

**Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität
München [Klinikum rechts der Isar]**
(Dirketor: Univ.-Prof. Dr. med. D. Neumeier)

**Ligandbindungsstudien des humanen Steroidhormon-bindenden
Globulins in einem Biosensorsystem**

Andreas Schnitzbauer

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

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

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. P.B. Lippa
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Wagner, Ph.D. (Melbourne)

Die Dissertation wurde am 03.08.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 02.02.2005 angenommen.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht unter:

1. Schnitzbauer, A.A., Luppa, P.B. Biosensor-Analyse der Bindung von Androgenen an das Steroidhormon-bindende Globulin. *Bioforum*, **10**, 718-720 (2001).
2. Metzger, J., Schnitzbauer, A., Meyer, M., Söder, M., Cuilleron, C.Y., Hauptmann, H., Huber, E., Luppa, P.B. Binding analysis of 1alpha- and 17alpha-dihydrotestosterone derivatives to homodimeric sex hormone-binding globulin. *Biochemistry* **42**, 13735-45 (2003).
3. Hauptmann, H., Metzger, J., Schnitzbauer, A., Cuilleron, C.Y., Mappus, E., Luppa, P.B. Syntheses and ligand-binding studies of 1 alpha- and 17 alpha-aminoalkyl dihydrotestosterone derivatives to human sex hormone-binding globulin. *Steroids* **68**, 629-39 (2003).

Für meine Eltern Marianne und Reinhard Schnitzbauer

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	S. 1-3
2. Allgemeiner Teil – Einleitung	S. 4-16
2.1. hSHBG – Steroid Hormone-Binding Globulin	S. 4-10
2.1.1. Funktion und Bedeutung im menschlichen Körper	S. 4-5
2.1.2. Struktur und Proteinchemie	S. 5-10
2.1.2.1. Primärstruktur	S. 5-6
2.1.2.2. Säure- und Oligosaccharidreste	S. 6
2.1.2.3. Mikroheterogenität des hSHBG-Moleküls	S. 6-7
2.1.2.4. Steroid-Bindungsdomäne	S. 7
2.1.2.5. Carboxy- (C-) und Amino- (N-) terminale Region	S. 7
2.1.2.6. Weitere funktionelle Domänen	S. 8
2.1.2.7. Dimerisierung des hSHBG-Moleküls	S. 8-9
2.1.2.8. Räumliche Struktur	S. 9
2.1.2.9. hSHBG-bindender Membranrezeptor	S. 9-10
2.2. hSHBG und seine physiologischen Liganden	S. 10-13
2.2.1. Steroidhormone	S. 10-11
2.2.1.1. Hauptklassen und Herkunft	S. 10
2.2.1.2. Synthese der Androgene und Estrogene aus Pregnenolon	S. 11
2.2.2. Sterische Anforderungen an Steroide zur Bindung an hSHBG	S. 11
2.2.3. Spezifische Liganden von hSHBG	S. 12
2.2.3.1. Androgene: Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron	S. 12
2.2.3.2. Estrogene - 17 β -Estradiol	S. 12
2.2.4. Bindungsmodelle der Steroide an SHBG	S. 13
2.2.4.1. Bindung von 1 mol Steroid pro mol SHBG-Dimer: Sandwich-Modell	S. 13
2.2.4.2. Bindung von 1 mol Steroid pro mol SHBG-Monomer	S. 13
2.3. Bestimmung und Messung von hSHBG im Serum	S. 13-16
2.3.1. Stabilität des Proteins	S. 14
2.3.2. Immunradiometrischer Assay für hSHBG	S. 14-15

2.3.3. Diagnostische Anwendungsbeispiele für die hSHBG-Serumbestimmung	S. 15-16
3. Themenstellung der vorliegenden Dissertation	S. 17
4. Spezieller Teil – Methodik und Experimente	S. 18-36
4.1. Verdrängungsassay zur Bestimmung der relativen Affinitäten von Androgenen zu hSHBG	S. 18-26
4.1.1. Materialien	S. 18
4.1.2. Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten hSHBG	S. 19
4.1.3. Versuchsaufbau und Durchführung	S. 19-22
4.1.4. Standardkurve für die Bindung von Testosteron an hSHBG	S. 22-23
4.1.5. Scatchard-Plot zur Bestimmung des K_a -Werts von Testosteron	S. 23-24
4.1.6. Bindungsvermögen von 5α -Dihydrotestosteronderivaten an hSHBG	S. 24-26
4.2. Grundlagen der Biosensorik	S. 26-36
4.2.1. Einführung	S. 27
4.2.2. Optische Biosensoren am Beispiel der Surface Plasmon Resonance: SPR (Oberflächenplasmonresonanz)	S. 27-30
4.2.3. Materialien	S. 30-31
4.2.4. Beladung der Chipoberfläche mit Steroidliganden	S. 31-36
4.2.5. Durchführung der Messungen	S. 36
5. Ergebnisse	S. 37-48
5.1. Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten hSHBG	S. 37-38
5.2. Gleichgewichtsanalysen	S. 40-43
5.2.1. Auswertung der Wettbewerbsversuche	S. 39
5.2.2. Scatchard-Plot für Testosteron	S. 40-41
5.2.3. Ergebnisse der Gleichgewichtsanalysen	S. 42-43
5.3. Auswertung der Biosensor-Messungen	S. 43-48
5.3.1. Datenprozessierung und Sensorgramm	S. 43-45
5.3.2. Bindungskurven der Amino-Dihydrotestosteron-Derivate	S. 46-48
5.3.2.1. 17α -DHT- C_3 -NH ₂	S. 46
5.3.2.2. 17α -DHT- C_6 -NH ₂	S. 46-47

5.3.2.3. 1α -DHT- C_6 -NH ₂	S. 47-48
5.3.3. Thermodynamische Auswertung	S. 48
6. Diskussion	S. 49-56
6.1. Strukturvergleich der Steroidhormonderivate mit Testosteron und DHT	S. 49-50
6.2. Assoziationskonstante (K_a - Wert) von Testosteron	S. 50
6.3. RBA-Werte unter Gleichgewichtsbedingungen	S. 51
6.4. Warum das „Bivalent-Analyte“ - Modell?	S. 51-55
6.5. Thermodynamischen Bindungswerte, erhalten im Biosensorsystem	S. 56
7. Zusammenfassung	S. 57-58
8. Abkürzungen	S. 59-60
9. Danksagung	S. 61
10. Literaturverzeichnis	S. 62-78

1. Einführung

Im Jahre 1965 wurde das humane Steroidhormon-bindende Globulin (hSHBG) von Mercier [127 (S. 212)] entdeckt, doch gelang es erst ein Jahrzehnt später reines hSHBG aus dem menschlichen Serum mittels einer Affinitätschromatographischen Methode aufzureinigen [85 (S. 815), 120 (S. 58), 127 (S. 212), 157 (S. 735), 184 (S. 703)].

1978 erkannte Petra, dass es sich dabei um ein dimeres Protein handelt, dessen mittleres Molekulargewicht 95 kD beträgt [78 (S. 544), 84 (S. 71), 85 (S. 818), 157 (S. 736)]. Dunn et al. untersuchten Anfang der 80er Jahre die steroidal Bindungspartner des hSHBG und deren sterische Eigenschaften zur Bindung an hSHBG. Dazu entwickelten sie einen Verdrängungsassay, der die Bestimmung der relativen Bindungsaffinität (RBA) und der Assoziationskonstanten (K_a -Werte) von hSHBG zu unterschiedlichen Steroidhormonen erlaubte [48 (S. 58-68)].

Aus einer Gruppe von 21 endogenen steroidal Hormonen und 70 Medikamenten gehören 5α -Dihydrotestosteron, Testosteron und 17β -Estradiol, sogenannte 17β -Hydroxyandrostano- und 17β -Hydroxyestranderivate mit polarer Gruppe in Ring A, zu den stärksten Bindungspartnern des hSHBG's [48 (S. 60), 78 (S. 545), 84 (S. 71f.), 120 (S. 58), 157 (S. 741), 168 (S. 71), 195 (S. 456)].

Ab Mitte der 80er Jahre war es möglich hSHBG als Analyt mittels eines IRMA (Immunoradiometrischer Assay) im Serum zu bestimmen und seine Konzentration zu messen [81 (S. 603ff)]. Dadurch hielt die hSHBG-Messung Einzug in das klinisch-chemische Labor und kann als Parameter bei Erkrankungen wie Hirsutismus, Gynäkomastie, Hyperthyreose, hormonabhängigen Tumoren, wie Prostata- und Mamma-Carcinom und Diabetes mellitus u.v.a. wertvolle Zusatzinformationen zu Genese und Verlauf dieser Erkrankungen liefern [3 (S. 69), 120 (S. 62f)].

Zur gleichen Zeit wurde durch direkte Sequenzierung und durch Klonen der cDNA die Primärstruktur aufgeklärt [65 (S. 132), 80 (S. 102), 172 (S. 405), 180 (S. 703), 220 (S. 7548)]. Zunächst entdeckte man für Glykoproteine typische Kohlenhydratseitenketten, nämlich zwei N-verknüpfte biantennäre Oligosaccharide und eine O-verknüpfte Kohlenhydratseitenkette an einem monomeren hSHBG aus ca. 400 Aminosäureresten [84 (S. 71), 85 (S. 822), 157 (S. 737), 202 (S. 519)]. Neben zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten Cys164 und Cys188 sowie Cys333 und Cys361, die in der Sekundärstruktur eine Schlinge bilden [11 (S. 345),

78 (S. 544), 84 (S. 72)], mindestens zwei Bindungsstellen für zweiwertige Kationen, bedeutsam für Integrität des Proteins und Dimerisierung [7 (S. 25920), 21 (S. 10622), 87 (S. 300)], wurde zudem eine Steroidbindungsdomäne um den Aminosäurerest an Position 139 (Met139) von Hammond beschrieben [78 (S. 543)], welche eine niedrig dielektrische Höhlung darstellt, die mit einer Hydroxylgruppe am C₃-Atom des Steroids interagiert [150 (S. 2686), 157 (S. 741), 186 (S. 240)].

Die Frage, wie viele Steroidmoleküle an einem hSHBG-Dimer binden, war zu dieser Zeit noch umstritten. Petra postuliert, dass ein Steroid in einer Bindungstasche pro hSHBG-Dimer gebunden wird [87 (S. 299), 155 (S. 699), 156(S. 191), 157 (S. 740)].

In einem anderen Modell von Petra geht man vom gleichen Bindungsverhältnis aus, postuliert jedoch, dass die Bindung eines Steroids an einer Untereinheit hSHBG eine Konformationsänderung bewirkt und die Steroidbindungsstelle so vor weiterer Bindung durch andere Steroide schützt [154 (S. 10), 157 (S. 740)].

Das neueste Modell von Grishkovskaya aus dem Jahre 2000 zeigt, dass jedes Monomere fähig ist, ein Steroid in einer spezifischen Bindungstasche zu binden [6 (S. 34454), 72 (S. 621), 73 (S. 32086)].

Eine neue Methode zur spezifischen Untersuchung dieser Interaktionen zwischen Steroid und hSHBG stellt die Surface Plasmon Resonance (Oberflächenplasmonresonanz/SPR) dar, eine biosensorische Nachweismethode, die ein biologisches Element enthält. Man unterscheidet je nach Transducer optische, chemische, mechanische und elektrische Biosensoren [24 (S. 1), 115 (S. 1)].

Bei einem Immunosensor ist das biologische Element beispielsweise ein Antikörper, der auf einer Festphase immobilisiert ist. Die reversible biospezifischen Interaktionen des Antigens mit einem Antikörper verändert die optischen Eigenschaften des Mediums, so dass durch eingestrahktes Licht ein Signal ausgelöst wird, welches mittels eines Transducers (Signalwandlers) dargestellt werden kann [24 (S. 1), 115 (S. 5)].

Die Vorteile moderner Biosensor-Systeme liegen im Einsatz von markierungsfreien Reaktanden und einem kontinuierlichen Flusssystem zur Detektion in Echtzeit [19 (2.1.), 24 (S. 7), 115 (S. 17), 123 (S. 335), 190 (S. 1230)]. Durch diese Echtzeitanalyse in Form des Signalverlaufs in relativen Units (RU) im Verhältnis zur Zeit, erhält man ein Vielfaches an Informationen über kinetische Wechselwirkungen der Analyten, als beispielsweise ein Radioimmunoassay im Gleichgewichtszustand

liefern kann [115 (S. 18)]. Damit dient die biosensorische Nachweismethode der Oberflächenplasmonresonanz als hervorragende analytische Technik zur genaueren Beschreibung der Wechselwirkung des hSHBG und seinen steroidalern Bindungspartnern im Serum.

2. Allgemeiner Teil – Einleitung

2.1. hSHBG – Steroid Hormone-Binding Globulin

2.1.1. Funktion und Bedeutung im menschlichen Körper

hSHBG (human sex hormone-binding globulin oder Sexualhormon-bindendes Globulin) ist das Produkt eines singulären Gens auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 und wird hauptsächlich in den Hepatozyten synthetisiert [16 (S. 65), 78 (S. 543), 95 (S. 1356), 98 (S. 4166)]. Androgene, Insulin und Prolaktin hemmen die Expression, Estrogene und Schilddrüsenhormone fördern diese [180 (S. 706), 181 (S. 83)]. Ein kleiner Anteil wird außerdem in den Sertoli-Zellen des männlichen Geschlechtstraktes, sowie dem zentralen Nervensystem (ZNS) synthetisiert [82 (S. 577f), 87 (S. 301), 99 (S. 771)].

Im humanen Serum bindet hSHBG als typisches Beta-(β)-Globulin ca. 70-80% der verschiedenen im Blut zirkulierenden Sexualhormone mit hoher Affinität und Spezifität, jedoch mit einer im Vergleich zum Albumin geringeren Bindungskapazität [87 (S. 298), 120 (S. 58)].

Die hohe Affinität und Spezifität gilt vor allem für hydroxylierte Steroide mit planarem A/B-Ring, wie beispielsweise die 17β -hydroxylierten Androgene 5α -Dihydrotestosteron (DHT), dem stärksten Bindungspartner in vivo und Testosteron (T) der einen etwas weniger affinen Bindungspartner darstellt. Des Weiteren werden weibliche Geschlechtshormone, wie 17β -Estradiol, von hSHBG gebunden, jedoch mit geringerer Affinität im Vergleich zu den 17β -hydroxylierten Androgenen [48 (S. 59), 168 (S. 70)].

hSHBG übt in der Zirkulation eine Pufferwirkung für die gebundenen Steroid-Hormone aus. Durch die Bindung an hSHBG können Sexualhormone an ihren Zielzellen und Zielgeweben nicht wirksam werden [84 (S. 65), 157 (S. 745), 168 (S. 73)]. Denn nur Protein-ungebundene Formen der Sexualhormone besitzen biophysiological Aktivität und können als Transkriptionsfaktoren wirksam werden [182 (S. 815)].

Die Bedeutung der Bindung von Steroiden an hSHBG liegt generell in einer Aufrechterhaltung des steady-states der Konzentration an Sexualhormonen im

Plasma. hSHBG dient als Regulator der freien Steroidkonzentrationen im Plasma und gibt nach Bedarf Steroide ab oder bindet diese.

hSHBG modifiziert und vermittelt auch die Wirkung von Sexualhormonen, in dem es beim Transport von Sexualhormonen durch Membranen in Wechselwirkung mit einem spezifischen hSHBG-Membranrezeptor tritt. Der Hormoninflux in die Zelle ist dabei sowohl sensitiv für die Konzentration an Sexualhormon-hSHBG-Komplex-Konzentration, als auch für die Änderung der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche [157 (S. 745f)].

2.1.2. Struktur und Proteinchemie

2.1.2.1. Primärstruktur

hSHBG liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 95000 Dalton (D) vor [78 (S. 544), 84 (S. 71), 85 (S. 818), 157 (S. 736)]. Es besteht aus zwei unterschiedlich großen Untereinheiten (UE) zu 52 kD (schwere UE) und 48 kD (leichte UE), die in einem Verhältnis von ca. 10 (schwere UE) zu 1 (leichte UE) vorliegen. In manchen Individuen findet man zusätzlich eine dritte Untereinheit mit einem Massengewicht von 56 kD, ungefähr in gleicher Menge wie die schwere UE [85 (S. 822), 202 (S. 521)]. Bei Denaturierung des Proteins erhält man nur eine einzige Polypeptidkette, was ein Beweis dafür ist, dass hSHBG nur von einem Gen kodiert wird [84 (S. 71), 85 (S. 817)].

Eine Untereinheit eines hSHBG-Moleküls setzt sich aus 402 Aminosäuren zusammen, wobei die Aminosäurereste 1-29 ein hydrophobes Signalpolypeptid bilden, welches auf Grund limitierter Proteolyse durch Serumproteasen variabel sein kann, also ein heterogenes N-terminales Ende darstellt.

Die darauffolgenden 373 Aminosäuren werden an den Cysteinresten Cys164 und Cys188, sowie Cys333 und Cys361 über jeweils eine Disulfidbrücke miteinander verbunden, die in der Sekundärstruktur als zwei Schlingen imponieren [11 (S. 345), 78 (S. 544), 84 (S. 72)].

Dazu besitzt eine monomere Untereinheit einen Kohlenhydratanteil von 18-23%, der größtenteils aus Säureresten besteht und zudem aus 3 Oligosacchariden, von denen zwei über N-Brücken an den Aminosäureresten Asparagin (Asn351) und (Asn367)

und eine über eine O-Brücke am Aminosäurerest Threonin (Thr6) angeknüpft sind [82 (S. 822), 86 (S. 71), 157 (S. 737), 202 (S. 519)].

2.1.2.2. Säure- und Oligosaccharidreste

Die Oligosaccharide werden über N-Acetylactosaminreste an Aminosäurereste angelagert: die beiden N-verknüpften Oligosaccharidketten mit biantennärer Struktur an Asparaginreste (Asn351, Asn367), die singuläre biantennäre O-verknüpfte Oligosaccharidkette an einen Threoninrest (Thr6) [84 (S. 71), 85 (S. 822), 157 (S. 737), 202 (S. 519)].

N-verknüpfte Oligosaccharide werden ausschließlich C-terminal gefunden. Deshalb vermutet man, dass es sich dabei um strukturelle Determinanten handelt, die für die Wiedererkennung von hSHBG durch seinen Membranrezeptor von Bedeutung sind [87 (S. 300)]. Die Anzahl der N-verknüpften Oligosaccharide hat außerdem Einfluss auf die Halbwertszeit von hSHBG, im Sinne einer positiven Korrelation der Anzahl der Ketten mit der Länge der Halbwertszeit (HWZ), d.h. je mehr N-verknüpfte Ketten vorhanden sind, desto länger ist die HWZ von hSHBG [40 (S. 115)].

Eine zusätzliche Stelle zur N-Glykosylierung findet man in der dritten 56 kD schweren UE, die auf einem genetischen Polymorphismus beruht, bei welchem die Aminosäure Asparagin an Stelle 327 durch Aspartat ersetzt wird [78 (S. 544)].

Alle Kohlenhydratketten stellen sterische Komponenten dar, die zur Dimerisierung der hSHBG-Monomere beitragen, die räumliche Struktur stabilisieren und mit den Plasmamembranen der Sexualhormon-kontrollierten Zellen in Wechselwirkung treten und die Bindung und Signalwirkung des hSHBG an seinen hSHBG-Bindungsrezeptor unterstützen [87 (S. 300)].

2.1.2.3. Mikroheterogenität des hSHBG-Moleküls

Hypothetisch handelt es sich bei hSHBG um ein Homodimer. Da in einer SDS-Page drei Banden mit sehr ähnlichen Molekulargewichten auftreten, spricht man von einer Mikroheterogenität von hSHBG [85 (S. 822), 202 (S. 521)].

Erklärbar ist die Mikroheterogenität des Ein-Gen Produktes hSHBG durch die Veränderungen, die während seiner Aufreinigung und Lagerung auftreten. Dadurch variiert der Kohlenhydratgehalt sowie die Anzahl der Säurereste. Eine limitierte

Proteolyse durch Serumproteasen verändert in vivo die Aminosäuresequenz am N-terminalen Ende der Polypeptidkette [85 (S. 822), 157 (S. 739)]. Genetische Variationen tragen ebenfalls zu veränderten Molekülstrukturen bei, aus welchen funktionsfähige isomere Formen entstehen [156 (S. 199)].

2.1.2.4. Steroid-Bindungsdomäne

Bei der Steroid-Bindungsstelle handelt es sich um eine hydrophobe Höhlung mit (1+x) Protonenakzeptoren, die mit der Hydroxylgruppe am C3-Atom des Steroidgerüsts von Equilenin interagiert, welche in der Region um die Aminosäure Methionin an der Stelle 139 (Met139) von hSHBG liegt. Diese Region ist weiterhin für die Dimerisierung von hSHBG von Bedeutung [150 (S. 2686), 157 (S. 741), 186 (S. 240)]. Dabei üben N-terminal von Met139 gelegene Aminosäuren, vermutlich von Lys134 bis Stelle Phe148, bereits C-terminal von Met139 gelegen, Einfluss auf die Bindungsspezifität an das Glykoprotein aus [69 (S. 7609), 78 (S. 543)]. Met139 beeinflusst die Interaktion mit dem B-Ring des Steroids, die Stellen 134-139 treten sowohl mit dem A-, als auch dem B-Ring des Steroidgerüsts in Wechselwirkung. Die Aminosäuresequenz 139-148, ein C-terminal von Met139 gelegener Anteil an der Bindungsdomäne, interagiert mit dem bindenden Steroiden und beeinflusst gleichzeitig die Formation der Bindungsstelle [79 (S. 199)]. Funktionelle Beteiligung hat außerdem die Aminosäuresequenz 248-291, sowie die Sequenz von Position 296 bis zu 35 hydrophoben Aminosäureresten am C-terminalen Ende der Polypeptidkette, die über Ausbildung von Faltblattstrukturen in enger räumlicher Beziehung zur Region um Met139 stehen [157 (S. 738)].

2.1.2.5. Carboxy- (C-) und Amino- (N-) terminale Region

Die Region um Met139 teilt hSHBG in zwei funktionelle Bereiche. N-terminal von Met139 gelegene Strukturen bilden die Steroid-Bindungsdomäne. C-terminal davon befinden sich Komponenten, welche die strukturelle Stabilität des Gesamtproteins und der Steroid-Bindungsdomäne gewährleisten, die HWZ determinieren und die Zelloberflächenerkennung von hSHBG durch seinen Membranrezeptor garantieren [78 (S. 543)].

2.1.2.6. Weitere funktionelle Domänen

Im hSHBG-Molekül findet man zwei „ProteinS-like“-Domänen. Eine in Nähe der Cysteinreste, zwischen welchen sich die Disulfidbrücken von hSHBG ausbilden, die Zweite zwischen den Aminosäureresten 48-57, einen Teil einer Domäne, die an der Bindung von hSHBG an seinem Membranrezeptor beteiligt ist [87 (S. 298)].

Zusätzlich existieren vier Metallbindungsstellen für zweiwertige Kationen, alle in enger struktureller Beziehung zur Steroidbindungsdomäne um Met139 stehend: eine Calciumbindungsstelle (Ca^{2+} -binding-site) liegt im C-terminalen Bereich und gewährleistet die strukturelle Integrität von hSHBG. Die restlichen drei liegen im N-terminalen Bereich. Die N-terminale Site I ist eine weitere Ca^{2+} -binding Site, wohingegen Site II und III Zinkbindungsstellen (Zn^{2+} -binding-site) darstellen [7 (S. 25920)].

Site I stabilisiert die Steroidbindungsstelle von hSHBG und verbessert gleichzeitig dessen Dimerisierung. Site II liegt nahe der Steroidbindungsdomäne. Das Zn^{2+} -Ion wird von den Seitenketten an His83, His136 und der Carboxylatgruppe an Asp65 koordiniert. Das zweiwertige Kation verändert die Konformation der Histidinreste, sowie einer zusätzlichen „ungeordneten“ Region der Steroidbinungsstelle und verhindert gleichzeitig die Interaktion von Asparagin mit der 17β -OH-Gruppe bindender Steroide. Das in Site III gelegene zweiwertige Kation vergrößert den Abstand zwischen den Seitenketten am His101 und der Carboxylatgruppe am Asp 117.

Die Veränderungen an Site II und III führen zu einer Verminderung der Affinität von Estrogen zu hSHBG, wobei die Abspaltung des Steroids, sowie die Bindung von Androgenen nicht beeinflusst wird [7 (S. 25920)].

2.1.2.7. Dimerisierung des hSHBG-Moleküls

Für die Dimerisierung der beiden Monomere spielen die Aminosäurereste 138-142 - auf dem C-Terminus gelegen - eine entscheidende Rolle. Sie bilden das Dimerisierungsinterface, das die beiden Untereinheiten in exakte und korrekte räumliche Beziehung zueinander bringt und so ihre starke Assoziation garantiert. Eine ähnliche Rolle spielt die Sequenz sich abwechselnder Leucinreste von Position 267-281, die ebenfalls ein Dimerisierungsinterface darstellt [78 (S. 543)].

Aus der strukturellen Beschaffenheit beider Sequenzen resultiert die Dimerisierungsenergie für die Assoziation von hSHBG-Monomeren. Steroidhormone tragen ebenfalls zu dieser Energie bei, was durch die Beobachtung, dass denaturiertes hSHBG unter Anwesenheit von DHT teilweise renaturiert, bestätigt wird. Die nicht-kovalent assoziierten Dimere werden durch Calciumionen im umgebenden Medium und C-terminal gelegene Kohlenhydratketten strukturell stabilisiert [7 (S. 25920), 78 (S. 543), 157 (S. 735)].

2.1.2.8. Räumliche Struktur

hSHBG besteht zu 15% aus α -helikalen Anteilen, zu 43% aus β -sheet (Haarnadelstruktur) und zu 10-16% aus β -Faltblattstrukturen. Das Dimer weist eine langgezogene, gestreckte Form, ähnlich einem Zylinder, auf, dessen Länge 11 ± 3 nm und Breite 3 ± 1 nm beträgt. Unter dem Rasterelektronenmikroskop erscheint es als kurzer ellipsoider Stab in kompakter Konformation [11 (S. 13)].

2.1.2.9. hSHBG-bindender Membranrezeptor

hSHBG bindet an einen hochspezifischen plasmalemmlen und membranständigen Rezeptor, auf den Plasmamembranen von Hepatozyten, Sertoli-Zellen, Prostatagewebe, Deziduazellen des Endometriums, sowie der Syncytiotrophoblasten der Plazenta [83 (S. 100), 180 (S. 697), 181 (S. 80), 202 (S. 519)]. hSHBG organisiert den Transport der Hormone zu den Geweben im Sinne eines Shuttle-Mechanismus und spielt eine wichtige Rolle als Modulator der Signaltransduktion in den Zellen, und somit der direkten Hormonwirkung auf die Zielgewebe. hSHBG entfaltet seine Wirkung jedoch nur über den Kontakt mit seinem Rezeptor und einem Steroidhormon an der extrazellulären Seite der Plasmamembran, ohne selbst in die Zelle internalisiert zu werden [202 (S. 519)].

Die extrazelluläre Bindung des Glykoproteins als Ligand an den membranständigen Rezeptor erfordert eine Umwandlung in ein intrazelluläres Signal. Für diesen, als Signaltransduktion bezeichneten Vorgang, existieren u.a. Guaninnucleotid-bindende Proteine, die sogenannten G-Proteine, die als molekulare Schalter dienen [184 (S. 481)]. Im Falle des hSHBG hat ein unligantiertes dimeres Molekül an seinen Rezeptor gebunden nur eine geringe Wirkung. Bindet ein Steroidhormon an das

hSHBG-Dimer, nachdem es selbst bereits an seinen Rezeptor angedockt hat, so wird über einen allosterischen Reaktionsmechanismus ein G-Protein aktiviert [184 (S. 481), 185 (S. 513)]. Mit Steroidhormon beladenes hSHBG kann nicht an den hSHBG-Rezeptor binden, da durch das Hormon die Membranbindungsstelle allosterisch verändert wird [157 (S. 735), 184 (S. 481)].

Die G-Proteine kommen dabei in zwei unterschiedlichen Zuständen vor, die sich nur durch das jeweils gebundene Guaninnucleotid unterscheiden. In aktiver Form ist es mit GTP beladen und kann das Adenylatcyclasesystem zu aktivieren. Durch eine GTPase-Aktivität wird GTP zu GDP und das G-Protein in seine inaktive Form überführt. Nach Abspaltung des GDP durch sogenannte Guaninnucleotid-releasing-Proteine (GNRP), kann neues, hochaffines GTP binden und das G-Protein ist regeneriert und reaktiviert. Durch Aktivierung der Adenylatcyclase durch das G-Protein erfolgt eine Aktivitätszunahme der auf der Innenseite der Zellmembran lokalisierten katalytischen Einheit, welche die Reaktion von Adenosintriphosphat (ATP) zu cyclo-AMP (cAMP) katalysiert. cAMP ist ein Vermittler der Wirkung von hSHBG sowie vieler anderer Hormone und wird auch als second messenger bezeichnet. Durch den Anstieg an cAMP an der Innenseite der Zellmembran erfolgt eine Verstärkung der Funktion von Steroidhormonen als Transkriptionsfaktoren [114 (S. 774f.)].

2.2. hSHBG und seine physiologischen Liganden

2.2.1. Steroidhormone

2.2.1.1. Hauptklassen und Herkunft

Alle Steroidhormone leiten sich vom Cholesterin ab. Die fünf Hauptklassen sind die Gestagene, die Glucocorticoide, die Mineralocorticoide, die Androgene und die Estrogene. Von besonderem Interesse sind hier die Androgene und Estrogene, die in der Nebennierenrinde und den Gonaden synthetisiert werden. Androgene bewirken die Ausbildung der sekundären männlichen, Estrogene die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale [114 (S. 837, S. 842), 203 (S. 739)].

2.2.1.2. Synthese der Androgene und Estrogene aus Pregnenolon

Cholesterin, bestehend aus 27 C-Atomen, dient als Ausgangsmolekül zur Synthese steroidaler Hormone. Steroide bestehen aus 21 oder weniger C-Atomen. Der erste Schritt in der Biosynthese der Steroide besteht in der Entfernung eines C-6-Restes aus der Seitenkette, wobei Pregnenolon entsteht. Anschließend werden C-20 und C-22 hydroxyliert, wodurch die Bindung zwischen diesen beiden Atomen gespalten wird. Durch Oxidation der 3-Hydroxylgruppe zur 3-Ketogruppe und Isomerisierung der Δ^5 -Doppelbindung zur Δ^4 -Doppelbindung entsteht Progesteron.

Die Synthese der Androgene und Estrogene beginnt mit der Hydroxylierung von Progesteron an C-17. Durch Abspaltung der Seitenkette aus C-20 und C-21 erhält man Androstendion, durch Reduktion der 17-Ketogruppe des Androstendions, Testosteron. Diese Androgene besitzen 19 C-Atome.

Estrogene entstehen durch Entfernung der C-19-Methylgruppe und anschließender Aromatisierung von Ring A [114 (S. 466)].

2.2.2. Sterische Anforderungen an Steroide zur Bindung an hSHBG

Die Steroidbindungsstelle von hSHBG stellt spezielle sterische und elektrostatische Ansprüche an seine Bindungspartner. Hohe Affinität zu hSHBG haben nur Steroidhormone mit einer Ringstruktur aus 18 bzw. besser 19 C-Atomen mit folgenden strukturellen Eigenschaften: zwischen Ring A und Ring B ist eine planare „Transdecalin“-Ringkonfiguration erforderlich. Zusätzlich müssen die Sexualhormone mit einer hydroxylierten Gruppe in β -Konfiguration am C-Atom 17 im D-Ring ausgestattet sein [84 (S. 65), 120 (S. 57)]. Diese funktionelle Gruppe ist unbedingt erforderlich, um mit hSHBG interagieren zu können. Eine Keton- oder Hydroxylgruppe an C-Atom 3 im A-Ring fördert die Affinität zur Steroidbindungsstelle. Die Hydroxylgruppe kann sowohl α -, als auch β -konfiguriert sein [157 (S. 735)].

2.2.3. Spezifische Liganden von hSHBG

2.2.3.1. Androgene: Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron

Testosteron fördert Wachstum und Differenzierung der männlichen Fortpflanzungsorgane wie Samenleiter, Prostata, Vesikulardrüsen und Penis (androgene Wirkung) während der Embryogenese und nach der Geburt [161 (S. 66)]. Die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale wie Bartwuchs, virile Behaarung, Vergrößerung des Kehlkopfes und Verdickung der Stimmbänder ist ebenfalls androgenabhängig. Weiterhin stimulieren sie die Produktion von Erythropoietin, das Wachstum der Brustmuskulatur, Spermatogenese und fördern Libido und Potenz. Für einen Teil dieser Wirkungen ist die intrazelluläre Umwandlung des Testosteron in DHT durch die 5 α -Reduktase erforderlich [114 (S. 837), 161 (S. 66)].

2.2.3.2. Estrogene - 17 β -Estradiol

Estrogene sind im Vergleich zu den Androgenen weitaus schwächere Bindungspartner von hSHBG [61 (S. 385)]. Sie werden vor allem im Ovar der Frau und zu einem geringen Anteil auch in der Nebennierenrinde gebildet. Zusammen mit den Gestagenen regulieren sie die Gonadotropinsekretion durch die Hypophyse über eine Änderung der Amplitude oder der Häufigkeit der LH-RH-Freisetzung aus dem Hypothalamus. Sie wirken auch direkt auf Hypophysenzellen: 17 β -Estradiol potenziert die Wirkung von LH-RH und bewirkt eine positive Rückkoppelung, d.h. es fördert die Freisetzung von LH-RH und somit dessen Wirkung auf die Hypophyse und damit die Freisetzung von LH, dem wichtigsten Hormon während der ersten Zyklusphase der Frau und hemmt gleichzeitig die Freisetzung von FSH.

Estrogene induzieren die Proliferationsphase des Zyklus und bereiten den Uterus somit auf die anschließende Gestagenwirkung und eine mögliche Schwangerschaft vor. Sie sind für die Ausprägung und Aufrechterhaltung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale, wie Wachstum der Mammae, verantwortlich. Allgemein haben sie Einfluss auf Stoffwechselfparameter, darunter gesteigerte Gewebsdurchblutung, verstärktes Wachstum, Wasserretention, Senkung der Körperkerntemperatur und Veränderung des Serumlipoprotein-Musters (Senkung von LDL und Erhöhung von HDL) [114 (S. 843)].

2.2.4. Bindungsmodelle der Steroide an SHBG

2.2.4.1. Bindung von 1 mol Steroid pro mol SHBG-Dimer: Sandwich-Modell

Hammond und Petra postulierten auf der Grundlage, dass es sich bei hSHBG um ein Homodimer nicht kovalent-gebundener Untereinheiten mit einer Steroidbindungsstelle handelt, die Bindung von einem mol Steroid pro mol dimeres hSHBG. Die Hypothese war, dass sich die beiden ellipsoiden SHBG-Monomere symmetrisch aneinander lagern und eine Schleife oder ein Sandwich bilden, in deren Zentrum die Bindungstasche für Steroide entsteht [109 (S. 373), 157 (S. 735)]. Die Kohlenstoffatome C17 und C1 des Steroids binden an der Steroid-Bindungsstelle, die zwischen den beiden monomeren hSHBG-Molekülen entsteht, so dass die Oberfläche des Steroids nach außen steht [155 (S. 699)].

Ein zweites Modell, das die oben genannte Stöchiometrie von 1:1 berücksichtigte, war das negative Kooperationsmodell: Die Bindung eines Steroids an eine hSHBG-Untereinheit bewirkt eine Konformationsänderung der anderen Untereinheit dahingehend bewirkt, dass kein zweites Steroid mehr an das Protein binden kann [145 (S. 18345), 156 (S. 191), 157 (S. 735)].

2.2.4.2. Bindung von 1 mol Steroid pro mol SHBG-Monomer

Grishkovskaya und Avvakumov zeigten im Jahre 2000 mittels einer kristallographischen Analyse von hSHBG, dass beide Monomere eines homodimeren Komplexes fähig sind, je ein Steroid zu binden. Das bedeutet, dass jedes Monomere hSHBG eine Steroidbindungsstelle besitzt. Es existieren zwei 14-fach gefaltete β -Faltblattstrukturen, die sich über eine gedachte symmetrische Achse mittels Wasserstoffbrücken zu einem Dimer zusammenlagern und in deren entstehender Tasche ein Steroid anbinden kann [6 (S. 34453), 71(S. 504), 72 (S. 621), 73 (S. 32086)].

2.3. Bestimmung und Messung von hSHBG im Serum

Die Bioverfügbarkeit und die natürliche Balance von Testosteron und 17β -Estradiol im Körper wird durch die Liganden-Bindung an hSHBG reguliert. Kommt es zu einer

Störung im Regelkreis der Androgene und Estrogene, d.h. zu extrem hohen oder niedrigen Konzentrationen dieser Geschlechtshormone oder ihres Haupttransportproteins hSHBG, so kommt man durch Messung der freien Steroidkonzentrationen und zusätzlich des hSHBG, der Ursache näher.

So kann z.B. eine extrem niedrige Androgenkonzentration ihre Ursache auch in hohen hSHBG-Konzentrationen haben, d.h. viel hSHBG bindet vermehrt freie Androgene, bei gleichbleibender gesamt-Androgenkonzentration. Auf diese Weise dient die Bestimmung von hSHBG der richtigen Interpretation von freien Androgen- und Estrogenspiegeln [120 (S. 57), 157 (S. 735)].

2.3.1. Stabilität des Proteins

Durch Lagerung von Proben bei 4°C im Kühlschrank ist hSHBG im Serum bis zu 8 Wochen stabil, wohingegen es bei einer Temperatur von 37°C einem rapiden Aktivitätsverlust unterliegt, was vor allem auf der Spaltung und Zerstörung des Glykoproteins durch Serumproteasen beruht. Tiefgefroren ist es über viele Monate stabil und behält nahezu seine volle Immunreaktivität [198 (S. 1253)].

2.3.2. Immunradiometrischer Assay für hSHBG

Der Nachweis erfolgt mittels eines Immunradiometrischen Assays (IRMA), welcher auf den Prinzipien eines nicht-kompetitiven „liquid-phase“-Sandwichassays beruht. Man inkubiert Serumproben mit ¹²⁵I-markierten monoklonalen SHBG-Antikörpern und polyklonalen Kaninchen-anti-SHBG-Antiserum. Gleiches geschieht mit bekannten Kontrollproben und Standards. Nach einstündiger Inkubation gibt man solid-phase Esel anti-Kaninchen IgG-Antiserum zu, zentrifugiert, hebt den Überstand ab und verwirft diesen.

Die zurückgebliebenen SHBG-Moleküle an der Festphase der Analyseröhrchen werden im γ -counter analysiert. Die Menge an gemessener Radioaktivität ist direkt proportional zur SHBG-Konzentration.

Population	hSHBG-Konzentration (nmol/l)
Kinder	
Jungen und Mädchen, 2-4 Jahre	ca. 90
Jungen und Mädchen, 11-14 Jahre	ca. 60
Männer	ca. 35
Frauen (prämenopausal)	ca. 55
Schwangere im 3. Trimeon	ca. 400
Estrogenbehandlung	
bei Frauen	bis auf das 3-fache des Normalwertes erhöht, abhängig von Art und Dosis des verabreichten Estrogens
bei Männern	bis auf das 5-fache des Normalwertes erhöht bei Antiandrogen-behandelten Prostatakarzinompatienten

Tab. 1.: Referenzwerte bei verschiedenen Personengruppen in nmol/l

2.3.3. Diagnostische Anwendungsbeispiele für die hSHBG-Serumbestimmung

Schilddrüse	Hyperthyreote Patienten zeigen einen signifikanten, zur hyperthyreoten Stoffwechsellage positiv korrelierenden Anstieg von hSHBG. Bei einer Überdosierung mit Amiodaron dient hSHBG somit zur Einschätzung des Verlaufes einer Thyreotoxikose [37 (S. 387), 61 (S. 385), 157 (S. 735), 165 (S. 841), 180 (S. 697)].
Hirsutismus	Testosteron (erhöht) und hSHBG (erniedrigt) dienen der Feststellung des Grades einer Hyperandrogenämie. HSHBG dient als Parameter zur Abschätzung der freien Konzentration an Testosteron zum gebundenen bzw. Gesamttestosteron [103 (S. 129), 118 (S. 132), 119 (S. 139)].
Gynäkomastie	Bei betroffenen Patienten können niedrige hSHBG-Serumspiegel in Kombination mit moderatem Hypogonadismus zur Erklärung der Pathogenese der Gynäkomastie beitragen [165 (S. 841)].
Diabetes Mellitus Typ II	Man nimmt an, dass hSHBG ein Marker für Inulinresistenz ist. Je höher der Insulin-Spiegel im Blut, desto niedriger ist hSHBG und desto höher die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines späteren Diabetes Mellitus Typ II [153 (S. 279), 157 (S. 735)].
Adipositas	Körperfettmasse, intraabdominelle Fettgewebsakkumulation, erhöhter BMI (Body Mass Index) und erhöhte Cholesterinspiegel im Blut, spiegeln sich in einer Erniedrigung des Blut-hSHBG-Spiegels und einer Hyperinsulinämie wieder [165 (S. 841), 175 (S.1545), 225 (S. 81)].
Anorexia nervosa	Starke Erhöhung der hSHBG-Spiegel ist eines der Zeichen für eine Anorexie [50 (S. 571)].

Tab. 2: Diagnostische Anwendungsbeispiele zur Serumbestimmung von hSHBG.

3. Themenstellung der vorliegenden Dissertation

In der vorliegenden experimentellen Studie der Wechselwirkung von hSHBG mit seinen Liganden wurden mittels Gleichgewichtsmessungen in Lösung unter Gleichgewichtsbedingungen und mittels Surface Plasmon Resonance-Biosensorik (Oberflächenplasmonresonanz/SPR) verschiedene 1α - und 17α -Amino- 5α -DHT-Derivate untersucht. Das Ziel war es, Androgene zu finden, die als immobilisierte Liganden auf der Chipoberfläche in Wechselwirkung mit hSHBG treten. Mittels kinetischer Daten über Assoziation und Dissoziation von hSHBG sollte eine bessere funktionelle Charakterisierung der Anbindung von Sexualhormonen an hSHBG ermöglicht werden.

Folgende Kriterien waren dabei zu erfüllen:

- Die Androgenderivate müssen den beiden stärksten Bindungspartnern an hSHBG, 5α -DHT und Testosteron, strukturell möglichst ähnlich sein.
- Die Steroidhormone müssen in der Gleichgewichtsreaktion eine starke Anbindung an hSHBG zeigen, um bei Immobilisation auf dem Biosensor-Chip ein ausreichendes Signal bei der Protein-Steroid-Wechselwirkung mit hSHBG auszulösen.
- Die ermittelten Ergebnisse in Lösung und auf der heterogenen Biosensoroberfläche müssen für die unterschiedlichen Androgenderivate vergleichbar sein.

Die Arbeitshypothese lautete:

1α - und 17α -Amino- 5α -DHT-Derivate stellen gute, den physiologischen Bindungspartnern an hSHBG homologe Substanzen dar, die immobilisiert auf der Chipoberfläche, ein auswertbares Signal zur Analyse der kinetischen Wechselwirkung zwischen Steroid und hSHBG liefern.

4. Spezieller Teil – Methodik und Experimente

4.1. Verdrängungsassay zur Bestimmung der relativen Affinitäten von Androgenen zu hSHBG

Das Bindungsvermögen von Androgenen an hSHBG wurde mittels eines Verdrängungsassays unter Gleichgewichtsbedingungen mit radioaktiv markiertem Testosteron (^3H -Testosteron) als Tracer durchgeführt. Dazu wurden die relativen Bindungsaktivitäten (RBA) der Androgene an hSHBG bei 37°C bestimmt, indem man nach Koinkubation des jeweiligen Steroids mit dem kompetitiven ^3H -Testosteron-Tracer das Glykoprotein hSHBG an ConA-Sepharose band und die Radioaktivität des nichtgebundenen Tritium-Testosterons im Überstand mittels eines Szintillations- β -Counters maß [48]. Nicht-markiertes Cortisol diente dabei zur Absättigung des auf dem Gelsediment immobilisierten Cortisol-bindenden Globulin (CBG), um eventuelle Wechselwirkungen mit den Sexualhormonen und daraus resultierenden Analysefehlern für die hSHBG-Bindung zu vermeiden.

4.1.1. Materialien

ConA-Sepharosegel stammte von der Firma Pharmacia Biotech, Amersham, UK und wurde bei $+4^\circ\text{C}$ gelagert. Affinitätschromatographisch gereinigtes hSHBG stammte von Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA und wurde in einer molaren Konzentrationen von $1,1\ \mu\text{mol/l}$ in PBS Puffer ($0,3\% \text{NaN}_3$) bei einem pH von $7,4$ gelöst und bei -20°C gelagert.

Cortisol (11β - 17α - 21 -Trihydroxy- 4 -pregnen- 3 - 20 -dion) und Testosteron (17β -Hydroxy- 4 -androst- 3 -on) stammten von Sigma, Deisenhofen, Deutschland.

Der radioaktive Tracer [$1, 2, 6, 7$ - ^3H]-Testosteron (Molekulargewicht $293\ \text{g/mol}$) wurde bei Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK mit einer spezifischen Aktivität von $3,55\ \text{TBq/mmol}$ bezogen und bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Opti-Fluor-Szintillationslösung stammte von Packard Instruments, Groningen, Niederlande.

Gemessen wurde mit dem β -Counter 1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter der Fa. Wallac, Bromma, Sweden.

4.1.2. Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten hSHBG

Man ermittelte die Konzentration an freiem Testosteron in einer Serumprobe gesunder Männer vor und nach Zugabe von hSHBG mittels eines ^{125}I -markierten freien Testosteron Coat-A-Count[®] RIA von DPC-Biermann, Bad Nauheim, Deutschland. Der β -Count erfolgte mit einem 1277 Gamma master counter von LKB Wallac, Bromma, Schweden. Dabei erwartete man einen sinkenden Testosterongehalt in den Serumproben nach Zugabe von hSHBG.

Außerdem wurde die hSHBG-Konzentrationen in den Serumproben vor und nach Zugabe von 40 μl hSHBG (1,1 mmol/l) zu 180 μl Serumprobe bestimmt, womit eine Endkonzentration von ca. 200 nmol/l an hSHBG pro Serumprobe erreicht wurde. Kontrollen wurden durch Zugabe von 40 μl PBS-Puffer zu 180 μl Serum durchgeführt.

4.1.3. Versuchsaufbau und Durchführung

Den Verdrängungsassay von hSHBG für verschiedene Sexualhormone und deren Derivate wurde analog zu Dunn et al [48 (S. 58ff.)]. Die Experimente wurden bei 22°C und 37°C nach von Grenot et al. nach oberer Vorschrift durchgeführt [69 (S. 7609)].

Assaypuffer bestand aus 1.000 ml isotonischer NaCl-Lösung, 0,24 g NaH_2PO_4 und 1,44 g Na_2HPO_4 und wurde auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Das ConA-Sepharosegel wurde bei Raumtemperatur 1h lang auf dem Rotationsschwenker 30 Minuten durchmischt und 20 ml in Vials gegeben. Dieses wurde zweimal mit jeweils 20 ml Assaypuffer gewaschen.

Affinitätschromatographisch gereinigtes hSHBG der Fa. Fitzgerald wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit Assaypuffer auf eine Konzentration von 100 nmol/l verdünnt (hSHBG-Gebrauchslösung).

2000 μg Cortisol wurden mit 1 ml Ethanol gemischt und mit Assaypuffer um den Faktor 2500 verdünnt, was eine Cortisol-Gebrauchslösung mit einer Konzentration von 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ergab. Im Ansatz erfolgte eine weitere Verdünnung um den Faktor 10, woraus eine Endkonzentration von 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ resultierte, Testosteron wurde von einer Stocklösung zu 10 mmol/l in Ethanol mit Assaypuffer auf Konzentrationen von 50000, 10000, 1000, 750, 500, 250, 100, 50 und 10 nmol/l verdünnt.

	Testosteron MW: 288,43 g/mol
Stocklösung	10 mmol/l = 2,8 mg in 1000 µl Ethanol
V1	10 mmol/l = 10 000 µmol/l = 10 000 000 nmol/l

Tab. 3: Herstellung einer Stocklösung V1 für Testosteron mit $c = 10$ mmol/l.

Konzentration nmol/l	Verdünnung	Assaypuffer µl	Lösung µl
V2: 50000 aus V1	1 : 200	1492,5	7,5
10000 aus V2	1 : 5	1200	300
1000 aus V2	1 : 50	1470	30
100 aus V2	1 : 500	1497	3
50 aus V2	1 : 1000	1498,5	1,5
10 aus V2	1 : 5000	2499,5	0,5

Tab. 4: Verdünnungsreihe für Testosteron ausgehend von einer Lösung mit einer Konzentration von 10 mmol/l (V_1).

Herstellung der Gebrauchslösung des ^3H -Testosteron-Tracers: nach Dunn et al. wurde ein Wert an Total counts (T_0) von 50000 dpm (desintegrations per minute) im β -Counter eingestellt. Dazu verdünnte man die Stocklösung an $[1,2,6,7\text{-}^3\text{H}]$ -Testosteron mit Assaypuffer um den Faktor 1900, was einer molaren Konzentration von 7 nmol/l bei einer spezifischen Aktivität von 77,0 Ci/mmol und einer radioaktiven Konzentration von 1 mCi/ml, entsprach.

	^3H-Testosteron Spezifische Aktivität: 77,0 Ci/mmol Molekulargewicht: 293 g/mol Radioaktive Konzentration: 1 mCi/ml
Total-count-Wert von 50000 dpm	77 Ci/mmol = 77000 mCi/mmol = 1 mCi / 12,987 nmol in 1 ml
Verdünnung	12987 nmol/l / 7 nmol/l = 1855 \Rightarrow Verdünnung von 1 : 1900
Ansatz	2µl ^3H -Testosteron mit 3,8ml Assaypuffer verdünnen

Tab. 5: Herstellung der Tritium-Tracer-Gebrauchslösung für einen T_0 -Wert von 50 000 dpm.

Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur in 5 ml Glasröhrchen angesetzt. Für jede Konzentration des Testosterons (Probenröhrchen) und für T_0 erfolgten Doppelbestimmungen; zusätzlich wurden jeweils 4 Leerwertbestimmungen

durchgeführt. Zuerst wurde in die Proben- und die Leerwertröhrchen jeweils 100 µl der SHBG-Gebrauchslösung und darauf 300 µl des 50%igen ConA-Sepharosegels gegeben, die Lösung gemischt und anschließend für 30 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert.

	T ₀ -Wert µl	Leerwert µl	Proben µl
hSHBG- Gebrauchslösung	-	100	100
50 %-ige Con A Sepharose- Suspension	-	300	300

Tab. 6: Testansatz in 5 ml Glasröhrchen hSHBG-Gebrauchslösung inkubiert mit ConA-Sepharosegel.

Das ConA-Sepharose-Gel interagiert dabei mit Glykoproteinen, die mindestens eine N-verknüpfte Biantennäre oder eine Kohlenhydratkette vom high-mannose-type besitzen [41 (S. 235)]. Dadurch erhielt man eine feste Phase in Form des Gelsediments, mit daran gebundenen Glykoproteinen.

Danach wurden zum Waschen zwei Mal 2 ml Assaypuffer zugegeben, für 5 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dabei wurden Plasmaproteine, wie Albumin, die nicht von ConA-Sepharosegel absorbiert werden, aus dem Ansatz entfernt. 900 µl Assaypuffer wurden in die T₀-Röhrchen, 800 µl in die Leerwertröhrchen, sowie 700 µl in die Probenröhrchen gegeben. In die Probenröhrchen wurden 100 µl der verdünnten Testosteronlösungen gefüllt, dann wurden 100 µl des [1,2,6,7-³H]-Testosteron-Tracers und 100 µl der Cortisolgebrauchslösung in die Proben- und Leerwertröhrchen gegeben, so dass sich in jedem Röhrchen ein Endvolumen von 1000 µl befand.

	T ₀ -Wert µl	Leerwert µl	Proben µl
Assaypuffer	900	800	700
Steroid	-	-	100
³ H-Testosteron	100	100	100
Cortisol	-	100	100

Tab. 7: Versuchsansatz

Die Ansätze wurden gemischt, für 60 Minuten unter Schütteln und dann für weitere 30 Minuten ohne Schütteln im Wasserbad bei 37°C inkubiert, damit sich das Gel absetzen konnte.

Danach wurden 750 µl des Überstandes in Analysevials mit je 5 ml Szintillationslösung gegeben und jeweils 180 Sekunden im β-Counter gemessen.

4.1.4. Standardkurve für die Bindung von Testosteron an hSHBG

Um die Bindungsfähigkeit der einzelnen Androgenderivate miteinander vergleichen zu können, mußte eine Bezugssubstanz erstellt werden. Testosteron eignete sich als Referenz, da es ein starker Bindungspartner für hSHBG ist. Daher wurde mit unterschiedlichen Testosteronkonzentrationen eine Standardkurve erstellt. Aussagekräftiger Punkt in der Standardkurve für die Bindungsfähigkeit eines Steroids an hSHBG, ist der B/B_0 -Wert bei 50%. Dieser zeigt an, wie hoch die Konzentration an Steroid sein muss, um 50% an radioaktivem Tracer aus der Bindung an hSHBG verdrängen zu können. Je niedriger also der B/B_0 -Wert bei 50% ist, desto stärker ist die Bindungsfähigkeit des Steroids an hSHBG bzw. das Bindungsvermögen der Steroidbindungsstelle am hSHBG.

Rechenparameter in der Übersicht:

T_0	total counts (dpm), gesamte Menge an radioaktivem Tracer im Versuchsansatz
$T_{\text{Steroid}(x)}$	Menge an freiem Tracer bei einer Konzentration x eines bestimmten Steroids in der Reaktion um die Bindung an hSHBG
L_{Steroid}	Leerwert für ein bestimmtes Steroid
B	$T_0 - T_{\text{Steroid}(x)}$
B_0	$T_0 - L_{\text{Steroid}}$
$T_0 - \ddot{U}$	alle Werte von $T_0 - T_{\text{Steroid}(x)}$ und $T_0 - L_{\text{Steroid}}$

Der Versuchsansatz erfolgte wie in Kapitel 4.1.2. beschrieben.

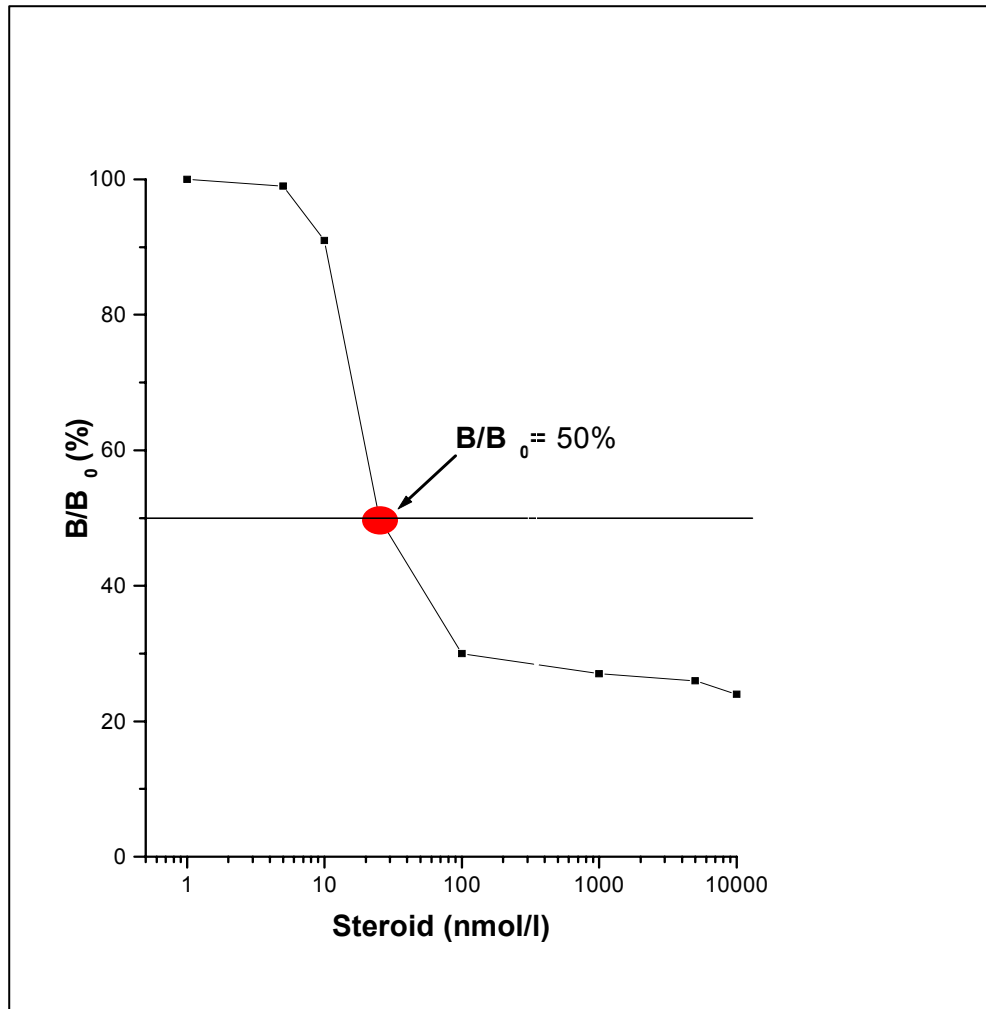


Abb. 1: Standardkurve für die Bindung von T an hSHBG.

4.1.5. Scatchard-Plot zur Bestimmung des K_a -Werts von Testosteron

Zur Auswertung wurde ein lineares Koordinatensystem nach Scatchard verwendet [188 (S. 660)]. Dabei wird auf der x-Achse die Konzentration des gebundenen Anteils des Tracers (^3H -Tracer-bound) und auf der y-Achse der Quotient aus der Radioaktivität im Überstand (\ddot{U}) und der Totalen Menge an Radioaktivität (T_0) minus der Radioaktivität im Überstand (\ddot{U}) aufgetragen.

Die Steigung der resultierenden Geraden war äquivalent zur Affinitätskonstante K_a des Testosterons, der Schnittpunkt mit der x-Achse (n) war proportional zur Konzentration des Tracers und der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse ergab den Quotienten aus n/K_d , mit n = Konzentration des Tracers und K_d = Dissoziationskonstante.

Für die Standardauswertung müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- a.) Protein und Ligand reagieren in einer eins zu eins Reaktion ohne allosterische Effekte,
- b.) die Trennung der gebundenen und ungebundenen Anteile im Reaktionsansatz ist komplett,
- c.) das System ist im Gleichgewicht,
- d.) markierter und unmarkierter Ligand haben beide gleiche Affinität zum Makromolekül.

Weitere Einflussgrößen sind Temperatur, pH, Länge der Inkubation und Änderung der Matrix [188 (S. 660), 214 (S. 487)].

Verdünnungsreihe von Testosteron ausgehend von einer Konzentration von 100.000 nmol/l an Testosteron:

Konzentration nmol/l	Verdünnung	Assaypuffer µl	Lösung µl
50000	1 : 2	750	750
10000	1 : 5	1200	300
7500	1 : 6,7	1276	224
5000	1 : 10	1350	150
2500	1 : 20	1425	75
1000	1 : 50	1470	30
500	1 : 100	1485	15
100	1 : 500	1497	3
10	1 : 5 000	2499,5	0,5

4.1.6. Bindungsvermögen von 5 α -Dihydrotestosteronderivaten an hSHBG

Für die Experimente auf dem Biosensor benötigt man Steroid-Liganden, durch deren Immobilisation auf den Biosensorchips mit einer Dextranmatrix geeignete Oberflächen zur experimentellen Erforschung der Eigenschaften von hSHBG geschaffen werden. Dazu wurden die Bindungseigenschaften von synthetischen Steroidhormonderivaten an hSHBG zunächst in Lösung mittels des Verdrängungsassays getestet, um Aussagen über die Bindungsstärke der einzelnen Sexualhormonderivate an hSHBG im Vergleich zu Testosteron zu erhalten. Verschiedene synthetische Steroidhormonderivate wurden in den Gleichgewichtsmessungen bzgl. der Affinität zu hSHBG getestet. Die Synthese

dieser Steroidhormonderivate stellt einen komplizierten mehrstufigen organisch-chemischen Prozess dar. Die synthetischen Prinzipien werden in [88 (S. 629ff.)] ausführlich dargestellt.

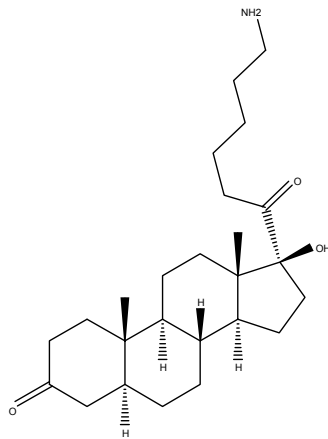
Im einzelnen wurden folgende Amino-DHT-Derivate als hSHBG-Liganden getestet:

IUPAC-Name	Abkürzung	Massengewicht g/mol	c(Stocklösung) nmol/l
17 α -Aminocaproylethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on	17 α -DHT-C ₆ -NH ₂	492	10
17 α -Aminoethylethyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on	17 α -DHT-C ₂ -NH ₂	379	2,24
17 α -Aminopropyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on	17 α -DHT-C ₃ -NH ₂	392	1
1 α -Aminohexyl-17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-on	1 α -DHT-C ₆ -NH ₂	383	6,44

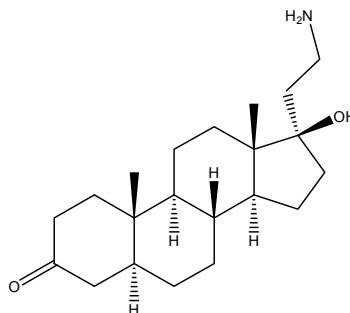
Tab. 8: Amino-DHT-Derivate als Liganden an hSHBG.

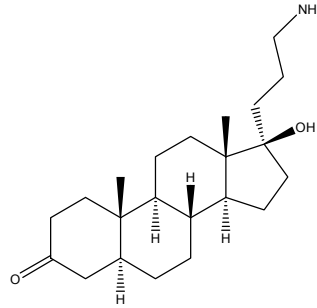
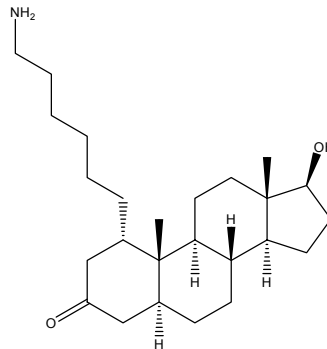
In der nachfolgenden Abb. 2 sind die Strukturen der Liganden dargestellt:

1.) 17 α -DHT-C₆-NH₂



2.) 17 α -DHT-C₂-NH₂



3.) 17 α -DHT-C₃-NH₂**4.) 1 α -DHT-C₆-NH₂****4.2. Grundlagen der Biosensorik****4.2.1. Einführung**

Ein Biosensor ist ein miniaturisiertes Analysesystem, das einen reagiblen biologischen Baustein enthält, welcher dazu dient, eine gesuchte Substanz unter einer Fülle anderer – auch ähnlicher – herauszufinden. Mit diesem werden Informationen über die biochemische Zusammensetzung einer Analysenprobe oder über biospezifische Interaktionen von Bindungspartnern in Echtzeit erhalten. Als biologische Komponente fungieren Enzyme, Rezeptoren, spezifische Liganden, einsträngige DNA, Proteine, Antikörper(-fragmente), Zellen und Viren, welche markierungsfrei auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden können. Dabei interagiert der Analyt, je nach Funktionsweise und Eigenschaften, mit dem biologischen Baustein des Sensors. Die daraus resultierende Antwort basiert auf biochemischen oder chemischen Reaktionen, auf der Änderung von optischen, elektrischen oder mechanischen Eigenschaften oder einem anderen verlässlich quantifizierbaren Geschehen.

Die biospezifischen Abläufe im Biosensor werden schließlich von einem geeigneten Transducer, einem Signalwandler, in ein messbares Signal umgewandelt und dann elektrisch verstärkt. Biosensoren kombinieren somit hohe analytische Spezifität mit den Vorzügen moderner Elektronik, um möglichst sensitive, gleichzeitig aber spezifische Signale zu erhalten [24 (S. 6), 115 (S. 1)].

4.2.2. Optische Biosensoren am Beispiel der Surface Plasmon Resonance: SPR (Oberflächenplasmonresonanz)

Das Grundprinzip beruht darauf, dass linear polarisiertes Licht von einem Prisma von einer Schicht mit hohem Refraktionsindex (RI) zu einer Schicht mit geringerem RI geleitet wird, woraus unter Bedingungen der Totalreflektion eine Abschwächung der Intensität des reflektierten Lichts resultiert. Die Analyseprobe wird auf einer Schicht mit geringerem RI immobilisiert. Im Zwischenraum zwischen dem Prisma und der Probe liegt ein ca. 50 nm dünner Goldfilm.

Durch Energietransfer aus dem Licht werden die Oberflächenelektronen, die sogenannten Plasmonen entlang des Goldfilmes in einen kollektiven Schwingungszustand versetzt. Daraus resultiert eine exponentiell abfallende, evaneszente Welle, die eine definierte Strecke in das Medium mit niedrigem RI eindringt und eine charakteristische Änderung des Winkels des reflektierten Lichtes unter Intensitätsabschwächung hervorruft.

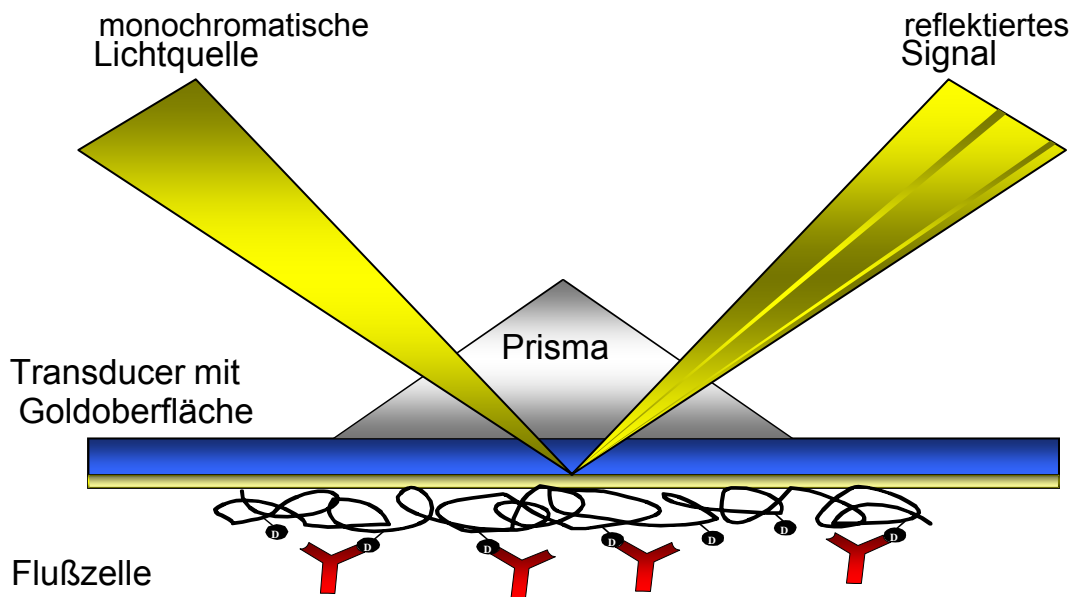


Abb. 3: Oberflächenplasmonresonanz – SPR. Abgebildet ist ein B1-Chip mit immobilisierten Aminosteroiden und Antikörpern an einer Dextranmatrix, die auf einen dünnen Goldfilm an einem Transducer aufgebracht ist. Polarisiertes Licht wird durch ein Prisma geschickt und versetzt die Plasmonen entlang des Goldfilms in einen kollektiven Schwingungszustand, deren evaneszente Welle weiter Richtung Goldfilm vordringt. Dadurch wird der Winkel des reflektierten Lichts geändert und die Intensität abgeschwächt. Diese optischen Phänomene können aufgezeichnet und als Signal ausgewertet werden.

So wird ein direkter Einblick in die Veränderungen des RI an der Oberfläche der biologischen Schicht möglich und durch Registrierung der Intensität und des Resonanzwinkels des reflektierten Lichts die biospezifische Interaktion visualisiert. Am Beispiel des Biacore X[®] kann man dieses Prinzip durch Bindung von Steroidhormonderivaten an eine carboxymethylierte Dextranmatrix und der Reaktion des Komplexes mit hSHBG zur Charakterisierung ihrer Interaktionen nutzen. Bindet hSHBG an Steroidhormone, die als Liganden auf die Oberfläche aufgebracht werden, ändert dies die optische Dichte und damit auch den Winkel des reflektierten Lichtes, das als Sensorsignal dient. Wichtig ist, dass die Steroidbindungsdomäne des sich frei in Lösung befindlichen hSHBG optimal zur Verfügung steht, was hohe Signalintensitäten zur Folge hat und sich in typischen Assoziations- und Dissoziationskurven zeigt [111 (S. 1), 115 (S. 1), 200 (S. 66)].

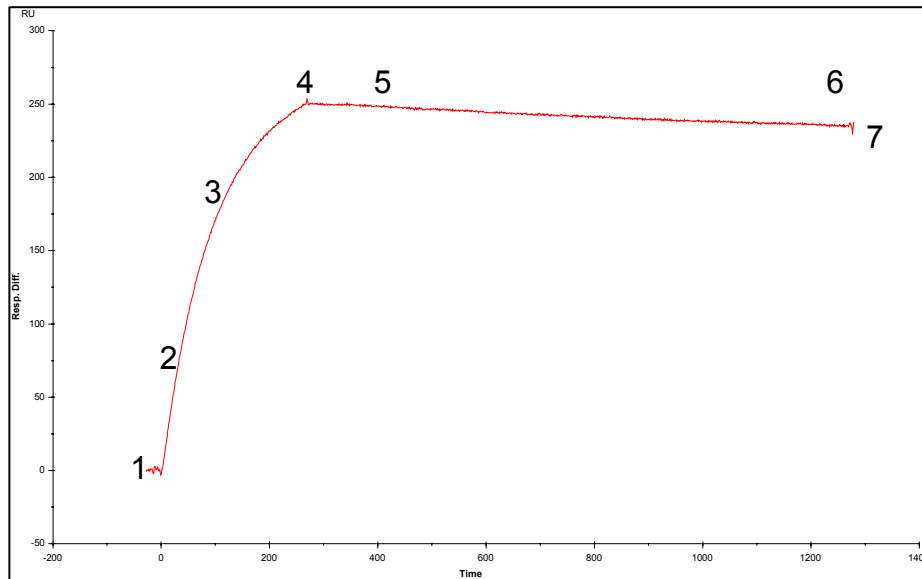


Abb. 4: Darstellung einer typischen Oberflächenplasmonresonanz-Messkurve 1: Injektionsstart, 2-3: Assoziationsphase, 4: Injektionsstopp, 5-6: Dissoziationsphase, 7: Stop der Messung

Die sogenannte Echtzeitanalyse von biomolekularen Interaktionen (BIA) erkennt die Formation und Dissoziation von biomolekularen Komplexen auf der Sensoroberfläche unmittelbar bei Auftreten der Wechselwirkungen. Dazu immobilisiert man Moleküle kovalent auf der Sensoroberfläche und fügt die Analyten in Lösung, über einen kontinuierlichen Fluss, zu. Konzentrationsveränderungen auf der Sensoroberfläche können bis zu einem Zeitintervall von 0,1 sec aufgelöst werden. Die Bandbreite der analysierbaren Substanzen reicht von Proteinen, Nucleinsäuren und Lipidmizellen, bis zu großen Partikeln, wie Viren und ganzen Zellen [19 (2.1), 115 (S. 1)].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sensor-Chips sind B1-Chips, d.h. sie besitzen eine Dextranmatrix mit einem geringen Grad an Carboxylierung, was zwar ihre Beladungskapazität und Dichte im Vergleich zu häufig eingesetzten CM 5-Chips erniedrigt, jedoch im Gegensatz nicht-spezifische Bindungsphänomene von positiv geladenen Molekülen erheblich reduziert [19 (2.1)].

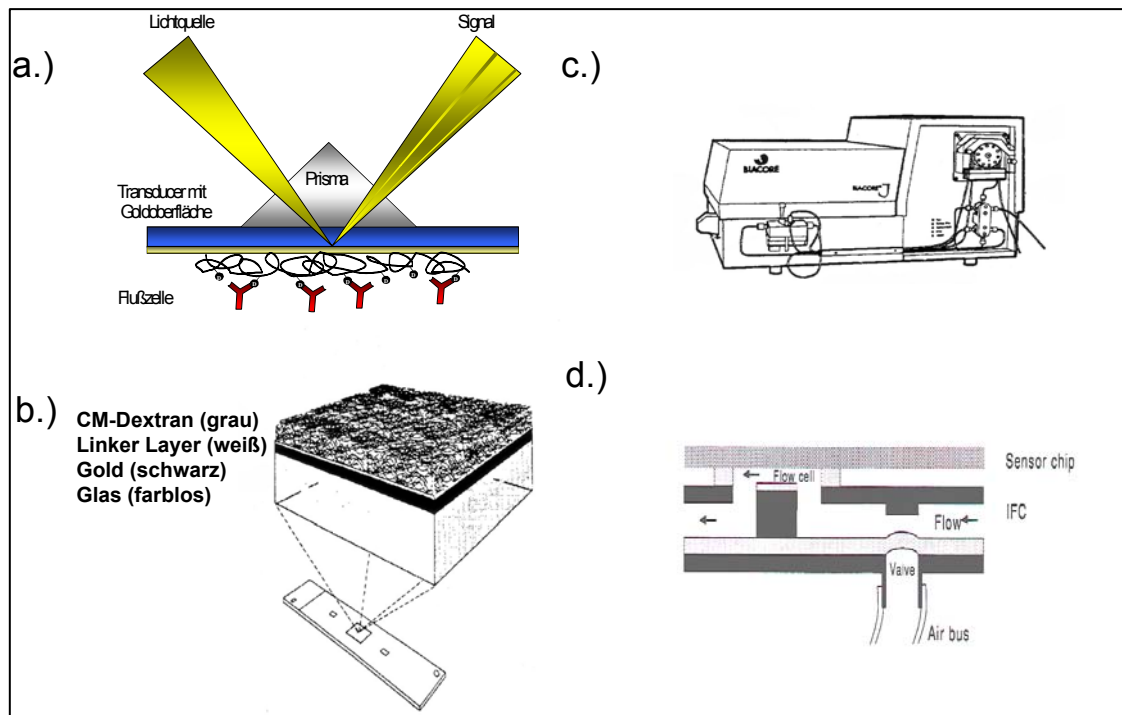


Abb. 5: Schema eines SPR-Biosensors. Man erkennt die 3 grundlegenden Elemente eines optischen Biosensors (c.): a.) zeigt das Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz, b.) zeigt einen typischen Analysechip mit einer CM-Dextran-Matrix, die über eine Verbindungsschicht und Goldschicht auf einem Glasgrund aufgebracht wurde und d.) eine integrierte Mikroflusszelle (IFC), für einen kontinuierlichen Fluss über die Sensoroberfläche.

4.2.3. Materialien

Zur Ligandenkopplung wurden 0,05 M NHS (N-Hydroxysuccinimid), 0,2 M EDC (N-Ethyl-N'-(-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) und 1 M Ethanolamin-hydrochlorid bei pH = 8,5 benutzt. Diese Reagenzien stammten von Biacore, Uppsala, Schweden.

Die monoklonalen Antikörper MAK-T₃ (M2111244), MAK-T₁₉ (M212051a) und MAK-E₂₋₃ (M40557) stammten von der Fa. Fitzgerald.

Als Abspaltungslösung bzw. Konditionierungslösungen diente Phosphorsäure (H₃PO₄: 100mM in PBS, pH = 1,60). Der PBS-Puffer wurde mit 2,6 mM KCl, 138 mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄ x H₂O, 1,8 mM H₂KPO₄ und 0,1% NaN₃ in Aqua dest. hergestellt und auf einen pH = 7,55 – 7,65 eingestellt. Niedrigionischer Phosphatpuffer/Laufpuffer wurde mit 0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M Na₂HPO₄, 500 mM K₂SO₄ und 1 M CaCl₂ in Aqua dest. angesetzt und auf einen pH = 7,3-7,5 eingestellt.

Boratpuffer (H_3BO_3) wurde mit 100 nM und einem pH = 8,30 in Aqua dest. hergestellt und diente der Verdünnung der Aminosteroide.

Natriumacetat wurde mit 10 mM und einem pH = 4,50 benutzt.

hSHBG wurde mittels PBS-Puffer in Lösung gebracht. Durch PNGase-Verdau mittels Zugabe von 5 Einheiten PNGase pro μg hSHBG, 30minütiger Inkubation bei 37°C und anschließender Gelfiltration über eine ConA-Sepharose-Säule erfolgte eine Abspaltung der N-glykosidischen Seitenketten von hSHBG, wodurch störende Oligomere entfernt wurden. Das behandelte hSHBG wurde in Aliquots ($V = 50 \mu\text{l}$, pH = 7,53, zu $c = 1,1 \mu\text{M}$ und $c = 2,2 \mu\text{M}$) bei -20°C gelagert. Die analysierten Aminosteroide ($17\alpha\text{-DHT-C}_3\text{-NH}_2$, $17\alpha\text{-DHT-C}_9\text{-NH}_2$ und $1\alpha\text{-DHT-C}_6\text{-NH}_2$) stammten von Prof. Hauptmann, Universität Regensburg.

4.2.4. Beladung der Chipoberfläche mit Steroidliganden

Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 25°C auf dem Biacore X[®] und bei Flussgeschwindigkeiten von $5 \mu\text{l}/\text{min}$ bzw. $10 \mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Zunächst wurde der Sensor solange konditioniert eine konstant verlaufende Basislinie (siehe Abb. 6) in beiden Flusskammern (FC1 und FC2) mittels kontinuierlichen Flusses von niedrigionischem Phosphatpuffer (Laufpuffer) erhalten wurde. FC1 diente bei der späteren Analyse als Messzelle, mit an der Dextranmatrix gekoppelten Aminosteroiden. FC2 als Referenzzelle, mittels welcher bei der Auswertung unspezifische Signale eliminiert werden. Danach erfolgte die weitere Konditionierung der Chipoberfläche durch dreimalige Injektion von $10 \mu\text{l}$ H_3PO_4 (100 mM in PBS-Puffer). Durch die Konditionierung erfolgte eine Abspaltung von unspezifisch angebondenen Substanzen auf der Chipoberfläche, die Einfluss auf das Messergebnis haben könnten.

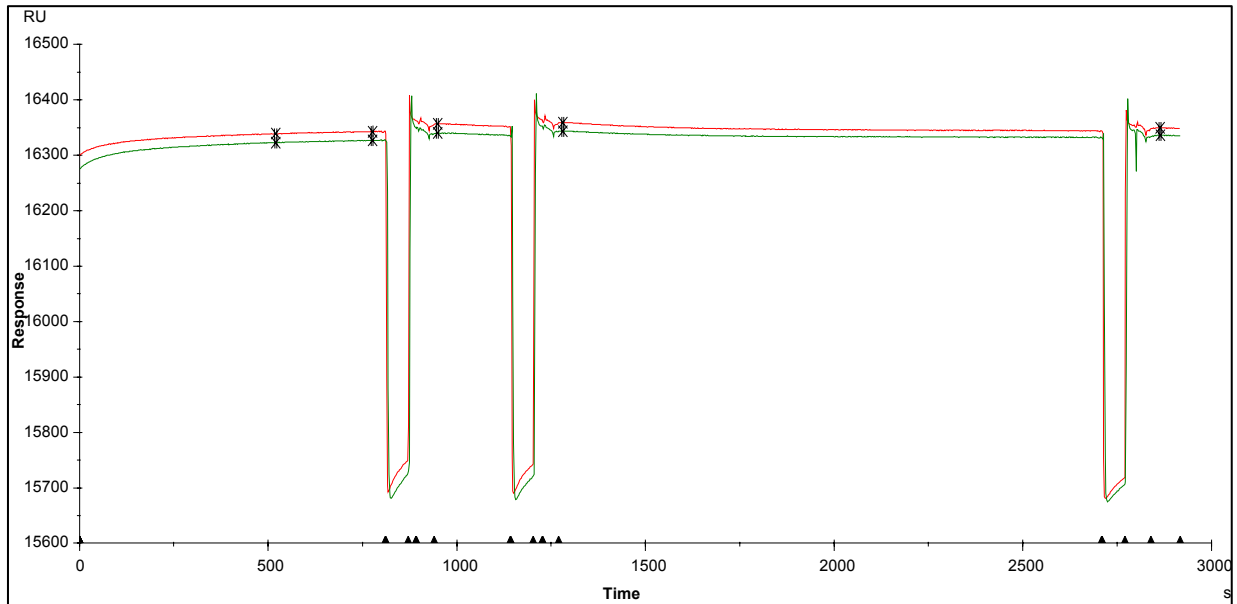


Abb. 6: Konditionierung der Flusszellen durch dreimalige Injektion von 10 μl H_3PO_4 (100 mM in PBS-Puffer). Der Abfall an RU zeigt jeweils die Injektion von H_3PO_4 an. Die Basislinie verläuft hier bei ca. 16350 RU.

Im nächsten Zyklus erfolgte die Beladung von FC1. Injektion von 35 μl EDC (400 mM)/NHS (100 mM) und anschließendem Delay von 30 sec. Unter Delay versteht man dabei die Zeit, in der das System bei kontinuierlichem Fluss des Laufpuffers einen Gleichgewichtszustand erreicht hatte.

Durch Injektion einer Kombination aus N-Hydroxysuccinimid (NHS) und N-Ethyl-N'-(dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid (EDC) wurden N-Hydroxysuccinimid-Ester auf die Chipoberfläche aufgebracht und so die Carboxymethylgruppen der Dextranoberfläche des B1-Chips aktiviert (siehe Abb. 10) [19], was sich in einem Anstieg des SPR-Signals (RU) zeigte, das nach Stopp des Laufes wieder auf die etablierte Basislinie abfiel.

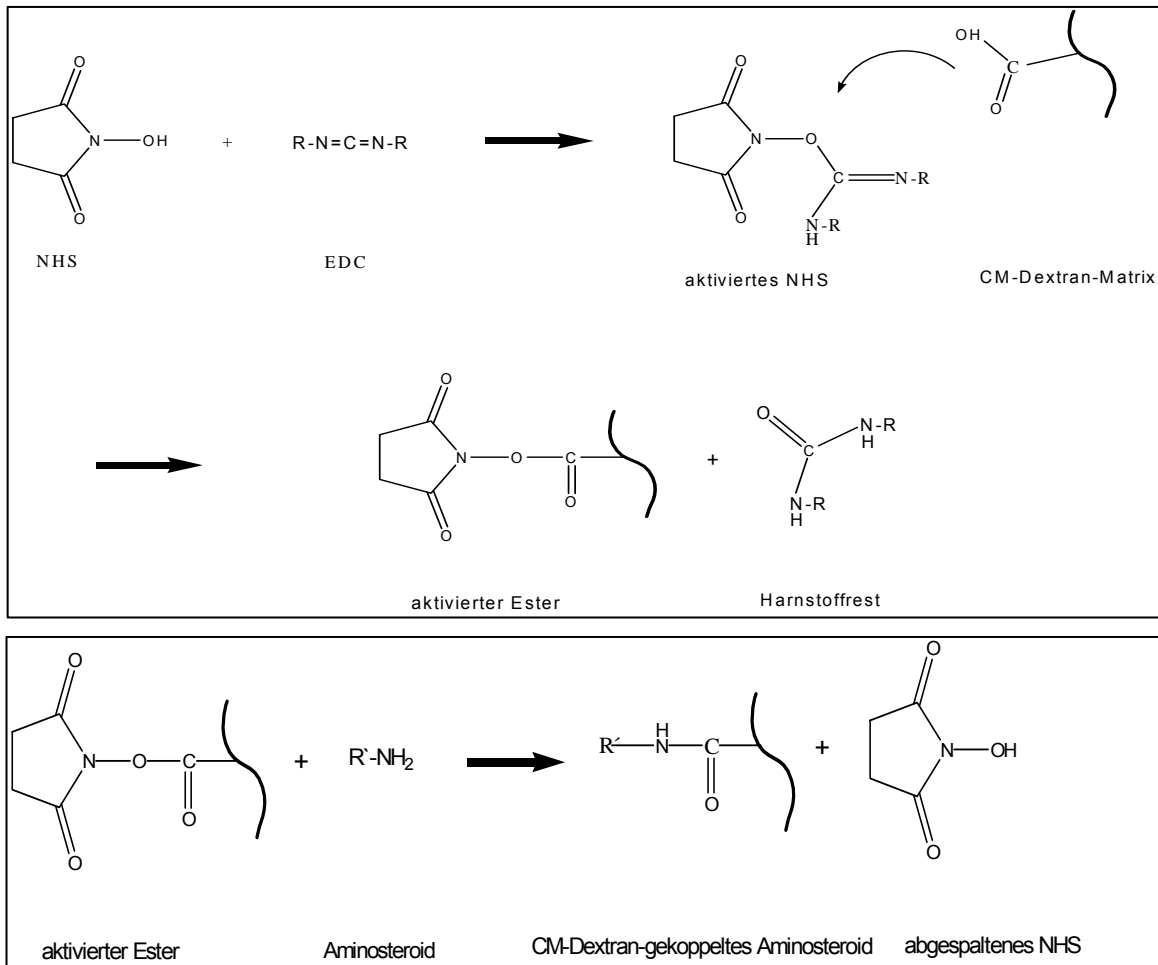


Abb. 7: Aminkopplung an die Dextranmatrix des B1-Chips.

Durch Injektion von 40 µl Ethanolaminhydrochlorid (1 M) wird die Aktivierungsreaktion mit einem nachfolgendem Delay von 100 sec gestoppt. Dadurch werden nichtreagierte NHS-Ester inaktiviert. Durch Injektion von 10 µl H₃PO₄ (100mM in PBS) wurde danach die Deaktivierungsreaktion von Ethanolamin mit den NHS-Estern gestoppt und dadurch eine stabile Basislinie erreicht.

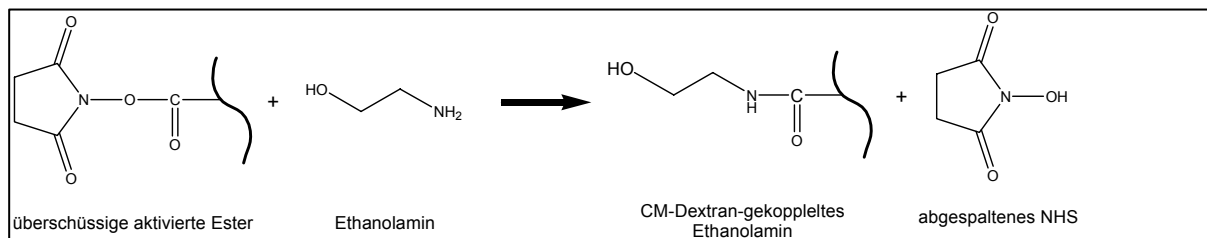


Abb. 8: Inaktivierung der überschüssigen aktivierten NHS-Ester mittels Ethanolamin

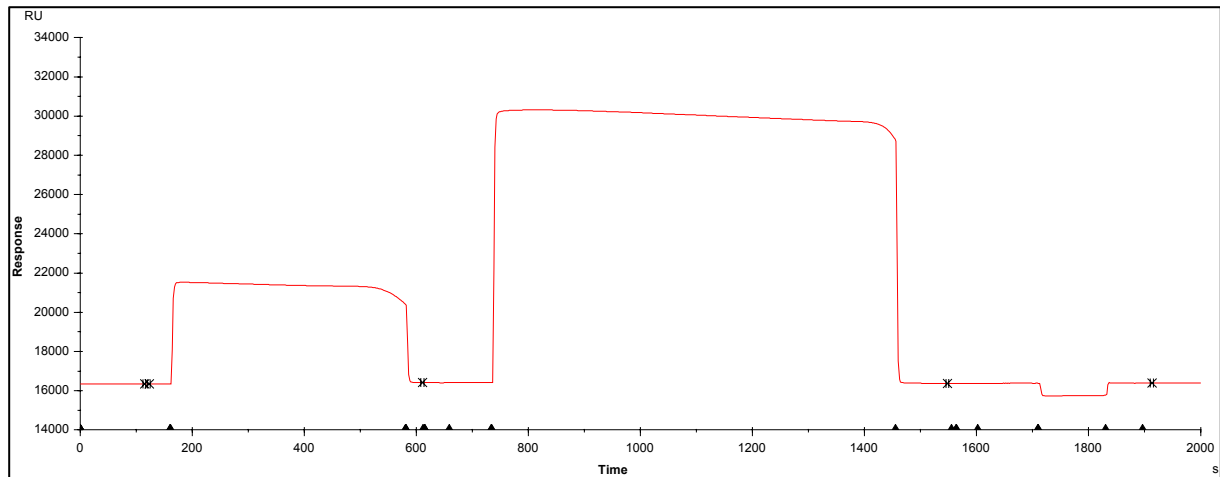


Abb. 9: Aktivierung der Dextranoberfläche in FC1 (Referenzkammer) mittels Injektion von 35 μ l EDC (400 mM)/ NHS (100 mM). Die Basislinie ist bei ca. 16350 RU erkennbar. Nach Injektion des EDC/NHS-Aktivierungsreagens (180 s) steigt das SPR-Signal auf ca. 22000 RU an. Injektion von Ethanolamin (750 s) inaktiviert nicht reagierte NHS-Ester auf der Chipoberfläche. Injektion von H_3PO_4 beendet die Deaktivierungsreaktion und etabliert die Basislinie.

Die Beladung von FC2 erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei FC1, mit dem Unterschied, dass nach Aktivierung der Dextranoberfläche die NHS-Ester nicht mittels Ethanolamin deaktiviert wurden, sondern zusätzlich 30 μ l des jeweiligen Aminosteroids in einer Konzentration von 200 μ M injiziert und mit einem nachfolgenden Delay von 600 sec auf die Oberfläche des B1-Chips aufgebracht wurden.

Somit befanden sich am Ende des Beladungsvorgangs auf der Chipoberfläche des B1-Chips in FC1 an die Dextranmatrix gekoppelte Amiosteroide (Aminkopplung) und in FC2 an die Dextranmatrix nur gebundenes Ethanolamin.

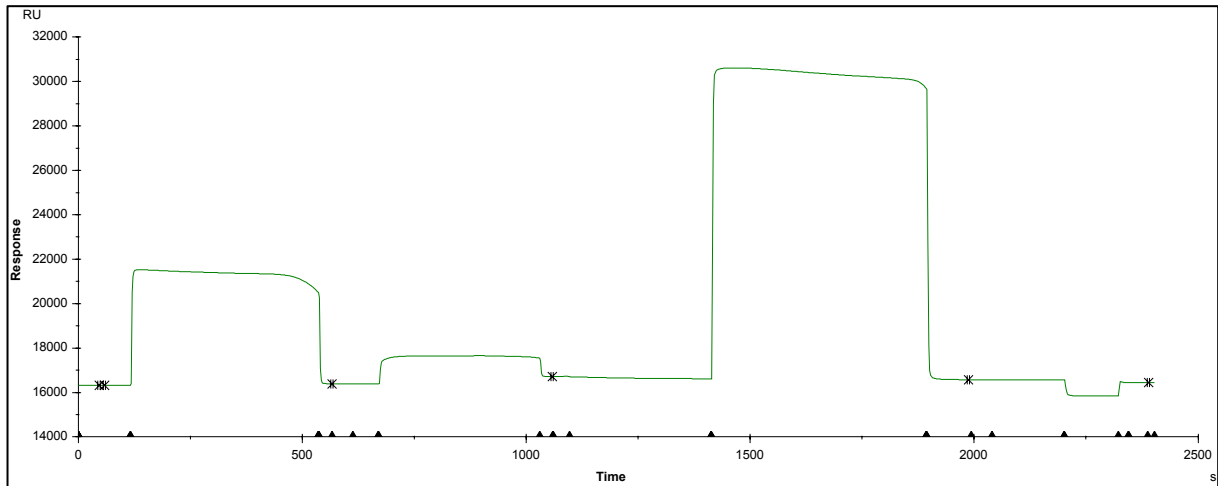


Abb. 10: Aktivierung der Detranoberfläche in FC2 mittels EDC/NHS (120s), Inaktivierung mittels Ethanolaminhydrochlorid (670s) und Beladung der Chipoberfläche mit Aminosteroid mittels Injektion von 30 μ l Aminosteroid in einer Konzentration von 200 μ M (1400s) und abschließender Abspaltung mittels H_3PO_4 (2200s).

Nach erfolgter Beladung wurde das Beladungsergebnis durch Injektion monoklonaler anti-DHT-Antikörper kontrolliert. Dazu injizierte man nacheinander jeweils 50 μ l von MAK-T19, MAK-E2-3 und MAK-T3 zu $c = 0,04$ mg/ml bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min., einem Delay von 600 sec. und anschließender Abspaltung mit 10 μ l H_3PO_4 (100mM in PBS). Dabei war das Signal bei Injektion von MAK-T19 für 17α -DHT- C_3 - NH_2 und 17α -DHT- C_9 - NH_2 stärker als bei Injektion von MAK-T3. Bei 1α -DHT- C_6 - NH_2 war das Signal für MAK-T3 höher, als für MAK-T19. Der anti-E2 Antikörper MAK-E2-3 diente der Negativkontrolle.

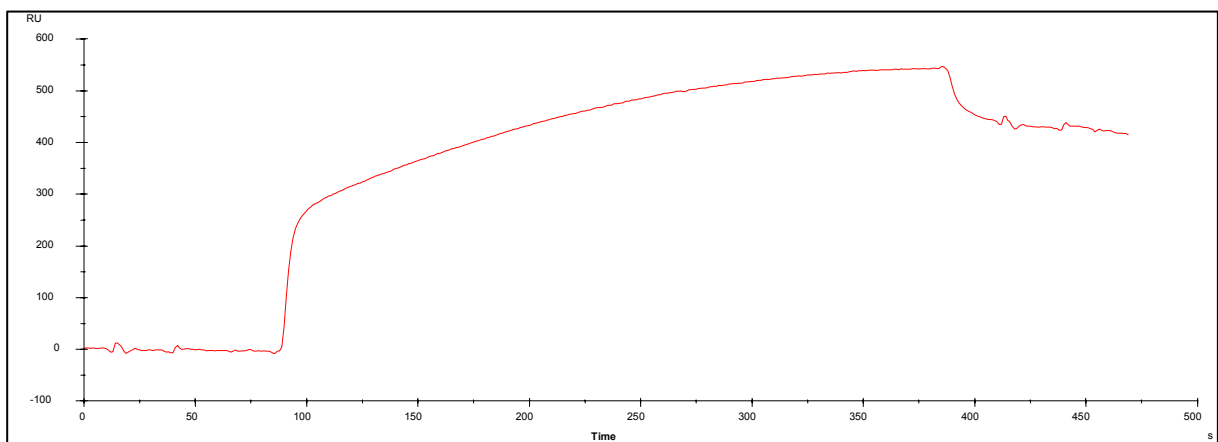


Abb. 11: MAK-T19-Kontrolle der Anbindung von 17α -DHT- C_3 - NH_2 auf der Sensoroberfläche des B_1 -Chips. Man sieht eine deutliche Zunahme der RU in

FC2 von 250 RU auf 600 RU im Intervall von 100 s bis 400 s, was für eine hochaffine Anbindung des Antikörpers spricht.

4.2.5. Durchführung der Messungen

Die Amino-DHT-Derivate 17α -DHT- C_3 - NH_2 , 17α -DHT- C_6 - NH_2 und 1α -DHT- C_6 - NH_2 wurden wie oben beschrieben auf der Dextranoberfläche verschiedener B1-Chips kovalent gebunden. Ihre Bindungseigenschaften an hSHBG wurden mittels Analyse ihrer Assoziations- und Dissoziationseigenschaften untersucht. Es wurden für jedes Aminosteroid 7 μ l hSHBG in individuell unterschiedlichen Konzentrationen injiziert (siehe Tab.: 9). Die Flussgeschwindigkeit betrug 10 μ l/min. Die Delay-Zeit betrug für 17α -DHT- C_3 - NH_2 und 17α -DHT- C_6 - NH_2 600 sec sowie 1000 sec für 1α -DHT- C_6 - NH_2 . Die spezielle Beschaffenheit der integrierten Mikroflussskammer (IFC) und die Klappenmechanismen gewährleisteten ein kontinuierliches, pulsationsfreies, kontrolliertes und nahezu verzögerungsfreies Flusssystem, in dem eine konstante Konzentration des injizierten hSHBG während der Assoziationsphase auf dem Sensorchip herrschte. Zusätzlich ermöglichte die integrierte Mikroflussskammer, dass die Probenlösung an hSHBG gleichzeitig durch beide Flusskammern FC1 und FC2 des Sensorchips floss und somit eine parallele Untersuchung der beiden unterschiedlichen Oberflächen von FC1 und FC2 möglich war. Durch Subtraktion der RU-Werte der Referenzzelle FC2 von den RU-Werten von FC1 wurden Nettosensorgramme berechnet, aus denen mittels der Biacore-Software BIAevaluation 3.0 die Assoziationskonstanten der Aminosteroide für hSHBG ermittelt wurden.

	hSHBG – Konzentrationen (nM)	n (Anzahl der Versuche)
17α-DHT-C_6-NH_2	25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250	4
17α-DHT-C_3-NH_2	50, 75, 100, 125, 150	4
1α-DHT-C_6-NH_2	25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 300, 350, 400, 800	4

Tab. 9: hSHBG-Konzentrationen (nM) und Anzahl der Versuche.

5. Ergebnisse

5.1. Aktivität des affinitätschromatographisch gereinigten hSHBG



Abb. 12: Nachweis der biologischen Aktivität des hSHBG: hSHBG-Konzentration in den Seren A-C.

Drei Seren (A-C) von gesunden Erwachsenen Männern mit niedrigen endogenen hSHBG-Spiegeln (ca. 20 nmol/l) und einen mittleren freien Testosteron im Serum von 12,33 pg/ml wurden mit affinitätschromatographisch gereinigtem hSHBG aufgestockt. In den aufgestockten Seren stieg dadurch die hSHBG-Konzentration im Mittel auf 175nmol/l, die Konzentration des freien Testosterons fiel dagegen auf 4,2 pg/ml. Dadurch ist die Bioaktivität und funktionelle Integrität der für die Biosensorversuche benutzten hSHBG-Präparationals gegeben anzunehmen. Das Diagramm in Abb.: 13 zeigt die Konzentration an hSHBG im Serum bei Zugabe von 200 nmol/l hSHBG(F) und in einer Kontrollmessung bei Zugabe von PBS zu den Serumproben der drei Kontrollpersonen A, B und C. Man sieht, dass die hSHBG-Konzentration im Serum von durchschnittlich 21,1 nmol/l auf 174,0 nmol/l stieg. Das folgende Säulendiagramm in Abb. 14 zeigt die im ¹²⁵I-markierten freien Testosteron

Coat-A-Count[®] RIA ermittelten Konzentrationen an freiem Testosteron im Serum der drei Versuchspersonen A, B, C nach Zugabe von hSHBG und in einer Kontrollmessung nach Zugabe von PBS-Puffer. Bei allen drei Personen nahmen nach Zugabe von hSHBG(F) die Konzentration an freiem Testosteron deutlich ab. Von durchschnittlich 12,33 pg/ml an freiem Testosteron im Serum sank der Wert auf 4,20 pg/ml an freiem Testosteron im Serum.

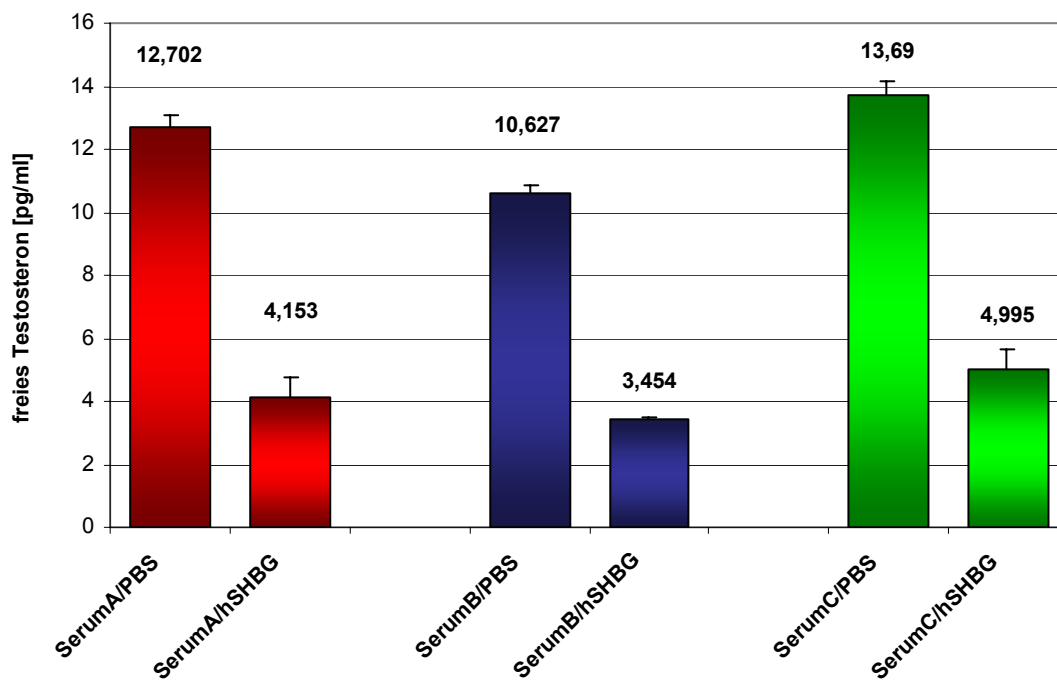


Abb. 13: Nachweis der biologischen Aktivität des hSHBG: Konzentration des freien Testosteron in den Seren A-C.

5.2. Gleichgewichtsanalysen

5.2.1. Auswertung der Wettbewerbsversuche

Die relative Bindungsaktivitäten (RBA) der einzelnen Androgenderivate wurden unter Gleichgewichtsbedingungen bei 37 °C mit Hilfe von ConA-Sepharose zur Festphasenseparation und ³H-Testosteron als Tracer durchgeführt. In Detail wurde diese Technik von Dunn et al. [48] beschrieben. Das Prinzip in Kürze: Die Gleichgewichtsmessungen wurden wie ein Radioimmunoassay (RIA) durchgeführt und die Bindungskurven ausgewertet. Statt eines Antikörpers wurde jedoch hSHBG als spezifischer Bindungspartner für Androgene eingesetzt. Die Bindung des hSHBGs an Con A-Sepharose erlaubte die bound-from-free Trennung des Reaktanden. Als Tracer wurde der Betastrahler ³H-Testosteron eingesetzt, die Analyten waren die verschiedenen Androgenderivate, die eine niedrigere Affinität zu SHBG zeigten als Testosteron. Daher sind die Bindungskurven im Vergleich zu Testosteron nach rechts verschoben. Bezogen auf die 50%-Verdrängung des ³H-Tracers wurden die relative Bindungsaktivitäten im Vergleich zu Testosteron mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{RBA} = (C_{0,5, T} / C_{0,5, \text{competitor}}) \times 100$$

(mit $C_{0,5}$ = aktuelle Konzentration des radioinerten Kompetitors, die benötigt wird, die spezifische Bindung des ³H-Testosteron um 50% zu reduzieren; der RBA-Wert des Testosteron wurde dabei auf 100% gesetzt).

5.2.2. Scatchard-Plot für Testosteron

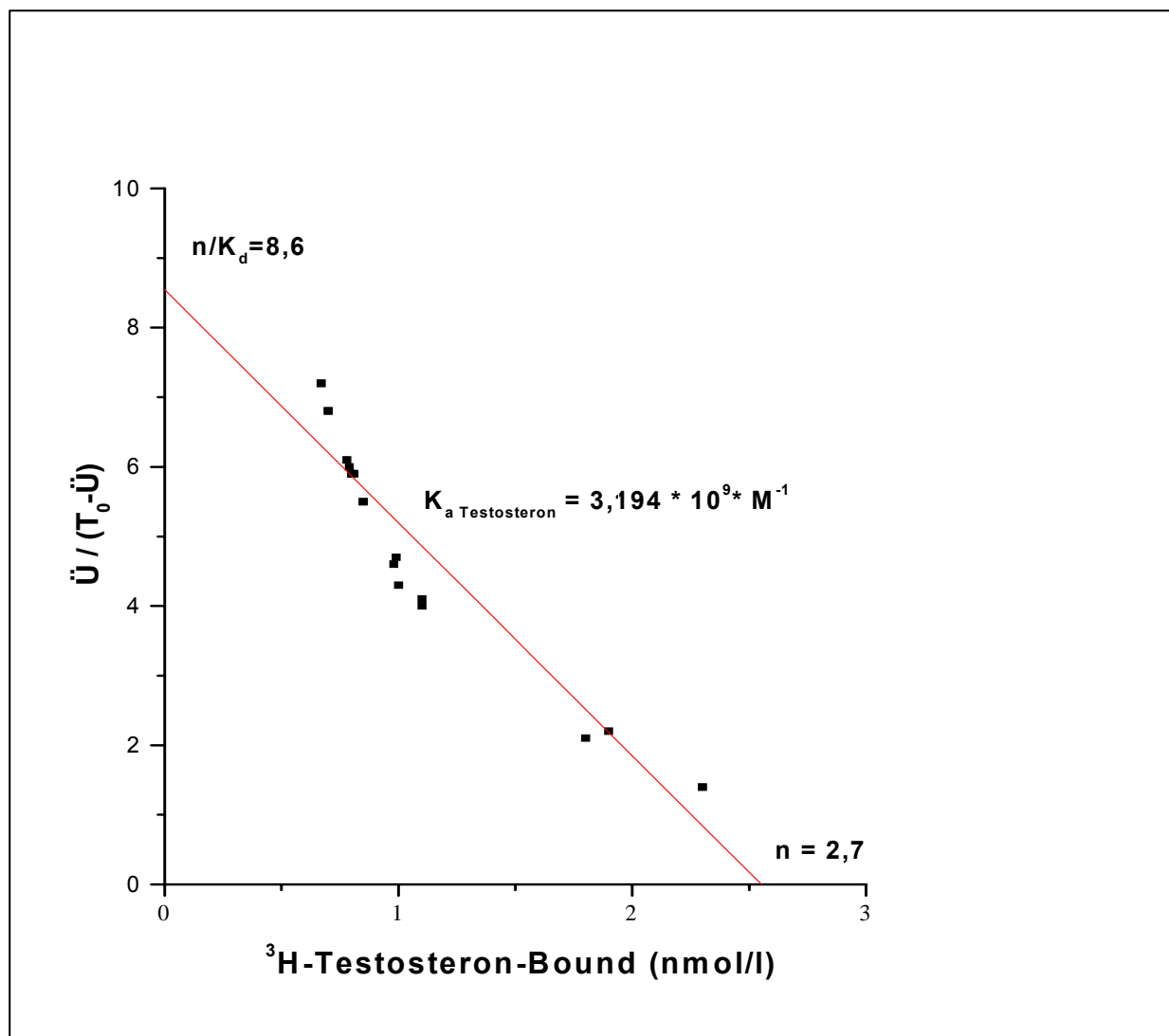


Abb. 14: Assoziationskonstante von Testosteron für hochreines hSHBG, ermittelt aus dem Scatchard-Plot ($n = 5$).

Die Bestimmung der Assoziationskonstanten K_a von Testosteron wurde durch die Zugabe von unmarkiertem Testosteron in Endkonzentrationen von 1 bis 1000 nM durchgeführt. Aus dem Anstieg der Ausgleichsgerade des Scatchard Plots (siehe Abb.: 15, $y = n/K_d = 8,6$, $n = 2,7$) wurde der K_a -Wert mit $3,19 \pm 0,32 \text{ (SD)} \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ($n = 5$) bestimmt. Daraus errechneten sich die Assoziationskonstanten für die Verbindungen $17\alpha\text{-DHT-C}_2\text{-NH}_2$, $17\alpha\text{-DHT-C}_3\text{-NH}_2$, $17\alpha\text{-DHT-C}_6\text{-NH}_2$ und $1\alpha\text{-DHT-C}_6\text{-NH}_2$ nach der Gleichung: $K_{a\text{Competitor}} = K_{aT} / ((1 + R)/RBA) - R$ (mit $R = B/B_0$ bei 50% Verdrängung [168 (S. 69)]). Zunächst wurde analog zum kompetitiven Verdrängungssay die B/B_0 -Werte für die verschiedenen Konzentrationen der

Steroide berechnet. Für die besondere Darstellung in Form des Scatchard-Plots wurde die Konzentration des gebundenen Anteils des Tracers (^3H -Tracer-Bound) für jede Steroidkonzentration x in nmol/l, der auf der x-Achse (Abszisse) aufgetragen wurde, benötigt. Berechnet wurde dieser, indem man den Quotienten aus dem Produkt der Gesamtkonzentration an ^3H -Tracer (x nmol/l) und der gebundenen Menge an radioaktivem Marker in dpm ($T_0 - \ddot{U}$) bei einer Konzentration x eines bestimmten Steroids in der Reaktion um die Bindung an hSHBG, also $(T_0 - T_{\text{Steroid}(x)})$ und der absoluten freien Menge an radioaktivem Tracer (T_0), bildete.

$$c(^3\text{H -Tracer-Bound}) = c_{\text{ges}}(\text{Tracer}) \times [T_0 - T_{\text{Steroid}(x)}] / T_0$$

Auf der y-Achse wurde der Quotient aus der freien Menge an radioaktivem Tracer (\ddot{U}), hier $T_{\text{Steroid}(x)}$ in dpm und der gebundenen Menge an radioaktivem Marker in dpm ($T_0 - \ddot{U}$) bei einer Konzentration x eines bestimmten Steroids in der Reaktion um die Bindung an hSHBG, also $(T_0 - T_{\text{Steroid}(x)})$ aufgetragen. Die Auftragung erfolgte in ein lineares Koordinatensystem. Die x-Achse war die ^3H -Testosteron-gebundene Konzentration. Die Steigung der resultierenden Geraden war äquivalent zur Affinitätskonstante K_a , der Schnittpunkt mit der x-Achse (n) war proportional zur Konzentration des Tracers und der Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse ergab den Quotienten aus n/K_d , mit n = Konzentration des gebundenen Tracers und K_d = Dissoziationskonstante.

$$1/ K_d = K_a$$

Testosteron K_a (10^9 M^{-1}) $n = 5$
3,25
2,64
3,4
3,28
3,4
$\bar{\emptyset} 3,19 \pm 0,32$

Tab. 10: Assoziationskonstante von Testosteron für hSHBG ermittelt aus dem Scatchard-Plot in Abb. 15 ($n = 5$).

5.2.3. Ergebnisse der Gleichgewichtsanalysen

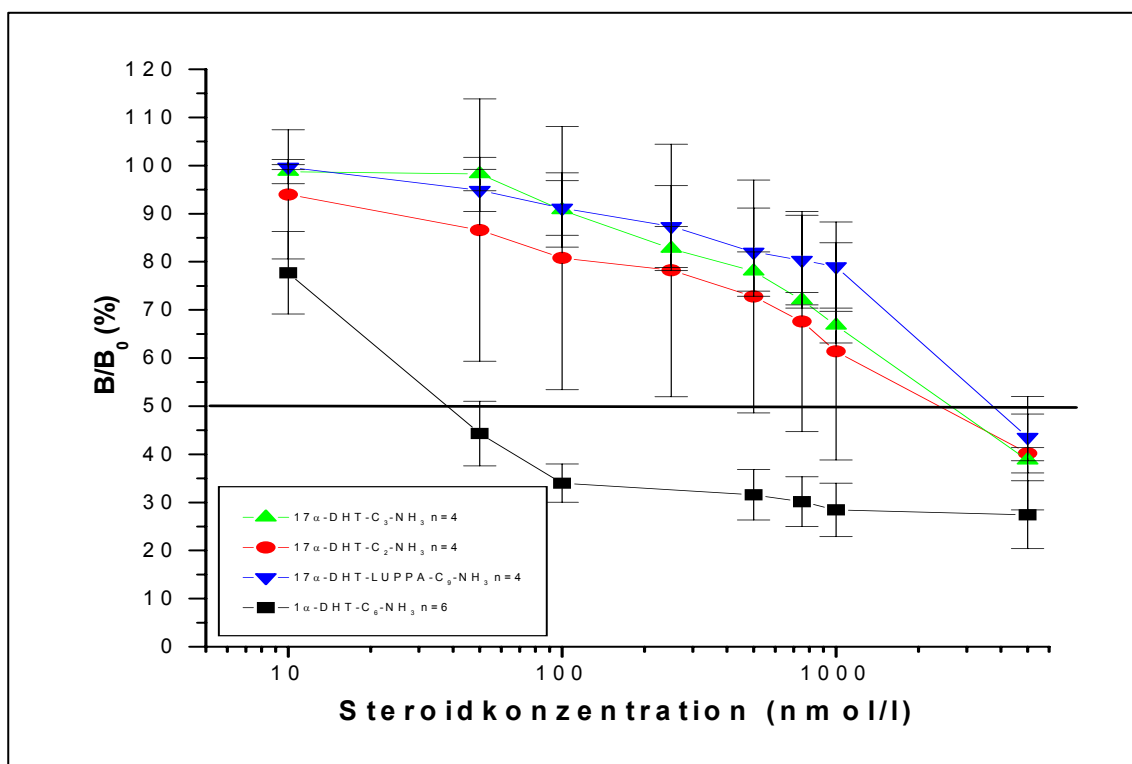


Abb. 15: Bindung von DHT-Aminosteroidderivaten an affinitätschromatographisch gereinigtem hSHBG.

17α-DHT-C ₃ -NH ₃ B/B _{0(50%)} (nmol/l) n=4	17α-DHT-C ₂ -NH ₃ B/B _{0(50%)} (nmol/l) n=4	17α-DHT-C ₆ -NH ₃ B/B _{0(50%)} (nmol/l) n=4	1α-DHT-C ₆ -NH ₂ B/B _{0(50%)} (nmol/l) n=6
2510	3588	3056	37
2998	4380	3450	39
2241	3080	2665	31
2735	4364	3344	41
			60
			45
Ø 2621 ± 322	Ø 3853 ± 634	Ø 3129 ± 351	Ø 42 ± 5,8

Tab. 11: B/B_{0(50%)}-Werte der 4 Amino-DHT-Derivate.

Die nachfolgende Tabelle 13 zeigt die starke Bindungsfähigkeit der Amino-DHT-Derivate an hSHBG. Der am stärksten bindende Partner an hSHBG war 1α-DHT-C₆-NH₂ (B/B_{0(50%)} = 42 nmol/l, K_a = 1,4 × 10⁹ M⁻¹). Diese Verbindung band knapp 100 mal stärker an hSHBG band, als die 17α-DHT-Aminoderivate (17α-DHT-C₂-NH₂

($B/B_{0(50\%)} = 3853 \text{ nmol/l}$, $K_a = 1,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) $17\alpha\text{-DHT-C}_3\text{-NH}_2$ ($B/B_{0(50\%)} = 2621 \text{ nmol/l}$, $K_a = 2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) $17\alpha\text{-DHT-C}_9\text{-NH}_2$ ($B/B_{0(50\%)} = 3129 \text{ nmol/l}$, $K_a = 1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$).

	RBA $\bar{\varnothing} \pm 1 \text{ SD}$	R $\bar{\varnothing} \pm 1 \text{ SD}$	$B/B_0 = 50\%$ $\bar{\varnothing} \pm 1 \text{ SD}$ (nmol/l)	K_a $\bar{\varnothing} \pm 1 \text{ SD}$ (10^9 M^{-1})
Testosteron n = 5	1	-	21 ± 4,6	3,19 ± 0,320
$1\alpha\text{-DHT-C}_6\text{-NH}_2$ n = 6	0,52 ± 0,112	0,483 ± 0,041	42 ± 5,8	1,4 ± 0,320
$17\alpha\text{-DHT-C}_2\text{-NH}_2$ n = 4	0,0063 ± 0,00051	0,44 ± 0,024	3853 ± 634	0,013 ± 0,079
$17\alpha\text{-DHT-C}_3\text{-NH}_2$ n = 4	0,0098 ± 0,0019	0,48 ± 0,01	2621 ± 322	0,022 ± 0,0039
$17\alpha\text{-DHT-C}_9\text{-NH}_2$ n = 4	0,006 ± 0,0001	0,40 ± 0,0058	3129 ± 351	0,015 ± 0,0010

Tab. 12: RBA-Werte, B/B_0 -Werte und Assoziationskonstanten der Amino-DHT-Derivate im Vergleich.

5.3. Auswertung der Biosensor-Messungen

5.3.1. Datenprozessierung und Sensorgramm

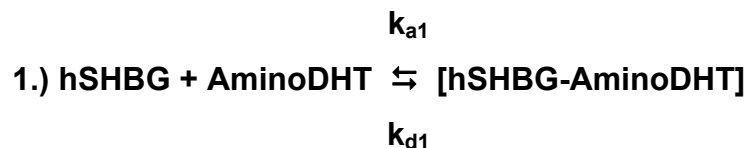
Zunächst wurden die Rohdaten mittels BIAevaluation 3.0 bearbeitet. Ausgewertet wurden die Sensorgramme, die sich nach Subtraktion der Referenzzelle FC1 von der Messzelle FC2 ergaben. Dadurch wurden unspezifische Signale eliminiert, welche durch den kontinuierlichem Fluss von Substanzen über die Oberfläche und durch die Substanzinjektion zu Beginn einer Messung entstanden.

Dann erfolgt das „Fitting“, die Anpassung der Sensorgramme, indem man die wichtigsten Punkte auf dem Sensorgramm manuell markierte. Man wählte den Injektionsstart von hSHBG (Position 1 in Abb. 5), die Assoziationsphase (Positionen 2-3 in Abb. 5) in dem Bereich der Kurve, der eine konstante Steigung aufwies, die Dissoziationsphase (Position 5-6 in Abb. 5), nach Stopp der Injektion (Position 4 in Abb. 5) von hSHBG und Umschalten auf kontinuierlichen Fluss, in dem sich hSHBG wieder von den Steroiden auf der Chipoberfläche ablöste und den Stoppunkt der Messung (Position 7 in Abb. 5). Anhand dieser Marken berechnete die

Auswertesoftware zunächst das wahrscheinlichste Bindungsmodell der Reaktanden. Zur Auswahl standen dabei die aus der Theorie der dynamischen Reaktionskinetik an festen Oberflächen möglichen Szenarien:

- 1:1 – Bindung (nach Langmuir)
- 1:1 – Bindung mit Massentransferanteil des löslichen Reaktionspartners an eine hochaffine Oberfläche (mit hoher Ligandendichte)
- bivalente Bindung
- Bindung mit konsekutiver konformationeller Strukturänderung

Aus den Sensorgrammen mit immobilisierten Steroiden und löslichem hSHBG ergaben sich aus einem globalen Fitting einheitlich nur das Fittingmodell „Bivalent analyse“. Die einzelnen Assoziations- und Dissoziationsraten waren daraus für die 1. und anschließende 2. Bindungsreaktion ableitbar.



Somit erhielt man für den jeweiligen Reaktionsschritt die Assoziationskonstanten K_{a1} (M^{-1}) und K_{a2} (RU^{-1}). Es gilt: $K_{a1} = (k_{a1} / k_{d1})$ und $K_{a2} = (k_{a2} / k_{d2})$.

Der Beschreibung der Geschlossenheit eines Angleichungsprozesses diene χ^2 , eine statistische Prüfgröße, welche bei der Auswertung der Sensorgramme vom Auswertungsprogramm nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\chi^2 = \sum_1^n (r_f - r_x) / (n - p)$$

r_f gefitteter Wert an einem gegebenen Punkt

r_x experimenteller Wert am gleichen Punkt

n Anzahl der Datenpunkte

p Anzahl der gefitteten Parameter

$n - p \approx n$ (Anzahl der Datenpunkte \gg Anzahl der gefitteten Punkte)

Es können χ^2 -Werte $\leq |5|$ akzeptiert werden. Die Form der gefitteten Kurve und die Residualwerten geben Aufschluss über die Qualität der Messung [17 (C.1.4), 18 (A.5.1)].

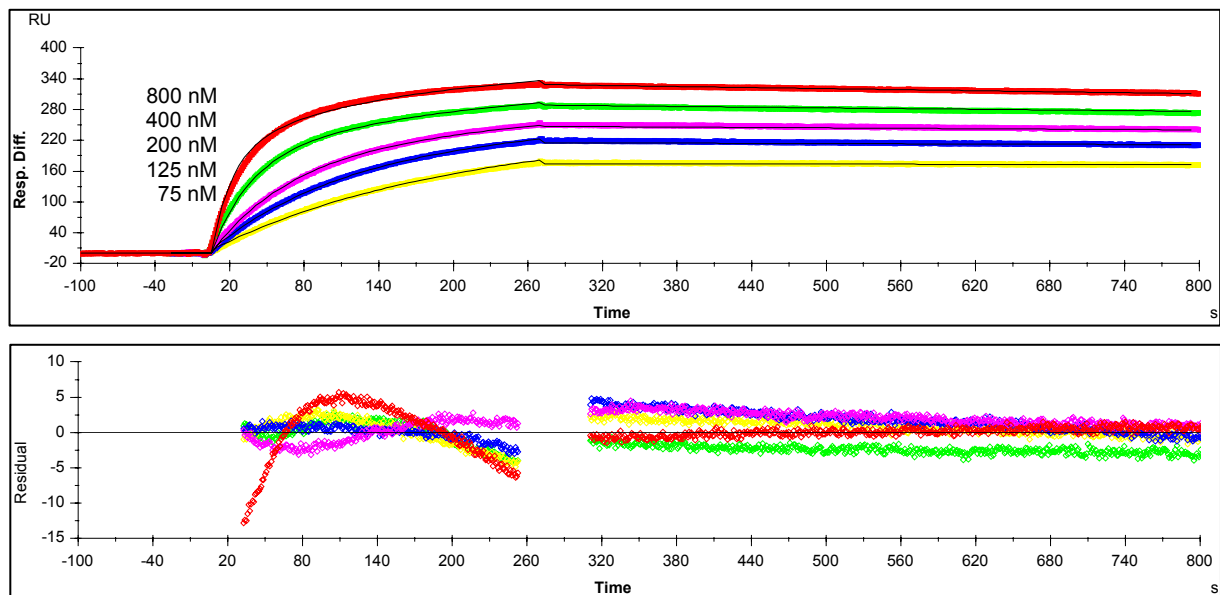


Abb. 16: Reaktion von 1α -DHT- C_6 - NH_2 mit hSHBG auf einem B1-Chip. Im oberen Ausschnitt erkennt man die typischen Anbindungskurven. Im Ausschnitt darunter sind Residualwerte für die Assoziations- und Dissoziationsphase im „Bivalent-Analyte“-Modell dargestellt. hSHBG-Zugabe: 75-800 nM, ($n = 5$).

Je näher sich die Residualwerte an der Nulllinie befanden und je geringer die Streuung war, umso deutlicher entsprach das angewandte Reaktionsmodell dem tatsächlichen Reaktionsgeschehen auf der Chipoberfläche. Ausreißer zu Beginn bzw. am Injektionsstopp einer Messung konnten in den meisten Fällen auf Injektionsartefakte zurückgeführt werden [139 (S. 2468)].

5.3.2. Bindungskurven der Amino-Dihydrotestosteron-Derivate

5.3.2.1. 17α -DHT- C_3 - NH_2

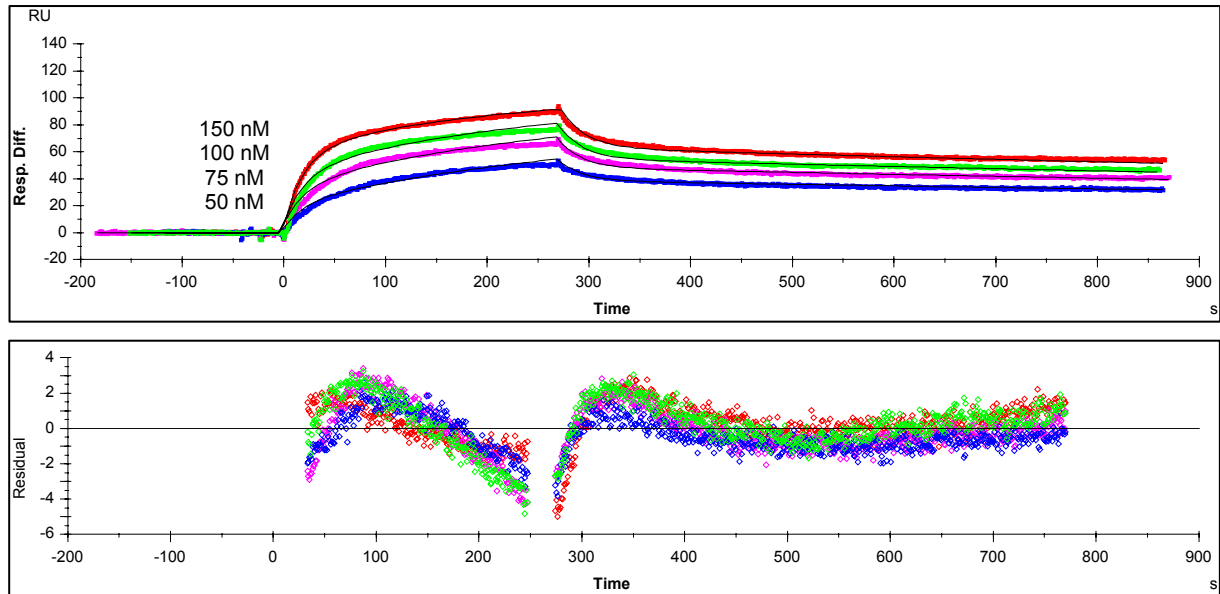


Abb. 17: 17α -DHT- C_3 - NH_2 immobilisiert auf einen B_1 -Sensorchips. Der Kurvenverlauf zeigt die Assoziation und Dissoziation von hSHBG an den Aminosteroiden auf der Sensoroberfläche und darunter die Residualwerte. hSHBG-Zugabe: 50-150 nM, (n = 4).

5.3.2.2. 17α -DHT- C_6 - NH_2

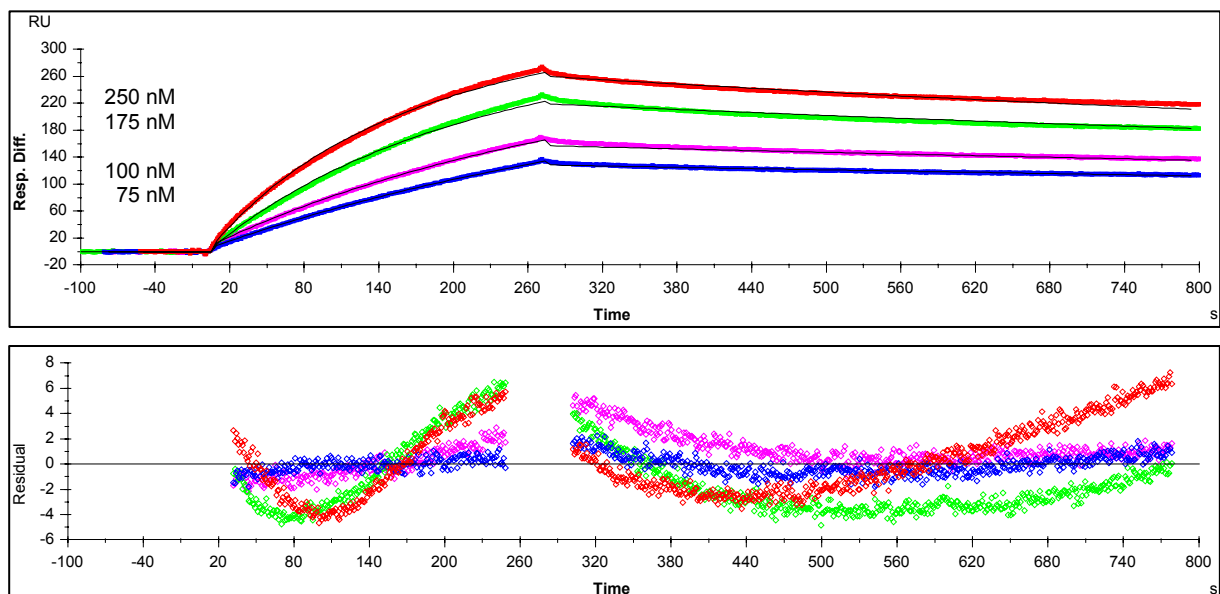


Abb. 18: 17α -DHT- C_9 - NH_2 immobilisiert auf B_1 -Sensorchips. Der Kurvenverlauf zeigt die Assoziation und Dissoziation von hSHBG an den Aminosteroiden auf der Sensoroberfläche und darunter die Residualwerte. hSHBG-Zugabe: 125-250 nM, ($n = 4$).

5.3.2.3. 1α -DHT- C_6 - NH_2

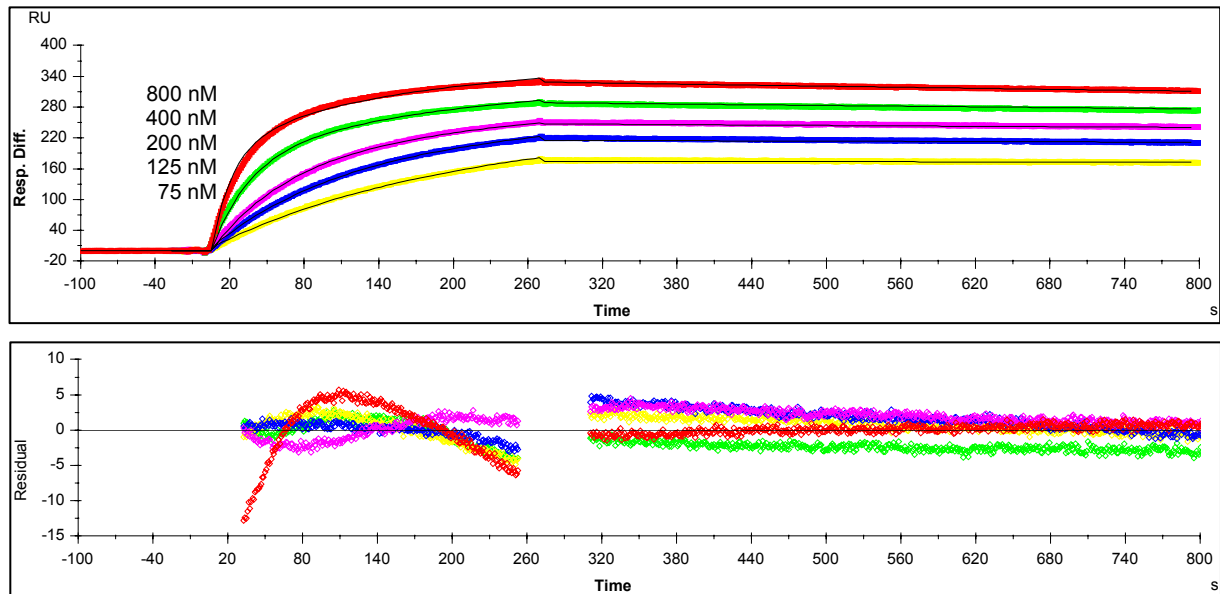


Abb. 19: 1α -DHT- C_6 - NH_2 immobilisiert auf B_1 -Sensorchips. Der Kurvenverlauf zeigt die Assoziation und Dissoziation von hSHBG an den Aminosteroiden auf der Sensoroberfläche und darunter die Residualwerte. hSHBG-Zugabe: 75-800 nM, ($n = 4$).

Es wurde eine vergleichende Fitting-Analyse mittels der Auswertungssoftware für die Interaktion der Aminosteroide 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($c[hSHBG] = 50$ bis 150 nM), 17α -DHT- C_6 - NH_2 ($c[hSHBG] = 25$ bis 250 nM) und 1α -DHT- C_6 - NH_2 ($c[hSHBG] = 25$ bis 800 nM) mit hSHBG bei $25^\circ C$ und einer Versuchanzahl von $n = 4$ pro Steroid durchgeführt. Vergleich man explizit die Response-Werte am Ende der Assoziationsphase der drei Substanzen für einzelne Konzentrationen an hSHBG untereinander, so konnte man bereits eine Tendenz bezüglich der Stärke der Steroid-Protein-Wechselwirkung auf der Chipoberfläche erkennen. Bei einer Konzentration von 50 nM hSHBG lag der Response-Wert für 17α -DHT- C_3 - NH_2 bei ca. 50 RU, für 17α -DHT- C_6 - NH_2 bei ca. 90 RU und für 1α -DHT- C_6 - NH_2 bei ca. 200

RU, für 100 nM hSHBG bei 80 RU zu 140 RU zu 166 RU und für 150 nM hSHBG bei 100 RU zu 180 RU zu 200 RU. Das belegte, dass 1α -DHT- C_6 - NH_2 im Vergleich zu 17α -DHT- C_6 - NH_2 und 17α -DHT- C_3 - NH_2 die stärkste Steroid-Protein-Wechselwirkung mit hSHBG in Bezug auf das Response-signal am Ende der Assoziationsphase zeigte.

5.3.3. Thermodynamische Auswertung

Wie unter 5.3.1. bereits erwähnt standen vier mögliche kinetische Modelle zur Verfügung. Auf Grund der niedrigen χ^2 -Werte der globalen Fitting-Analyse für die drei Liganden, war das Bivalent analyte-Modell dasjenige, welches mit höchster Wahrscheinlichkeit dem wahren Reaktionsgeschehen auf der Chipoberfläche entsprach.

	k_{a1} ($10^4 M^{-1}s^{-1}$) $x \pm 1 SD$	k_{d1} ($10^{-3} s^{-1}$) $x \pm 1 SD$	k_{a2} ($10^{-3} RU^{-1}s^{-1}$) $x \pm 1 SD$	k_{d2} ($10^{-3} s^{-1}$) $x \pm 1 SD$	K_{a1} ($10^7 M^{-1}$) $x \pm 1 SD$	K_{a2} ($10^{-1} RU^{-1}$) $x \pm 1 SD$	χ^2 $x \pm 1 SD$
17α-DHT-C_3-NH_2	3,69	25,2	0,05	0,18	0,156	3,05	1,65
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
n = 4	0,79	9,11	0,02	0,03	0,044	1,59	0,42
17α-DHT-C_6-NH_2	0,91	0,55	11,9	674	1,64	0,15	4,63
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
n = 4	0,24	0,08	13,9	160	0,236	0,14	0,36
1α-DHT-C_6-NH_2	2,15	0,18	24,7	323	11,7	0,67	4,64
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
n = 4	0,60	0,02	36,4	291	2,12	0,42	1,71

Tab. 13: Kinetische und thermodynamische Parameter

Die thermodynamischen Parameter sind in Tab. 13 dargestellt. Aus den Assoziations- und Dissoziationsraten konnte schließlich die Assoziationskonstante K_{a1} (M^{-1}) für den 1. Reaktionsschritt der vermuteten bivalenten Interaktion von hSHBG mit den Amino-DHT-Derivaten errechnet werden. Die Assoziationskonstante für 1α -DHT- C_6 - NH_2 ($1,2 \times 10^8 M^{-1}$) war dabei deutlich höher, als die Werte für 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($1,6 \times 10^6 M^{-1}$) und 17α -DHT- C_6 - NH_2 ($16 \times 10^6 M^{-1}$).

6. Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Studie der Wechselwirkung von hSHBG mit seinen Liganden wurden mittels Gleichgewichtsmessungen in Lösung und Surface Plasmon Resonance-Biosensorik (Oberflächenplasmonresonanz/SPR) verschiedene Amino-DHT-Derivate untersucht. Das Ziel war es Steroidhormone zu finden, die als immobilisierte Liganden auf der Chipoberfläche in Wechselwirkung mit hSHBG treten. Mittels kinetischer Daten über Assoziation und Dissoziation von hSHBG sollte eine funktionelle Charakterisierung der Anbindung von Sexualhormonen an hSHBG erfolgen.

6.1. Strukturvergleich der Steroidhormonderivate mit Testosteron und DHT

Hohe Affinität zu hSHBG haben nur Steroidhormone mit einer Ringstruktur aus 18 bzw. 19 C-Atomen mit der strukturellen Bedingung, dass zwischen Ring A und Ring B eine planare „trans“-Konfiguration vorliegt [84 (S. 65), 120 (S. 57)]. Zusätzlich müssen die Sexualhormone eine Hydroxylgruppe in β -Konfiguration am C-Atom 17 im D-Ring haben [13 (S. 637), 21 (S. 10622)]. Diese funktionelle Gruppe ist erforderlich, damit der Ligand mit hSHBG interagieren kann. Eine Keton- oder Hydroxylgruppe an C-Atom 3 im A-Ring fördert die Affinität zur Steroidbindungsstelle. Die Hydroxylfunktion kann sowohl α -, als auch β -konfiguriert sein [22 (S. 227)]. Die optimalen Liganden für hSHBG sind demnach Testosteron und 5α -DHT.

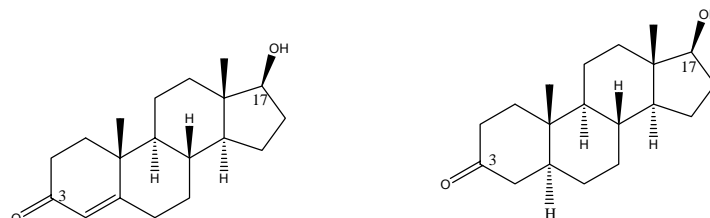


Abb. 20: Strukturen von Testosteron und 5α -DHT

Die synthetisierten Steroidhormonderivate sollten daher möglichst ähnliche Eigenschaften wie Testosteron oder 5α -DHT aufweisen und zusätzlich eine Gruppe oder Kette am Steroidgerüst besitzen, die eine kovalente Anbindung an die

Chipoberfläche ermöglicht, ohne die Bindung an hSHBG durch sterische Faktoren zu behindern. Als besonders günstige Positionen für solche Seitenketten erwiesen sich dabei die Positionen 7α , 17α und 1α [88 (S. 629), 89 (S. 537), 128 (S. 13735), 189 (S. 718)].

Abb. 2 und 23 zeigen die Amino-DHT-Derivate mit typischem 5α -DHT-Gerüst und jeweils unterschiedlich langen Aminketten an C-Atom 17 in α -Position (C17) und 1 in α -Position (C1). Damit waren gute Voraussetzungen zur Bindung an hSHBG und gleichzeitig zur Immobilisation auf Biosensoroberflächen mit Carboxymethyl-Dextranmatrix im gegeben.

6.2. Assoziationskonstante (K_a - Wert) von Testosteron

Die aus den in den Gleichgewichtsmessungen erhaltenen Scatchard-Plots ergab sich eine Assoziationskonstante K_a von Testosteron für affinitätschromatographisch gereinigtes hSHBG von $3,19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C .

Dieser Wert stimmte gut mit den in der Literatur angegebenen überein:

Dunn und Nisula gaben eine Assoziationskonstante von Testosteron für Serum-hSHBG von $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C an [48 (S. 58)]. Martin fand eine Assoziationskonstante von Testosteron für dialysiertes hSHBG von $0,37 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 20°C [126 (S. 429)]. Bei Vigersky lag sie von Testosteron für dialysiertes hSHBG bei $3,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C und bei $0,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 0°C [218 (S. 899)]. Die Werte von Mappus und Grenot lagen bei $0,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ für Testosteron für chromatographisch gereinigtes hSHBG bei einer Temperatur von 22°C [124 (S. 459)].

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass die Werte zum einen von der Reinheit des verwendeten hSHBG und zum anderen von der Temperatur abhängen. Somit lässt sich der Unterschied von K_a für Testosteron für hochreines hSHBG, ermittelt bei einer Temperatur von 37°C , im Vergleich zu den Literaturangaben erklären, die bei anderen Temperaturen und/oder mit unterschiedlichen hSHBG-Aufbereitungen ermittelt wurden.

6.3. RBA-Werte unter Gleichgewichtsbedingungen

Die strukturell ähnlichen 5α -DHT-Aminoderivate 17α -DHT- C_2 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 3853$, $n = 4$), 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 2621$, $n = 4$) und 17α -DHT- C_9 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 3129$, $n = 4$) zeigten im Verdrängungsassay unter Gleichgewichtsbedingungen im Vergleich zu Testosteron ($B/B_{0/50\%} = 21$, $n = 5$) eine relativ gute Bindung an hSHBG und reagierten nahezu gleich. 1α -DHT- C_6 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 42$, $n = 6$) dagegen ist ein hervorragender Bindungsligand, was sich in der Berechnung der Assoziationskonstanten bestätigte. Diese lag für 1α -DHT- C_6 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 42$, $n = 6$) bei $1,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bei 37°C und damit im Bereich von Testosteron selbst. Die K_a -Werte von 17α -DHT- C_2 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 3853$, $n = 4$, $K_a = 0,013 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 2621$, $n = 4$, $K_a = 0,022 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) und 17α -DHT- C_9 - NH_2 ($B/B_{0/50\%} = 3129$, $n = 4$, $K_a = 0,015 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) lagen deutlich niedriger.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die funktionellen Seitenketten unterschiedlicher Länge und chemischer Zusammensetzung in Position 17α von der Steroidbindungsdomäne des hSHBG-Moleküls gut toleriert werden [73 (S. 32086), 88 (S. 629), 128 (S. 13735)]. Entscheidend ist die Position des Steroidgerüsts von 5α -DHT, an der die Seitenketten angebracht werden und die β -ständige 17-Hydroxyfunktion.

6.4. Warum das „Bivalent-Analyte“ - Modell?

Bisher hatte man angenommen [87 (S. 298), 154 (S. 699), 156 (S. 191), 157 (S. 735)], dass homodimeres hSHBG nur eine aktive Steroidbindungsdomäne, wie von Petra postuliert, besitzt. Dieses Modell besagt, dass ein Steroid in einer Bindungstasche pro hSHBG-Dimer gebunden wird. Das Postulat bedeutet, dass das Steroid sandwich-artig oben und unten von je einem hSHBG-Monomerern eingeschlossen werden musste (siehe Abb. 21). In einem alternativen Modell von Petra ging man vom gleichen Bindungsverhältnis aus, glaubte jedoch, dass die Bindung eines Steroids an einer Untereinheit hSHBG eine Konformationsänderung bewirkt und die Steroidbindungsstelle so vor weiterer Bindung durch andere Steroide schützt [154 (S. 10), 157 (S. 735)].

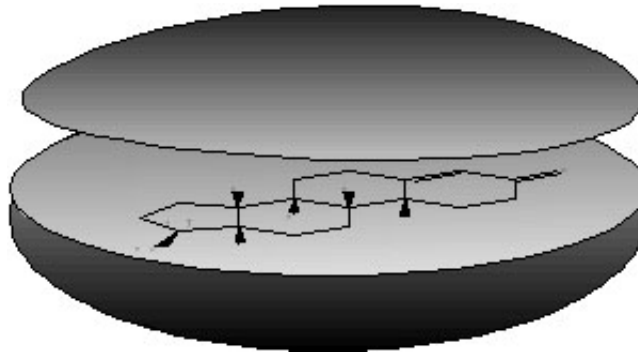


Abb. 21: Bindung von 1mol Steroid an die Steroidbindungsdomäne im dimeren Interface.

Dieses Konzept wurde mittels zahlreicher Gleichgewichtsmessungen mit radioaktiven steroidaligen Liganden, einschließlich Scatchard-Plots, bei unterschiedlichen Temperaturen und mit unterschiedlichen hSHBG-Präparationen, respektive Serumproben, etabliert [84 (S. 65)].

Neue Röntgenstrukturdaten des hSHBG von Grishkovskaya zeigten jedoch, dass jedes Monomere hSHBG fähig ist, ein Steroid in einer speziellen Bindungstasche im Bereich der Laminin-G-ähnlichen-Domäne zu binden. Avvakumov zeigte zudem, dass zur Dimerisierung unfähige hSHBG-Varianten eine Bindungsdomäne besitzen, die gleiche Affinität und Spezifität wie der Wild-Typ besitzen [6 (S. 34453), 72 (S. 621), 73 (S. 32086)]. Aus diesen neuen Daten resultierte eine Bindungsstöchiometrie für hSHBG von zwei Untereinheiten plus zwei steroidale Liganden.

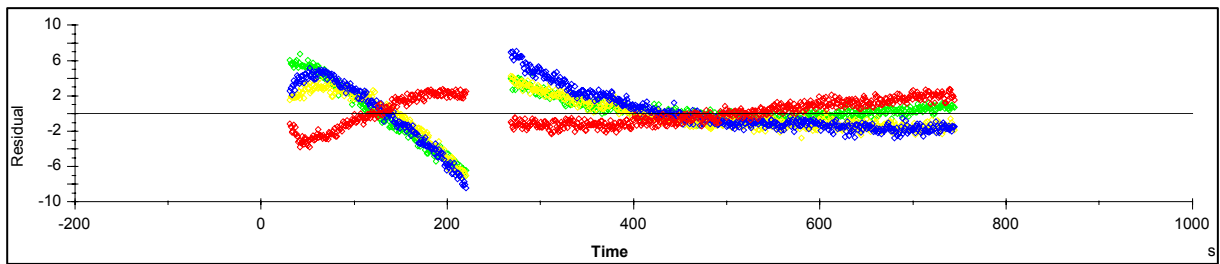
Zur funktionellen Überprüfung dieser Theorien musste zunächst ein globales Fitting der Biosensorgramme vorgenommen werden, welches die möglichen Szenarien Bindungskinetik berücksichtigt:

- 1:1 – Bindung (nach Langmuir)
- 1:1 – Bindung mit Massentransferanteil des löslichen Reaktionspartners an eine hochaffine Oberfläche (mit hoher Ligandendichte)
- bivalente Bindung
- Bindung mit konsekutiver konformationeller Strukturänderung

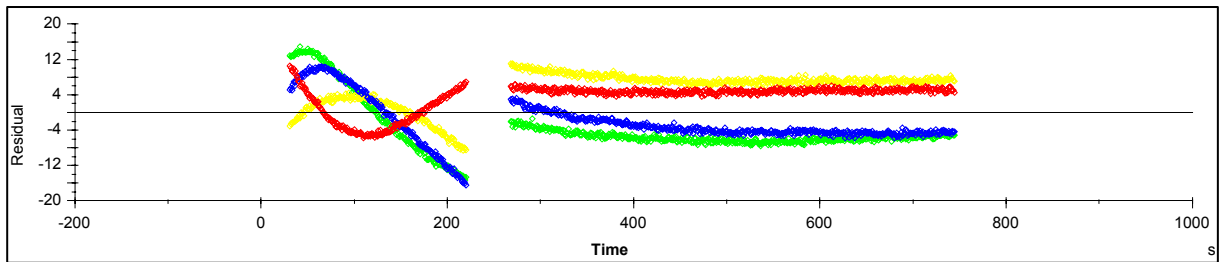
Abb. 22 a-d zeigt, dass der Fitting-Algorithmus bei den Modellen „Langmuir-binding (1:1)“ und „two state reaction (with conformational change)“ die Sensorgramme nicht kongruent approximiert. Daher lagen die Residualwerte bei beiden genannten Modellen in weiten Bereichen der Assoziationsphase deutlich über dem statistischen Grenzwert von ± 10 um die Nulllinie ($\chi^2 = 64$ „langmuir-binding (1:1)“ und $\chi^2 = 32$ „two state reaction (with conformational change)“).

In Abb. 25 c. erkennt man, dass bei der Auswertung mit dem „bivalent-analyte“-Modell alle geforderten Bedingungen erfüllt waren: Die Auswertung erkannte die Sensorgramme nahezu deckungsgleich, die Residualwerte liegen maximal ± 9 um die Nulllinie ($\chi^2 = 3$). Die selben Veränderungen waren bei der Auswertung der B1-Chips mit immobilisiertem 17α -DHT-C₂-NH₂, 17α -DHT-C₃-NH₂ und 17α -DHT-C₉-NH₂ beobachtbar. Daraus ist zu schließen, dass sowohl das Versuchsdesign des B1-Chips, als auch das Bindungsmodell realitätsnah gewählt waren.

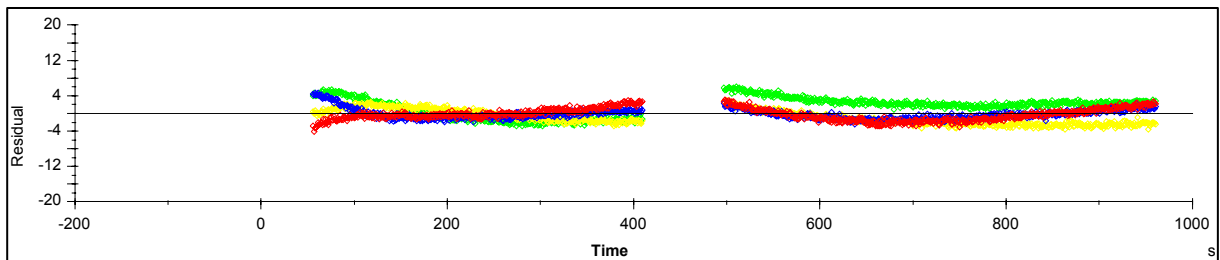
a, ($\chi^2 = 54$)



b, ($\chi^2 = 54$)



c, ($\chi^2 = 3$)



d, ($\chi^2 = 32$)

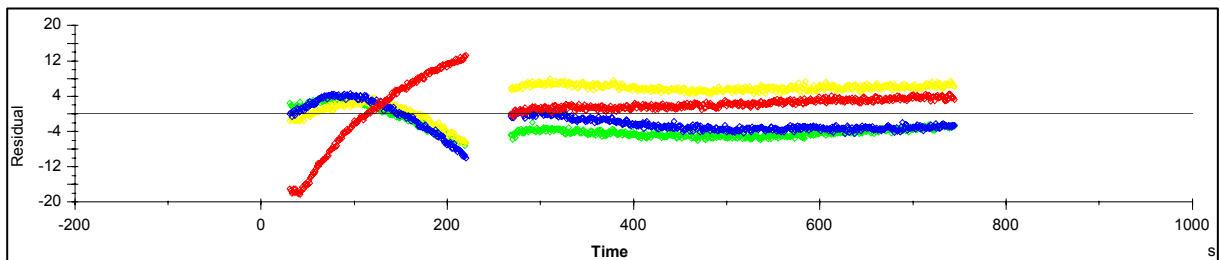


Abb. 22. a-d.: Residualwerte, erhalten aus einer globalen vergleichenden Fitting-Analyse der hSHBG-Sensorgramme. Injektion unterschiedlicher Konzentrationen an hSHBG auf eine B1-Chipoberfläche mit einem amingekoppeltem 1a-DHT-Derivat. Die kinetischen Modelle sind 1:1 – Bindung (nach Langmuir) (a), 1:1 – Bindung mit Massentransferanteil des löslichen Reaktionspartners an eine hochaffine Oberfläche (mit hoher Ligandendichte) (b), bivalente Bindung (c), Bindung mit konsekutiver konformationeller Strukturänderung (d).

Die hSHBG-Lösung wurde mit PNGase vorbehandelt, wodurch die Kohlenhydratseitenketten abgespalten und so Wechselwirkungen dieser mit der Carboxymethyl-Dextran-Matrix auf der Chipoberfläche verhindert wurden, was u.U. zu einer erhöhten Dissoziationsrate geführt hätte.

Die Seitenketten der kovalent und in niedriger Dichte auf der Carboxymethyldextran-Matrix des B1-Chips gebundenen Amino-DHT-Derivate ermöglichten eine hervorragende Interaktion der gegenüberliegenden funktionellen Gruppen an Position 17 und 3 des Steroidderivats mit der Steroidbindungsdomäne am hSHBG. Die optimale sterische Interaktion der immobilisierten Liganden und des gelösten hSHBG wurde durch die außerordentlich hohe Flexibilität der polymerisierten Dextranmatrix gewährleistet, welche ca. 100 nm aus der Chipoberfläche herausragt.

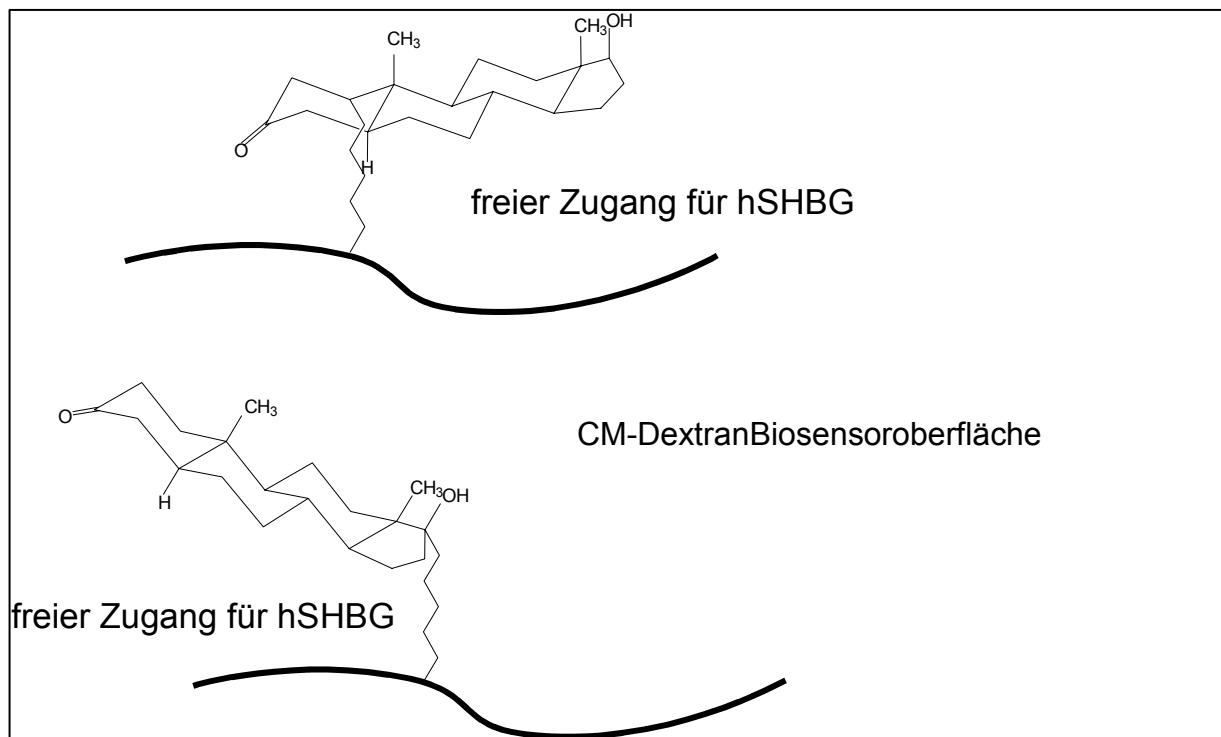


Abb. 23.: Sterische Verhältnisse auf der CM-Dextran-Sensoroberfläche für 17 α - und 1 α -Amino-DHT-Derivate.

Das ermöglicht ein lokales Arrangement von zwei immobilisierten Liganden in der Art und Weise, dass sie gleichzeitig an die End-zu-End-konfigurierte Bindungsstelle am hSHBG binden könnten, woraus höhere Sensorsignale für Anbindung und Abspaltung resultieren.

6.5. Thermodynamischen Bindungswerte, erhalten im Biosensorsystem

Die initiale intermolekulare Bindung wurde durch die Affinitätskonstante K_{a1} mit der Dimension M^{-1} definiert. Die Affinitätskonstante für das zweite Bindungsereignis auf der Chipoberfläche ist K_{a2} mit der unkonventionellen Einheit RU^{-1} , weil die zweite Assoziationsratenkonstante k_{a2} in $RU^{-1}s^{-1}$ ausgedrückt wurde, nachdem die Konzentration des initial gebundenen Komplexes, der an einen Liganden auf der Chipoberfläche bindet (hSHBG-Amino-DHT), während des Anpassungsprozesses aus den gemessenen RU-Werten berechnet wurde. Die Gesamt-Affinitätskonstante resultierte folglich aus der Summe der freien Energieänderungen, die während der beiden Bindungsvorgänge auftraten. Somit errechnete sich die Affinitätskonstante K_a aus dem Produkt der beiden Bindungskonstanten K_{a1} und K_{a2} ($K_a = K_{a1} \times K_{a2}$) mit der Einheit $M^{-1}RU^{-1}$. Die Oberflächenkapazität für die drei Amino-DHT-Liganden wurde mit 100-200 RU berechnet. Vergleicht man die Assoziationskonstanten aus den Biosensormessungen mit denen aus den Gleichgewichtsmessungen, muss man sie mit 150 multiplizieren. Die kinetischen Werte der Wechselwirkungen des ersten Reaktionsschrittes mit dem Komplex (hSHBG-Amino-DHT) waren für alle drei Amino-DHT-Liganden ähnlich. Die Dissoziationsraten k_{d1} waren hingegen hoch für 17α -DHT- C_3 - NH_2 , mittel für 17α -DHT- C_6 - NH_2 und niedrig für 1α -DHT- C_6 - NH_2 (Tab. 14), was die stärkere Bindungsaffinität von 1α -DHT- C_6 - NH_2 erklärt. Im zweiten Reaktionsschritt bindet der hSHBG-AminoDHT-Komplex an einen weiteren immobilisierten Amino-DHT-Liganden und bildet einen divalenten Komplex (hSHBG(Amino-DHT)₂). Für diesen zweiten Schritt waren sowohl die Assoziationsraten k_{a2} , als auch die Dissoziationsraten k_{d2} für 1α -DHT- C_6 - NH_2 am höchsten, mit abnehmender Tendenz für 17α -DHT- C_3 - NH_2 und 17α -DHT- C_6 - NH_2 .

7. Zusammenfassung

hSHBG (humanes Steroidhormon-bindendes Globulin) ist ein ca. 95 kD schweres Transportprotein der β -Globulin-Fraktion, das ca. 70-80% der im Blut frei zirkulierenden Sexualhormone mit hoher Affinität und Spezifität bindet. Für diese Bindung der Steroide an hSHBG existieren mehrere Theorien. Petra postuliert, dass ein Steroid in einer Bindungstasche pro hSHBG-Dimer gebunden wird [87 (S. 299), 155 (S. 699), 156 (S. 191), 157 (S. 740)]. Das neueste Modell von Grishkovskaya aus dem Jahre 2000 zeigt, dass jedes Monomere hSHBG fähig ist, ein Steroid in einer spezifischen Bindungstasche zu binden [6 (S. 34454), 72 (S. 621), 73 (S. 32086)].

In der vorliegenden experimentellen Studie wurden mittels Gleichgewichtsmessungen in Lösung und Surface Plasmon Resonance-Biosensorik (Oberflächenplasmonresonanz/SPR) verschiedene Amino-DHT-Derivate in ihrer Wechselwirkung mit hSHBG untersucht. Ziel war es, Steroidhormone zu finden, die als immobilisierte Liganden auf der Chipoberfläche in Wechselwirkung mit hSHBG treten. Mittels kinetischer und thermodynamischer Daten über Assoziation und Dissoziation der Liganden, sollte eine funktionelle Charakterisierung der Anbindung von Sexualhormonen an hSHBG erfolgen.

Die Gleichgewichtsmessungen wurden mit den 1α - und 17α -DHT-Aminderivaten 1α -DHT- C_6 - NH_2 , 17α -DHT- C_2 - NH_2 , 17α -DHT- C_3 - NH_2 und 17α -DHT- C_6 - NH_2 bei $37^\circ C$ durchgeführt. Die Stärke der Bindungsfähigkeit der Liganden an hSHBG wurde mittels der Parameter $B/B_{0(50\%)}$ und K_a (Assoziationskonstante) im Vergleich zu Testosteron ($B/B_{0(50\%)} = 21 \pm 4,6$ nmol/l, $K_a = 3,19 \pm 0,320 \times 10^7$ M^{-1}) angegeben. Der am stärksten bindende Partner an hSHBG war 1α -DHT- C_6 - NH_2 ($B/B_{0(50\%)} = 42$ nmol/l, $K_a = 1,4 \times 10^9$ M^{-1}), welches knapp 100 mal stärker an hSHBG band als die 17α -Amino-DHT-Derivate 17α -DHT- C_2 - NH_2 ($B/B_{0(50\%)} = 3853$ nmol/l, $K_a = 1,3 \times 10^7$ M^{-1}), 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($B/B_{0(50\%)} = 2621$ nmol/l, $K_a = 2,2 \times 10^7$ M^{-1}) und 17α -DHT- C_6 - NH_2 ($B/B_{0(50\%)} = 3129$ nmol/l, $K_a = 1,5 \times 10^7$ M^{-1}). 1α -DHT- C_6 - NH_2 zeigte gleichzeitig eine deutlich höhere Assoziationskonstante K_a für die Bindung an hSHBG als die 17α -Amino-DHT-Derivate. Dies war ein Beleg dafür, dass die Position der Seitenkette am DHT-Derivat in sterischer Hinsicht wichtig für die Bindung an hSHBG ist.

Mit der SPR-Biosensorik wurden die Bindungseigenschaften von 1α - und 17α -Amino-DHT-Derivaten 1α -DHT- C_6 - NH_2 , 17α -DHT- C_3 - NH_2 und 17α -DHT- C_6 - NH_2 an hSHBG auf einer hochflexiblen polymerisierten Carboxymethyl-Dextranmatrix untersucht. Die Assoziationskonstante K_{a1} (M^{-1}) für den 1. Reaktionsschritt der bivalenten Interaktion von hSHBG mit den Amino-DHT-Derivaten betrug für 1α -DHT- C_6 - NH_2 $1,2 \times 10^8 M^{-1}$ und war dabei deutlich höher als die Werte für 17α -DHT- C_3 - NH_2 ($1,6 \times 10^6 M^{-1}$) und 17α -DHT- C_6 - NH_2 ($16 \times 10^6 M^{-1}$).

Der Vergleich der Assoziationskonstanten aus beiden Methoden, Gleichgewichtsmessung und Biosensorik, zeigte dass die Werte für 17α -DHT- C_6 - NH_2 ($K_a = 1,5 \times 10^7 M^{-1}$, $K_{a1} = 16 \times 10^6 M^{-1}$) nahezu identisch sind. Der K_a -Wert von 17α -DHT- C_3 - NH_2 aus den Verdrängungsassays ($2,20 \times 10^7 M^{-1}$) war höher als der K_{a1} -Wert aus den Biosensorversuchen ($0,16 \times 10^7 M^{-1}$). Das 1α -DHT-Aminoderivat lieferte ebenfalls einen weitaus höheren K_a -Wert aus dem Verdrängungsassay ($140 \times 10^7 M^{-1}$). In den SPR-Biosensorversuchen lag der K_{a1} -Wert für das 1α -DHT-Aminoderivat mit $11,7 \times 10^7 M^{-1}$ nur bei etwa 10% des Wertes aus den Gleichgewichtsmessungen.

Zusammenfassend konnte mittels Oberflächenplasmonresonanz die bivalente Interaktion von hSHBG mit 1α - und 17α -Amino-DHT-Derivaten gezeigt werden. Diese Ergebnisse bestätigten somit die Präsenz von zwei aktiven Bindungsstellen am hSHBG, wie es Grishkovskya et al. [72 (S. 621), 73 (S. 32086)] mittels röntgen-christallographischer Analysen und Avvakumov et al. [6 (S. 34453)] mittels Bindungsstudien an hSHBG-Monomeren, die nicht zur Dimerisierung fähig waren, zeigen konnten.

Die Ergebnisse zeigen, dass 1α - und 17α -Amino-DHT-Derivate geeignete, den physiologischen Bindungspartnern an hSHBG ähnliche Liganden darstellen, die immobilisiert auf der Oberfläche eines Biosensors eine Analyse der kinetischen Wechselwirkung zwischen Steroid und hSHBG ermöglichen und dadurch funktionelle Schlussfolgerungen bzgl. der Strukturoptimierung von hSHBG-Liganden zulassen.

8. Abkürzungen

ABP	Androgen bindendes Protein
ADP	Adenosindiphosphat
Asn	Asparagin
ATP	Adenosintriphosphat
BIA	biospecific interaction analysis
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CBG	Corticoid-bindendes Globulin
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
ConA	Concanvalin A
Cys	Cystein
D	Dalton
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E ₂	17 β -Estradiol
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GDP	Guanosindiphosphat
GNRP	Guanonucleotid Releasing Faktor
G-Proteine	Guaninnucleotid-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat
His	Histidin
hSHBG	humanes Steroidhormon-bindendes Globulin
HWZ	Halbwertszeit
IRMA	Immunradiometrischer Assay
K _a	Assoziationskonstante
kD	Kilodalton
LH	Luteinisierendes Hormon, Lutropin
LH-RH	Lutropin-Releasinghormon
Lys	Lysin
M	mol/l, molar
Met	Methionin
mM	mmol/l, 10 ⁻³ mol/l, millimolar

μM	μmol/l, 10 ⁻⁶ mol/l, mikromolar
N	Stickstoff
nM	nmol/l, 10 ⁻⁹ mol/l, nanomolar
O	Sauerstoff
pg/ml	10 ⁻¹² g/ 10 ⁻³ l, Pikogramm pro Milliliter
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
RBA	relative binding association
RU	relative Units
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	Surface Plasmon Resonance – Oberflächenplasmonresonanz
T	Testosteron
Thr	Threonin
UE	Untereinheit

9. Danksagung

Die vorliegende Arbeit hätte ohne die Unterstützung und Hilfe, die mir von vielen Seiten zuteil wurde, nicht realisiert werden können.

Mein Dank gilt an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Peter B. Lupp, der das Thema gestellt und die Arbeit als Dissertation angenommen hat und mir die nötige Infrastruktur bereitgestellt hat.

Des weiteren gilt mein Dank Dr. rer.-nat. Jochen Metzger, der mit zahlreichen Anregungen den Fortgang der Arbeit gefördert hat.

Für beständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in technischen Fragen danke ich Manuela Meyer, Ingrid Schwab und Edith Dürmeier.

10. Literaturverzeichnis

1. Adamczyk, M., Chen, Y.Y., Gebler, J.C., Johnson, D.D., Mattingly, P.G., Moore, J.A., Reddy, R.E., Wu, J., Yu, Z. Evaluation of chemiluminescent estradiol conjugates by using a surface plasmon resonance detector. *Steroids* **65**, 295-303 (2000).
2. Allen, N. E., Appleby, P. N., Davey, G. K. & Key, T. J. Hormones and diet: low insulin-like growth factor-I but normal bioavailable androgens in vegan men. *Br J Cancer* **83**, 95-7 (2000).
3. Anderson, D. C., Lasley, B. L., Risher, R. A., Shepherd, J. H., Newman, L., Hendrickx, A. G. Transplacental gradients of sex-hormone-binding globulin in human and simian pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **5**, 657-69 (1976).
4. Anderson, D. C. Sex-hormone-binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf)* **3**, 69-96 (1974).
5. Anstead, G. M., Carlson, K. E. & Katzenellenbogen, J. A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62**, 268-303 (1997).
6. Avvakumov, G. V., Grishkovskaya, I., Muller, Y. A. & Hammond, G. L. Resolution of the human sex hormone-binding globulin dimer interface and evidence for two steroid-binding sites per homodimer. *J Biol Chem* **276**, 34453-7 (2001).
7. Avvakumov, G.V., Muller, Y.A., Hamond, G.L. Steroid-binding specificity of human sex hormone-binding globulin is influenced by occupancy of a zinc-binding site. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 25920-25925 (2000).
8. Barnard, N. D., Scialli, A. R., Hurlock, D. & Bertron, P. Diet and sex-hormone binding globulin, dysmenorrhea, and premenstrual symptoms. *Obstet Gynecol* **95**, 245-50 (2000).
9. Bauer, E. R., Daxenberger, A., Petri, T., Sauerwein, H. & Meyer, H. H. Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor. *Apmis* **108**, 838-46 (2000).
10. Becchis, M., Frairia, R., Ferrera, P., Fazzari, A., Ondej, S., Alfrano, A., Collucia, C., Biglia, N., Sismondi, P., Fortunati, N. The additionally glycosylated variant of human sex hormone-binding globulin (SHBG) is linked to estrogen-dependence of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **54**, 101-7 (1999).
11. Beck, K., Gruber, T.M., Ridgway, C.C., Hughes, W., Sui, L., Pètra, P.H. 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* **247**, 339-47 (1997).
12. Bedecarràs, P., Gryngarten, M., Ayuso, S., Escobar, M.E., Bergadà, C., Campo, S. Characterization of serum SHBG isoforms in prepubertal and pubertal girls. *Clin Endocrinol (Oxf)* **49**, 603-8 (1998).
13. Bendridi, N., Mappus, E., Grenot, C., Lejeune, H., Cuilleron, C.Y., Pugeat M. Intravenous injection of human sex steroid hormone-binding globulin in mouse decreases blood

- clearance rate and testicular accumulation of orally administered [2-125I]iodobisphenol A. *Steroids* **67**, 637-45 (2002).
14. Berggard, T., Julenius, K., Ogard, A., Drakenberg, T. & Linse, S. Fragment complementation studies of protein stabilization by hydrophobic core residues. *Biochemistry* **40**, 1257-64 (2001).
 15. Berta, L., Fortunati, N., Frairia, R., Fazzari, A., Donvito, V., Gaidano, G. SBP and menopausal status in breast cancer patients. *Steroids* **52**, 393-4 (1988).
 16. Berube, D., Seralini, G. E., Gagne, R. & Hammond, G. L. Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (SHBG) to the short arm of chromosome 17 (17p12----p13). *Cytogenet Cell Genet* **54**, 65-7 (1990).
 17. BIAevaluation 3. Software Handbook, edition November 1999. Copyright 1997 Biacore AB: C.1.4.
 18. BIAevaluation 3. Software Handbook, edition November 1999. Copyright 1997 Biacore AB: A.5.1.
 19. BIAtechnology Handbook, version AB (reprinted 1998). Copyright 1994-1998 Biacore AB: 2.1.
 20. Blake, R. C., 2nd, Pavlov, A. R. & Blake, D. A. Automated kinetic exclusion assays to quantify protein binding interactions in homogeneous solution. *Anal Biochem* **272**, 123-34 (1999).
 21. Bocchinfuso, W. P. & Hammond, G. L. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation. *Biochemistry* **33**, 10622-9 (1994).
 22. Bocchinfuso, W. P., Warmels-Rodenhiser, S. & Hammond, G. L. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* **301**, 227-30 (1992).
 23. Brenta, G., Schnitman, M., Gurfinkiel, M., Damilano, S., Pierini, A., Sinay, I., Pisarev, M.A. Variations of sex hormone-binding globulin in thyroid dysfunction. *Thyroid* **9**, 273-7 (1999).
 24. Buerk, D.G. Biosensors – theory and applications. Institute for Environmental Medicine, University of Pennsylvania.
 25. Bulbrook, R.D., Hayward, J.L., Wang, D.Y., Thomas, B.S., Clark, G.M., Allen, D.S., Moore, J.W. Identification of women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **7 Suppl**, S5-10 (1986).
 26. Bulbrook, R.D., Moore, J.W., Clark, G.M., Wang, D.Y., Millis, R.R., Hayward, J.L. Relation between risk of breast cancer and biological availability of estradiol in the blood: prospective study in Guernsey. *Ann N Y Acad Sci* **464**, 378-88 (1986).
 27. Bulbrook, R.D., Moore, J.W., Allen, D., Thomas, B.S., Gravelle, I.H., Hayward, J.L., Wang, D.Y. Sex hormone-binding globulin and the natural history of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* **538**, 248-56 (1988).
 28. Burger, H. G., Dudley, E. C., Cui, J., Dennerstein, L. & Hopper, J. L. A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex

- hormone-binding globulin levels through the menopause transition. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2832-8 (2000).
29. Carlstrom, K., Doeberl, A., Gershagen, S. & Rannevik, G. Relationship between serum testosterone and sex hormone binding globulin in menstruating and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* **5**, 95-100 (1991).
 30. Catalano, M.G., Comba, A., Fazzari, A., Benedusi-Pagliano, E., Sberveglieri, M., Revelli, A., Massobrio, M., Frairia, R., Fortunati, N. Sex steroid binding protein receptor (SBP-R) is related to a reduced proliferation rate in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **42**, 227-34 (1997).
 31. Center, J. R., Nguyen, T. V., Sambrook, P. N. & Eisman, J. A. Hormonal and biochemical parameters in the determination of osteoporosis in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3626-35 (1999).
 32. Center, J. R., Nguyen, T. V., Sambrook, P. N. & Eisman, J. A. Hormonal and biochemical parameters and osteoporotic fractures in elderly men. *J Bone Miner Res* **15**, 1405-11 (2000).
 33. Chambon, C., Bennat, D., Delolme, F., Dessalces, G., Blachere, T., Rolland de Ravel, M., Mappus, E., Grenot, C., Cuilleron, C.Y. Photoaffinity labeling of human sex hormone-binding globulin using 17 α -alkylamine derivatives of 3 β -androstane-20 α -diol substituted with azidonitrophenylamido, azidonitrophenylamino, or trifluoroazidonitrophenylamino chromophores. Localization of Trp-84 in the vicinity of the steroid-binding site. *Biochemistry* **40**, 15424-35 (2001).
 34. Chapurlat, R. D., Garnero, P., Breart, G., Meunier, P. J. & Delmas, P. D. Serum estradiol and sex hormone-binding globulin and the risk of hip fracture in elderly women: the EPIDOS study. *J Bone Miner Res* **15**, 1835-41 (2000).
 35. Chen, Z. & Sadana, A. An analysis of antigen-antibody binding kinetics for biosensor applications utilized as a model system: influence of non-specific binding. *Biophys Chem* **57**, 177-87 (1996).
 36. Cheskis, B. & Freedman, L. P. Modulation of nuclear receptor interactions by ligands: kinetic analysis using surface plasmon resonance. *Biochemistry* **35**, 3309-18 (1996).
 37. Chikhaoui, Y. & Chitour, F. Human sex hormone binding globulin and sensitive thyrotropin measurements in thyroid physiopathology. *Steroids* **52**, 387-8 (1988).
 38. Cooper, B., Gruber, J. A. & McPhaul, M. J. Hormone-binding and solubility properties of fusion proteins containing the ligand-binding domain of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* **57**, 251-7 (1996).
 39. Cornell, B. A., Krishna, G., Osman, P. D., Pace, R. D. & Wieczorek, L. Tethered-bilayer lipid membranes as a support for membrane-active peptides. *Biochem Soc Trans* **29**, 613-7 (2001).
 40. Cousin, P., Dechaud, H., Grenot, C., Lejeune, H., Hammond, G.L., Pugeat, M. Influence of glycosylation on the clearance of recombinant human sex hormone-binding globulin from rabbit blood. *J Steroid Biochem Mol Biol* **70**, 115-21 (1999).

41. Cousin, P., Dechaud, 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* **83**, 235-40 (1998).
42. Crave, J. C., Lejeune, H., Brebant, C., Baret, C. & Pugeat, M. Differential effects of insulin and insulin-like growth factor I on the production of plasma steroid-binding globulins by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 1283-9 (1995).
43. Danzo, B. J., Bell, B. W. & Black, J. H. Human testosterone-binding globulin is a dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated. *Endocrinology* **124**, 2809-17 (1989).
44. Dechaud, H., Lejeune, H., Garoscio-Cholet, M., Mallein, R. & Pugeat, M. Radioimmunoassay of testosterone not bound to sex-steroid-binding protein in plasma. *Clin Chem* **35**, 1609-14 (1989).
45. Dibbelt, L., Knuppen, R., Jutting, G., Heimann, S., Klipping, C.O., Parikka-Olexik, H. Group comparison of serum ethinyl estradiol, SHBG and CBG levels in 83 women using two low-dose combination oral contraceptives for three months. *Contraception* **43**, 1-21 (1991).
46. Dickerman, R. D., McConathy, W. J. & Zachariah, N. Y. Testosterone, sex hormone-binding globulin, lipoproteins, and vascular disease risk. *J Cardiovasc Risk* **4**, 363-6 (1997).
47. Dörner, K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Stuttgart: Enke, 3. Auflage (1998).
48. Dunn, J. F., Nisula, B. C. & 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* **53**, 58-68 (1981).
49. Eaton, N. E., Reeves, G. K., Appleby, P. N. & Key, T. J. Endogenous sex hormones and prostate cancer: a quantitative review of prospective studies. *Br J Cancer* **80**, 930-4 (1999).
50. Estour, B., Pugeat, M., Lang, F., Dechaud, H., Pellet, J., Rousset, H. Sex hormone binding globulin in women with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* **24**, 571-6 (1986).
51. Farnsworth, W. E. Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *Prostate* **41**, 263-74 (1999).
52. Fazzari, A., Catalano, M.G., Comba, A., Becchis, M., Rainei, M., Frairia, R., Fortunati, N. The control of progesterone receptor expression in MCF-7 breast cancer cells: effects of estradiol and sex hormone-binding globulin (SHBG). *Mol Cell Endocrinol* **172**, 31-6 (2001).
53. Fernandez-Real, J.M., Grasa, M., Casamitjana, R., Pugeat, M., Barret, C., Ricart, W. Plasma total and glycosylated corticosteroid-binding globulin levels are associated with insulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3192-6 (1999).
54. Fimbel, S., Dechaud, H., Grenot, C., Tabard, L., Claustrat, F., Bador, R., Pugeat, M. Use of non-radioactive labels for half-life measurement of sex hormone-binding globulin in the rabbit. *Steroids* **60**, 686-92 (1995).
55. Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Piovano, F., Catalano, M.G., Becchi, M., Berta, L., Frairia, R. Estradiol induction of cAMP in breast cancer cells is mediated by foetal calf

- serum (FCS) and sex hormone-binding globulin (SHBG). *J Steroid Biochem Mol Biol* **70**, 73-80 (1999).
56. Fortunati, N., Becchis, M., Catalano, M.G., Comba, A., Ferrera, P., Raineri, M., Berta, L., Frairia, R. Sex hormone-binding globulin, its membrane receptor, and breast cancer: a new approach to the modulation of estradiol action in neoplastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 473-9 (1999).
57. Fortunati, N., Becchis, M., Catalano, M.G., Comba, A., Ferrera, P., Raineri, M., Berta, L., Frairia, R. Sex hormone-binding globulin, its membrane receptor, and breast cancer: a new approach to the modulation of estradiol action in neoplastic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 473-9 (1999).
58. Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Becchis, M., Comba, A., Catalano, M.G., Frairia, R. Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A. *Endocrinology* **137**, 686-92 (1996).
59. Fortunati, N., Becchis, M., Fissore, F., Berta, L., Catalano, M.G., Orsello, M., Gaidano, G., Frairia, R. The hepatic receptor for sex steroid-binding protein: study on a non-malignant cell line (Chang liver). *J Mol Endocrinol* **11**, 257-64 (1993).
60. Fortunati, N., Raineri, M., Cignetti, A., Hammond, G. L. & Frairia, R. Control of the membrane sex hormone-binding globulin-receptor (SHBG-R) in MCF-7 cells: effect of locally produced SHBG. *Steroids* **63**, 282-4 (1998).
61. Garden, G. A., Hannan, C. J., Spencer, C. A. & Plymate, S. R. The effect of sex hormone binding globulin (SHBG) on the pituitary testicular axis in hyperthyroid men. *Steroids* **52**, 385-6 (1988).
62. Garnero, P., Sornay-Rendu, E., Claustrat, B. & Delmas, P. D. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* **15**, 1526-36 (2000).
63. Gascon, F., Valle, M., Martos, R., Ruz, F.J., Rios, R., Montilla, P., Canete, R. Sex hormone-binding globulin as a marker for hyperinsulinemia and/or insulin resistance in obese children. *Eur J Endocrinol* **143**, 85-9 (2000).
64. Gershagen, S., Fernlund, P. & Edenbrandt, C. M. The genes for SHBG/ABP and the SHBG-like region of vitamin K-dependent protein S have evolved from a common ancestral gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 763-9 (1991).
65. Gershagen, S., Fernlund, P. & Lundwall, A. A cDNA coding for human sex hormone binding globulin. Homology to vitamin K-dependent protein S. *FEBS Lett* **220**, 129-35 (1987).
66. Gershagen, S., Henningson, K. & Fernlund, P. Subunits of human sex hormone binding globulin. Interindividual variation in size. *J Biol Chem* **262**, 8430-7 (1987).
67. Giguere, V., Tremblay, A. & Tremblay, G. B. Estrogen receptor beta: re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* **63**, 335-9 (1998).

68. Gluud, C. & Bennett, P. Comparison of methods for determination of testosterone and non-protein bound testosterone in men with alcoholic liver disease. *Scand J Clin Lab Invest* **46**, 647-53 (1986).
69. Grenot, C., Montard de, A., Blachère, T., Ravel de, M.R., Mappus, E., Cuilleron, C.Y. 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* **31**, 7609-21 (1992).
70. Griffin, P.R., Kumar, S., Shabanowitz, J., Charbonneau, H., Namkung, P.C., Walsh, K., Hunt, D.F., Petra, P.H. The amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. *J Biol Chem* **264**, 19066-75 (1989).
71. Grishkovskaya, I., Avvakumov, G.V., Sklenar, G., Dales, D., Hammond, G.L., Muller, Y.A. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *Embo J* **19**, 504-12 (2000).
72. Grishkovskaya, I., Avvakumov, G. V., Hammond, G. L. & Muller, Y. A. Resolution of a disordered region at the entrance of the human sex hormone-binding globulin steroid-binding site. *J Mol Biol* **318**, 621-6 (2002).
73. Grishkovskaya, I., Avvakumov, G. V., Hammond, G. L., Catalano, M. G. & Muller, Y. A. Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J Biol Chem* **277**, 32086-93 (2002).
74. Habito, R. C. & Ball, M. J. Postprandial changes in sex hormones after meals of different composition. *Metabolism* **50**, 505-11 (2001).
75. Habito, R. C., Montalto, J., Leslie, E. & Ball, M. J. Effects of replacing meat with soyabean in the diet on sex hormone concentrations in healthy adult males. *Br J Nutr* **84**, 557-63 (2000).
76. Haffner, S. M. Sex hormones, obesity, fat distribution, type 2 diabetes and insulin resistance: epidemiological and clinical correlation. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2**, S56-8 (2000).
77. Hakkinen, K., Pakarinen, A., Kraemer, W. J., Newton, R. U. & Alen, M. Basal concentrations and acute responses of serum hormones and strength development during heavy resistance training in middle-aged and elderly men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, B95-105 (2000).
78. Hammond, G. L. & Bocchinfuso, W. P. Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: steroid-binding and dimerization domains. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 543-52 (1995).
79. Hammond, G. L. & Bocchinfuso, W. P. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. *Horm Res* **45**, 197-201 (1996).
80. Hammond, G. L. & Lahteenmaki, P. L. A versatile method for the determination of serum cortisol binding globulin and sex hormone binding globulin binding capacities. *Clin Chim Acta* **132**, 101-10 (1983).

81. Hammond, G. L. & Langley, M. S. Identification and measurement of sex hormone binding globulin (SHBG) and corticosteroid binding globulin (CBG) in human saliva. *Acta Endocrinol (Copenh)* **112**, 603-8 (1986).
82. Hammond, G. L. Determinants of steroid hormone bioavailability. *Biochem Soc Trans* **25**, 577-82 (1997).
83. Hammond, G.L., Underhill, D.A., Smith, C.L., Goping, I.S., Harley, M.J., Musto, N.A., Cheng, C.Y., Bardin, C.W. The cDNA-deduced primary structure of human sex hormone-binding globulin and location of its steroid-binding domain. *FEBS Lett* **215**, 100-4 (1987).
84. Hammond, G. L. Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex-steroid binding proteins. *Endocr Rev* **11**, 65-79 (1990).
85. Hammond, G. L., Robinson, P. A., Sugino, H., Ward, D. N. & Finne, J. Physicochemical characteristics of human sex hormone binding globulin: evidence for two identical subunits. *J Steroid Biochem* **24**, 815-24 (1986).
86. Hammond, G. L., Underhill, D. A., Rykse, H. M. & Smith, C. L. The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgen-binding protein and two other testicular messenger RNAs. *Mol Endocrinol* **3**, 1869-76 (1989).
87. Hammond, G.L. Potential functions of plasma steroid-binding proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolsim* **6**, 298-304 (1995).
88. Hauptmann, H., Metzger, J., Schnitzbauer, A., Cuilleron, C.Y., Mappus, E., Luppa, P.B. Syntheses and ligand-binding studies of 1 alpha- and 17 alpha-aminoalkyl dihydrotestosterone derivatives to human sex hormone-binding globulin. *Steroids* **68**, 629-39 (2003).
89. Hauptmann, H., Paulus, B., Kaiser, T. & Luppa, P. B. Concepts for the syntheses of biotinylated steroids. Part II: 17beta-estradiol derivatives as immunochemical probes. *Bioconjug Chem* **11**, 537-48 (2000).
90. Hautanen, A. Synthesis and regulation of sex hormone-binding globulin in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2**, S64-70 (2000).
91. Heikkila, R., Aho, K., Heliovaara, M., Knekt, P., Reunanen, A., Aromaa, A., Leino, A., Palosuo, T. Serum androgen-anabolic hormones and the risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **57**, 281-5 (1998).
92. Heikkila R., Aho K., Heliovaara M., Hakama M., Marniemi J., Reunanen A., Knekt P. Serum testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations and the risk of prostate carcinoma: a longitudinal study. *Cancer* **86**, 312-5 (1999).
93. Hildebrand, C., Bocchinfuso, W. P., Dales, D. & Hammond, G. L. Resolution of the steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin by expression in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **34**, 3231-8 (1995).
94. Hodgert Jury, H., Zacharewski, T. R. & Hammond, G. L. Interactions between human plasma sex hormone-binding globulin and xenobiotic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol* **75**, 167-76 (2000).

95. Ip, Y. C., Lee, W. M. & Hammond, G. L. The rabbit sex hormone-binding globulin gene: structural organization and characterization of its 5-flanking region. *Endocrinology* **141**, 1356-65 (2000).
96. Iturriaga, H., Valladares, L., Hirsch, S., Devoto, E., Perez, C., Bunout, D., Lioi, X., Petermann, M. Effects of abstinence on sex hormone profile in alcoholic patients without liver failure. *J Endocrinol Invest* **18**, 638-44 (1995).
97. Iturriaga, H., Lioi, X. & Valladares, L. Sex hormone-binding globulin in non-cirrhotic alcoholic patients during early withdrawal and after longer abstinence. *Alcohol Alcohol* **34**, 903-9 (1999).
98. Janne, M., Hogeveen, K. N., Deol, H. K. & Hammond, G. L. Expression and regulation of human sex hormone-binding globulin transgenes in mice during development. *Endocrinology* **140**, 4166-74 (1999).
99. Joseph, D. R., Sullivan, P. M., Wang, Y. M., Millhorn, D. E. & Bayliss, D. M. Complex structure and regulation of the ABP/SHBG gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 771-5 (1991).
100. Kaiser, T., Gudat, P., Stock, W., Pappert, G., Grol, M., Neumeier, D., Lippa, P.B. Biotinylated steroid derivatives as ligands for biospecific interaction analysis with monoclonal antibodies using immunosensor devices. *Anal Biochem* **282**, 173-85 (2000).
101. Kenny, A. M., Prestwood, K. M., Marcello, K. M. & Raisz, L. G. Determinants of bone density in healthy older men with low testosterone levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **55**, M492-7 (2000).
102. Key, T.J., Pike, M.C., Moore, J.W., Bulbrook, R.D., Clark, G.M., Allen, D.S., Wang, D.Y. The relationships of SHBG with current and previous use of oral contraceptives and oestrogen replacement therapy. *Contraception* **39**, 179-86 (1989).
103. King, S, Lippa, P.B. Diagnostik des Hirsutismus mit Klinik und Routinelabor. *Münchener Medizinische Wochenschrift* **133**, 129-131 (1991).
104. Kratzsch, J, Keller, E, Hoepffner, W, Muller, G, Reich, A, Meyer, K, Kiess, W. The DSL analog free testosterone assay: serum levels are not related to sex hormone-binding globulin in normative data throughout childhood and adolescence. *Clin Lab* **47**, 73-7 (2001).
105. Kunst, G., Pfeilschifter, J., Kummermehr, G., Luntz, S., Bauer, H., Martin, E., Motsch, J. Assessment of sex hormone-binding globulin and osteocalcin in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* **14**, 546-52 (2000).
106. Lapidus, L., Lindstedt, G., Lundberg, P. A., 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* **32**, 146-52 (1986).
107. Lassmann-Vague, V., Raccah, D., Pugeat, M., Baurant, D., Belicar, P., Vague, P. SHBG (sex hormone binding globulin) levels in insulin dependent diabetic patients according to the route of insulin administration. *Horm Metab Res* **26**, 436-7 (1994).

108. Leder, L., Llera, A., Lavoie, P.M., Lebedeva, M.I., Li, H., Sékaly, R.P., Bphach, G.A., Gahr, P.J., Schlievert, P.M., Karjalainen, K., Mariuzza, R.A. A mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxins B and C3 to the T cell receptor beta chain and major histocompatibility complex class II. *J Exp Med* **187**, 823-33 (1998).
109. Lee, W.M., Wong, A.S.T., Tu, A.W.K., Cheung, C.H., Li, J.C.H. Rabbit sex hormone binding globulin: primary structure, tissue expression, and structure/function analyses by expression in *Escherichia coli*. *J Endocrinol* **153**, 373-84 (1997).
110. Leifke, E., Gorennoi, V., Wichers, C., Von Zur Muhlen, A., Von Buren, 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)* **53**, 689-95 (2000).
111. Liedberg, B., Nylander, C. & Lundstrom, I. Biosensing with surface plasmon resonance--how it all started. *Biosens Bioelectron* **10**, i-ix (1995).
112. Lipschultz, C. A., Li, Y. & Smith-Gill, S. Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance. *Methods* **20**, 310-8 (2000).
113. Löfas, S., Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J Chem Soc Chem Comm* **21**, 1526-1528.
114. Löffler, G, Petrides, PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1997. 5. Auflage.
115. Luppa, P. B., Sokoll, L. J. & Chan, D. W. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry. *Clin Chim Acta* **314**, 1-26 (2001).
116. Luppa, P., Brückner, C., Schwab, I., Hauck, S., Schmidmayr, S., Birkmayer, C., Paulus, B., Hauptmann, H. 7 alpha-Biotinylated testosterone derivatives as tracers for a competitive chemiluminescence immunoassay of testosterone in serum. *Clin Chem* **43**, 2345-52 (1997).
117. Luppa, 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)* **121**, 791-6 (1989).
118. Luppa, P.B. Diagnostik des Hirsutismus mit Spezialmethoden. *Münchener Medizinische Wochenschrift* , **133**, 132-134 (1998).
119. Luppa, P.B., Seiffert-Klauss, V., Höß, C. Endokrinologische Diagnostik der sekundären Amenorrhö und Oligomenorrhö unter besonderer Berücksichtigung des Polyzystischen Ovar-Syndroms. *Gynäkologie und Frauenheilkunde*, **58**, 139-151 (1998).
120. Lutz, R. A., Marki, H. H. & Weder, H. G. [Androgen binding in human plasma and its physiological significance (author's transl)]. *J Clin Chem Clin Biochem* **15**, 57-67 (1977).
121. Maalouf, G. J., Xu, W., Smith, T. F. & Mohr, S. C. Homology model for the ligand-binding domain of the human estrogen receptor. *J Biomol Struct Dyn* **15**, 841-51 (1998).
122. MacKenzie, C. R. & Hirama, T. Quantitative analyses of binding affinity and specificity for glycolipid receptors by surface plasmon resonance. *Methods Enzymol* **312**, 205-16 (2000).

123. Malmqvist, M. BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans* **27**, 335-40 (1999).
124. Mappus, E., Chambon, C., Fenet, B., Rolland de Ravel, M., Grenot, C., Cuilleron, Y. Synthesis of (5-azido-2-nitrobenzoyl)amido, (4-azido-2-nitrophenyl)amino, and (5-azido-2-nitro-3,4, 6-trifluorophenyl)amino derivatives of 17alpha-methylamino-, 17alpha-ethylamino-, and 17alpha-propylamino-5alpha-dihydrotestosterone as reagents of different linker lengths for the photoaffinity labeling of sex hormone binding globulins and androgen receptors. *Steroids* **65**, 459-81 (2000).
125. Markgren, P. O., Hamalainen, M. & Danielson, U. H. Kinetic analysis of the interaction between HIV-1 protease and inhibitors using optical biosensor technology. *Anal Biochem* **279**, 71-8 (2000).
126. Martin, M. E., Haourigui, M., Pelissero, C., Benassayag, C. & Nunez, E. A. Interactions between phytoestrogens and human sex steroid binding protein. *Life Sci* **58**, 429-36 (1996).
127. Mercier, C., Alfsen, A. & Baulieu, E. E. [A testosterone binding globulin. In proceedings of 2nd Symposium on steroid hormones, Ghent, Belgium (1965). *Excerpta Med Int Congr Ser* **101**, 212 (1966).
128. Metzger, J., Schnitzbauer, A., Meyer, M., Söder, M., Cuilleron, C.Y., Hauptmann, H., Huber, E., Luppa, P.B. Binding analysis of 1alpha- and 17alpha-dihydrotestosterone derivatives to homodimeric sex hormone-binding globulin. *Biochemistry* **42**, 13735-45 (2003).
129. Mickelson, K. E. & Petra, P. H. Purification of the sex steroid binding protein from human serum. *Biochemistry* **14**, 957-63 (1975).
130. Misao, R., Nakanishi, Y., Fujimoto, J., Iwagaki, S. & Tamaya, T. Levels of sex hormone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin mRNAs in corpus luteum of human subjects: correlation with serum steroid hormone levels. *Gynecol Endocrinol* **13**, 82-8 (1999).
131. Moore, JW, Clark, GM, Hoare, SA, Millis, RR, Hayward, JL, Quinlan, MK, Wang, DY, Bulbrook, RD. Binding of oestradiol to blood proteins and aetiology of breast cancer. *Int J Cancer* **38**, 625-30 (1986).
132. Moore, JW, Key, TJ, Wang, DY, Bulbrook, RD, Hayward, JL, Takatani, O. Blood concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin in relation to age at menarche in premenopausal British and Japanese women. *Breast Cancer Res Treat* **18 Suppl 1**, S47-50 (1991).
133. Moore, JW, Key, TJA, Clark, GMG, Bulbrook, RD, Allen, DS, Wang, DY, Pike, MC. Concentrations of sex-hormone-binding-globulin (SHBG) in a population of normal women: relationship to risk factors for breast cancer. *Steroids* **52**, 391-2 (1988).
134. Moore, JW, Clark, GM, Bulbrook, RD, Hayward, JL, Murai, JT, Hammond, GL, Siiteri, PK. Serum concentrations of total and non-protein-bound oestradiol in patients with breast cancer and in normal controls. *Int J Cancer* **29**, 17-21 (1982).

135. Moore, JW, Key, TJ, Bulbrook, RD, Clark, GM, Allen, DS, Wang, DY, Pike, MC. Sex hormone binding globulin and risk factors for breast cancer in a population of normal women who had never used exogenous sex hormones. *Br J Cancer* **56**, 661-6 (1987).
136. Moras, D. & Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 384-91 (1998).
137. Murayama, Y., Hammond, G. L. & Sugihara, K. The shbg Gene and Hormone Dependence of Breast Cancer: A Novel Mechanism of Hormone Dependence of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Based upon SHBG. *Breast Cancer* **6**, 338-343 (1999).
138. Murayama, Y., Utsunomiya, J., Asano, K. & Bulbrook, R. D. Sex hormone-binding globulin and recurrence after mastectomy. *Gann* **70**, 715-6 (1979).
139. Myszka, DG, Arulanantham, PR, Sana, T, Wu, Z, Morton, TA, Ciardelli, TL. Kinetic analysis of ligand binding to interleukin-2 receptor complexes created on an optical biosensor surface. *Protein Sci* **5**, 2468-78 (1996).
140. Myszka, D. G. Improving biosensor analysis. *J Mol Recognit* **12**, 279-84 (1999).
141. Myszka, D. G., Jonsen, M. D. & Graves, B. J. Equilibrium analysis of high affinity interactions using BIACORE. *Anal Biochem* **265**, 326-30 (1998).
142. Nagata, C, Shimizu, H, Takami, R, Hayashi, M, Takeda, N, Yasuda, K. Relations of insulin resistance and serum concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin to potential breast cancer risk factors. *Jpn J Cancer Res* **91**, 948-53 (2000).
143. Nakhla, A. M., Khan, M. S. & 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* **71**, 398-404 (1990).
144. Nakhla, A. M., Leonard, J., Hryb, D. J. & Rosner, W. Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via a G protein. *Steroids* **64**, 213-6 (1999).
145. Namkung, P. C., Kumar, S., Walsh, K. A. & Petra, P. H. Identification of lysine 134 in the steroid-binding site of the sex steroid-binding protein of human plasma. *J Biol Chem* **265**, 18345-50 (1990).
146. Nieba, L., Krebber, A. & Pluckthun, A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal Biochem* **234**, 155-65 (1996).
147. Noe, G., Cheng, Y. C., Dabike, M. & Croxatto, H. B. Tissue uptake of human sex hormone-binding globulin and its influence on ligand kinetics in the adult female rat. *Biol Reprod* **47**, 970-6 (1992).
148. Ober, R. J. & Ward, E. S. The choice of reference cell in the analysis of kinetic data using BIAcore. *Anal Biochem* **271**, 70-80 (1999).
149. Okubo, M., Tokui, M., Egusa, G. & Yamakido, M. Association of sex hormone-binding globulin and insulin resistance among Japanese-American subjects. *Diabetes Res Clin Pract* **47**, 71-5 (2000).
150. Orstan, A., Lulka, M. F., Eide, B., Petra, P. H. & Ross, J. B. Steroid-binding site of human and rabbit sex steroid binding protein of plasma: fluorescence characterization with equilenin. *Biochemistry* **25**, 2686-92 (1986).

151. Pan, C. C., Woolever, C. A. & Bhavnani, B. R. Transport of equine estrogens: binding of conjugated and unconjugated equine estrogens with human serum proteins. *J Clin Endocrinol Metab* **61**, 499-507 (1985).
152. Panidis, D, Kokkinos, T, Vavilis, D, Rousso, D, Tantanassis, T, Kalogeropoulos, A. [SHBG serum level in women with endometriosis before, during and after long-term danazol therapy]. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **53**, 121-4 (1993).
153. Peiris, AN, Stagner, JI, 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* **76**, 279-82 (1993).
154. Petra, PH, Que, BG, Namkung, PC, Ross, JBA, Charbonneau, H, Walsh, KA, Griffin, PR, Shabanowitz, J, Hunt, DF. Affinity labeling, molecular cloning, and comparative amino acid sequence analyses of sex steroid-binding protein of plasma. A multidisciplinary approach for understanding steroid-protein interaction and its physiological role. *Ann N Y Acad Sci* **538**, 10-24 (1988).
155. Petra, PH, Stanczyk, FZ, Seneary, DF, Namkung, PC, Novy, MJ, Ross, JBA, Turner, E, Brown, JA. Current status of the molecular structure and function of the plasma sex steroid-binding protein (SBP). *J Steroid Biochem* **19**, 699-706 (1983).
156. Petra, PH, Namkung, PC, Seneary, DF, McCraet, DA, Rousslang, KW, Teller, DC, Ross, JBA. Molecular characterization of the sex steroid binding protein (SBP) of plasma. Re-examination of rabbit SBP and comparison with the human, macaque and baboon proteins. *J Steroid Biochem* **25**, 191-200 (1986).
157. Petra, P. H. 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* **40**, 735-53 (1991).
158. Petra, P. H. The serum sex steroid-binding protein. Purification, characterization and immunological properties of the human and rabbit proteins. *J Steroid Biochem* **11**, 245-52 (1979).
159. Plymate, SR, Loop, SM, Hoop, RC, Wiren, KM, Ostenson, R, Hryb, DJ, Rosner, W. Effects of sex hormone binding globulin (SHBG) on human prostatic carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 833-9 (1991).
160. Power, SGA, Bocchinfuso, WP, Pallesen, M, Warmels-Rodenhiser, S, Baelen van, H, Hammond, GL. Molecular analyses of a human sex hormone-binding globulin variant: evidence for an additional carbohydrate chain. *J Clin Endocrinol Metab* **75**, 1066-70 (1992).
161. Pschyrembel, W. *Klinisches Wörterbuch*. Berlin, New York: de Gruyter, 257. Auflage (1994).
162. Pugeat, M, Lejeune, H, Mazonod, B, Dechaud, H, Flaury, MC, Tourniaire, J. [Changes in plasma binding protein of sex steroids and transcortin during the treatment of menopause with oral estrogens]. *Presse Med* **17**, 1189-92 (1988).

163. Pugeat, M, Lejeune, H, Dechaud, H, Emptoz-Bonneton, A, Fleury, MC, Charriè, A, Tourniaire, J, Forest, MG. Effects of drug administration on gonadotropins, sex steroid hormones and binding proteins in humans. *Horm Res* **28**, 261-73 (1987).
164. Pugeat, M, Moulin, P, Cousin, P, Fimbel, S, Nicolas, MH, Crave, JC, Lejeune, H. Interrelations between sex hormone-binding globulin (SHBG), plasma lipoproteins and cardiovascular risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 567-72 (1995).
165. Pugeat, M, Crave, JC, Elmidani, M, Nicolas, MH, Garosco-Cholet, M, Lejeune, H, Dechaud, H, Tourniaire, J. Pathophysiology of sex hormone binding globulin (SHBG): relation to insulin. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 841-9 (1991).
166. Pugeat, M, Rocle, B, Chrousos, GP, Dunn, JF, Lipsett, MB, Nisula, BC. Plasma testosterone transport in primates. *J Steroid Biochem* **20**, 473-8 (1984).
167. 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* **538**, 235-47 (1988).
168. Pugeat, M. M., Dunn, J. F. & Nisula, B. C. Transport of steroid hormones: interaction of 70 drugs with testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **53**, 69-75 (1981).
169. Pugeat, M. M., Dunn, J. F., Rodbard, D. & Nisula, B. C. The significance of drug interactions with human TeBG and CBG under physiological conditions: a new approach. *J Steroid Biochem* **15**, 487-90 (1981).
170. Pugeat, M., Cousin, P., Baret, C., Lejeune, H. & Forest, M. G. Sex hormone-binding globulin during puberty in normal and hyperandrogenic girls. *J Pediatr Endocrinol Metab* **13 Suppl 5**, 1277-9 (2000).
171. Pugeat, M., Crave, J. C., Tourniaire, J. & Forest, M. G. Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. *Horm Res* **45**, 148-55 (1996).
172. Que, B. G. & Petra, P. H. Characterization of a cDNA coding for sex steroid-binding protein of human plasma. *FEBS Lett* **219**, 405-9 (1987).
173. Raastad, T., Bjoro, T. & Hallen, J. Hormonal responses to high- and moderate-intensity strength exercise. *Eur J Appl Physiol* **82**, 121-8 (2000).
174. Ramakrishnan, A. & Sadana, A. Analyte-receptor binding and dissociation kinetics for biosensor applications: a fractal analysis. *Biosens Bioelectron* **15**, 651-62 (2000).
175. Reis, A. F., Miranda, W. L. & Chacra, A. R. Low levels of sex hormone-binding globulin and hyperproinsulinemia as markers of increased pancreatic beta-cell demand in men. *Braz J Med Biol Res* **31**, 1545-51 (1998).
176. Reventos, J, Hammond, GL, Crozat, A, Brooks, DE, Gunsalus, GL, Bardin, CW, Musto, NA. Hormonal regulation of rat androgen-binding protein (ABP) messenger ribonucleic acid and homology of human testosterone-estradiol-binding globulin and ABP complementary deoxyribonucleic acids. *Mol Endocrinol* **2**, 125-32 (1988).
177. Rich, R. L. & Myszka, D. G. Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* **11**, 54-61 (2000).
178. Rich, R. L. & Myszka, D. G. BIACORE J: a new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J Mol Recognit* **14**, 223-8 (2001).

179. Rosenbaum, W., Christy, N. P. & Kelly, W. G. Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding beta-globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **26**, 1399-403 (1966).
180. Rosner, W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**, 697-720 (1991).
181. Rosner, W. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* **11**, 80-91 (1990).
182. Rosner, W., Hryb, D. J., Khan, M. S., Nakhla, A. M. & Romas, N. A. Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. *J Steroid Biochem Mol Biol* **40**, 813-20 (1991).
183. Rosner, W., Hryb, D. J., Khan, M. S., Nakhla, A. M. & Romas, N. A. Androgens, estrogens, and second messengers. *Steroids* **63**, 278-81 (1998).
184. Rosner, W., Hryb, D. J., Khan, M. S., Nakhla, A. M. & Romas, N. A. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**, 481-5 (1999).
185. Rosner, W., Pugeat, M. M., Chrousos, G. P. & Khan, M. S. Steroid-binding proteins in primate plasma. *Endocrinology* **118**, 513-7 (1986).
186. Ross, J. B., Torres, P. & Petra, P. H. Equilenin: a specific fluorescent probe for steroid-protein interactions in sex steroid-binding protein. *FEBS Lett* **149**, 240-4 (1982).
187. Saito, N., Suzuki, T., Kanasugi, H. & Hiroi, M. Existence and biochemical analysis of estradiol binding protein (E2BP) in normal menstrual cycle. *Steroids* **52**, 383-4 (1988).
188. Scatchard, G. The Attractions of Small Proteins for Small Molecules and Ions. *Annals New York Academy of Sciences*, **51**, 660-672 (1949).
189. Schnitzbauer, AA, Luppä, PB. Biosensor-Analyse der Bindung von Androgenen an das Steroidhormon-bindende Globulin. *Bioforum*, **10**, 718-720 (2001).
190. Schuck, P. Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor. I. A computer simulation of the influence of mass transport. *Biophys J* **70**, 1230-49 (1996).
191. Schuck, P. Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 498-502 (1997).
192. Scopacasa, F, Wishart, JM, Need, AG, Horowitz, M, Morris, HA, Nordin, BE. Bone density and bone-related biochemical variables in normal men: a longitudinal study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57**, M385-91 (2002).
193. Scopacasa, F, Horowitz, M, Wishart, JM, Morris, HA, Chatterton, BE, Need, AG. The relation between bone density, free androgen index, and estradiol in men 60 to 70 years old. *Bone* **27**, 145-9 (2000).
194. Shaneyfelt, T., Husein, R., Bublely, G. & Mantzoros, C. S. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* **18**, 847-53 (2000).
195. Shrimanker, K., Salter, L. J. & Patterson, R. L. Binding of steroid hormones and anabolic agents to bovine sex-hormone binding globulin. *Horm Metab Res* **17**, 454-7 (1985).

196. Siiteri, PK, Murai, JT, Hammond, GL, Nisker, JA, Raymoure, WJ, Kuhn, RW. The serum transport of steroid hormones. *Recent Prog Horm Res* **38**, 457-510 (1982).
197. Siiteri, P. K., Ashby, R., Schwarz, B. & MacDonald, P. C. Mechanism of estrogen action studies in the human. *J Steroid Biochem* **3**, 459-70 (1972).
198. Sinnecker, G. Stability of sex-hormone-binding globulin in serum and plasma. *Clin Chem* **35**, 1253-4 (1989).
199. Smith, RH, Lemon, WJ, Erb, JL, Erb-Downward, JR, Downward, JG, Ulrich, OE, Wittliff, JL. Development of Kinetic Ligand-binding Assays Using a Fiber Optic Sensor. *Clin Chem* **45**, 1683-1685 (1999).
200. Spektrum der Wissenschaft, Dossier **4**, Mikrosystemtechnik, (Januar 1996).
201. Stellato, R. K., Feldman, H. A., Hamdy, O., Horton, E. S. & McKinlay, J. B. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care* **23**, 490-4 (2000).
202. Strel'chyonok, O. A. & Avvakumov, G. V. Specific steroid-binding glycoproteins of human blood plasma: novel data on their structure and function. *J Steroid Biochem* **35**, 519-34 (1990).
203. Stryer, L. *Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag, 1996. 4. Auflage, (1996).
204. Sui, L. M., Hughes, W., Hoppe, A. J. & Petra, P. H. Direct evidence for the localization of the steroid-binding site of the plasma sex steroid-binding protein (SBP or SHBG) at the interface between the subunits. *Protein Sci* **5**, 2514-20 (1996).
205. Swinkels, L. M., van Hoof, H. J., Ross, H. A., Smals, A. G. & Benraad, T. J. Concentrations of salivary testosterone and plasma total, non-sex-hormone-binding globulin-bound, and free testosterone in normal and hirsute women during administration of dexamethasone/synthetic corticotropin. *Clin Chem* **37**, 180-5 (1991).
206. Tanji, M. & Carpenter, D. O. A steroid-binding protein mediates estrogen-dependent inhibition of growth of MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res* **20**, 2785-9 (2000).
207. Tchernof, A. & Despres, J. P. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* **32**, 526-36 (2000).
208. Tchernof, A., Toth, M. J. & Poehlman, E. T. Sex hormone-binding globulin levels in middle-aged premenopausal women. Associations with visceral obesity and metabolic profile. *Diabetes Care* **22**, 1875-81 (1999).
209. Valladares, L., Erices, A., Lioi, X. & Iturriaga, H. Characterization of the oligosaccharides of plasma sex hormone binding globulin from noncirrhotic alcoholic patients. *Steroids* **65**, 275-80 (2000).
210. 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* **75**, 135-9 (1992).
211. van den Beld, A. W., de Jong, F. H., Grobbee, D. E., Pols, H. A. & Lamberts, S. W. Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with

- muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3276-82 (2000).
212. van den Koedijk, C. D., Blankenstein, M. A. & Thijssen, J. H. Speculation on the mechanism of action of triphenylethylene antioestrogens. *Biochem Pharmacol* **47**, 1927-37 (1994).
213. van der Vange, N., Blankenstein, M. A., Kloosterboer, H. J., Haspels, A. A. & Thijssen, J. H. Effects of seven low-dose combined oral contraceptives on sex hormone binding globulin, corticosteroid binding globulin, total and free testosterone. *Contraception* **41**, 345-52 (1990).
214. van Zoelen, E. J., Kramer, R. H., van Moerkerk, H. T. & Veerkamp, J. H. The use of nonhomologous scatchard analysis in the evaluation of ligand-protein interactions. *Trends Pharmacol Sci* **19**, 487-90 (1998).
215. Verkasalo, P. K., Thomas, H. V., Appleby, P. N., Davey, G. K. & Key, T. J. Circulating levels of sex hormones and their relation to risk factors for breast cancer: a cross-sectional study in 1092 pre- and postmenopausal women (United Kingdom). *Cancer Causes Control* **12**, 47-59 (2001).
216. Vermeulen, A. & Verdonck, L. Sex hormone concentrations in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* **9**, 59-66 (1978).
217. Vierhapper, H., Bieglmayer, C., Nowotny, P. & Waldhausl, W. Normal serum concentrations of sex hormone binding-globulin in patients with hyperthyroidism due to subacute thyroiditis. *Thyroid* **8**, 1107-11 (1998).
218. Vigersky, R. A., Kono, S., Sauer, M., Lipsett, M. B. & Loriaux, D. L. Relative binding of testosterone and estradiol to testosterone-estradiol-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* **49**, 899-904 (1979).
219. Vikinge, TP, Hansson, KM, Sandström, P, Liedberg, B, Lindahl, TL, Lundström, I, Tengvall, P, Höök, F. Comparison of surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance in the study of whole blood and plasma coagulation. *Biosens Bioelectron* **15**, 605-13 (2000).
220. Walsh, KA, Titani, K, Takio, K. Amino acid sequence of the sex steroid binding protein of human blood plasma. *Biochemistry* **25**, 7584-90 (1986).
221. Wang, D. Y., Rubens, R. D., Clark, G. M., Moore, J. W. & Bulbrook, R. D. Effects of prednisolone on sex hormone binding globulin during primary endocrine treatment of advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **11**, 67-70 (1988).
222. Weigel, NL. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemistry Journal*, **319**: 657-667 (1996).
223. Weigel, N. L. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* **319 (Pt 3)**, 657-67 (1996).
224. Weiss-Wichert, CH, Smetazko, M, Valina-Saba, M, Schalkhammer, Th. A New Analytical Device Based on Gated Ion Channels: A Peptide-Channel Biosensor. *Journal of Biomolecular Screening*, **2**, 11-18 (1995).

225. Wu, F., Ames, R., Evans, M. C., France, J. T. & Reid, I. R. Determinants of sex hormone-binding globulin in normal postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* **54**, 81-7 (2001).
226. Wurtz, J. M., Egner, U., Heinrich, N., Moras, D. & Mueller-Fahrnow, A. Three-dimensional models of estrogen receptor ligand binding domain complexes, based on related crystal structures and mutational and structure-activity relationship data. *J Med Chem* **41**, 1803-14 (1998).
227. Zeginiadou, T., Koliass, S., Kouretas, D. & Antonoglou, O. Nonlinear binding of sex steroids to albumin and sex hormone binding globulin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **22**, 229-35 (1997).
228. Zeginiadou, T., Kortsaris, A. H., Koliass, S. & Antonoglou, O. Sex hormone binding globulin inhibits strongly the uptake of estradiol by human breast carcinoma cells via a deprivative mechanism. *Cancer Biochem Biophys* **16**, 253-63 (1998).