Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 177-179

Analyse van steroïdhormonen en valkuilen op de weg naar mannelijkheid

F.H. de JONG*

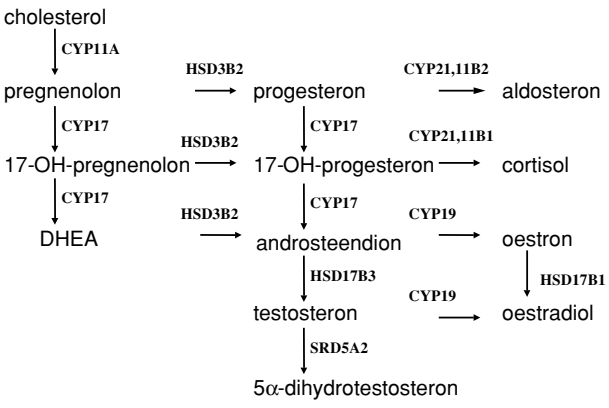
De biosynthese van steroïden uit cholesterol leidt tot de productie van verschillende hormonen, die aan de hand van hun effecten op specifieke receptoren kunnen worden ingedeeld als progestagenen, mineralocorticoïden, glucocorticoïden, androgenen en oestrogenen. Meer dan 10 verschillende enzymen en co-enzymen spelen een rol in deze biosynthese (figuur 1). Wanneer één van deze factoren onvoldoende werkzaam is, kunnen ernstige defecten in de productie van testosteron en daardoor in de vroege seksuele differentiatie optreden.
Tot voor kort werd, wanneer een dergelijk defect werd vermoed, een diagnose gesteld op basis van gemeten hormoonspiegels en spiegels van hormoonvoorlopers in het bloed. Door gebruik te maken van moleculair-biologische methoden blijkt een meer verfijnde diagnostiek mogelijk, waarbij verdere opheldering van de oorzaak van het klinisch beeld mogelijk is (1-3). In het volgende worden enkele voorbeelden aangegeven van mutaties in de enzymsystemen, die de biosynthese van androgenen mogelijk maken en de effecten daarvan in genotypisch mannelijke indidividuen.

Methodes

De patiënt
Defecten in androgeensynthese leiden tot afwijkende ontwikkeling van de genitalia externa, waarbij variaties van totaal vrouwelijk fenotype (totale afwezigheid van virilisatie) tot geringe mate van ondervirilisatie (micropenis, hypospadie) kunnen optreden. Een soortgelijk spectrum van afwijkingen kan veroorzaakt worden door mutaties in de androgeenreceptor. Daarom is het belangrijk in een vroeg stadium van de diagnostiek het onderscheid tussen deze twee oorzaken van ondervirilisatie te maken. De meest effectieve manier om een receptordefect op het spoor te komen is gebruik te maken van het feit, dat androgenen de productie van het sexhormoon-bindend globuline (SHBG) onderdrukken. Kortdurend toedienen van androgenen moet dus bij normale androgeengevoeligheid leiden tot een verlaging van de SHBG-concentratie in het bloed (4).

De steroïdbepaling
Het is, vooral na de postnatale piek van de testosteronconcentratie in het serum bij prepuberale jongens, lastig een defect in androgeenbiosynthese vast te stellen aan de hand van testosteronspiegels. De bestaande analysemethoden laten eigenlijk niet toe niveaus beneden de 0,5 nmol/l te meten en het gebruik van analyseautomaten heeft hier tot nu toe geen verbetering in gebracht. Dat betekent dat het bij deze groep patiënten noodzakelijk is de niveaus van testosteron en de voorlopersteroïden androsteendion, 17-hydroxyprogesteron en progesteron te meten na stimulatie van de testiculaire steroïdproductie met humaan choriongonadotropine (HCG). Tijdens of na de puberteit, vast te stellen door het vinden van verhoogde concentraties van LH en FSH in het serum, volstaat het meten van basale spiegels van deze steroïden meestal.

Het vaststellen van het defect
Op grond van de steroïdspiegels is het mogelijk een waarschijnlijkheidsdiagnose te stellen. Om deze diagnose te bevestigen, is het noodzakelijk het defect in het gen, dat codeert voor het betreffende enzym, vast te stellen. Dit is mogelijk door het amplificeren van de sequentie van het DNA, dat uit bloedcellen gewonnen kan worden, met behulp van geschikte primers en de polymerase-kettingreactie (PCR). Wanneer een eerder beschreven mutatie wordt gevonden, waarbij het defect door middel van transfectie van de gemuteerde sequentie en de onwerkzaamheid van het uit deze sequentie geproduceerde enzym kan worden aangetoond, is hiermee het probleem opgelost. Wanneer dit echter niet het geval is, moet op deze manier worden aangetoond, dat inderdaad sprake is van een verandering in de aminozuurvolgorde, waardoor de enzymactiviteit wordt aangetast.



Figuur 1. Steroïdbiosynthese en de genen die coderen voor enzymen die daarin een rol spelen. CYP: cytochroom P450, HSD: hydroxysteroïddehydrogenase, SRD: steroïdreductase.

**Endocrinologisch Laboratorium, Afd. Inwendige Geneeskunde, Erasmus MC, Rotterdam*

Resultaten

Defecten in de biosynthese van testosteron kunnen veroorzaakt worden door mutaties van ieder van de betrokken enzymen (figuur 1). Defecten van de enzymen in de biosynthese van progesteron (cholesterolzijketen-afsplitsend enzym, het cholesteroltransporteiwit StAR, 3β-hydroxysteroïd-dehydrogenase (3β-HSD)) beïnvloeden ook de biosynthese van aldosteron en cortisol, en zullen daardoor geen geïsoleerde effecten op de biosynthese van geslachtshormonen hebben. Dit ligt anders bij de enzymen 17-hydroxylase/17,20-lyase, cytochroom B5, 17β-hydroxysteroïd-dehydrogenase en 5α-reductase, die in het volgende besproken zullen worden. Tenslotte zullen mutaties die de LH-receptor onwerkzaam maken, door afwezigheid van stimulatie van testiculaire steroïdogenese, leiden tot afwezigheid van testosteron en dus van vermannelijking.

17-hydroxylase/17,20-lyase

Het enzym, dat de 17-hydroxylering van pregnenolon en progesteron en daarna de afsplitsing van C20 en C21 van het steroïdskelet katalyseert wordt gecodeerd door het CYP17-gen. Mutaties in dit gen kunnen leiden tot een totale afwezigheid van activiteit van het enzym, of tot een geïsoleerde uitval van de lyaseactiviteit. Voor de 17-hydroxyleringsreactie worden de benodigde elektronen geleverd door het cytochroomP450-oxidoreductase, dat ook een rol speelt in de andere steroïdhydroxyleringsreacties. De elektronen, die nodig zijn voor de lyase reactie zijn afkomstig van cytochroom B5 (5). Dit betekent, dat bij mutaties in de delen van het enzym die verantwoordelijk zijn voor binding van het oxidoreductase of het substraat, een gecombineerde uitval van beide enzymactiviteiten zal worden gevonden. Bij een mutatie in het deel van het eiwit, dat een interactie aangaat met het cytochroom B5 is de lyaseactiviteit gecompromitteerd, terwijl de hydroxylaseactiviteit aanwezig kan blijven.

Dit differentiële effect wordt geïllustreerd aan de hand van de patiënten waarvan de serumsteroïdspiegels zijn weergegeven in tabel 1 (3). Patiënt 1 bleek compound heterozygoot voor een mutatie in het steroïdbindende domein van het enzym (F114V) en een 4-baseparen-deletie in exon 8 te zijn. Van deze laatste mutatie, die ook bekend is als de Mennonieten-mutatie, is bekend dat hij het enzym onwerkzaam maakt (6). Ondanks sterk verhoogde spiegels van LH en FSH waren de plasmaconcentraties van 17-hydroxyprogesteron, androsteendion en testosteron nauwelijks of niet detecteerbaar. De lage basale cortisolconcentratie bleek niet te reageren op het toedienen van ACTH. Bij patiënt 2 werden een mutatie in het domein dat interactie aangaat met cytochroom B5 (R347C) en de Mennonieten-mutatie gevonden (3). Stimulatie met ACTH bracht een geringe verhoging van 17-hydroxyprogesteron en cortisol teweeg, terwijl de spiegels van androsteendion en testosteron sterk verlaagd bleven.

Tabel 1. Concentraties van gonadotropines (IU/l) en steroïden (nmol/l) in het serum van 2 genotypisch mannelijke patiënten met een mutatie in CYP17

	Patiënt 1 (17 jaar, F114V)		Patiënt 2 (28 jaar, R347C)	
	basaal	na ACTH	basaal	na ACTH
LH	107	10,6		
FSH	38	37,3		
progesteron	14,5	14,9	6,1	12,2
17-hydroxyprogesteron	0,3	0,3	1,9	2,4
androsteendion	<0,1	<0,1	0,6	0,5
testosteron	<0,2	<0,2	0,1	
cortisol	220	240	232	285

17β-hydroxysteroïddehydrogenase (17β-HSD)

Van het enzym 17β-HSD is een vijftal iso-enzymen bekend (7). Mutaties in 17β-HSD type 3, dat gelokaliseerd is in de testis en de omzetting van androsteendion naar testosteron katalyseert, leiden tot hetzelfde fenotype, dat ook bij CYP17-mutaties gevonden wordt. Bij deze patiënten wordt onder stimulatie met endogeen LH of exogeen HCG een verlaagde testosteron/androsteendion-verhouding gevonden.

5α-reductase

Ook van het 5α-reductase zijn meerdere iso-enzymen bekend. Defecten van het 5α-reductase, type 2, leiden tot te lage prenatale productie van 5α-dihydrotestosteron (DHT), en daardoor tot afwezigheid van virilisatie en een vrouwelijk fenotype. Na de puberteit treedt een sterke door LH gestimuleerde stijging van de testosteronproductie op, gevolgd door omzetting van dit testosteron naar DHT door het andere, niet gemuteerde type 5α-reductase en daardoor hirsutisme en virilisatie (8). Preliminaire diagnostiek van deze enzymstoornis kan worden verkregen door het meten van de verhouding tussen de spiegels van DHT en testosteron voor en na stimulatie met HCG.

LH-receptormutaties

Van een aantal mutaties in het LH-receptor gen is beschreven, dat hierbij een verlies van testosteronproductie en dus van virilisatie optreedt. Bij deze patiënten wordt een volledig normale steroïdbiosynthese in de bijnier gevonden, terwijl na stimuleren met HCG geen respons aanwezig is (9).

Conclusies

Op de beschreven wijze is het mogelijk gebleken bij een aantal patiënten duidelijkheid te verkrijgen over het onderliggend defect in de steroïdbiosynthese. Merkwaardig is, dat het in de meerderheid van de gevallen om XY-individuen met onvoldoende virilisatie gaat, terwijl geen van de betreffende enzymen of cofactoren door genen op het X-chromosoom worden gecodeerd. Dit wijst erop, dat de diagnose enzymdefect in vrouwen nog relatief vaak wordt gemist.

Vraag is, of dezelfde conclusies niet ook getrokken zouden kunnen worden op grond van de al dan niet gestimuleerde steroïdconcentraties in het serum van de patiënten. In de praktijk blijkt, dat, met name door het grote aantal factoren dat betrokken is bij een cor-

recte biosynthese van steroïden, het vaststellen van de juiste diagnose alleen mogelijk is door vaststellen van de mutatie die verantwoordelijk is voor de afwijking. Onder deze omstandigheden leidt meten van de steroïdconcentraties alleen dus niet tot het kennen van het onderliggend defect.

Literatuur

1. Boehmer ALM, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJJ, Niermeijer MF, Andersson S, et al. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 4713-4721.
2. Boehmer ALM, Nijman RJ, Lammers BAS, Coninck SJF de, Hemel JO van, Themmen APN, et al. Etiological studies of severe or familial hypospadias. J Urol 2001; 165: 1246-1254.
3. Akker ELT van den, Koper JW, Boehmer ALM, Themmen APN, Verhoef-Post M, Timmerman MA, et al. Differential inhibition of 17α-hydroxylase and 17,20-lyase activities by three novel missense CYP17 mutations identified in patients with P450c17 deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87: 5714-5721.
4. Sinnecker GH, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, Kruse K. Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group. Eur J Pediatr 1997; 156: 7-14.
5. Geller DH, Auchus RJ, Miller WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. Mol Endocrinol 1999; 13: 167-175.
6. Imai T, Yanase T, Waterman MR, Simpson ER, Pratt JJ. Canadian Mennonites and individuals residing in the Friesland region of The Netherlands share the same molecular basis of 17 alpha-hydroxylase deficiency. Hum Genet 1992; 89: 95-96.
7. Andersson S, Moghrabi N. Physiology and molecular genetics of 17 β-hydroxysteroid dehydrogenases. Steroids 1997; 62: 143-147.
8. Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Sturla E. Androgens and the evolution of male-gender identity among male pseudohermaphrodites with 5α-reductase deficiency. N Engl J Med 1979; 300: 1233-1237.
9. Themmen APN, Martens JW, Brunner HG. Activating and inactivating mutations in LH receptors. Mol Cell Endocrinol 1998; 145: 137-142.

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 179-182

Neurosteroïden

E. R. de KLOET*

Jos Thijssen is een kenner van de hormoonhuishouding. Zo is hij bekend in de wereld van sport en doping, in de psychiatrie en uiteraard in de endocrinologie. Zo heb ik Jos ook leren kennen. Eerst in 1966 tijdens mijn training als student bij Organon. Jos ontmoette ik destijds bij mijn maandelijkse bezoeken aan het AZU-laboratorium van professor Marius Tausk, de directeur van Organon en hoogleraar Endocrinologie, die verantwoordelijk voor mijn stage was (zie Lequin en Thijssen, 2000). Vervolgens leerden wij elkaar beter kennen als jonge onderzoekers bij de FUNGO-werkgemeenschap Bijnierfunctie en tenslotte als collega's in de diverse geledingen van de Utrechtse faculteit geneeskunde en als medeorganisator van het VIIIth International Congress on Hormonal Steroids. Jos Thijssen is een leerling van Marius Tausk, een geleerde die van grote betekenis was voor de Nederlandse endocrinologie. Om deze reden is in Leiden de Marius Tausk Wisselleerstoel ingesteld, waarvoor jaarlijks een gerenommeerde endocrinoloog genomineerd wordt.

**Sectie Medische Farmacologie, LACDR/LUMC, Universiteit Leiden*

Intussen ontwikkelde zich de neuro-endocrinologie van stress, een gebied waarin mijn onderzoek sinds 1968 bij Organon onder leiding van Johan van der Vies en David de Wied begon. Mijn taak als promovendus was het *target* vast te stellen van corticosteroïdwerking in de hersenen. Dat begon met een simpel experiment en niemand kon vermoeden dat bij het afscheid van Jos Thijssen ruim dertig jaar onderzoek samengevat kon worden. Dat onderzoek heeft als centrale vraag hoe deze corticosteroïdwerking in de hersenen tot stand komt en wat de betekenis is voor aanpassing aan stress bij gezondheid en ziekte. En nu is het dan zo ver dat een antagonist van corticosteroïdwerking een potent antidepressivum blijkt te zijn voor een subgroep van depressieve patiënten (Belanoff et al., 2002). De corticosteroïd antagonisten zijn al na enkele dagen werkzaam. In feite gaat het hier over de eerste psychiatrische aandoening die op geleide van pathofysiologie een nieuw medicijn opleverde. Hoe dat in zijn werk is gegaan volgt nu.

Corticosteroïdfysiologie

Corticosteroïden betreffen het mineralocorticoïd hormoon aldosteron, dat de Na/K-balans bewaakt en de glucocorticoïdhormonen corticosteron (knaagdier en