenbindung des SHBG voll intakt wäre, könnte man die Rolle des Bindungsproteins als Estrogen-Verstärker bei Lci endgültig als erwiesen ansehen. Allerdings ist fraglich, ob dazu ein Biosensorsystem ähnlich wie in dieser Arbeit verwendet werden kann. Zum einen müsste dazu ein immobilisierbares Estrogenderivat synthetisiert werden, zum anderen ist unklar, ob man aufgrund der geringeren Affinität der Estrogene und der niedrigen SHBG-Konzentrationen der injizierten Fraktionen überhaupt ein messbares Biosensorsignal erhalten würde.

Weiterhin sollte der Einfluss des SHBG auf die Ausprägung der endokrinen Störungen quantifiziert werden. Solange der Anteil der SHBG-Erhöhung an der Veränderung der einzelnen

hormonellen Parameter nicht klar ist, lässt sich die tatsächliche Bedeutung des SHBG für die Pathogenese der hormonellen Störungen nur schwer abschätzen. Aufgrund des weiten Bereiches der gemessenen SHBG-Konzentrationen bei männlichen Leberzirrhotikern würde sich hierfür beispielsweise ein Vergleich des Hormonhaushaltes von Patienten mit leicht, mittel und stark erhöhten SHBG-Spiegeln anbieten.

Eine ebenfalls bisher nicht behandelte Frage sind mögliche geschlechtsspezifische Besonderheiten in der Rolle des SHBG bei der Entstehung der Lci-assoziierten hormonellen Störungen. Angesichts der unterschiedlich hohen SHBG-Ausgangsspiegel, der beträchtlichen Unterschiede in der Regulation des Sexualhormonhaushalts und der verschieden schweren Verläufe von Lebererkrankungen bei Männern und Frauen ist nicht auszuschließen, dass bei Frauen mit Lci SHBG-Veränderungen andere Konsequenzen haben.

Auch die Ursache der SHBG-Erhöhung bei Lci liegt noch im Unklaren. Da SHBG bei Lci, wie in dieser Studie gezeigt, Androgene völlig normal bindet, ist eine intakte räumliche Struktur des Proteins anzunehmen. Es erscheint daher wahrscheinlicher, dass tatsächlich die SHBG-Synthese hochreguliert ist und nicht ein defektes oder unvollständiges Protein aus den geschädigten Hepatozyten freigesetzt wird. Um dies endgültig zu bestätigen und um zu klären, welche Faktoren im Einzelnen die Steigerung der SHBG-Synthese bei Lci auslösen, sind weitere Untersuchungen nötig. Da sich das SHBG trotz der sich selbst verstärkenden Estrogenwirkung nur auf etwa die doppelte Konzentration von Gesunden erhöht, wäre in diesem Zusammenhang auch von Interesse, welche Mechanismen dem SHBG-Anstieg entgegenwirken.

Zudem gilt es auch, die nebenbefundlich in dieser Studie gefundene DHEAS-Verminderung in frühen Stadien der Lci näher abzuklären. Die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen ACTH und DHEAS-Spiegeln bei Lci wäre hierfür ein erster Schritt. DHEAS könnte darüber hinaus möglicherweise als prognostischer Marker für den Verlauf einer Lci verwendet werden. Auch ein positiver Effekt einer DHEAS-Substitution auf das Befinden der Leberzirrhotiker wäre denkbar.

5. Zusammenfassung

SHBG ist ein homodimeres Glykoprotein, das in der Leber synthetisiert wird und Sexualsteroiden im Plasma bindet. Seine Affinität zu T ist dabei größer als zu E2. Estrogene bewirken einen Anstieg, Androgene einen Abfall des SHBG-Spiegels. SHBG dient als Reservoir für Sexualsteroiden im Blut und reguliert ihre freie Hormonfraktion, ihre metabolische Clearance sowie das Androgen-Estrogen-Gleichgewicht. Weiterhin wurde ein SHBG-Membranrezeptor auf der Oberfläche vieler Androgen- und Estrogen-sensitiver Zellen mit noch nicht endgültig gekläarter biologischer Funktion beschrieben, bei dem es sich wohl um Megalin handelt. Die bei Lci erhöhten SHBG-Spiegel sind entscheidend an der Entstehung von Hypogonadismus und Feminisierung bei männlichen Patienten beteiligt. Voraussetzung hierfür ist eine intakte Steroidbindung des SHBG. Da bei der Lci der Ort der SHBG-Synthese geschädigt ist, kann dies nicht als selbstverständlich angesehen werden, insb. angesichts der Tatsache, dass der genaue Mechanismus der SHBG-Erhöhung bisher nicht definitiv geklärt ist. So ist bekannt, dass bei Lebererkrankungen die hepatische Synthese von vielen Glykoproteinen gestört ist. Zudem wurde bei Lci eine Veränderung im elektrophoretischen Verhalten einzelner SHBG-Isoformen beschrieben. Ziel der Arbeit war es daher, zu klären, ob die SHBG-Steroid-Interaktion bei Lci normal oder verändert ist. Zusätzlich sollten die sich daraus ergebenden Folgen auf den Sexualhormonhaushalt untersucht werden.

Hierzu wurden die Seren von 33 männlichen Lci-Patienten im Child-Pugh Stadium A oder B und von 32 altersgleichen gesunden Männern sowie von 19 Schwangeren und 20 Hyperthyreotikern in die Studie einbezogen. Das SHBG wurde individuell aus 23 der Lci-, 20 der gesunden Männer- sowie aus allen Schwangeren- und Hyperthyreose-Seren mittels einer Gelfiltrationschromatographie auf einer Agarose-Dextran-Säule mit PBS als Laufpuffer partiell aufgereinigt. Durch eine SDS-PAGE und anschließenden Western-Blot mit einem SHBG-spezifischen Ak konnten die SHBG-haltigen Fraktionen identifiziert werden. Diese wurden nachfolgend an einem SPR-Biosensor injiziert und ihr Anbindungsverhalten an ein geeignetes, auf der Oberfläche des Sensorchips immobilisiertes Androgenderivat ermittelt. Zu Kalibrationszwecken wurde auch die Anbindung von hochaufgereinigtem SHBG auf den einzelnen Messchips aufgezeichnet. Weiterhin wurden bei allen Lci-Patienten und gesunden Männern die Serumspiegel von SHBG, Albumin, GT, fT, DHEAS, Androstendion, GE2 und 17-OHP sowie das Gesamteiweiß, FSH und TSH und die Aktivitäten der ALT, AST, PChE und GGT mit gut etablierten Meßsystemen aus der klinisch-chemischen Routinediagnostik bestimmt. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bei einem Signifikanzniveau von 5% auf Signifikanz hin überprüft.

Bei der Analyse der Biosensormessungen zeigte sich in allen Studiengruppen die gleiche, hyperbole Anbindungskurve von SHBG an das Androgen. Die Injektion von hochaufgereinigtem SHBG am Biosensor lieferte ebenfalls die gleichen Sensorgramme wie die Studiengruppen und ermöglichte die Erstellung einer Chip-spezifischen Kalibrationskurve. Hierdurch gelang ein von der

Beladungsdichte des jeweiligen Chips unabhängiger, quantitativer Vergleich der Biosensordaten. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass SHBG bei Lci im Vergleich zu den Kontrollgruppen gesunde Männer, Hyperthyreote und Schwangere dieselbe Menge an Androgenen im Verhältnis zu seiner Serumkonzentration bindet. Bei der Evaluation der im statistischen Teil der Arbeit ermittelten Laborparameter zeigten sich bezüglich des GT und FSH keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. Die Leberzirrhotiker wiesen jedoch ein signifikant höheres GE2 und SHBG sowie ein signifikant niedrigeres fT, DHEAS, Albumin und GT/GE2-Verhältnis auf.

Durch den der Biosensormessung vorgeschalteten Gelfiltrationsschritt gelang es, SHBG aus sehr geringen Probenmengen unter Erhalt seiner Funktionalität bei gleichzeitiger Abreicherung evtl. interferierender Serumproteine, SHBG-Oligomere und endogener Steroide effizient zu isolieren. Die SHBG-Androgen-Interaktion konnte damit in einer großen Zahl an Seren individuell bestimmt werden. Insgesamt deuten die erhaltenen Biosensordaten auf ein unverändertes Anbindungsverhalten von Androgenliganden an SHBG bei Lci hin, dass sich nicht von dem gesunder Männer, dem von Hyperthyreotikern oder dem von Schwangeren unterscheidet. Die festgestellten verminderten DHEAS-Werte in frühen Stadien der Lci waren bisher nur bei fortgeschrittenen Verläufen dieser Erkrankung bekannt. Sie beruhen wohl auf einer Erschöpfung der adrenalen Corticoid- und Androgen-Reserve und stellen einen weiteren Faktor dar, der zur Hypoandrogenämie bei Lci beiträgt. Ansonsten bestätigen die Ergebnisse der statistischen Analyse das Vorherrschen eines estrogenen Milieus bei männlichen Lci-Patienten. Pathogenetisch betrachtet gelangen bei der Lci Androgene durch die portale Hypertension vermehrt in die Peripherie, wo aus ihnen durch die periphere Aromatase verstärkt Estrogene gebildet werden. Gleichzeitig beeinträchtigen ein IGF-1-Mangel und die erhöhten Estrogene die testikuläre Androgensynthese. Hinzu kommt, dass bei der Lci eine hypothalamisch-hypophysäre Störung vorliegt, die verhindert, dass die Hypophyse adäquat auf die verminderten T-Spiegel reagieren kann. Es bildet sich daher ein Hypoandrogenismus und Hyperestrogenismus aus. Hinsichtlich des Plasma-Transportes der Sexualsteroiden ist bei Lci eine Kombination aus vermindertem Albumin- und erhöhtem SHBG-Spiegel typisch. Die Bedeutung des SHBG für die Lage des Androgen-Estrogen-Gleichgewichts steigt damit deutlich an. Bei voller Funktionalität der Androgenbindung des SHBG sinkt durch die unterschiedlichen Affinitäten von SHBG und Albumin zu den einzelnen Steroiden die freie Fraktion des T und die des E2 steigt. Durch das erhöhte SHBG und dessen intakte Androgenbindung, welche in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, wird also das Androgen-Estrogen-Ungleichgewicht verstärkt auf die freien Hormonspiegel übertragen. So sinken in kompensierten Stadien der Zirrhose trotz noch normalen GT schon die fT-Spiegel ab und es entwickelt sich eine ausgeprägtere endokrine Symptomatik als dies ohne SHBG-Erhöhung der Fall wäre.

6. Danksagung

Ohne Unterstützung, die mir von vielen Seiten zuteil wurde, wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter B. Lippa, danken, der die Idee für die vorliegende Arbeit hatte, mir die Laborausüstung zur Verfügung stellte und den Fortgang der Untersuchung in zahlreichen Diskussionen beständig begleitet hat.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Dr. rer. nat. Jochen Metzger, der mit vielen Anregungen und Hinweisen die Realisierung des Projektes gefördert hat. Anita Schreiegg danke ich für die exzellente Unterstützung in technischen und organisatorischen Belangen.

Auch den Kliniken, die die Seren für diese Studie bereitgestellt haben, sei an dieser Stelle gedankt. Insbesondere Herr PD Dr. med. Ewert Schulte-Frohlinde von der II. Medizinischen Klinik des MRI stand für Fragen zur Gruppe der Leberzirrhotiker immer wieder zu Verfügung.

Daneben danke ich Frau Dipl.-Math. Raymonde Busch vom Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München für ihre statistische Beratung.

7. Abkürzungen

17-OHA	17 β -Hydroxy-Androgene
17-OHP	17 α -Hydroxy-Progesteron (17 α -Hydroxy-4-pregnen-3,20-dion)
1 α -C6-DHT	1 α -Aminohexyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on
2MeOE2	2-Methoxy-Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-2,3,17 β -triol 2-methyl ether)
Abb.	Abbildung
ABP	Androgen-bindendes Protein
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ala	Alanin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammonium Persulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
cAMP	3'-5'-cyclo-Adenosinmonophosphat
C-Atome	Kohlenstoff-Atome
CBG	Transcortin
CM-Dextran	Carboxymethyl-Dextran
Cys	Cystein
Da	Dalton
DHEA	Dehydroepiandrosteron (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on)
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat (3 β -Hydroxy-5-androsten-17-on-sulfat)
DHT	5 α -Dihydrotestosteron (17 β -Hydroxy-5 α -androstan-3-on)
E1	Estron (3-Hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-on)
E2	Estradiol (3,17 β -Dihydroxy-1,3,5(10)-estratrien)
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDC	N-Ethyl-N'-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimid
EGF	Epidermal Growth Factor

FAI	freier Androgen-Index
Fc1	Referenzzelle bei der Biosensormessung
Fc2	Meßzelle bei der Biosensormessung
fE2	freies Estradiol
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FS	Fettsäuren
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fT	freies Testosteron
fT3	freies Triiodthyronin
fT4	freies Thyroxin
GE1	Gesamt-Estron
GE2	Gesamt-Estradiol
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GH	Growth Hormon
Gly	Glycin
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GT	Gesamt-Testosteron
HBS-P-Puffer	HEPES-buffered Saline mit Surfactant P20
hCG	humanes Choriongonadotropin
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
His	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
HVL	Hypophysenvorderlappen
HWZ	biologische Halbwertszeit
IEP	isoelektrischer Punkt
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IGF-1	Insulin like growth factor-1
Ile	Isoleucin
K _a	Assoziationskonstante
kb	Kilo-Basen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
Lci	Leberzirrhose
LDL	Low Density Lipoprotein
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon

Lys	Lysin
M	Marker für Molekulargewicht
Max exp	mit Hilfe der Chip-spezifischen Biosensor-Kalibrationskurven errechnete Konzentration an funktionalem SHBG in der Fraktion eines Serums mit dem Serum-Anbindungsmaximum (angegeben in nmol/l SHBG)
MCR	metabolische Clearancerate
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht
MRI	Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NNR	Nebennierenrinde
ns	nicht signifikant
o. A.	ohne Angabe
PBS	Phosphate-buffered Saline
PChE	Pseudocholinesterase
PCOS	Polyzystisches Ovarialsyndrom
Phe	Phenylalanin
PNGase	Peptid N-Glykosidase
PR	Produktionsrate
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
r ²	Bestimmtheitsmaß
RI	Refraktionsindex
RIA	Radioimmunoassay
RU	Resonance Unit
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
Shbg	für Sexualhormon-bindendes Globulin kodierendes Gen
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SP-1	Stimulating protein-1
SPR	Surface Plasmon Resonance
SS	Schwangerschaft
T	Testosteron (17β-Hydroxy-4-androsten-3-on)

T3	Triiodthyronin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin
TGF- α	Transforming Growth Factor- α
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyreoida-stimulierendes Hormon
TTBS	Tween-Tris-buffered Saline
TWEEN 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
UV	Ultraviolett
Val	Valin
Vk	Variationskoeffizient
WHR	Waist-to-Hip-Ratio

8. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

8.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Hormonhaushalt bei Männern mit Lci.	S. 31
Tab. 2: Ermittlung der Child-Pugh-Score.	S. 43
Tab. 3: Verdünnungsschema für aufgereinigtes, deglykosiliertes SHBG.	S. 59
Tab. 4: Leistungsdaten der Protein-, Enzym- und Hormonbestimmungen.	S. 60
Tab. 5: Begriffserläuterungen zu den Biosensormessungen.	S. 65
Tab. 6: Biosensormesschips.	S. 70
Tab. 7: Anzahl der gemessenen Seren.	S. 71
Tab. 8: Statistische Kennzahlen zum Vergleich von männlichen Leberzirrhotikern und gesunden Männern.	S. 74

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prinzip des SPR-Effektes.	S. 38
Abb. 2: Prinzip der Aminkopplung von 1 α -C6-DHT an CM-Dextran mittels EDC/NHS-Chemie.	S. 40
Abb. 3: Elutionsprofile und Western-Blots mit Fraktionsnummern für je ein typisches Lci-, normales Männer-, Schwangeren- und Hyperthyreose-Serum.	S. 63
Abb. 4: Gelfiltrationschromatogramm eines Schwangerenserums mit zugehörigem Western-Blot, bei dem sich eine zusätzliche SHBG-Elution im hoch- molekularen Bereich findet.	S. 64
Abb. 5: Sensorgramme der vier Gelfiltrationsfraktionen mit den höchsten An- bindungen für je ein typisches Lci-, normales Männer-, Schwangeren- und Hyperthyreoseserum.	S. 66
Abb. 6: Serum-Anbindungsmaxima in den verschiedenen experimentellen Gruppen.	S. 67
Abb. 7: Ermittlung der Chip-spezifischen Kalibrationskurve am Beispiel des CM4-53-Chips.	S. 69
Abb. 8: Vergleich der Max exp-Werte von Lci-Patienten und gesunden Männern.	S. 72
Abb. 9: Regressionanalyse des Zusammenhanges zwischen Max exp-Werten und SHBG-Konzentrationen.	S. 73
Abb. 10: Basischarakteristika der Studiengruppen.	S. 75

Abb. 11: Leberfunktionsparameter.	S. 77
Abb. 12: Sexualsteroid.	S. 78
Abb. 13: Vergleich des GT/GE2-Quotienten von Lci-Patienten und gesunden Männern.	S. 79
Abb. 14: Vergleich der FSH-Spiegel von Lci-Patienten und gesunden Männern.	S. 80
Abb. 15: Gesamteiweiss und Transportproteine für Sexualsteroid.	S. 80
Abb. 16: Modell zur Pathogenese der hormonellen Störungen bei Lci.	S. 93

9. Literaturverzeichnis

1. Alber B, Mößner G. Leistungsverzeichnis des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie. Untersuchungsprogramm und Hinweise. 3. Ausgabe. München: Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar, 2004.
2. Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1974; 3:69-96.
3. Aoki N, Maruyama Y, Imamura M, Ohno Y, Saika T, Yamamoto T, Suzuki Y, Sinohara H. Studies of sex-steroid-binding plasma protein (SBP) in Graves' disease before and under antithyroid drug therapy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986; 113:249-254.
4. Ashwell G, Steer CJ. Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *JAMA* 1981; 246:2358-2364.
5. Avvakumov GV, Grishkovskaya I, Muller YA, Hammond GL. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin in complex with 2-methoxyestradiol reveals the molecular basis for high affinity interactions with C-2 derivatives of estradiol. *J Biol Chem* 2002; 277:45219-45225.
6. Avvakumov GV, Grishkovskaya I, Muller YA, Hammond GL. Resolution of the human sex hormone-binding globulin dimer interface and evidence for two steroid-binding sites per homodimer. *J Biol Chem* 2001; 276:34453-34457.
7. Avvakumov GV, Muller YA, Hammond GL. Steroid-binding specificity of human sex hormone-binding globulin is influenced by occupancy of a zinc-binding site. *J Biol Chem* 2000; 275:25920-25925.
8. Baker HW, Burger HG, de Kretser DM, Dulmanis A, Hudson B, O'Connor S, Paulsen CA, Purcell N, Rennie GC, Seah CS, Taft HP, Wang C. A study of the endocrine manifestations of hepatic cirrhosis. *Q J Med* 1976; 45:145-178.
9. Bannister P, Losowsky MS. Sex hormones and chronic liver disease. *J Hepatol* 1988; 6:258-262.
10. Bardin CW, Lipsett MB. Testosterone and androstenedione blood production rates in normal women and women with idiopathic hirsutism or polycystic ovaries. *J Clin Invest* 1967; 46:891-902.
11. Beck K, Gruber TM, Ridgway CC, Hughes W, Sui L, Petra PH. Secondary structure and shape of plasma sex steroid-binding protein - comparison with domain G of laminin results in a structural model of plasma sex steroid-binding protein. *Eur J Biochem* 1997; 247:339-347.
12. Becker U, Gluud C, Bennett P. Thyroid hormones and thyroxine-binding globulin in relation to liver function and serum testosterone in men with alcoholic cirrhosis. *Acta Med Scand* 1988; 224:367-373.

13. Beishuizen A, Thijs LG, Vermes I. Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? *Crit Care* 2002; 6:434-438.
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemie*. 5. Auflage. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2003.
15. Bérubé D, Séralini GE, Gagné R, Hammond GL. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12-->p13). *Cytogenet Cell Genet* 1990; 54:65-67.
16. *BIAApplications Handbook*, edition May 1994. Uppsala, Schweden: Copyright 1994 Pharmacia Biosensor AB.
17. *Biacore Sensor Surface Handbook*, Edition October 2003 (Version AA): Copyright Biacore 2003.
18. *BIAtechnology Handbook*, version AB: Copyright 1994-1998 Biacore AB, reprinted 1998.
19. Bocchinfuso WP, Hammond GL. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation. *Biochemistry* 1994; 33:10622-10629.
20. Bocchinfuso WP, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. Expression and differential glycosylation of human sex hormone-binding globulin by mammalian cell lines. *Mol Endocrinol* 1991; 5:1723-1729.
21. Bocchinfuso WP, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 1992; 301:227-230.
22. Bordin S, Petra PH. Immunocytochemical localization of the sex steroid-binding protein of plasma in tissues of the adult monkey *Macaca nemestrina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:5678-5682.
23. Braunstein GD. Gynecomastia. *N Engl J Med* 1993; 328:490-495.
24. Brenta G, Bedecarras P, Schnitman M, Gurfinkiel M, Damilano S, Campo S, Pisarev MA. Characterization of sex hormone-binding globulin isoforms in hypothyroid women. *Thyroid* 2002; 12:101-105.
25. Burger HG, Dudley EC, Cui J, Dennerstein L, Hopper JL. A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex hormone-binding globulin levels through the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2832-2838.
26. Burke CW, Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin is an oestrogen amplifier. *Nature* 1972; 240:38-40.
27. Carlström K, Gershagen S, Rannevik G. Free testosterone and testosterone/SHBG index in hirsute women: a comparison of diagnostic accuracy. *Gynecol Obstet Invest* 1987; 24:256-261.

28. Castagnetta LA, Agostara B, Montalto G, Polito L, Campisi I, Saetta A, Itoh T, Yu B, Chen S, Carruba G. Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells. *Cancer Res* 2003; 63:5041-5045.
29. Castilla-Cortázar I, Diez N, García-Fernandez M, Puche JE, Diez-Caballero F, Quiroga J, Díaz-Sánchez M, Castilla A, Casares AD, Varela-Nieto I, Prieto J, González-Barón S. Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: effect of insulin-like growth factor 1. *World J Gastroenterol* 2004; 10:2529-2534.
30. Chikhaoui Y, Chitour F. Human sex hormone binding globulin and sensitive thyrotropin measurements in thyroid physiopathology. *Steroids* 1988; 52:387-388.
31. Cousin P, Déchaud H, Grenot C, Lejeune H, Pugeat M. Human variant sex hormone-binding globulin (SHBG) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:235-240.
32. Danzo BJ, Bell BW, Black JH. Human testosterone-binding globulin is a dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated. *Endocrinology* 1989; 124:2809-2817.
33. De Besi L, Zucchetta P, Zotti S, Mastrogiacomo I. Sex hormones and sex hormone binding globulin in males with compensated and decompensated cirrhosis of the liver. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 120:271-276.
34. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 53:58-68.
35. Fissore F, Fortunati N, Comba A, Fazzari A, Gaidano G, Berta L, Frairia R. The receptor-mediated action of sex steroid binding protein (SBP, SHBG): accumulation of cAMP in MCF-7 cells under SBP and estradiol treatment. *Steroids* 1994; 59:661-667.
36. Ganne-Carrié N, Chastang C, Uzzan B, Pateron D, Trinchet JC, Perret G, Beaugrand M. Predictive value of serum sex hormone binding globulin for the occurrence of hepatocellular carcinoma in male patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26:96-102.
37. Garden GA, Hannan CJ, Spencer CA, Plymate SR. The effect of sex hormone binding globulin (SHBG) on the pituitary testicular axis in hyperthyroid men. *Steroids* 1988; 52:385-386.
38. Gershagen S, Henningson K, Fernlund P. Subunits of human sex hormone binding globulin. Interindividual variation in size. *J Biol Chem* 1987; 262:8430-8437.
39. Gluud C, Dejgaard A, Bennett P, Svenstrup B. Androgens and oestrogens before and following oral testosterone administration in male patients with and without alcoholic cirrhosis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987; 115:385-391.
40. Gluud C. Serum testosterone concentrations in men with alcoholic cirrhosis: background for variation. *Metabolism* 1987; 36:373-378.

41. Gluud C. Testosterone and alcoholic cirrhosis. Epidemiologic, pathophysiologic and therapeutic studies in men. *Dan Med Bull* 1988; 35:564-575.
42. Gordon GG, Olivo J, Rafil F, Southren AL. Conversion of androgens to estrogens in cirrhosis of the liver. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 40:1018-1026.
43. Gordon GG, Southren AL, Vittek J, Lieber CS. The effect of alcohol ingestion on hepatic aromatase activity and plasma steroid hormones in the rat. *Metabolism* 1979; 28:20-24.
44. Gravel P, Walzer C, Aubry C, Balant LP, Yersin B, Hochstrasser DF, Guimon J. New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220:78-85.
45. Grenot C, de Montard A, Blachère T, de Ravel MR, Mappus E, Cuilleron CY. Characterization of Met-139 as the photolabeled amino acid residue in the steroid binding site of sex hormone binding globulin using $\Delta 6$ derivatives of either testosterone or estradiol as unsubstituted photoaffinity labeling reagents. *Biochemistry* 1992; 31:7609-7621.
46. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Hammond GL, Catalano MG, Muller YA. Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J Biol Chem* 2002; 277:32086-32093.
47. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *Embo J* 2000; 19:504-512.
48. Guechot J, Vaubourdolle M, Ballet F, Giboudeau J, Darnis F, Poupon R. Hepatic uptake of sex steroids in men with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1987; 92:203-207.
49. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lippa PB, Nykjaer A, Willnow TE. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005; 122:751-762.
50. Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: steroid-binding and dimerization domains. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53:543-552.
51. Hammond GL, Bocchinfuso WP. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. *Horm Res* 1996; 45:197-201.
52. Hammond GL, Robinson PA, Sugino H, Ward DN, Finne J. Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: evidence for two identical subunits. *J Steroid Biochem* 1986; 24:815-824.
53. Hammond GL, Underhill DA, Rykse HM, Smith CL. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol* 1989; 3:1869-1876.

54. Hammond GL, Underhill DA, Smith CL, Goping IS, Harley MJ, Musto NA, Cheng CY, Bardin CW. The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS Lett* 1987; 215:100-104.
55. Hammond GL. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev* 1990; 11:65-79.
56. Hampl R, Kancheva R, Hill M, Biečková M, Vondra K. Interpretation of sex hormone-binding globulin levels in thyroid disorders. *Thyroid* 2003; 13:755-760.
57. Hauptmann H, Metzger J, Schnitzbauer A, Cuilleron CY, Mappus E, Luppá PB. Syntheses and ligand-binding studies of 1 α - and 17 α -aminoalkyl dihydrotestosterone derivatives to human sex hormone-binding globulin. *Steroids* 2003; 68:629-639.
58. Hermanson GT. *Bioconjugate techniques*. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press - An Imprint of Elsevier, 1996.
59. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold, 2003.
60. Hildebrand C, Bocchinfuso WP, Dales D, Hammond GL. Resolution of the steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1995; 34:3231-3238.
61. Hilpert J, Vorum H, Burmeister R, Spoelgen R, Grishkovskaya I, Misselwitz R, Nykjaer A, Willnow TE. Efficient eukaryotic expression system for authentic human sex hormone-binding globulin. *Biochem J* 2001; 360:609-615.
62. Hobbs CJ, Jones RE, Plymate SR. The effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on testosterone transport into the cerebrospinal fluid. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 42:629-635.
63. Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem* 1990; 265:6048-6054.
64. Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM, St. George J, Levy NC, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector. *J Biol Chem* 2002; 277:26618-26622.
65. Johnson PJ. Sex hormones and the liver. *Clin Sci (Lond)* 1984; 66:369-376.
66. Jönsson U, Malmqvist M. Real time biospecific interaction analysis. The integration of surface plasmon resonance detection, general biospecific interface chemistry and microfluidics into one analytical system. *Adv Biosens* 1992; 2:291-336.
67. Joseph DR. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids* 1997; 62:578-588.
68. Joseph DR. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm* 1994; 49:197-280.

69. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol* 2002; 175:113-120.
70. Karagiannis A, Harsoulis F. Gonadal dysfunction in systemic diseases. *Eur J Endocrinol* 2005; 152:501-513.
71. Kaulhausen H, Rohner HG, Siedek M, Lafosse M, Breuer H. Bindungskapazität von sexualhormon- und corticosteroidbindendem Globulin im Serum bei Männern mit Lebercirrhose. *J Clin Chem Clin Biochem* 1980; 18:137-143.
72. Kaymakoglu S, Ökten A, Cakaloglu Y, Boztas G, Besisik F, Tascioglu C, Yalcin S. Hypogonadism is not related to the etiology of liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 1995; 30:745-750.
73. Khan MS, Ehrlich P, Birken S, Rosner W. Size isomers of testosterone-estradiol-binding globulin exist in the plasma of individual men and women. *Steroids* 1985; 45:463-472.
74. Kley HK, Nieschlag E, Wiegelmann W, Solbach HG, Kruskemper HL. Steroid hormones and their binding in plasma of male patients with fatty liver, chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1975; 79:275-285.
75. Kley HK, Teschke R. Alkohol und Fertilität: Sexualhormone. *Z Hautkr* 1985; 60:1017-1025.
76. Kuper H, Mantzoros C, Lagiou P, Tzonou A, Tamimi R, Mucci L, Benetou V, Spanos E, Stuver SO, Trichopoulos D. Estrogens, testosterone and sex hormone binding globulin in relation to liver cancer in men. *Oncology* 2001; 60:355-360.
77. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyssönen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:601-608.
78. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
79. Lapidus L, Lindstedt G, Lundberg PA, Bengtsson C, Gredmark T. Concentrations of sex-hormone binding globulin and corticosteroid binding globulin in serum in relation to cardiovascular risk factors and to 12-year incidence of cardiovascular disease and overall mortality in postmenopausal women. *Clin Chem* 1986; 32:146-152.
80. Leifke E, Gorenai V, Wichers C, von zur Mühlen A, von Büren E, Brabant G. Age-related changes of serum sex hormones, insulin-like growth factor-1 and sex-hormone binding globulin levels in men: cross-sectional data from a healthy male cohort. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000; 53:689-695.
81. Leowattana W. DHEAS as a new diagnostic tool. *Clin Chim Acta* 2004; 341:1-15.
82. Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2003.
83. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB, Araujo AB. Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:293-296.

84. Longcope C, Pratt JH, Schneider S, Fineberg E. Estrogen and androgen dynamics in liver disease. *J Endocrinol Invest* 1984; 7:629-634.
85. Luppá P, Munker R, Nagel D, Weber M, Engelhardt D. Serum androgens in intensive-care patients: correlations with clinical findings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1991; 34:305-310.
86. Luppá P, Oettrich K, Schwab I, Langmandel U, Neumeier D. Immunocytochemical localization of the sex hormone-binding globulin in a human hepatoma cell line. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989; 121:791-796.
87. Luppá PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta* 2001; 314:1-26.
88. Lutz RA, Marki HH, Weder HG. Die Androgenbindung im menschlichen Plasma und ihre physiologische Bedeutung. *J Clin Chem Clin Biochem* 1977; 15:57-67.
89. Madersbacher S, Ludvik G, Stulnig T, Grünberger T, Maier U. The impact of liver transplantation on endocrine status in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44:461-466.
90. Maruyama Y, Adachi Y, Aoki N, Suzuki Y, Shinohara H, Yamamoto T. Mechanism of feminization in male patients with non-alcoholic liver cirrhosis: role of sex hormone-binding globulin. *Gastroenterol Jpn* 1991; 26:435-439.
91. Metzger J, Schnitzbauer A, Meyer M, Soder M, Cuilleron CY, Hauptmann H, Huber E, Luppá PB. Binding analysis of 1α - and 17α -dihydrotestosterone derivatives to homodimeric sex hormone-binding globulin. *Biochemistry* 2003; 42:13735-13745.
92. Nakhla AM, Khan MS, Rosner W. Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71:398-404.
93. Nakhla AM, Leonard J, Hryb DJ, Rosner W. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* 1999; 64:213-216.
94. Namkung PC, Kumar S, Walsh KA, Petra PH. Identification of lysine 134 in the steroid-binding site of the sex steroid-binding protein of human plasma. *J Biol Chem* 1990; 265:18345-18350.
95. Nolte W, Schindler CG, Figulla HR, Wuttke W, Hüfner M, Hartmann H, Ramadori G. Increase of serum estradiol in cirrhotic men treated by transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt. *J Hepatol* 2001; 34:818-824.
96. Pardridge WM. Selective delivery of sex steroid hormones to tissues in vivo by albumin and by sex hormone-binding globulin. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 538:173-192.
97. Parker LN, Levin ER, Lifrak ET. Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:947-952.
98. Peiris AN, Stagner JJ, Plymate SR, Vogel RL, Heck M, Samols E. Relationship of insulin secretory pulses to sex hormone-binding globulin in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:279-282.

99. Petra PH, Stanczyk FZ, Namkung PC, Fritz MA, Novy MJ. Direct effect of sex steroid-binding protein (SBP) of plasma on the metabolic clearance rate of testosterone in the rhesus macaque. *J Steroid Biochem* 1985; 22:739-746.
100. Petra PH. The plasma sex steroid binding protein (SBP or SHBG). A critical review of recent developments on the structure, molecular biology and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40:735-753.
101. Plymate SR, Namkung PC, Metej LA, Petra PH. Direct effect of plasma sex hormone binding globulin (SHBG) on the metabolic clearance rate of 17β -estradiol in the primate. *J Steroid Biochem* 1990; 36:311-317.
102. Power SGA, Bocchinfuso WP, Pallesen M, Warmels-Rodenhiser S, Van Baelen H, Hammond GL. Molecular analyses of a human sex hormone-binding globulin variant: evidence for an additional carbohydrate chain. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:1066-1070.
103. Preuss R. Leberzirrhose. In: Braun J, Renz-Polster H (Hrsg.). *Basislehrbuch Innere Medizin, kompakt - greifbar - verständlich*. 2. Auflage. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2001:641-645.
104. Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. *Horm Res* 1996; 45:148-155.
105. Pugeat M, Garrel D, Estour B, Lejeune H, Kurzer MS, Tourniaire J, Forest MG. Sex steroid-binding protein in nonendocrine diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 538:235-247.
106. Ramadori G, Nolte W, Sauerbruch T. Leberzirrhose. In: Berdel WE, Böhm M, Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W (Hrsg.). *Innere Medizin*. 5. Auflage. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2004:1296-1302.
107. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzylxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:3116-3120.
108. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20:697-720.
109. Selby C. Sex hormone binding globulin: origin, function and clinical significance. *Ann Clin Biochem* 1990; 27:532-541.
110. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98:503-517.
111. Strel'chyonok OA, Avvakumov GV, Survilo LI. A recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1984; 802:459-466.
112. Strel'chyonok OA, Avvakumov GV. Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function. *J Steroid Biochem* 1990; 35:519-534.

113. Tadic SD, Elm MS, Subbotin VM, Eagon PK. Hypogonadism precedes liver feminization in chronic alcohol-fed male rats. *Hepatology* 2000; 31:1135-1140.
114. Tanaka K, Sakai H, Hashizume M, Hirohata T. Serum testosterone:estradiol ratio and the development of hepatocellular carcinoma among male cirrhotic patients. *Cancer Res* 2000; 60:5106-5110.
115. Tchernof A, Després JP. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000; 32:526-536.
116. Terasaki T, Nowlin DM, Pardridge WM. Differential binding of testosterone and estradiol to isoforms of sex hormone-binding globulin: selective alteration of estradiol binding in cirrhosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:639-643.
117. Tilbrook AJ, Clarke IJ. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. *Biol Reprod* 2001; 64:735-742.
118. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4354.
119. Valladares L, Erices A, Lioi X, Iturriaga H. Characterization of the oligosaccharides of plasma sex hormone binding globulin from noncirrhotic alcoholic patients. *Steroids* 2000; 65:275-280.
120. Van Baelen H, Convents R, Cailleau J, Heyns W. Genetic variation of human sex hormone-binding globulin: evidence for a worldwide bi-allelic gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:135-139.
121. Van Thiel DH, Gavalier JS, Slone FL, Cobb CF, Smith WI, Jr., Bron KM, Lester R. Is feminization in alcoholic men due in part to portal hypertension: a rat model. *Gastroenterology* 1980; 78:81-91.
122. Van Thiel DH, Gavalier JS, Spero JA, Egler KM, Wright C, Sanghvi AT, Hasiba U, Lewis JH. Patterns of hypothalamic-pituitary-gonadal dysfunction in men with liver disease due to differing etiologies. *Hepatology* 1981; 1:39-46.
123. Vermeulen A, Verdonck L, van-der-Straeten M, Orié N. Capacity of the testosterone binding globulin in human plasma and influence of specific binding of testosterone on its metabolic clearance rate. *J Clin Endocrinol* 1969; 29:1470-1480.
124. Vigersky RA, Kono S, Sauer M, Lipsett MB, Loriaux DL. Relative binding of testosterone and estradiol to testosterone-estradiol-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49:899-904.
125. Walsh KA, Titani K, Takio K, Kumar S, Hayes R, Petra PH. Amino acid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. *Biochemistry* 1986; 25:7584-7590.

126. Wang YJ, Wu JC, Lee SD, Tsai YT, Lo KJ. Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in postnecrotic cirrhotic men: a matched study with alcoholic cirrhotic men. *Hepatology* 1991; 38:531-534.
127. Westphal U. VII. Sex steroid-binding protein (SBP). In: Westphal U, ed. *Steroid-protein interactions II (Monographs on endocrinology)*. Vol. 27. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag, 1986:198-264.
128. Wu F, Ames R, Evans MC, France JT, Reid IR. Determinants of sex hormone-binding globulin in normal postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54:81-87.