

Genexpressiepatronen. Met SAGE en GeneChips zijn MR- en GR-responsieve netwerken van genen geïdentificeerd die neuronale plasticiteit in een diermodel voor depressie kunnen reguleren. Vragen: Hoe kan *remodelling* van synaptische contacten, celdood en neurogenese de pathogenese en het herstel van depressie bepalen? Zijn de nieuwe genen van belang voor 'target discovery' en validatie?

Diermodellen. In meer holistische benadering worden tegenwoordig gedragstaken geanalyseerd die simultaan emotionele en cognitieve processen betreffen, gecombineerd met elektrofysiologie. Vraag: hoe kunnen cognitieve processen leiden tot emotionele stoornissen die kenmerkend zijn voor depressie? Dit is van belang daar de snelwerkende GR-antagonisten met name via modulatie van een cognitieve input lijken te werken in plaats van op circuits betrokken bij emotie, zoals de traditionele langzaamwerkende mono-aminerge antidepressiva schijnen te doen.

Dankbetuiging

Dit werk kwam mede tot stand door financiële steun van NWO, EU, de Nederlandse Hartstichting en de ISAO het afgelopen decennium, en door jarenlang enthousiasme van de medewerkers van de Leidse sectie Medische Farmacologie in samenwerking met de Amsterdamse afdeling Neurobiologie.

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 182-185

Steroiden en meningeomen

M.A. BLANKENSTEIN*

Eind 1984 werden meningeomen aan het onderzoeksrepertoire van het Endocrinologisch Laboratorium van het AZU toegevoegd. Kort daarvoor was op deze intracraniale tumoren de aandacht van de endocrinologie gevestigd, omdat ze kenmerken van hormoonafhankelijke tumoren vertoonden. Zo komen ze beduidend vaker bij vrouwen voor dan bij mannen, verergeren de symptomen reversibel in perioden van relatieve progesteronovermaat zoals tijdens zwangerschap en in de 2^e helft van de menstruele cyclus en was er associatie beschreven tussen het voorkomen van meningeomen en mammacarcinoom. Bovendien bleken meningeomen rijk aan progesteronreceptoren (PR) te zijn (1). Gezien de reeds bij Jos Thijssen bestaande grote belangstelling voor alles wat met pro-

Literatuur

1. Belanoff JK, Rothschild AJ, Cassidy F, DeBattista C, Baulieu EE, Schatzberg, AA. Rapid reversal of psychotic major depression using C-1073 (Mifepristone). *Biol Psychiatry* 2002; 52: 386-392.
2. Datson NA, Perk J van der, Kloet ER de, Vreugdenhil E. Identification of corticosteroid responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur J Neuroscience* 2001; 14: 675-689.
3. Kloet ER de, Oitzl MS, Vreugdenhil E, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 1998; 19: 269-301.
4. Kloet ER de, Oitzl MS, Joëls M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 1999; 22: 422-426.
5. Joëls M. Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinology* 2001; 13: 657-669.
6. Lequin RM, Thijssen JHH. Marius Tausk (1902-1990), influential endocrinologist and producer of medicines: a retrospect to mark the centenary of his birth. *Ned Tijdschr Geneesk* 2002; 146: 327-330.
7. Meijer OC. Coregulator proteins and corticosteroid action in the brain. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 499-505.
8. Meijer OC, Lange ECM de, Breimer DD, Boer AG de, Workel JO, Kloet ER de. Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinol* 1998; 139: 1789-1793.
9. Oitzl MS, Reichardt H, Joëls M, Kloet ER de. Point mutation in the mouse glucocorticoid receptor preventing DNA binding impairs spatial memory. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 12790.

gestagenen van doen had en vooral met de relatie steroiden en kanker, is het niet verwonderlijk dat het onderzoek aan deze tumoren kon worden voortgezet toen ik naar Utrecht kwam. Het onderzoek heeft zich vervolgens redelijk rechtlijnig ontwikkeld en in de pas met de technologische ontwikkelingen.

Integriteit van de progesteronreceptor (PR) in meningeomen

Aanvankelijk hebben we veel aandacht moeten geven aan de "erkenning" van het progesteronbindend eiwit als receptor omdat er in de literatuur nogal wat bedenkingen waren geuit. Vooral de bevinding dat meningeomen veel PR, maar geen oestrogenreceptor (ER) bevatten, moest het ontgelden. Algemeen was immers bekend dat PR door oestrogenen via de ER werden geïnduceerd. Helaas konden we niet aan alle eisen, die er bestonden voor de toekenning van het predikaat "receptor" aan een bindend eiwit, voldoen. Hoewel in ons laboratorium zowel als elders aange- toond werd dat meningeomen een eiwit bevatten dat

**Klinische Chemie, Acad.Ziekenhuis der Vrije Universiteit, Amsterdam.*

In samenwerking met: S.G.A. Koehorst, F.M. Verheijen, G.H. Donker, H.M. Jacobs en M. Sprong. U.M.C. Utrecht.

in staat is progestagenen met hoge specificiteit en beperkte capaciteit te binden, bleek het onmogelijk om een eenduidig effect van progesteron op meningeomcellen (een waarneming die het pleit beslecht zou hebben) aan te tonen. De toevlucht moest dus worden gezocht tot indirecte bewijzen c.q. aanwijzingen en de verzameling daarvan is als een rode draad door het onderzoek heen geweest. Zo bleek de molmassa van het eiwit in kwestie vergelijkbaar met die van de progesteronreceptor uit humane uterus en gedroeg het zich elektroforetisch en op sucrosegradiënten identiek aan de PR. Toen antilichamen tegen de humane PR beschikbaar kwamen bleken die het meningeomeiwit ook te binden (2). Met de komst van moleculair-biologische bewijzen dat het eiwit inderdaad identiek is aan de humane PR is het pleit inmiddels beslecht.

Andere steröidreceptoren in meningeomen

Toen eenmaal duidelijk werd dat meningeomen inderdaad progesteronreceptoren bevatten, werd uiteraard ook de aanwezigheid van andere receptoren onderzocht. Aanvankelijk dacht men dat oestrogeenreceptoren ook aanwezig waren, maar andere groepen die zich bedienden van betere technieken (Scatchard plot-analyse in plaats van éénpuntsassays) konden de aanwezigheid van ER niet met zekerheid vaststellen. Uiteindelijk werd men het erover eens dat met de juiste technieken slechts in een beperkt aantal meningeomen en dan ook nog in lage concentratie ER konden worden aangetoond. Dus onze aanvankelijke hypothese dat meningeomen helemaal geen ER bevatten, konden wij met gevoeliger technieken niet handhaven. Feit bleef dat de verhouding ER/PR in meningeomen volstrekt anders was dan in uterus- of borstkankerweefsel. De cruciale vraag was natuurlijk of een zo kleine hoeveelheid ER voldoende was voor het bewerkstelligen van een biologisch effect. Helaas moeten we tot op de dag van vandaag het antwoord op deze vraag schuldig blijven.

De aanwezigheid van glucocorticoidreceptoren (GR) was al aangetoond voordat PR gevonden waren en wij hebben daaraan, behalve bevestiging verder geen onderzoek gedaan. Androgeenreceptoren daarentegen hebben we wel kort onderzocht omdat die in bindingsstudies met het synthetisch androgeen R-1881 (methyltriënonon) aantoonbaar leken. Het bleek echter dat PR verantwoordelijk waren voor het grootste deel van de met dit steröide waargenomen binding. Wanneer daar adequaat voor werd gecorrigeerd bleef een bescheiden bijdrage van de androgeenreceptoren over. Vijfentwintig procent van de meningeomen bleek een minimale hoeveelheid AR te bevatten. Voor ons waren de progesteronreceptoren, en met name de regulatie van de expressie ervan, interessanter, ook in relatie tot de mogelijkheid van het ontwikkelen van een endocriene therapie voor niet-operabele tumoren. Daarom werden verder alleen ER en PR bestudeerd.

PR in andere hersentumoren

Nadat de aanwezigheid van PR in meningeomen onomstotelijk was vastgesteld, is ook gekeken of andere hersentumoren dit eiwit ook tot expressie konden

brengen. In een serie van 36 hersentumoren konden we alleen in een tweetal neurinomen een bescheiden PR-expressie aantonen. Dit leidde ons tot de conclusie dat PR-expressie een voor meningeomen specifiek fenomeen was.

Effecten van progestagenen en antiprogestagenen op de groei van meningeomen

Zoals reeds hierboven genoemd waren experimenten om een direct effect van progestagenen op meningeomcellen aan te tonen in kweek niet succesvol. Onze eerste pogingen om primaire cultures van meningeomcellen te maken waren echter onverwacht succesvol, zeker wanneer we bedenken dat de meeste meningeomen goedaardige tumoren zijn die bovendien *in vivo* erg langzaam groeien. Er deed zich echter één probleem voor: de cultures verloren het vermogen om PR tot expressie te brengen. Hierdoor werden experimenten die tot doel hadden een effect van progesteron via die receptor te bewerkstelligen wel erg moeilijk. Om hieraan het hoofd te bieden werd een indirecte benadering toegepast, waarbij de meningeomcultures direct na de isolatie ervan werden behandeld met het antiprogestageen RU-486 (mifepristone) en werd de proliferatie, gemeten als thymidine-labellingindex (TLI) na een vrij korte periode gemeten. Hoewel deze benadering het aantal experimenten dat wij konden uitvoeren drastisch reduceerde, konden we toch aantonen dat de TLI door de behandeling met RU-486 significant afnam (3). Deze waarneming hebben we geïnterpreteerd als aanwijzing dat de progesteronreceptor in meningeomen functioneel is. Dat geen positief effect van progestagenen zelf kon worden aangetoond hebben we uitgelegd door de mogelijkheid dat de cellen door de cultuurcondities mogelijk al op een zodanige snelheid prolifererden dat verdere stimulatie niet meer mogelijk was, remming nog wel. Ook latere pogingen om middels alternatieve cultuurtechnieken (sferoiden) en toevoeging van groeifactoren aan het kweekmedium de achteruitgang van PR-expressie te verhinderen zijn zonder succes gebleven.

Autonome expressie van PR in meningeomen

De kennelijk autonome expressie van PR in meningeomen bleef in het centrum van onze belangstelling staan. De introductie van moleculair-biologische technieken op het laboratorium opende mogelijkheden voor een nadere analyse van deze waarneming. De hypothese die aan dit deel van het werk ten grondslag heeft gelegen was dat er alternatieve vormen van de oestrogeenreceptor bestaan, die door een mutatie niet meer in staat zijn hun ligand (oestradiol) te binden, maar die nog wel het vermogen tot signaaltransductie (lees: aanzetten tot PR-expressie) hebben behouden. Doordat dergelijke vormen het hormoon niet kunnen binden, kunnen zij ook niet met ligandbindingsassays worden aangetoond. Doordat de tegen de ER gegenereerde antilichamen die in immunometrische assays worden gebruikt vaak gericht zijn tegen het hormoonbindend domein van de receptor is het niet verwonderlijk dat ook met die technieken de ER niet kon worden aangetoond.

Gebaseerd op de hierboven geformuleerde hypothese werd gezocht naar het bestaan van ER-varianten en werd op mRNA een drietal varianten geïdentificeerd. Deze varianten misten respectievelijk exon 4, exon 5 en exon 7. De variant die exon 4 miste leek het meest geschikt om verder onderzoek te doen, maar bleek absoluut niet in verband gebracht te kunnen worden met PR-expressie omdat hij volstrekt inactief was in transfectie-experimenten (4). Voor de variant waarin exon 5 ontbrak was bij het mammacarcinoom aangetoond dat deze constitutieve activiteit bevat. Echter in meningeomen konden wij de aanwezigheid van deze variant niet in verband met PR-expressie brengen (5). Van de variant zonder exon 7, tenslotte, bleek uit de literatuur dat deze dominant negatief was, waarmee deze zich als kandidaat diskwalificeerde.

PR-isovormen en hun relatie met apoptose

Met de vorderingen die geboekt werden in het inzicht in het werkingmechanisme van steroïdhormonen werd ook duidelijk dat de PR in meer dan één vorm voorkwam. Er bleken zeker 2 vormen afgeschreven te worden van hetzelfde gen, PR-A en PR-B. Naast deze beide vormen bleek in meningeomen op zijn minst nog één andere isovorm voor te komen: een PR-vorm van ca. 78 kD werd door ons ook aangetoond. Was het al moeilijk om voor één PR aan te tonen dat er een effect mee te bereiken was, voor drie vormen werd het nog veel moeilijker. Het bleek dat hoe hoger de totale hoeveelheid PR, hoe hoger het percentage van de B-vorm. De 78-kD-PR-vorm in meningeomen zou heel goed een degradatieproduct van de B-vorm van PR kunnen zijn, aangezien een negatieve correlatie tussen de expressie van beide vormen werd aangetoond. Aangezien A en B verschillende effecten kunnen mediëren, zouden deze waarnemingen wel eens van fysiologische betekenis kunnen zijn (6).

Ook de oestrogenreceptor bleek in meer dan één vorm voor te komen. Hier ging het om ER- α , waarvan naast de native vorm, ook deletievarianten konden worden aangetoond. Evenals ER- α bleek ook de expressie van ER- α niet gerelateerd te zijn aan de expressie van PR.

In andere weefsels is de expressie van steroïdreceptoren gebleken verband te houden met de expressie van eiwitten betrokken bij apoptose. Omdat apoptose mogelijk een rol speelt bij de langzame groei van de tumoren *in vivo* en de ongeremde groei *in vitro* wel eens met een verstoring van het evenwicht te maken zou kunnen hebben, werd de expressie van bij apoptose betrokken eiwitten bestudeerd. Het proapoptotische bcl₂ en het anti-apoptotische bax werden inderdaad aangetroffen. De expressie van bcl₂ in meningeomen was omgekeerd evenredig met die van PR, terwijl de relatie in mammacarcinoom evenredig bleek te zijn. Bax-expressie was hoog in meningeoom, maar onafhankelijk van de expressie van steroïdreceptoren (7).

Het huidige model van het mechanisme waarlangs wij denken dat progestagenen hun invloed op meningeomen en mogelijk ook andere tumoren uitoefenen gaat uit van het duo PR-A en PR-B. PR-A kan als

suppressor van de effecten van PR-B fungeren. Het 'overall effect' van de blootstelling van een cel aan progestagenen en antiprogestagenen zal dan afhangen van de verhouding tussen PR-A en PR-B. Zo is het denkbaar dat in een tumor met veel PR-B behandeling met een antagonist leidt tot regressie van de tumor, terwijl in een tumor met verhoudingsgewijs meer PR-A behandeling met dezelfde antagonist juist tot tumorgroei kan leiden. Het beeld is duidelijk gecompliceerder geworden dan wij aanvankelijk hadden gedacht, zeker als de 78-kD-PR-isovorm ook nog in de discussie wordt betrokken (8).

Het doek valt, maar de speurtocht gaat door.

In het voorafgaande is 17 jaar werk aan een fascinerend onderwerp uiterst summier samengevat. Hoewel het werk aan de hormoongevoeligheid van meningeomen in Utrecht in 2001 werd beëindigd, blijft de interesse in de hormoongevoeligheid van deze tumoren elders prominent aanwezig. Behandeling van meningeomen met mifepristone (RU-486) is lange tijd beschouwd als veelbelovend. Ondanks positieve rapporten in de beginfase is de effectiviteit van deze vorm van medicamenteuze behandeling tot nu toe nog niet met de gewenste zekerheid vastgesteld. Het is bemoedigend te constateren dat andere groepen het onderzoek naar de rol van progesteronreceptoren in meningeomen voortzetten. De prognostische waarde van PR is inmiddels beschreven (9, 10) en de rol die progestagenen spelen in celgroei en apoptose wordt verder bestudeerd (11, 12). Uiteindelijk zal dit leiden tot de complete opheldering van de rol die progestagenen spelen in de etiologie van meningeomen en een moleculaire benadering van de behandeling van inoperabele meningeomen mogelijk maken.

Het was een voorrecht om zolang in dit spannende gebied werkzaam te mogen zijn. Ik dank Jos Thijssen voor zijn voortdurende belangstelling, stimulatie en steun.

Literatuur

1. Blankenstein MA, Blaauw G, Lamberts SWJ, Mulder E. Presence of progesterone receptors and absence of oestrogen receptors in human intracranial meningioma cytosols. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19: 365-370.
2. Blankenstein MA, Berns PMJJ, Blaauw G, Mulder E, Thijssen JHH. Search for oestrogen receptors in human meningioma tissue sections with a monoclonal antibody against the human estrogen receptor. *Cancer Res (Suppl)* 1986; 46: 4268S-4270S.
3. Blankenstein MA, Verlaet JW van 't, Croughs RJM. Hormone dependency of meningiomas. *Lancet* 1989; 1381.
4. Koehorst SGA, Cox JJ, Donker GH, Lopes da Silva S, Burbach JPH, Thijssen JHH, Blankenstein MA. Functional Analysis of an alternatively spliced estrogen receptor lacking exon 4 isolated from MCF-7 breast cancer cells and meningioma tissue. *Molec Cell Endocrinol* 1994; 101: 237-245.
5. Jacobs HM, Spriel AB van, Koehorst SGA, Thijssen JHH, Blankenstein MA. The truncated estrogen receptor alpha variant lacking exon 5 is not involved in progesterone receptor expression in human meningiomas. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1999; 71: 167-172.

6. Verheijen FM, Sprong M, Jacobs J, Donker TH, Amelink GJ, Thijssen JHH, Blankenstein MA. Progesterone receptor isoform expression in human meningiomas. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1488-1495.
7. Verheijen FM, Donker TH, Sprong M, Jacobs J, Sales Viera C, Blaauw G., Thijssen JHH, Blankenstein MA. Progesterone receptor, Bcl-2 and Bax expression in meningioma and breast cancer cytosol. *J Neuro-oncol* 2002; 56: 35-41.
8. Verheijen FM. Progesterone receptors in human meningiomas. *Academisch Proefschrift Universiteit Utrecht*, 2001.
9. Fewings PE, Battersby RD, Timperley WR. Long-term follow up of progesterone receptor status in benign meningioma: a prognostic indicator of recurrence? *J Neurosurg* 2000; 92: 401-405.
10. Strik HM, Strobelt I, Pietsch-Breitfeld B, Iglesias-Rozas JR, Will B, Meyermann R. The impact of progesterone receptor expression on relapse in the long-term clinical course of 93 benign meningiomas. *In Vivo* 2002; 6: 265-270.
11. Das A, Tan WL, Teo J, Smith DR. Overexpression of mdm2 and p53 and association with progesterone receptor expression in benign meningiomas. *Neuropathol* 2002; 22: 194-199.
12. Gursan N, Gundogdu C, Albayrak A, Kabalar ME. Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Int J Neurosci* 2002; 112: 463-470.

Ned Tijdschr Klin Chem 2003; 28: 185-187

Steroiden en gezelschapsdieren

H.C.A. RIJNBERK*

In het begin van de jaren zestig van de vorige eeuw ontstonden de eerste contacten tussen de destijds zo genoemde Kliniek voor Kleine Huisdieren van de Faculteit der Diergeneeskunde en de Afdeling Endocrinologie van de Faculteit der Geneeskunde. Die contacten kwamen vooral voort uit de behoefte aan endocriene diagnostiek bij gezelschapsdieren. Het begon met de diagnostiek voor schildklieraandoeningen. Wij zagen bij honden schildkliervergrotingen, maar hadden geen inzicht in de functionele betekenis daarvan. Bovendien werden honden behandeld met thyroxine, maar of die dieren ook werkelijk hypothyreoïdie hadden was niet duidelijk. De Afdeling Endocrinologie van de medische faculteit, geleid door de latere hoogleraar F. Schwarz, en in het bijzonder het daarbinnen vigerende schildklierlaboratorium onder leiding van de latere hoogleraar P.J. der Kinderen, hebben ons met raad en daad ter zijde gestaan bij de start van de schildklierdiagnostiek *in vivo* met ¹³¹I. De beide medische endocrinologen en hun medewerkers hebben steeds grote belangstelling getoond voor de ziektekundige problemen bij dieren. Deze interesse is voor ons een sterke stimulans geweest bij de ontrafeling van ziektebeelden. Een deel van deze gezamenlijke bevindingen is in een groot overzicht gepubliceerd, samen met onderzoekers van het Angell Memorial Animal Hospital in Boston (1).

Hyperfunctie van de bijnierschors

Zo ging het ook even later bij onze contacten met de latere hoogleraar J.H.H. Thijssen, toen het nieuwe

hoofd van het steroïdlaboratorium van de Afdeling Endocrinologie van de medische faculteit. Kort nadat de schildklierdiagnostiek op gang was gekomen, zagen we in onze kliniek een hond die we verdachten van het syndroom van Cushing. We klopten aan bij het nieuw gestarte steroïdlaboratorium en daar betraden we een voor ons totaal nieuwe wereld van uiterst moderne steroïddiagnostiek. Bovendien bleken zowel het nieuwe hoofd, de nu afscheid nemende Jos Thijssen, als ook zijn medewerkers zeer bereid om na te gaan of de voor de mens geïntroduceerde diagnostiek ook bij de hond toegepast zou kunnen worden.

We startten een onderzoek naar de bijnierschorsfunctie van de gezonde hond. Met de toen juist ingevoerde fluorimetrische methode (2), konden in hondenplasma fraai de concentraties aan 11 β -hydroxycorticosteroiden (11 β -OHCS, cortisol en corticosteron) worden gemeten. Niet bij elke gezonde hond werd een duidelijk dagritme van de plasmaconcentraties van 11 β -OHCS gevonden, zodat meting van de dagvariatie niet kon bijdragen aan de diagnostiek van hyperadrenocorticisme (syndroom van Cushing) (3). Ook werd duidelijk dat bepaling van 17-ketosteroiden in 24-uurs urine geen goede maat was voor de bijnierschorsfunctie. Meting van 17-hydroxycorticosteroiden (17-OHCS) in 24-uurs urine daarentegen bleek wel een zeer goede afspiegeling van de cortisolproductie te zijn. Met een in het Utrechtse laboratorium voor endocrinologie gemodificeerde methode werd ook een indruk gekregen van de productiesnelheid van cortisol (3, 4). Bepalingen van 17-OHCS in 24-uurs-urine en van basale waarden van 11 β -OHCS in plasma maakten het mogelijk om hyperadrenocorticisme als ziektebeeld bij de hond af te bakenen. Bovendien kon met

*Emeritus hoogleraar Geneeskunde van Gezelschapsdieren, R.U. Utrecht