

**Expression und topographische Verteilung von
Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG)
im Hypothalamus des Menschen**

**- Dissertation -
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Susanne Göthe
geboren am 03.10.1980 in Gera

Erster Gutachter: Prof. Dr. G. F. Jirikowski

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. A. Gudziol

Dritter Gutachter: Prof. Dr. H. G. Bernstein

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.04.2007

Für meine Eltern

*Nutzt euer Wissen stets zum Wohle anderer, dann mag der Krieg von dieser schönen Erde
ablassen und ein herrlicher Bau des Friedens und der Eintracht aufgerichtet werden.*

– Abdu'l-Baha, Ansprachen in Paris –

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad in Celsius
μJ	Mikrojoule
μl	Mikroliter
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ABP	Androgen-binding-globulin
ACN	Acrylsäurenitril
ADH	antidiuretisches Hormon
AHL	Area hypothalamica lateralis
AN	Akzessorische Nuclei
ARC	Nucleus arcuatus
bNST	bed Nucleus stria terminalis
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca^{2+}	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Chloramidoproyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfat zwitter-ionic
Cl^-	Chlorid
CRH	Corticotropin releasing hormone
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzol
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FO	Fornix
FSH	Folikel stimulierendes Hormon
g	Gramm
GHRH	Growth hormone releasing hormone
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
H^+	Protonen
h	Stunde
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffdioxid

HHL	Hypophysenhinterlappen
HT	Hypothalamus
HVL	Hypophysenvorderlappen
IDM	Interaction Discovery Mapping
IgG	Immunglobulin
KDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
Mg ²⁺	Magnesium
min.	Minuten
ml	Milliliter
mMol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
nm	Nanometer
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PBS	Phosphatpuffer
PEV	Nucleus periventricularis
pH	pondus Hydrogenii
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVN	Nucleus paraventricularis
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SELDI-TOF MS	Surface enhanced laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
SHBG	Sex-hormone-binding-globulin
sog.	sogenannt
SON	Nucleus supraopticus
SRIH	Somatotropin release inhibiting hormone
TFA	Trifluoroacetic acid
TRH	Thyrotropin releasing hormone

TX	Triton X-100
UV	ultraviolett
V	Volt
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
Zn ²⁺	Zinkionen
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Hypothalamus	3
2.2	Plexus choroideus	3
2.3	Blut-Hirn-Schranke und Liquor cerebrospinalis	4
2.4	Neuroendokrine Systeme des Hypothalamus	4
2.4.1	Anatomie des Hypothalamus	4
2.4.2	Parvozelluläres neuroendokrines System	7
2.4.3	Magnozellanuläres neuroendokrines System	8
2.5	Hypothalamische neuroendokrine Systeme und Steroide	8
2.6	Sex-Hormone-Binding-Globuline SHBG	9
2.7	Zielsetzung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Gewebe Gewinnung und Verarbeitung	13
3.2	Immunzytochemie	14
3.3	Proteinextraktion mit Beads	16
3.4	Proteinextraktion mit Säulenchromatographie	18
3.5	Western Blot	19
3.6	Massenspektrometrie	23
3.7	Hilfsmittel zur morphologisches Auswertung	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Morphologie SHBG-positiver Neurone	25
4.2	Topographische Verteilung SHBG-positiver Neurone	25
4.3	Magnozellanuläre hypothalamische Kerngebiete	29
4.4	Parvozelluläre Systeme	29
4.5	Perivaskuläre Systeme	30
4.6	Infundibulum	30
4.7	Ependym und Plexusepithel	30
4.8	Nucleus periventricularis	31
4.9	Biochemische Befunde	31
4.10	SELDI-TOF MS	37

5	Diskussion	38
5.1	Topographische Verteilung SHBG-positiver Neurone im Hypothalamus	38
5.2	SHBG im Hypothalamoadenohypophysären System	39
5.3	SHBG im Hypothalamoneurohypophysären System	40
5.4	SHBG in gefäßnahen Neuronen	40
5.5	Infundibulum	41
5.6	Ependym und Plexusepithel	41
5.7	Nucleus periventricularis	42
5.8	Nucleus supraiasmaticus	43
5.9	Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis	43
5.10	Fornix und perifornikale Region	43
5.11	Bed Nucleus der Stria terminalis	43
5.12	Nucleus arcuatus	44
5.13	Nachweis des Proteins SHBG mittels Western Blot	44
5.14	Nachweis des Proteins SHBG mittels SELDI-TOF MS	45
6	Schlussfolgerungen	46
7	Literaturverzeichnis	48
8	Lebenslauf	I
9	Danksagung	III
10	Ehrenwörtliche Erklärung	IV

1 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit immunhistochemischen Methoden sowie Western Blot und Surface enhanced laser desorption ionization time of flight Massenspektrometrie die topografische Verteilung von Sex-Hormone-Binding-Globulin im Hypothalamus des Menschen zu untersuchen.

Sex-Hormone-Binding-Globulin ist ein Bindungsprotein für Dihydrotestosteron und Testosteron und wird überwiegend in der Leber produziert. Intrinsische Produktion von Sex-Hormone-Binding-Globulin wurde auch in Hoden, Ovar, Nebenniere und Prostata beobachtet. Neuere Untersuchungen gaben auch Hinweise für die Expression von Sex-Hormone-Binding-Globulin im zentralen Nervensystem. Sex-Hormone-Binding-Globulin ist möglicherweise für nicht genomische Regulationsmechanismen von Steroidhormonen mitverantwortlich.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen von menschlichem Hypothalamusproben wurden Paraffinschnitte und hochspezifische monoklonale Antikörper verwendet. Für die biochemischen Untersuchungen wurden Hypothalamusanteile mikrodisseziert, homogenisiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Western Blot und Surface enhanced laser desorption ionization time of flight Massenspektrometrie wurden für die Proteinanalytik herangezogen.

Spezifische Immunreaktivität für Sex-Hormone-Binding-Globulin wurde in magnozellularen Anteilen des Nucleus supraopticus, in der Area hypothalamica anterior, in der perifornikalen Region und im bed Nucleus stria terminalis nachgewiesen. Parvozelluläre Neurone im Nucleus paraventricularis, im Nucleus suprachiasmaticus und im Nucleus arcuatus zeigten ebenfalls spezifische Färbungen. Eine Teilklasse der Epithelzellen im Ependym und im Plexus choroideus färbten sich mit Anti-Sex-Hormone-Binding-Globulin. Fasern ließen sich im Infundibulum, der Eminentia mediana und dem Fornix anfärben. Im Western Blot wurden bei Proben von humanem Hypothalamus Banden bei ca. 50 und 35 Kilodalton gefunden. Dieses Molekulargewicht wurde durch die Surface enhanced laser desorption ionization time of flight Massenspektrometrie mit einem Peak bei 49600 Dalton bestätigt. Ähnliche Proteinmassen wurden in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Plexus choroideus gefunden. Sie unterschieden sich deutlich von dem im Blutplasma nachgewiesenen Sex-Hormone-Binding-

Globulin welches ein Molekulargewicht von 53900 Dalton hatte. In der Kontrolle war dieser Peak nicht vorhanden.

Die vorliegende Untersuchung ist die erste topographische Lokalisation von Sex-Hormone-Binding-Globulin im Hypothalamus des Menschen. Sie bestätigt die endogene Expression, ähnlich, wie sie schon bei der Ratte nachgewiesen wurde. Frühere Kolokalisationsstudien zeigten, dass Sex-Hormone-Binding-Globulin mit Neurohormonen wie Vasopressin und Oxytocin koexprimiert wird und im hypothalamo-neurohypophysären System funktionell relevant sein dürfte. Die Lokalisation in den verschiedenen neuroendokrinen Kerngebieten legt unterschiedliche Funktionen nahe. Neben einer Bedeutung als Neurohormon könnte Sex-Hormon-Binding-Globulin auch als Neurotransmitter, als hypophyseotroper Faktor oder als Liquorprotein bedeutsam sein.

2 Einleitung

2.1 Hypothalamus

Der Hypothalamus ist Teil des Diencephalons (Zwischenhirn), neben Subthalamus, Thalamus und Epithalamus. Das Diencephalon umschließt mit seinen Bestandteilen den III. Ventrikel, an dessen Wand auch einige Neurohämalorgane, die sog. zirkumventrikulären Organe (ZVO) liegen. Sie haben eine besonders enge funktionelle Beziehung zum Hypothalamus.

Der Hypothalamus besteht aus Gruppen von Neuronen und Fasersystemen im Boden der unteren Abschnitte der Seitenwände des III. Ventrikels. Der vordere Anteil, die sog. Area preoptica gehört entwicklungsgeschichtlich zum Telencephalon, wird aber wegen der engen topographischen und funktionellen Beziehungen zum Hypothalamus gerechnet. Ausgedehnte reziproke Verbindungen der Kerne des Hypothalamus bestehen zu telencephalen, anderen diencephalen Arealen und zum Hirnstamm.

Obwohl der Hypothalamus mit 4-5 g nur weniger als 1% des Hirngewichts ausmacht, ist seine Bedeutung herausragend: er integriert über seine Systeme vor allem jene autonomen und endokrinen Mechanismen und Verhaltensweisen, die für die Aufrechterhaltung basaler Körperfunktionen (Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt, Nahrungsaufnahme, Thermoregulation, Biorhythmen, Bewältigung von Stress, Arterhaltung) notwendig sind.

2.2 Plexus choroideus

Der Plexus choroideus liegt in den inneren Liquorräumen, die von Gehirn und Rückenmark umfasst werden. Zu den inneren Liquorräumen gehören die Seitenventrikel (Ventriculi laterales), der III. Ventrikel, der IV. Ventrikel und der Zentralkanal. Die Liquorräume sind hauptsächlich ausgekleidet mit einem einfachen zumeist kubischen Flimmerepithel, dem Ependym. Das Plexusepithel leitet sich vom Ependym ab und ist besonders transportativ.

Die Plexus choroidei überbrücken die Fissurae choroideae der Seitenventrikel, das Dach des III. Ventrikels und große Abschnitte des IV. Ventrikels.

Die Plexus bestehen aus einer Lamina epithelialis (Plexusepithel) und einer Lamina propria (Tela choroidea). Die streifenförmigen Befestigungszonen der Plexus in der Pia der angrenzenden Hirnabschnitte werden als Taeniae choroideae bezeichnet. Die Tela choroidea ist ein

stark kapillarisiert, spezialisierter Abschnitt der Pia mater. Die Oberfläche der Plexus ist durch Zotten und Falten stark vergrößert. Sie sind die Hauptproduktionsstätte des Liquor cerebrospinalis.

2.3 Blut-Hirn-Schranke und Liquor cerebrospinalis

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine Permeabilitätsbarriere für Makromoleküle aus dem Blutkreislauf im ZNS dar. Sie ist charakterisiert durch tight junctions der Gefäßendothelien des ZNS. Die Blutgefäße des Plexus choroideus haben allerdings fenestrierte Endothelien, die Plexusepithelzellen sind ihrerseits durch tight junctions verbunden (Brightman und Reese 1969). Die interzelluläre Diffusion von Substanzen wird verhindert, jedoch erfolgt transzellulärer Transport.

Die in den hypothalamischen Systemen produzierten Hormone werden entweder in Neurohämalorgane, in die portale oder die systemische Zirkulation sezerniert, in extrazelluläre Spalten über das Ependym in den Liquor abgegeben oder sie werden direkt von sogenannten Liquorkontaktneuronen (Vigh-Teichmann et al. 1970) in den Liquor sezerniert.

Zu 70% wird der Liquor cerebrospinalis vom Plexus choroideus produziert, der aus einschichtigem kubischen Epithel mit Mikrovilli und tight junctions besteht. Die übrigen 30% kommen durch kapilläre Ultrafiltration und metabolische Wasserproduktion zustande (Sato und Bering 1967).

2.4 Neuroendokrine Systeme des Hypothalamus

2.4.1 Anatomie des Hypothalamus

Seit Anfang des 20. Jahrhunderts gibt es Bemühungen, die Regionen des menschlichen Hypothalamus zu kartographieren, und die zelluläre Architektur zu untersuchen. Da es sich bei dem zu untersuchenden Material um in begrenzter Menge vorhandenes menschliches Gewebe handelt, das sich durch große Variationsbreite der Schnittebenen und durch lange post-mortem Zeit auszeichnet, existieren noch Diskrepanzen zwischen den Beobachtungen der untersuchenden Forschungsgruppen. Brockhaus 1942 und Braak und Braak 1987 beschäftigten sich intensiv mit diesem Thema und erforschten mittels Nisselfärbung und pigmento-architektonischer Analysen die Kernkonfigurationen der Zellen im Hypothalamus

(Brockhaus 1942, Braak 1987). Exakte Beschreibungen der Nuclei im Hypothalamus des Menschen und deren Transmitterspezifität wurden von zahlreichen Gruppen untersucht.

Der Hypothalamus wurde von Braak und Braak 1987 in drei Hauptregionen in rostro-caudaler Richtung unterteilt:

- Die präoptische/chiasmatische Region, vor und über dem Chiasma opticum,
- die intermediäre (tuberale) Region, die kegelförmig den Eingang in den Recessus infundibuli umgibt und bis zur Neurohypophyse reicht, und
- die posteriore (mammilläre) Region, die von den Corpora mammillaria dominiert wird und an das Tegmentum mesencephali grenzt. (Benninghoff 2004)

Außerdem definierte Brockhaus 1942 drei weitere Zonen in medio-lateraler Richtung:

- Die periventriculäre Zone, die an den III. Ventrikel heranreicht,
- die mediale Zone, die sich lateral der periventriculären Zone anschließt und endokrine Neurone aufweist, und
- die laterale Zone mit der lateralen preoptischen Region und dem Nucleus tuberalis lateralis.

Die auf der nächsten Seite dargestellten acht Abbildungen (Abb. 1) des menschlichen Hypothalamus veranschaulichen die Lage und Beziehungen der Kerngebiete des Hypothalamus. Es ist jeweils die rechte Seite dargestellt.

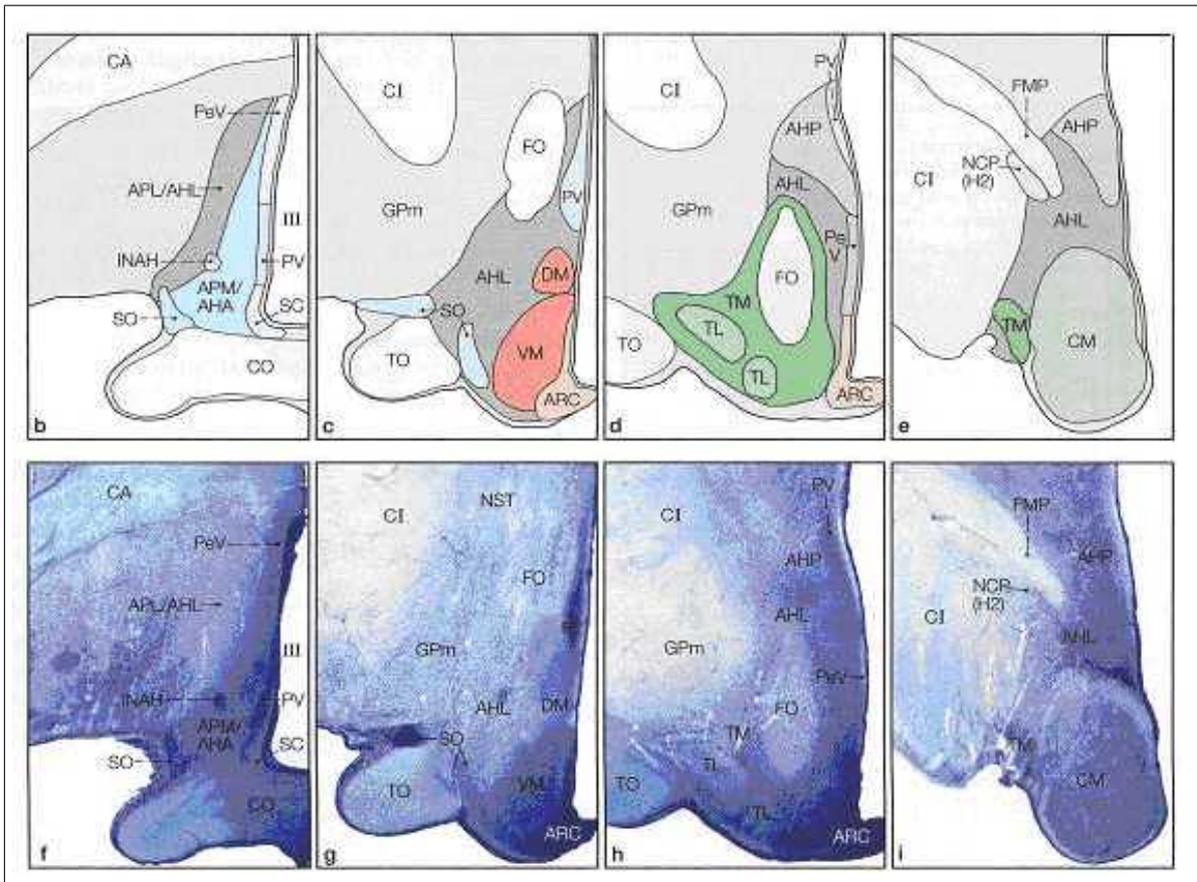


Abbildung 1: Nuclei und Areae des Hypothalamus (Quelle: Benninghoff 2004)

Blau: präoptische/chiasmatische, rot: intermediäre, grün: posteriore Region, hellere Farbtöne: mehr medial, dunklere: mehr lateral gelegene Nuclei und Areae. Dunkelgrau: laterale hypothalamische Areae.

(b) bis (e) zeigen die Ausdehnung der Nuclei und Areae in den Frontalschnitten (f) bis (i) durch den menschlichen Hypothalamus, etwa in den angegebenen Schnittebenen.

AHA: Area hypothalamica anterior; AHL: Area hypothalamica lateralis; AHP: Area hypothalamica posterior; APL: Area preoptica lateralis; APM: Area preoptica medialis; ARC: Ncl. arcuatus; CA: Commissura anterior; CI: Capsula interna; CM: Copora mammillares; CO: Chiasma opticum; DM: Ncl. dorsomedialis; FMP: Fasciculus mammillaris princeps; FO: Fornix; Gpm: Globus pallidus medialis; INAH: Ncl. interstitiales hypothalami anteriores; NCP: Ncl. campi perizonalis; PeV: Ncl. periventriculares; PV: Ncl. paraventricularis hypothalami; SC: Ncl. suprachiasmaticus; SO: Ncl. supraopticus; TL: Ncl. tuberales lateralis; TM: Ncl. tuberomammillaris; TO: Tractus opticus; VM: Ncl. ventromedialis; III: dritter Ventrikel

Der Hypothalamus ist die Schnittstelle zweier wichtiger Kommunikationssysteme des menschlichen Körpers: das endokrine System und das Nervensystem. Durch die Koordination beider Systeme in ihrer Aktivität bei komplexen Regulationsvorgängen des Körpers (Thermo- und Blutdruckregulation, Energie- und Flüssigkeitshaushalt, u.a.) sorgt er für die optimalen Funktionsbedingungen der Organe.

Das neuroendokrine System des HT besteht aus Neuronen, die Hormone produzieren (Calas et al. 1994), sie in das Blut abgeben und so Organsysteme beeinflussen. Der biologische Effekt und vegetative und somatische Reize werden direkt oder indirekt an den HT übermittelt (Elman und Breier 1997) (durch Blutosmolalität, Hormonkonzentration im Blut, etc.) und beeinflusst damit die Aktivität der endokrinen und nicht-endokrinen Neurone. Zusätzlich besitzt der HT weitreichende neuronale Verbindungen im ZNS. Die funktionelle Bedeutung von Neuropeptiden im Liquor ist noch weitgehend unklar.

2.4.2 Parvozelluläres neuroendokrines System

Im parvozellulären Anteil des PVN in den periventriculären Nuclei, im Organum vasculosum der Lamina Terminalis OVLT, im Ncl. arcuatus, im Ncl. supra- und retrochiasmaticus und in den Ncl. ventro- und dorsomedialis liegen kleine neuroendokrine Neurone, (Lechan et al. 1982, Sawchenko und Swanson 1982). Diese produzieren unter anderem Releasing- und Inhibitingfaktoren für den Hypophysenvorderlappen, die die Freisetzung von Hormonen fördern oder hemmen. Wichtige Steuerhormone sind: Growth-hormone-releasing-hormone (GHRH; Somatoliberin), Corticotropin-releasing-hormone (CRH; Corticoliberin), Thyrotropin-releasing-hormone (TRH; Thyroliberin), Gonadotropin-releasing-hormone (GnRH; Luliberin oder Gonadoliberin) und Somatotropin-release-inhibiting-hormone (SRIH, Somatostatin) sowie Dopamin (Prolactostatin). Die Axone der kleinen neuroendokrinen Neurone verlaufen in das Infundibulum und enden in der Eminentia mediana und geben ihre Hormone an den primären Kapillarplexus des hypophysären Pfortadersystems ab. Von da gelangen sie in hoher Konzentration in den Hypophysenvorderlappen (Adenohypophyse) und regulieren hier die Freisetzung der Steuer- und Effektorhormone.

2.4.3 Magnozelluläres neuroendokrines System

Vor allem in den Ncll. paraventricularis und supraopticus und in den akzessorischen Nuclei wurden große neuroendokrine Neurone beschrieben. Unterschiedliche Neuronenpopulationen produzieren die beiden Peptidhormone antidiuretisches Hormon (ADH; Vasopressin) und Oxytocin (Sawchenko und Swanson 1982, Armstrong 1995, Dierick und Vandesande 1977). Die Axone dieser Neurone bilden den Tr. hypothalamohypophysialis, der durch das Infundibulum zieht und in der Umgebung eines Kapillarplexus der Neurohypophyse (Lobus nervosus) endet (El Majdoubi et al. 2000, Fellmann et al. 1979).

Für die magnozellulären Kerngebiete wurde die Produktion und Sekretion von hauptsächlich zwei Peptiden beschrieben: Oxytocin und Vasopressin. Diese wurden sowohl getrennt in einzelnen Zellen als auch gemeinsam in Zellen als Produktionsort durch vorhandene mRNA nachgewiesen (Jirikowski et al. 1991, Telleria-Diaz et al. 2001). Vasopressin hat entscheidenden Einfluß auf die Blutdruckregulation (Grindstaff und Cunningham 2001) und Oxytocin ist verantwortlich für die Uteruskontraktion (Russell et al. 2003) und die Milchejektion nach der Geburt (Gimpl und Fahrenholz 2001).

2.5 Hypothalamische neuroendokrine Systeme und Steroide

Sexualsteroiden werden nach der Produktion und Sekretion aus Leber, Nebenniere und den Gonaden im Blut größtenteils an das Androgen-Binding-Protein (ABP) bzw. Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG) gebunden (Becchis et al. 1996). ABP/SHBG ist ein Bindungs- und Transportprotein im Blut und reguliert die Bioverfügbarkeit der Sexualhormone. Weiterführende Theorien sprechen diesen Proteinen ebenfalls eine eigene hormonelle Wirkung zu. Es wird angenommen, dass ABP/SHBG die Genexpression von Androgen- bzw. Östrogenrezeptoren moduliert (Joseph 1997). Die Wirkung der Steroide peripher erfolgt nach bisheriger Erkenntnis über intrazelluläre Rezeptorproteine. Das Steroid wird internalisiert und bindet an die Steroid-Binding-Site des Rezeptors. Die dadurch verursachte Konformationsänderung des Rezeptors führt dazu, dass mit einem weiteren aktivierten Rezeptor ein Homodimer gebildet wird und dieser bestimmte DNA-Sequenzen der Promotorregion bestimmter Gene erkennt (steroidresponsives Element). Auf diese Weise wird die Transkription reguliert.

Auch im ZNS befinden sich Steroidhormone, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden

können. Sie regulieren Vorgänge von Gehirnarealen und von einzelnen Zellen. Wie zuvor schon beschrieben, wird angenommen, dass sämtliche Steroide ihre Wirkung über Steroidrezeptoren im Zellkern entfalten. Bisher existierte nur die Vorstellung, dass sie die Translation bestimmter Gene beeinflussen. Dies jedoch erklärte nicht die rasante Wirkung, die Steroide im Hypothalamus verursachen (Induktion der Uteruskontraktion, Körpertemperaturregulation, Sexualverhalten), da es bei dieser Theorie von der Rezeptorbindung bis zur Wirkungsentfaltung Stunden bis Tage dauern kann. Es werden daher seit geraumer Zeit sogenannte nicht-genomische Wirkungen von Steroiden diskutiert. Elektrophysiologische Untersuchungen weisen auf die Existenz von Membranrezeptoren hin (Kamei 1996), was aber bisher nicht bewiesen werden konnte.

Es ist anzunehmen, dass sich im Gehirn ein äquivalentes Bindungsprotein zu ABP vorhanden ist. Dieses Protein Sex-Hormone-Binding-Globulin (SHBG) ist im Gehirn der Ratte schon nachgewiesen worden. (Herbert et al. 2003)

Es wird die Existenz eines SHBG Rezeptors diskutiert (Rosner et al. 1999b, Rosner et al. 1999a), die die schnellen Steroidwirkungen erklären könnten. Es wird vermutet, dass es sich um einen putativen Membranrezeptor für SHBG handelt, an den SHBG, gekoppelt an ein Steroid, bindet und so über ein G-Protein eine cAMP Kaskade auslöst und damit zu einer schnellen Steroidwirkung führen könnte (Rosner et al. 1999a, Caldwell et al. 2000). Andererseits wird vermutet, dass SHBG nur ohne gebundenes Steroid an den möglichen Membranrezeptor binden kann, so dass Steroide oder inaktive Steroidmetabolite als Inhibitoren der Rezeptorbindung wirken können (Rosner et al. 1991, Caldwell et al. 2002, Catalano et al. 2005).

2.6 Sex-Hormone-Binding-Globuline SHBG

Das SHBG, ein Glycoprotein, ist ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 90.000 und 100.000 Da. Das SHBG im Plasma von Kaninchen besteht aus zwei identischen Polypeptidketten mit 367 Aminosäuren und zwei N-Glycosilierungen (Griffin et al. 1989). Im Hypothalamus der Ratte wurden SHBG-Fragmente mit 22, 37 und 48 kDa und mRNA identifiziert (Herbert et al. 2003, Wang et al. 1990).

Das Homodimer des humanen SHBG hat ein Molekulargewicht von 93.000 Da und die Monomere von 46 bzw. 48 kDa. Es ist belegt, dass beim menschlichen SHBG pro Monomer eine

Steroidbindungsstelle an der N-terminalen Domäne vorhanden ist (Abb. 2) (Avvakumov et al. 2001) und dass am N'Ende eine Bindungsstelle für Zink die Affinität des Moleküls zu den verschiedenen Steroiden beeinflusst (Avvakumov et al. 2000). Dimerisierung der Homodimere ist in Abwesenheit von Kalzium möglich (Sui et al. 1996), jedoch wird Stabilität des Dimers durch Bindung zweiwertiger Katione wie Ca^{2+} und Zn^{2+} erreicht (Bocchinfuso und Hammond 1994).

Das Gen für SHBG besitzt 8 kodierende Exone. Durch Glycosilierung wird die Sekretion des Proteins aus der Zelle gewährleistet (Hammond und Bocchinfuso 1995). Das kodierende Gen für SHBG befindet sich auf Chromosom 17 (17p12-p13) (Becchis et al. 1996, Reventos et al. 1993, Joseph et al. 1985, Joseph et al. 1991b, Joseph et al. 1991a, Joseph 1994, Joseph et al. 1996, Joseph 1997, Joseph 1998).

Es ist nachgewiesen, dass SHBG die DNA Synthese unabhängig von Co-Faktoren fördern kann (Gerard et al. 1996).

Steroidhormone beeinflussen die Synthese und Sekretion von Neuropeptiden, die wiederum für spezifische Verhaltensmuster verantwortlich sind. Steroidhormone können aufgrund ihrer Lipophilie und ihrer geringen Größe die Blut-Hirn-Schranke passieren. Im Blut sind sie an Bindungsproteine assoziiert. Diese sind als ABP (Androgen-Binding-Globuline) und SHBG identifiziert. ABP/SHBG wird in der Leber und in den Sertolizellen synthetisiert (Joseph et al. 1991b, Hammond und Bocchinfuso 1996). SHBG wurde bisher in verschiedenen Spezies in den Geweben von Leber (Joseph et al. 1991b), Plazenta (Krupenko et al. 1990), Uterus (Avvakumov et al. 1986), Ovar (Forges et al. 2005), Hoden (Gershagen et al. 1989) und Endometrium (Misao et al. 1997) nachgewiesen. Beide Proteine werden auf dem gleichen Gen codiert, sind jedoch Produkte unterschiedlicher posttranslationaler Modifikation (Hammond und Bocchinfuso 1996) und sind unterschiedlich glycosiliert (Hammond und Bocchinfuso 1995). Ein Membranrezeptor für ABP/SHBG wurde bisher nicht nachgewiesen, jedoch existieren Untersuchungen, in denen eine cAMP Erhöhung in isolierten Zellen ausschließlich durch ABP verursacht wurde (Porto et al. 1995). Daraus ergibt sich, dass Steroidhormonbindungsproteine Zellfunktionen über einen Membranrezeptor regulieren könnten.

Im Gegensatz zu den Steroiden können die Bindungsproteine aufgrund ihrer Größe die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Jedoch wurde auch im Hypothalamus der Ratte SHBG sowie die entsprechende mRNA nachgewiesen (Herbert et al. 2003, Wang et al. 1990). Dies weist darauf hin, dass es zusätzlich zur Leber einen Produktionsort im ZNS gibt.

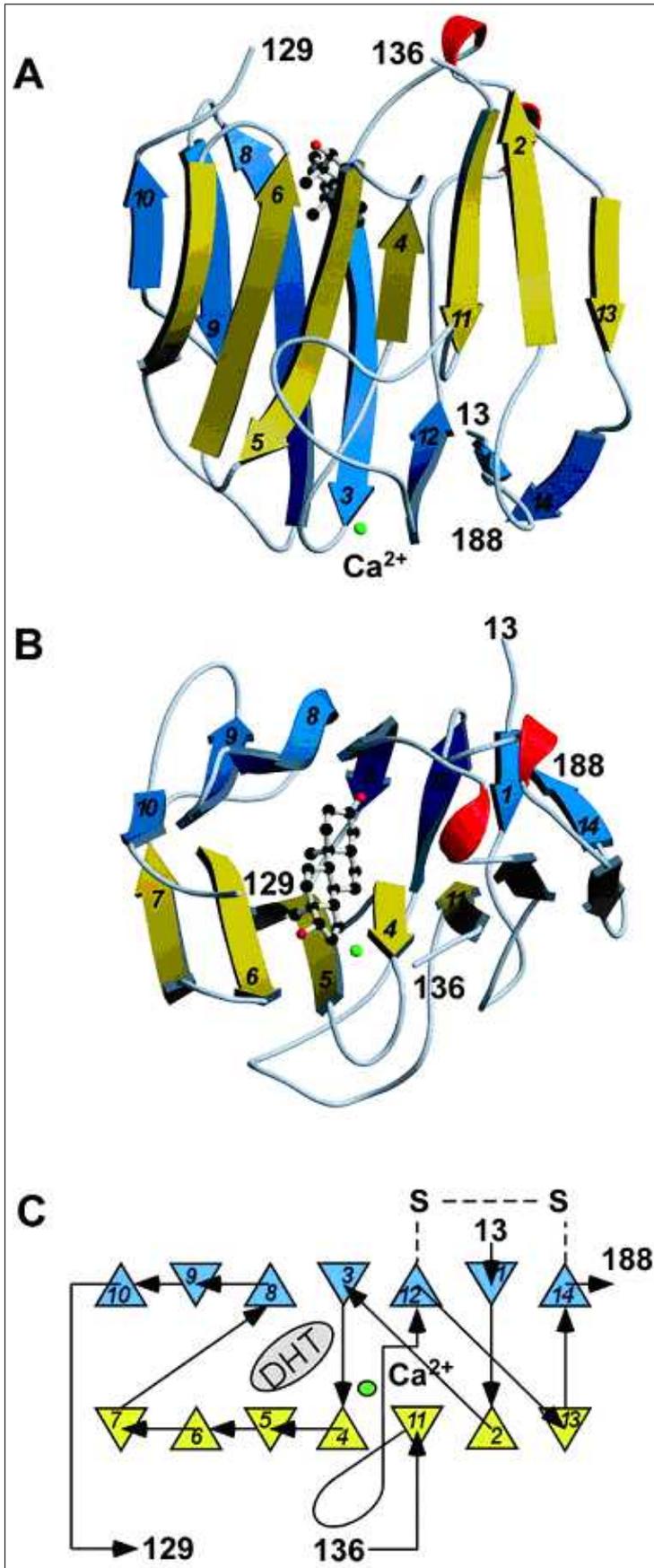


Abbildung 2: Schematische Struktur des SHBG Moleküls:

SHBG ist ein Homodimer. Die blauen und gelben Pfeile in der Grafik kennzeichnen jeweils die Proteinketten der Monomere. Zwischen ihnen befindet sich die Bindungstasche für DHT/Testosteron/Östrogen

A:
3D-Struktur des SHBG Moleküls mit gebundenem DHT

B:
DHT bindet an die 3. und 5. Proteinkette im SHBG Molekül

C:
schematische Darstellung des SHBG Moleküls mit in der Bindungstasche zwischen den Ketten 3 und 8 gebundenem DHT

Quelle:
www.rcsb.org/pdp/explore.do?structureId=1LHN
Protein Data Bank

2.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit soll der Nachweis von Sex-Hormone-Binding-Globulin im menschlichen Hypothalamus sein. Für die Untersuchung sollen Paraffinschnitte immunhistochemisch auf SHBG angefärbt werden und mikroskopisch qualitativ ausgewertet werden.

Zur Verifizierung des Proteins sollen biochemische Verfahren genutzt werden. Der Western Blot und die SELDI-TOF Massenspektrometrie sollen dafür herangezogen werden.

Im Zusammenhang mit dem qualitativen Nachweis von SHBG im menschlichen Hypothalamus soll die Lokalisation von SHBG in den einzelnen Kerngebieten und deren Neuronen untersucht und in einer Kartierung des Hypothalamus bezüglich des SHBG aufgezeigt werden.

Es soll der Versuch gewagt werden, durch die Lokalisation von SHBG in bestimmten Regionen des Hypothalamus eine funktionelle Interpretation zu liefern.

3 Material und Methoden

3.1 Gewebegewinnung und Verarbeitung

Es wurden für die erfolgten Untersuchungen menschliche Gewebe und Körperflüssigkeiten benutzt. Für verschiedene Versuche kam humaner Hypothalamus (n=7) (mittleres Alter 69 +/- 14), Plexus choroideus (n=7) (mittleres Alter 69 +/- 14), Liquor und Plasma zur Anwendung. Die Versuche wurden von der Ethik Kommission laut Protokoll # 1065-03/03 genehmigt.

Gewebeentnahme und Lagerung

Der Hypothalamus und Plexus choroideus, der für die biochemischen Untersuchungen und für die Proteinextraktion benutzt wurde, stammt aus Leichen des Pathologischen Institutes der Friedrich Schiller Universität in Jena. Die post-mortem Zeit der Leichen, denen Gewebe für die Versuche entnommen wurde, lag zwischen 24 und 48 Stunden.

Nach der Sektion wurde den post-mortem Gehirnen ein Block entnommen, der dem retrochiasmatischen Hypothalamus beginnend von der Lamina terminalis und der Commissura anterior bis zu den Copora mamillaria und dorsal bis zur Begrenzung des Thalamus enthielt. Die Kantenlänge des Gewebeblocks betrug ca. 2 cm.

Für die biochemischen Untersuchungen wurde nach dem Abwiegen das Material in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in mit Geschlecht der Leiche, Gewicht des Gewebes und Gewebebezeichnung beschrifteten Eppendorfröhrchen bei -80°C gelagert, bis es zur Verwendung bei den Versuchen kam.

Der Transport des Gewebes vom Institut für Pathologie in das Institut für Anatomie erfolgte mittels einem mit gefrorenem Wasserstoff gefüllten isolierendem Styroporbehälter bei ca. -80°C.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde das hypothalamische Gewebe nach der Entnahme aus der Leiche in 4%igem Formaldehyd in PBS (Roche) Immersionsfixierung für mindestens 3 Wochen fixiert.

Für die Paraffineinbettung wurden die Gewebelöcke in PBS gewaschen und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Sie wurden in Alkohollösung (Merck) mit 30%, 50%, 70%, 90% und 3 mal 100% für je 24 Stunden behandelt. Anschließend wurden sie mit dem Intermedium Methylbenzoat (Merck), danach in 1:1 Paraffin (Merck) und Methylbenzoat für je

24 Stunden behandelt und schließlich in Paraffin eingegossen.

Mit einem Reichert Grundschlittenmikrotom wurden Serienschnitte von 8 μm Dicke angefertigt. Diese wurden auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger (Merck) im Wasserbad aufgebracht und auf einer Wärmeplatte gestreckt. Die Objektträger wurden vor der Färbung für mindestens eine Woche in einem Trockenschrank gelagert.

Liquorherkunft

Der menschliche Liquor stammt aus dem pathologischen Institut von Professor Bonelli der Universität Graz.

Blutentnahme und Plasmagewinnung

Menschliches Plasma benutzte ich für die Versuche von mir selbst und von 5 anderen freiwilligen Kommilitonen. Dazu ließ ich einen anderen Doktoranden von mir Blut abnehmen und anschließend entnahm ich den Freiwilligen Blut. Je Proband wurden 20 ml Blut genutzt. Dieses wurde sofort für 10 min. bei 4000 Umdrehungen pro min. zentrifugiert. Danach wurde das Plasma abpipettiert und in einzelnen Eppendorfröhrchen bei -20°C bis zur weiteren Nutzung eingefroren.

3.2 Immunzytochemie

Eine Serie von 1000 Paraffinschnitten des menschlichen Hypothalamus wurden nach der ABC Methode spezifisch auf qualitatives Vorhandensein von SHBG gefärbt. Da sie auf den Objektträgern fixiert waren, mussten sie vor Beginn der Färbung rehydriert werden. Dies erfolgte in einer absteigenden Ethanolreihe.

Rehydrierung

Die Objektträger wurden zweimal für je fünf Minuten in Xylol (Merck) gestellt; danach für je vier Minuten in zunächst absoluten Alkohol und dann in 90%igen, 75%igen, 50%igen Alkohol.

Darauf wurden sie in PBS für 10 Minuten gewaschen.

Blocken der endogenen Peroxidase

Dazu wurde eine Mischung aus H₂O₂ 3%, Methanol 10% und PBS 87% (Merck) verwendet. Darin wurden die Schnitte für 15 Minuten inkubiert.

Es folgte erneut eine Waschphase in PBS für zwei Mal 15 Minuten.

Auftragen der hydrophoben Umrandung

Weil ab diesem Schritt die Lösungen nur noch in Tropfenform auf die Schnitte aufgetragen wurden, wurden sie mit einem DAKO-Pen (Merck) auf dem Objektträger eingekreist. Dieser verhindert, dass die Flüssigkeit über die damit gezogene Linie hinaus ausläuft.

Präinkubation

Bevor der Primärantikörper aufgetragen wurde, wurde mit Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck) in einer Verdünnung von 1:150 in PBS für 20 Minuten präinkubiert. Es folgte eine zweimalige Waschung mit PBS für je 5 Minuten.

Primärantikörper

Es wurden auf jeden Schnitt 50 μ l monoklonaler Anti-human-SHBG Clone 16D5 (Herstellung und Charakterisierung des Antikörpers siehe (Lewis et al. 1999)) in einer Verdünnung von 1:250 in PBS aufgetragen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Waschvorgang

Am nächsten Tag folgte zunächst das Waschen in PBS für zwei Mal fünf Minuten.

Sekundärantikörper

Danach wurden die Schnitte mit 50 μ l biotinyliertem Anti-mouse-IgG (Sigma) in einer Verdünnung von 1:150 in PBS für 2 Stunden in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten erneute Waschungen in PBS für zweimal 5 Minuten.

Horseradish-avidin-peroxidase-Komplex

Es wurde jeder Schnitt mit horseradish-avidin-peroxidase-Komplex (Sigma) in einer Verdünnung

von 1:150 mit PBS für zwei Stunden in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Zweimalige Waschung in PBS für je 5 Minuten.

DAB-Färbung

Die Färbung der markierten Proteine erfolgte mit einer Lösung aus 10 ml PBS, 2 mg Diaminobenzidin und 2 μ l H₂O₂ (Reagenzien von Merck). Diese wurde auf die Schnitte aufgebracht und für ca. 15 Minuten inkubiert, bis eine ausreichend kräftige Färbung zustande kam. Die Kontrolle über die Färbung fand unter dem Mikroskop statt.

Konservierung der Schnitte

Um die Schnitte anschließend zu konservieren, wurden sie mit Entellan (Merck) eingedeckelt. Dazu wurden sie zunächst in einer aufsteigenden Alkohol-Reihe entwässert. Diese Reihe bestand aus: 50%igem, 75%igem Alkohol, darin wurden die Schnitte für je fünf Minuten belassen; danach folgten 90%iger, zwei Mal absoluter Alkohol und zwei Mal Xylol, darin wurde je 4 Minuten entwässert. Sofort nach dem letzten Schritt mit Xylol wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckelt.

Kontrollfärbung

Die Kontrollen zu den untersuchten Schnitten wurden ebenso behandelt, aber statt des monoklonalen anti-SHBG Antikörpers wurden die Schnitte mit rabbit-Serum inkubiert.

3.3 Proteinextraktion mit Beads

PROBENVORBEREITUNG

SHBG wurde mit Hilfe der IDM affinity beads (CIPHERGEN) aus der Proteinlösung des Hypothalamus und Plexus choroideus gewonnen.

Zunächst wurden die Gewebe aufgetaut und mechanisch mit Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurden diese Proben in Lysispuffer zentrifugiert. Dieser Lysispuffer bestand aus:

0,1 M NaPH₄ pH 7,5;

2 mM MgCl₂;

5 mM EDTA (Sigma).

Kurz vor Benutzung der Lösung Zugabe von:

10 μl PMSF 10 mM in Isopropanol (Sigma);

10 μl CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat zwitterionic) 10% (Roche);

10 μl Leupeptin (Serin- und Cysteinproteasehemmer) 50 mM (Serva);

0,2 μl β -Mercaptoethanol (Sigma).

In dieser Lösung wurden die Gewebeproben mit 10000 Umdrehungen pro min. bei 3°C für 30 Minuten zentrifugiert und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Plasma und Liquor wurden ohne Vorbehandlung verwendet.

Affinitätsextraktion von SHBG

Die IDM affinity beads (Ciphergen) wurden folgendermaßen vorbereitet:

25 μl IDM Affinity beads wurden in ein 1,5ml Eppendorfröhrchen gefüllt und 8x mit 1 ml desinfiziertem, destilliertem Wasser gewaschen, und jedes Mal der Überstand vorsichtig abpipettiert.

Es wurden 200 μl Protein-A-Sepharose (Sigma) in 100 mM Acetatpuffer pH 5,0 zu den beads gegeben und über Nacht in einem end-over-end Mixer bei Raumtemperatur inkubiert.

Waschvorgang

Der Überstand wurde entfernt und die Beads zweimal mit 100 mM Acetatpuffer pH 5.0 gewaschen.

Entfernung reaktiver Gruppen

Um verbliebene reaktive Gruppen zu entfernen wurde eine Lösung aus 600 μl 0,5 M Tris-HCl pH 9,0 und 0,1% Triton X-100 (Merck) zu den beads zugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden in einem end-over-end Mixer bei Raumtemperatur. Danach wurden die beads mit 1 ml PBS für 15 min. in einem end-over-end Mixer bei Raumtemperatur gewaschen. Dies wurde wiederholt bis sich kein Schaum mehr bildete, wenn man das Eppendorfröhrchen für ein paar Sekunden vortexte.

Antikörperbindung

Es wurden 2 μg monoklonaler SHBG Antikörper clone 16D5 in 50 μl 50 mM Natriumazetatpuffer pH 5,0 gelöst, zu den beads gegeben und für eine Stunde im end-over-end Mixer inkubiert.

Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und die beads einmalig mit 500 μl 50 mM Natriumazetatpuffer pH 5,0 gewaschen.

Proteinbindung

Die Antigenlösung aus Hypothalamus und Plexus choroideus wurde zu den beads dazu gegeben und für eine Stunde in einem end-over-end Mixer bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden sie mit 500 μl PBS gewaschen wobei das Röhrchen mit den beads gut geschüttelt wurde.

Danach wurde zweimal mit 0,5 M NaCl + 0,05% TX in PBS für 15 min. bei 4°C gewaschen.

Anschließend wurde noch zweimal mit 500 μl PBS gut schüttelnd gewaschen.

Danach wurde mit 500 μl aqua destillata gewaschen.

Proteineluierung

Als letzter Schritt wurden 10 μl Lösung aus 50% ACN und 0,5% TFA zum eluieren der Proteine aus den beads dazugegeben und der Überstand davon mittels SELDI-TOF MS untersucht.

3.4 Proteinextraktion mit Säulenchromatographie

Als zweites verwendetes Verfahren zur Proteingewinnung wurde die Säulenchromatographie genutzt.

Gewebehomogenisierung

Vorgang wie 3.3. Proteinextraktion mit beads

Probenvorbereitung

Säulenvorbereitung:

Protein-A-Sepharose (Sigma) wurde mit PSA aktiviert und dreimal in PBS gewaschen. An-

schließlich wurde der Antikörper antiSHBG clone 16D5 in einer Konzentration von 1:10 dazugegeben und die Lösung wurde auf dem Schüttler bei 8°C über Nacht inkubiert.

Die antikörpergebundene Sepharose wurde in die Säule eingefüllt. Mit PBS wurde überflüssiger ungebundener Antikörper ausgewaschen. Zur Überprüfung des Waschvorgangs wurde mittels Dot Blot (Sigma) im Eluat Protein nachgewiesen. Der Waschvorgang wurde beendet, als im Eluat kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte.

Affinitätschromatographie

Probenaufbringung

Der aufgetaute Überstand wurde auf die mit Glaswolle verschlossene Pasteurpipette injiziert. Sie wurde so lange offen gelassen, bis das Proteingemisch sich in der gesamten Säule verteilt hatte. Dann wurde die Säule verschlossen und für 1,5 h inkubiert.

Die Säule wurde mit PBS gespült, bis kein Protein mehr ausgewaschen wurde. Dies wurde kontrolliert mittels Dot Blot, ein System, welches durch Blaufärbung von Spots auf einer Palette sämtliche Proteine in der auf ihr aufgetragenen Lösung anzeigt. Mit diesem Waschvorgang wurden alle ungebundenen Proteine ausgewaschen, und die an den Antikörper gebundenen Proteine verblieben in der Säule.

Proteineluierung

Nachfolgend wurde mit 0,1 molarem Glycinpuffer (7,5 g/l) (Sigma) mit einem pH von 4,2 (pH-Einstellung mit konzentrierter HCl) gespült. Das Eluat wurde unter Dot Blot-Kontrolle in Eppendorfröhrchen aufgefangen (13-15 Röhrchen pro Durchgang).

Anschließend wurde das Eluat im Dialyseschlauch gesammelt und über Nacht bei 4°C gegen H₂O dialysiert.

Anschließend wurde das Dialysat aus dem Schlauch wieder in Eppendorfröhrchen abgefüllt und in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert. Endlich wurden die in den Eppendorfröhrchen verbliebenen Proteine bei -20°C aufbewahrt.

3.5 Western Blot

Gießen des Agarosefußes

Auf einer mit Ethanol gereinigten Ceranplatte wurde der Agarosefuß gegossen. Dazu wurde 1 ml heiße 1%ige Agarose (Sigma), gelöst in aqua destillata, auf die Platte aufgetragen und die Glasplatten hinein gestellt und die Polymerisation abgewartet.

Gießen des Trenngels

Dazu wurde in folgender Reihenfolge eine Mischung zusammengestellt:

4 ml aqua destialta,

2,5 ml Trenngelpuffer (Sigma),

3,33 ml Acrylamid (Sigma),

50 μ l Ammoniumperoxiddisulfat 10%ig (Sigma),

10 μ l Tetramethylethyldiamid (Sigma)

Von dieser Mischung wurde ca. 3 ml von oben zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit aqua destillata überschichtet.

Nach zwei Stunden wurde das aqua destillata mit Filterpapier abgezogen.

Gießen des Sammelgels

Das Sammelgel setzte sich aus folgender Mischung zusammen:

3,05 ml aqua destillata,

1,25 ml Sammelgelpuffer (Sigma),

0,65 ml Acrylamid (Sigma),

50 μ l Ammoniumperoxiddisulfat 10%ig (Sigma),

10 μ l Tetramethylethyldiamid (Sigma)

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde der Kamm gestellt, um die Kammern für die Proben zu erhalten.

Nach 30 Minuten ist das Sammelgel polymerisiert, so dass der Kamm gezogen werden kann und die Klammern an den Glasplatten entfernt werden können.

Präparation der Elektrophoresekammer

Die so präparierten Platten wurden in die Elektrophoresekammer gestellt und der abstandhaltende Block wurde trocken eingepasst. Die Kammer wurde mit Laufpuffer (Sigma) auf-

gefüllt, bis die Platten bedeckt waren.

Auftragung der Proben

In die Probenkammern wurden die Proben mit einer Pipette eingefüllt. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem Deckel abgedeckt, die Spannung von 100 V angelegt und für 25 Minuten beibehalten. Danach wurde für eine Stunde und 20 Minuten eine Spannung von 150 V angelegt. Die blaue Farbe muss den Agarosefuß erreicht haben.

Vorbereitung des Western Blot

Für den Blot wurde das Gel aus den Glasplatten gelöst und folgendermaßen in das Blotgerät geschichtet:

Zuerst 3 Filterpapiere, darauf das Gel, darauf die Nitrozellulose-Membran und zuletzt wieder 3 Filterpapiere. Nitrozellulose-Membran und die Filterpapiere waren alle mit Anodenpuffer befeuchtet.

Western Blot

Durch das Gerät wurden für 1,5 Stunden 200 mA geleitet.

Fixierung der Proteine auf der Membran

Nach dem Blot befindet sich ein Großteil der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran. Diese werden mittels UV-Licht kovalent an die Membran gebunden. Sie muss dem ultravioletten Licht für eine Minute ausgesetzt sein.

Proteinnachweis im Gel

Das Gel wird auf weitere zurück gebliebene Proteine untersucht indem es in Comassieblau (Sigma) gefärbt und dafür über Nacht bei Raumtemperatur in diesem inkubiert wird.

Präinkubation der Membran

Die Nitrozellulose-Membran wurde mit 3% Glycin (Sigma) und 1% Fischgelatine (Sigma) in PBS-TX 0,05%ig für 2,5 Stunden präinkubiert.

Zweimaliges Waschen für je 15 Minuten in PBS-TX auf dem Schüttler.

Primärantikörper

Darauf wurde der kovalente Anti-SHBG Clone 16D5 1:100 in PBS-TX 0,05%ig auf die Membran aufgebracht, die Membran mit dem Antikörper eingeschweißt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Waschvorgang

Am nächsten Tag wurde die Membran mit PBS-TX 0,05%ig drei Mal je 15 Minuten gewaschen.

Sekundärantikörper

Anti-mouse-Antikörper 1:100 in PBS-TX 0,05%ig wurde aufgetragen und für 1,5 Stunden inkubiert.

Waschung in PBS-TX 0,05%ig für zwei Mal 15 Minuten.

Horseradish Avidin-Peroxidase-Komplex

Die Membran wurde mit horseradish Avidin-Peroxidase-Komplex 1:100 in PBS-TX 0,05%ig für 1,5 Stunden inkubiert (Reagenzien von Roche).

Anschließend zwei Waschgänge für 15 Minuten.

DAB-Färbung

Die Färbung erfolgte mit einer Lösung aus 4 mg DAB (Merck), 20 ml PBS-TX 0,05%ig, 4 μ l H₂O₂ 30%ig (Merck) und 40 μ l Nickelchlorid 8%ig (Merck). Damit wurde die Membran für ca. fünf Minuten inkubiert und bei ausreichender Färbung die Reaktion mit aqua destillata gestoppt.

Waschen für 2 Mal 15 Minuten in aqua destillata folgte.

Membranstabilisierung

Die Membran wurde anschließend bei 4°C über Nacht getrocknet und war dann für Auswertung unempfindlich.

3.6 Massenspektrometrie

Für die Surface enhanced laser desorption ionization time of flights (SELDI-TOF) Massenspektrometrieanalyse SELDI-TOF MS Analyse ist es notwendig, die Proben auf standardisierte Testplatten aufzubringen. Dazu wurden H4 Protein Chip Array, (CIPHERGEN) verwendet. Vor dem Gebrauch müssen diese aktiviert werden.

Aktivierung

Die test-palets wurden dreimal mit Seldi-Puffer (5 μl Tris-Puffer) für je 5 min. inkubiert. Dieser Puffer setzt sich zusammen aus 200 μl 0,1 M PBS und 600 μl ACN (Sigma) auf 2 ml 0,1 M PBS bei pH 7,4.

Probenauftragung

Die durch Vakuumzentrifugation getrockneten Proteine wurden mit 100 μl H4 Puffer versetzt.

Vor Probenauftragung wurden die H4-Chips mit 5 μl H4 Puffer befeuchtet und anschließend wurden die Proben aufgetragen. Nach Aerosolierung der wässrigen Probenkomponente wurde das test-palet mit 5 μl H4 Puffer gewaschen und der Spot getrocknet.

Auftragung der Matrix

125 μl ACN (Sigma) und 125 μl 1%iges TFA (Sigma) wurden mit Sinapinsäure (CIPHERGEN) verdünnt. Die Matrixlösung wurde zweimal auf den Spot aufgetragen. Sie ionisiert das Probenprotein und macht damit die Chips der SELDI-TOF MS Untersuchung zugänglich.

Untersuchung mit SELDI-TOF MS

Die Proben wurden in der SELDI-TOF MS Untersuchung in einem Intervall von 30000 bis 75000 Da und einer Laser-Intensität von 300, 250 und 200 detektiert. Die vorbereiteten Chips wurden in einem Lesegerät (PBS-II; CIPHERGEN Biosystems) unter Verwendung einer automatischen Datensammlung analysiert. Das Gerät wurde in einem positiven Ionenmodus gefahren, bei einer Nitrogen Laser Emission um maximal 337 nm. Die Chips wurden bei 300 nm untersucht; dies entspricht annähernd 200 μJ . Um ein jeweiliges Spektrum auszuwerten,

wurde eine Gesamtheit von 105 Durchgängen gemittelt. Zur Datenanalyse wurde CIPHERGEN Proteinchip Software 2.01 verwendet.

3.7 Hilfsmittel zur morphologisches Auswertung

Die angefärbten Schnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus BX50, der Digitalkamera Olympus DP10 und der Software DPsoft 3.0 visualisiert und ausgewertet.

Die topographische Kartierung wurde mit Hilfe des Stereotaktischen Atlas von Braak und Braak 1987 angefertigt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie SHBG-positiver Neurone

Mit Hilfe der oben genannten Methodik zur Färbung der Zellen in den anatomisch untersuchten Bereichen des menschlichen Gehirns konnten sowohl einzelne als auch Gruppen von Zellen lokalisiert werden. Je nach Region zeigten die nachgewiesenen SHBG-positiven Zellen die Morphologie der für dieses Gebiet charakteristischen Zellen:

Im Ncl. supraopticus (SON), Area hypothalamica lateralis (AHL) und akzessorischen Nuclei (AN) sind dies magnozellige Neurone. Der durchschnittliche Durchmesser der Perikaryen dieser Zellen ist $15\ \mu\text{m}$. Die stärkste Färbung zeigte sich jeweils im Zytoplasma, während die Zellkerne ausgespart blieben. Die perinukleäre Region ließ sich nur schwach anfärben, während sich das kernferne Zytoplasma in granulierter Form anfärbte.

Im Bereich des Ncl. periventricularis (PEV) und Ncl. arcuatus (ARC) fanden sich kleine und mittelgroße polygonale Zellen. Der durchschnittliche Durchmesser der parvozellulären Neurone beträgt ca. $7\ \mu\text{m}$. Sie zeigen sich als bi- und multipolare Zellen, deren Zytoplasma homogen angefärbt wurde, während der Nucleus ungefärbt blieb.

Im Bereich des Fornix (FO) und des Nucleus stria terminalis (bNST) finden sich sowohl magno- als auch parvozelluläre polygonale Zellen.

Typisch für die magnozelligen polygonalen SHBG-positiven Zellen ist das mit angefärbten Granula gefüllte Zytoplasma, mit Aussparung des Nucleus und einer perinukleären Region. Die magnozelligen Zellen zeigen sich in unterschiedlichen Formen: unipolare, bipolare und polypolare Neurone. Die parvozellulären SHBG-positiven Zellen zeigen ebenso ein stark angefärbtes Zytoplasma. Auch hier ist der Nucleus ausgespart.

4.2 Topographische Verteilung SHBG-positiver Neurone

Anhand der Untersuchung der Schnitte des humanen Hypothalamus wurde eine neuronale Kartierung angefertigt. Diese zeigt die qualitative Verteilung der SHBG Moleküle in 5 verschiedenen Schnittebenen. Je nach Stärke der Färbung und Quantität der angefärbten Zellen wurde die Anzahl der Sterne und Kreise in den Karten gewählt. Bereiche mit zahlreichen Markierungen kennzeichnen Gebiete mit reichlich gefärbten SHBG-positiven Zellen und Fasern. Gebiete mit weniger Markierungen in den Karten symbolisieren Areale mit niedriger

Anzahl gefärbter SHBG-positiver Zellen und Fasern.

Bei der Auswertung der untersuchten Hypothalami wurde keine Quantifizierung durchgeführt. Die topographische Verteilung war bei allen Hypothalami in etwa gleich, allerdings war die Intensität der Färbung unterschiedlich. Auf geschlechtsspezifische Unterschiede wurde nicht geachtet.

arc: Ncl. arcuatus

bstc: zentraler Ncl. des bed Ncl. stria terminalis

bnst: bed Ncl. stria terminalis

bnst-pm: posteriormedialer Anteil des bed Ncl. stria terminalis

CA: Commisura anterior

CM: Copora mammillaria

fo: perifornikale Region

FX: Fornix

inf: Infundibulum

ME: Eminentia mediana

NO: Nervus opticus

OT: Tractus opticus

OX: Chiasma opticus

pvn: Ncl. paraventricularis

rson: retrochiasmatische Region des Ncl. supraopticus

scn: Ncl. suprachiasmaticus

son: Ncl. supraopticus

III: dritter Ventrikel

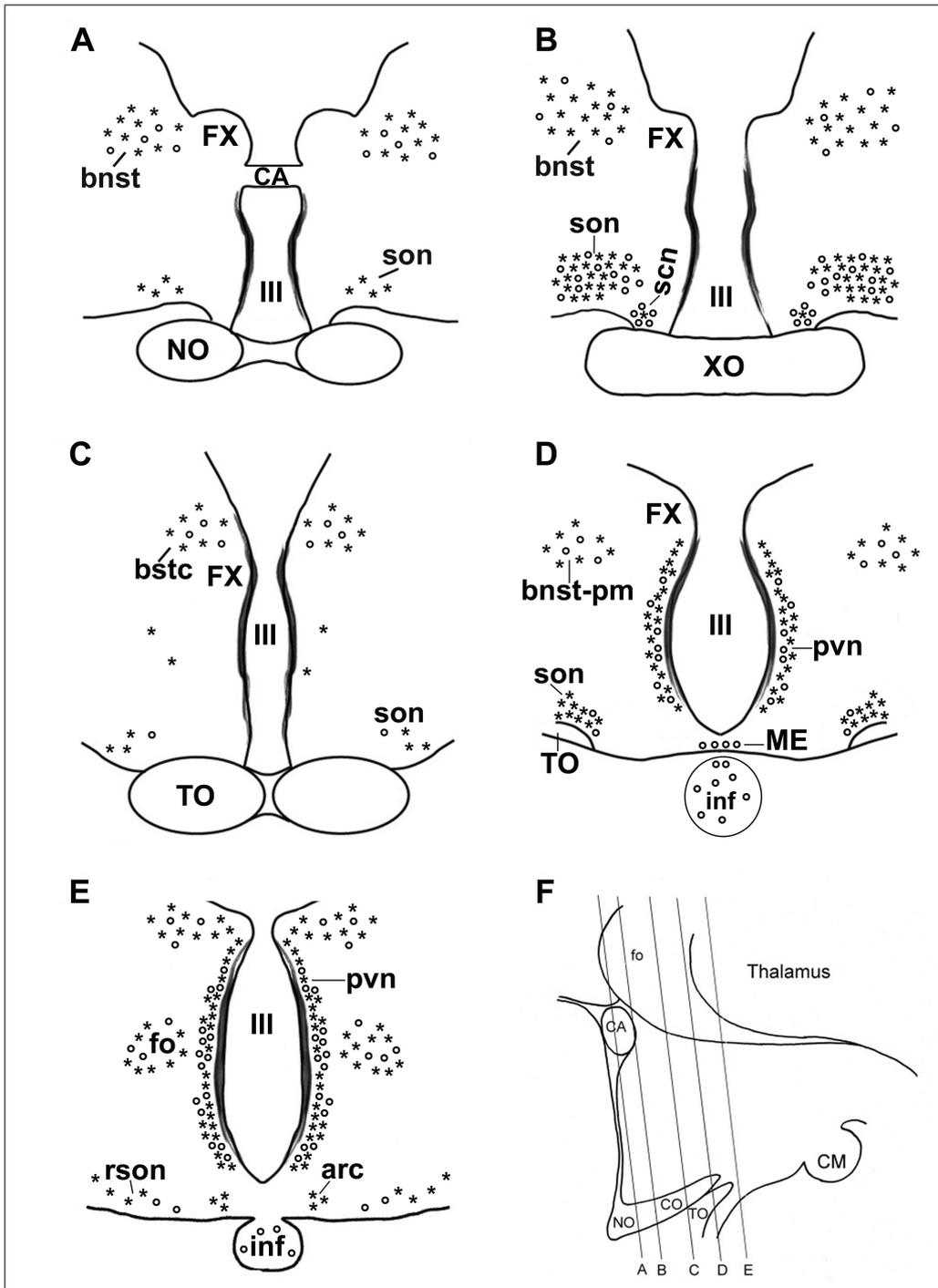


Abbildung 3: Qualitative Verteilung der SHBG-positiven Zellen und Fasern im Hypothalamus des Menschen

*: Lokalisation der SHBG-positiven Zellen und Varikositäten

o: Lokalisation der SHBG-positiven Axone und Fasern

4.3 Magnozelluläre hypothalamische Kerngebiete

Nucleus supraopticus und Nuclei accessorii

Im SON finden sich unterschiedliche Populationen von magnozellulären Neuronen. Diese wurden durch die SHBG spezifische Färbung nachgewiesen. In den Zellen finden sich deutliche Granula, an die der SHBG Antikörper gebunden hat. Die SHBG-positiven Zellen fanden sich im gesamten Nukleus. Auch im mit dem SON in Verbindung stehenden akzessorischen magnozellulären Nukleus fanden sich SHBG-positive Neurone entlang der Blutgefäße. (Bild A, Abb. 5)

Area hypothalamica anterior

In der AHL wurden hauptsächlich die magnozellulären Neurone SHBG spezifisch angefärbt. Wie auch im SON konnte man reichlich gefärbte Granula und einen ungefärbten Zellkern differenzieren. Die Zellen fanden sich größten Teils in Gruppierungen. Einige fanden sich vereinzelt abseits der Zellgruppen. (Bild B, Abb. 5)

Fornix und perifornicale Region

Im Bereich des Fornix wurden reichlich Fasern und der perifornikalen Region magnozelluläre Neurone gefunden, die sich mit reichlich Granula und einem ausgesparten Zellkern darstellen ließen. Diese fanden sich vorrangig in Gruppen angeordnet, aber waren auch vereinzelt zu finden. (Bild C, Abb. 5)

bed Nucleus stria terminalis

Im bNst fanden sich Neuronenansammlungen granulierter magnozellulärer Neurone. Diese lagen in deutlich abgrenzbaren Gruppen zusammen. Fasern konnten hier nicht nachgewiesen werden. Auch bei diesen Zellen war der Zellkern von der Färbung ausgenommen. (Bild D, Abb. 5)

4.4 Parvozelluläre Systeme

Ncll. Paraventricularis

In den PVN fanden sich sowohl kleine als auch mittelgroße Neurone, die SHBG Antikörper

banden. Zusätzlich fanden sich Nervenfasern die sich anfärben ließen, also auch SHBG enthielten. Diese Fasern befanden sich hauptsächlich nahe dem Ependym. (Bild E, Abb. 5)

Nucleus arcuatus und Nucleus suprachiasmaticus

Die parvozellulären Neurone im ARC und in anterioren Anteilen des SCN traten nur vereinzelt auf. Es fanden sich jedoch reichlich Projektionen und Fasern. (Bild F, Abb. 5)

4.5 Perivaskuläre Systeme

Die Kapillaren im periventriculären Bereich wurden von besonders stark anfärbbaren Zellen umschlossen oder tangiert. Die meisten dieser Neurone waren ca.15 bis 20 μm groß und gehören damit eher zu den magnozellulareren Neuronen. Fasern waren nicht erkennbar.

4.6 Infundibulum

Im Infundibulum ließen sich reichlich Fasern SHBG spezifisch anfärben. Außerdem fanden sich reichlich Varikositäten, die sich auch mit dem SHBG Antikörper darstellen ließen. (Bild A und B, Abb. 6)

Eminentia mediana

Cranial des Infundibulum in der Eminentia mediana und in den posterioren Anteilen des Nucleus suprachiasmaticus fanden sich reichlich angefarbte Fasern.

4.7 Ependym und Plexusepithel

Ependym

Das Ependym des dritten Ventrikels ließ sich homogen zum Teil intensiv anfärben. In den Zellen des Ependyms fanden sich keine Granula. Der Zellkern war nicht erkennbar. (Bild C, Abb. 6)

Einige der endymnahen makrozellulären Neurone waren unter Aussparung der perinukleären Region angefarbt. Im Bereich des Ependyms der Eminentia mediana waren reichlich Fasern und Tonyozyten angefarbt, jedoch das Epithel des Ependyms blieb ungefarbt. (Bild

D, Abb. 6)

Plexus choroideus und zerebrale Kapillaren

Das den Plexus choroideus umschließende Epithel konnte stark angefärbt werden. Auch bei diesem konnte man weder Granula noch Zellkern differenzieren. (Bild F, Abb. 6)

Perivaskuläre Neurone im Bereich der zerebralen Kapillaren erschienen deutlich gefärbt und granuliert. (Bild E, Abb. 6)

Die sich in den Gefäßen des Plexus choroideus befindlichen Erythrozyten blieben ungefärbt.

4.8 Nucleus periventricularis

Im PEV konnten keine Zellen mit SHBG Antikörpern angefärbt werden. In diesem Bereich fanden sich zwar Neurone aber diese nahmen den DAB Farbstoff nicht an.

4.9 Biochemische Befunde

Die Proben von Hypothalamus, Plexus choroideus, Liquor cerebrospinalis und Plasma wurden mit Western Blot untersucht, um zu verifizieren, ob es sich bei dem mit dem Antikörper für SHBG gebundenen Molekül aus den Proteingemischen um das SHBG mit seiner spezifischen Größe handelt. Das Ergebnis des Western Blots zeigte, dass sich in allen Proben die Bande bei 50000 Da fand. Zusätzlich wurde ausschließlich im Plasma eine Verschiebung der Bande nach ca. 54000 Da festgestellt. In der Kontrolle fand sich eine dieser Banden nicht. Mittels des Western Blots konnte allerdings die genaue Größe und der Größenunterschied der einzelnen SHBG Moleküle nicht exakt untersucht werden. Deswegen wurden die Gewebe und Flüssigkeiten anschließend mit der SELDI-TOF MS untersucht.

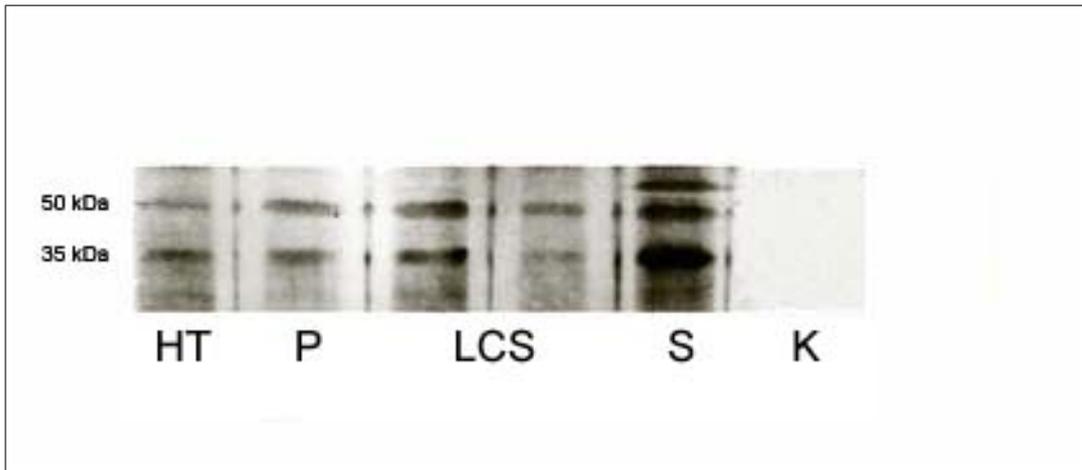


Abbildung 4: HT: Hypothalamus; P: Plexus; LCS: Liquor cerebrospinalis; S: Plasma; K: Kontrolle

- A** Gruppe von magnozellulären Neuronen im Nucleus supraopticus

- B** SHBG-positive magnozelluläre Neurone in der Area hypothalamica anterior

- C** SHBG-positive Neurone in der perifornikalen Region

- D** magnozelluläre Neurone im bed Nucleus stria terminalis

- E** SHBG-positive Neurone des Ncl. paraventricularis

- F** SHBG-positive Fasern im Ncl. arcuatus

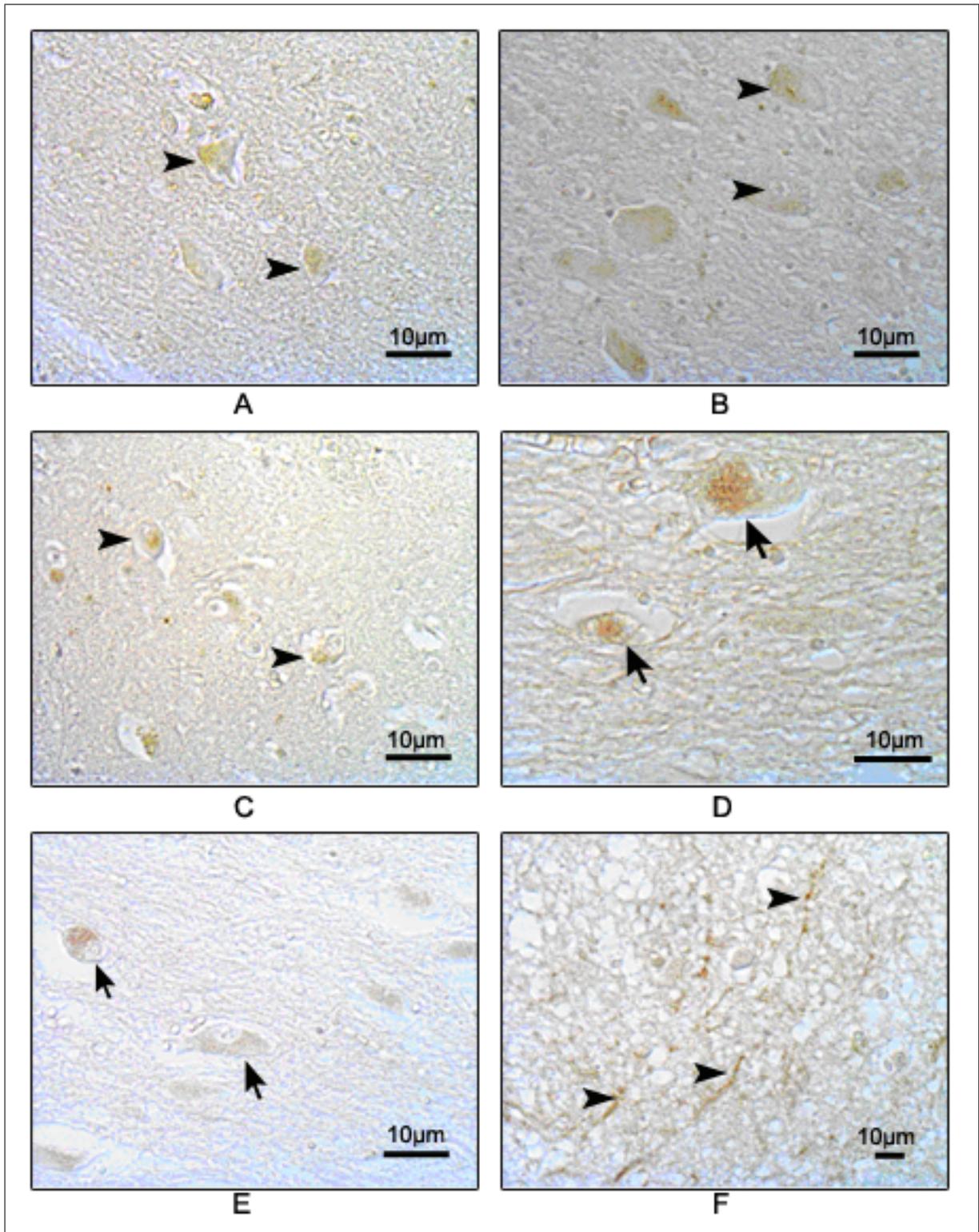


Abbildung 5: (A-F) SHBG-positive Strukturen in Kerngebieten des menschlichen Hypothalamus.

A Projektionen im Infundibulum

B Projektionen im Infundibulum

C Ependymale SHBG-positive Zellen und parvozelluläre Neurone des Ncl. periventricularis

D periependymales magnozellulars SHBG-positives Neuron mit deutlich angefärbtem Dendrit

E perivaskuläre Neurone mit deutlichen Granulationen nahe an zerebralen Kapillaren

F Ependym des Plexus choroideus

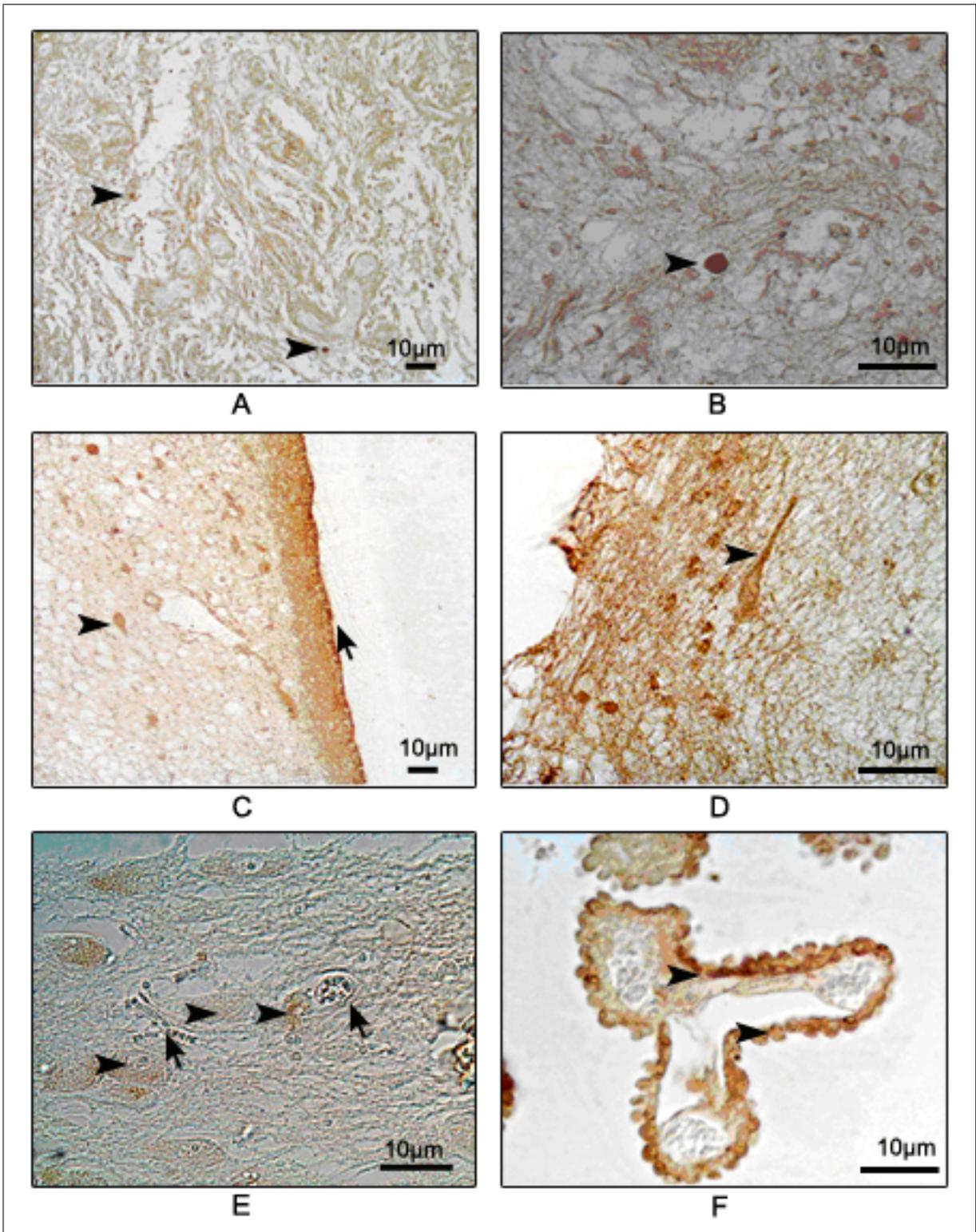


Abbildung 6: (A-F) SHBG-positive Strukturen in Kerngebieten des menschlichen Hypothalamus.

4.10 SELDI-TOF MS

Mit Hilfe des SELDI-TOF MS wurden zwei SHBG Moleküle unterschiedlichen Gewichtes identifiziert. Im Hypothalamus, Plexus choroideus, Liquor und Plasma wurde ein Protein von 49605 ± 6 Da gefunden. Ein Protein von 53909 Da wurde ausschließlich im Plasma identifiziert. In der Kontrolle fand sich kein Molekül dieser Größe. Die Nachweise der Western Blots zeigten Banden an der korrespondierenden Stelle.

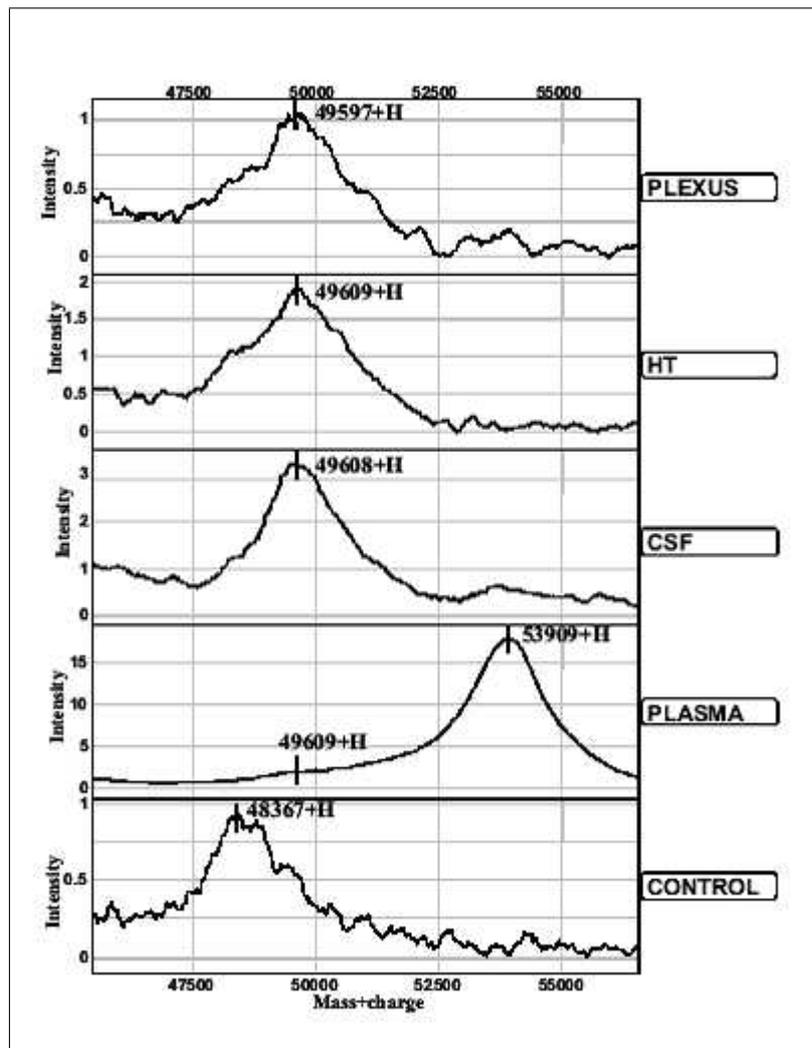


Abbildung 7: Darstellung der Peaks der mit SELDI-TOF MS untersuchten Proteine:

PLEXUS: Plexus choroideus

HT: Hypothalamus

CSF: Liquor cerebrospinalis

PLASMA: Plasma

CONTROL: Kontrolle

5 Diskussion

5.1 Topographische Verteilung SHBG-positiver Neurone im Hypothalamus

Bisher wurde SHBG in unterschiedlichsten Geweben des Menschen gefunden, besonders in Leber, Uterus, Ovar und den Reproduktionsorganen wie Testis, Prostata und Epididymidis (Krieg et al. 1977, Hryb et al. 2002, Forges et al. 2005, Kalme et al. 2003, Misao et al. 1997). Es wurde auch schon im Gehirn der Ratte nachgewiesen (Herbert et al. 2003) und die Expression von SHBG im Rattenhirn wurde gezeigt (Wang et al. 1990).

Jedoch wurde bisher kein menschliches Gehirn auf SHBG untersucht. Diese Arbeit untersuchte nun zum ersten Mal den menschlichen Hypothalamus auf das Vorhandensein von SHBG. Das Bindungsprotein für Steroide konnte mit den Methoden der Immunhistochemie in Zellen des menschlichen Hypothalamus in magno- und parvozellulären Neuronen lokalisiert werden.

SHBG-positive Zellen konnten vor allem im SON, PVN, FO, bNST, SCN und den accessorischen Nuclei beobachtet werden. Außerdem ließen sich Fasern und Varikositäten von Neuronen und die Projektionen im Infundibulum anfärben.

Durch den Nachweis des Proteins konnte erstmalig eine neuronale Kartierung angefertigt werden, in der die Gebiete des qualitativen Vorhandenseins von SHBG im Hypothalamus des Menschen grafisch dargestellt werden. Eine ähnliche Kartierung existiert bisher nur für den Hypothalamus der Ratte (Herbert et al. 2003).

Die magnozellularen Neurone sind als Syntheseort für Vasopressin und Oxytocin beschrieben worden (Armstrong 1995, Sawchenko und Swanson 1982). Diese Zellen sind unter bestimmten Umständen auch fähig, beide Peptide zu exprimieren (Jirikowski et al. 1991, Telleria-Diaz et al. 2001). In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch SHBG in den magnozellularen Neuronen des Menschen vorkommt. Es konnte nicht bewiesen werden, ob die Zellen dieses Globulin selbst synthetisieren, weil aufgrund der langen post-mortem Zeit die in-situ Hybridisierung von mRNA nicht erfolgreich durchführbar war. Im Hypothalamus der Ratte wurde jedoch die Synthese von SHBG bereits durch in-situ Hybridisierung (Herbert et al. 2003) und rt-PCR (Caldwell 2001) nachgewiesen. Ob Zellen des menschlichen Hypothalamus das Protein selbst exprimieren bleibt zu untersuchen, erscheint aber aufgrund der

Beobachtungen im Versuchstier wahrscheinlich.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene SHBG Isomeren in menschlichen Organen existieren. Ein 49,6 kDa großes SHBG Molekül kommt im Blut, Liquor und Plexus choroideus vor. Es war auch im Hypothalamus nachweisbar. Jedoch wurde in dieser Untersuchung ein weiteres, etwas größeres Molekül von 53,9 kDa gefunden, welches ausschließlich im Plasma nachgewiesen werden konnte. Ein weiterer Hinweis für die Produktion des SHBG im Hypothalamus ist die Größe des Moleküls. Proteine dieser Größe passieren nicht die Blut-Hirn-Schranke. Daher ist anzunehmen, dass es einen Syntheseort jenseits der Blut-Hirn-Schranke gibt. Dieser könnte im Hypothalamus zu finden sein.

Die Funktion des Globulins im Hypothalamus ist bisher unklar, jedoch legt die Lokalisation von SHBG in vielen verschiedenen Regionen multiple Funktionen nahe.

5.2 SHBG im Hypothalamoadenohypophysären System

In parvozellulären Neuronen wurde SHBG deutlich aber in wesentlich weniger Zellen als im magnozellularen System nachgewiesen. Auch im Infundibulum färbten sich Axone an. SHBG-positive Fasern konnten in verschiedenen Gebieten des Hypothalamus dargestellt werden. SHBG immunreaktive Fasern in der Pars tuberalis und der Eminentia mediana lassen vermuten, dass SHBG axonal von den parvozellulären Neuronen transportiert und in das adenohypophysäre Pfortadersystem ausgeschüttet wird. Damit könnte man annehmen, dass SHBG den gleichen Weg wie die Releasinghormone geht, von den Kerngebieten über die Eminentia mediana in das Pfortadersystem und schließlich in den Hypophysenvorderlappen. Von da werden sie bei Bedarf freigesetzt. Interessanterweise hat Östrogen einen wesentlichen Einfluss auf die Ausschüttung von nicht wenigen HVL Hormonen, z.B. FSH. Östrogen bewirkt an den Zellen des HVL eine Inhibition der Freisetzung von FSH. Nachdem die FSH Zellen kaum nukleäre Östrogenrezeptoren besitzen, ist der Mechanismus der Östrogenwirkung unklar (Stumpf 1972). Die Hemmung der FSH Freisetzung erfolgt durch Östrogeneinfluss. Dies könnte mit dem möglichen Vorhandensein eines putativen SHBG Rezeptors an HVL Zellen erklärt werden (Rosner et al. 1999a, Rosner et al. 1999b). SHBG bindet an den Membranrezeptor im HVL nachdem es Östrogen gebunden hat. Durch eine cAMP Kaskade, ausgelöst durch die Konformationsänderung des SHBG Membranrezeptors, wird die FSH Freisetzung inhibiert. Diese Theorie lässt sich auch bei anderen Zellen vermuten, die auf Östrogen reagie-

ren ohne einen Kernrezeptor für dieses Steroid zu besitzen. Membranrezeptoren für Steroide konnten bisher nicht gezeigt werden.

5.3 SHBG im Hypothalamoneurohypophysären System

Die Neurohypophyse ist Releasingstelle für Neurohormone. Vermutlich wird SHBG zusammen mit klassischen Hypothalamuspeptiden ausgeschüttet (Jirikowski et al. 2005, Herbert et al. 2003). Dabei handelt es sich neben anderen auch um Oxytocin und Adiuretin. Die Kolokalisation von SHBG und Oxytocin im Hypothalamus der Ratte wurde bereits nachgewiesen (Herbert et al. 2003, Anderson de la Llana 2003, Jirikowski et al. 2005) und es zeigte sich, dass das Protein und das Nonapeptid sogar in den gleichen Vesikeln gespeichert werden (Herbert et al. 2003). Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch beide Substanzen zusammen freigesetzt werden. Diese Annahme wird unterstützt durch die ähnliche Funktion, die SHBG und Oxytocin in der Beeinflussung des Sexualverhaltens haben (Gao et al. 2003). Wenn SHBG und Oxytocin auch beim Menschen kolokalisiert sind, dann könnte SHBG unter der Geburt mit Vasopressin kolokalisiert und auch koexprimiert sein, denn der Nachweis der Kolokalisation von Oxytocin und Vasopressin während des Geburtsvorganges wurde bei der Ratte schon erbracht (Herbert et al. 2003).

SHBG wird durch Östrogene beeinflusst. Ein Mangel an Östrogen führt zu Steigerung der Synthese von SHBG (Gao et al. 2003). Das bedeutet, dass bei niedrigen Östrogenspiegeln die Konzentration an SHBG im Hypothalamus und möglicherweise auch in der Peripherie steigt.

5.4 SHBG in gefäßnahen Neuronen

Eine besonders starke Färbung fand sich in magnozellulären Neuronen um die Gefäße in den untersuchten Hirnabschnitten. Es sind sowohl die kleinen Kapillaren im Gewebe des Hypothalamus, als auch große Gefäße. Die Epithelien der Gefäße sind unspezifisch angefärbt, denn sie konnten auch in den Kontrollen ohne Antikörper gefärbt werden. Die perivaskulären Neurone hingegen sind spezifisch gefärbt, denn sie stellten sich in den Kontrollen nicht dar. Möglicherweise nehmen diese Neurone das SHBG aus dem Blut auf.

Zwischen der Lamina media der Gefäße und den perivaskulären Neuronen befinden sich die Virchow-Robin-Räume, die mit Liquor cerebrospinalis gefüllt sind. Diese kommunizieren mit

den äußeren und inneren Liquorräumen. Perivaskuläre Neurone sezernieren parakrin verschiedene Stoffe, beispielsweise vasoaktive Substanzen, in den Liquor. Es könnte von diesen auch SHBG in den Liquor sezerniert werden. Steroide können ungehindert die Blut-Hirn-Schranke passieren und binden möglicherweise im Liquor an SHBG, welches nun als Steroidtransporter im Liquor fungiert. SHBG könnte auch selbst als vasoaktive Substanz wirken.

5.5 Infundibulum

In Schnitten durch das Infundibulum konnten Fasersysteme immunhistochemisch dargestellt werden. Sie kamen reichlich vor. Da im Infundibulum die Axone von magnozellulären neurosekretorischen Neuronen verlaufen, die Hormone und Releasingfaktoren durch axonalen Transport in die Neurohypophyse bringen, ist anzunehmen, dass die SHBG-positiven Fasern den axonalen Transport von SHBG in die Neurohypophyse zeigen. Unterstützt wird diese Annahme durch den Nachweis von SHBG im Hypophysenhinterlappen der Ratte (Gao et al. 2003, Herbert et al. 2003). Es ist wahrscheinlich, dass SHBG von der Neurohypophyse unter Einfluss von Hormonen, möglicherweise Östradiol, abgegeben wird. Bei Versuchen an ovariectomierten Ratten unter Östradiolbehandlung nahm die Konzentration an SHBG im Hypophysenhinterlappen signifikant ab (Gao et al. 2003). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass sich SHBG im Gehirn in einem dynamischen System befindet, mit Produktion in hypothalamischen Kerngebieten, zellulären Transport in die Hypophyse und Freisetzung in das extrazelluläre Gewebe und das Blut.

5.6 Ependym und Plexusepithel

Die Zellen des Ependyms und das Epithel des Plexus choroideus wurde in diesen Versuchen stark immunhistochemisch angefärbt. Die Verteilung der antikörpergebundenen Farbpigmente zeigte sich im Unterschied zu den magnozellulären Neuronen über das gesamte Zytoplasma verteilt mit besonders starker Färbung der Membranen. Die Zellkerne waren nicht ausgespart. Die hohe Konzentration von SHBG in den Epithelzellen und im Ependym lässt vermuten, dass die Zellen das Protein aus dem Blut oder dem Liquor aufnehmen. Die in-situ Hybridisierung im Plexus und Ependym der Ratte zeigte, dass SHBG nicht in den Epithelzellen synthetisiert wird (Herbert et al. 2003). Da SHBG ein großes Protein ist, welches nicht durch die Membranen diffundieren kann, muss man davon ausgehen, dass in

den Membranen Bindungsproteine für SHBG existieren. Es wurden bereits Theorien über Membranrezeptoren für SHBG aufgestellt. Es wurde vermutet, dass der SHBG Rezeptor in der Prostata nur dann SHBG bindet, wenn es zuvor an seiner Steroidbindungsstelle DHT gebunden hat (Hryb et al. 2002) SHBG Rezeptoren können nicht nur in der Prostata vermutet werden, sondern auch im Uterus (Avvakumov et al. 1986), in der Placenta (Diaz et al. 1997, Larrea et al. 1993, Krupenko et al. 1990), in der Mamma (Isaksson et al. 1999) in den Testis (Herbert et al. 2005b) und in Mammakarzinomgewebe (Cui et al. 2005), da in diesen Geweben SHGB bereits nachgewiesen wurde.

Eine weitere Theorie postuliert, dass SHBG zunächst an seinen Membranrezeptor koppelt, bevor es Östrogen bindet. Dieser Vorgang könnte die Konformation des intrazellulären Teils des Rezeptors ändern und damit Veränderungen in der Zelle bewirken, beispielsweise eine Aktivierung einer Adanylatcyclase die eine cAMP Kaskade in Gang setzt und die Produktion von cAMP steigert (Rosner et al. 1999a).

Eine dritte Theorie besagt, dass SHBG als Antagonist am SHBG Membranrezeptor agiert, wenn es zuvor DHT gebunden hat (Caldwell et al. 2002, Caldwell et al. 2000). SHBG ohne gebundenes DHT hatte in diesen Untersuchungen einen fördernden Einfluss auf das Sexualverhalten weiblicher Ratten, während ungebundenes DHT oder an SHBG gebundenes DHT diesen Einfluss nicht ausübte. Nach Caldwell's Theorie steht der putative SHBG Rezeptor über ein gemeinsames G-Protein mit dem Oxytocinrezeptor in Verbindung.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Verteilungsmuster für SHBG im menschlichen Hypothalamus lassen vermuten, dass auch im Gehirn Membranrezeptoren für SHBG existieren. Besonders die starke Färbung der ependymalen Zellen des dritten Ventrikels und endothelialen Zellen des Plexus choroideus legen eine derartige Annahme nahe. Die starke Färbung könnte also durch die Bindung von SHBG an Membranrezeptoren und möglicherweise auch die Internalisierung von SHBG in die Zelle hervorgerufen worden sein.

5.7 Nucleus periventricularis

Im Nucleus periventricularis konnten in den zu dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen keine SHBG-positiven Zellen nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen an der Ratte, bei denen im PEV ABP positive magnozellige Neurone gezeigt werden konnten (Jirikowski et al. 2005).

5.8 Nucleus suprachiasmaticus

Im SCN fanden sich wenige SHBG-positive Neurone. Im SCN wird der circadiane Rhythmus koordiniert (Moore und Eichler 1972, Stephan und Zucker 1972). Die Neurone dieser Kernregion scheinen neurosekretorische Zellen für Vasopressin und vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) zu sein. Nach Egli wird der circadiane Rhythmus und die Freisetzung von Oxytocin und Prolactin aus dem Hypophysenvorderlappen vermutlich über die Hormone des SCN reguliert (Egli et al. 2004). Das nachgewiesene SHBG hat möglicherweise auch auf diesen einen Einfluss.

5.9 Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis

Im SON und im PVN konnten SHBG-positive magno- und parvozelluläre Neurone nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass in diesen beiden Kernregionen Vasopressin synthetisiert wird (Panayotacopoulou et al. 2005) und per axonalem Transport in den Hypophysenhinterlappen gelangt. Da sich in den Präparaten auch Varikositäten im Infundibulum und in der Eminentia mediana anfärben ließen, kann man davon ausgehen, dass auch SHBG in diesen Kernregionen synthetisiert wird und in Axonen in den HHL gelangt.

5.10 Fornix und perifornikale Region

Im Fornix wurden SHBG-positive Fasern gefunden und in der perifornikalen Region konnten reichlich SHBG-positive hauptsächlich magnozellanäre Neurone nachgewiesen werden. Diese Entdeckung war überraschend, da der Fornix nicht zu den hypothalamischen Kerngebieten gehört, sondern vielmehr zum limbischen System. Da dieses System in Lernprozessen (Brasted et al. 2005) und emotionalen Empfindungen eine Rolle spielt (Antoniadis und McDonald 2006), kann man vermuten, dass SHBG auch als Neurotransmitter fungiert und möglicherweise Einfluss auf Emotionen und Instinkte haben könnte.

5.11 Bed Nucleus der Stria terminalis

Besonders viele SHBG-positive Neurone fanden sich im bNST. Die magnozellanären granulierten Zellen befanden sich dicht beieinander in Gruppen. Dieser Bereich beeinflusst

das soziale Verhalten. Individuen mit ausgeprägt sozialem Verhalten exprimieren vermehrt Östrogenrezeptor alpha (Cushing und Wynne-Edwards 2006), so dass anzunehmen ist, dass Östrogene einen Einfluss auf das soziale Verhalten haben. Da auch in diesem Bereich SHBG-positive Zellen angefärbt werden konnten, hat dieses möglicherweise einen ähnlichen Einfluss oder ist an der Modifikation des Verhaltens beteiligt.

5.12 Nucleus arcuatus

Im ARC fanden sich reichlich SHBG-positive parvozelluläre Neurone. Der ARC reguliert die Sekretion der Hormone des Hypophysenhinterlappens. Er besitzt neurosekretorische Zellen, die Neuropeptid Y produzieren und sezernieren und mit diesem Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben (Dong et al. 2006, Fetissov et al. 2005). Da sich auch hier in Zellen SHBG nachweisen ließ, ist es möglich, dass SHBG auch hier synthetisiert wird, eine neurotransmitterische Funktion besitzt und Einfluss auf die Sekretion der Hormone des HHL nimmt.

5.13 Nachweis des Proteins SHBG mittels Western Blot

Der Western Blot wurde in diesen Untersuchungen genutzt, um Proteine, an die der zur Färbung genutzte Antikörper bindet, auf ihre Eigenschaften zu untersuchen. Es wurden die untersuchten Gewebe affinitätsgereinigt, und die an die Antikörper gebundenen Proteine dem Blot zugeführt. Bei den Geweben handelte es sich einerseits um Plasma und Liquor, Körperflüssigkeiten, in denen SHBG bereits nachgewiesen wurde (Fassler et al. 1985), andererseits um Hypothalamus und Plexus choroideus. Weiterhin wurde auch der Antikörper im Blot untersucht, um zu zeigen, dass es sich bei den affinitätsgereinigten Proteinen nicht um den Antikörper handelt. Die Ergebnisse zeigten in den Spuren der Gewebe Banden im Größenbereich von 50 kDa. Die Banden des Hypothalamus, Liquor, Plasmas und Plexusgewebes befanden sich in exakt gleicher Höhe. Die Bande für Plasma war jedoch auch auf den Bereich von 54 kDa ausgedehnt. Der Nachweis eines SHBG Proteins im Plasma mit einem größeren Gewicht, als das in anderen Geweben nachgewiesene, lässt vermuten, dass es sich bei dem im Hypothalamus gefundenen Protein um SHBG handelt, dies jedoch anderen Ursprungs sein muss als das SHBG im Plasma. Diese überraschende Entdeckung unterstützt die bereits existierenden Theorien, dass SHBG im Gehirn, wahrscheinlich in Neuronen des Hypothalamus produziert wird (Gao et al. 2003).

5.14 Nachweis des Proteins SHBG mittels SELDI-TOF MS

Der SELDI-TOF Massenspektrometrie wurden affinitätsgereinigte Proteine auf H4 Chips zugeführt und mittels Protein Chip Reader ausgewertet. Die Ergebnisse unterstützen die Aussagen des Western Blot. Es wurden die SHBG Moleküle von Plexus choroideus, Hypothalamus, Liquor und Plasma untersucht. Die Größe des Moleküls in Plexus, Hypothalamus und Liquor fand sich bei 49,6 kDa. Die Größe des im Plasma identifizierten Moleküls war jedoch bei 53,9 kDa zu finden. Die beiden Kontrollen beinhalten zum einen den zur Reinigung der Proteine genutzten Antikörper, zum anderen Hypothalamusgewebe von einer mit unspezifischen Antikörpern gereinigten Probe. Die Kontrolle des Antikörpers und die unspezifisch gereinigte Kontrolle zeigt keinen dieser Peaks. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem SHBG im menschlichen Gehirn um ein anderes Molekül handeln muss, als das in anderen Körpergeweben, speziell im Plasma, vorkommende. Mit diesen Untersuchungen lässt sich die Annahme unterstützen, dass es Synthesorte für SHBG im menschlichen Gehirn gibt. Diese könnten sich im Bereich des Hypothalamus befinden. Bei der Ratte wurde mittels in-situ Hybridisierung die mRNA für SHBG im Hypothalamus bereits nachgewiesen, und damit bewiesen, dass SHBG im Hypothalamus der Ratte gebildet wird (Gao et al. 2003).

6 Schlussfolgerungen

SHBG wird wahrscheinlich im Hypothalamus des Menschen produziert, ähnlich wie das bei der Ratte nachgewiesen werden konnte (Herbert et al. 2003). Der Nachweis von SHBG-kodierender mRNA ist naturgemäß am menschlichen Hirngewebe mit einer entsprechend langen post-mortem Zeit schwierig.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass hypothalamisches SHBG ein anderes Molekulargewicht als Plasma-SHBG hat. In wie weit sich die beiden Proteine unterscheiden, ob sie zum Beispiel von unterschiedlichen Genen kodiert oder nur unterschiedlich gespleisst werden, ist das Thema laufender Untersuchungen.

Die intrinsische Produktion von SHBG im Hypothalamus könnte eine weitreichende funktionelle Bedeutung haben: Magnozellige Neurone in den klassischen Kerngebieten der Ratte koexprimieren SHBG mit den Hinterlappenhormonen Vasopressin und Oxytocin (Herbert et al. 2005b, Anderson de la Llana 2003). Die Lokalisation in Axonen des hypothalamoneurohypophysären Systems legt nahe, dass SHBG zusammen mit Releasingfaktoren wirken könnte. Im hypothalamoneurohypophysären System könnte SHBG als Neurohormon wirken. Bisherige funktionelle Untersuchungen untermauern diese Hypothesen (Caldwell et al. 2002). Im Liquor nachgewiesenes SHBG könnte aus ventrikelnahen neuroendokrinen Zellen oder dem Plexusepithel stammen. Sicherlich kommt SHBG im Liquor eine Bedeutung als Steroid-Puffer, ähnlich wie im Plasma zu. Steroide spielen bei der Kontrolle zentraler Abläufe, Verhalten und Befinden, insbesondere aber bei der neuronalen Entwicklung eine entscheidende Rolle.

„Neurosteroide“ stehen seit einigen Jahren im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die weitverzweigten SHBG-positiven Projektionen in Teilen des limbischen Systems legen eine Funktion als zentrale neuroaktive Substanz, möglicherweise als Transmitter nahe. Verhaltensbiologische Untersuchungen zeigen dass SHBG an der Steuerung von Sexual- und Brutpflegeverhalten bei der Ratte beteiligt ist (Caldwell et al. 2000).

Auch Gliazellen, wie das Ependym oder das Plexusepithel, scheinen SHBG zu enthalten. Ob sie selbst zur SHBG Expression befähigt sind oder SHBG aus dem Liquor aufnehmen ist im Moment unklar. Möglicherweise spielt SHBG bei der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke eine Rolle.

Die vielfältigen Lokalisationen von SHBG und das weitläufige Netz von Projektionen legt

mehrere unterschiedliche Funktionen nahe, so, wie das auch für andere Neurohormone beschrieben wurde. Neben dem neurohypophysären Hormon ist auch eine Rolle als hypophysiotroper Faktor, als Liquorprotein und als Neurotransmitter denkbar. Weitere Untersuchungen müssen zeigen in wie weit SHBG in der klinischen Neuropharmakologie Bedeutung haben könnte.

7 Literaturverzeichnis

Anderson de la Llana S, Jirikowski, G.F., Schäfer, H., Bernstein, H.G., Lewis, J., Eberstberger, A., Caldwell, J.D. 2003. Localization of sex hormone binding globulin SHBG in magnocellular neurons of the rat hypothalamus. *Soc Neurosci*,

Antoniadis EA, McDonald RJ. 2006. Fornix, medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and mediodorsal thalamic nucleus: roles in a fear-based context discrimination task. *Neurobiol Learn Mem*, 85 (1):71-85.

Armstrong WE. 1995. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. *Prog Neurobiol*, 47 (4-5):291-339.

Avvakumov GV, Zhuk NI, Strel'chyonok OA. 1986. Subcellular distribution and selectivity of the protein-binding component of the recognition system for sex-hormone-binding protein-estradiol complex in human decidual endometrium. *Biochim Biophys Acta*, 881 (3):489-498.

Avvakumov GV, Muller YA, Hammond GL. 2000. Steroid-binding specificity of human sex hormone-binding globulin is influenced by occupancy of a zinc-binding site. *J Biol Chem*, 275 (34):25920-25925.

Avvakumov GV, Grishkovskaya I, Muller YA, Hammond GL. 2001. Resolution of the human sex hormone-binding globulin dimer interface and evidence for two steroid-binding sites per homodimer. *J Biol Chem*, 276 (37):34453-34457.

Becchis M, Sullivan PM, Ordronneau P, Petrusz P, Joseph DR. 1996. Distribution of immunoreactive androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat. *Steroids*, 61 (7):392-400.

Benninghoff D. 2004. *Anatomie Band 2. Aufl.*

Bocchinfuso WP, Hammond GL. 1994. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca^{2+} stabilize dimer formation. *Biochemistry*, 33 (35):10622-10629.

Braak HB, E. 1987. The Hypothalamus of the human adult:chiasmatic region. *Anatom Embryol (Berl)*, (175(3)):315-330.

Brasted PJ, Bussey TJ, Murray EA, Wise SP. 2005. Conditional motor learning in the nonspatial domain: effects of errorless learning and the contribution of the fornix to one-trial learning. *Behav Neurosci*, 119 (3):662-676.

Brightman MW, Reese TS. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*, 40 (3):648-677.

Brockhaus H. 1942. Beitrag zur normalen Anatomie des Hypothalamus und der Zona incerta beim Menschen. *J Psychol Neurol*, (51):96-196.

Calas A, Landry M, Roche D, Trembleau A. 1994. [A model of phenotypic plasticity: the hypothalamo-posthypophyseal neurons]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 188 (3):187-206.

Caldwell JD. 2001. Evidence of sex hormone binding globulin binding sites in the medial preoptic area and hypothalamus. *Horm Metab Res*, 33 (1):7-9.

Caldwell JD, Hoffe S, Englof I. 2002. Sex hormone binding globulin facilitates female sexual receptivity except when coupled to dihydrotestosterone. *Brain Res*, 948 (1-2):102-107.

Caldwell JD, Moe BD, Hoang J, Nguyen T. 2000. Sex hormone binding globulin stimulates female sexual receptivity. *Brain Res*, 874 (1):24-29.

Catalano MG, Frairia R, Boccuzzi G, Fortunati N. 2005. Sex hormone-binding globulin antagonizes the anti-apoptotic effect of estradiol in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 230 (1-2):31-37.

Cui Y, Shu XO, Cai Q, Jin F, Cheng JR, Cai H, Gao YT, Zheng W. 2005. Association of breast cancer risk with a common functional polymorphism (Asp327Asn) in the sex hormone-binding globulin gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14 (5):1096-1101.

Cushing BS, Wynne-Edwards KE. 2006. Estrogen receptor-alpha distribution in male rodents is associated with social organization. *J Comp Neurol*, 494 (4):595-605.

Diaz L, Queipo G, Carino C, Nisembaum A, Larrea F. 1997. Biologically active steroid and thyroid hormones stimulate secretion of sex hormone-binding globulin by human term placenta in culture. *Arch Med Res*, 28 (1):29-36.

Dierickx K, Vandesande F. 1977. Immunocytochemical localization of the vasopressinergic and the oxytocinergic neurons in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res*, 184 (1):15-27.

Dong Y, Tyszkiewicz JP, Fong TM. 2006. Galanin and Galanin-Like Peptide Differentially Modulate Neuronal Activities in rat Arcuate Nucleus Neurons. *J Neurophysiol*,

Egli M, Bertram R, Sellix MT, Freeman ME. 2004. Rhythmic secretion of prolactin in rats: action of oxytocin coordinated by vasoactive intestinal polypeptide of suprachiasmatic nucleus origin. *Endocrinology*, 145 (7):3386-3394.

El Majdoubi M, Poulain DA, Theodosis DT. 2000. Activity-dependent morphological synaptic plasticity in an adult neurosecretory system: magnocellular oxytocin neurons of the hypothalamus. *Biochem Cell Biol*, 78 (3):317-327.

Elman I, Breier A. 1997. Effects of acute metabolic stress on plasma progesterone and testosterone in male subjects: relationship to pituitary-adrenocortical axis activation. *Life Sci*, 61 (17):1705-1712.

Erlık Y, Meldrum DR, Judd HL. 1982. Estrogen levels in postmenopausal women with hot flashes. *Obstet Gynecol*, 59 (4):403-407.

Fassler R, Schwarz S, Pohl P. 1985. Demonstration of sex hormone binding globulin in human cerebrospinal fluid. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1985 Oct;23(4): :349-359.

Fellmann D, Bloch B, Bugnon C, Lenys D. 1979. [Immunocytochemical study of the maturation of the hypothalamo-neuro-hypophysial axes in the human fetus (author's transl)]. *J Physiol (Paris)*, 75 (1):37-43.

Fetissof, Bergstrom, Johansen JE, Hokfelt T, Schalling M, Ranscht B. 2005. Alterations of arcuate nucleus neuropeptidergic development in contactin-deficient mice: comparison with anorexia and food-deprived mice. *Eur J Neurosci*, 2005 Dec;22(12):3217-28.

Forges T, Gerard A, Monnier-Barbarino P, Gerard H. 2005. Immunolocalization of sex hormone-binding globulin (SHBG) in human ovarian follicles and corpus luteum. *Histochem Cell Biol*, 2005 Sep;124(3-4):285-90. Epub 2005 Oct 28.

Gao G, Herbert Z, Kong J, Gabrielson N, Mautz A, Wu D, Jirikowski GF, Caldwell JD. 2003. Estradiol control of expression and levels of estradiol-binding proteins in the medial preoptic area, medial hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology*, 78 (2):61-71.

Gerard A, Bedjou R, Clerc A, Maachi F, Closset J, Hammond GL, Nabet F, Gerard H. 1996. Growth response of adult germ cells to rat androgen-binding protein and human sex hormone-binding globulin. *Horm Res*, 45 (3-5):218-221.

Gershagen S, Lundwall A, Fernlund P. 1989. Characterization of the human sex hormone binding globulin (SHBG) gene and demonstration of two transcripts in both liver and testis. *Nucleic Acids Res*, 17 (22):9245-9258.

Gimpl G, Fahrenholz F. 2001. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81 (2):629-683.

Griffin PR, Kumar S, Shabanowitz J, Charbonneau H, Namkung PC, Walsh KA, Hunt DF, Petra PH. 1989. The amino acid sequence of the sex steroid-binding protein of rabbit serum. *J Biol Chem*, 264 (32):19066-19075.

Grindstaff RR, Cunningham JT. 2001. Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Exp Neurol*, 171 (2):219-226.

Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1995. Sex hormone-binding globulin/androgen-binding protein: steroid-binding and dimerization domains. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53 (1-6):543-552.

Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1996. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. *Horm Res*, 45 (3-5):197-201.

Herbert Z, Jirikowski GF, Petrusz P, Englof I, Caldwell JD. 2003. Distribution of androgen-binding protein in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system, co-localization with oxytocin. *Brain Res*, 992 (2):151-158.

Herbert Z, Gothe S, Caldwell JD, Bernstein HG, Melle C, von Eggeling F, Lewis J, Jirikowski GF. 2005a. Identification of sex hormone-binding globulin in the human hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 81 (5):287-293.

Herbert Z, Weigel S, Sendemir E, Marshall A, Caldwell JD, Petrusz P, Peuckert C, Jirikowski GF. 2005b. Androgen-binding protein is co-expressed with oxytocin in the male reproductive tract. *Anat Histol Embryol*, 34 (5):286-293.

Herbert ZG, Göthe S, Caldwell J.D, Bernstein, H.G, Jirikowski, G.F. 2004. Sexhormone binding globulin/SHBG is produce in human hypothalamic neurons. *FENS Abstr*, 2

Hryb DJ, Nakhla AM, Kahn SM, St George J, Levy NC, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin in the human prostate is locally synthesized and may act as an autocrine/paracrine effector. *J Biol Chem*, 277 (29):26618-26622.

Isaksson E, Sahlin L, Soderqvist G, von Schoultz E, Masironi B, Wickman M, Wilking N, von Schoultz B, Skoog L. 1999. Expression of sex steroid receptors and IGF-1 mRNA in breast tissue—effects of hormonal treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1999 Sep-Oct (70(4-6)):257-262.

Jirikowski GF, Ramalho-Ortigao FJ, Caldwell JD. 1991. Transitory coexistence of oxytocin and vasopressin in the hypothalamo neurohypophysial system of parturient rats. *Horm Metab Res*, 23 (10):476-480.

Jirikowski GF, Herbert Z, Petrusz P, Sendemir E, Caldwell JD. 2005. Co-expression of vasopressin and androgen-binding protein in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat*, 29 (4):233-237.

Joseph DR. 1994. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm*, 49:197-280.

Joseph DR. 1997. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids*, 62 (8-9):578-588.

Joseph DR. 1998. The rat androgen-binding protein (ABP/SHBG) gene contains triplet repeats similar to unstable triplets: evidence that the ABP/SHBG and the fragile X-related 2 genes overlap. *Steroids*, 63 (1):2-4.

Joseph DR, Hall SH, French FS. 1985. Identification of complementary DNA clones that encode rat androgen binding protein. *J Androl*, 6 (6):392-395.

Joseph DR, Adamson MC, Kozak CA. 1991a. Genetic mapping of the gene for androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin to mouse chromosome 11. *Cytogenet Cell Genet*, 56 (2):122-124.

Joseph DR, Becchis M, Fenstermacher DA, Petrusz P. 1996. The alternate N-terminal sequence of rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin contains a nuclear targeting signal. *Endocrinology*, 137 (3):1138-1143.

Joseph DR, Sullivan PM, Wang YM, Millhorn DE, Bayliss DM. 1991b. Complex structure and regulation of the ABP/SHBG gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):771-775.

Kalme T, Koistinen H, Loukovaara M, Koistinen R, Leinonen P. 2003. Comparative studies on the regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) and sex

hormone-binding globulin (SHBG) production by insulin and insulin-like growth factors in human hepatoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003 Aug;86(2):197-200.

Kamei Y. HT, Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell Press*, 85(3):403-414.

Krieg M, Bartsch W, Herzer S, Becker H, Voigt KD. 1977. Quantification of androgen binding, androgen tissue levels, and sex hormone-binding globulin in prostate, muscle and plasma of patients with benign prostatic hypertrophy. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 86 (1):200-215.

Krupenko NI, Avvakumov GV, Strel'chyonok OA. 1990. Binding of human sex hormone-binding globulin-androgen complexes to the placental syncytiotrophoblast membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 171 (3):1279-1283.

Krupenko SA, Krupenko NI, Danzo BJ. 1994. Interaction of sex hormone-binding globulin with plasma membranes from the rat epididymis and other tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 51 (1-2):115-124.

Larrea F, Diaz L, Carino C, Larriva-Sahd J, Carrillo L, Orozco H, Ulloa-Aguirre A. 1993. Evidence that human placenta is a site of sex hormone-binding globulin gene expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46 (4):497-505.

Lechan RM, Nestler JL, Jacobson S. 1982. The tuberoinfundibular system of the rat as demonstrated by immunohistochemical localization of retrogradely transported wheat germ agglutinin (WGA) from the median eminence. *Brain Res*, 245 (1):1-15.

Lewis JG, Longley NJ, Elder PA. 1999. Monoclonal antibodies to human sex hormone-binding globulin (SHBG): characterization and use in a simple enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of SHBG in plasma. *Steroids*, 64 (4):259-265.

Misao R, Fujimoto J, Nakanishi Y, Tamaya T. 1997. Expression of sex hormone-binding globulin exon VII splicing variant mRNA in human uterine endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997 Aug;62(5-6):385-390.

Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42 (1):201-206.

Panayotacopoulou MT, Malidelis Y, van Heerikhuize J, Unmehopa U, Swaab D. 2005. Individual differences in the expression of tyrosine hydroxylase mRNA in neurosecretory neurons of the human paraventricular and supraoptic nuclei: positive correlation with vasopressin mRNA. *Neuroendocrinology*, 81 (5):329-338.

Porto CS, Lazari MF, Abreu LC, Bardin CW, Gunsalus GL. 1995. Receptors for androgen-binding proteins: internalization and intracellular signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 53 (1-6):561-565. Reventos J, Sullivan PM, Joseph DR, Gordon JW. 1993. Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 96 (1-2):69-73.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1991. Sex hormone-binding globulin: anatomy and physiology of a new regulatory system. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):813-820.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999a. Androgen and estrogen signaling at the cell membrane via G-proteins and cyclic adenosine monophosphate. *Steroids*, 64 (1-2):100-106.

Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999b. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69 (1-6):481-485.

Russell JA, Leng G, Douglas AJ. 2003. The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Front Neuroendocrinol*, 24 (1):27-61.

Sato O, Bering EA. 1967. Extra-ventricular formation of cerebrospinal fluid. *No To Shinkei*, 19 (9):883-885.

Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol*, 205 (3):260-272.

Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69 (6):1583-1586.

Stumpf WE. 1972. Uptake of oestrogens in the amygdala-preoptic-hypothalamic-hypophyseal-gonadal complex. *J Anat*, 111 (3):476.

Sui JL, Chan KW, Logothetis DE. 1996. Na⁺ activation of the muscarinic K⁺ channel by a G-protein-independent mechanism. *J Gen Physiol*, 108 (5):381-391.

Telleria-Diaz A, Grinevich VV, Jirikowski GF. 2001. Colocalization of vasopressin and oxytocin in hypothalamic magnocellular neurons in water-deprived rats. *Neuropeptides*, 35 (3-4):162-167.

Vigh-Teichmann I, Vigh B, Koritsanszky S. 1970. [Liquor contacting neurons in the paraventricular nucleus]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 103 (4):483-501.

Wang YM, Bayliss DA, Millhorn DE, Petrusz P, Joseph DR. 1990. The androgen-binding protein gene is expressed in male and female rat brain. *Endocrinology*, 127 (6):3124-3130.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Susanne Göthe
Geburtsdatum: 03. 10. 1980
Geburtsort: Gera
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

1987-1991: Grundschule, Ernst-Schneller-POS, Nöbdenitz
1991-1997: staatliches Gymnasium, Schmölln
1997-1998: high school, Attica, NY, USA
1998-2000: staatliches Gymnasium, Schmölln

Universitäre Bildung

seit WS 2000: Studium der Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
August 2002: Ärztliche Vorprüfung
August 2003: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
April 2006: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit Oktober 2003: wissenschaftliche Arbeit am Institut der Anatomie der FSU Jena

- Veröffentlichungen: Co-Autor: 2004: Herbert, Z.; Göthe, S.; Caldwell, J.D.; Bernstein, H.G.; Jirikowski, G.F.; (Sex Hormone Binding Globulin/SHBG is produce in human hypothalamic neurons.), FENS
Co-Autor: 2005: Herbert, Z.; Gothe, S.; Caldwell, J. D.; Bernstein, H. G.; Melle, C.; von Eggeling, F.; Lewis, J.; Jirikowski, G. F. (Identification of Sex Hormone Binding Globulin in the human hypothalamus), Neuroendocrinology
- 2003: Famulatur in Batavia, NY, USA
- 2004: Famulatur in Tamsweg, Österreich
- 2004: Famulatur in Bangalore, Indien
- 2005: Famulatur in Chiclana, Spanien
- seit April 2006: 1. PJ Tertial in Temuco, Chile

Sonstige Aktivitäten

- 1998-2001: Museumsführerin im Burgmuseum und -kirche Posterstein
- seit 2002: Stipendiatin der Melton Foundation
- 2003-2006: Tutor im Institut der Anatomie der FSU Jena

Fremdsprachen

englisch

spanisch

Jena, den 15.05.2006

Susanne Göthe

9 Danksagung

Herzlichen Dank!

Besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G. F. Jirikowski für die Möglichkeit bedanken, diese Promotionsarbeit in seiner Abteilung zu erstellen. Während der Arbeit daran, war er jederzeit für Fragen und Probleme ansprechbar und stets konnte ich mit seiner Hilfe rechnen. Für Belastungssituationen im Studium oder im Privaten hatte er immer Verständnis, vermochte es jedoch auch ausgezeichnet, die Motivation zur Weiterarbeit aufzufrischen.

Ausgesprochen großer Dank gilt auch Frau Dr. Zsófia Herbert für die großartige, unentbehrliche Betreuung der Versuche und die zahlreichen Erklärungen und Hilfestellungen im gesamten Verlauf der Arbeit.

Des weitern möchte ich Frau Kasch danken, die mir oftmals im Labor helfend zur Seite stand und auch die Suche nach Reagenzien erleichterte. Außerdem danke ich Larissa Rausch für fachliche Ratschläge.

Für wiederholte Rettung aus dem Word-Dschungel bin ich S. Pezeshki besonders dankbar. Danken möchte ich auch Prof. Dr. S. Patt, und Dr. M. Brodhun vom pathologischen Institut der FSU, Prof. Dr. Bonelli vom pathologischen Institut Graz und Dr. J. Lewis vom biochemischen Institut in Chistchurch, Neuseeland für die Bereitstellung der Proben und Antikörper. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. von Eggeling für die Hilfe bei der Untersuchung mittels SELDI-TOF MS.

Selbstverständlich bedanke ich mich auch bei allen hier nicht genannten Personen, die zu dieser Arbeit durch Rat und Hilfe beigetragen haben.

Danken möchte ich nicht zuletzt meiner Familie und Freunden, die oft Verständnis aufbringen mussten und die mich fortwährend motivierten und vielfältig unterstützten.

Jena, den 15.05.2006

Susanne Göthe

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Jirikowski, Dr. Zsofia Herbert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine anderer Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 15.05.2006

Susanne Göthe