

**Expression von Sex Hormone-Binding Globulin
und Androgenrezeptoren in Myokardbiopsien von
Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie**

Dissertation

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

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Henning Wolfgang Schock
geboren am 23.09.1976 in Filderstadt

Juli 2004

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. G. F. Jirikowski, Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. H. R. Figulla, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. vet. W. Amselgruber, Hohenheim

Tag der öffentlichen Verteidigung: 7. Juni 2005

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Androgen Binding Protein
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Autofluoreszenz
AK	Antikörper
AR	Androgenrezeptor
ARVCM	Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie
AT	Angiotensin
BrdU	5'Bromo-2-Desoxyuridine
BSA	Bovine Serum Albumine
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
DAB	Di-Amino-Benzidine
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCM	Hypertrophische Kardiomyopathie
IgG	Immunglobulin G
ISFC	International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of the Cardiomyopathies
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LH	Luteinisierendes Hormon
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mRNA	messenger-RNA
NKCM	Nicht klassifizierte Kardiomyopathie
NYHA	New York Heart Association
PAP	Peroxidase-Antiperoxidase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Protein-Kinase A
RCM	Restriktive Kardiomyopathie
RNA	Ribonukleinsäure
SBP	Sex-Steroid Binding Protein
SELDI-TOF	Surface Enhances Laser Desorption/Ionization Time Of Flight
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin, Sexual-Hormon bindendes Globulin
SHBG-R	Sexual Hormon-Binding Globulin - Rezeptor
SRC	Steroid-Rezeptor-Coaktivator
T	Testosteron
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	<i>Anatomische Grundlagen - Kardiomyozyt und Herzmuskulatur</i>	3
2.2	<i>Dilatative Kardiomyopathie (DCM)</i>	5
2.2.1	Definition und Epidemiologie der DCM	5
2.2.2	Ätiologie der DCM	6
2.2.3	Klinik der DCM	7
2.3	<i>Androgene</i>	8
2.3.1	Synthese der Androgene	8
2.3.2	Testosteron - Grundlagen der klassischen intrazellulären Wirkungsmechanismen	10
2.3.3	Der Androgenrezeptor (AR)	11
2.3.4	Androgene - kardiale Auswirkungen und Erkrankungen	13
2.4	<i>Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)</i>	15
2.4.1	Grundlagen des SHBG	15
2.4.2	Zellmembranassoziierte Effekte des SHBG	16
3	Ziele der Arbeit und Fragestellung	18
3.1	<i>Überlegungen zum gegenwärtigen Kenntnisstand</i>	18
3.2	<i>Ziele der Arbeit und Fragestellungen</i>	19
4	Material und Methoden	20
4.1	<i>Biopsien</i>	20
4.1.1	Herkunft der Myokardbiopsien	20
4.1.2	Gewinnung der Myokardbiopsien	20
4.1.3	Virusnachweis	21
4.1.4	Aufbereitung des gewonnenen Biopsiematerials	21
4.1.5	Einbettung der Myokardbiopsien in Epon	21
4.1.6	Anfertigung der Semidünnschnitte am Mikrotom	22
4.1.7	Entharzen der eingebetteten Myokardbiopsien	22
4.2	<i>Immunfärbungen am Semidünnschnitt</i>	22
4.2.1	Verwendete Antikörper	22
4.2.2	Arbeitsschritte der Färbetechnik Peroxidase–Antiperoxidase (PAP) am Semidünnschnitt	23
4.2.3	In-Situ-Hybridisierung (ISH) am Semidünnschnitt	24
4.3	<i>Morphologische Auswertung (Qualitativ)</i>	25
4.4	<i>Bestimmung von Androgenspiegeln aus Serumproben</i>	25
4.4.1	Gewinnung der Serumproben	25
4.4.2	Bestimmung der Testosteronspiegel aus den verfügbaren Serumproben	25

4.5	<i>Ausgewertete Biopsien</i>	26
4.6	<i>Qualitativer Nachweis von SHBG im Herzmuskel</i>	27
4.6.1	Untersuchungsgut	27
4.6.2	Materialaufbereitung	27
4.6.3	SHBG-Isolierung mittels Affinitätschromatographie	28
4.6.4	Massenspektrometrische Untersuchung mittels SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time Of Flight)	29
5	Ergebnisse	30
5.1	<i>Testosteron - Serumkonzentrationen</i>	30
5.2	<i>Qualitativer Nachweis von Sexual-Hormon Binding Globulin in Herzmuskelgewebe</i>	32
5.3	<i>Morphologische Auswertungen</i>	34
5.3.1	Lokalisation von Sex Hormone-Binding Globulin in Kardiomyozyten	35
5.3.2	Lokalisation von Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten	38
5.3.3	Kolokalisation von Sexual-Hormon Binding Globulin und Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten	43
5.3.4	In-Situ-Hybridisierung für SHBG in Kardiomyozyten	46
6	Diskussion	48
6.1	<i>Massenspektrometrische Untersuchung und Immunfärbung von SHBG in Herzmuskelgewebe</i>	48
6.2	<i>Der Nachweis der Expression von SHBG in Kardiomyozyten mittels In-Situ-Hybridisierung</i>	51
6.3	<i>Testosteron und die Lokalisation des Androgenrezeptors in Kardiomyozyten</i>	52
6.4	<i>Kolokalisation von SHBG und Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten</i>	56
6.5	<i>Das Wirkungsgefüge von Androgenen und SHBG – Überlegungen zu physiologischer Bedeutung und Pathomechanismen</i>	57
6.6	<i>Klinischer Ausblick</i>	58
7	Schlussfolgerungen	60
8	Literaturverzeichnis	62
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	68

1 Zusammenfassung

Bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) handelt es sich um eine lebensbedrohliche Erkrankung mit derzeit nur unbefriedigenden Therapieoptionen. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer progredienten Herzinsuffizienz mit Dilatation des linken Ventrikels unklarer Genese. In Untersuchungen zeigte sich eine mögliche Beteiligung von kardiotropen Viren an der Krankheitsentstehung, aber auch eine genetische Disposition.

Bei männlichen Patienten mit DCM wurden erniedrigte Testosteronspiegel im Blutserum beobachtet, was einen Ausgangspunkt für therapeutische Konzepte darstellen könnte. Verschiedene Studien weisen auf anabole Effekte von Testosteron und anderen Steroidhormonen am Myokard hin.

Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) ist ein im Blutplasma vorkommendes Bindungsglobulin für Steroidhormone wie Testosteron und Östrogene. In der vergangenen Zeit wurden SHBG neue zellmembranassoziierte Funktionen in der Hormonwirkung zugeordnet. Am Menschen und an der Ratte wurde SHBG in zahlreichen Zielgeweben der Steroidhormone nachgewiesen.

Die Expression von Androgenrezeptoren (AR) in Herzmuskelzellen ist dokumentiert, Beschreibungen zu SHBG in humanen Kardiomyozyten fehlen bislang.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob SHBG in humanen Kardiomyozyten exprimiert wird, und inwiefern sich Zusammenhänge zwischen SHBG-Expression, Androgenrezeptor-Verteilung und Testosteronspiegel im Blut erkennen lassen. Eine weitere Fragestellung war, ob es bei Patienten mit DCM Auffälligkeiten in der Androgenrezeptor-Expression gibt.

SHBG wurde aus menschlichem Myokard mittels Affinitätschromatographie isoliert und massenspektrometrisch dargestellt. Durch In-Situ-Hybridisierung gelang es, die Präsenz von SHBG-kodierender mRNA in Herzmuskelzellen zu zeigen. Die Lokalisation von SHBG und Androgenrezeptor wurde an 20 linksventrikulären Myokardbiopsien von männlichen Patienten mit DCM immunhistochemisch untersucht. Zusätzlich wurden aus Serumproben Testosteronwerte bestimmt und Zusammenhänge zu morphologischen Befunden gesucht.

In dieser Arbeit konnte SHBG erstmals auf zellulärem Niveau in humanen Kardiomyozyten immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Expression von SHBG in Kardiomyozyten wurde durch In-Situ-Hybridisierung belegt.

Im Zytoplasma der Kardiomyozyten zeigten sich SHBG und Androgenrezeptor kolokalisiert. Eine veränderte Nachweisbarkeit von Androgenrezeptor und SHBG in Biopsien mit erniedrigtem Testosteronspiegel im Blutserum ließ sich nicht feststellen. Bei zwei Biopsien mit zugehörigem erhöhtem Serumtestosteronwert zeigte sich eine verminderte Androgenrezeptor-Expression.

Die Ergebnisse der Untersuchung lassen darauf schließen, dass SHBG in humanen Kardiomyozyten exprimiert wird und mit Androgenrezeptoren kolokalisiert vorliegt. Die Expression von SHBG in dem hochdifferenzierten und extrem belasteten Funktionsgewebe Myokard deutet darauf hin, dass die funktionelle Bedeutung des Bindungsproteins SHBG hier über die eines reinen Transportproteins hinausgeht.

Ein morphologisches Korrelat zu erniedrigten Testosteronspiegeln war in Kardiomyozyten nicht zu beobachten.

Möglicherweise kommt es bei hohen Testosteronwerten in Kardiomyozyten zu einer herabgesetzten Androgenrezeptor-Expression.

Medikamentöse Therapieversuche der Wachstumsförderung am Myokard rücken zunehmend in das Interesse der Wissenschaft. Steroidhormone wie Testosteron und Cortison spielen in der Regelung des Zellstoffwechsels, auch am Myokard, eine zentrale Rolle. Eine Aussage zur Testosteronsubstitution bei kardialen Erkrankungen lässt sich aus den Untersuchungsergebnissen aber nicht ableiten.

2 Einleitung

2.1 Anatomische Grundlagen - Kardiomyozyt und Herzmuskulatur

Kardiomyozyten haben einen Durchmesser von etwa 15-25 μm und eine Länge von etwa 50-120 μm . Die Herzmuskelzellen verzweigen sich und anastomosieren in spitzem Winkel miteinander, wodurch das typische mikroskopische Bild entsteht. Im Bereich der Glanzstreifen (*Disci intercalares*) beträgt der Interzellularrspalt durchschnittlich 15-20 nm. An diesen Stellen befinden sich in der Zellmembran auch die Nexus, welche als Zonen mit erhöhter Durchlässigkeit für Ionen (*Gap junctions*) der elektrischen Erregungsausbreitung von Zelle zu Zelle dienen. Durch die elektrische und metabolische Kopplung entsteht das funktionelle Syncytium. Die runden oder linsenförmigen Zellkerne, 1-2 je Zelle, liegen zentral und sind von Endoplasma umgeben. Sie haben einen Durchmesser von 6-12 μm . Zwischen den Herzmuskelzellen liegt auffällig viel interstitielles Bindegewebe mit einer großen Anzahl von Blut- und auch Lymphkapillaren (Wartenberg 1997). Beim Herz eines Erwachsenen besteht der linke Ventrikel aus etwa 5,8-6 Milliarden Myozyten (Sabbah 2001).

Abbildung 1 zeigt eine Myokardbiopsie in Methylen-Blau-Färbung und soll hier näher erläutert werden: Durch die dünne Schnittführung von nur 1 μm Schichtdicke entsteht das zweidimensionale Bild. Mittig im Bild sieht man einen quer geschnittenen Kardiomyozyten. Die Zellgrenzen des Myozyten sind nur schwach grau erkennbar und hier durch eine schwarz gepunktete Linie markiert (G). Zentral in der Zelle erkennt man einen blass-violett gefärbten Zellkern mit Nucleolus (N). Sichtbar sind auch kleinere, türkisblau gefärbte Zellorganellen wie beispielsweise Lysosomen (O).

Zwischen den Myozyten finden sich einige Fibrozyten mit etwas dunkler blauviolett gefärbten Kernen (F).

Rechts unten im Bild erkennt man eine angeschnittene Blutkapillare mit türkisblau gefärbten Erythrozyten von zirka 8 μm Durchmesser und einer Endothelzelle mit Kern (K). Rechts oben und mittig oben im Bild stellen sich zwei einzelne Erythrozyten dar (E).

Oben im Bild sieht man einen Teilabschnitt eines schräg längs angeschnittenen Kardiomyozyten. Deutlich zu erkennen ist die typische Streifung der Myofibrillenstruktur (M). Der Messbalken rechts unten im Bild überspannt eine Strecke von 20 μm .

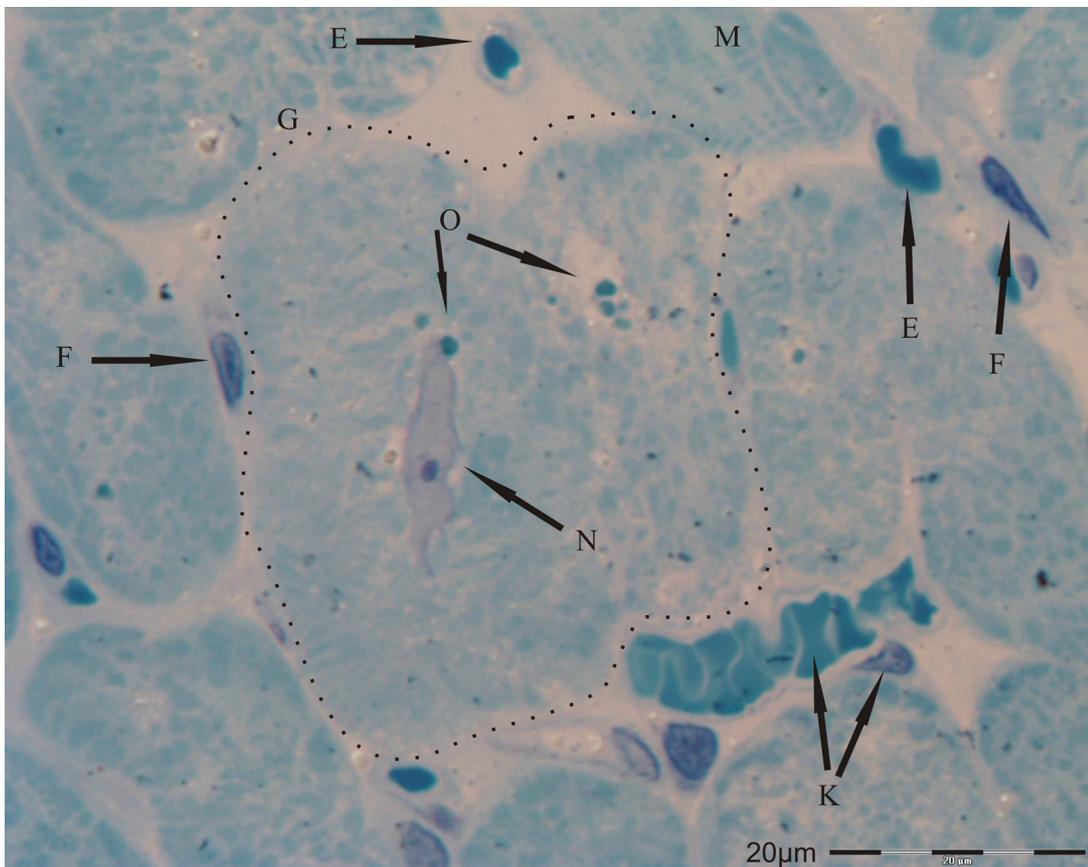


Abb. 1: Semidünnschnitt durch eine Myokardbiopsie in Methylen-Blau-Färbung (1000x). Die sichtbaren Strukturen werden im Text eingehend erläutert. Zellgrenzen des querschnittenen Kardiomyozyten gepunktet markiert (G). Angeschnittener Zellkern (N) und weitere Zellorganellen (O). Ebenfalls angeschnittene Blutkapillare mit Erythrozyten (K,E). Zwischen den Myozyten einige Fibrozyten (F). Im benachbarten schräg längs geschnittenen Myozyten deutliche sichtbare Myofibrillenstruktur (M).

2.2 Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

2.2.1 Definition und Epidemiologie der DCM

Der Begriff der Kardiomyopathie wurde erstmals in den 1950er Jahren zur Definition nichtkoronarer Herzerkrankungen unklarer Ätiologie gebraucht. In der Zwischenzeit hat sich die Bedeutung des Begriffes gewandelt. 1995 modifizierte die „WHO/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of the Cardiomyopathies“ (Richardson et al. 1996, Sigusch et al. 1998) die Einteilung der Kardiomyopathien und definierte sie nun als „Erkrankungen des Myokards assoziiert mit kardialer Dysfunktion“. Die Kardiomyopathien werden dabei in die folgenden fünf Formen unterteilt, von denen jede durch unterschiedliche Erkrankungen verursacht sein kann:

- die dilatative Kardiomyopathie (DCM)
- die hypertrophische Kardiomyopathie (HCM)
- die restriktive Kardiomyopathie (RCM)
- die arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (ARVCM)
- nicht klassifizierte Kardiomyopathien (NKCM)

Die WHO unterscheidet von den primären Kardiomyopathien die spezifischen Kardiomyopathien, bei denen Herzmuskelerkrankungen im Zusammenhang mit spezifischen kardialen und systemischen Erkrankungen zugrunde liegen, wie ischämische, valvuläre, toxische, entzündliche, hypertensive und metabolische Kardiomyopathien. Mitunter verwischen die Grenzen zwischen primärer und spezifischer Kardiomyopathie (Olbrich 2001).

Die DCM stellt die häufigste Form der Kardiomyopathie dar. Bei ihr kommt es zur Dilatation und nachlassenden Kontraktilität des linken oder beider Ventrikel. Die Inzidenz liegt in den westlichen Industrieländern zwischen 5 und 8 Fällen pro 100.000 Einwohner, die alterskorrigierte Prävalenz wird in den USA mit 36 Fällen auf 100.000 angegeben. Die Erstdiagnose wird häufig im mittleren bis fortgeschrittenen Lebensalter gestellt, es sind aber auch zahlreiche junge Menschen betroffen. Männer sind mit einem Verhältnis 3:1 gegenüber Frauen wesentlich gefährdeter. Die klinischen Symptome der Herzinsuffizienz treten erst nach seit Monaten bis Jahren bestehender linksventrikulärer Dilatation auf. Die Prognose ist ungünstig. Die durchschnittliche 5-Jahresmortalität symptomatischer Patienten liegt bei etwa 20 % (Olbrich 2001).

2.2.2 Ätiologie der DCM

Untersuchungen zur Ursache der DCM zeigen unter Einschluss von Rechts- und Linksherzkatheterisierung, Koronarangiographie und Endomyokardbiopsie als Enddiagnose in etwa der Hälfte der Fälle von zunächst unerklärlicher DCM eine idiopathische, also primäre DCM. Die andere Hälfte der Enddiagnosen verteilt sich auf ein breites Spektrum primär und sekundär kardialer Erkrankungen und ist laut WHO den spezifischen Kardiomyopathien zuzurechnen.

Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen kann bei 20 bis 30 % der Patienten mit idiopathischer DCM eine familiäre DCM nachgewiesen werden. In der Mehrzahl der Fälle ist der Vererbungsmodus autosomal dominant. Da die betroffenen Gene Proteine des Zytoskeletts (Dystrophin, Taffazin, Aktin, Desmin, Laminin A/C und d-Sarkoglykan) verschlüsseln, wurde die familiäre DCM auch schon als Zytoskelettopathie bezeichnet. Bis jetzt wurden 16 Krankheitsgene identifiziert (Schönberger et al. 2004).

Aber auch eine familiäre Disposition für eine autoimmunvermittelte DCM erscheint möglich. So wurden im Serum von einigen Patienten mit DCM und deren Angehörigen mit asymptomatischer Ventrikelvergrößerung erhöhte Interleukin-2-Spiegel nachgewiesen (Maisch 1998, Olbrich 2001).

Bei einem geringen Anteil der Patienten mit DCM zeigt sich in der Biopsie das Bild einer Myokarditis (ca. 7 %). Bei etwa 20-25 % der Patienten mit DCM lassen sich in der Myokardbiopsie virale Nukleinsäuren nachweisen (Sigusch et al. 1998). Eine besondere Bedeutung ist dabei den Gruppen der Entero- und Adenoviren sowie dem Parvovirus B19 beizumessen (Noutsias et al. 2002). Eine neuere Veröffentlichung von Lotze et al. dazu zeigt eine noch häufigere Nachweisbarkeit viraler Nukleinsäuren in Myokardbiopsien bei Patienten mit DCM. Dabei waren nur bei 14 von 52 Patienten (27 %) keine viralen Nukleinsäuren nachweisbar (Lotze et al. 2004).

2.2.3 Klinik der DCM

Die Leitsymptome orientieren sich am Stadium der Herzinsuffizienz (Einteilung nach NYHA-Klassifikation). Infolge der erhöhten Wandspannung und relativer koronarer Minderperfusion kommt es zu Dyspnoe und pektanginösen Beschwerden. Mit zunehmender Ventrikeldilatation und sinkender Ejektionsfraktion kommt es vermehrt zu Rhythmusstörungen und damit zur steigenden Gefahr des plötzlichen Herztodes (Maisch 1998, Sigusch et al. 1998). Mit Ausnahme der spezifischen Kardiomyopathien bleibt die Therapie im Wesentlichen symptombezogen: Körperliche Schonung, ACE-Hemmer (bei Kontraindikationen AT-II-Antagonisten), Digitalis bei tachykardem Vorhofflimmern, Diuretika, Betablocker. Maßnahmen zur Thromboembolieprophylaxe sind zu erwägen. Im Präterminal- und Terminalstadium kann eine Herztransplantation notwendig werden (Noutsias et al. 2002).

Das hämodynamische Bild der DCM entspricht einem systolischen Pumpfehler mit Kardiomegalie und eingeschränkter Ejektionsfraktion. Störungen der diastolischen Funktion treten regelhaft mit hinzu. Als hauptsächliche strukturelle Korrelate der diastolischen Funktionsstörung sind die interstitielle Fibrose und strukturelle Alterationen der extrazellulären Matrix anzusehen, in deren Folge es zu Störungen der Relaxation kommt (Richardson et al. 1996).

2.3 Androgene

2.3.1 Synthese der Androgene

Das wichtigste Androgen des Mannes ist das Testosteron, das zu über 95 % in den ca. 500 Mio. Leydig-Zellen der Hoden gebildet wird. Die restlichen 5 % des Testosterons werden in der Nebennierenrinde gebildet. Täglich werden etwa 5-7 mg produziert. Entscheidender Regulator dabei ist das Luteinisierende Hormon (LH). LH bindet an seinen spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und aktiviert die Adenylatcyclase. Der dadurch gesteigerte intrazelluläre cAMP-Gehalt führt über die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen zu einer Erhöhung der steroidsynthetisierenden Enzyme. Für die Aktivität des Rezeptors ist es wichtig, dass nur ein Teil der Rezeptoren mit LH besetzt ist, da ein Überangebot von LH oder hCG zu einer Herabregulation der Rezeptoren führt. Die Sensitivität des Rezeptors unterliegt einer zirkadianen Rhythmik, sodass die höchsten Testosteronspiegel morgens zwischen 6:00 und 8:00 Uhr erreicht werden und dann während des Tages um ca. 25 % abfallen (Kamischke und Nieschlag 1997).

Ausgangspunkt der Androgenbiosynthese ist Cholesterol. In den Mitochondrien wird durch Spaltung der Seitenkette des Cholesterols mittels Cytochrom P450_{scc20,22}-Desmolase biologisch inaktives Pregnenolon gebildet. Diese essentiell vom LH abhängige Bildung von Pregnenolon stellt den limitierenden Faktor für die Androgenbildung dar. Vom Pregnenolon führen 2 Wege zur Bildung von Testosteron: Der überwiegende Teil des Pregnenolon wird über den Delta-5-Syntheseweg über 17-alpha-Hydroxypregnenolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) in Testosteron umgesetzt. Der andere, beim Mann wesentlich seltenere Delta-4-Weg führt über Progesteron zu Testosteron (Kamischke und Nieschlag 1997, Eckardstein und Nieschlag 2000). Die Abbildung 2 veranschaulicht die Testosteronsynthese.

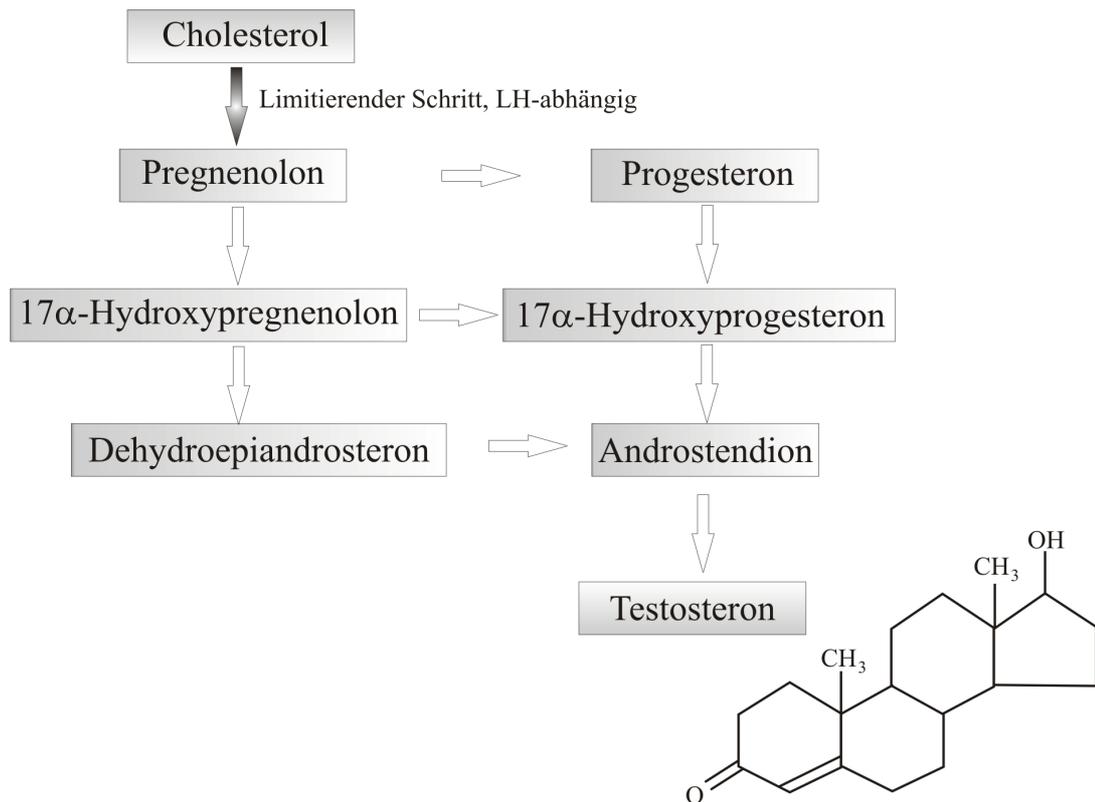


Abb. 2: Synthesewege des Testosterons. (Abbildung angelehnt an Eckardstein und Nieschlag 2000)

Aus Testosteron entsteht durch Aromatase Östradiol und durch 5-alpha-Reduktase Dihydrotestosteron (DHT). Diese Differenzierung des Testosterons findet zum Teil erst in den Zielzellen statt.

Durch kontinuierliche Diffusion, analog dem Konzentrationsgefälle, verlassen die entstandenen Steroidhormone die Leydig-Zellen über das Interstitium in das Blutplasma der venösen Gefäße. Testosteron liegt im Serum zu circa 98 % in proteingebundener Form vor. Dabei bindet der Großteil des Testosterons (66 %) mit hoher Affinität an Sexual-Hormon Binding Globulin (SHBG), ein Teil mit geringerer Affinität an Albumin (circa 30 %). Geringe Mengen (circa 2 %) sind auch mit niedriger Affinität an Corticosteroid-bindendes Globulin (CBG) gebunden (Dunn et al. 1981). Für das Gesamttestosteron gilt beim erwachsenen Mann bis ins hohe Alter der Referenzbereich 9,0-35,0 nmol/l in der ersten Tageshälfte (Fisher und Nelson 2001). Mit zunehmendem Alter kommt es zu einer leichten Abnahme der Testosteronwerte (Feldman et al. 2002). Die 2 % des Testosterons, die in ungebundener Form vorliegen, entsprechen etwa 200-500 pmol/l.

Das freie, nicht spezifisch gebundene Testosteron erlaubt eine bessere Beurteilung der klinischen Situation des Patienten als eine Betrachtung des Gesamttestosterons (Vermeulen et al. 1999). Diese von der klassischen Funktion und Bedeutung des SHBG als Bindungsglobulin im Blutplasma ausgehenden Überlegungen beziehen sich jedoch auf die globale Situation des Patienten und die Entscheidungsfindung zur therapeutischen Hormonsubstitution. Die Situation einzelner Zellen kann hiervon stark abweichen, zumal in den Zielgeweben mitunter stark vom Blutplasmaspiegel abweichende SHBG-Konzentrationen herrschen können (Gao et al. 2003).

Während des dritten Lebensjahrzehnts beginnt der Blutplasmaspiegel des Testosterons abzunehmen. Adipositas, insbesondere Stammfettsucht, führt zu einer Abnahme des Gesamttestosteronspiegels (Gapstur et al. 2002).

2.3.2 Testosteron - Grundlagen der klassischen intrazellulären Wirkungsmechanismen

Nur das freie, nicht proteingebundene Testosteron kann durch die Zellmembran diffundieren und je nach Enzymausstattung der Zielzelle im Zytoplasma weiter verstoffwechselt werden. Durch Aromatase wird im Zytoplasma beispielsweise Östradiol, oder mittels 5- α -Reduktase Dihydrotestosteron (DHT) gebildet. Die Zielzelle des Testosterons kann also selbst beeinflussen, durch welche Hormone der AR aktiviert wird. Da die Konsequenzen der Rezeptoraktivierung, wie oben beschrieben, ganz entscheidend von dem aktivierenden Steroidhormon abhängen, kann die Zelle also über ihr Enzymprofil die Folgen der Testosteronwirkung ihren gewebsspezifischen Anforderungen und Funktionen entsprechend selbst gestalten (Zhou et al. 1994). Siehe dazu auch Abbildung 4.

In der Muskulatur mit einer niedrigen 5- α -Reduktaseaktivität ist Testosteron selbst das wichtigste Androgen. Testosteron führt in der glatten und in der quergestreiften Muskulatur zu einer Hypertrophie der Myofibrillen. Dies mündet in einer Zunahme der Muskelmasse und der Kontraktionskraft. Ein Testosteronmangel führt zu einer Atrophie der Muskulatur. Als Folge der Testosteronwirkung kommt es des weiteren in der quergestreiften Muskulatur zu einer gesteigerten mRNA-Synthese, Glucoseumsatz und Glykogensynthese. Auch am Herzmuskel hat Testosteron einen anabolen Effekt mit erhöhter mRNA-Synthese (Kamischke und Nieschlag 1997, Marsh et al. 1998).

2.3.3 Der Androgenrezeptor (AR)

Grundlagen des Androgenrezeptors (AR)

Marsh konnte zeigen, dass AR in Kardiomyozyten von Kindern und Erwachsenen beiderlei Geschlechts exprimiert werden (Marsh et al. 1998).

Der Androgenrezeptor ist ein auf dem X-Chromosom kodiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa, bestehend aus 919 Aminosäuren. Der AR entfaltet seine genomischen Wirkungen intranukleär. Nach Bindung an einen Liganden aktiviert der AR die Transkription. Die Anwesenheit des AR entscheidet darüber, ob eine Zelle auf diesem Weg auf Steroidhormone reagieren kann (Zhou et al. 1994).

Als typisches Mitglied der Familie der Steroidrezeptoren fungiert der AR als ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor. Er besteht im wesentlichen aus 3 Regionen: Einer Steroidhormon-Bindungs-Domäne, einer aus 2 „Zink-Fingern“ bestehenden DNA-Bindungs-Domäne und einer amino-terminalen Transaktivierungs-Domäne (Abb. 3). Die Transaktivierungs-Domäne ist wichtiger Angriffspunkt für weitere Faktoren, die die Wirkung des Hormonrezeptors modifizieren können (Löffler 1998).



Abb. 3: Schematischer Aufbau des AR als typisches Mitglied der Familie der Steroidhormonrezeptoren. Die Größenverhältnisse der Domänen sind hier nicht maßstabsgerecht wiedergegeben (Abbildung angelehnt an Löffler 1998).

Durch die Anlagerung des Steroidhormons erfolgt die Aktivierung des Rezeptors. Daraufhin lagert sich der AR an seine spezifischen Hormonerkennungsstellen der DNA an. Diese liegen kurz vor der Promotorregion der Transkriptions-DNA. Die Transkription führt zur Bildung spezifischer mRNA und anschließend gesteigerter Proteinbiosynthese. Die Hormonerkennungsstellen der DNA können von verschiedenen Hormonrezeptoren besetzt werden. Die daraufhin entstehenden Proteine sind damit sowohl davon abhängig, welche Anteile der Erkennungsstellen besetzt sind, als auch davon, ob eventuell mehrere, unterschiedlich gebundene Steroidhormone synergistisch oder antagonistisch wirken. Aufgrund dieses Mechanismus können beispielsweise Testosteron und DHT an demselben Rezeptor neben ihrer unterschiedlichen Potenz auch die Produktion vollkommen unterschiedlicher Proteine zur Folge haben.

Über diese klassischen genomischen Mechanismen hinausgehend werden jetzt weitere, innerhalb von Minuten wirksam werdende Effekte des AR beschrieben (Cato et al. 2002).

Nach Aktivierung des AR durch einen Liganden im Zytoplasma kann dieser über eine Tyrosin-Kinase (c-Src) und Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) weitere zytoplasmatische Effekte auslösen und intranukleär Steroid-Rezeptor-Coaktivatoren (SRC) induzieren. Über einen nicht sicher bekannten Mechanismus kann Testosteron auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen und so MAPK und SRC aktivieren, um nichtgenomische und genomische Wirkungen auszulösen (Heinlein und Chang 2002).

Der in Abbildung 4 ebenfalls eingezeichnete membranständige SHBG-Rezeptor (SHBG-R) wird im Kapitel 2.4.2 „Zellmembranassoziierte Effekte des SHBG“ besprochen (Rosner et al. 1999).

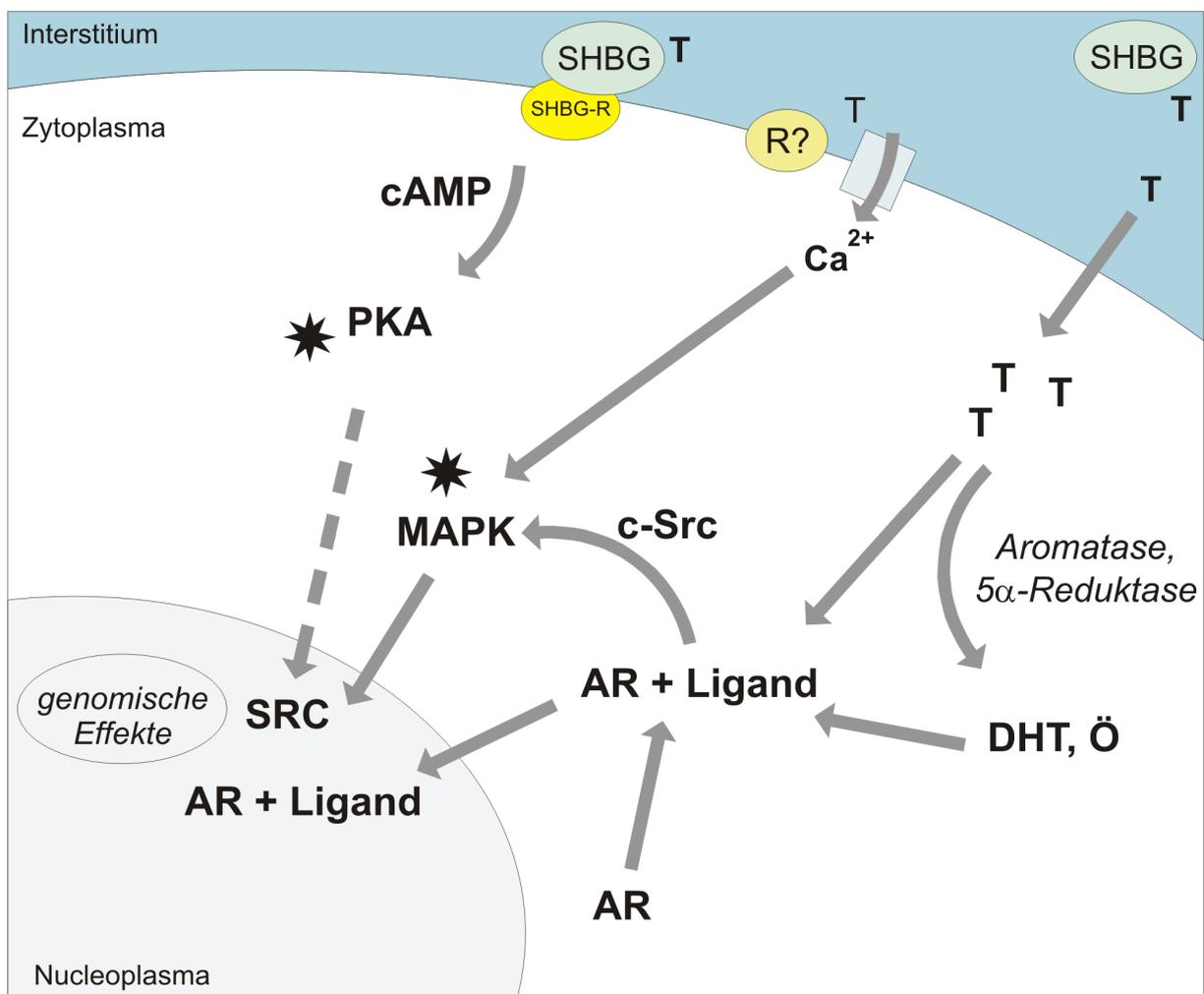


Abb. 4: Wirkungswege der intrazellulären Testosteronwirkung. Freies Testosteron (T) diffundiert in die Zelle. Dort kann es entweder direkt oder nach enzymatischer Umwandlung zu Dihydrotestosteron (DHT) oder Östradiol (Ö) als Ligand an den Androgenrezeptor (AR) koppeln. Der AR-Liganden-Komplex wandert in den Zellkern, kann jedoch auch über eine Tyrosin-Kinase (c-Src) und Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) weitere zytoplasmatische Effekte auslösen (*) und Steroid-Rezeptor-Coaktivatoren (SRC) induzieren. Über einen nicht sicher bekannten Mechanismus (R?) kann T auch die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen und so MAPK und SRC aktivieren. Über einen in Kapitel 2.4.2 näher beschriebenen putativen SHBG-Rezeptor kann T auch über die Protein-Kinase A (PKA) zytoplasmatische Effekte auslösen (*) und auf noch nicht gesichertem Wege auf genomische Effekte Einfluss nehmen. (Abbildung angelehnt an Heinlein und Chang 2002)

Ligandenabhängigkeit des Androgenrezeptors

Zhou zeigte an isolierten Affennierenzellen eine Rezeptorhalbwertszeit von $t_{1/2} = 1$ Stunde bei Abwesenheit von Androgenen. Hier kommt es zum raschen proteolytischen Abbau des AR (Zhou et al. 1994). Die Zugabe von Androgenen stabilisierte den AR auf $t_{1/2} = 6$ Stunden. Nach Androgenentzug verschwand die Anfärbbarkeit des Rezeptors im Zellkern. Für morphologische Betrachtungen wichtig sind die Erkenntnisse darüber, wie der AR intrazellulär in Abhängigkeit vom Androgenangebot lokalisiert ist. In Abwesenheit von Androgenen war der Rezeptor überwiegend zytoplasmatisch anzufärben. Immunfluoreszenzuntersuchungen zeigten ligandenfreien AR in zytoplasmatischen Granula um den Zellkern, möglicherweise in Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums oder Lysosomen. Die Anwesenheit von Androgenen wiederum verursachte eine Verschiebung der Anfärbbarkeit des AR vom perinukleären Bereich in den Zellkern innerhalb von 15-30 Minuten (Zhou et al. 1994).

2.3.4 Androgene - kardiale Auswirkungen und Erkrankungen

Wie für viele Organe sind auch für das Herz geschlechtsabhängige Unterschiede in Anatomie, Physiologie und Pathologie beschrieben. Marsh beschrieb, dass das männliche Herz, auch nach Korrektur bezüglich des Körpergewichts, im Vergleich zum weiblichen hypertrophiert ist. Frauen sind eher als Männer prädisponiert für QT-Verlängerungen im EKG und neigen häufiger zur Entwicklung einer Torsades-de-Pointes-Tachykardie (Marsh et al. 1998).

Guerra untersuchte Herzen, die aufgrund von Kardiomyopathien explantiert wurden, und erkannte, dass bei Männern gegenüber Frauen um den Faktor 2-3 erhöhte Apoptose- und Nekrosraten der Myozyten vorlagen (Guerra et al. 1999). Die höhere Zellsterblichkeit ging bei Männern mit einem rapideren Krankheitsverlauf und einem früher eintretenden Herzversagen einher.

Marsh wies an isolierten Kardiomyozyten die hypertrophe Wirkung der Androgene über AR durch Modulation der Transkription, Translation und Enzymfunktion nach (Marsh et al. 1998).

Bei Sportlern, die anabole Steroide anwenden (Doping), wurden makroskopische Veränderungen wie eine Zunahme der Muskelmasse des linken Ventrikels und der Septumdicke beobachtet. Dabei fielen auch mikroskopische Veränderungen, wie eine Dysmorphie der Myofibrillen, Umbau der Myozyten mit fokaler Fibrose und Wandverdickung der intramuralen Arterien, auf (Kennedy und Lawrence 1993). Die beim Doping verwendeten Steroiddosen liegen zum Teil um den Faktor 100-1000 über den in der

Substitutionstherapie üblichen Dosen (Sullivan et al. 1998). Die regelmäßige Presseberichterstattung über obscure Todesfälle unter Leistungssportlern lässt an Zusammenhänge zwischen hohen Steroiddosen und kardialen Erkrankungen denken. Dies wird auch von Fallbeschreibungen gestützt (Ferrera et al. 1997). Genau Zahlen zu kardiovaskulären Nebenwirkungen und Todesfällen durch anabole Steroide sind nicht bekannt, da verlässliche Angaben zu Dosierungen und Zwischenfällen durch Patienten und beteiligte Ärzte fehlen.

Verschiedene Arbeiten zeigen die einer Gratwanderung gleichende Schlüsselposition der Steroidhormone zwischen anabolen und zytotoxischen Effekten. So konnte eine androgeninduzierte Apoptoseresistenz von Prostatakrebszellen beobachtet und Androgenen eine Wirkung als „Überlebenssignal“ zugeschrieben werden (Berchem et al. 1995, Coffey et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen konnten toxische Wirkungen des Testosterons an humanen Tubuluszellen der Niere (Verzola et al. 2004) und Kardiomyozyten der Ratte zeigen (Zaugg et al. 2001).

Bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe eine Erniedrigung der Androgenspiegel beobachtet (Kontoleon et al. 2003). Eine Arbeitsgruppe um P. J. Pugh führte bei 20 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Mittelwerte: 61,5 Jahre, Ejektionsfraktion 34,8 %) eine prospektive Doppelblindstudie durch. Dabei erfolgte über 3 Monate 14-tägig eine intramuskuläre Injektion von 100 mg Testosteron bzw. Placebo-Präparat. Nach dem Behandlungszeitraum zeigte sich bei der Verum-Gruppe eine Steigerung der Gehstrecke, eine Verbesserung der Herzinsuffizienz-Symptome nach NYHA und eine Linderung der teilweise vorhandenen psychisch-depressiven Verstimmung. Keine Veränderung zeigte sich bei Ejektionsfraktion, computertomographisch bestimmter Muskelmasse und Skelettmuskelkraft der Hand (Pugh et al. 2004).

Die Autoren sehen hier einen möglichen zusätzlichen therapeutischen Ansatz, der sich in der körperlichen Leistungsfähigkeit und Wohlbefinden des Patienten widerspiegelt. Morphologisch oder in einer kardiospezifischen Funktionsgröße ließ sich der Therapieeffekt jedoch nicht wiederfinden.

2.4 Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG)

2.4.1 Grundlagen des SHBG

Sowohl in der internationalen, als auch in der deutschen Literatur ist die englischsprachige Bezeichnung „Sex Hormone-Binding Globulin“ (SHBG) weit verbreitet. In der deutschsprachigen Literatur findet sich vereinzelt die deutsche Bezeichnung „Sexual-Hormon bindendes Globulin“. Für Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) wird synonym die Bezeichnung Sex-Steroid-Binding Protein (SBP) verwendet. Erstmals wurde SHBG vor fast 40 Jahren als Bindungsglobulin für Östrogene (Rosenbaum et al. 1966) und Testosteron (Kato und Horton 1968) beschrieben. SHBG wurde zunächst nur als hepatisch sezerniertes Plasmaprotein gesehen. Ihm wurde als Hauptaufgabe die Bindung von Steroidhormonen, speziell von Geschlechtshormonen zugeschrieben. Das menschliche SHBG bindet alle 17- β -hydroxylierten Steroide. Die relative Bindungsaffinität des humanen SHBG beträgt für DHT 100, für Testosteron 45 und für Östradiol 22. Die Bindung und Dissoziation der Steroidhormone und des SHBG erfolgt spontan in Abhängigkeit von den Bindungskonstanten (Kamischke und Nieschlag 1997). SHBG reguliert über das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Testosteron, DHT und Östrogen deren Verfügbarkeit für hormonsensible Gewebe. Da SHBG im Vergleich zu Albumin eine wesentlich höhere Affinität und geringere Kapazität zur Steroidbindung hat, ist es eine sehr viel empfindlichere Regelgröße (Kahn et al. 2002).

Fördernd auf die hepatogene SHBG-Produktion wirken Östrogene, Hyperthyreose, Leberzirrhose, Tamoxifen, Antiepileptika und zunehmendes Alter ab dem dritten Lebensjahrzehnt. Eine supprimierende Wirkung wird beschrieben für Androgene, Hyperprolaktinämie, Glukocorticoide und Adipositas (Kamischke und Nieschlag 1997, Gapstur et al. 2002, Feldman et al. 2002).

Da nur freies Testosteron in die Zelle diffundieren kann, kontrolliert die Bindung an SHBG die Aufnahme des Testosteron in die Zellen. Die hohe Proteinbindung schützt auch das Testosteron vor zu schneller Metabolisierung durch die Leber.

Neben der vorwiegend von der Leber ins Blutplasma sezernierten Form wird auch eine unterschiedlich glykosylierte Isoform beschrieben, das Androgen-Binding-Protein (ABP), das von den Sertoli-Zellen der Hoden produziert wird (Grishkovskaya et al. 2000). Die

unterschiedliche Glykosylierung des ansonsten zum SHBG identischen ABP scheint ohne entscheidenden Einfluss auf die Steroidbindungsfähigkeit zu sein (Bocchinfuso et al. 1992).

Die Arbeitsgruppe um Becchis wies SHBG in zahlreichen Gewebearten und Organen von 17 Tage alten männlichen Rattenföten nach (Becchis et al. 1996). Dabei fand sich die stärkste Anfärbbarkeit in Geweben mesodermalen Ursprungs: Bindegewebe, gestreifte Muskulatur und Myokard, Knorpel, hämatopoetisches System und Leber. Eine Arbeitsgruppe um Kahn erbrachte einen immunhistochemischen Nachweis von SHBG und den mRNA-Nachweis mittels ISH in menschlicher Prostata und Brustdrüse (Kahn et al. 2002). In menschlichen Kardiomyozyten wurde SHBG bis jetzt noch nicht beschrieben.

SHBG zeigt keine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen steroidbindenden Proteinen, auch nicht zum intrazellulären Androgen- oder Östrogen-Rezeptor (Bardin et al. 1988).

Das SHBG-kodierende Gen liegt in der Region p12-p13 auf Chromosom 17 (Hammond und Bocchinfuso 1996).

In physiologischer Umgebung liegt SHBG als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 92,5-100 kDa vor. Die Varianz des Molekulargewichts hängt von der Glykosylierung ab (Fortunati 1999, Kahn et al. 2002). Die beiden Monomere bestehen jeweils aus 373 Aminosäuren und verfügen über eine beschriebene Dimerisationsdomäne im Bereich der Aminosäuren 138-148 (Bocchinfuso und Hammond 1994).

2.4.2 Zellmembranassoziierte Effekte des SHBG

Über die Funktion als Bindungsprotein im Blutplasma hinausgehend werden jetzt weitere Aufgaben des SHBG postuliert. SHBG wirkt auch über direkte, second-messenger-vermittelte Effekte: Es bindet möglicherweise an spezifische Rezeptoren an der Zellmembran. Nach anschließender Bindung eines Steroids an diesen SHBG-Rezeptor-Komplex wird ein Anstieg des intrazellulären cAMP mit nachfolgender Aktivierung der PKA ausgelöst. Die Aktivierung der PKA kann weitere nichtgenomische zytoplasmatische Effekte auslösen und über noch nicht sicher beschriebene Wege auf die Transkription Einfluss nehmen (Fortunati 1999, Heinlein und Chang 2002). Dieser Signalweg wird in Abbildung 4 veranschaulicht.

Die Bindung von SHBG an seinen Rezeptor wird durch die Bindung von hochaffinen Steroiden (z. B. DHT-SHBG-Komplex) gehemmt. Niedrig affine Steroide können leicht vom SHBG abdiffundieren (z. B. Östradiol-SHBG-Komplex) und erleichtern so die Bindung des SHBG an seinen Rezeptor (Fortunati 1999). Die genauen Bedeutungen dieses Mechanismus

sind noch nicht ausreichend geklärt. Jedoch scheint es dadurch auch Steroiden mit sehr niedrigen Konzentrationen (z. B. Östradiol) oder sehr hoher Affinität zu SHBG (z. B. DHT) möglich zu sein, über den putativen SHBG-Rezeptor indirekt intrazelluläre Wirkungen zu verursachen (Rosner et al. 1999). Die nachfolgende Abbildung 5 veranschaulicht diese Mechanismen.

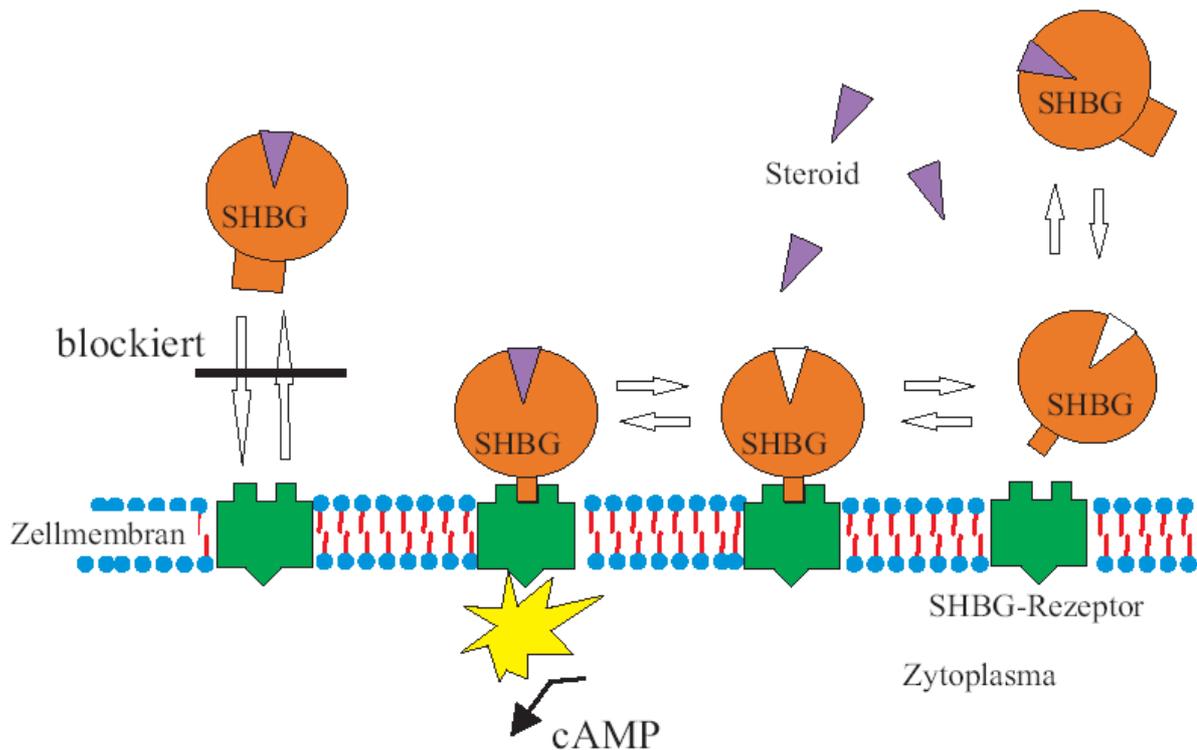


Abb. 5: Wirkung des SHBG-Steroid-Komplexes am zellmembranassoziierten Rezeptor
(Abbildung angelehnt an Rosner et al. 1999)

Die genauen Einzelheiten und Bedeutungen dieser Signalwege sind erst ansatzweise bekannt. Erste Erkenntnisse lassen jedoch vermuten, dass sich hier eine mögliche Erklärung für bedeutsame, bisher kaum bekannte Mechanismen findet: Über den SHBG-Rezeptor (SHBG-R) wurden verschiedene Einflüsse auf die sexuelle Erregbarkeit von beobachtet (Caldwell et al. 2000, Caldwell et al. 2002). Eine Beeinflussung des Zellwachstums ist ebenfalls belegt: An Zelllinien des humanen Mamma-Karzinoms beobachtete man wachstumshemmende Wirkungen des SHBG-R (Fortunati 1999, Kahn et al. 2002). Nakhla und Rosner beschrieben wachstumssteigernde Wirkungen des SHBG-R in Verbindung mit Östradiol und DHT auf Zelllinien des menschlichen Prostata-Karzinoms (Nakhla und Rosner 1996).

3 Ziele der Arbeit und Fragestellung

3.1 Überlegungen zum gegenwärtigen Kenntnisstand

Die Beschreibung des SHBG als lediglich von der Leber ins Blut sezerniertes Bindungsglobulin für Steroidhormone hat sich als unvollständig herausgestellt.

SHBG konnte unter anderem in fötalem Myokard der Ratte (Becchis et al. 1996) sowie in menschlicher Prostata und Mamma gezeigt werden (Hryb et al. 2002). Mittels ISH konnte die intrinsische Herkunft des SHBG in diesen Geweben belegt werden.

Muskulatur ist ein bedeutendes Zielgewebe für Steroidhormone, wie oben besprochen beispielsweise für die anabolen Eigenschaften der Androgene.

Für uns liegt die Überlegung nahe, dass Herzmuskulatur als Zielgewebe für Steroidhormone auch ein Wirkungsort für SHBG und die oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen SHBG und Androgenen sein könnte.

Am menschlichen Herzen wurde SHBG bis heute allerdings noch nicht beschrieben.

Androgene sind mit ihren anabolen Eigenschaften auch zum Muskelaufbau in therapeutischer und missbräuchlicher Verwendung. Die Arbeitsgruppe um Pugh et al. 2004 hat an einer kleinen Patientengruppe einen subjektiven und objektiven Benefit einer Testosteronsubstitution für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erreicht. Der therapeutische Effekt ließ sich dabei nicht an einer kardiospezifischen Messgröße oder an der Skelettmuskulatur nachvollziehen.

Es stellt sich die Frage, ob ein Androgenmangel bei Herzinsuffizienz, hier in Verbindung mit einer DCM, möglicherweise ein morphologisches Korrelat, beispielsweise in der Expression von Androgenrezeptoren zeigt.

3.2 Ziele der Arbeit und Fragestellungen

- Lässt sich SHBG auch in menschlichen Herzmuskelzellen nachweisen?
- Wenn SHBG im menschlichen Herzen nachweisbar ist, wurde es auch dort exprimiert, oder ist es lediglich aus dem Serum aufgenommen?
- Lassen sich Zusammenhänge zwischen der Anwesenheit bzw. der Lokalisation von klassischem AR und SHBG in Kardiomyozyten von Patienten mit DCM erkennen?
- Lässt sich ein Zusammenhang zwischen Nachweisbarkeit des AR in Kardiomyozyten und Testosteronspiegel erkennen, speziell bei erniedrigtem Testosteronspiegel?

4 Material und Methoden

4.1 Biopsien

4.1.1 Herkunft der Myokardbiopsien

In der Klinik für Innere Medizin I der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurden im Zeitraum von Juni 1998 bis Oktober 1999 64 Patienten mit unklarer linksventrikulärer Dysfunktion unter Leitung von Oberarzt PD Dr. Lotze aufgenommen.

Entsprechend der WHO/ISFC-Definition (1995) wurde bei fehlender kardialer Ursache (hypertone, koronare Kardiopathie, hämodynamisch relevantes Vitium) bei systolischer Dysfunktion, Kardiomegalie und linksventrikulärer Ejektionsfraktion < 55 % in Ruhe die klinische Diagnose „idiopathische dilatative Kardiomyopathie (DCM)“ gestellt.

Zur histologischen Sicherung der Diagnose und zum Ausschluss von sekundären Krankheitsursachen erfolgte im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung eine linksventrikuläre Myokardbiopsie. Die histopathologische Beurteilung zur Diagnosesicherung geschah durch die Pathologischen Institute in Darmstadt und Hamburg. Entnommenes Gewebe wurde nach der Dallas-Klassifikation eingeteilt und bewertet und die Diagnose der dilatativen Kardiomyopathie verifiziert (Busch 2001).

4.1.2 Gewinnung der Myokardbiopsien

Im Rahmen der durchgeführten Herzkatheteruntersuchung über die Arteria femoralis wurde mittels einem Cordis long sheath biptome (5.4F, 7F) eine Biopsieentnahme aus dem linken Ventrikel durchgeführt.

Neben der oben erwähnten pathologischen Beurteilung zu Diagnosesicherung erfolgten immunhistologische und morphologische Untersuchungen zur weiteren Spezifizierung und zur Apoptoseforschung durch die Klinik für Innere Medizin I und das Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bei einem Teil der Patienten zeigte sich in einer Übersichtsfärbung, dass die Biopsie nicht ausreichend verwertbare Myozyten enthielt.

Letztlich standen nach Ausschluss sekundärer Krankheitsursachen 20 auswertbare Biopsien von männlichen Patienten für diese Arbeit zu Verfügung. Die Fälle sind im Kapitel 4.5 „Ausgewertete Biopsien“ in Tabelle 1 aufgeführt.

4.1.3 Virusnachweis

Die Virusbefunde wurden uns durch die Klinik für Innere Medizin I der FSU Jena zur Verfügung gestellt. Mittels PCR erfolgte die Untersuchung der Myokardbiopsien auf virale Nukleinsäuren. Dies geschah in Zusammenarbeit mit dem Institut für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Leitung von Prof. Dr. A. Stelzner. Die Virusbefunde gingen bereits in frühere Untersuchungen und Veröffentlichungen ein (Busch 2001, Lotze et al. 2001, Lotze et al. 2004).

4.1.4 Aufbereitung des gewonnenen Biopsiematerials

Unmittelbar nach Biopsieentnahme wurde das Material in 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend im Institut für Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität wie unten angegeben weiter verarbeitet und in Epon eingebettet.

4.1.5 Einbettung der Myokardbiopsien in Epon

Basislösungen:

Isotone PBS (1 Liter, 67 mM Phosphat ~ 300 osm.)

9,32 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

1,80 g KH_2PO_4

5,0 g NaCl

starker PBS-Puffer (5 Liter)

46,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

9,0 g KH_2PO_4

45 g NaCl

Epongemisch

13,0 g Epon 812

4,9 g DDSA Härter

8,9 g MNA Härter

0,8 g DMP 30 Beschleuniger

(Firma Ferak, Berlin)

Prozedere:

- Anlieferung der Biopsien in 4 % Paraformaldehyd in isotoner PBS
- Waschen in PBS über 24 Stunden bei 7 °C
- 4 Stunden in 50 % Ethanol
- 20 Stunden in 70 % Ethanol
- 1 Stunde in 90 % Ethanol
- 2 Stunden in absolutem Ethanol
- 2 Stunde in Propylenoxid
- 1 Stunde in Epongemisch : Propylenoxid = 1:4
- 1 Stunde in Epongemisch : Propylenoxid = 1:2
- 20 Stunden in Epongemisch : Propylenoxid = 1:1 bei 7 °C
- Eingießen in Epongemisch, Aushärten bei 65 °C über 6 Tage

4.1.6 Anfertigung der Semidünnschnitte am Mikrotom

Von den Biopsien wurden auf einem Mikrotom (Reichert Ultracut E) Semidünnschnitte mit einer Schichtdicke von 1 µm angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgetrocknet und anschließend weiter verarbeitet.

4.1.7 Entharzen der eingebetteten Myokardbiopsien

Die Semidünnschnitte wurden mit methanolischer NaOH über 3 Minuten entharzt und anschließend über Methanol-Benzol-Lösung in Aceton übergeführt. Nach 2 x 3 Minuten Spülen in Aceton wurden die Schnitte 2 x 10 Minuten in PBS gespült und anschließend den Schritten der Färbeprozedur zugeführt.

4.2 Immunfärbungen am Semidünnschnitt

4.2.1 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-Androgenrezeptor

Anti-Androgenrezeptor PG-21 des Herstellers Upstate Biotechnology, NY, USA

(rabbit immunoaffinity purified polyclonal IgG), Lot. #21071

Immunogenität: Korrespondierend zu den Peptiden 1-21 des humanen Androgenrezeptors (MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRG)

Spezies-Kreuzreaktivität: Mensch, Maus, Ratte, Huhn, Frosch, Rind, Schwein, Fisch, nichtmenschliche Primaten, Hyänen, Hamster, Frettchen, Wühlmaus

Anwendung zur Immunhistochemie 1:100 in PBS verdünnt.

Anti-SHBG

Polyklonaler Antikörper 882. Dieser wurde uns freundlicherweise von P. Petrusz (Department of Cell Biology and Anatomy, University of North California, USA) zur Verfügung gestellt. Der Antikörper wurde aus Kaninchen gewonnen und erkennt die Peptide TIDLTKISKPSSSFERT (Position 61-78).

Genaue Spezifizierung des Antikörpers durch Becchis (Becchis et al. 1996).

Anwendung zur Immunhistochemie 1:400 in PBS verdünnt.

Anti-BrDU

Antikörper aus Maus, monoklonales IgG, Firma Progen, Heidelberg

Sekundäre Antikörper

Anti-Rabbit

Antikörper aus Ziege, monoklonales IgG, R-2004, Sigma St. Louis, USA

Tertiäre Antikörper

Peroxidase-Antiperoxidase (PAP), Immunkomplex aus Meerrettich-Peroxidase und Anti-Peroxidase IgG (monoklonal) aus Kaninchen, P-2026, Sigma St. Louis, USA

Verwendetes Farbstoffsubstrat: Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine-Sets (DAB-Peroxidase-Substrate), D-4168, Sigma St. Louis, USA

4.2.2 Arbeitsschritte der Färbetechnik Peroxidase–Antiperoxidase (PAP) am Semidünnschnitt

- Nach Entharzen des Semidünnschnittes wie oben beschrieben Inkubation Präparats mit dem Primärantikörper (IgG aus Kaninchen) in entsprechender Verdünnung über 18 Stunden bei 7 °C
- 10 Minuten Spülen in PBS bei 18 °C
- Inkubation über 30 Minuten bei 18 °C mit Anti-Kaninchen-IgG 1:100 in PBS
- 10 Minuten Spülen in PBS bei 18 °C
- Inkubation über 30 Minuten bei 18 °C mit Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (aus Kaninchen) 1:100 in PBS
- 10 Minuten Spülen mit PBS bei 18 °C

- Vorlage des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) für 15 Minuten bei 18 °C
- Spülen in Aqua dest.
- Entwässern in aufsteigender alkoholischer Reihe 50 %, 70 %, 90 % , absoluter Ethanol für je 2 Minuten
- Eindeckeln in Entellan

Bei jeder Färbeprozedur wurden Negativkontrollen mitgeführt. Dazu wurde anstatt mit Primärantikörper mit 3 % Kaninchen-Normalserum in PBS inkubiert und die Proben in gleicher Serie identisch mit den Antikörperfärbungen weiterbehandelt.

4.2.3 In-Situ-Hybridisierung (ISH) am Semidünnschnitt

Bei der In-Situ-Hybridisierung (ISH) werden mittels einer Gen-Sonde (DNA) mRNA-Sequenzen, die für die Codierung eines bestimmten Proteins spezifisch sind, markiert.

Am Semidünnschnitt, nach Einbettung Präparates in Epon, finden sich durch die gute Fixierung der mRNA hervorragende Voraussetzungen für die In-Situ-Hybridisierung von mRNA mittels BrdU-markierter Sonden (Jirikowski et al. 1989, Jirikowski et al. 1990).

Synthetische Oligonukleotidproben (komplementär zu SHBG kodierender mRNA) wurden durch 3'-Kopplung mit 5'-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) markiert. Die Herstellung der DNA-Sonde erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Leitung: Prof. Dr. Stelzner).

Die Sequenz der Antisense-Probe ist 5'-TGTAGAATCAAATCCCGGGA-3' (Joseph et al. 1991). Die BrdU-Markierung der Sonde konnte nach Hybridisierung wie unten beschrieben über Antikörper gefärbt werden.

Die zur mRNA nicht komplementäre Senseprobe wurde in identischer Behandlung wie die Antisense-Probe als Negativkontrolle zur Hybridisierung mitgeführt. Dadurch konnte eine unspezifische Bindungsreaktion der DNA ausgeschlossen werden.

Arbeitsschritte der In-Situ-Hybridisierung am Semidünnschnitt:

- Das Präparat wurde direkt nach dem Entharzen unter RNAase-freien Arbeitsbedingungen mit der BrDU-markierten Sonde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert
- Spülen mit PBS 2 x 15 Minuten
- Inkubieren mit Anti-BrDU-AK (aus Maus) 1:400 in PBS über 12 Stunden bei 4 °C
- Spülen mit PBS 2 x 15 Minuten
- Inkubieren mit Anti-Maus-AK (aus Ziege) 1:100 in PBS über 90 Minuten bei 18 °C
- Spülen mit PBS 2 x 15 Minuten

- Inkubieren mit PAP-Komplex (aus Maus) 1:100 in PBS über 90 Minuten bei 18 °C
- Spülen mit Aqua dest. 2 x 15 Minuten
- Vorlage des Chromogens DAB über 15 Minuten bei 18 °C
- Waschen mit Aqua dest. über 15 Minuten
- Entwässern in aufsteigender alkoholischer Reihe und Eindeckeln mit Entellan

4.3 Morphologische Auswertung (Qualitativ)

Die Auswertung erfolgte an einem Olympus-Mikroskop BX 50 mit 200- und 400- bzw. 1000-facher Vergrößerung. Zur besseren Erkennung der Zell- und Zellkerngrenzen wurde die Möglichkeit des Interferenzphasenkontrast genutzt. Zusätzlich konnten die im Semidünnschnitt nur schwach oder gar nicht gefärbten Grenzen der Zellkompartimente durch Nutzung der Autofluoreszenz einzelner Gewebebereiche im UV-Licht (Wellenlänge 440 nm) verifiziert werden.

Die Auswertung unmittelbar aufeinanderfolgender Schnitte erlaubte den Vergleich einzelner Zellbereiche identischer Kardiomyozyten unter Anfärbung verschiedener Proteine.

Zur weiteren Auswertung und Dokumentation wurden Aufnahmen mit der zur Verfügung stehenden Olympus DP10 Digitalkamera angefertigt. Die Bilder wurden mittels eines herkömmlichen PC und der Software „Olympus PD soft“ bearbeitet und gespeichert.

4.4 Bestimmung von Androgenspiegeln aus Serumproben

4.4.1 Gewinnung der Serumproben

Am Tag der Myokardbiopsieentnahme wurde bei den Patienten durch die Mitarbeiter der Klinik für Innere Medizin I standardisiert zwischen 8:00 Uhr und 10:00 Uhr Blut entnommen. Nach Zentrifugation ließ das Serum abpipettieren und bei –80 °C zur späteren Untersuchung einfrieren.

4.4.2 Bestimmung der Testosteronspiegel aus den verfügbaren Serumproben

Die Bestimmung der Testosteronserumspiegel erfolgte durch Mitarbeiter der Firma Jenapharm im Labor von Dr. Pacev.

Für unsere Fragestellung war es notwendig, einen Anhaltspunkt für den Androgenstatus der Patienten zu gewinnen. Das Patientengut war hinsichtlich Alter, psychischer Stressbelastung und möglicherweise vorhandenen unbekanntem Zusatzerkrankungen relativ inhomogen. Eine

Bestimmung des freien, ungebundenen Testosterons hätte im Vergleich zur kostengünstigeren Bestimmung des Gesamttestosterons aus der Sicht unserer Fragestellung keinen weiteren Aufschluss gegeben. Deshalb wurde ein zur Verfügung stehender ELISA zur Bestimmung des Gesamttestosterons genutzt.

4.5 Ausgewertete Biopsien

Insgesamt wurden 20 Biopsien von männlichen Patienten in diese Arbeit aufgenommen. Zu 5 dieser 20 ausgewählten Biopsien stand keine Serumprobe zur Testosteronbestimmung zur Verfügung. Diese Biopsien wurden jedoch von der Arbeit nicht gänzlich ausgeschlossen, sondern zur morphologischen Auswertung mitgeführt. Die Daten der Biopsien sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt. Die in die Arbeit aufgenommenen Biopsien wurden laufend durchnummeriert. Die interne Biopsienummer des Institut für Anatomie II der FSU wurde in dieser Tabelle zur Nachvollziehbarkeit angegeben.

Tab. 1: Übersicht über die Daten der in die Untersuchung aufgenommenen Biopsien. Zu den mit * markierten Fällen waren keine Serumproben verfügbar, zum Fall 17 waren keine Virus-PCR-Befunde verfügbar.

Biopsie- nummer	Interne Biopsie- nummer im Institut f. Anatomie II der FSU	Alter des Patienten in Jahren	Virusnachweis in Myokardbiopsien 1=positiv, 0=negativ			Ejektionsfraktion (echokardio- graphisch) in %
			Entero- virus	Parvo- virus	Adeno- virus	
1	49	50	0	1	0	32
2	52	37	0	1	0	26
3	90	23	0	0	0	47
4	96	49	0	1	0	27
5	99	41	1	0	0	31
6	100	62	0	1	0	28
7	102	52	0	0	0	35
8	103	48	0	1	0	21
9	114	54	1	1	0	20
10	115	61	1	0	0	31
11	122	48	0	0	0	21
12	135	54	0	1	0	32
13	142	56	1	0	0	23
14	149	18	0	0	0	25
15	150	40	1	0	0	31
16*	59	57	1	0	0	21
17*	72	73	x	x	x	27
18*	75	64	1	0	0	20
19*	93	68	0	1	0	26
20*	117	40	0	0	0	31
Mittelwert		49,75				27,75
Minimal- und Maximalwert		18 - 73				20 - 47

4.6 Qualitativer Nachweis von SHBG im Herzmuskel

4.6.1 Untersuchungsgut

Das untersuchte Myokard stammt aus der Obduktion eines 59-jährigen Mannes. Dieser wurde im März 2003 26 Stunden post mortem im Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Leitung Prof. Dr. D. Katenkamp) obduziert. Dabei wurde eine Myokardprobe von etwa 5 g aus der Wand des linken Ventrikels entnommen. Nach Todeseintritt wurde der Leichnam bis zur Obduktion bei 7-10 °C aufbewahrt. Todesursache: Septisches Multiorganversagen bei bakterieller Pneumonie und Peritonitis. Eine kardiale Erkrankung wurde nicht festgestellt. Vor Klinikseintritt nahm der Patient keine Dauermedikation ein.

4.6.2 Materialaufbereitung

Lysis-Puffer: 0,1 M NaHPO₄
 5 mM EDTA
 2 mM MgCl
 pH 7,5 eingestellt

Das Myokardstück (5 g) wurde zunächst in Lysis-Puffer mehrfach gründlich gewaschen, um restliches Blutplasma zu entfernen. Anschließend konnte es manuell und mit elektrischem Homogenisator (Ultrafox) zerkleinert und in Lysis-Puffer mit Ultraschalltechnik homogenisiert werden.

Das Homogenat wurde bei 4 °C über 15 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei 4 °C über 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde jeweils verworfen. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren. Nach dem Auftauen wurde erneut bei 4 °C über 15 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert.

4.6.3 SHBG-Isolierung mittels Affinitätschromatographie

Glycin-Puffer: 0,1 M Glycin-Lösung (7,5 g / l)
pH mit 1 M HCl auf 4,2 eingestellt

Säulenmaterial: Protein A auf Sapharose CL-HB, P-3391, Sigma St. Louis, USA
1 ml Sapharose bindet 20 mg IgG-Antikörper.

Inkubation des Säulenmaterials mit dem SHBG-Antikörper 882 über 24 Stunden.

Anschließend erfolgte die Isolierung des Proteins:

- Waschen mit PBS (pH 7,4), bis frei von ungebundenem Antikörper
- Inkubation mit der aus der Myokardprobe gewonnenen Proteinlösung über 90 Minuten
- Waschen mit PBS (pH 7,4) bis frei von ungebundenen Proteinen
- Auswaschen des Eluats mit Glycin-Puffer (pH 4,2)
- Waschen der Säule mit PBS für nächsten Durchgang

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte eine Kontrolle der austretenden Waschlösung auf enthaltene Proteine mit Commassie-Blau-Lösung (Firma Biorad) auf Dot-Blot-Platten.

Das gewonnene Eluat wurde zur Eliminierung der Puffersalze im Dialyseschlauch (Durchlässigkeit für Molekulargewichte < 14 kDa, Medicell Int. Ltd., London, GB) über 24 Stunden dialysiert. Als äußeres Dialysemedium diente Aqua dest.

Das Dialysat wurde in der Vakuumzentrifuge über 8 Stunden getrocknet. Bis zur weiteren Untersuchung im SELDI-TOF wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

Zur Kontrolle wurde der gesamte Durchgang mit Puffer ohne Proteinlösung aus dem Herzen durchgeführt. Die so erhaltene Kontrolllösung wurde ebenfalls im Massenspektrometer gemessen, um eine potentielle Verunreinigung des gewonnenen Eluats durch aus dem Säulenmaterial gelöste Proteine auszuschließen.

4.6.4 Massenspektrometrische Untersuchung mittels SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time Of Flight)

Die gewonnenen Proben wurden in einem SELDI-TOF Massenspektrometer (ProteinChip-Reader PBS-II, Chipergen Biosystems) untersucht. Das Gerät stand uns dankenswerterweise über Herrn Dr. v. Eggeling vom Institut für Humangenetik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Leitung: Prof. Dr. U. Claussen) zur Verfügung.

Die getrockneten Proteinproben wurden in 5 µl Bindungs-Puffer (0,1 M Tris-Puffer mit 0,02 % Triton-X-100, pH 8,5) gelöst. Die Messung erfolgte auf einem Strong-Anion-Exchanger-Chip (SAX2, Chipergen Biosystems). Die Oberfläche war durch Waschen in Bindungs-Puffer vorzubereiten. Anschließend wurden die Proben auf den Chip aufgetragen und in einer feuchten Kammer 90 Minuten inkubiert. Nach Waschen in Bindungs-Puffer wurde der Chip luftgetrocknet. 5 mg Sinapinsäure (SA, Amersham Biosciences) wurde mit 125 µl 0,1 % Trifluoressigsäure und 125 µl Acetonitril (CH₃CN) gemischt. Von dieser Lösung waren 2 x 0,5 µl aufzutragen. Der so vorbereitete Chip ließ sich im ProteinChip Reader (PBS-II, Chipergen Biosystems) auswerten. Die Intensität des Stickstoff-Lasers betrug 200 µJ, die Wellenlänge 337 nm. Zur Datenanalyse diente die Chipergen ProteinChip Software 2.01. Das Arbeitsprotokoll zur Messung ist bereits entsprechend etabliert und beschrieben (von Eggeling et al. 2000, Herbert et al. 2003).

Eine Probe des SHBG-Antikörpers 882 wurde zur Kontrolle ebenfalls gemessen und ergab lediglich ein Signal bei einem Molekulargewicht von 66 kDa. Zur weiteren Kontrolle wurde auch die Kontrolllösung aus der Chromatographiesäule gemessen, was keine weiteren Proteinfractionen zeigte.

5 Ergebnisse

5.1 Testosteron - Serumkonzentrationen

Die nachfolgende Tabelle 2 gibt die Ergebnisse der Gesamttestosteronbestimmung im Serum der biopsierten Patienten wieder. Die Blutentnahmen erfolgten am Tag der Biopsie zwischen 8 und 10 Uhr. Bei einem Teil der Patienten waren keine Serumproben verfügbar.

Tab. 2: Ermittlung der Gesamttestosteronwerte in Zusammenhang mit den übrigen zur Verfügung stehenden Biopsiedaten. Zu den mit „x“ markierten Fällen waren keine Serumproben verfügbar.

Biopsie- nummer	Alter des Patienten in Jahren	Gesamttestosteron in nmol/l	Virusnachweis in Myokardbiopsien 1=positiv, 0=negativ			Ejektionsfraktion (echokardio- graphisch) in %
			Entero- virus	Parvo- virus	Adeno- virus	
1	50	15,88	0	1	0	32
2	37	15,43	0	1	0	26
3	23	19,07	0	0	0	47
4	49	21,60	0	1	0	27
5	41	2,50	1	0	0	31
6	62	19,48	0	1	0	28
7	52	7,25	0	0	0	35
8	48	10,64	0	1	0	21
9	54	17,96	1	1	0	20
10	61	35,54	1	0	0	31
11	48	42,23	0	0	0	21
12	54	1,39	0	1	0	32
13	56	15,71	1	0	0	23
14	18	16,47	0	0	0	25
15	40	15,08	1	0	0	31
Mittelwert	46,20	17,08				
Minimal- und Maximalwert	18 - 62	1,39 – 42,23				
16	57	x	1	0	0	21
17	73	x	x	x	x	27
18	64	x	1	0	0	20
19	68	x	0	1	0	26
20	40	x	0	0	0	31

Zusammenhänge zwischen dem Testosteronwert und anderen Patientendaten wie Alter, Virusnachweis oder Ejektionsfraktion lassen sich nicht erkennen.

Der Referenzbereich für Gesamttestosteron bei erwachsenen Männern liegt zwischen 9,0-35,0 nmol/l (Fisher und Nelson 2001). Die nachfolgende Abbildung 6 veranschaulicht die Verteilung der Gesamttestosteronwerte.

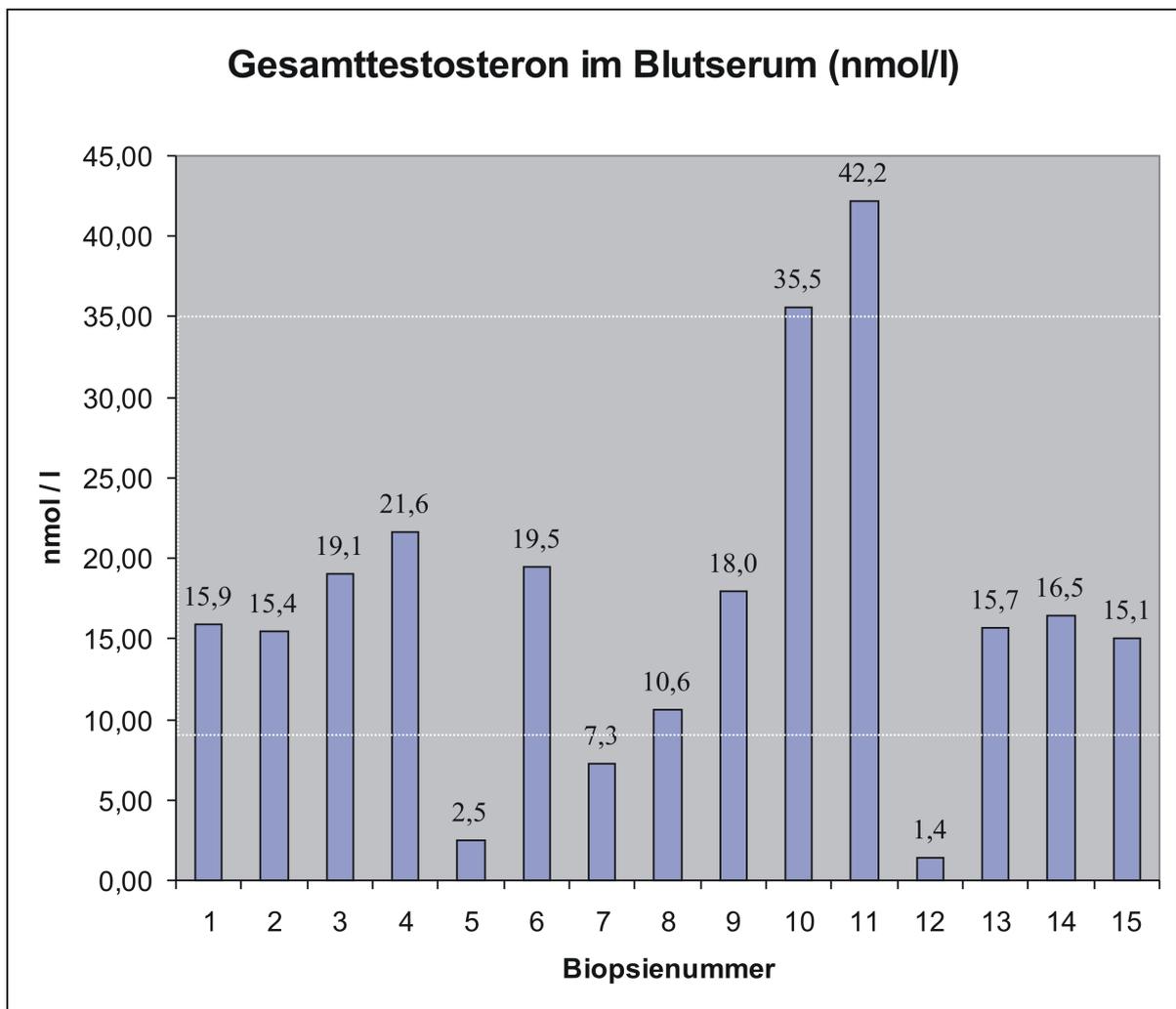


Abb. 6: Verteilung der Gesamttestosteronwerte. Der obere und untere Referenzwert sind als schwache weiße Linie markiert.

Auffallend sind die zwei nach oben abweichenden Proben (Biopsien 10 und 11, Alter der Patienten 61 und 48 Jahre). Außerdem fallen die drei stark nach unten abweichenden Proben 5, 7 und 12 auf, das Alter der Patienten betrug 41, 52 und 54 Jahre.

5.2 Qualitativer Nachweis von Sexual-Hormon Binding Globulin in Herzmuskelgewebe

Die nachfolgende Abbildung 7 zeigt die massenspektroskopische Untersuchung des mittels Affinitätschromatographie unter Verwendung des SHBG-Antikörpers 882 aus menschlichem Myokard isolierten Proteins. Die überlagerte grüne Linie zeigt eine durch die Mitarbeiterin unserer Abteilung, Frau Dr. Z. Herbert, freundlicherweise zur Verfügung gestellte Messung mit SHBG aus dem Hypothalamus der Ratte. An der Ratte ist SHBG in zahlreichen Geweben nachgewiesen und funktionell untersucht. Deshalb stellt SHBG aus der Ratte hier einen guten Anhaltspunkt zur Beurteilung des menschlichen SHBG dar.

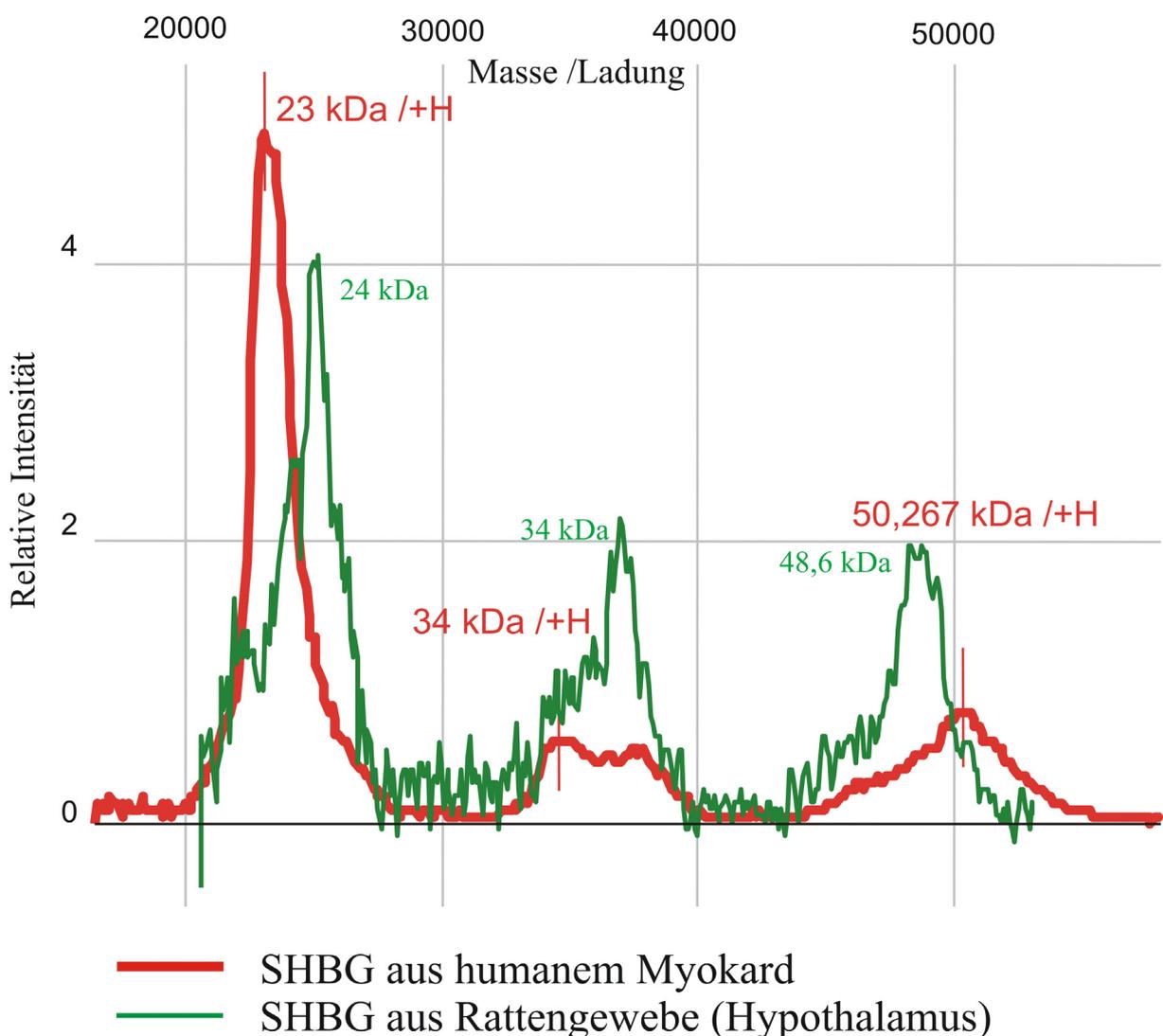


Abb. 7: Massenspektrometrische Untersuchung des mittels des SHBG-Antikörpers aus menschlichem Myokard isolierten Proteins. Die dickere rote Linie zeigt das Protein aus menschlichem Myokard. Die dünnere grüne Linie zeigt eine Vergleichsmessung von aus Hypothalamus der Ratte isoliertem Protein. Alle Proteinfractionen waren jeweils einfach positiv geladen.

SHBG liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer mit einem Molekulargewicht von 92,5-100 kDa vor. Nach Denaturierung tritt es hier als Monomer auf.

Deutlich zu erkennen ist die Proteinfraction mit einfacher H^+ -Ladung und einem mittleren Molekulargewicht von 50,267 kDa, die den Eigenschaften des SHBG entspricht.

Es zeigen sich zwei weitere Proteinfractionen mit 23 und 34 kDa Molekulargewicht. Dies lässt sich auch bei der Vergleichsmessung des aus dem Rattengewebe isolierten SHBG beobachten.

Eine zur Kontrolle durchgeführte Messung mit einer reinen Antikörperprobe erbrachte eine einzelne Proteinfraction bei 66 kDa. Eine Verunreinigung durch aus der Chromatographiesäule ausgetretenes Säulenmaterial konnte durch Messung einer Kontrolllösung ebenfalls ausgeschlossen werden.

5.3 Morphologische Auswertungen

Im Semidünnschnitt mit 1 µm Schichtdicke ergibt sich nicht, wie bei einem sonst in der Histologie gebräuchlichen Paraffinschnitt, ein plastisches Bild. Die dünne Schnittführung aus dem in Epon eingebetteten Gewebe lässt auf einen fast zweidimensionalen Gewebeschnitt blicken. Dies gestattet es, mehrere parallele Folgeschnitte durch identische Zellkompartimente zu führen und so die selben Zellabschnitte unter verschiedenen Aspekten zu betrachten.

Die folgenden Abbildungen und deren Erläuterungen setzen die in der Einleitung beschriebenen anatomischen und histologischen Grundlagen voraus. Die Beschriftungen der Abbildungen konzentrieren sich im wesentlichen auf die Kardiomyozyten. Auf andere Zellen wie Fibrozyten, Blutkapillare oder interstitielles Gewebe wird, der Übersichtlichkeit halber, nur vereinzelt eingegangen.

Die durch den Antikörper nicht gefärbten Zellgrenzen der Kardiomyozyten sind am Semidünnschnitt im einfachen lichtmikroskopischen Bild zum Teil nur schwer erkennbar. Unter Ausnutzung der phasenkontrastmikroskopischen Bildgebung und der Autofluoreszenz des Gewebes im ultravioletten Licht (440 nm Wellenlänge) konnten die Zellgrenzen und Zellkerne am Mikroskop jedoch sicher identifiziert werden. Auf den hier abgebildeten Aufnahmen sind die Zellgrenzen zum besseren Verständnis gegebenenfalls grau gepunktet markiert.

Zu allen Färbeprozeduren wurden Negativkontrollen wie im Abschnitt 4.2.2 „Arbeitsschritte der Färbetechnik Peroxidase–Antiperoxidase (PAP) am Semidünnschnitt“ beschrieben angefertigt. Die Negativkontrollen zeigten keine Färbungen. Auf Abbildungen hierzu wurde verzichtet.

5.3.1 Lokalisation von Sex Hormone-Binding Globulin in Kardiomyozyten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Lokalisation des SHBG in Kardiomyozyten morphologisch zu beschreiben. Dazu wurden Semidünnschnitte aus Myokardbiopsien mit dem SHBG-Antikörper 882 gefärbt.

Innerhalb der Biopsien fällt eine große Varianz der Anfärbbarkeit der Myozyten auf.

Ein Teil der Kardiomyozyten, je nach Biopsie zirka 25-50 %, zeigen eine zytoplasmatische SHBG-Färbung (Abb. 8 a). SHBG lässt sich zytoplasmatisch insbesondere im perinukleären Bereich sehr gut anfärben (Abb. 8 b und c).

Die im Interferenzphasenkontrast gut darstellbaren Myofibrillen im peripheren Zytoplasma zeigen sich gelegentlich gefärbt (Abb. 8 b, Abb. 9 a).

Zusammenhänge zwischen der Anfärbung des SHBG in den Myokardbiopsien und patientenspezifischen Parametern wie Alter, im Myokard nachgewiesenen viralen Nukleinsäuren oder erniedrigtem Serumandrogenspiegel, lassen sich nicht erkennen.

Der periphere Bereich des Zytoplasmas zeigt sich meist hell und nicht gefärbt, wie in Abbildung 8 c zu erkennen ist. Die Zellmembranen der Kardiomyozyten sind nur leicht gefärbt.

Myozytenkerne zeigen eine unterschiedliche Anfärbbarkeit mit dem SHBG-Antikörper 882. Im selben Gewebeschnitt lassen sich gefärbte (Abb. 9 a) neben schwächer (Abb. 9 b) und nicht gefärbten Kernen (Abb. 9 c) beobachten.

Häufig weisen Kardiomyozyten mit starker SHBG-Färbung im Zellkern auch eine deutliche Färbung im Zytoplasma vor. Eine schwache Färbung im Zellkern geht meist auch mit schwacher Färbung im Zytoplasma einher.

Das die Herzmuskelzellen umgebende Binde- und Versorgungsgewebe lässt sich teilweise auf SHBG anfärben. Dabei ist sowohl das Zytoplasma als auch die Kerne der Fibrozyten mit wechselnder Intensität gefärbt (Abb. 8 c).

Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten keine Färbung (ohne Abbildung).

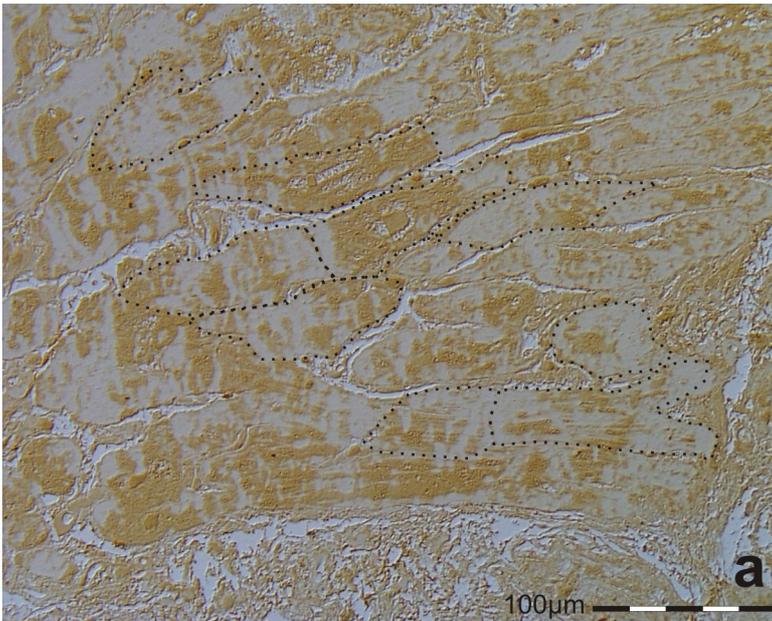
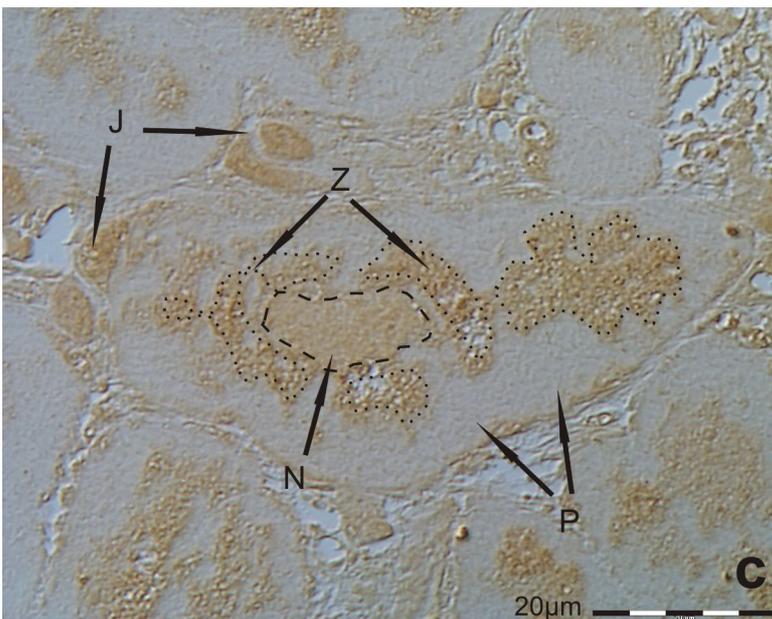


Abb. 8:
Myozyten in SHBG-Färbung.

a: Biopsie 1. Bereits in der Übersichtsaufnahme (200x) sind deutliche Färbungen in den Myozyten sichtbar. Die Zellgrenzen der Myozyten sind auf dem Foto in schwacher Vergrößerung nur schwer erkennbar. Zur Veranschaulichung sind die Grenzen einiger Myozyten gepunktet markiert.



b: Biopsie 1 (1000x). Deutlich sichtbare Färbung im perinukleären Zytoplasma (Z) und etwas schwächer im Zellkern (N), ungefärbte Myofibrillen im peripheren Zellbereich (P). Die Grenzen des Zellkerns sind gestrichelt, die zytoplasmatische Färbung gepunktet markiert.



c: Biopsie 2 (1000x). Auch hier deutliche Färbung im Zytoplasma (Z), etwas schwächer im Zellkern (N). Ein Teil des Zytoplasmas ist nicht gefärbt (P). SHBG-Färbung auch in Zellen des Binde- und Versorgungsgewebes (J). Die Grenzen des Zellkerns sind gestrichelt, die zytoplasmatische Färbung gepunktet markiert.

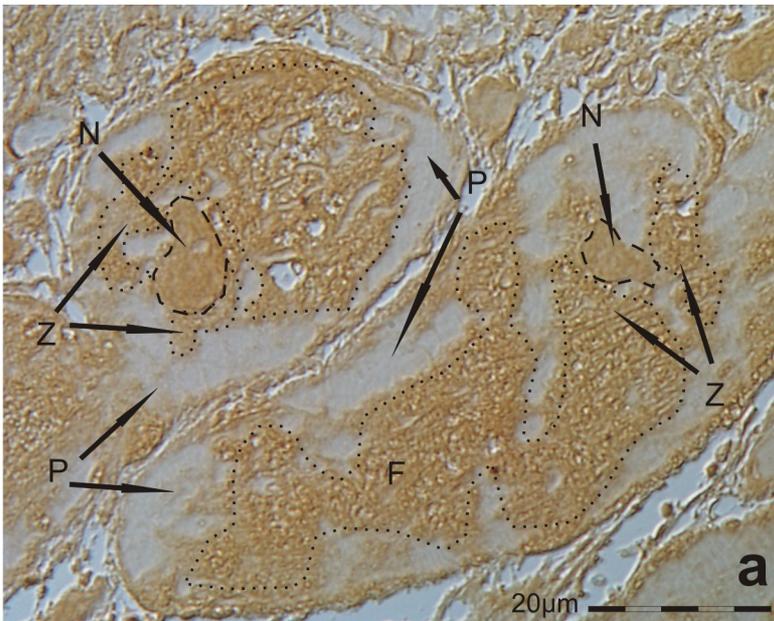
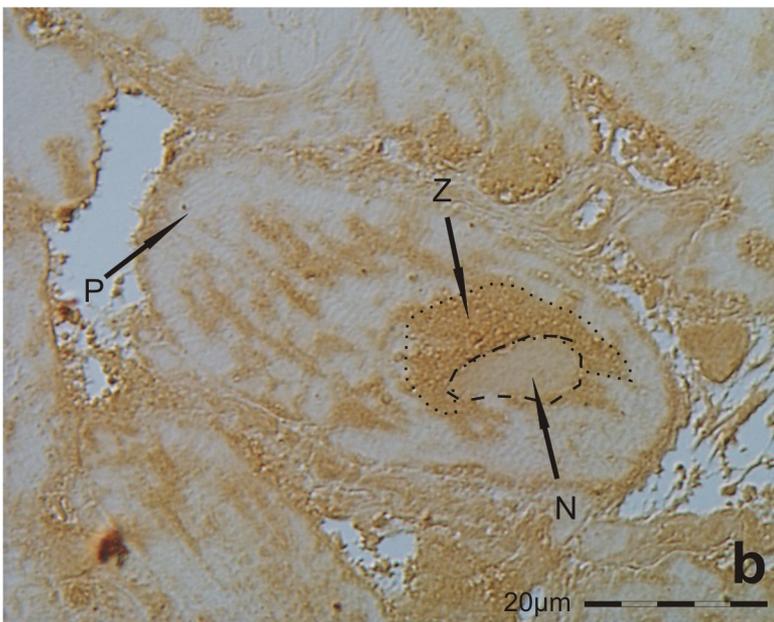
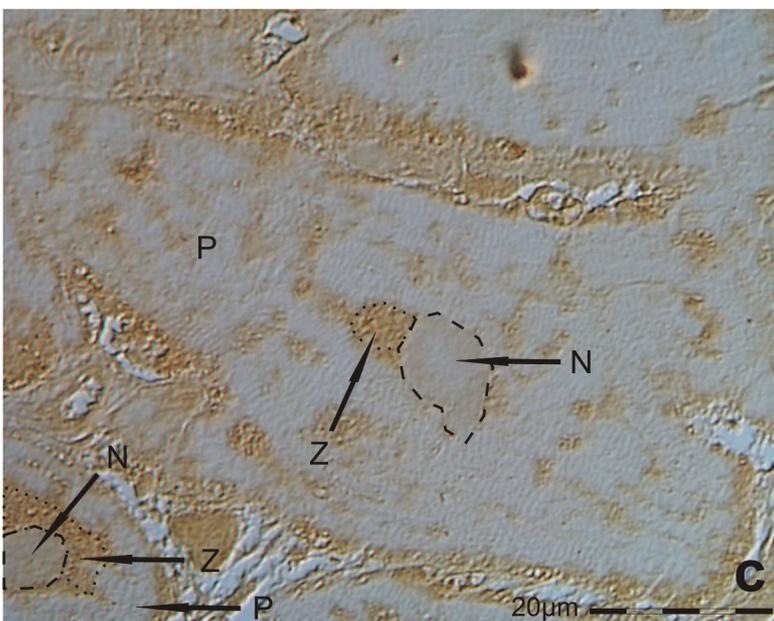


Abb. 9: Myozyten in SHBG-Färbung Biopsie 1 (1000x). Die Grenzen des Zellkerns sind gestrichelt, die zytoplasmatische Färbung gepunktet markiert.

a: Zwei Kardiomyozyten mit relativ intensiv gefärbten Zellkernen (N) und perinukleärer Färbung des Zytoplasmas (Z). Hier weitere Färbung des Zytoplasmas im Bereich der im Phasenkontrast schwach erkennbaren Myofibrillen (F). Ungefärbter Randsaum des peripheren Zytoplasmas (P).



b: Kardiomyozyt mit schwächer gefärbtem Zellkern (N) und nur perinukleärer Färbung des Zytoplasmas (Z). Einige Bereiche des Zytoplasmas zeigen sich ungefärbt (P).



c: Mittig im Bild ein Myozyt mit ungefärbtem Kern (N) und nur kleinflächiger perinukleärer Färbung des Zytoplasmas (Z). Das weitere Zytoplasma zeigt sich ungefärbt (P). Links unten im Bild ein teilweise erfasster Myozyt mit ähnlichem Färbeverhalten.

5.3.2 Lokalisation von Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten

Zur Beurteilung der AR-Expression in Kardiomyozyten wurden Folgeschnitte zu den SHBG-Färbungen mit dem AR-Antikörper gefärbt.

Androgenrezeptoren lassen sich in recht unterschiedlichem Maße in den Kardiomyozyten nachweisen. Dabei fällt bereits in geringer Vergrößerung auf, dass es innerhalb einer Biopsie ein sehr unterschiedliches Färbeverhalten der Zellen gibt (Abb. 10 a).

Zusammenhänge zwischen Anfärbbarkeit auf Androgenrezeptoren und patientenspezifischen Parametern wie Alter, im Myokard nachgewiesenen viralen Nukleinsäuren oder erniedrigten Serumandrogenspiegel lassen sich nicht erkennen.

Ähnlich wie im Zytoplasma verhält sich die Anfärbbarkeit des Androgenrezeptors im Kern der Kardiomyozyten. Innerhalb der einzelnen Biopsien lässt sich eine sehr große Varianz der Anfärbbarkeit beobachten. Ein Zusammenhang zu patientenspezifischen Daten, insbesondere zu erniedrigten Serumandrogenspiegeln lässt sich auch hier nicht feststellen.

Es zeigen sich zum Teil schwach angefärbte Kerne mit intensiver gefärbtem perinukleärem Zytoplasma in ein und derselben Biopsie neben Zellen mit starker Kernfärbung und kaum gefärbtem Zytoplasma.

Abbildung 10 b und c zeigt benachbarte Kardiomyozyten in dem selben Schnitt. Bild b zeigt dabei zwei Kardiomyozyten mit zytoplasmatischer AR-Färbung und, im Vergleich zum Zytoplasma, noch intensiver gefärbtem Zellkern. Bild c zeigt eine weniger als 500 µm von Bild b entstandene Aufnahme. Dabei zeigt sich ein ungefärbter Myozytenkern mit geringer perinukleärer Färbung im Zytoplasma. Einige Zellen des Binde- und Versorgungsgewebes zeigen AR-Färbung.

Abbildung 11 zeigt ebenfalls zwei Kardiomyozyten aus einem AR-gefärbten Schnitt, die nur um wenige Mikrometer voneinander entfernt lagen. Die abgebildete Biopsie 12 stammt von dem Patienten mit dem niedrigsten gemessenen Gesamttestosteron von 1,4 nmol/l. Dabei zeigt die eine Zelle eine starke Kernfärbung (Abb. 11 a), die andere einen ungefärbten Kern (Abb. 11 b).

Bei der Beurteilung der Biopsien der beiden Patienten mit den auffallend hohen Gesamttestosteronwerten (Biopsie 10 und 11, 42,23 bzw. 35,54 nmol/l, jeweils 61 bzw. 48 Jahre alt) in Abbildung 12 b und a fällt auf, dass die Kardiomyozyten nur eine sehr schwache Anfärbbarkeit des AR zeigen. In beiden Biopsien lässt sich eine sehr schwache Färbung des Zytoplasmas beobachten, Myozytenkerne sind in beiden Biopsien überhaupt nicht gefärbt. Dies zeigt sich auch in Wiederholungsfärbungen, die zur Kontrolle dienten. Einige Fibrozyten, die ebenfalls angeschnitten sind, zeigen jedoch eine Färbung des Zytoplasmas und des Zellkerns.

Einige andere in den Biopsien angeschnittene Zellen wie beispielsweise Fibrozyten oder Zellen der Blutkapillaren zeigen ebenfalls eine Anfärbbarkeit auf Androgenrezeptoren. Dabei tritt meist ein, im Vergleich zum Zytoplasma, relativ intensiv angefarbter Kern hervor (Abb. 10 c, Abb. 12 a und b).

Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten keine Färbung (ohne Abbildung).

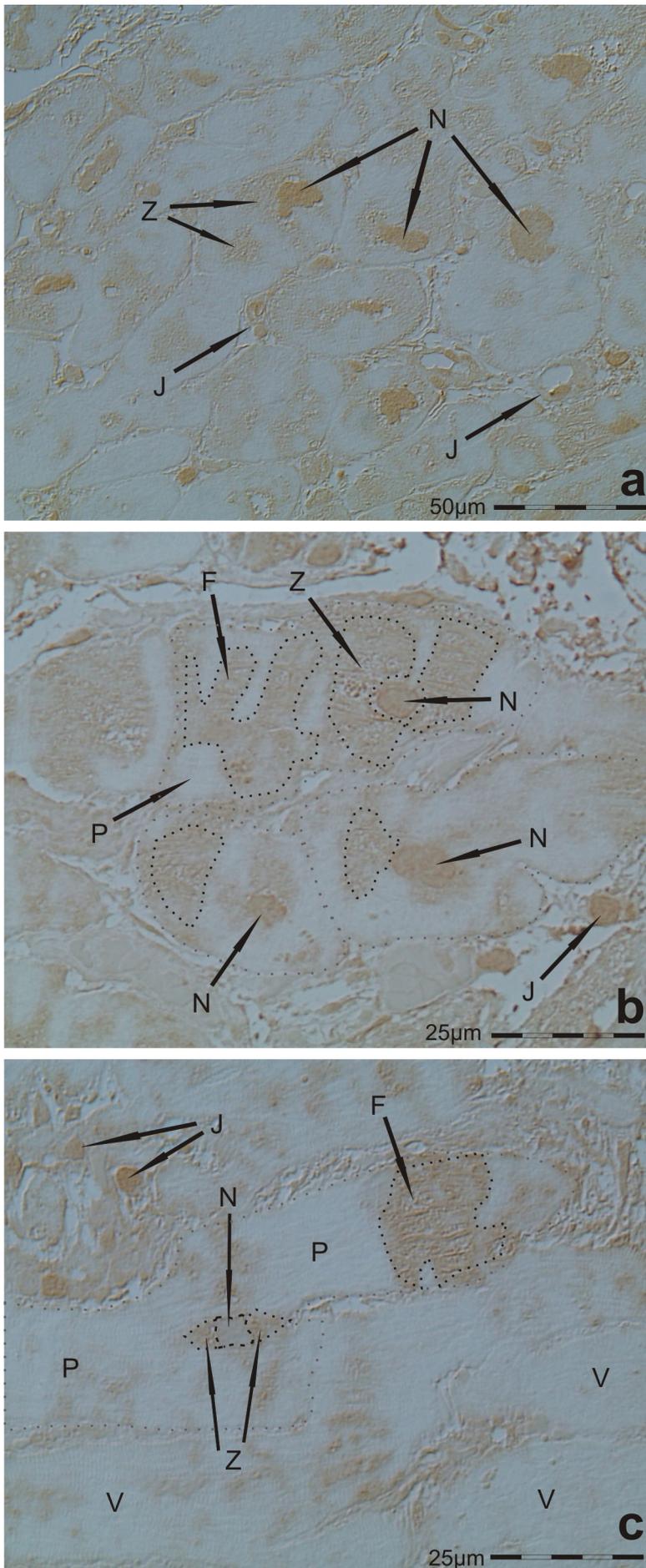


Abb. 10: AR-Färbung

a: Biopsie 2 (400x). Bereits in geringer Vergrößerung zeigen sich Myozyten mit zum Teil angeschnittenen Kernen (N) und unterschiedlicher zytoplasmatischer Färbung (Z). Zwischen den Kardiomyozyten weitere Zellen wie Fibrozyten oder Endothelzellen der Blutkapillare mit z. T. auch gefärbten Kernen (J).

b: Biopsie 1 (800x). Drei Kardiomyozyten mit angeschnittenen gefärbten Zellkernen (N). Die Zellgrenzen sind hier nur schwach erkennbar, konnten jedoch mittels Phasenkontrast und Autofluoreszenzbetrachtung sicher identifiziert werden. Zur Veranschaulichung sind sie hier gepunktet markiert. Erkennbare zytoplasmatische Färbung im perinukleären Bereich des endoplasmatischen Retikulums (Z). Zytoplasmatische Färbung auch im Bereich der Myofibrillen (F). Einige Bereiche des Zytoplasmas erscheinen ungefärbt (P). Zwischen den Myozyten gelegene Fibrozyten mit gefärbtem Kern (J).

c: Biopsie 1 (800x). Aus dem selben Schnitt wie Bild b stammt dieses Bild. Ein verzweigter Myozyt mit ungefärbtem Kern (N), die Grenzen des Zellkerns sind gestrichelt markiert. Die Grenzen des Myozyten ließen sich nur mittels Phasenkontrast und Autofluoreszenz des Gewebes sicher darstellen und sind hier grau gepunktet markiert. Perinukleäre Färbung des Zytoplasmas (Z), zytoplasmatische Färbung auch weiter peripher (F). Weite Teile des Zytoplasmas sind ungefärbt (P). Rechts unten im Bild Myozyten ohne Anfärbbarkeit (V). Links im Bild nicht genau identifizierte Zellen des Binde- und Versorgungsgewebes mit gefärbten Kernen (J).

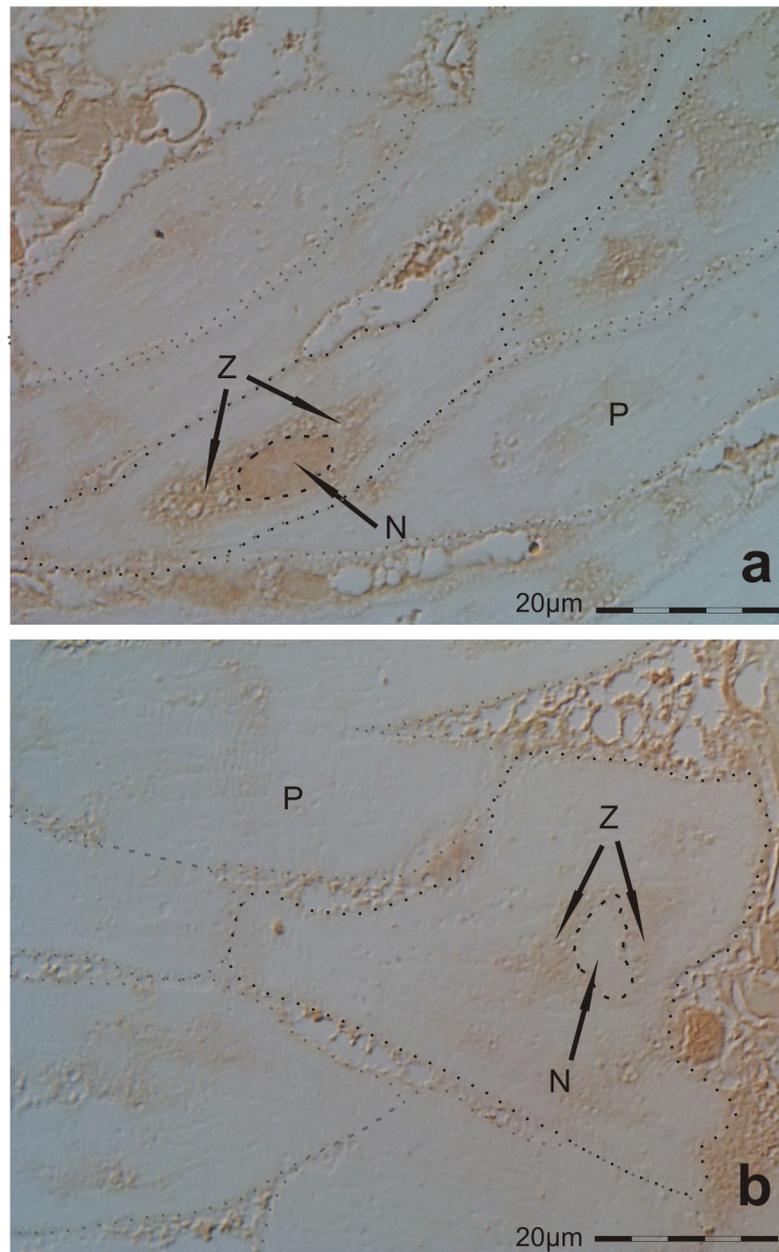


Abb. 11: AR-Färbung Biopsie 12 (1000x). Die Bilder a und b stammen aus dem selben Schnitt. Die Grenzen der beschriebenen Myozyten sind schwarz gepunktet, die Zellkerne schwarz gestrichelt markiert. Die Grenzen benachbarter Myozyten sind grau gepunktet markiert.

a: Myozyt mit intensiv gefärbtem Zellkern (N). Färbung der perinukleären Strukturen des Zytoplasmas (Z). Die übrigen Bereiche des Zytoplasmas sind ungefärbt. Benachbarte Myozyten weitgehend ungefärbt (P).

b: Myozyt mit ungefärbtem Zellkern (N). Das perinukleäre Zytoplasma schwach gefärbt (Z). Benachbarte Myozyten sind ungefärbt (P).

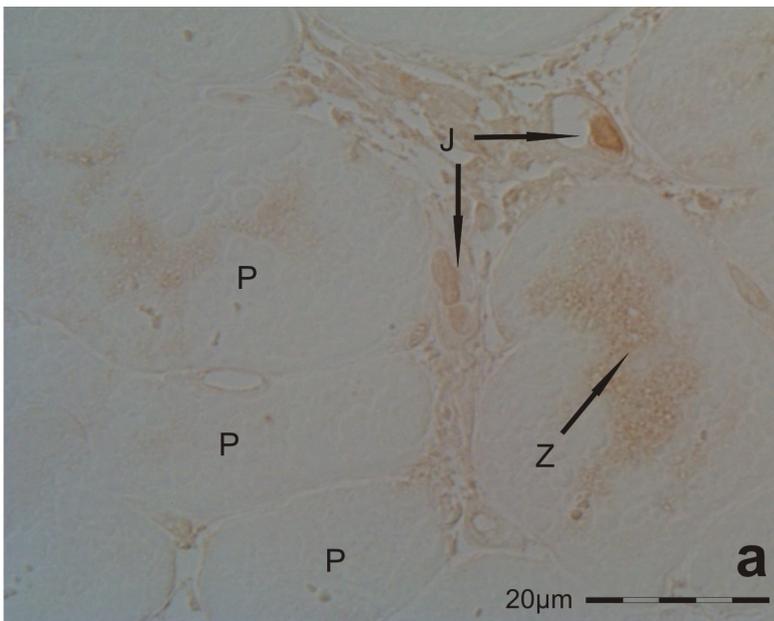
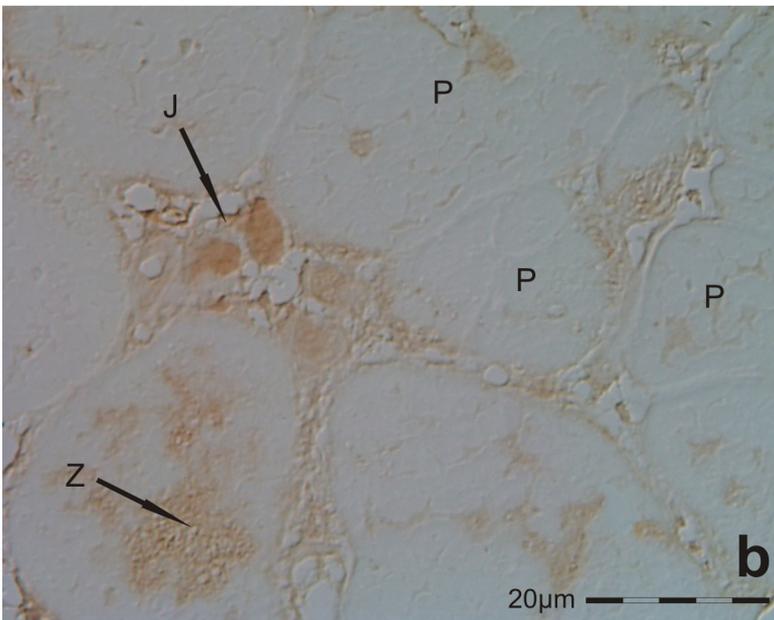
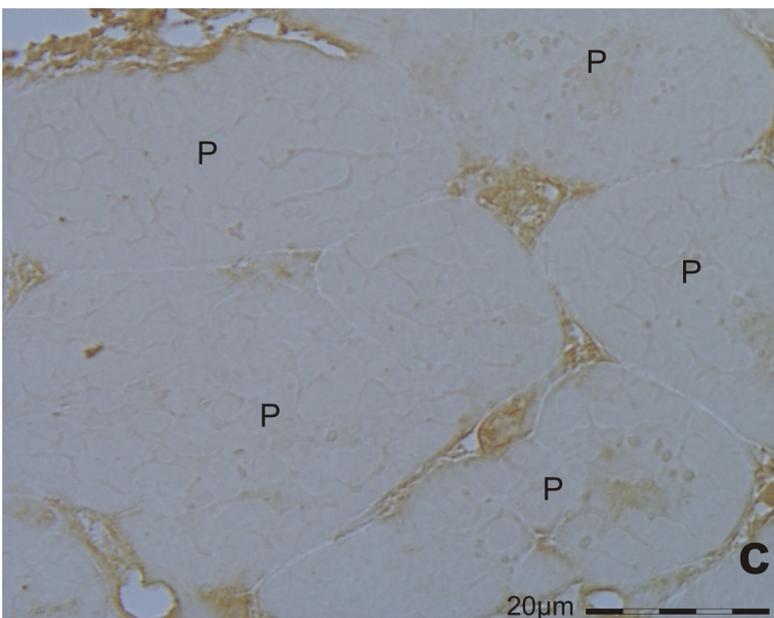


Abb. 12: AR-Färbungen Biopsien 10 und 11 (1000x)

a: AR-Färbung Biopsie 11. Rechts im Bild ein Kardiomyozyt mit nur geringer zytoplasmatischer Färbung (Z). Dabei handelt es sich um die stärkste AR-Färbung eines Kardiomyozyten in dieser Biopsie. Abgebildet sind weitere ungefärbte Myozyten (P). Einige Zellen des Binde- und Versorgungsgewebes zeigen sich mit gefärbten Kernen (J).



b: AR-Färbung Biopsie 10. Links unten im Bild ein Kardiomyozyt mit nur geringer zytoplasmatischer Färbung (Z). Bei dieser handelt es sich um die stärkste AR-Färbung eines Kardiomyozyten in dieser Biopsie. Die übrigen Kardiomyozyten zeigen sich ungefärbt (P). Einige Fibrozyten zeigen sich mit gefärbten Kernen (J).



c: SHBG-Färbung Biopsie 10. Es zeigen sich Kardiomyozyten mit ungefärbtem Zytoplasma (P).

5.3.3 Kolokalisation von Sexual-Hormon Binding Globulin und Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten

Zum Vergleich der Anfärbarkeit von SHBG und AR in Kardiomyozyten wurden jeweils Folgeschnitte aus den Biopsien mit den beiden Antikörpern gefärbt. Dadurch konnten die jeweiligen Zellabschnitte, um nur wenige Mikrometer versetzt, verschiedenen Färbungen unterzogen werden. Dies ermöglicht Vergleiche innerhalb einzelner Zellkompartimente.

Bereits bei der Betrachtung der Präparate in geringer Vergrößerung fällt die Kolokalisation von SHBG und AR auf (Abb. 13). In vereinzelt Zellen ist jeweils nur eines der beiden Proteine angefärbt. In der überwiegenden Mehrheit der Zellen, die eines der beiden Proteine präsentieren, lässt sich eine Kolokalisation besonders im Zytoplasma beobachten. Zellen, die in einer der beiden Färbungen ungefärbt erschienen, zeigten sich meist auch in der anderen Färbung ungefärbt.

In stärkerer Vergrößerung fällt auf, dass die Proteine in den Folgeschnitten jeweils in exakt den selben Kompartimenten bzw. Regionen der Zellen angefärbt sind. In Abbildung 14 zeigen die Bilder a und b sowie c und d jeweils Folgeschnitte in SHBG- und AR-Färbung.

SHBG und AR zeigen sich also sowohl in den gleichen Kardiomyozyten, als auch in den gleichen Zellbereichen angefärbt.

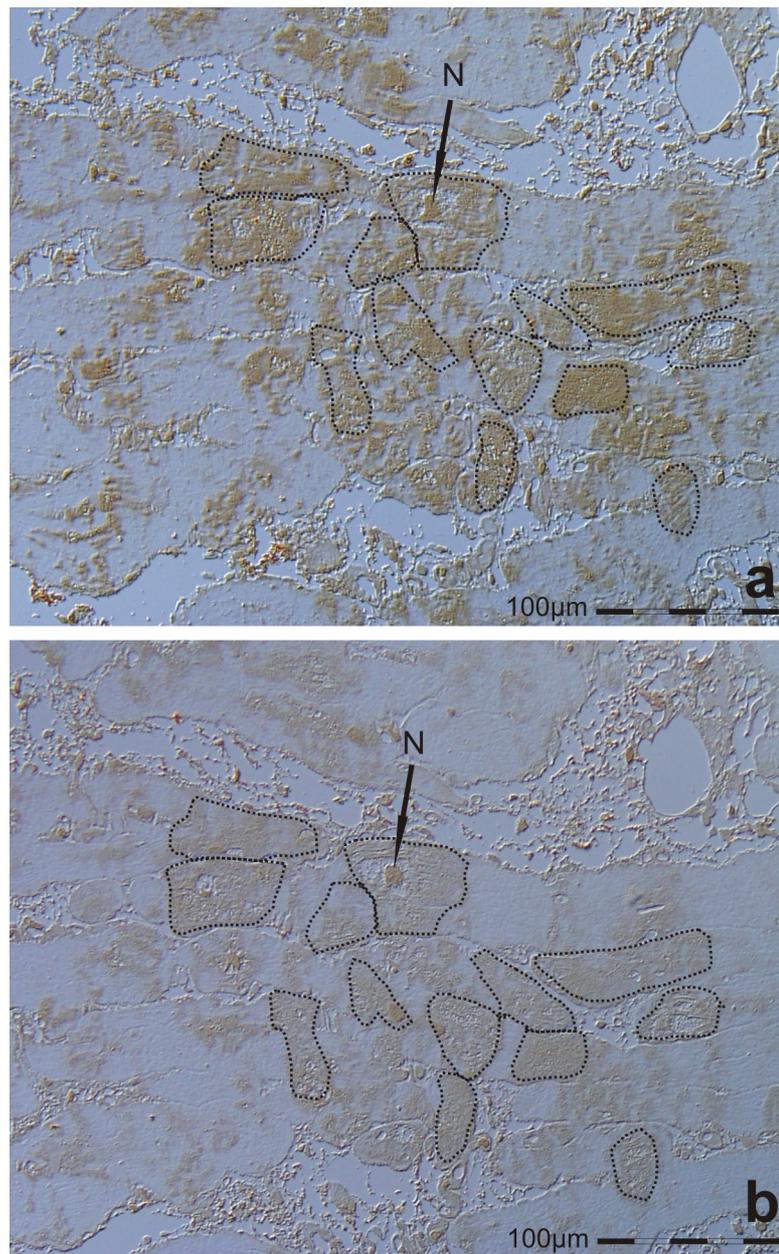


Abb. 13: Kolokalisation von SHBG und AR. Abgebildet sind zwei unmittelbare Folgeschnitte aus Biopsie 4. Bereits in 200-facher Vergrößerung fällt die Übereinstimmung der gefärbten Areale auf. Zur Veranschaulichung ist ein Teil der gefärbten Zellbereiche gepunktet markiert.

a: SHBG-Färbung Biopsie 4 (200x). Myozyten mit zum Teil angeschnittenem Kern (N) und gefärbten Zellbereichen (gepunktet markiert).

b: AR-Färbung Biopsie 4 (200x). Folgeschnitt zur Färbung in Bild a. Myozyten mit zum Teil angeschnittenem Kern (N) und gefärbten Zellbereichen (gepunktet markiert). Die gefärbten Areale decken sich weitgehend mit denen der SHBG-Färbung in Bild a.

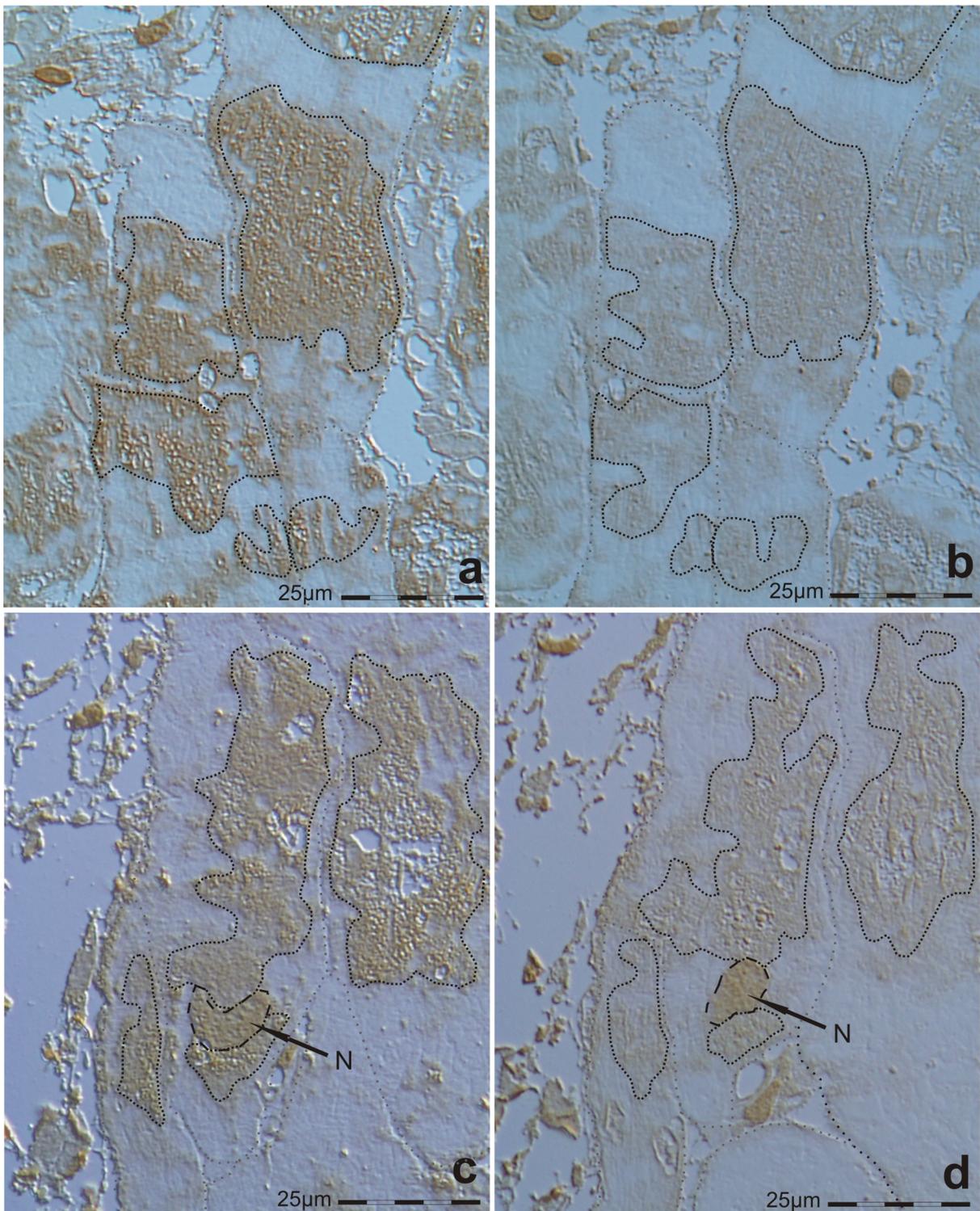


Abb. 14: Kolokalisation von SHBG und AR im Zytoplasma (800x). Die Bilder a und b sowie c und d zeigen jeweils Folgeschnitte aus der Biopsie 4. Die Zellgrenzen der Kardiomyozyten sind grau gepunktet markiert. Die zytoplasmatischen Färbungen in den Myozyten sind schwarz gepunktet markiert.

a: SHBG-Färbung aus Biopsie 4.

b: AR-Färbung aus Biopsie 4. Es handelt sich um einen Folgeschnitt zu Bild a.

c: SHBG-Färbung aus Biopsie 4. Zu sehen ist ein gefärbter Myozytenkern (N) mit gestrichelt markierten Grenzen.

d: AR-Färbung aus Biopsie 4. Es handelt sich um einen Folgeschnitt zu Bild c. Der angeschnittene Kern (N) zeigt durch den parallel räumlich versetzten Schnitt einen anderen Umriss wie in Bild c. Die Zellkerngrenzen sind gestrichelt markiert.

5.3.4 In-Situ-Hybridisierung für SHBG in Kardiomyozyten

Über eine BrdU-markierte DNA-Sonde wurde für die Expression von SHBG spezifische mRNA angefärbt. Durch die nur in geringen Mengen vorliegende mRNA ist die Hybridisierungsfärbung im Vergleich zur den Proteinfärbungen etwas schwächer.

Die ISH zeigt deutlich das Vorliegen von SHBG kodierender mRNA in Kardiomyozyten.

Abbildung 15 zeigt eine Hybridisierungsfärbung für SHBG aus Biopsie 17. Deutlich sichtbar ist die zytoplasmatische Färbung der Hybridisierung. Zu erkennen ist die körnige Struktur der gefärbten Zellbereiche, die dem typischen lichtmikroskopischen Bild des endoplasmatischen Retikulums entspricht.

In Abbildung 16 zeigt Bild a einen weiteren Kardiomyozyten in Hybridisierungsfärbung. Bild b zeigt einen unmittelbaren Folgeschnitt zu Bild a. Deutlich sichtbar ist die Färbung des Proteins SHBG in der unmittelbaren Umgebung der in Bild a gefärbten mRNA. Im Zellkern zeigt sich ebenfalls gefärbtes SHBG. Bild c zeigt einen weiteren Folgeschnitt durch den selben Kardiomyozyten mit AR-Färbung in Zytoplasma und Zellkern. Abbildung 16 veranschaulicht die aktuelle Expression von SHBG bei gleichzeitigem Nachweis von SHBG und AR im Zytoplasma und Zellkern.

Die als Kontrolle mitgeführte Inkubation mit der zur mRNA nicht komplementären DNA-Sense-Sonde zeigte keine Färbungsreaktion (ohne Abbildung).

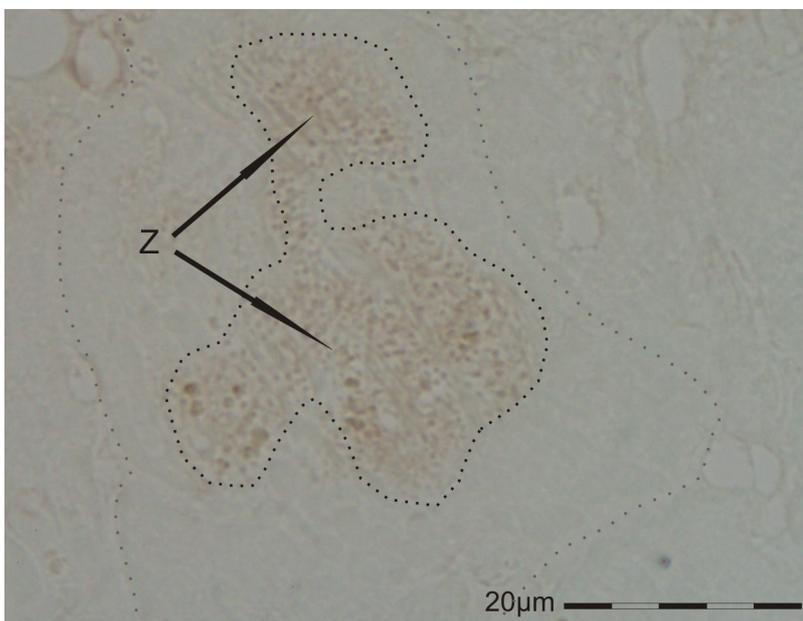


Abb. 15:
In-Situ-Hybridisierung für SHBG Biopsie 17 (1000x).
 Anfärbung der mittels Gensonde markierten mRNA im zentralen Zytoplasma. Die körnigen Strukturen entsprechen dem typischen lichtmikroskopischen Bild von Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum.

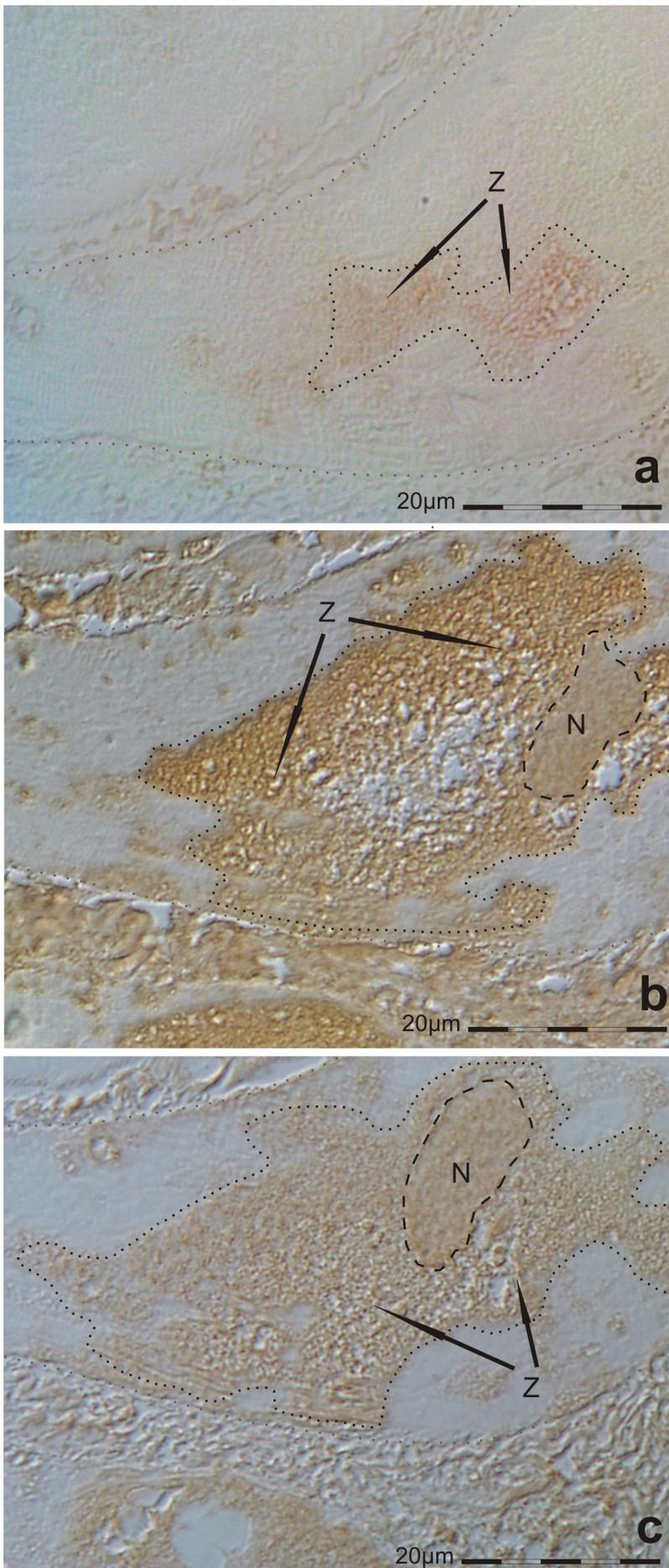


Abb. 16:
In-Situ-Hybridisierung für SHBG, SHBG- und AR-Färbung in einem Kardiomyozyten aus Biopsie 16 (1000x). Die Bilder a, b und c zeigen Folgeschnitte. Die Grenzen der Kardiomyozyten sind grau gepunktet markiert. Zellkerne (soweit angeschnitten) sind gestrichelt markiert. Zytoplasmatische Färbungen sind schwarz gepunktet markiert.

a: In-Situ-Hybridisierung für SHBG. Sichtbar ist die Anfärbung der Gensonde im zentralen perinukleären Zytoplasma (Z). Lokalisation der Färbung entspricht der typischen Lokalisation von Golgi-Apparat und endoplasmatischen Retikulum.

b: SHBG-Färbung. Folgeschnitt zu Bild a. Kardiomyozyt mit zytoplasmatischer Färbung (Z) und gefärbtem Kern (N).

c: AR-Färbung. Folgeschnitt zu Bild a und b. Färbung in Zytoplasma (Z) und Kern (N).

6 Diskussion

6.1 Massenspektrometrische Untersuchung und Immunfärbung von SHBG in Herzmuskelgewebe

Das Protein SHBG wurde zunächst als von der Leber ins Blut abgegebenes Bindungsprotein für Steroidhormone beschrieben, was auch zur Namensgebung führte. Darüber hinausgehend wurde SHBG in den letzten Jahren in verschiedenen anderen Geweben nachgewiesen, beispielsweise in menschlicher Prostata (Herbert et al. 2003), im Gehirn (Fortunati 1999, Caldwell et al. 2000) und zahlreichen weiteren Geweben der Ratte (Becchis et al. 1996).

Im menschlichen Myokard wurde SHBG bis jetzt noch nicht beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte SHBG aus menschlichem Myokard isoliert und dessen Lokalisation und Expression immunhistochemisch gezeigt werden.

Die mittels Affinitätschromatographie aus der Myokardprobe isolierte Proteinlösung enthält Proteine verschiedener Molekulargewichte, die alle durch die ihnen gemeinsame, vom SHBG-Antikörper erkannte Aminosäuresequenz charakterisiert werden.

SHBG liegt unter physiologischen Bedingungen als Homodimer vor. Nach Denaturierung zeigt sich in der massenspektrometrischen Messung hier das Monomer, das der Proteinfraction mit einer mittleren Masse von 50,267 kDa entspricht.

In meinen Untersuchungen zeigte sich die starke Anfärbbarkeit von SHBG an den perinukleären Strukturen der Kardiomyozyten. Im Bereich der Myofibrillen fand sich eine Färbung des Proteins, die seltener und schwächer war als im perinukleären Bereich, und nicht im Vordergrund stand. Die Zellmembranen waren nur leicht gefärbt. Zahlreiche Myozytenkerne zeigten ebenfalls eine SHBG-Färbung.

Becchis konnte in quergestreifter Muskulatur und in Myokard an Ratten starke immunhistochemische Anfärbbarkeit von SHBG feststellen. Dabei fiel auch die Anfärbbarkeit des SHBG im Bereich der Myofibrillen auf (Becchis et al. 1996). Beschreibungen zur Lokalisation des vollständigen SHBG-Moleküls in Zellkernen finden sich in der Literatur nicht.

Die Fibrozyten zeigten zum Teil auch eine deutliche SHBG-Färbung. Dies deckt sich auch mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Becchis, die eine intensive SHBG-Färbung im Bindegewebe und anderen Geweben mesodermalen Ursprungs der Ratte fanden (Becchis et al. 1996).

In der massenspektrometrischen Untersuchung (Abb. 7) zeigen sich zwei weitere Proteinfractionen mit Molekülmassen von 23 und 34 kDa. Diese zwei Fraktionen mit geringeren Molekulargewichten finden sich auch in der Vergleichsmessung aus Gewebe der Ratte. In funktionellen Untersuchungen konnte die Arbeitsgruppe um G. Jirikowski nachweisen, dass sich diese beiden Proteine parallel zum vollständigen SHBG durch Östrogengaben bei Ratten im Hypothalamus supprimieren ließen (Herbert et al. 2003). Dieses exakt analoge Verhalten der Proteine zum vollständigen SHBG lässt es unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich dabei um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit einem vollkommen anderen Protein handeln könnte.

Die Synthese von alternativ gespleißtem SHBG und ABP wurde in mehreren Geweben und Arten beschrieben. Dabei entstehen durch die entsprechend kodierende mRNA Proteine, die zwar zum Teil identische AS-Sequenzen wie das vollständige SHBG enthalten, selbst jedoch keine Steroide binden. Diese alternativ gespleißten SHBG-ähnlichen Proteine besitzen auch eine vom vollständigen SHBG verschiedene Sekundär- und Tertiärstruktur (Joseph und Lawrence 1993, Sullivan et al. 1993, Joseph 1994). Möglich wäre auch, dass es sich bei den beiden leichteren Fraktionen nicht um primär anders synthetisierte Proteine, sondern um sekundär entstandene Fragmente des SHBG handeln könnte. Für diese theoretisch denkbare Möglichkeit finden sich in der Literatur jedoch keine Hinweise.

Die Annahme, dass es sich bei den beiden hier zusätzlich gemessenen Proteinfractionen um alternativ gespleißte SHBG-Formen handelt, erscheint plausibel.

An isolierten Nierenzellen des Affen konnte in den Zellkernen alternativ gespleißte Formen von SHBG nachgewiesen werden. Diese alternativ exprimierten Formen des SHBG enthalten im amino-terminalen Bereich eine als „nuclear targeting signal“ bezeichnete Sequenz, die für den Eintritt des Proteins in den Zellkern mitverantwortlich zu sein scheint (Joseph et al. 1996).

Es erscheint naheliegend, dass die beiden Fraktionen (23 und 34 kDa) alternativ gespleißten SHBGs auch das Substrat der in meiner Untersuchung beobachteten Kernfärbungen bilden. Die SHBG-Formen mit geringeren Molekulargewichten zeigen durch die gemeinsame Aminosäuresequenz ebenfalls eine Affinität zum SHBG-Antikörper; ihre funktionellen Eigenschaften unterscheiden sich jedoch vom vollständigen SHBG wie oben beschrieben.

Durch mitgeführte Negativkontrollen konnte die Spezifität der Immunfärbungen gezeigt werden. Durch die affinitätschromatographische Isolierung und massenspektrometrische Untersuchung der Proteine konnte eine Kreuzreaktivität des Antikörpers in den immunhistochemischen Färbungen mit anderen Zellproteinen ausgeschlossen werden.

Eine Verunreinigung der Myokardprobe durch im anhaftenden Blutplasma enthaltenes extrazelluläres SHBG konnte durch gründliches Waschen der Probe mit Pufferlösung weitestgehend reduziert bzw. ausgeschlossen werden. Eine Kontrollmessung mit reinem SHBG-Antikörper zeigte eine einzelne Proteinfraction bei 66 kDa. Zusätzlich wurde, wie im Kapitel 4.6.3 „SHBG-Isolierung mittels Affinitätschromatographie“ beschrieben, eine Kontrollmessung ohne Myokardprobe durchgeführt. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer der hier gemessenen Proteinfractionen um Spuren des aus der Chromatographiesäule ausgewaschenen Antikörpers oder Säulenmaterials handelt.

In meiner Arbeit wurden zur immunhistochemischen Untersuchung der Lokalisation des SHBG in Kardiomyozyten bereits zur Verfügung stehende Myokardbiopsien verwendet. Diese stammen von Patienten mit DCM und fanden zum Teil bereits in vorhergehenden Studien Anwendung. Entsprechende Biopsien von gesunden Patienten stehen naturgemäß nicht zu Verfügung, da die Entnahme einer Myokardbiopsie einer strengen Indikationsstellung bedarf und sich am gesunden Menschen verbietet. Zur immunhistochemischen morphologischen Beurteilung ist es wichtig, dass die Gewebeproben innerhalb weniger Minuten nach Entnahme fixiert werden. Deshalb eignet sich Untersuchungsgut aus Obduktionen mit postmortalen Lagerungszeiten im günstigsten Fall zwischen 12 und 24 Stunden hierfür nicht. Proben aus explantierten Herzen von Transplantationspatienten entstammen terminalen Krankheitsstadien und eignen sich nicht zum Vergleich. Biopsien, die nach Transplantation entnommen werden, stammen von immunsupprimierten Patienten und lassen eine sichere Beurteilung des dadurch beeinflussten SHBG nicht zu.

An dieser Stelle soll nochmals betont werden, dass hier keine Aussage über die DCM getroffen werden konnte. Ziel war es, die bisher nicht belegte Existenz des Proteins SHBG in menschlichen Kardiomyozyten nachzuweisen und dessen intrazelluläre Verteilung zu beschreiben. Der massenspektrometrische Nachweis des Proteins SHBG in einer nativen Myokardprobe eines Patienten, der nicht an einer DCM litt, deutet darauf hin, dass SHBG

regelhaft im Myokard lokalisiert ist und sich dessen Nachweisbarkeit nicht auf die dilatative Kardiomyopathie beschränkt. Die immunhistochemische Untersuchung erlaubt aufgrund der enzymatischen Verstärkungsreaktion keine direkte Quantifizierung. Quantitative Aussagen zur unterschiedlichen SHBG-Expression könnte mit Immunoassays gemacht werden, wofür aber nicht genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung stand.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie erstmals der qualitative Nachweis von SHBG in menschlichem Herzmuskelgewebe erbracht werden. Zusätzlich wurde dessen zelluläre Lokalisation immunhistochemisch gezeigt und beschrieben.

Dies ist ein weiterer Beitrag zu der Feststellung, dass dem Protein SHBG in den Zielgeweben der Steroidhormone weit mehr Funktionen zuzurechnen sind als nur die extrazelluläre Aufgabe als Bindungsglobulin. Denkbar wären Einflüsse des SHBG auf Apoptose oder auch als trophischer Faktor in Kardiomyozyten. Vorstellbar wäre auch die kardiale Synthese von SHBG als Hormon, ähnlich der des atrialen natriuretischen Peptids. Derartige Überlegungen würden dazu passen, dass in einigen Kardiomyozyten zwar SHBG, aber kaum AR gefärbt war. An der Ratte wurde SHBG in einigen Geweben nachgewiesen, die keine klassischen Zielgewebe für Steroidhormone darstellen (Becchis et al. 1996).

6.2 Der Nachweis der Expression von SHBG in Kardiomyozyten mittels In-Situ-Hybridisierung

Eine mögliche Erklärung für das Vorliegen von SHBG in Kardiomyozyten wäre die Aufnahme des Proteins aus dem Blutplasma bzw. Interstitium. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das nachgewiesene SHBG in den Kardiomyozyten gebildet wurde.

Nachdem die Expression des Proteins SHBG in zahlreichen anderen Geweben beschrieben wurde (Kahn et al. 2002), lag die Überlegung nahe, dass SHBG auch im Myokard intrinsischen Ursprungs sein könnte.

Mittels In-Situ-Hybridisierung am Semidünnschnitt konnte SHBG kodierende mRNA in Kardiomyozyten markiert werden. In Folgeschnitten durch den selben Kardiomyozyten konnte zusätzlich das intensiv anfärbbare Protein SHBG sowie dessen Kolo-kalisation mit AR gezeigt werden (Abb. 16).

Damit wird deutlich, dass das qualitativ nachgewiesene SHBG nicht vollständig von extern in die Zelle eingedrungen bzw. aufgenommen worden ist, sondern zumindest teilweise in den Kardiomyozyten exprimiert wurde.

Die Untersuchungsergebnisse stellen einen ersten Hinweis auf bisher noch nicht bekannte Funktionen des Proteins SHBG in menschlichen Kardiomyozyten dar. Die Synthese eines Bindungsglobulins mit dem Ziel der Sekretion ins Blutplasma ohne vordergründige Funktionen im Myokard würde sämtlichen bisherigen Charakterisierungen des Myokards als hochdifferenziertes und spezialisiertes Funktionsgewebe entgegenstehen. Eine Funktion des lebenslang und ununterbrochen arbeitenden Myokards als „endogene SHBG-Drüse“, ähnlich der Leber, erscheint nicht plausibel.

6.3 Testosteron und die Lokalisation des Androgenrezeptors in Kardiomyozyten

Zur möglichen Bedeutung der Androgene bei Herzinsuffizienz und anderen kardiovaskulären Erkrankungen finden sich in der Literatur zahlreiche Beiträge. In einer Studie beobachtete man bei einer Gruppe von männlichen Patienten mit DCM und konsekutiver Herzinsuffizienz, im Vergleich zu einer altersentsprechenden Kontrollgruppe, um etwa die Hälfte erniedrigte Werte des freien Testosterons (Kontoleon et al. 2003). Die Werte des Growth Hormons und des Insulin-like Growth Factor I waren ebenfalls erniedrigt. Kritisch anzumerken ist zu dieser Arbeit, dass die verwendete direkte Messung des freien Testosterons mittels einem Radio-Immunassay als unzuverlässig gilt (Vermeulen et al. 1999, Rosner 2001). Da Kontoleon et al. 2003 das Gesamttestosteron nicht bestimmten, ist ein Vergleich mit Daten meiner Arbeit nicht möglich. Eine Erniedrigung des freien Testosterons durch Digoxin, ACE-Hemmer oder Diuretika schlossen die Autoren aus. ACTH und Cortisol zeigten sich in der Patientengruppe gegenüber den Kontrollen erniedrigt, jedoch nicht signifikant. Kontoleon et al. sahen die hormonellen Veränderungen bei den Patienten mit DCM als mögliche Folge der Dauer und Schwere der Erkrankung. Dies deckt sich mit weiteren Veröffentlichungen, in denen erniedrigte Testosteron- und Cortisolwerte bei Versuchstieren und Patienten mit schweren, langwierigen Stressbelastungen und Erkrankungen beobachtet wurden (Woolf et al. 1985, Ottenweller et al. 1988, Jeppesen et al. 1996). Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass Corticosteroide im Gegensatz zur Skelettmuskulatur an der

Herzmuskulatur einen anabolen Effekt haben, der dem der Androgene ähnelt (Hickson et al. 1984, Sullivan et al. 1998).

Am Tiermodell der Ratte konnte durch Testosterongabe nach Myokardinfarkt eine Steigerung der linksventrikulären Muskelmasse mit Reduzierung der Wandspannung und des linksventrikulären Druckes erreicht werden. Dabei kam es unter Testosterontherapie zu keiner Häufung weiterer, nachfolgender Infarkte (Nahrendorf et al. 2003). Eine ähnliche Veröffentlichung unterstützt diese Schlussfolgerungen (Callies et al. 2003).

Die Arbeitsgruppe um Pugh konnte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz unter Testosteronbehandlung eine Verbesserung der subjektiven Symptomatik, der psychischen Verfassung und der körperlichen Leistungsfähigkeit beobachten (Pugh et al. 2004). Eine signifikante Verbesserung direkter kardiospezifischer Parameter konnte nicht festgestellt werden.

An Affennierenzellen wurde eine Abhängigkeit der Lokalisation des AR vom Androgenangebot beschrieben (Zhou et al. 1994). Dieser Beschreibung zufolge zeigt sich der AR bei Androgenentzug der Zellen vorwiegend im perinukleären Zytoplasma, bei ausreichendem Androgenangebot vorwiegend im Kern.

Von diesen Forschungsergebnissen ausgehend erscheint ein Zusammenhang zwischen Serumtestosteronspiegel und Expression von Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten naheliegend und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Zu 15 Biopsien standen Serumproben zu Verfügung, aus denen die Gesamttestosteronwerte bestimmt wurden (Abb. 6). 10 Proben davon lagen im Normbereich. Bei 3 Proben fielen deutlich unter dem Normbereich liegende, bei 2 Proben deutlich über dem Normbereich liegende Werte auf. Zusammenhänge zwischen Testosteronwert und Alter, Virusnachweis oder Ejektionsfraktion ließen sich nicht erkennen.

In meinen Untersuchungen konnte ich zwischen Biopsien von Patienten mit normalen und erniedrigten Serumtestosteronspiegeln keine Unterschiede in der Anfärbarkeit der Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten oder andere morphologische Auffälligkeiten feststellen. In beiden Gruppen zeigten sich Kardiomyozyten mit unterschiedlichem Färbeverhalten in unmittelbarer Nachbarschaft (Abb. 11).

In den beiden Biopsien mit auffallend hohen zugehörigen Serumtestosteronkonzentrationen fiel die geringe Färbung des AR in Kardiomyozyten bei erhaltener Anfärbbarkeit der Fibrozyten auf. Dies zeigte sich auch in zum Ausschluss eines methodischen Fehlers angefertigten Wiederholungsfärbungen.

Ähnliche Ergebnisse zeigten Färbungen an zwei weiteren Biopsien von Patienten mit erhöhten Testosteronspiegeln, die nicht in diese Untersuchung einbezogen worden waren. Bei einem dieser beiden nicht eingeschlossenen Patienten lag keine primäre DCM vor.

Eine Aussage über die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da in der einen betroffenen Biopsie beispielsweise nur 28 Kardiomyozyten angeschnitten sind, was eine sichere Auswertung nicht zulässt. Die Beurteilung einer so kleinen Gewebeprobe aus einem nicht näher bekannten Bereich der Innenseite des linken Ventrikels ist möglicherweise nicht repräsentativ für die hormonelle Situation des gesamten Myokards. Um für therapeutische Entscheidungen eine möglichst verlässliche Aussagekraft zu erhalten, werden zur Stellung von Diagnosen deshalb mehrere Biopsien ausgewertet. Zu Forschungszwecken kann jedoch nur die Entnahme kleinster Gewebeproben vertreten werden.

Denkbar wäre, dass es mit steigendem Testosteronangebot aus dem Blut zu einer herabgesetzten Rezeptorexpression in Kardiomyozyten im Sinne einer Gegenregulation kommt. Solch ein Mechanismus wurde bereits in Geweben des männlichen Reproduktionstraktes beschrieben (Quarby et al. 1990).

Für die Sättigung und Aktivierung des AR genügen bereits physiologisch vorkommende Androgenspiegel (Sullivan et al. 1998, Cato et al. 2002). Unter der Wirkung des physiologisch gesättigten AR werden die von missbräuchlichen Überdosierungen um den Faktor 100-1000 bekannten zytotoxischen Effekte nicht beobachtet. Das legt die Vermutung nahe, dass zumindest ein Teil der zytotoxischen Androgenwirkungen über andere, nicht vom klassischen AR vermittelte Wege ablaufen könnte (Sullivan et al. 1998).

Zur diskutierten Hormonsubstitution bei chronischer Herzinsuffizienz mit erniedrigten Testosteronspiegeln lässt sich aus meinen vorliegenden Ergebnissen keine Empfehlung oder weitere Aussage ableiten.

Eine unkritische Testosterongabe, wie in der Studie durch die Arbeitsgruppe um Pugh et al. 2004 geschehen, kann durch diese Arbeit im Grunde nicht widerlegt werden, zumal es zu einer Verbesserung der körperlichen Leistungsfähigkeit und psychischen Verfassung in der Therapiegruppe kam. Die „blinde“ Testosterongabe erscheint in Anbetracht der von mir im Zusammenhang mit hohen Testosteronwerten beobachteten verminderten

Nachweisbarkeit von AR in Kardiomyozyten aber fragwürdig. Die oben genannten Arbeiten lassen zudem an der Ursache des Testosteronmangels als Krankheitsursache der Herzinsuffizienz zweifeln.

Die Vor- und Nachteile der Bestimmung von freiem bzw. Gesamttestosteron werden in der Literatur eingehend diskutiert. Die indirekte Bestimmung des freien Testosterons besitzt die höchste Aussagekraft für die globale Situation des Patienten hinsichtlich der Fragestellung einer Hormonsubstitutionstherapie (Vermeulen et al. 1999). Die mit der Bestimmung des freien Testosterons im Blut mögliche Aussage erfasst einen Überblick über die globale Situation im Blutserum.

Im Rahmen meiner Untersuchungen ging es jedoch darum, einzelne Zellen und Zellkompartimente zu beurteilen. Die hormonelle Situation in Organen, insbesondere in einzelnen Zellen, kann von der im Blut stark abweichen. In den Zielgeweben können mitunter völlig verschiedene und vom Blutplasma abweichende SHBG-Konzentrationen vorliegen (Gao et al. 2003). Aus diesen Gründen bietet der Wert des Gesamttestosterons hier einen aussagekräftigeren Anhaltspunkt für das prinzipiell auf zellulärer Ebene zur Verfügung stehende Testosteron als der Wert des freien Testosterons.

Die Überlegungen von Gao et al. 2003 decken sich mit der von mir beobachteten großen Varianz der AR-Färbungen einzelner Biopsien. Innerhalb eines Schnittes zeigten sich neben Zellen mit starker Kernfärbung und schwacher Zytoplasmafärbung auch Zellen mit geringer Kernfärbung und intensiver gefärbtem perinukleärem Zytoplasma und auch gänzlich ungefärbte Kardiomyozyten.

Der zunächst als naheliegend vermutete Zusammenhang zwischen erniedrigtem Serumtestosteronwert und veränderter Anfärbbarkeit des AR in Kardiomyozyten konnte nicht gezeigt werden. Setzt man die Übertragbarkeit der von Zhou et al. beschriebenen Ligandenabhängigkeit des AR auf Kardiomyozyten voraus, lassen sich aus den Ergebnissen der AR-Färbung Rückschlüsse auf die hormonelle Situation der einzelnen Kardiomyozyten ziehen. Den beschriebenen Beobachtungen zufolge hängt das „hormonelle Innenleben“ einzelner Zellen nicht in so großem Maße vom systemischen hormonellen Angebot im Blut ab. Es erscheint plausibler, dass jede Zelle in ihrer „eigenen Steroidhormonwelt“ lebt, die sicher in gewissem Maße, aber nicht erschöpfend durch den globalen Hormonstatus des Organismus beeinflusst und erklärt werden kann.

6.4 Kolokalisation von SHBG und Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten

Zum Vergleich der Anfärbarkeit von SHBG und AR in Kardiomyozyten wurden Folgeschnitte der Biopsien mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt. Dadurch konnten die Zellabschnitte, nur um wenige Mikrometer versetzt, verschiedenen Färbungen unterzogen werden. Diese Technik ermöglicht Vergleiche innerhalb einzelner Zellkompartimente. Bei Doppelfärbungen an einem Schnitt besteht das Risiko von Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Antikörpern. Die Einzelfärbungen am Semidünnschnitt kombinieren eine hohe Aussagekraft mit einem niedrigen Risiko verfälschter Färbungen durch Kreuzreaktionen.

In meinen immunhistochemischen Untersuchungen fiel die Kolokalisation von SHBG und AR im Zytoplasma der Kardiomyozyten auf. Es fanden sich auch Kardiomyozyten, in denen nur eines der beiden Proteine nachweisbar war. In der überwiegenden Mehrzahl der Zellen zeigte sich entweder keine der beiden Färbungen, oder beide zeigten eine deutliche Reaktion. Die Färbungen für AR und SHBG traten dabei in übereinstimmenden Bereichen des Zytoplasmas auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass SHBG an den Wirkungsmechanismen der Androgene in den Kardiomyozyten beteiligt ist.

Die Tatsache, dass sich SHBG und AR in den Kardiomyozyten jeweils gleichzeitig beobachten lassen, deutet möglicherweise auf eine simultane Synthese hin.

In der Literatur finden sich wenig Beschreibungen zur Kolokalisation von SHBG und Steroidrezeptoren in anderen Geweben. Die Bedeutung der gleichzeitigen Expression von SHBG und AR in Zellen ist derzeit noch ungeklärt. In einer Arbeit wird die Kolokalisation von SHBG und Östrogen-Rezeptor in Epithel- und Muskelzellen des menschlichen Eileiters beschrieben (Noe 1999). Der Autor sah in seinen Untersuchungsergebnissen einen Hinweis darauf, dass SHBG auf lokaler Ebene im Gewebe die Wirkung von Steroidhormonen moduliert.

Eine mögliche Erklärung der Kolokalisation in identischen Zellbereichen wäre, dass Androgene oder Östrogene als Liganden für SHBG und AR durch ihre Affinität für die beiden Bindungspartner deren Kolokalisation mitverursachen.

Denkbar wäre es auch, dass SHBG und AR in den gefärbten Zellbereichen bzw. Kompartimenten zeitgleich synthetisiert und bereitgestellt werden, ohne dass es sich dabei bereits um einen funktionell bedeutsamen Ort der Wechselwirkung von Steroiden mit SHBG und AR handelte.

6.5 Das Wirkungsgefüge von Androgenen und SHBG – Überlegungen zu physiologischer Bedeutung und Pathomechanismen

Im Rahmen meiner Arbeit wurde SHBG in Kardiomyozyten qualitativ nachgewiesen. Genaue Aussagen zu dessen funktioneller Bedeutung lassen sich hieraus nicht ableiten. Die Lokalisation von SHBG und AR in Kardiomyozyten muss vor dem Hintergrund der vorliegenden Literatur entsprechend diskutiert und betrachtet werden.

Die oben beschriebenen Zusammenhänge zeigen, dass AR und Androgene nicht mehr als isoliertes System betrachtet werden dürfen. Es sind zahlreiche Wirkungen von Steroidhormonen beschrieben, die sich über den klassischen genomischen Wirkungsweg des AR nicht ausreichend erklären lassen (Caldwell 2002, Cato et al. 2002, Heinlein und Chang 2002, Kahn et al. 2002). Wie in der Einleitung beschrieben, scheint SHBG an der Zellmembran selbst als Rezeptor für steroidvermittelte Effekte zu fungieren (Rosner et al. 1999, Caldwell 2002).

Verschiedene Arbeiten zeigen die Schlüsselposition der Steroidhormone zwischen anabolen Effekten und zytotoxischer Wirkung. Es erschienen Arbeiten, in denen eine androgeninduzierte Apoptoseresistenz von Prostatakrebszellen beobachtet und Androgenen eine Wirkung als „Überlebenssignal“ zugeschrieben wurde (Berchem et al. 1995, Coffey et al. 2002). Die Untersuchungsergebnisse von Berchem und Coffey sind jedoch nicht sicher auf andere Zellen zu übertragen und nur eingeschränkt zu verallgemeinern. In den zu diesen Untersuchungen verwendeten Zellreihen (LNCaP) wurde eine Mutation des AR beobachtet (Veldscholte et al. 1990). Andere Arbeitsgruppen lenkten die Aufmerksamkeit auf zytotoxische Wirkungen des Testosterons an Tubuluszellen der humanen Niere (Verzola et al. 2004) und Kardiomyozyten der Ratte (Zaugg et al. 2001).

Wie bereits erläutert, genügen für die Sättigung des AR bereits physiologische Testosteronspiegel (Sullivan et al. 1998, Cato et al. 2002). Davon ausgehend erscheint es besonders interessant, dass die zytotoxischen und zum Teil kanzerogenen Wirkungen erst bei einem vielfachen der physiologischen Dosierungen des Testosteron auftreten. Die missbräuchlichen Dosierungen zum „Doping“ liegen um den Faktor 100-1000 über den physiologischen Bereichen (Lukas 1993, Blue und Lombardo 1999). Vor diesem Hintergrund erscheint es naheliegend, dass auch an den pathologischen Wirkungen der Androgene nicht nur der AR, sondern andere Funktionsmechanismen beteiligt sind. SHBG könnte einen

möglichen Baustein in diesen Mechanismen darstellen. Denkbar wäre auch, dass die Produktion von SHBG durch die Leber keine „selbstlose“ Funktion im Dienste des Gesamtorganismus darstellt. Sie dient vielleicht nicht nur dazu, Testosteron vor der hepatischen Metabolisierung zu schützen, sondern schützt auch die Leber vor zytotoxischen Effekten der Steroide. Solch ein Mechanismus wäre auch für andere steroidsensible Organe denkbar.

SHBG könnte in Kardiomyozyten auch mit anderen Steroidhormonen interagieren. Die Expression eines anderen Corticosteroid-bindenden Globulins (CBG), das auch Steroide bindet, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Steroide können die SHBG-Expression stimulieren, wobei jedoch keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht (Caldwell 2002).

In vielen bisherigen Überlegungen und Strategien zur Hormontherapie bei Männern wird SHBG lediglich als hinderliches Bindungsprotein betrachtet, das die therapeutische Gabe von Androgenen behindert und deren Wirkungsentfaltung im Zielgewebe hemmt. Diese Einordnung des SHBG erweist sich inzwischen als unzureichend.

6.6 Klinischer Ausblick

Lange Zeit galt das Myokard des Erwachsenen als ausdifferenziertes Gewebe, das nicht zur Regeneration und effektivem kompensatorischem Wachstum fähig schien. Jüngere Untersuchungen zeigten, dass Myozyten des adulten menschlichen Herzens zur Mitose fähig sind, und es unter krankhaften Bedingungen sogar noch zur Steigerung der Mitoseraten kommen kann (Kajstura et al. 1998).

Therapieansätze mit Stammzellen nach Myokardinfarkt erscheinen erfolgsversprechend (Kueth et al. 2004). In Tierversuchen konnte der positive Einfluss von Testosteron auf die Folgen einer Myokardischämie gezeigt werden (Callies et al. 2003, Nahrendorf et al. 2003). Das menschliche Herzmuskelgewebe wird in Zukunft möglicherweise zunehmend als Wachstumsgewebe angesehen und damit Ziel medikamentöser Therapieversuche der Wachstumsförderung werden. Ähnlich den Überlegungen und Hoffnungen der Arbeitsgruppe um Pugh (Pugh et al. 2004) könnten anabole Effekte der Androgene zur Steigerung der kardialen Leistungsfähigkeit führen, was man, etwas populär, als „Muskeldoping für das Herz“ bezeichnen könnte. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die oben angesprochene mögliche Teilungsfähigkeit der Kardiomyozyten. Diese könnte vielleicht

einmal den Schlüssel zu realem Muskelwachstum darstellen, das über die heute beobachtete Hypertrophie hinausginge.

Für diese hoffnungsvollen Therapieansätze wird es wichtig sein, die komplexen und bis jetzt nur unvollständig bekannten Wirkungsmechanismen der Steroidhormone, der steroidbindenden Proteine, wie dem SHBG und anderer beteiligter Faktoren weiter zu durchleuchten und zu verstehen. SHBG wird in den bisherigen klinisch-therapeutischen Überlegungen und Konzepten lediglich als im Blutplasma gelegener Störfaktor gesehen, der eine Steigerung Hormondosis erfordert, um den Anteil des freien, biologisch wirksamen Hormons zu erhöhen. Durch den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis des in Kardiomyozyten lokalisierten SHBG zeigt sich, dass dieses Modell auch am menschlichen Herzen die hormonellen Wirkungsgefüge nicht ausreichend erklärt.

Von den im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Überlegungen und neu aufgetauchten Fragen ausgehend ergaben sich weitere Fragestellungen. Denkbar wären weiterführende funktionelle Untersuchungen an Tiermodellen zu SHBG- und Steroidhormonwirkungen im Myokard. Größere Fallzahlen und Gewebeproben wären auch notwendig, um die hier gemachten Beobachtungen der Androgenrezeptorverteilung im Myokard näher zu untersuchen und mögliche Zusammenhänge zu klinischen Parametern der Patienten zu erkennen.

7 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals SHBG in menschlichen Kardiomyozyten nachgewiesen. Der Nachweis des Proteins SHBG als intrazellulärer Bestandteil von menschlichen Kardiomyozyten wurde zuvor noch nicht erbracht. In meinen Untersuchungen wurde SHBG erstmals aus menschlichem Myokard mittels Affinitätschromatographie isoliert und die entsprechende Proteinfraction massenspektrometrisch nachgewiesen. Des Weiteren konnte die Lokalisation immunhistochemisch dargestellt und die zumindest teilweise intrinsische Herkunft des SHBG mittels In-Situ-Hybridisierung der entsprechenden mRNA belegt werden.

Damit wurde gezeigt, dass SHBG im hochspezialisierten Funktionsgewebe der Kardiomyozyten exprimiert wird und im Zytoplasma lokalisiert ist.

Die vorliegende Arbeit gibt einen weiteren Hinweis auf die vielfältigen Funktionen des Proteins SHBG, denen die bis vor wenigen Jahren herrschenden Vorstellungen nicht gerecht werden.

Funktionelle Bedeutung und Wirkungsmechanismen des SHBG in Kardiomyozyten sind bislang nicht geklärt. Sie werden in weiteren Studien zu untersuchen sein, zu denen diese Arbeit Anstoß geben könnte.

SHBG und AR sind im Zytoplasma der Kardiomyozyten kolokalisiert. Aus der vorliegenden Arbeit lassen sich die Ursachen und möglichen Bedeutungen dieser Beobachtung noch nicht beantworten.

Ein zunächst vermuteter Zusammenhang zwischen erniedrigten Testosteronspiegeln und verminderter Anfärbbarkeit des Androgenrezeptors in Myokardbiopsien konnte nicht gezeigt werden. Innerhalb der Biopsien fiel eine große Streubreite der unterschiedlichen Anfärbung des AR in den einzelnen Myozyten auf. Diese Beobachtung scheint auf eine unterschiedliche hormonelle Situation der einzelnen benachbarten Zellen hinzudeuten.

Zusammenhänge zwischen Anfärbbarkeit des AR in den biopsierten Kardiomyozyten und Ejektionsfraktion, Virusnachweis oder Patientenalter waren nicht zu erkennen. Unter Umständen wäre hierfür eine Untersuchung an einer größeren Patientengruppe mit Erhebung weiterer Parameter notwendig.

Die bei zwei Biospien mit sehr hohen Testosteronspiegeln beobachtete herabgesetzte Anfärbbarkeit des AR könnte sich mit der in anderen Geweben beschriebenen verminderten AR-Expression bei hohen Testosteronspiegeln decken. Dies könnte in weiterführenden Studien verifiziert werden.

Zur Klärung dieser Fragestellungen werden weitere Untersuchungen notwendig sein. Interessant wären hierfür beispielsweise funktionelle Untersuchungen am Tiermodell, die therapeutische und supratherapeutische Dosierungen von Steroidhormonen beinhalten. Diese würden es ermöglichen, die Wirkungsmechanismen des SHBG und der Steroide im Myokard experimentell zu beeinflussen, sowie invasive Messungen und Gewebeentnahmen durchzuführen.

8 Literaturverzeichnis

- Bardin CW, Gunsalus GL, Musto NA, Cheng CY, Reventos J, Smith C, Underhill DA, Hammond G. 1988. Corticosteroid binding globulin, testosterone-estradiol binding globulin, and androgen binding protein belong to protein families distinct from steroid receptors. *J Steroid Biochem*, 30 (1-6):131-139.
- Becchis M, Sullivan PM, Ordroneau 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.
- Berchem GJ, Bosseler M, Sugars LY, Voeller HJ, Zeitlin S, Gelmann EP. 1995. Androgens induce resistance to bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*, 55 (4):735-738.
- Blue JG, Lombardo JA. 1999. Steroids and steroid-like compounds. *Clin Sports Med*, 18 (3):667-689, ix.
- Bocchinfuso WP, Hammond GL. 1994. Steroid-binding and dimerization domains of human sex hormone-binding globulin partially overlap: steroids and Ca²⁺ stabilize dimer formation. *Biochemistry*, 33 (35):10622-10629.
- Bocchinfuso WP, Ma KL, Lee WM, Warmels-Rodenhiser S, Hammond GL. 1992. Selective removal of glycosylation sites from sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *Endocrinology*, 131 (5):2331-2336.
- Busch H-J. 2001. Apoptosemarker in Kardiomyozyten; Eine immunhistochemische Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit Enterovirus-assoziiierter dilatativer Kardiomyopathie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Caldwell JD. 2002. A sexual arousability model involving steroid effects at the plasma membrane. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (1):13-30.
- Caldwell JD, Hofle 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.
- Callies F, Stromer H, Schwinger RH, Bolck B, Hu K, Frantz S, Leupold A, Beer S, Allolio B, Bonz AW. 2003. Administration of testosterone is associated with a reduced susceptibility to myocardial ischemia. *Endocrinology*, 144 (10):4478-4483.
- Cato AC, Nestl A, Mink S. 2002. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*, 2002 (138):RE9.
- Coffey RN, Watson RW, O'Neill AJ, Mc Eleny K, Fitzpatrick JM. 2002. Androgen-mediated resistance to apoptosis. *Prostate*, 53 (4):300-309.

- Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. 1981. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 53 (1):58-68.
- Eckardstein SV, Nieschlag E. 2000. Therapie mit Sexualhormonen beim alternden Mann. *Dt Ärzteblatt*, 47:2372-2376.
- Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremner WJ, McKinlay JB. 2002. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87 (2):589-598.
- Ferrera PC, Putnam DL, Verdile VP. 1997. Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology*, 88 (2):218-220.
- Fisher DA, Nelson JC. 2001. Endocrine Testing. In: DeGroot LJ, Jameson JL, Hrsg. *Endocrinology*. 3te Aufl. London: Saunders, 2574-2600.
- Fortunati N. 1999. Sex hormone-binding globulin: not only a transport protein. What news is around the corner? *J Endocrinol Invest*, 22 (3):223-234.
- 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.
- Gapstur SM, Gann PH, Kopp P, Colangelo L, Longcope C, Liu K. 2002. Serum androgen concentrations in young men: a longitudinal analysis of associations with age, obesity, and race. The CARDIA male hormone study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11 (10 Pt 1):1041-1047.
- Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. 2000. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *Embo J*, 19 (4):504-512.
- Guerra S, Leri A, Wang X, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Kajstura J, Anversa P. 1999. Myocyte death in the failing human heart is gender dependent. *Circ Res*, 85 (9):856-866.
- Hammond GL, Bocchinfuso WP. 1996. Sex hormone-binding globulin: gene organization and structure/function analyses. *Horm Res*, 45 (3-5):197-201.
- Heinlein CA, Chang C. 2002. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol*, 16 (10):2181-2187.
- 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.
- Hickson RC, Galassi TM, Kurowski TT, Daniels DG, Chatterton RT, Jr. 1984. Androgen and glucocorticoid mechanisms in exercise-induced cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*, 246 (6 Pt 2):H761-767.

- 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.
- Jeppesen LL, Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS, Winther K. 1996. Decreased serum testosterone in men with acute ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16 (6):749-754.
- Jirikowski GF, Ramalho-Ortigao JF, Lindl T, Seliger H. 1989. Immunocytochemistry of 5-bromo-2'-deoxyuridine labelled oligonucleotide probes. A novel technique for in situ hybridization. *Histochemistry*, 91 (1):51-53.
- Jirikowski GF, Ramalho-Ortigao JF, Kesse KW, Bloom FE. 1990. In situ hybridization of semithin Epon sections with BrdU labelled oligonucleotide probes. *Histochemistry*, 94 (2):187-190.
- Joseph DR. 1994. Structure, function, and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam Horm*, 49:197-280.
- Joseph DR, Lawrence W. 1993. Mutagenesis of essential functional residues of rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Mol Endocrinol*, 7 (4):488-496.
- 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. 1991. Complex structure and regulation of the ABP/SHBG gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 40 (4-6):771-775.
- Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. 2002. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. *J Endocrinol*, 175 (1):113-120.
- Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. 1998. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (15):8801-8805.
- Kamischke A, Nieschlag E. 1997. Testes. In: Meng W, Ziegler R, Hrsg. *Endokrinologie: Grundlagen-Klinik-Praxis*. 1te Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag, 356f.
- Kato T, Horton R. 1968. Studies of testosterone binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 28 (8):1160-1168.
- Kennedy MC, Lawrence C. 1993. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust*, 158 (5):346-348.
- Kontoleon PE, Anastasiou-Nana MI, Papapetrou PD, Alexopoulos G, Ktenas V, Rapti AC, Tsagalou EP, Nanas JN. 2003. Hormonal profile in patients with congestive heart failure. *Int J Cardiol*, 87 (2-3):179-183.

- Kueth F, Figulla HR, Voth M, Richartz BM, Opfermann T, Sayer HG, Krack A, Fritzenwanger M, Hoffken K, Gottschild D, Werner GS. 2004. [Mobilization of stem cells by granulocyte colony-stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr*, 129 (9):424-428.
- Löffler G. 1998. Transkription und posttranskriptionale Prozessierung der RNA. In: Löffler G, Petrides PE, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6te Aufl. Berlin: Springer, 255ff.
- Lotze U, Egerer R, Tresselt C, Gluck B, Dannberg G, Stelzner A, Figulla HR. 2004. Frequent detection of parvovirus B19 genome in the myocardium of adult patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 193 (2-3):75-82.
- Lotze U, Busch HJ, Aschoff A, Gluck B, Sigusch H, Jirikowski G, Stelzner A, Figulla HR. 2001. Damaged myocytes as detected by the colocalization of DNA fragmentation and tissue transglutaminase and their prognostic significance in enterovirus-associated dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest*, 31 (9):744-755.
- Lukas SE. 1993. Current perspectives on anabolic-androgenic steroid abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 14 (2):61-68.
- Maisch B. 1998. [Classification of cardiomyopathies according to the WHO/ISFC Task Force--more questions than answers?]. *Med Klin*, 93 (4):199-209.
- Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. 1998. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*, 98 (3):256-261.
- Nahrendorf M, Frantz S, Hu K, von zur Muhlen C, Tomaszewski M, Scheuermann H, Kaiser R, Jazbutyte V, Beer S, Bauer W, Neubauer S, Ertl G, Allolio B, Callies F. 2003. Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovasc Res*, 57 (2):370-378.
- Nakhla AM, Rosner W. 1996. Stimulation of prostate cancer growth by androgens and estrogens through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. *Endocrinology*, 137 (10):4126-4129.
- Noe G. 1999. Sex hormone binding globulin expression and colocalization with estrogen receptor in the human Fallopian tube. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 68 (3-4):111-117.
- Noutsias M, Pauschinger M, Kuhl U, Schultheiss HP. 2002. [Myocarditis and dilated cardiomyopathy. New methods in diagnosis and therapy]. *MMW Fortschr Med*, 144 (14):36-40.
- Olbrich HG. 2001. [Epidemiology-etiology of dilated cardiomyopathy]. *Z Kardiol*, 90 Suppl 1:2-9.
- Ottenweller JE, Tapp WN, Creighton D, Natelson BH. 1988. Aging, stress, and chronic disease interact to suppress plasma testosterone in Syrian hamsters. *J Gerontol*, 43 (6):M175-180.

- Pugh PJ, Jones RD, West JN, Jones TH, Channer KS. 2004. Testosterone treatment for men with chronic heart failure. *Heart*, 90 (4):446-447.
- Quarmby VE, Yarbrough WG, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. 1990. Autologous down-regulation of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol*, 4 (1):22-28.
- Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O'Connell J, Olsen E, Thiene G, Goodwin J, Gyarfas I, Martin I, Nordet P. 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation*, 93 (5):841-842.
- Rosenbaum W, Christy NP, Kelly WG. 1966. Electrophoretic evidence for the presence of an estrogen-binding beta-globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 26 (12):1399-1403.
- Rosner W. 2001. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab*, 86 (6):2903.
- Rosner W, Hryb DJ, Khan MS, Nakhla AM, Romas NA. 1999. Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69 (1-6):481-485.
- Sabbah HN. 2001. Apoptosis in heart failure: a real problem? *Cardiovasc Drugs Ther*, 15 (6):525-528.
- Schönberger J, Zimmer M, Ertl G. 2004. Genetik der dilatativen Kardiomyopathie. *Dtsch Ärzteblatt*, 101:A 1099-1105.
- Sigusch HH, Reinhardt D, Figulla HR. 1998. [Clinical picture and differential diagnosis of cardiomyopathy and myocarditis]. *Med Klin*, 93 (4):236-239.
- Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ. 1998. The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis*, 41 (1):1-15.
- Sullivan PM, Wang YM, Joseph DR. 1993. Identification of an alternate promoter in the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene that regulates synthesis of a messenger RNA encoding a protein with altered function. *Mol Endocrinol*, 7 (5):702-715.
- Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper GG, Jenster G, Berrevoets C, Claassen E, van Rooij HC, Trapman J, Brinkmann AO, Mulder E. 1990. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem Biophys Res Commun*, 173 (2):534-540.
- Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. 1999. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (10):3666-3672.

- Verzola D, Gandolfo MT, Salvatore F, Villaggio B, Gianiorio F, Traverso P, Deferrari G, Garibotto G. 2004. Testosterone promotes apoptotic damage in human renal tubular cells. *Kidney Int*, 65 (4):1252-1261.
- von Eggeling F, Davies H, Lomas L, Fiedler W, Junker K, Claussen U, Ernst G. 2000. Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Biotechniques*, 29 (5):1066-1070.
- Wartenberg H. 1997. Herzmuskulatur. In: Bucher, Hrsg. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 12te Aufl. Bern: Verlag Hans Huber, 151ff.
- Wolf PD, Hamill RW, McDonald JV, Lee LA, Kelly M. 1985. Transient hypogonadotropic hypogonadism caused by critical illness. *J Clin Endocrinol Metab*, 60 (3):444-450.
- Zaugg M, Jamali NZ, Lucchinetti E, Xu W, Alam M, Shafiq SA, Siddiqui MA. 2001. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. *J Cell Physiol*, 187 (1):90-95.
- Zhou ZX, Wong CI, Sar M, Wilson EM. 1994. The androgen receptor: an overview. *Recent Prog Horm Res*, 49:249-274.

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1:	Semidünnschnitt durch eine Myokardbiopsie in Methylen-Blau-Färbung.....	4
Abb. 2:	Synthesewege des Testosterons.....	9
Abb. 3:	Schematischer Aufbau des AR als typisches Mitglied der Familie der Steroidrezeptoren.....	11
Abb. 4:	Wirkungswege der intrazellulären Testosteronwirkung.....	12
Abb. 5:	Wirkung des SHBG-Steroid-Komplexes am zellmembranassoziierten Rezeptor.....	17
Abb. 6:	Verteilung der Gesamttestosteronwerte.....	31
Abb. 7:	Massenspektrometrische Untersuchung des mittels des SHBG-Antikörpers aus menschlichem Myokard isolierten Proteins.....	32
Abb. 8:	Myozyten in SHBG-Färbung.....	36
Abb. 9:	Myozyten in SHBG-Färbung Biopsie 1.....	37
Abb. 10:	AR-Färbung.....	40
Abb. 11:	AR-Färbung Biopsie 12.....	41
Abb. 12:	AR-Färbungen Biopsien 10 und 11.....	42
Abb. 13:	Kolokalisation von SHBG und AR.....	44
Abb. 14:	Kolokalisation von SHBG und AR im Zytoplasma.....	45
Abb. 15:	In-Situ-Hybridisierung für SHBG Biopsie 17.....	46
Abb. 16:	In-Situ-Hybridisierung für SHBG, SHBG- und AR-Färbung in einem Kardiomyozyten aus Biopsie 16.....	47
Tab. 1:	Übersicht über die Daten der in die Untersuchung aufgenommenen Biopsien.....	26
Tab. 2:	Ermittlung der Gesamttestosteronwerte in Zusammenhang mit den übrigen zur Verfügung stehenden Biopsiedaten.....	30

Herzlichen Dank!

Besonders herzlich möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. G. F. Jirikowski danken, der mir die Möglichkeit geboten hat, in seiner Abteilung diese Promotionsarbeit zu erstellen.

Er war jederzeit zur Hilfestellung bereit, für seine Mitarbeiter stets ansprechbar und half in seiner unkomplizierten Art auch in Zeiten des Zweifels. Er begegnete meinen vielfältigen Interessen in Studium, Natur und Freizeit mit einer großen Geduld, die weit über das selbstverständliche Maß hinausging.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Zsófia Herbert, die mir bei zahlreichen Fragen und Problemstellungen eine große Hilfe war.

Des weiteren gilt mein Dank den Mitarbeitern der Klinik für Innere Medizin I unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. R. Figulla sowie dem damaligen Oberarzt PD Dr. U. Lotze für die Bereitstellung der Biopsien und der Arbeitsgruppe um Dr. Pavec, Jenapharm, für die Bestimmung der Testosteronspiegel.

Danken möchte ich auch der medizinisch-technischen Mitarbeiterin Frau E. Schönfeld für die Arbeit am Mikrotom und die Einweisung in die immunhistochemischen Färbetechniken.

Heidi Beinhauer und Derek Ott danke ich für ihr hilfreiches Lektorat der Arbeit.

Selbstverständlich gilt mein Dank auch allen hier nicht genannten, die zu dieser Arbeit durch Hilfe, Rat oder Verständnis beigetragen haben.

Danken möchte ich auch meiner Familie und meiner Freundin Nora Janoschek dafür, dass sie mich ohne Promotion nicht minder lieben und schätzen würden.

Henning Schock

LEBENS LAUF

Name: Henning Wolfgang Schock
Anschrift: Allee 10
74336 Brackenheim
Geburtsdatum: 23.09.1976 in Filderstadt
Familienstand: ledig

1983-1987 Besuch der Grundschule in Brackenheim
1987-1996 Besuch des Zabergäu-Gymnasiums Brackenheim
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife
Juli 1996 - Juli 1997 Zivildienst im Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes
Ludwigsburg
Seit September 1997 Tätigkeit als Aushilfskraft im Rettungsdienst Ludwigsburg
Oktober 1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
September 1999 Physikum
Februar-März 2000 Famulatur in der Abteilung für Anästhesie des Krankenhauses
Dinkelsbühl
August 2000 Erstes Staatsexamen
November 2000 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. G. F. Jirikowski, Institut für
Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Februar-März 2001 Famulatur in einer Radiologischen Gemeinschaftspraxis
August 2001 Famulatur in der Abteilung für Unfallchirurgie des
Krankenhauses Bietigheim-Bissingen
2001-2002 Tätigkeit als Tutor im Institut für Anatomie II der FSU Jena
März 2002 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des Loretto-
Krankenhauses in Freiburg im Breisgau
März 2003 Zweites Staatsexamen
April-August 2003 PJ-Tertial Anästhesie FSU Jena
August-November 2003 PJ-Tertial Chirurgie Krankenhaus Altenburg
Dezember 2003 - März 2004 PJ-Tertial Innere Medizin in der Abteilung für Angiologie,
Inselspital Bern
Seit April 2004 Vorbereitung auf das dritte Staatsexamen

Jena, 17. Juli 2004

Henning Wolfgang Schock

Ehrenwörtliche Erklärung

Henning Wolfgang Schock

Allee 10

74336 Brackenheim

Hiermit erkläre ich, Henning Wolfgang Schock, 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. G. F. Jirikowski, Dr. Z. Herbert,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,

Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

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

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

Jena, 17. Juli 2004

Henning Wolfgang Schock