

Summary

Clarification of the genetic background of inherited hyperbilirubinemia. Bosma P.J, Bakker CTM and Hoek F.J. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 11-17.

The uridine-diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) catalysed glucuronidation is an essential step in the excretion and detoxification of a large number of endogenous and exogenous compounds. These hydrophobic substrates are converted to hydrophilic conjugates by covalent binding to UDP-glucuronic acid (UDPGA). The UGT's are a multi gene family of membrane bound enzymes located in the endoplasmic reticulum (ER). The glucuronidation of bilirubin is physiologically very important, due to the large amount of this compound produced daily and its toxicity. Deficient bilirubin glucuronidation leads to high, toxic levels of unconjugated bilirubin, as is seen in the Crigler-Najjar syndrome. In man only UGT has activity towards bilirubin, while most other substrates are conjugated by several transferases. The bilirubin UDP-glucurono-

syltransferase (B-UGT) is encoded by the UGT1 gene. In addition to B-UGT this gene encodes several other transferases recognizing other substrates. These UGT's each have a unique aminotermus, containing the substrate bindings site, and a shared carboxy terminus, encoding the UDPGA bindings site and membrane insertion region. Since the isolation of the gene a number of mutations in Crigler Najjar patients have been identified. Recently, also the genetic background of Gilbert's syndrome, a mild form of inherited hyperbilirubinemia, was elucidated. This common inherited disorder is caused by an abnormality in the promoter region of B-UGT. Due to the presence of an additional TA in the TATAA box upstream of B-UGT1, the expression of this gene was only 20% of normal. This reduced expression of B-UGT is a prerequisite for Gilbert's syndrome but in addition other factors, like an increased bilirubin load, are required for its clinical presentation.

Key-words: bilirubin; glucuronosyltransferase; mutation analysis; Crigler-Najjar; Gilbert's syndrome.

Ned Tijdschr Klin Chem 1996: 21: 17-22

Autonome expressie van progestageenreceptoren in humane meningeomen: na vele jaren nog steeds een uitdaging

M.A. BLANKENSTEIN¹, S.G.A. KOEHORST^{1,4}, C.J.H. van der KALLEN¹, H.M. JACOBS¹, A.B. van SPRIEL¹, G.H. DONKER¹, J.W. van't VERLAAT², G. BLAAUW³ en J.H.H. THIJSEN¹

Meningeomen brengen op een oestrogeen-onafhankelijke wijze progestageenreceptoren (PR) tot expressie. Oestrogeenreceptoren (ER) zijn niet of nauwelijks aantoonbaar. De PR worden als functioneel actief aangemerkt, aangezien anti-progestagenen de groei-snelheid van gekweekte meningeoomcellen kunnen remmen en patiënten baat kunnen hebben bij behandeling met antiprogestagenen. In dit overzicht wordt het reeds vele jaren lopende onderzoek beschreven dat tot doel heeft het ER-negatieve/PR positieve fenotype van meningeomen te verklaren. Een eiwit dat in staat is aan het z.g. oestrogen responsive element (ERE) te binden werd met een band shift assay aangetoond. Voorts werden m.b.v. reverse transcriptase PCR mRNA's coderend voor diverse aberrante oestrogeenreceptoren geïdentificeerd. Tevens werd mRNA coderend voor de wild type ER aangetoond. Van de gevonden ER mutanten is er één dominant negatief (ERD7) en één inactief (ERD4), terwijl er één (ERD5) oestrogeen onafhankelijke transcriptieactiviteit heeft. Verder onderzoek is erop gericht te ontdek-

ken of het ERE-bindend eiwit door ERD5 wordt gecodeerd. Activering van andere signaaltransductiepathways, waarvan inmiddels een rol bij de PR synthese is gepostuleerd, leidde in meningeoomcellen niet tot verhoging van de PR concentratie. Dit zal leiden tot studies naar het promotor gebied van het PR gen.

Trefwoorden: steroidreceptoren, meningeomen, oestrogenen, progestagenen

Meningeomen zijn tumoren van de arachnoidale cellen van de hersenvliezen waarvan de meerderheid als histologisch benigne wordt geklassificeerd. Compressie van de hersenen maakt ze echter, afhankelijk van de locatie, potentiëel levensbedreigend. De primaire behandeling van meningeomen is chirurgisch, hetgeen in 68-80% van de gevallen curatief kan zijn. Meningeomen zijn relatief ongevoelig voor radio- en chemotherapie. Hoewel een adequate therapie voor recidiverende tumoren niet voorhanden is, kunnen patiënten langdurig overleven (1).

Meningeomen kunnen tot de potentiëel hormoongevoelige tumoren worden gerekend onder andere op grond van de epidemiologische waarnemingen dat de incidentie van meningeomen bij vrouwen ca. 3 maal zo hoog is als bij mannen (2) en de reversibele intensivering van symptomen tijdens zwangerschap en in de luteale fase van de menstruele cyclus (3).

In humane meningeomen komen progestageenreceptoren (PR) in hoge concentratie voor, terwijl oestrogeenreceptoren (ER) veelal niet of nauwelijks aantoonbaar zijn. In de zogenaamde "klassieke" doelwitweefsels

Afdelingen Endocrinologie¹ en Neurochirurgie², Academisch Ziekenhuis Utrecht; Afdeling Neurochirurgie De Wever Ziekenhuis, Heerlen³; Afdeling Klinische Chemie, Stichting Deventer Ziekenhuizen, Deventer⁴

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., januari 1995

Correspondentie: Dr. M.A. Blankenstein, Afdeling Endocrinologie, Academisch Ziekenhuis Utrecht G02.626, Postbus 85500; 3508 GA Utrecht.
Ingekomen: 26.07.95

voor oestrogenen zoals borstklier en uterus, wordt de synthese van progestageenreceptoren door oestrogenen gemedieerd. Het hier beschreven onderzoek had en heeft tot doel de reden voor deze schijnbare discrepantie te onthullen. De vraagstelling is daarbij tweeledig. Enerzijds ging het daarbij om de opheldering van het mechanisme van de PR synthese; anderzijds om de vraag of de receptoren in meningeomen ook klinische betekenis hebben.

MATERIAAL en METHODEN

Alle gebruikte methoden zijn in detail gepubliceerd. Daarom wordt hier volstaan met een korte beschrijving.

Weefsels

Meningeoomweefsel voor biochemisch en moleculair-biologisch onderzoek werd direct na verwijdering ingevroren bij -80°C . Weefsel voor celkweekexperimenten werd in kweekmedium (MEM) met fungizon opgevangen en na verdeling in kleine fragmenten bij 37°C gekweekt in MEM met 10% foetaal kalfsserum en 10 mg/ml runderinsuline, onder een atmosfeer van 95% O_2 en 5% CO_2 (4).

Bepalingen

Concentraties van ER, PR werden bepaald met ligand binding en Scatchard plot analyse volgens de richtlijnen van de EORTC Receptor Study group (5), dan wel met immunologische technieken (6-8).

Moleculair-biologische procedures

Het moleculair-biologische onderzoek van meningeomen, dat in het proefschrift van Koehorst (9) is beschreven, bestond aanvankelijk uit isolatie van RNA met zure guanidine thiocyanaat/phenol/chloroform; synthese van cDNA; amplificatie van het verkregen product met behulp van PCR; scheiding en identificatie van de reactieproducten en cloneren en sequenzen van geselecteerde producten. Later werden nog band shift assays, expressie in een celvrij systeem en een studie naar de transactivatie-eigenschappen van gemuteerde ER uitgevoerd.

RESULTATEN en DISCUSSIE

Receptoren in meningeomen

De incidentie van ER en PR in meningeomen en een serie borsttumoren is weergegeven in figuur 1. Het

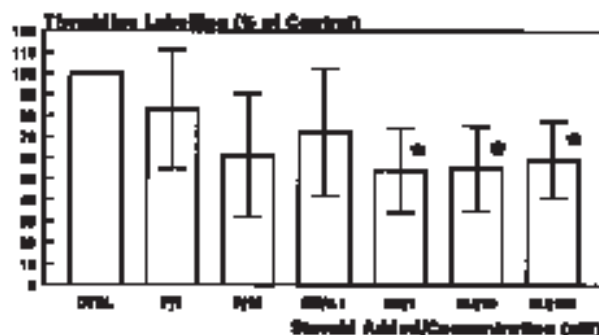


Figuur 1. Oestrogeen- (ER) en Progestageenreceptor (PR) fenotype van 188 humane meningeomen en 2647 mammacarcinomen.

ER/PR fenotype van de meningeomen onderscheidt zich duidelijk van dat van de mammacarcinomen. PR werden in meningeomen aangetroffen in concentraties vergelijkbaar met die in mammacarcinomen, variërend van 10-3040 fmol/mg eiwit. In een klein deel van de meningeomen waren weliswaar ER aantoonbaar, maar de concentratie daarvan was altijd erg laag, <40 fmol/mg eiwit. De waarneming dat meningeomen overwegend het ER negatieve/PR positieve fenotype bezaten, waarvan de eerste 20 tumoren reeds in 1983 werden gepubliceerd (5) werd bevestigd door een serie experimenten waarin aangetoond werd dat aan de identiteit van de PR in meningeomen niet getwijfeld hoefde te worden en het ontbreken van ER niet op technische onvolkomenheden berustte. Zo had de PR in meningeomen dezelfde affiniteit en specificiteit voor het ligand, subcellulaire lokalisatie (nucleair) als de PR in uterusweefsel. Bovendien waren het sedimentatiepatroon op sucrosegradiënten (10) en herkenning door monoclonale antilichamen tegen de humane PR (7) identiek. De afwezigheid van ER viel niet terug te voeren op resistentie van receptoren tegen extractie, proteolytische degradatie van de ER tijdens de experimenten of metabolisme van het ligand tijdens de bindingsstudies (6). Ook de mogelijkheid dat ER slechts in enkele cellen voorkomen en ten gevolge van het homogeniseren voor de biochemische receptorbepaling zodanig verdund worden dat hun concentratie beneden de detectiegrens komt te liggen, kon worden uitgesloten (6).

Receptoren in andere weefsels

Expressie van PR in hersentumoren was specifiek voor meningeomen want van 36 onderzochte andere intracranieële tumoren werd in slechts 2 neurinomen PR aangetroffen (10) en dan nog in zeer lage concentratie (12 en 14 fmol/mg eiwit). Recent is gebleken dat ook in normaal meningeweefsel PR aantoonbaar is (11). Deze waarneming roept de vraag op of PR en daarmee ook progestagenen een fysiologische rol in de hersenvliezen spelen. Het antwoord op deze vraag is echter nog niet voorhanden.



Figuur 2. Thymidine labeling in meningeoomcultures na 8 dagen kweken met progesteron (P) dan wel het antiprogestageen mifepristone, RU-486 (RU). De gebruikte doseringen zijn in nmol/l achter de componenten weergegeven. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm SD en uitgedrukt als percentage t.o.v. de controles. De labeling index van de controlecellen was $3,0 \pm 1,7$ in 17 afzonderlijke experimenten. Significante verschillen t.o.v. de controle ($P < 0,05$) zijn aangegeven met *.

Effecten van progestagenen op meningeomen

Een belangrijk criterium om aan een bindend eiwit de kwalificatie "receptor" toe te kennen is het aantonen van een effect van het hormoon op de cellen waarin het bindend eiwit is aangetoond. Daartoe werden meningeomen in monolaag gekweekt en werd de thymidine incorporatie onder tal van hormonale condities bestudeerd. In totaal werd van 39 meningeomen een monolaagcultuur gestart. Dertig cultures werden verkregen, waarvan er 13 een zodanig langzame thymidine inbouw vertoonden (TLI<1) dat effecten niet te meten waren. De 17 overige cultures hadden een gemiddelde TLI van $3,0 \pm 1,2$ (SD) met een spreiding van 1,2-7,7. Met deze cultures werd het effect van aanwezigheid van progesteron en het antiprogestageen RU-486 (mifepristone) getest (4,12).

Aanvankelijk werden cultures in meerdere passages opgekweekt tot een groot aantal cellen voordat de te testen componenten werden aangeboden. Het bleek daarbij echter dat onder deze condities de cellen hun PR verloren. Daarom werd gekozen voor toediening van de teststoffen direct bij het starten van de cultures en meting van de thymidine labeling na 8 dagen aanwezigheid van de betreffende (anti-)steroiden.

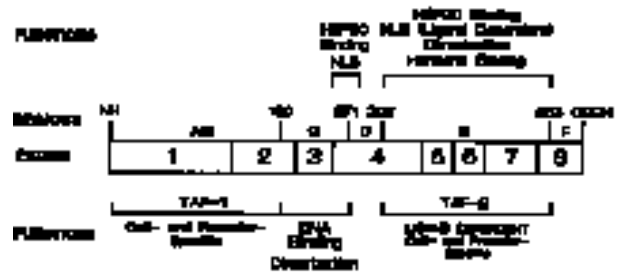
Een selectie uit de resultaten is in figuur 2 weergegeven. Onder de gehanteerde kweekcondities werd geen stimulerend effect van progesteron op de thymidine incorporatie gemeten. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat de cellen al min of meer op volle toeren prolifereren t.g.v. de aanwezigheid van o.a. foetaal kalverserum in het kweekmedium. Duidelijk waarneembaar, zij het met grote spreiding tussen de verschillen cultures was een remmend effect van het antiprogestageen. De grootst waargenomen remming bedroeg 83%.

Klinische implicaties

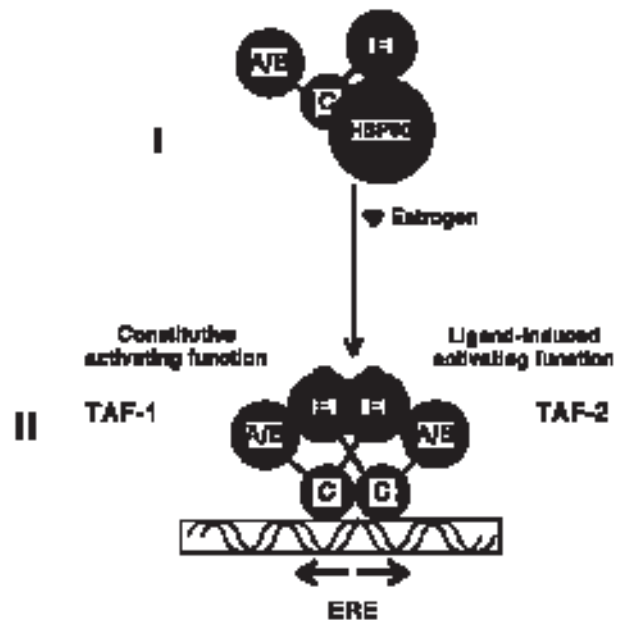
De waargenomen effecten van antiprogestagenen op gekweekte meningeoomcellen hebben klinisch onderzoek naar therapeutische effecten geïntensiveerd. Een aantal patiënten lijkt baat te hebben bij behandeling met mifepristone (13,14). Hoewel onze patiënt met de hoogste thymidine labelling niet op de behandeling reageerde, is onvoldoende bekend over een eventuele relatie tussen de thymidine labelingsindex in vitro en de respons op de therapie. Selectie van patiënten voor endocriene therapie op grond van receptorgehalte dan wel gedrag van de tumor in vitro behoort dus niet tot de mogelijkheden.

Regulatie PR

Het ter beschikking komen van moleculair-biologische technieken en de daarmee gepaard gaande toename in het inzicht in de functie van steroidreceptoren opende nieuwe mogelijkheden om de autonome expressie van PR in meningeomen, en met name de rol van ER daarin te onderzoeken. Een schema van de structurele en functionele organisatie van het ER molecule is in figuur 3 weergegeven. In de steroidreceptoren zijn diverse domeinen herkenbaar. Het ligand bindend domein (LBD) bindt het hormoon, waardoor een verandering in de conformatie optreedt, waarbij het inactieve receptormolecuul een heat



Figuur 3. Model voor de structurele en functionele organisatie van steroidreceptoren (9). Gebruikte afkortingen: HSP: heat shock protein; NLS: Nuclear Localization Signal; TAF: Transcription Activation Function.



Figuur 4. Model voor de werking van steroidhormonen (9). Diverse domeinen zijn als cirkels weergegeven; domein D als staaf tussen domeinen C en E. De inactieve receptor bindt HSP90 waardoor de bindingsplaatsen voor DNA worden geblokkeerd (I). Na binding van het hormoon gaat de HSP90 binding verloren en wordt een receptor dimeer gevormd, dat aan het Estrogen Response Element (ERE) kan binden (II). Ten gevolge van deze binding komen de constitutieve en hormoonafhankelijke transactivatiefuncties (TAF) ter beschikking.

shock eiwit (HSP90) zou verliezen. Dit stelt het hormoon-receptor complex in staat een dimeer te vormen en aan het hormoon response element (HRE) van het doelwitgen te binden. Dat gebeurt via de z.g. zinkvingers in het DNA-bindend domein (DBD). Het response element bezit een zekere mate van specificiteit. Zo bindt de ER via een Estrogen Response Element (ERE) aan de doelwitgenen. Een schematische voorstelling van dit model van hormoonwerking is weergegeven in figuur 4.

Onze hypothese was dat expressie van PR in meningeomen getriggerd zou kunnen worden door de aanwezigheid van ER-mutanten die een functioneel intact DBD hebben, maar voor de binding aan het doelwitgen niet afhankelijk zijn van de door hormoonbinding aan het LBD geïnduceerde conformatieverandering. Testen van deze hypothese vond plaats langs twee

sporen. Enerzijds zochten we naar eiwitten in meningeoomcytosol die in staat zijn aan het PR-gen te binden, anderzijds onderzochten we het bestaan van aberrante mRNA's die voor zulke eiwitten zouden kunnen coderen. Elk van deze sporen heeft tot interessante waarnemingen geleid.

ERE-bindend eiwit

Bij het onderzoek naar aanwezigheid in meningeoomweefsel van eiwitten die interactie hebben met het PR gen werd de aanname gehanteerd dat deze eiwitten van een estrogen responsive element (ERE) gebruik maken. Een ERE is een nucleotidensequentie in het promotergebied van het via de oestrogenreceptor tot expressie te brengen gen. De ER wordt geacht via binding aan een dergelijk ERE transactivering te bewerkstellingen (zie ook figuur 4). Aanwezigheid van een ERE-bindend eiwit in meningeoomextracten werd onderzocht met een z.g. "band shift assay", waarbij de elektroforetische mobiliteit van radioactief ERE verandert (shifts) als er een eiwit aan bindt. Het ERE werd gesynthetiseerd en radioactief gelabeld. Als bij incubatie van meningeoomextract met dit radioactieve ERE binding aan één of meer eiwitten optreedt, zal in een polyacrylamide gel bij elektroforese een verschuiving van de radioactiviteit waarneembaar zijn ten opzichte van extracten waarin geen binding optreedt. Specificiteit van de assay werd bevestigd in competitie-experimenten met synthetisch progesteron responsive element (PRE). In alle 14 onderzochte meningeomen was een dergelijke verschuiving detecteerbaar, waardoor de conclusie gerechtvaardigd is dat humane meningeomen een ERE-bindend eiwit bevatten. Antilichamen tegen de humane ER waren in staat de vorming van het complex tussen dit ERE bindend eiwit en het synthetisch ERE te verhinderen. Dit leidde tot de conclusie dat het ERE-bindend eiwit verwant aan de ER moest zijn. Aanwezigheid van het ERE-bindend eiwit op zich was niet voldoende om autonome PR-expressie te verklaren omdat het eiwit ook in PR-negatieve tumoren werd gevonden (15).

Aberrante mRNA's

Als mRNA's coderend voor mutante vormen van ER aanwezig zijn leek het aannemelijk te veronderstellen dat in elk geval het DBD van zulke mutanten intact zou zijn. Reverse transcriptase PCR werd gebruikt om RNA uit meningeomen te karakteriseren. In één set experimenten werd een gebied van exon 2 tot 6 geamplificeerd, dat het DNA-bindend domein van de ER omvat. In andere experimenten ging het om exon 4 tot 8, het hormoon-bindend domein. Tegen de verwachting in werd in beide gevallen een produkt gevonden dat codeert voor het wild-type (wt) ER. Naast het RNA coderend voor wtER werden diverse varianten gevonden die een exon misten en dus als splice varianten werden geclassificeerd (16,17). Het meest prominent was een mutant met een volledige deletie van exon 4 (ERD4). Daarnaast werden mutanten die exon 7 resp 5 misten gevonden. Van ERD7 was al bekend dat die dominant negatief is, d.w.z. zelf geen activiteit heeft en ook de activiteit van de wtER kan onderdrukken. ERD5 zou autonome transcriptie-activiteit

bezitten (18,19) en is daarmee dus een kandidaat voor het coderen van het ERE-bindend eiwit. ERD4 was nog niet beschreven en was door de ligging van de mutatie, die de zinkvingers intact laat, maar HSP90 binding verhindert en een deel van het HBD mist ook een goede kandidaat en daarom werd besloten de eigenschappen van deze mutant te onderzoeken. Het eiwit werd in vitro getransleerd, en bleek door antilichamen H222 en H226 welke beide tegen de humane ER reactief zijn, te worden herkend. Het bleek echter niet aan DNA te binden en ook geen heterodimeren met wtER te vormen. Tenslotte bleek het ook geen transactivatie-eigenschappen te hebben. We concludeerden daarom dat het hier helaas om een stille mutant gaat, die hoogst waarschijnlijk niet de oorzaak kan zijn voor de autonome expressie van PR in meningeomen (20).

Andere mechanismen voor PR inductie

Hoewel de betrokkenheid van ER bij de synthese van PR min of meer als dogma werd beschouwd (21), is later komen vast te staan dat de synthese van PR niet uitsluitend onder oestrogene controle staat. Signaaltransductiemechanismen die leiden tot verhoging van het intracellulair cAMP, tot activering van tyrosine kinases of Ca^{2+} - en fosfolipide-afhankelijke proteïne-kinases kunnen daarin ook een rol spelen (22-24). Activering van één der hiergenoemde mechanismen in meningeoomcultures echter leidde tot verhoging van PR-synthese (9).

Epiloog

Beide vraagstellingen van het hier beschreven onderzoek zijn gedeeltelijk beantwoord. Medicamenteuze, anti-hormonale therapie van meningeomen lijkt voor een aantal patiënten tot de mogelijkheden te behoren, en geleidelijk worden de moleculaire bijzonderheden van de autonome expressie van progesteronreceptor in meningeomen duidelijk. Diverse vragen zijn echter nog open. Zo is nog niet duidelijk hoe patiënten die potentiëel op de anti-hormonale therapie kunnen reageren, geïdentificeerd kunnen worden.

Verder is er de aanwezigheid van mRNA coderend voor wild-type ER, terwijl op eiwitniveau de meeste meningeomen ER-negatief zijn. Een hogere turnover van het ER eiwit of mRNA in meningeomen zou hiervoor een verklaring kunnen zijn. Stabiliteit van mRNA hebben wij niet getest. Mengexperimenten met meningeoom- en uterus-cytosol hebben geen aanwijzing gegeven voor het bestaan van een verhoogde turnover van ER eiwit in meningeoomcytosol.

De aanwezigheid van enerzijds een ERE-bindend eiwit en anderzijds een mRNA met transactivatie-capaciteit (ERD5) leidt tot de hypothese dat dit eiwit gecodeerd wordt door ERD5 mRNA. Het toetsen van deze hypothese vormt onze volgende uitdaging.

De derde open vraag is het PR gen zelf. Het feit dat activering van alternatieve signaaltransductiemechanismen in meningeoomcultures niet tot verhoogde PR synthese leidt, maakt het aannemelijk dat de cellulaire en promotor context van het PR gen in meningeomen niet optimaal is (25).

Recent zijn nieuwe estrogen response elementen ontdekt (26). Aangezien een volwaardig ERE in het humane PR-gen nog niet is geïdentificeerd, is het niet ondenkbaar dat ER-mutanten die vooralsnog als inactief terzijde zijn geschoven, zoals ERD4, via zulke elementen kunnen werken.

Het verliezen van PR door de meningeomcellen in kweek is een apart fenomeen, dat ook door andere onderzoekers is gezien. Het zou onder andere kunnen betekenen dat de cultuurcondities niet optimaal zijn. Een methode waarbij niet in monolaag maar in z.g. sferoid cultures op agar wordt gekweekt en waarbij de PR, althans immunohistochemisch aantoonbaar blijft, zouden een goed alternatief zijn (27). Evaluatie van deze hypothese staat op stapel.

Literatuur

- Jääskeläinen J. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: Late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol* 1986; 26: 461-469.
- Nakasu S, Hirano A, Shimura T, Llena JF. Incidental meningiomas in autopsy study. *Surg Neurol* 1987; 27: 319-322.
- Bickerstaff ER, Small JM, Guest IA. The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psych* 1958; 21: 89-91.
- Blankenstein MA, Van der Meulen-Dijk C, Thijssen JHH. Effects of steroids and antisteroids on human meningioma cells in primary culture. *J Steroid Biochem*. 1989; 34: 419-421.
- 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.
- Blankenstein MA, Berns PMJJ, Blaauw G, Mulder E, Thijssen JHH. Search for estrogen receptors in human meningioma tissue sections with a monoclonal antibody against the human estrogen receptor. *Cancer Res* 1986; 46: 4268s-4270s.
- Blankenstein MA, van der Meulen-Dijk C, Thijssen JHH. Assay of estrogen and progestin receptors in human meningioma cytosols using immunological methods. *Clin Chim Acta* 1987; 165: 189-195.
- Blaauw G, Koudstaal J, Blankenstein MA, Debets-Te Baerts M, Gijzen AHJ. Progestin receptors in meningiomas. Comparison of cytosolic assays with immunocytochemical identification in cryostat and paraffin sections. *Acta Neurochir* 1995; 134: 83-87.
- Koehorst SGA. Female sex steroid receptors in human meningiomas. PhD Thesis Utrecht University, 1994.
- Blankenstein MA, Blaauw G, van't Verlaat JW, van der Meulen-Dijk C, Thijssen JHH: Steroid receptors in cerebral tumours; Possible consequence for endocrine treatment? In Klijn JGM, Paridaens R, Foekens JA (eds) *Hormonal Manipulation of Cancer: Peptides, Growth Factors and New (Anti)steroidal Agents* Raven Press, New York, U.S.A. 1987, pp 61-70.
- Verhagen A, Go KG, Visser GM, Blankenstein MA, Vaalburg W. The presence of progesterone receptors in arachnoid granulations and in the lining of arachnoid cysts: its relevance to the expression of progesterone receptors in meningiomas. *Br J Neurosurg* 1995; 9: 47-50.
- Blankenstein MA, Van't Verlaat JW, Crougts RJM. Hormone dependency of meningiomas. *Lancet* 1989; I: 1381.
- Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J Neurosurg* 1991; 74: 861-866.
- Lamberts SWJ, Tange HLJ, Avezaat CJJ, Braakman R, Wijngaarde R, Koper JW, de Jong FH. Mifepristone (RU486) treatment of meningiomas. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 486-490.
- Koehorst SGA, Jacobs HM, Thijssen JHH, Blankenstein MA. Detection of an oestrogen receptor-like protein in human meningiomas by band shift assay using a synthetic oestrogen responsive element. *Br J Cancer* 1993; 68: 290-294.
- Koehorst SGA, Jacobs HM, Tilanus MGJ, Bouwens AGM, Thijssen JHH, Blankenstein MA. Aberrant oestrogen receptor species in human meningioma tissue. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; 43: 57-61.
- Koehorst SGA, Jacobs HM, Thijssen JHH, Blankenstein MA. Wild-type and alternatively spliced estrogen receptor messenger RNA in human meningioma tissue and MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 45: 227-233.
- McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SAW. Oestrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol* 1991; 5: 1571-1577.
- Fuqua SA, Fitzgerald SD, Chamness GC, Tandon AK, McDonnell DP, Nawaz Z, O'Malley BW, McGuire WL. Variant human breast cancer estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Res* 1991; 51: 105-109.
- 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 MCF7 breast cancer cells and meningioma tissue. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 101: 237-245.
- Horwitz KB, McGuire WL. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. *J Biol Chem* 1978; 253: 2223-2228.
- Aronica SM, Katzenellenbogen BS. Progesterone receptor regulation in uterine cells: Stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 1991; 128: 2045-2053.
- Sumida C, Pasqualini JR. Stimulation of progesterone receptor by phorbol ester and cyclic AMP in fetal uterine cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990; 69: 207-215.
- Ignar-Trowbridge DM, Teng CT, Ross, KA, Parker MG, Korach KS, McLachlan JA. Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 992-998.
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein, RB, Pike JW, McDonnell P. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 21-30.
- Dana SL, Hoener PA, Wheeler DA, Lawrence CB, McDonnell DP. Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 1193-1207.
- Tonn JC, Ott MM, Meixensberger J, Paulus W, Roosen K. Progesterone receptors are detectable in tumor fragment spheroids of meningiomas in vitro. *Anticancer Res* 1994; 14: 2453-2456.

Summary

Autonomous expression of progestin receptors in human meningiomas: still a challenge. Blankenstein MA, Koehorst SGA, Kallen CJH van der, Jacobs HM, Spriel AB van, Donker GH, Verlaat JW van't, Blaauw G, Thijssen JHH. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 17-22.

Human meningiomas are rich in progesterin receptors, which are expressed in an oestrogen independent fashion. In cultured meningioma cells, antiprogestins decrease thymidine incorporation. Clinical studies indicate that patients may benefit from antiprogestin treatment. In the search for an explanation for the ER negative/PR positive phenotype of meningioma, a protein was found in human meningioma cytosol which binds to a synthetic oestrogen responsive element (ERE). Using reverse transcriptase PCR mRNA encoding for the wild-type oestrogen receptor (ER) was found. In addition, several splice variants of ER mRNA were identified, including variants lacking exons 4, 5 and 7. We found the ERD4 protein to have no

transcriptional activity and the ERD7 protein reportedly is dominant negative. These mutants therefore probably are not responsible for the autonomous PR synthesis in human meningioma. The ERD5 protein, by contrast, has been reported to have oestrogen independent transcriptional activity and it is tempting to speculate that this protein is the ERE binding protein we have found. The role of the wild type ER mRNA is presently unclear. Activation of other signal transduction pathways in meningioma does not lead to an increased PR concentration.

Key-words: steroid receptors, meningiomas, estrogen, (anti-) progesterin, cell culture.

Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 22-28

Troponine T uitstorting in plasma na een acuut myocard infarct

M. P. van DIEIJEN-VISSER¹, K.W.H. WODZIG¹, J. A. KRAGTEN² en W. Th. HERMENS³

Bij patiënten met een acuut myocard infarct (AMI), die werden behandeld met trombolytische therapie, werd de uitstorting van troponine T in het plasma gekwantificeerd en vergeleken met totale uitstorting van de cytoplasmatische cardiale enzymen creatine kinase (CK) en α -hydroxy butyraat dehydrogenase (HBD). Bij de berekening van de totale eiwit of enzymuitstorting in het plasma werd gebruik gemaakt van een twee-compartimentenmodel. De cumulatieve eiwit- of enzymuitstorting werd uitgedrukt in gram-equivalenten (g-eq) gezond hartspierweefsel per liter plasma (infarctgrootte). Voor de cardiale enzymen CK en HBD bedroeg de gemiddelde totale uitstorting over 72 uur respectievelijk 5,9 (range 0,5-29; median 3,5; n=22) and 5,9 (range 0,3-36; median 3,3; n=22) g-eq/l. De uitstorting was constant na 72 uur en de verschillen tussen CK en HBD waren niet significant. De gemiddelde cumulatieve troponine T uitstorting bedroeg slechts 0,30 (range 0,0-2,0; median 0,3; n=22) g-eq/l na 72 uur en 0,51 (range 0,0-3,6; median 0,3; n=22) g-eq/l na 168 uur. Na 72 uur was de totale troponine T uitstorting in het plasma slechts 5% en na 168 uur slechts 8,5% van de totale enzymuitstorting.

Conclusie: Ondanks het feit dat de troponine T uitstorting slechts een fractie is van de uitstorting van de cytoplasmatische enzymen CK en HBD, bestaat er een goede correlatie tussen de troponine T uitstorting

en de enzymuitstorting. Kwantificeren van de infarctgrootte dient echter bij voorkeur te gebeuren aan de hand van plasmacurves van cytoplasmatische enzymen die volledig in de bloedbaan worden uitgestort en die bij voorkeur langzaam worden afgebroken, zoals het HBD.

Trefwoorden: compartimenten model, cardiale markers, kwantificeren van weefselschade, infarctgrootte, trombolytische therapie, reperfusie

Diagnostiek en vroegdiagnostiek van het acuut myocard infarct

Hart- en vaatziekten zijn in Nederland de belangrijkste doodsoorzaak. Voor patiënten met een dreigend hartinfarct is het van groot belang de diagnose acuut myocard infarct (AMI) in een zo vroeg mogelijk stadium te stellen, zodat tijdig met trombolytische (stolseloplossende) therapie kan worden gestart en de hartspierschade zoveel mogelijk beperkt kan blijven. Voor het vaststellen of uitsluiten van de diagnose AMI moet aan tenminste twee van de drie door de WHO (World Health Organization) opgestelde criteria zijn voldaan:

- het specifieke klachtenpatroon, zoals typische pijn op de borst gedurende meer dan 30 minuten
- karakteristieke veranderingen in het electrocardiogram (ECG)
- tijdsafhankelijke daling of stijging van cardiale eiwitten of enzymen (biochemische markers) in het bloed (1).

Echter, bij ongeveer 40% van de patiënten zijn de pijnklachten aspecifiek en zijn met name bij de aanvang van de klachten nog geen duidelijke ECG-veranderingen aanwezig (2). Voor de biochemische diagnostiek wordt meestal gebruik gemaakt van het enzym creatine kinase (CK) of van het meer hartspecifieke iso-enzym CK-MB, van lactaat dehydrogenase (LD) of van de meer hartspecifieke iso-enzymen LD1 en LD2 (gemeten met α -hydroxy-boterzuur dehydrogenase als substraat, HBD). Verhoogde plasma-

Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht¹, Afdeling Cardiologie, Ziekenhuis De Wever en Gregorius, Heerlen² en Cardiovascular Research Institute Maastricht, Rijksuniversiteit Limburg, Maastricht³.

Naar een voordracht voor de Werkgemeenschap Klinische Chemie i.o., juni 1995

Correspondentie: Prof. Dr. M. P. van Dieijen-Visser, Klinisch Chemisch Laboratorium, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht.

Ingekomen: 25.08.95