

## Overzichten

### Insuline-achtige groeifactor (IGF)-II: biologische eigenschappen en de klinische relevantie

J. van DOORN, C.M. HOOGERBRUGGE, M. JANSEN en S.C. van BUUL-OFFERS

Het bepalen van totale IGF-II spiegels in plasma, in combinatie met IGF-I metingen, is relevant voor de diagnostiek van GH-deficiëntie bij kinderen. IGF-II speelt een belangrijke rol bij het ontstaan van diverse typen tumoren, hetgeen een aanknopingspunt kan zijn voor therapieën die er op gericht zijn om lokaal IGF-II en/of IGF-receptoren te inactiveren. Gebleken is dat de detectie van precursorvormen van IGF-II ("big" IGF-II) van essentieel belang is bij de diagnostiek van non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglykemie (NPTH) en de evaluatie van de behandeling hiervan. Het ligt dan ook in de verwachting dat de recente ontwikkeling van relatief eenvoudig en snel uitvoerbare bepalingen van "big" IGF-II in plasma en andere lichaamsvloeistoffen een bijdrage zal leveren aan verder onderzoek naar de rol van dit eiwit als tumormarker bij tumoren die (nog) niet gepaard gaan met NPTH.

*Trefwoorden: IGF-II, pro-IGF-II, non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglykemie*

In dit artikel geven wij een beschouwing over de biologische betekenis van insulineachtige groeifactor (IGF)-II, en over de structuur en eigenschappen van het IGF-II-gen en -eiwit. Vervolgens gaan we in op de factoren die van invloed zijn op de concentraties van IGF-II en zijn precursorvormen in de circulatie en het belang van de detectie van deze eiwitten voor de klinische praktijk. IGF-I is aan bod gekomen in een eerder verschenen publicatie (1).

#### Biologische eigenschappen van IGF-II

IGF-II is een hoofdzakelijk paracrien en autocrien werkende groeifactor die met name een rol speelt tijdens de prenatale groei en ontwikkeling (2-4). In foetale weefsels wordt dan ook een veel hoger expressieniveau gevonden van het IGF-II-gen dan in

weefsels van volgroeide individuen (5, 6). In vitro experimenten met verscheidene celtypen laten zien dat IGF-II betrokken is bij de regulatie van de celproliferatie en het intermediair metabolisme (4). IGF-II blijkt ook de snelheid van geprogrammeerde celdood (apoptose) te remmen (3, 4). Daarnaast is IGF-II een belangrijke postnatale factor gebleken bij de regulatie van botturnover en voor het optimaal functioneren van het immuunsysteem en het centraal zenuwstelsel (3, 4). Men denkt dat de biologische effecten van IGF-II, evenals die van IGF-I, vooral tot stand komen na binding aan de type-I-IGF-receptor. De laatste jaren is echter duidelijk geworden dat ook interacties met andere receptoren, waaronder de insulinereceptor, bijdragen aan het pleiotrope karakter van de IGF-II-activiteit (4). Van de insulinereceptor bestaan, door alternatieve splicing van exon 11 van het insuline-receptorgen, er twee isovormen (A en B) (7). De relatieve expressie van beide isovormen is weefsel-specifiek: isovorm A komt met name tot expressie in foetale weefsels, hersenweefsel en hemopoëtische cellen, maar ook in verscheidene typen tumoren. Isovorm B overheerst in de belangrijkste doelwitweefsels voor de metabole effecten van insuline, zoals lever, spieren en vetweefsel (7, 8). Recent onderzoek suggereert dat IGF-II met een relatief hoge affiniteit, 30-40% van die van insuline, kan binden aan isovorm A van de insulinereceptor. Deze interactie leidt via autofosforylering van de receptor voornamelijk tot mitogene effecten (7). De affiniteit van IGF-II voor isovorm B ligt daarentegen meer dan tienvoudig lager. Er bestaat nog een derde type celmembraan-receptor die specifiek IGF-II bindt, namelijk de type-II-IGF/mannose-6-fosfaat-receptor (2,4). Deze receptor lijkt voornamelijk te functioneren bij de endocytose en degradatie van IGF-II (2-4). Daarnaast is de type-II-IGF/mannose-6-fosfaat-receptor betrokken bij het transport van lysosomale enzymen van het Golgi-apparaat naar de lysosomen en kan een interactie aangaan met de biologisch inactieve vorm van transformerende groeifactor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), die daarbij geactiveerd wordt en een groeiremmende werking uitoefent (4).

IGF-II wordt in tal van organen, met name de lever, gesynthetiseerd en komt voor een deel in de circulatie terecht. Onder normale omstandigheden is vrijwel al het IGF-II, net als IGF-I, in plasma gebonden aan

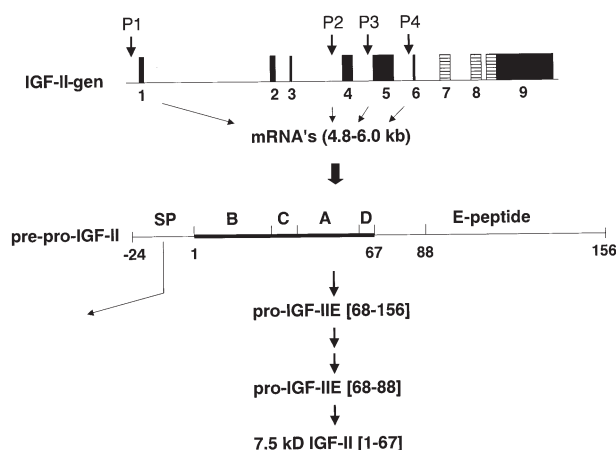
*Laboratorium voor Endocrinologie, Wilhelmina Kinderziekenhuis/Universitair Medisch Centrum, Utrecht*

Correspondentie: Dr. J. van Doorn, Laboratorium voor Endocrinologie, huispostnummer: KE.03.139.2, Wilhelmina Kinderziekenhuis/ Universitair Medisch Centrum, Utrecht. Postbus 85090, 3508 AB Utrecht.  
e-mail: J.vandoorn@lab.azu.nl.

specifieke IGF-bindende eiwitten (IGFBP's). Hiervan zijn er in totaal zes beschreven (9). IGFBP-2 en -6 binden preferentieel IGF-II. De affiniteit van IGF-I en -II voor de IGFBP's ( $K_d \sim 10^{-10}$  M) is zelfs hoger dan van de type-I-IGF-receptor ( $K_d \sim 10^{-8}$  M). In de normale situatie vormt meer dan 75% van de IGF's een complex met het groeihormoon (GH)-afhankelijke IGFBP-3 en een 85-kD-zuurlabele subunit (ALS) (4, 9). Deze relatief grote (150 kD) complexen kunnen het capillairmembraan niet passeren, waardoor de verblijfsduur van de IGF's in de circulatie aanzienlijk wordt verlengd (halfwaardetijd (T1/2): ca 15 uur). Het overige IGF circuleert in de vorm van binaire complexen met IGFBP-3 of met andere IGFBP's. T1/2 van dergelijke complexen in plasma bedraagt ca. 25-30 minuten (4, 9). Slechts een minieme fractie (< 1%) van zowel IGF-I als IGF-II is in de vrije, niet gebonden, vorm aanwezig (T1/2  $\approx$  10 min.) (4, 9). Naast hun transportfunctie moduleren IGFBP's de beschikbaarheid van IGF's op cellulair niveau en daarmee het uiteindelijk biologische effect (9). Door specifieke IGFBP-proteasen kan de affiniteit van IGFBP's voor de IGF's verlaagd worden, waardoor de groeifactoren beschikbaar komen voor binding aan hun receptoren.

### Structuur en eigenschappen van het IGF-II-gen en -eiwit

Het IGF-II gen is gelokaliseerd op chromosoom 11 en normaliter wordt in de meeste celtypen alleen het paternale allel tot expressie gebracht (maternale imprinting) (2, 6, 10). H19, een paternaal ingeprent gen dat eveneens gelokaliseerd is op chromosoom 11 en codeert voor een niet in eiwit vertaald RNA, is betrokken bij het in stand houden van de imprinting van het IGF-II-gen (2,11). Het IGF-II-gen is 30 kilobaseparen groot, bestaat uit 9 exonen en bevat 4 promotoren (figuur 1) (12). Hierdoor kan in principe een scala van IGF-II-mRNA-moleculen gevormd worden met



**Figuur 1.** Structuur van het IGF-II-gen en precursor-IGF-II-eiwit. Het IGF-II-gen bevat 4 promotoren (P1-P4). Alleen de exonen 7, 8 en een gedeelte van 9 (gearceerd aangegeven) coderen voor pre-pro-IGF-II-eiwit. Het N-terminale signaalpeptide (SP) wordt afgesplitst waardoor pro-IGF-II ontstaat. Het E-domein van het pro-IGF-II wordt via een aantal stappen, waarvan het pro-IGF-II [68-88] een relatief stabiele intermediair is die ook in de circulatie voorkomt, afgebroken tot het rijpe uit 67 aminozuren opgebouwde 7.5-kD-IGF-II.

verschillende 5'-uiteinden. Welke promotor(en) gebruikt worden is afhankelijk van het ontwikkelingsstadium en het weefseltype (5). Alleen de exonen 7, 8 en een gedeelte van exon 9 coderen voor het uit 180 aminozuren bestaande pre-pro-IGF-II-precursoreiwit. Dit eiwit bevat een N-terminaal peptide van 24 aminozuren en een carboxy-terminaal peptide (het zogenaamde E-domein) met een lengte van 89 aminozuren (figuur 1). Verondersteld wordt dat het N-terminale peptide als signaalpeptide functioneert bij het transmembraantransport en tijdens dit proces wordt afgesplitst (13, 14). Het E-domein-peptide wordt na glycosylering van specifieke serine- en threonineresiduen via een aantal, deels nog niet opgehelderde, opeenvolgende enzymatische stappen afgesplitst waarbij het rijpe, 67 aminozuren lange, 7,5 kDa monomere IGF-II-polypeptide overblijft (13, 14). Volledige intracellulaire afsplitsing van het E-domein is echter niet noodzakelijk voor secretie. In het plasma en andere lichaamsvloeistoffen wordt, naast het 7,5 kD-IGF-II, een heterogene (zowel wat betreft glycosyleringsgraad als het nog aanwezige deel van het E-domein) fractie 9-15-kD-pro-IGF-II aangetroffen. Dit wordt ook wel "big" IGF-II genoemd (15). Verder is gebleken dat verscheidene celtypen "big" IGF-II afscheiden in het kweekmedium (16). Er zijn aanwijzingen dat zowel de affiniteit voor de type-I-en -II-IGF-receptoren als de biologische activiteit van "big" IGF-II vergelijkbaar is met die van 7,5 kD IGF-II (17, 18).

De aminozuursequentie van het 7,5 kD-IGF-II-peptide vertoont 47% homologie met die van pro-insuline. Door een strikte conservering van de cysteïneresiduen en de drie resulterende zwavelbrugverbindingen hebben beide eiwitten een vergelijkbare driedimensionale structuur (2). De A- en B-domeinen van IGF-II zijn structureel verwant met de A- en B-ketens van insuline. Het C-domein van IGF-II lijkt sterk op het bindings (C)-peptide van pro-insuline.

### Rol van IGF-II bij tumorigenese en -progressie

Tegenwoordig wordt algemeen aangenomen dat IGF-II als paracrine en/of autocrine groeifactor betrokken is bij oncogen-geïnduceerde tumorigenese (10). IGF-II remt apoptose van reeds getransformeerde cellen en stimuleert bovendien de proliferatie van neoplastische cellen via activering van de type-I-IGF-receptor of isovorm A van de insulinerceptor (8, 10). Vergeleken met normaal weefsel wordt in tal van typen tumoren het IGF-II-gen verhoogd tot expressie gebracht, hetgeen met behulp van o.a. *in situ* hybridisatie (mRNA) en immunohistochemie (eiwit) kan worden aangetoond (10). Deze bevinding kan derhalve een aanknopingspunt zijn voor therapieën die er op gericht zijn om lokaal IGF-II en/of IGF-receptoren te inactiveren (10). Hoewel hiervoor tot nu toe maar weinig aanwijzingen gevonden zijn (19, 20), is het niet uitgesloten dat herrangschikkingen, mutaties of andere afwijkingen in het IGF-II-gen kunnen bijdragen tot een hogere transcriptieactiviteit. Bij sommige maligne tumoren heeft men een mutatie of deletie geconstateerd in het gen voor de type-II-IGF/mannose-6-fosfaatreceptor (21). Wellicht leidt dit tot

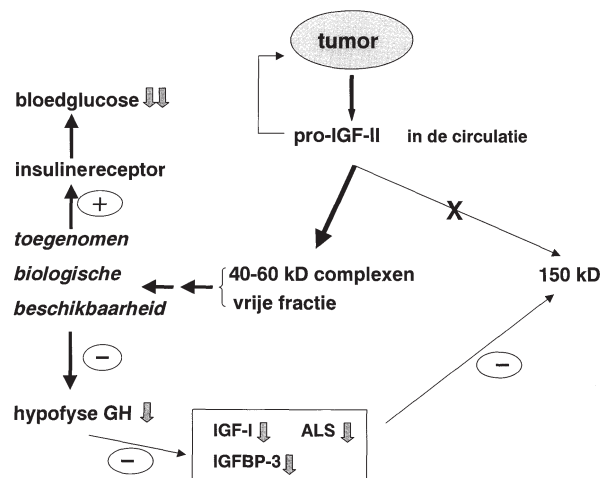
zowel een verminderde endocytose van IGF-II als tot een verminderde activering van TGF- $\beta$ 1 aan het celmembraan van neoplastische cellen. Het gevolg is een lokaal verhoogde concentratie van het mitogene IGF-II en een relatief lage concentratie van het biologisch actieve groeiremmende TGF- $\beta$ 1 (21).

Bij de meeste kinderen met het syndroom van Beckwith-Wiedemann, dat gekarakteriseerd wordt door onder meer foetaal gigantisme, organomegalie en hemihypertrofie, heeft men aangetoond dat er sprake is van een verlies van imprinting van het IGF-II-gen (11, 22). Daardoor bevatten diverse weefsels prenataal aanzienlijk meer IGF-II-mRNA dan normaal (23). Patiënten met deze aandoening hebben een 1000-voudig verhoogde kans op het ontwikkelen van embryonale tumoren, zoals Wilms' tumoren (11). In tal van andere tumoren, zoals het rhabdomyosaroom, glioom, longcarcinoom, leiomyosaroom en prostaatcarcinoom blijken de neoplastische cellen eveneens beide IGF-II-allelen tot expressie te brengen, hetgeen mogelijk voorafgegaan wordt door inactivering van het H19-allel (6, 10, 24). Daarnaast gaan Wilms' tumoren dikwijls gepaard met een deletie of mutatie van het gen voor Wilms-tumorsuppressoreiwit, WT1. Normaliter functioneert WT1 als een transcriptiesuppressorfactor voor zowel het IGF-II-gen (via binding aan de P3-promotor) als het type-I-IGF-receptorgen (6, 25, 26).

Patiënten die besmet zijn met het hepatitis-B-virus lopen een verhoogd risico op het ontwikkelen van een hepatocellulair carcinoom. Het virus produceert een 17-kD-eiwit, HBV-X, dat betrokken is bij de carcinogenese. HBV-X fosforyleert de transcriptiefactor Sp1, die vervolgens kan binden aan promotor 4 (en waarschijnlijk ook promotor 3) van het IGF-II-gen, waardoor de transcriptieactiviteit wordt verhoogd (27).

#### Non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglycemie

Een extreme mate van IGF-II-overproductie ligt ten grondslag aan het zeldzame syndroom van non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglycemie (NPTH). Doorgaans betreft het hier grote, zowel benigne als maligne (al dan niet gemetastaseerde) tumoren van mesodermale, epitheliale of hemopoietische origine. Het ziektebeeld wordt gekarakteriseerd door een persistent hoge insulineachtige activiteit in het lichaam (28, 29). De lipolyse in vetweefsel is gereduceerd. Er is een enorme toename van het glucoseverbruik door met name skeletspierweefsel, terwijl tegelijkertijd de glucoseproductie door de lever wordt geremd door een sterke afname van de glycogenolyse en gluconeogenese. Uiteindelijk kan dit resulteren in extreem lage plasmaspiegels van vrije vetzuren en hypoglycemie. Een insulinoom kan daarbij worden uitgesloten, aangezien bij patiënten met NPTH de insulinespiegels in het plasma zeer laag zijn. Bovendien wordt de GH-secretie sterk onderdrukt, waardoor in het algemeen verlaagde plasma IGF-I- en IGFBP-3-concentraties gemeten worden (18, 28). Ondanks de hoge mate van expressie van IGF-II-mRNA door tumorweefsel worden meestal geen verhoogde totale IGF-II-spiegels gevonden. Echter, in tegenstelling tot normaal plasma, blijkt het grootste deel van het IGF-II te bestaan uit



**Figuur 2.** Hypothetisch model voor het mechanisme van het ontstaan van non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglycemie. Het is waarschijnlijk dat in de tumorcellen de machinerie die betrokken is bij de processing van pro-IGF-II tot het rijpe 7.5 kD IGF-II niet in staat is om het hoge aanbod van precursoreiwit adequaat te verwerken. Hierdoor zal een aanzienlijke hoeveelheid "big" IGF-II in de circulatie terechtkomen. Big IGF-II competeert met 7.5 kD IGF-II en de relatief geringe hoeveelheid IGF-I voor binding aan de IGFBP's. Echter in NPTH-plasma blijkt de vorming van het 150-kD-complex ernstig verstoord te zijn. "Big"-IGF-II bindt wel aan IGFBP-3 maar dit complex is vervolgens niet of nauwelijks in staat om ALS te binden. In tegenstelling tot de normale situatie, treft men de IGF's dus voornamelijk in de vorm van binaire 40-60-kD-complexen aan. Daarnaast is ook de niet-gebonden, vrije, fractie verhoogd. Gezien de veel snellere turn-over van deze complexen in de circulatie veronderstelt men dat de plasmapool van IGF's, voor een groot deel dus "big" IGF-II, sneller uitwisselt met de weefselcompartimenten en lokaal de concentraties sterk zullen toenemen. Het gevolg is dat een sterk insulineachtig effect wordt geïnduceerd, waarschijnlijk via de insulinerceptor (isovorm B). Daarnaast kan men zich voorstellen, dat door een hoge mate van feedbackremming, de GH-productie door de hypofyse wordt onderdrukt. Hierdoor neemt de synthese van GH-afhankelijke eiwitten zoals IGF-I, IGFBP-3 en ALS eveneens af, waardoor de vorming van het 150-kD-complex nog verder wordt tegengegaan. Uiteindelijk zal, wanneer counterregulatie niet meer kan compenseren, hypoglycemie ontstaan.

"big" IGF-II (15, 18). In figuur 2 wordt de tegenwoordig gangbare hypothese uiteengezet over het mechanisme dat verantwoordelijk is voor NPTH. De veranderde kinetiek van IGF's in de circulatie van patiënten met NPTH verklaart waarom het totale gehalte van IGF-II in het plasma niet toeneemt. Indien het tumorweefsel niet operatief verwijderd kan worden is een efficiënte behandeling van NPTH lastig. Behandeling met GH, glucagon en/of glucocorticosteroiden kan dan tijdelijk succesvol zijn (28).

#### Totale IGF-II-spiegels in plasma

##### Bepalingsmethode

Het totale IGF-II-gehalte in serum of EDTA-plasma wordt in ons laboratorium bepaald met behulp van een radioimmunoassay (RIA) (30). Hierbij wordt gebruik gemaakt van een monoklonaal antilichaam dat is gericht tegen een epitoom van het rijpe 7,5 kD IGF-II. Deze IGF-II-RIA maakt dus geen onderscheid

tussen 7,5 kD IGF-II en hoogmoleculaire precursorvormen van deze groeifactor. Recent wordt het internationale (WHO 96/538) recombinant IGF-II-ijkingspreparaat als standaard gebruikt (31). In plasmamonsters aanwezige IGFBP's interfereren met de binding van IGF-II aan het antilichaam. Daarom worden deze eiwitten eerst zo veel mogelijk verwijderd door een extractieprocedure (Sep-Pak C18 kolomchromatografie) bij een lage pH, waarbij IGF's dissociëren van IGFBP's.

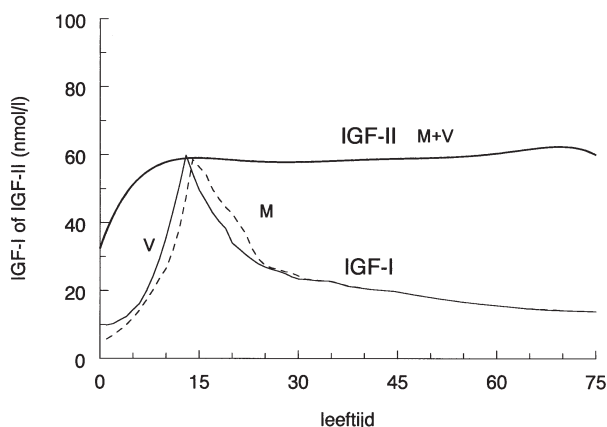
#### *Fysiologische invloeden op de totale IGF-II-concentratie in de circulatie*

De totale concentratie van IGF-II in de circulatie verandert niet gedurende de dag. Bij mannen en vrouwen worden dezelfde spiegels gemeten. Vanaf de geboorte stijgt de IGF-II-spiegel gedurende de eerste 5 levensjaren, maar verandert daarna niet of nauwelijks meer (figuur 3) (30, 32). Bij volwassenen ligt de totale IGF-II-spiegel in plasma ongeveer een factor 3 hoger dan die van IGF-I.

De invloed van de voedingstoestand op plasma IGF-II is complex. Vasten gedurende een periode van 5 dagen heeft geen effect (33). Bij intensive-care-patiënten die in een ernstig katabole toestand verkeren wordt daarentegen doorgaans een lage IGF-II-concentratie in het plasma aangetroffen, die samenhangt met gereduceerde IGFBP-3-concentraties (34). Kinderen met chronische eiwit- en energie-ondervoeding hebben eveneens sterk verlaagde IGFBP-3- en IGF-II-spiegels (33). Meestal normaliseren deze geleidelijk na realimentatie.

#### *Indicaties voor totaal IGF-II-meting*

In tegenstelling tot IGF-I staat de plasma-IGF-II-spiegel niet direct onder invloed van GH. Waarschijnlijk wordt de concentratie IGF-II in de circulatie voor een belangrijk deel bepaald door de hoeveelheid van de diverse IGF-bindende eiwitten, met name die van het GH-afhankelijke IGFBP-3. Zo worden bij een ernstige GH-deficiëntie lage spiegels gevonden, die weer



**Figuur 3.** Gemiddelde Nederlandse referentiewaarden voor de totale IGF-II- en IGF-I-spiegels in plasma als functie van de leeftijd. Aangezien de totale IGF-II-spiegels voor mannen (M, n = 472) en vrouwen (V, n = 434) niet significant verschillen, zijn deze samengenomen.

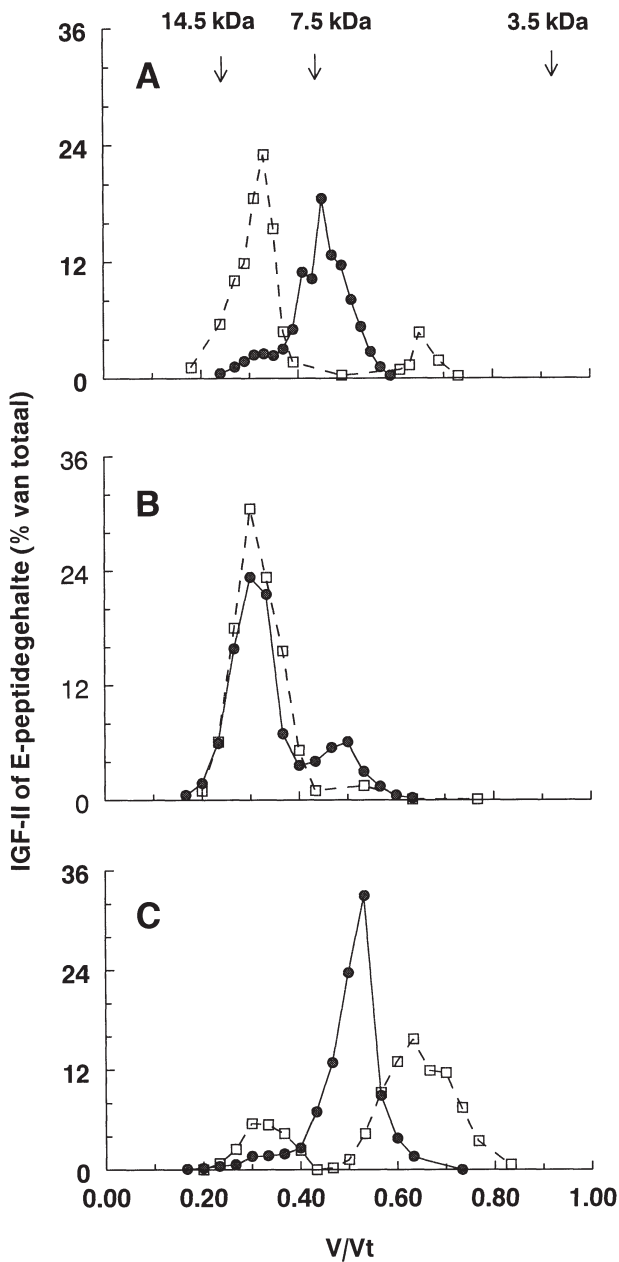
stijgen na GH-behandeling. Acromegalie leidt echter niet tot verhoogde IGF-II-spiegels (35). Door de (beperkte) GH-afhankelijkheid kan IGF-II gebruikt worden als additionele parameter voor GH-deficiëntie. De combinatie van plasma-IGF-I en -IGF-II-metingen, c.q. de molaire IGF-I/IGF-II-ratio, heeft bij kinderen met kleine gestalte een hogere sensitiviteit en specificiteit bij het voorspellen van de GH-piek na een GH-provocatietest dan IGF-I of IGF-II alleen (30, 32).

Bij chronische nierinsufficiëntie (CNI) kan de IGF-II-spiegel verhoogd zijn, waarschijnlijk ten gevolge van een accumulatie van IGFBP's in het plasma (36). Omgekeerd worden bij patiënten met chronische leverziekten, kinderen met systemische juveniele artritis en volwassenen met reumatoïde artritis meestal verlaagde plasma-IGF-II-concentraties gevonden (37-39). Ondanks het feit dat veel typen tumoren IGF-II verhoogd tot expressie brengen vindt men doorgaans geen verhoogde totale IGF-II-spiegels in het plasma of cerebrospinaal vocht. Echter, zowel het colorectaal adenoom als carcinoom lijken wel geassocieerd te zijn met een verhoogde totale plasma-IGF-II-spiegel (40, 41).

#### **“Big” IGF-II**

“Big” IGF-II in plasma kan geïdentificeerd en semi-kwantitatief bepaald worden met behulp van gelfiltratiekolomchromatografie bij lage pH (figuur 4). Circa 10-15% van het totale IGF-II in normaal plasma bestaat uit “big” IGF-II. De diagnose NPTH kan definitief gesteld worden wanneer een verhoogde bijdrage (soms meer dan 70%) gemeten wordt (18, 28). Het opnieuw stijgen of niet dalen van de hoeveelheid “big” IGF-II in het plasma na operatie is indicatief voor een tumorrecidief, zelfs voordat deze met behulp van een CT-scan kan worden gezien. Het is niet goed uitgezocht of “big” IGF-II-spiegels in het plasma van kankerpatiënten zonder symptomen van NPTH ook veranderd zijn. In een studie waarin plasmamonsters werden onderzocht van 11 schijnbare gezonde, maar hepatitis-B-virus-positieve patiënten bleek dat er in 4 gevallen sprake was van een verhoogd percentage “big” IGF-II (42). Het is niet bekend of juist deze patiënten een hoger risico hebben op het ontwikkelen van een hepatocellulair carcinoom. Een alternatief voor de bewerkelijke en tijdrovende gelfiltratiemethode is het bepalen van de concentratie E-peptide met behulp van een RIA. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een antilichaam dat is gericht tegen een specifieke sequentie van 15 tot 21 aminozuren in begin van het E-domein van pro-IGF-II (43, 44). Ook in ons laboratorium is een dergelijke RIA operationeel. Bij gezonde kinderen van 3 tot 14 jaar neemt de concentratie E-peptide in het plasma met de leeftijd ongeveer met een factor 2 toe (43). Bij volwassenen ligt de gemiddelde spiegel ca 40% lager. Patiënten met NPTH hebben een verhoogde concentratie E-peptide in de circulatie (43, 44), welke na operatie of embolisatie van de tumor binnen een dag begint af te nemen (45). Ook plasma afkomstig van patiënten met CNI bevat een aanzienlijk grotere hoeveelheid E-peptide dan normaal (43, 44). Een nadeel van de RIA methode is evenwel dat in principe

zowel E-peptide bevattend "big" IGF-II als vrije fragmenten van het E-domein worden gedetecteerd. Nader analyse van CNI-plasma wijst uit dat de verhoogde spiegel E-peptide die met RIA gevonden is verklaard kan worden door de accumulatie van vrije fragmenten van het E-domein (figuur 4) (13, 44).



**Figuur 4.** Sep-Pak-C18-extracten van 2 ml plasma werden onderworpen aan Sephadex-G-50-gelfiltratiekolomchromatografie. Met behulp van deze methode kunnen eiwitten op grootte gescheiden worden. Eiwitten werden geëluëerd met 0.1 M azijnzuur. De verhouding tussen het elutievolume ( $V_e$ ) van een eiwit en het totaal volume van de kolom ( $V_t$ ) is een maat voor de mobiliteit tijdens gelfiltratie. De  $V_e/V_t$ -waarden van een aantal eiwitten met een bekend molecuulgewicht dienen als referentiepunten. In iedere opgevangen fractie werd vervolgens zowel de hoeveelheid IGF-II- (—●—) als E-peptide- (—□—) immunoreactiviteit bepaald. A: normaal plasma; B: plasma van een patiënt met een hemangiopericytoom en NPTH; C: gepooled plasma van patiënten met chronisch nierfalen.

Waarschijnlijk is dit het gevolg van een afgenomen excretie. Ook normaal plasma bevat vrije E-peptide-fragmenten. Deze bevinding illustreert dat de E-peptide-RIA weliswaar gebruikt kan worden als meetinstrument voor een eerste screening van plasmamonssters, maar niet voor het definitief vaststellen van de concentratie "big" IGF-II. Daarom hebben wij recent in ons laboratorium een ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ontwikkeld die exclusief "big" IGF-II aantoon. Hierbij wordt gebruik gemaakt van zowel een antilichaam tegen 7,5-kD-IGF-II als een antilichaam dat een deel van het E-peptide herkent. Als standaard in deze bepaling wordt een uit Cohnfractie IV van normaal plasma gezuiverd "big" IGF-II-preparaat gebruikt (46). De ELISA-bepaling wordt uitgevoerd in Sep-Pak-C18-extracten van EDTA-plasma- of serummonsters. Wanneer deze methode wordt toegepast op plasma van patiënten met NPTH en nierdialysepatiënten blijkt dat de spiegels "big" IGF-II bij laatstgenoemde categorie inderdaad niet verhoogd zijn (tabel 1). In de literatuur wordt vermeld dat plasmamonssters van patiënten met actieve acromegalie een verhoogd gehalte van het E-peptide bevatten (zoals bepaald met een RIA) (43). In amnionvocht en zaadvloeistof wordt een relatief hoge concentratie E-peptide gemeten. Het is echter niet bekend of het hier om vrije fragmenten of pro-IGF-II gaat. Verder wordt door Daughaday en Trivedi een casus gerapporteerd van een patiënt die chronisch gehemodialyseerd werd en na verloop van tijd hypoglycemie ontwikkelde (47). Het RIA-E-peptidegehalte in het plasma bleek verhoogd te zijn. Echter men kon geen tumor ontdekken. Kolomchromatografische analyse van het plasma wees later uit dat de concentratie "big" IGF-II niet verhoogd was. Boven genoemde bevindingen illustreren dus dat de door ons ontwikkelde ELISA voor "big" IGF-II niet alleen van belang is voor de diagnostiek en follow-up van NPTH, maar ook perspectieven biedt voor verder onderzoek naar de aanwezigheid van "big" IGF-II in plasma en andere lichaamsvloeistoffen onder normale en pathofysiologische condities.

**Tabel 1.** Concentraties van totaal IGF-II, totaal E-peptide en "big" IGF-II zoals bepaald met behulp van respectievelijk RIA en ELISA, in Sep-Pak-C18-extracten van EDTA-plasmamonssters afkomstig van verscheidene patiënten met non-pancreas- $\beta$ -celtumor-geïnduceerde hypoglykemie (NPTH), chronische nierinsufficiëntie (CNI) en gezonde controles.

	totaal IGF-II (nmol/l)	totaal E-peptide (nmol/l)	"big" IGF-II (nmol/l)
NPTH-plasma (n= 9)			
gem. $\pm$ SD:	102,9 $\pm$ 32,4	45,3 $\pm$ 15,9 <sup>1</sup>	22,6 $\pm$ 9,41 <sup>2</sup>
range:	42,3 - 103,1	24,7 - 70,0	9,6 - 31,2
CNI-plasma (n=4)			
gem. $\pm$ SD:	93,7 $\pm$ 41,1	26,8 $\pm$ 6,5 <sup>3</sup>	2,0 $\pm$ 0,8
range:	62,5 - 153,7	20,2 - 35,6	1,2 - 2,9
Normaal plasma (gepooled)	51,5	8,4	3,8

<sup>1</sup>  $p < 0,0001$ ; <sup>2</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>3</sup>  $p < 0,05$  (vs. normaal plasma)

## Literatuur

1. Van Doorn J, Oltmans HF, Wit JM, Van Buul-Offers SC, Jansen M, Van den Brande JL. De klinische relevantie van de meting van insuline-achtige groeifactoren in het plasma. *Ned Tijdschr Geneesk* 1991; 135: 1730-1735.
2. O'Dell SD, Day INM. Molecules in focus - Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 767-771.
3. Van Buul-Offers SC. Insulin-like growth factor-II in the cycle of life. *Biomed Rev* 1996; 5: 65-71.
4. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
5. Jansen M, Holthuisen P, Van Dijk MA, Van Schaik FMA, Van den Brande JL, Sussenbach JS. Structure and expression of the insulin-like growth factor II (IGF-II) gene. In: Sara VR, Hall K, Low H, editors. *Growth factors From genes to clinical application*. New York: Raven Press, 1990: 25-40.
6. LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT, Jr. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995; 122: 54-59.
7. Frasca F, Pandini G, Scalia P et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 3278-3288.
8. Sciacca L, Costantino A, Pandini G et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 1999; 18: 2471-2479.
9. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: Regulation and functions. *Endocr Rev* 1997; 18: 801-831.
10. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000; 21: 215-244.
11. Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 1999; 154: 635-647.
12. Holthuisen P, Van der Lee FM, Ikejiri K, Yamamoto M, Sussenbach JS. Identification and initial characterization of a fourth leader exon and promoter of the human IGF-II gene. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1087: 341-343.
13. Daughaday WH, Trivedi B. Heterogeneity of serum peptides with immunoreactivity detected by a radioimmunoassay for proinsulin-like growth factor-II E domain: Description of a free E domain peptide in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 641-645.
14. Duguay SJ, Jin Y, Stein J, Duguay AN, Gardner P, Steiner DF. Post-translational processing of the insulin-like growth factor-2 precursor - Analysis of O-glycosylation and endoproteolysis. *J Biol Chem* 1998; 273: 18443-18451.
15. Haselbacher G, Humbel RE. Evidence of two species of insulin-like growth factor (IGF-II and "big" IGF-II) in human spinal fluid. *Endocrinol* 1982; 110: 1822-1824.
16. Hudgins WR, Hampton B, Burgess WH, Perdue JF. The identification of O-glycosylated precursors of insulin-like growth factor II. *J Biol Chem* 1992; 267: 8153-8160.
17. Valenzano KJ, Heath-monng E, Tollefsen SE, Lake M, Lobel P. Biophysical and biological properties of naturally occurring high molecular weight insulin-like growth factor II variants. *J Biol Chem* 1997; 272: 4804-4813.
18. Hoekman K, Van Doorn J, Gloude-mans T, Maassen JA, Schuller AG, Pinedo HM. Hypoglycaemia associated with the production of insulin-like growth factor II and insulin-like growth factor binding protein 6 by a haemangiopericytoma. *Clin Endocrinol* 1999; 51: 247-253.
19. Lambert S, Collette J, Gillis J, Franchimont P, Desai C, Gol-Winkler R. Tumor IGF-II content in a patient with a colon adenocarcinoma correlates with abnormal expression of the gene. *Int J Cancer* 1991; 48: 826-830.
20. Irminger JC, Schoenle EJ, Briner J, Humbel RE. Structural alteration of the insulin-like growth factor-II gene in Wilm's tumour. *Eur J Pediatr* 1989; 148: 620-623.
21. Wang SN, Souza RF, Kong DH et al. Deficient transforming growth factor-Betal activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGF-II receptor-mutant tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 2543-2546.
22. Brown KW, Villar AJ, Bickmore W et al. Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 2027-2032.
23. Hedborg F, Holmgren L, Sandstedt B, Ohlsson R. The cell type-specific IGF2 expression during early human development correlates to the pattern of overgrowth and neoplasia in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Pathol* 1994; 145: 802-817.
24. Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol* 2001; 54: 138-144.
25. Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, Sukhatme VP, Rauscher FJ, III. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science* 1992; 257: 674-678.
26. Werner H, Re GG, Drummond IA et al. Increased expression of the insulin-like growth factor I receptor gene, IGF1R, in Wilms tumor is correlated with modulation of IGF1R promoter activity by the WT1 Wilms tumor gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5828-5832.
27. Lee YI, Lee S, Lee Y et al. The human hepatitis B virus transactivator X gene product regulates Sp1 mediated transcription of an insulin-like growth factor II promoter 4. *Oncogene* 1998; 16: 2367-2380.
28. Zapf J. Insulinlike growth factor binding proteins and tumor hypoglycemia. *Trends Endocrinol Metab* 1995; 6: 37-42.
29. Hoekman K, Van Doorn J, Gloude-mans T et al. Tumour-induced hypoglycemia: A case report. *Ann Oncol* 1994; 5: 277-281.
30. Rikken B, Van Doorn J, Ringeling AM, Van den Brande JL, Massa G, Wit JM. Plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF-binding protein-3 in the evaluation of childhood growth hormone deficiency. *Horm Res* 1998; 50: 166-176.
31. Rafferty B, Rigsby P, Gaines-Das RE. Multicentre collaborative study to calibrate IGF-II by bioassay and immunoassay: establishment of the first WHO reference reagent. *Growth Hormone & IGF Research* 2001; 11: 18-23.
32. Rosenfeld RG, Wilson DM, Lee PDK, Hintz RL. Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr* 1986; 109: 428-433.
33. Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev* 1994; 15: 80-101.
34. Timmins AC, Cotterill AM, Hughes SCC et al. Critical illness is associated with low circulating concentrations of insulin-like growth factors-I and -II, alterations in insulin-like growth factor binding proteins, and induction of an insulin-like growth factor binding protein 3 protease. *Crit Care Med* 1996; 24: 1460-1466.
35. Van Doorn J, Cornelissen AJFH, Van Buul-Offers SC. Plasma levels of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) under normal and pathological conditions. *Clin Endocrinol* 2001; 54: 655-664.
36. Van Doorn J, Ringeling A, Shmueli SS et al. Circulating levels of human insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) in health and disease as determined by radioimmunoassay. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 601-609.
37. Ormarsdottir S, Ljunggren O, Mallmin H, Olofsson H, Blum WF, Loof L. Circulating levels of insulin-like growth factors and their binding proteins in patients with chronic liver disease. *Liver* 2001; 21: 123-128.
38. Bennett AE, Silverman ED, Miller III JJ, Hintz RL. Insulin-like growth factors I and II in children with systemic onset juvenile arthritis. *J Rheumatol* 1988; 15: 655-658.

39. Neidel J. Changes in systemic levels of insulin-like growth factors and their binding proteins in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19, 81-84.
40. Renehan AG, Painter JE, O'Halloran D et al. Circulating insulin-like growth factor II and colorectal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3402-3408.
41. Renehan AG, Jones J, Potten CS, Shalet SM, O'Dwyer ST. Elevated serum insulin-like growth factor (IGF)-II and IGF binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2001; 83: 1344-1350.
42. Daughaday WH, Wu J-C, Lee S-D, Kapadia M. Abnormal processing of pro-IGF-II in patients with hepatoma and in some hepatitis B virus antibody-positive asymptomatic individuals. *J Lab Clin Med* 1990; 116:555-562.
43. Daughaday WH, Trivedi B. Measurement of derivatives of proinsulin-like growth factor-II in serum by a radioimmunoassay directed against the E-domain in normal subjects and patients with nonislet cell tumor hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 110-115.
44. Liu F, Baker BK, Powell DR, Hintz RL. Characterization of proinsulin-like growth factor-II E-region immunoreactivity in serum and other biological fluids. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1095-1100.
45. Nanayakkara PWB, Van Doorn J, van den Berg FG, van Groeningen CJ, Pinedo HM, Hoekman K. Treatment of hemangiopericytoma associated hypoglycaemia with embolisation. *Eur J Intern Med* 2002; in press.
46. Jespersen S, Koedam JA, Hoogerbrugge CM, Tjaden UR, van der Greef J, Van den Brande JL. Characterization of O-glycosylated precursors of insulin-like growth factor II

by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectr* 1996; 31: 893-900.

47. Daughaday WH, Trivedi B. Heterogeneity of serum peptides with immunoactivity detected by a radioimmunoassay of proinsulin-like growth factor-II domain: description of a free E domain peptide in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75: 641-645.

---

### Summary

*Insulin-like growth factor (IGF)-II: biological properties and clinical relevance. Van Doorn J, Hoogerbrugge CM, Jansen M and Van Buul-Offers SC. Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 163-169.*

The determination of total IGF-II levels in plasma is useful in the evaluation of GH-deficiency during childhood. IGF-II plays an important role in tumorigenesis. Hence, therapies aimed to inactivate locally IGF-II and/or IGF-receptors could be of clinical relevance. The detection of incompletely processed precursor forms of IGF-II ("big"IGF-II) is of crucial importance in the diagnosis and follow up of patients with non-islet cell tumour induced hyperglycaemia (NICTH). It is likely that recently developed assays for the determination of "big" IGF-II in plasma and other biological fluids contribute to further investigations on its role as a tumour marker in the evaluation of tumours which are not (yet) associated with hypoglycaemia.

*Keywords: IGF-II, pro-IGF-II, non-pancreas-β cell tumour induced hypoglycemia*