Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Nauck

Universitätsmedizin der Universität Greifswald

# Metabolische Signaturen des Insulin-like growth factor 1 anhand von Metabolom-Untersuchungen in Plasma und Urin

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

2019

Vorgelegt von Henrike Knacke geb. am 07.02.1992 in Eutin

Name des Dekans:	Prof. Dr. Max P. Baur
Erstgutachter:	PD Dr. Nele Friedrich
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Martin Reincke (München)
Tag der Disputation:	29.11.2019 um 13:00 Uhr

Ort der Disputation: Klinik für Innere Medizin A, Seminarraum 7.0.15/17 Universitätsmedizin Greifswald

## INHALTSVERZEICHNIS

1	. EINLEITUNG	. 3
	1.1 Fragestellung	3
	1.2 Regulierung der IGF-I-Sekretion	3
	1.3 IGF-Binding Proteins	4
	1.4 IGF-I Signalweg und Effekte	4
	1.5 Physiologische Funktionen von IGF-I und assoziierte Erkrankungen	6
	1.6 Metabolomics	8
2	. MATERIAL UND METHODEN	. 9
	2.1 Studienpopulation	9
	2.2 Phänotypisierung und Labormessungen	9
	2.3 Metabolomics Messungen	10
	2.4 Statistische Analyse	10
3	. ERGEBNISSE	12
4	. DISKUSSION	15
	1 1 Geschlechtsunterschiede in der Assoziation von IGE-I mit dem Metabolom	15
	4.1 deschiedender Station von for 4 mit dem Metabolom	10
	4.2 Steroide	16
	<ul><li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19
	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 16 19 19
	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20
	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 19 20 22
	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23
5.	<ul> <li>4.1 Geschlechtsuhlerschlede in der Assoziation von Grännt dem Metabolom.</li> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24
5	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25
5 6 7	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26
5 6 7 8	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26 31
5 6 7 8	<ul> <li>4.1 Geschiedensteine schiedenstein der Assoziation von für 4 mit dem metabolom.</li> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26 31 32
5 6 7 8	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26 31 32 45
5 6 7 8	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26 31 32 45 56
5 6 7 8	<ul> <li>4.2 Steroide</li></ul>	16 19 19 20 22 23 24 25 26 31 32 45 56 57

## 1. EINLEITUNG

## 1.1 Fragestellung

Der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-I) ist ein Polypeptidhormon und wesentlicher Bestandteil der Growth Hormone (GH)/IGF-I Achse. Neben seinen bekannten physiologischen Wirkungen (siehe Abbildung 2) wie etwa der Stimulation von Wachstum und Proliferation, wurden Veränderungen der Serumkonzentration mit einer Vielzahl bevölkerungsrelevanter Erkrankungen innerhalb epidemiologischer Studien assoziiert. Da bisher nur unzureichende Kenntnisse über die molekularen Mechanismen dieser Beobachtungen vorhanden sind, zielt diese Arbeit auf einen hypothesengenerierenden Ansatz ab. Die umfassende Bestimmung der niedermolekularen Zusammensetzung von diagnostisch relevanten Materialien wie Plasma oder Urin mittels massenspektrometrischer Verfahren - Metabolomics - erlaubt eine vertiefende Einsicht in molekulare Vorgänge auch auf epidemiologischer Ebene. Unter Verwendung geeigneter statistischer Verfahren lassen sich so molekulare Signalwege identifizieren, die in einem beobachtbaren Zusammenhang zu Serumkonzentrationen des IGF-I stehen. Die Einordnung der Ergebnisse in bereits bekannte Assoziationen zu Krankheiten und Stoffwechselvorgängen sowie in neue mögliche pathophysiologische Zusammenhänge soll dazu dienen, neue Erklärungs- und Forschungsansätze aufzuzeigen.

#### 1.2 Regulierung der IGF-I-Sekretion



**Abbildung 1:** Endokriner Regelkreis der IGF-I Sekretion. Abkürzungen: GHRH = Growth Hormone Releasing Hormone, PTH = Parathormon, EGF-I = Epidermal Growth Factor-I IGF-I wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (zu ~ 75%)<sup>1,2</sup>, aber auch andere Gewebe wie beispielsweise das Gehirn, das Myokard, Endothelzellen und glatte Muskelzellen in Blutgefäßen, pulmonale, renale und intestinale Zellen, Zellen der Prostata sowie Knochen- und Knorpelzellen sind in der Lage, IGF-I zu exprimieren<sup>2,3</sup>.

Hypothalamus, Hypophyse und die Leber sowie die weiteren IGF-I-exprimierenden Gewebe bilden einen klassischen endokrinen Regelkreis (Abbildung 1). Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) und Somatostatin aus dem Hypothalamus regulieren die geschlechtsspezifische pulsatile hypophysäre GH Ausschüttung<sup>2</sup>. GH wiederum stimuliert die mRNA-Expression des für IGF-I codierenden Gens, dessen Produkt dann sekretiert wird<sup>4,5</sup>. Wie Abbildung 1 zu entnehmen, tragen weitere hormonelle Stimulatoren<sup>4,6</sup> zur Feinregulation der IGF-I-Sekretion bei. Der Regelkreis unterliegt einer negativen feedback-Hemmung: IGF-I inhibiert die hypophysäre GH-Genexpression<sup>6</sup>, hemmt die hypothalamische GHRH-Freisetzung und stimuliert die Bildung von Somatostatin<sup>1,6</sup>. Zusätzlich haben auch freie Fettsäuren im Plasma einen inhibierenden Effekt auf die GH-Produktion<sup>6</sup>.

## **1.3 IGF-Binding Proteins**

Die Aktivität und Halbwertszeit von IGF-I wird über sechs IGF-binding proteins (IGFBP 1-6) reguliert, die sowohl hemmende als auch stimulierende Wirkung auf IGF-I haben<sup>2</sup>. Weniger als 1% des zirkulierenden IGF-I liegt frei im Serum vor, der größte Anteil ist an IGFBP-3 gebunden (>80%) und bildet einen trimeren Komplex mit der Acid Labile Subunit (ALS)<sup>5,7,8</sup>, einem Stabilisatormolekül, das zur Familie der "leucine-rich-repeat" Proteine gehört<sup>8</sup>. Auch die Bindungsmoleküle stammen neben der Leber aus weiteren Geweben und ihre Sekretion wird unter anderem von GH beeinflusst. Das Verhältnis von IGF-I zu IGFBP-3, die IGF-I/IGFBP-3 Ratio, ist eine Schätzgröße für das freie, biologisch aktive IGF-I<sup>8,9</sup>, sodass im Folgenden beide Begriffe synonym verwendet werden. Für die IGFBPs, insbesondere für IGFBP-3, werden IGF-I unabhängige biologische Effekte wie beispielsweise Inhibierung und Förderung von Zellwachstum und metabolismus, die Induktion von Apoptose sowie im vaskulären System modulierende Effekte auf Angiogenese und atherosklerotische Prozesse diskutiert<sup>2,5,10</sup>. Es gibt Erkenntnisse über einen eigenen Rezeptor für IGFBP-3<sup>5</sup>. Inwiefern IGF-I unabhängige Effekte von IGFBP-3 in beobachtete Assoziationen mit der Ratio eingehen, ist unklar.

## 1.4 IGF-I Signalweg und Effekte

Der IGF-I Rezeptor (IGF-IR) ist ein Tyrosinkinaserezeptor und dem Insulinrezeptor sehr ähnlich (ca. 55% Homologie der Aminosäuresequenz). Es kann zur Hybridisierung der Rezeptorvorstufen kommen, die sowohl Insulin als auch IGF-I binden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität.<sup>7,11</sup>

Die Signaltransduktion des IGF-IR erfolgt im Wesentlichen über zwei intrazelluläre Signalkaskaden. Zum einen wird über die Insulin-Rezeptor Substrate (IRS) 1-4 die Phosphatidylinositol 3' Kinase (PI3K) und schließlich die Akt-Kinase aktiviert<sup>1,12</sup>. Dieses führt über weitere molekulare Mediatoren zu einer Stabilisierung der Mitochondrienmembran und Inhibition pro-



Abbildung 2 (auf Grundlage von: <sup>1,9,12,14</sup>):

Schematische Darstellung der intrazellulären IGF-I Signaltransduktion zur Übersicht über einige intrazelluläre Downstream Messenger mit Effekten.

PIP<sup>2</sup> = Phosphatidylinositol (4,5)-Diphosphat; PIP<sup>3</sup> = Phosphatidylinositol (3,4,5)-Triphosphat; PDK 3-= Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase: BAD = Bcl2-associated Death Promotor; Bcl-XL = B-cell lymphoma-extra large; Bcl2 = B-cell lymphoma 2;FOXO = Forkhead Box Protein; JNK = c-Jun N-**Terminal Kinase** 

Für weitere Abkürzungen siehe Text und Abkürzungsverzeichnis.

apoptotischer Transkriptionsfaktoren und hat somit positive Effekte auf das Zellüberleben<sup>1,12</sup>. Über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)<sup>1</sup> und Inhibierung der Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3)<sup>12</sup> wird die Steigerung der Glycogen-, Lipid- und Proteinsynthese vermittelt, außerdem bewirkt Akt die Verlagerung des Glukosetransporters GLUT4 an die Plasmamembran<sup>12</sup>. Der PI3K/Akt Komplex stimuliert zudem den nuklearen Transkriptionsfaktor-kB (NF-kB)<sup>9,13</sup> und Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)<sup>9,14</sup>, was neben Zellüberleben und (Glukose-) Stoffwechselprozessen<sup>5,14</sup> auch die Proteinsynthese und Zellbeweglichkeit stimuliert<sup>5</sup>. Zum anderen wird in einer zweiten Signaltransduktionskaskade mittels Growth Receptor Binding Protein 2 (Grb2), Scr-Homology Collagen (SHC) und Son of Sevenless (SOS) die Ras/Raf/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Kaskade<sup>9,15</sup> aktiviert. Diese Kaskade mündet entweder bei den Extracellular Signal Regulated Kinases (ERK) 1 oder 2 für wachstums- und differenzierungsfördernde Prozesse<sup>13,16,17</sup> oder bei den p38-Kinasen und der JNK-Molekülfamilie<sup>12</sup>, typischen Transduktoren bei extrazellulärem Stress oder proinflammatorischen Situationen<sup>17,18</sup>. Sowohl über PKC und Akt als auch über MAPK/p38 kann IGF-I den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren und so die Expression von CRE-abhängigen Genen beeinflussen<sup>19</sup>.

Die Aktivierung des IGF-IR bewirkt also intrazellulär die Initiierung vielfältiger Signalmoleküle, stimuliert anabole Veränderungen des Zell- und Gewebestoffwechsels und beeinflusst Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung sowie Genexpression und Transkriptionsaktivität. Hinsichtlich der Auswirkungen, extrazellulären Konsequenzen und generalisierten IGF-I Effekte auf den gesamten Metabolismus sind viele Details allerdings noch unzureichend geklärt.

#### **1.5 Physiologische Funktionen von IGF-I und assoziierte Erkrankungen**

Als Komponente der humanen GH/IGF-I-Achse spielt IGF-I eine wesentliche Rolle für intrauterine (GH-unabhängig) und postnatale Wachstumsprozesse<sup>1,7,20</sup>, bei Dysfunktionen kommt es zu Wachstumsstörungen wie der Akromegalie bei erhöhtem IGF-I bzw. der GH-Insuffizienz mit erniedrigtem IGF-I<sup>1,2</sup>. Die komplexen Auswirkungen von IGF-I auf den Glucose-, Lipid- und Protein-Metabolismus finden sich in verschiedenen Assoziationen zu entsprechenden Krankheitsbildern wieder: Es besteht ein Zusammenhang zwischen IGF-I Serumspiegeln und den Komponenten des Metabolischen Syndroms<sup>21</sup>. Bei Probanden der Framingham Heart Studie wurde eine starke Assoziation zwischen niedrigen IGF-I Spiegeln bzw. der IGF-I/IGFBP-3 Ratio und dem Vorliegen eines Metabolischen Syndroms beschrieben<sup>22</sup>. Für hohe IGF-I-Spiegel liegen widersprüchliche Daten vor: einerseits ist die Prävalenz des Metabolischen Syndroms vermindert<sup>23</sup> und andererseits liegen Daten einer longitudinalen Analyse hoher IGF-I Spiegel mit vermehrter Inzidenz des Metabolischen Syndroms vor<sup>24</sup>. Bezüglich der Entwicklung von reduzierter Insulinsensitivität sowie manifestem Diabetes mellitus Typ 2 verhält es sich ähnlich: sowohl für niedriges IGF-I als auch für hohe IGF-I-Spiegel wurde ein Zusammenhang gefunden<sup>22,25</sup>, mögliche Erklärungsansätze bieten lokale insulin-ähnliche Effekte am IGF-IR peripherer Gewebe<sup>7,21</sup> und eine Reduktion der IGF-I vermittelten Insulinsensitivität<sup>2</sup>. Bei Adipositas treten erniedrigte IGF-I-Spiegel sowie IGF-I/IGFBP-3 Ratio auf, zudem ist für niedriges IGF-I eine Herunterregulation von Genen des Lipidstoffwechsels beschrieben, was mit Dyslipidämie einhergeht<sup>21</sup>. Beispielsweise wurden bei Mäusen mit inaktiviertem hepatischen IGF-I Gen erhöhte Gesamt- und Low-Density Lipoprotein (LDL)-Cholesterinwerte nachgewiesen<sup>2,26</sup>. Bei Probanden der Study of Health in Pomerania (SHIP) ergab sich in der Querschnittsbetrachtung ein positiver Zusammenhang zwischen IGF-I und Gesamt- sowie LDL-Cholesterin und ein negativer Zusammenhang zu High-Density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin, longitudinale Analysen ergaben bisher keine signifikanten Ergebnisse<sup>27</sup>. Experimentell führt eine Administration von IGF-I zu erniedrigten freien Fettsäuren sowie Triglyceriden im Serum der Probanden<sup>7</sup>. Des Weiteren besteht ein enger Zusammenhang zwischen IGF-I und kardiovaskulären Erkrankungen<sup>28</sup>: Niedrige IGF-I-Spiegel sind mit endothelialer Dysfunktion und Apoptose assoziiert und erhöhen das Risiko für Atherosklerose<sup>10</sup>, Koronare Herzkrankheit<sup>29</sup> sowie einen ischämischen Schlaganfall<sup>13,30</sup>. Bei niedrigem IGF-I steigt die Wahrscheinlichkeit für das Entwickeln einer Herzinsuffizienz<sup>10,13,31</sup>. Der protektive Einfluss auf das kardiovaskuläre System<sup>13</sup> lässt sich zumindest teilweise mit der Expression des IGF-IR an Kardiomyozyten und Endothelien sowie glatter Muskulatur der Gefäßwand<sup>28</sup> erklären. Er vermittelt einen positiven Einfluss auf die Kontraktilität, den koronaren Fluss<sup>9</sup> und das myokardiale Remodeling<sup>9,13</sup>.

IGF-I beeinflusst auch die Funktionen anderer innerer Organe, beispielsweise die Regeneration von Lebergewebe<sup>1</sup> sowie die physiologische Entwicklung und Funktion der Niere<sup>1,7</sup>. Es steigert die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und den Renalen Plasma Fluss<sup>7,32</sup>. In der Reproduktion<sup>33</sup> beeinflusst IGF-I sowohl die ovarielle<sup>1,34</sup> als auch die testikuläre<sup>1,7</sup> Funktion positiv. Auch in neuronalem Gewebe besitzt IGF-I protektive Funktionen<sup>9</sup>: es beeinflusst neuronales Überleben, Wachstum und Differenzierung<sup>19</sup> sowie neuroendokrine und kognitive Funktionen im Gehirn<sup>14</sup>. IGF-I stärkt das muskuloskelettale System über Knochenwachstum und Erhöhung der Knochendichte<sup>1,35</sup> sowie Regeneration der Skelettmuskulatur<sup>36</sup>. Eine inverse Assoziation von IGF-I Spiegeln mit Osteoporose ist vielfach beschrieben<sup>8,35</sup>.

Auch das Immunsystem ist stark mit der GH/IGF-I Achse verlinkt: Lymphozyten exprimieren den GH-Rezeptor und GH mRNA<sup>37</sup>. Insgesamt werden IGF-I anti-inflammatorische Funktionen zugeschrieben<sup>1,21</sup>. Es reguliert physiologische und pathologische Immunantworten sowohl über stimulierende als auch inhibierende Prozesse<sup>38</sup>. Auf Basis der SHIP-Studie konnte eine inverse Assoziation zwischen IGF-I-Spiegeln und den Entzündungsmarkern hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP) und Interleukin (IL) 6 sowie eine positive Assoziation zu Fibrinogen gefunden werden<sup>39</sup>.

Weiterhin interessant ist die Assoziation der IGF-I-Achse mit der Regulierung der humanen Alterungsprozesse und Lebenszeit<sup>12,33</sup>, wobei die Studienlage inkonsistent ist: Eine Verminderung der Aktivität im IGF-I Signalweg geht mit verlängerter Lebenszeit einher<sup>9,33</sup>. Weitere Studien beschreiben eine inverse Abhängigkeit zwischen IGF-I Spiegeln und Mortalität<sup>29,40</sup>, während andere eine erhöhte Mortalität nur für Spiegel unter- und oberhalb des Referenzbereiches zeigen<sup>41</sup>. In der SHIP Studie wurde bei niedrigen IGF-I Spiegeln ein höheres Risiko für die multifaktoriell bedingte Gesamtmortalität sowie die karzinomassoziierte Sterblichkeit bei Männern beobachtet<sup>42</sup>. Verschiedene IGF-IR Genotypen, der Transkriptionsfaktor FOXO3A sowie weitere IGF-I-assoziierte Gene werden im Zusammenhang mit Langlebigkeit diskutiert<sup>43–45</sup>.

Es wird deutlich, wie vielfältig der Einfluss von IGF-I auf die Prozesse im menschlichen Körper ist. Es existieren nicht für alle Zusammenhänge eindeutige Studienergebnisse und die zugrundeliegende (Patho-) Physiologie bleibt bis dato wenig verstanden. Ein tieferer Einblick in mit IGF-I assoziierte kleine Moleküle, Metaboliten, könnte als Grundlage für Erklärungsansätze dienen.

## **1.6 Metabolomics**

Neben Genomics, Transcriptomics und Proteomics, ist Metabolomics ein weiteres "-omics" Feld in der Forschung<sup>46</sup>; es werden kleine Moleküle (typischerweise <1.5 kDa) quantifiziert und identifiziert, womit metabolische Fingerabdrücke unterschiedlicher internaler und externaler Stimuli erfasst werden können. Technisch gesehen besteht das Metabolom aus sehr vielen verschiedenen Substanzen mit unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften, die nicht alle mit den gleichen Messmethoden erfasst werden können, sodass eine Kombination verschiedener Herangehensweisen genutzt wird<sup>46</sup>: Mittels Flüssigkeits- oder Gaschromatographie gekoppelter Massenspektrometrie (MS) oder Kernspinresonsanzspektroskopie (engl. NMR) werden Metabolite aus Geweben oder Körperflüssigkeiten quantifiziert und identifiziert<sup>47</sup>. Bei der darauffolgenden Datenanalyse werden weitere Informationen und Erkenntnisse mithilfe statistischer und bioinformatischer Verfahren gewonnen<sup>46,47</sup>. Die verschiedenen Methoden reichen von "targeted analysis", der gezielten Quantifizierung von zuvor definierten Metaboliten, bis zur breiten Detektion aller sowohl bekannten als auch unbekannten Metaboliten beim "non-targeted" Metabolic Profiling<sup>46,48</sup>. Letzteres beinhaltet auch die Detektion unbekannter Metabolite (engl. unknowns), die aber anhand reproduzierbarer spektraler Muster eindeutig beschrieben werden können. Die erfassten Metaboliten erlauben Einblicke in den (patho-)physiologischen Zustand eines Organismus, sie dienen beispielsweise als potentielle Biomarker für verschiedene Erkrankungen. Zudem kann ein endogener Regulator wie beispielsweise IGF-I in Zusammenhang mit Veränderungen auf molekularer Ebene betrachtet werden.

#### 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Studienpopulation

SHIP-TREND umfasst die zweite Kohorte eines bevölkerungsbezogenen Forschungsprojekts in West-Vorpommern, das bereits ausführlich beschrieben wurde<sup>49</sup>. Insgesamt konnten in die Studie 4420 Probanden eingeschlossen werden, von denen eine Subkohorte von 1000 Probanden für eine vertiefte Phänotypsierung ausgewählt wurden. Dabei handelte es sich ausschließlich um Probanden, bei denen bisher kein Diabetes mellitus Typ 2 diagnostiziert wurde. Die erweiterte Phänotypisierung umfasste neben genetischen Analysen auch weitere Untersuchungen von Bioproben der Probanden, u.a. die Bestimmung des Metaboloms von Plasma und Urin mittels MS. Von diesen 1000 Probanden mussten fünf von den statistischen Analysen ausgeschlossen werden, da für diese keine Serumparameter für IGF-I oder IGFBP3 ermittelt werden konnten.

## 2.2 Phänotypisierung und Labormessungen

Die Merkmale und die Anamnese der Probanden wurden in computergestützten persönlichen Interviews erfasst. Der Raucherstatus wurde in aktuelle, ehemalige und Nicht-Raucher unterteilt. Der durchschnittliche Alkoholkonsum pro Tag wurde anhand von getränkespezifischem, purem Ethanolgehalt kalkuliert. Probanden, die mindestens zwei Stunden pro Woche Sport trieben, wurden als körperlich aktiv eingestuft. Der Hüftumfang wurde mit der Genauigkeit von 0,1 cm mit einem unelastischen Maßband in der Mitte zwischen dem unteren Rippenbogen und dem Iliakalkamm in der Horizontalebene gemessen. Die Körpergröße wurde bis auf 1 cm Genauigkeit mit einem digitalen Ultraschallinstrument gemessen und das Gewicht wurde mithilfe einer Standard Digitalwaage bis auf 0,1 kg genau bestimmt, wobei die Probanden leichte Kleidung und keine Schuhe trugen. Bluthochdruck lag vor, wenn entweder ein erhöhter Blutdruck (RR) (systolisch RR von ≥140 mm Hg oder diastolisch RR von ≥90 mm Hg) gemessen oder anamnestisch die Einnahme antihypertensiver Medikamente angegeben wurde. Eine Lebererkrankung wurde anhand anamnestischer Angaben definiert, außerdem wurden alle Probanden mit erhöhten Serum Gamma-Glutamyl Transferase (GGT), Aspartat-Amino Transferase (AST) oder Alanin-Amino Transferase (ALT) Spiegeln von zwei Standardabweichungen (SD) über dem Populationsdurchschnitt als auffällig bezüglich ihrer Leberfunktion eingestuft.

Nüchtern-Blutproben wurden vormittags aus der Vena mediana cubiti in Supination entnommen. Im selben Zeitrahmen wurde Spontanurin gesammelt. Die Proben wurden entweder sofort analysiert oder bei -80°C bis zur Analyse in der Biobank eingelagert. IGF-I und IGFBP-3 Serumkonzentrationen wurden durch automatisierte Two-Site Chemiluminescent Immunoassays auf dem IDS-iSYS (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK) gemessen. Die Assays wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers von ausgebildetem technischem Personal durchgeführt. Im Verlauf der Studie war der Inter-Assay Variationskoeffizient 3.5 % für hohe Spiegel, 4.3 % für mittlere Spiegel und 6.3% für niedrige Spiegel im IGF-I Assay. Im IGFBP-3 Assay war der Variationskoeffizient 8.3%, 8.8% und 10% für jeweils hohe, mittlere und niedrige Spiegel. LDL, Cholesterin, GGT, AST und ALT wurden mit Standardlabormethoden bestimmt (Dimension VISTA; Siemens Healthcare Diagnostics).

#### 2.3 Metabolomics Messungen

Die nontargeted Metabolomics Analyse zum Metabolic Profiling wurde im Genome Analysis Center (Helmholtz Zentrum München, Deutschland) durchgeführt. Detaillierte Beschreibungen der Messungen und Datenprozessierung sowie Anmerkungen sind dem Supplement der wissenschaftlichen Publikation zu entnehmen. Kurz zusammengefasst wurden zwei separate bereits publizierte Analysemethoden mit Flüssigkeitschromatographie und gekoppelter MS angewandt<sup>48</sup>, um ein möglichst breites Spektrum von Plasma- und Urinmetaboliten zu detektieren. Messungen im Urin wurden zudem über einen aus dem Metabolomdaten geschätzten Verdünnungsfaktor normalisiert. Da ein Großteil der Metabolite eine schiefe Verteilung zeigte, wurde zudem eine log-Transformation durchgeführt, um den Annahmen der statistischen Methoden zu genügen. Insgesamt standen 475 Plasma- und 558 Urinmetaboliten für die statistische Analyse zur Verfügung.

#### 2.4 Statistische Analyse

Für deskriptive Analysen wurden kontinuierliche Daten als Median (25.; 75. Quartil) und nominale Daten in Prozent ausgedrückt. Für die bivariate Analyse zum Vergleich von Männern und Frauen wurden der Mann-Whitney U Test (kontinuierliche Daten) oder der χ2 Test (nominale Daten) genutzt. Im ersten Schritt wurden Lineare Regressionsmodelle angewendet, um den Zusammenhang zwischen den IGF-I Spiegeln oder der IGF-I/IGFBP-3 Ratio (unabhängige Variablen) und Plasma- bzw. Urinmetaboliten (abhängige Variablen) zu testen. Hierfür wurden die IGF-I Spiegel logarithmiert. Alle Modelle wurden für Männer und Frauen separat berechnet und für Alter, Rauchen, körperliche Aktivität, Taillenumfang, Bluthochdruck, Lebererkrankungen und LDL-Cholesterin korrigiert. Um die Anzahl falsch-positiver Befunde zu kontrollieren,

10

wurde alle p-Werte nach der Methode von Benjamini-Hochberg für multiples Testen adjustiert (Falsch-Positiv-Rate, FDR *(engl. false discovery rate)*). Ein FDR-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet und impliziert, dass im Mittel weniger als 5% der als signifikant deklarierten Assoziationen falsch-positive Befunde sind.

Um die Interpretation solch einer metabolomweiten Assoziationsstudie zu strukturieren, wurden für jede der Körperflüssigkeiten metabolische Netzwerke als Gaussian Graphical Models (GGMs) konstruiert<sup>50–52</sup>. Details finden sich im Supplement der Publikation. Abhängigkeiten zwischen den Flüssigkeiten konnten durch Übereinanderlegen der GGMs für Plasma und Urin dargestellt werden. Anschließend wurden die Ergebnisse der Linearen Regressionsanalyse in das Diagramm eingebracht, um Cluster regulierter Metaboliten zu visualisieren.

In einem zweiten Schritt wurde Orthogonal Projections to Latent Structures (OPLS) Modelling genutzt um die Vorhersagekraft von Metaboliten (unabhängig) für IGF-I Spiegel oder die IGF-I/IGFBP-3 Ratio (abhängig) zu ermitteln. OPLS Modelle besitzen dabei die Eigenschaft auch mit stark korrelierten Variablen noch immer valide Ergebnisse zu liefern, eine Eigenschaft wie sie konventionelle Lineare Regressionsmodelle nicht erfüllen. Dies ist von besonderer Relevanz, da Metabolite aus identischen Stoffwechselwegen hoch miteinander korreliert sind und auf diese Weise unabhängige Beiträge ermittelt werden können. Die Vorhersagbarkeit des Modells (Q<sup>2</sup>) wurde über ein Kreuzvalidierungsschema evaluiert. Je stärker die Vorhersagekraft, desto größer ist der Q<sup>2</sup>-Wert (max. 1). Statistische Analysen wurden mit SAS version 9.4 (SAS statistical software, version 9.4, SAS Institute, Inc; NC, USA), R 3.0.1 (R Foundation for statistical computing, version 3.0.1, Vienna, Austria) und SIMPCA P + 13.0.02 (Umetrics AM, Umeå, Sweden) durchgeführt.

#### 3. ERGEBNISSE

Allgemeine Charakteristika der analysierten Studienpopulation sind in Tabelle 1 abgebildet. Es konnten 439 männliche und 556 weibliche Probanden in die Analysen eingeschlossen werden. Beide Gruppen, Männer und Frauen, waren durchschnittlich 50 Jahre alt. Frauen waren häufiger Nichtraucher, konsumierten weniger Alkohol als Männer, hatten einen geringeren Hüftumfang und hatten seltener Bluthochdruck. Die Laborwerte HbA1c, Gesamtcholesterin, Triglyceride und die geschätzte GFR waren in weiblichen Probanden signifikant niedriger. Bei Betrachtung der Hormonspiegel waren die IGF-I Spiegel vergleichbar, während IGFBP-3 Spiegel bei Frauen höher waren, sodass sich eine niedrigere IGF-I/IGFBP-3 Ratio bei Frauen im Vergleich zu Männern ergibt.

Charakteristika	Männer (n = 439)	Frauen (n = 556)	р
Alter [Jahre]	50 (39; 61)	51 (41; 60)	0.95
Nikotinkonsum [%]			<0.01
Nichtraucher	31.5	50.6	
Ehemalige Raucher	45.7	28.1	
Gegenwärtige Raucher	22.8	21.3	
Körperlich aktiv [%]	72.9	73.6	0.81
Alkoholkonsum [g/Tag]	8.5 (3.0; 18.4)	2.4 (0.7; 5.5)	<0.01
Hüftumfang [cm]	94 (86; 102)	81 (74; 90)	<0.01
Bluthochdruck [%]	44.1	35.3	<0.01
Hepatopathie [%]	9.3	9.2	0.93
HbA1c [%]	5.2 (4.9; 5.5)	5.1 (4.8; 5.5)	<0.01
Gesamtcholesterin [mmol/l]	5.3 (4.6; 6.1)	5.5 (4.9; 6.3)	<0.01
Triglyceride [mmol/l]	1.31 (0.92; 1.91)	1.15 (0.84; 1.62)	<0.01
eGFR [ml/min/1.73m²]	91 (81; 104)	88 (76; 101)	<0.01
IGF-I [ng/ml]	141 (114; 174)	132 (106; 173)	0.06
IGFBP-3 [ng/ml]	4092 (3475; 4695)	4254 (3652; 4951)	<0.01
IGF-I/IGFBP-3 Ratio	0.035 (0.029; 0.041)	0.031 (0.026; 0.038)	<0.01

## Tabelle 1: Allgemeine Merkmale der Population.

Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis. Kontinuierliche Daten sind als Median (25. Perzentile; 75. Perzentile) angegeben; nominale Daten in Prozent.

\*Es wurden der  $\chi^2$ -test (Nominaldaten) bzw. der Mann-Whitney Test (Intervalldaten) durchgeführt.

Bei den Frauen ergab die Lineare Regressionsanalyse 23 bzw. 38 Metabolite deren Plasmaspiegel signifikant mit IGF-I bzw. IGF-I/IGFBP-3 Ratio Serumspiegeln assoziiert waren (Publikation Tabelle 2), 19 der Plasmametaboliten waren dabei mit beiden Parametern assoziiert (Abbildung 3). Von den Urinmetaboliten waren neun Metabolite mit den IGF-I Spiegeln und 21 mit der IGF-I/IGFBP-3 Ratio assoziiert, wobei sieben der Urinmetaboliten für beides signifikant waren (Abbildung 3, Publikation Tabelle 3). Bei den Männern waren deutlich weniger signifikante Assoziationen zu Metaboliten in Plasma oder Urin zu identifizieren. So waren nur fünf Metaboliten im Plasma und sieben Metaboliten in Urin mit den Hormonparametern assoziiert (Abbildung 1, Publikation Tabelle 2 und 3). Nur ein Metabolit, die Plasmakonzentrationen des Unbekannten X – 12844, waren konsistent bei Männern wie bei Frauen mit den Hormonparametern assoziiert. Auf Grundlage der fehlenden Assoziationen bei den Männern wurden alle folgenden Analysen auf Frauen beschränkt.

Bei Frauen ergab sich die stärkste positive Assoziation mit den IGF-I/IGFBP-3 Ratio Spiegeln im Plasma für Betain und die stärksten inversen Assoziationen für Bradykinin sowie Pipecolat (Abbildung 3, Publikation Tabelle 2). Neben diesen Einzelassoziationen konnten aber auch Cluster, sprich Häufungen von Assoziationen innerhalb von engvernetzen Metaboliten, in den metabolischen Netzwerken identifiziert werden. Bei den Frauen betraf dies Metabolite die eng mit Dehydroepiandrostenedion-Sulfat (DHEA-S) vernetzt waren, sowie Intermediate aus dem Metabolismus von Cortisol, wie etwa 11-Ketoetiocholanolon-Glucuronid (Abbildung 4 und 5). Bis auf Cortisol zeigten all diese Assoziationen eine positive Assoziation mit dem Quotienten IGF-I/IGFBP3. Neben Steroiden waren auch Metabolite aus anderen Stoffklassen assoziiert. Freie Fettsäuren (z.B. Palmitat) und Lysophosphatidyllipide (z.B. 1-Stearoylglycerophosphoethanolamin) waren invers mit dem Quotienten aus IGF-I und IGFBP3 (Abbildung 6, Publikation Tabelle 2) assoziiert. Neben den bereits erwähnten Clustern wurde ein inverser Zusammenhang der IGF/IGFBP-3 Ratio mit Nicotinamid, sowie ein positiver zu Biliverdin und den Nucleotiden Uridin und 5-Methyluridin im Plasma gefunden (Publikation Tabelle 2). Im Urin wurden positive Zusammenhänge der IGF-I/IGFBP-3 Ratio mit Aminosäurespiegeln von Tyrosin und Histidin detektiert (Publikation Tabelle 3).

Vier OPLS Modelle wurden angewendet, um Plasma- bzw. Urinmetabolite zu identifizieren, die eine Vorhersagekraft für IGF-I Spiegel oder die IGF-I/IGFBP-3 Ratio haben (Publikation Abbildung 3 und Supplement Abbildung S2). Drei der OPLS Modelle enthielten eine prädiktive und eine orthogonale, d.h. nicht für die Hormonparametern relevante, Komponente (Plasma: IGF-I/IGFBP-3 Ratio; Urin: IGF-I, IGF-I/IGFBP-3 Ratio) und ein Modell enthielt eine prädiktive und zwei orthogonale Komponenten (Plasma: IGF-I). Die Vorhersagekraft Q<sup>2</sup> reichte von 27.8% bis 41.3% (Plasma: IGF-I - 41.3%, IGF-I/IGFBP-3 Ratio - 32.9%; Urin: IGF-I - 33.1%, IGF-I/IGFBP-3 Ratio - 27.8%). Zur Auswahl bedeutender Metabolite wurde ein normierter Score basierend auf der Wichtung der zur Konstruktion der prädiktiven Komponenten verwendeten Metabolite (VIP (*engl. variable influence on projection*)) berechnet. Mit der Anwendung einer VIP Schwelle von >1 ergaben sich 37 bzw. 58 Plasmametaboliten sowie 45 bzw. 55 Urinmetaboliten, die für die genaue Vorhersage von jeweils IGF-I Spiegeln oder der IGF-I/IGFBP-3 Ratio (Supplement Tabellle S3) von Bedeutung waren. In allen vier Modellen umfassten die Metabolite mit der höchsten VIP (Publikation Abbildung 3 und Supplement Abbildung S2) erneut Steroidderivate wie DHEA-S, Androsteron-Sulfat, Epiandrosteron-Sulfat, Pregnan-Steroid-Monosulfat oder 5alpha-Pregnan-3beta,20alpha-diol-Disulfat und bestätigten die Ergebnisse der Linearen Regression (Supplement Abbildung S3 und S4).



Abbildung 3:

Korrigierte p-Werte aus der multivariablen Linearen Regressionsanalyse von Metaboliten, assoziiert mit IGF-I bzw. **IGF/IGFBP3** der Plasma Ratio in und Urine bei Frauen (oben) und Männern (unten). Die gestrichelte Linie markiert eine false discovery rate (FDR) von 0.05, das Signifiwas kanzniveau anzeigt. Rot eingefärbte Metabolite sind mit IGF-I und der IGF-I/IGFBP-3 Ratio assoziiert. Die Regressionsmodelle sind für Alter, Rauchen, Alkoholkonsum, körperliche Aktivität. Hüftumfang, Lebererkrankungen, LDL Cholesterin und Hypertonus adjustiert.

#### 4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, neue Hypothesen für die vielfältigen mit IGF-I in Verbindung gebrachten Assoziationen zu bevölkerungsrelevanten Erkrankungen zu generieren. Zu diesem Zweck wurde die umfassende Bestimmung des Metaboloms von Plasma und Urinproben als Forschungsansatz gewählt. Dieses molekulare Profiling innerhalb eines populationsbasierten Ansatzes erlaubt einen vertieften Einblick in Stoffwechselwege, die mit Änderungen von IGF-I bzw. der Ratio aus IGF-I und IGFBP3, sprich freiem IGF-I, assoziiert sind. Aufgrund der Vielfalt der Befunde werden diese im Rahmen der deutschen Arbeit nur angeschnitten und punktuell weiter erläutert, für eine ausführlichere Darstellung möchte ich an dieser Stelle ergänzend auf die Publikation der Studie im Anhang des Textes verweisen.

#### 4.1 Geschlechtsunterschiede in der Assoziation von IGF-I mit dem Metabolom

Der auffallendste Befund der vorliegenden Arbeit ist die große Diskrepanz in den Assoziationsprofilen von IFG-I in Frauen (>50 Metabolite) und Männern (<10 Metabolite). Aus epidemiologischer Sicht deckt sich diese Beobachtung mit einer Reihe von Studien, in denen bereits geschlechtsspezifische Assoziationen bzgl. IGF-I im Hinblick auf Mortalität<sup>42</sup>, Atherosklerose<sup>10,53</sup> oder den Response von IGF-I nach Behandlung mit rekombinantem humanen GH<sup>54</sup> auffielen. Neben IGF-I-spezifischen Effekten sind auch IGF-I-assoziierte Phänotypen, wie etwa die Prävalenz des metabolischen Syndroms oder ein Hypertonus durch Geschlechtsunterschiede gekennzeichnet, was sich nach Überschreiten der Menopause verändert<sup>55,56</sup>. Diesbezüglich sind viele pathophysiologischen Zusammenhänge bis heute ungeklärt<sup>57</sup>. Da insbesondere bei männlichen Probanden niedriges zirkulierendes IGF-I ein metabolischer Risikofaktor zu sein scheint<sup>42</sup>, kann der generell gute Gesundheitszustand der vorliegenden Studienpopulation zum Fehlen signifikanter Ergebnisse in dieser Gruppe beitragen haben. Zudem haben die Geschlechter insgesamt ein unterschiedliches Metabolom mit einer insgesamt höheren Konzentration an Metaboliten bei Männern<sup>58</sup>, sodass sich kleine Variationen im IGF-I Spiegel weniger auswirken. Einen statistischen Beleg für diese Theorie konnten wir über Verfahren des maschinellen Lernens, sprich Random-Forest-Analysen, auf Basis der vorliegenden Studiendaten untermauern (Supplement Abbildung 5 und 6). So waren zur Prädiktion von IGF-I Spiegeln in Männern und Frauen unterschiedliche Faktoren von Relevanz. Während Alter und Hüftumfang bei beiden Geschlechtern Prädiktoren waren, so unterschieden sich der Einfluss von GGT (relevant bei Männern) und die Prävalenz eines Hypertonus (relevant bei Frauen) als signifikant unterschiedlich. Generell erschien der Einfluss der Leberfunktion, abgeleitet durch die Relevanz der Surrogatmarker ALT und GGT, bei Männern als bedeutender Prädiktor für freies IGF-I. Wohingegen bei Frauen ein großer Einfluss durch Parameter des Lipidstoffwechsels offensichtlich war. Diese geschlechtsspezifischen metabolischen Konditionen mit Einfluss auf log(IGF-I) oder die IGF-I/IGFBP-3 Ratio könnten sich trotz Adjustierung der Daten für die meisten der Variablen auf das Metabolom übertragen und die unterschiedlichen Ergebnisse für Männer und Frauen teilweise erklären. Ein Beispiel ist die starke Assoziation zwischen der IGF-I/IGFBP-3 Ratio und Lipidderivaten im Plasma bei weiblichen Probanden, die sich bei Männern nicht zeigte.

Die Relevanz der Hypertension für IGF-I Spiegel bei Frauen könnte in unmittelbarem Zusammenhang zum Metaboliten Bradykinin stehen, welcher ein potenter Vasodilatator ist<sup>59,60</sup>. Ergänzend zu den geschlechtsspezifischen metabolischen Konditionen mit Einfluss auf die GH/IGF-I-Achse ist auch die Assoziation zwischen Steroidhormonen und IGF-I, die sich aus den vorliegenden Daten ergibt, von Interesse für weitere Erklärungsansätze.

## 4.2 Steroide

Angesichts der geschlechtsspezifischen Ergebnisse ist interessant, dass bisherige Veröffentlichungen auf einen komplexen Zusammenhang zwischen Geschlechtshormonen und IGF-I Spiegeln hindeuten: Testosteron ist über GH als aktivierenden Mediator positiv mit IGF-I assoziiert<sup>61,62</sup>. Für Östrogen ist ein hemmender Einfluss auf IGF-I Spiegel beschrieben<sup>61,63,64</sup>, der höchstwahrscheinlich über Inhibition der hepatischen IGF-I mRNA Produktion vermittelt wird<sup>65,66</sup>. Im Detail inhibiert Östrogen den JAK/STAT-Pathway, der normalerweise vom GH aktiviert wird und in die IGF-I Transkription involviert ist<sup>67</sup>. Außerdem induziert Östrogen SOCS-2 und damit Inhibitoren des GH signaling<sup>62,67</sup>. Wichtige Gegenspieler der östrogenabhängigen IGF-I Modulation sind Progesteron-Abkömmlinge mit androgenen Eigenschaften<sup>64</sup>.

DHEA-S ist das abundanteste Steroidhormon im menschlichen Körper und kann in verschiedene Androgene umgewandelt werden<sup>68</sup>. DHEA ist z.B. das Vorläufermolekül von Androstenedion, einem Substrat für die Testosteron- und Östrogensynthese<sup>69</sup>. Eine positive Assoziation mit freiem IGF-I bei Frauen ist vorbeschrieben<sup>70</sup>. Insgesamt könnten die beschriebenen Effekte und Synthesewege die starke Assoziation zwischen IGF-I und dem Cluster von DHEA-S verlinkten Metaboliten erklären.



#### Abbildung 4:

oben: DHEA-S-assoziierter Ausschnitt aus dem übereinandergelegen GGM für Plasma (blau) und Urin (orange) mit integrierten Ergebnissen der Linearen Regressionsanalyse für die IGF-I/IGFBP-3 Ratio. Signifikant mit der Ratio assoziierte Metabolite sind mittels größerer und dunkler gefärbter Knotenpunkte hervorgehoben.

unten: Mittelwert mit 95% Konfidenzintervall für signifikante Metabolite in Quartilen der IGF-I/IGFBP-3 Ratio in Plasma (blau) und Urin (orange).

par. corr. = Partielle Korrelation

Neben DHEA ist Pregnenolon ein maßgebliches Vorläufermolekül der Steroidhormonsynthese<sup>71</sup> für z.B. Cortisol und auch Pregnenolon-Sulfat, Pregnanediol-3-Glucuronid and 5alpha-Pregnan-3beta,20alpha-Diol-Disulfate. Für diese haben wir eine Vorhersagekraft für IGF-I gefunden. IGF-I stimuliert einige Enzyme der Cortisol- und Androgensynthese (17-alpha-Hydroxylase/17,20-Lyase, 21- und 11-beta-Hydroxylase)<sup>72</sup>: Somit erhöhen sich IGF-I abhängig DHEA, Androstenedion, 11-Deoxycortisol und Glukokortikoide, gleichzeitig ist das Vorkommen von Pregnenolon und 17-Hydroxyprogesteron verringert. Dieses liefert eine mögliche Erklärung für die detektierten signifikanten Assoziationen zwischen IGF-I und Pregnenolon-Derivaten.

Neben DHEA-S war eine Reihe von Intermediaten des Cortisolstoffwechsels sowie Cortisol selbst stark mit IGF-I Spiegeln in Frauen assoziiert. Cortisol ist ein Kortikosteroidhormon, das von der Nebennierenrinde synthetisiert und in den Kreislauf freigesetzt wird. Wie IGF-I ist es in die physiologische Regulation von Stress und Entzündungsprozessen involviert<sup>73,74</sup>. Cortisol hat hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation<sup>75</sup> und ist positiv mit Insulinresistenz, Dyslipidämie und dem Metabolischen Syndrom<sup>76</sup> sowie kardiovaskulären Erkrankungen<sup>77</sup> assoziiert. Somit bewirkt es gegenteilige metabolische Effekte von IGF-I, was mit der hier beobachteten negativen Assoziation in Einklang zu bringen ist, sodass sich zwischen IGF-I, Cortisol und assoziierten Erkrankungen ein funktionelles Dreieck ergibt. Es sind einige Zusammenhänge zwischen Cortisol und IGF-I beschrieben: Beispielsweise der negative Einfluss von Cortisol auf IGF-I Tran-

skripte und das IGF-I Protein<sup>78</sup> sowie die inverse Korrelation von Cortisol mit IGF-I und direkte Korrelation mit IGFBP-1<sup>20</sup>. Dazu passt, dass die Therapie mit Hydrocortison, der therapeutischen Variante von Cortisol, niedrige IGF-I-Spiegel induziert<sup>66</sup> sowie die IGF-I/IGFBP-3 Ratio verringert<sup>61</sup>. Eine weitere mögliche Erklärung für diese negative Assoziation zwischen der GH/IGF-I Achse und dem Glukokortikoid Metabolismus, bzw. IGF-I und Cortisol, bietet die Inhibition der 11ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase durch IGF-I, sodass IGF-I abhängig die Cortisolsynthese verringert wird<sup>79</sup>.

Ein kleiner Anteil von Cortisolmetaboliten (3-5%) wird im Urin als 17-oxo-Steroide wie z.B. 11-Ketoetiocholanolon oder seine konjugierte Form 11-Ketoetiocholanolon-Glucuronid ausgeschieden<sup>80</sup>. Bei Patienten mit Akromegalie ist eine gesteigerte Ausscheidung von 11-Ketoetiochilanolon im Urin beobachtet worden, wobei eine Normalisierung der GH Spiegel auch zu einer Normalisierung der Urinausscheidung von 11-Ketoeitiocholanolon führte<sup>80</sup>. Die vorliegenden Daten zeigen eine eindrücklich positive Assoziation von 11-Ketoetiocholanolon im Urin zur IGF-I/IGFBP-3 Ratio, was den beschriebenen Zusammenhang in gesunden Probanden bestätigt.



#### Abbildung 5:

oben: Cortisol-assoziierter Ausschnitt aus dem übereinandergelegen GGM für Plasma (blau) und Urin (orange) mit integrierten Ergebnissen der Linearen Regressionsanalyse für die IGF-I/IGFBP-3 Ratio. Signifikant mit der Ratio assoziierte Metabolite sind mittels größerer und dunkler gefärbter Knotenpunkte hervorgehoben.

unten: Mittelwert mit 95% Konfidenz-intervall für signifikante Metabolite in Quartilen der IGF-I/IGFBP-3 Ratio in Plasma (blau) und Urin (orange).

par. corr. = Partielle Korrelation sign. = signifikant

#### 4.3 Zusammenhang zum Bradykinin-Signalling

Unsere Daten ergaben eine starke inverse Assoziation von Bradykinin und seinem aktiven Metaboliten Bradykinin (des-arg)<sup>60</sup> zu freiem IGF-I. Bradykinin ist ein Kinin mit insbesondere vasodilatatorischer Funktion<sup>59,60,81</sup> und hat einige funktionelle Assoziationen mit dem IGF-I Signalling: Beide Stoffe aktivieren intrazellulär MAPK und stimulieren die Prostacyclin-Synthese<sup>82</sup>. Den beobachteten negativen Zusammenhang im Plasma betreffend, wurde für Bradykinin schon beschrieben, dass es IGF-I-mRNA-Spiegel in Fibroblastenzellen absenkt<sup>83</sup>. Dabei kommt ligandenabhängig zu einer intrazellulären Anreicherung von Phosphatidylcholines Abkömmlingen wie Cholin und Phosphocholin; diese könnten spezifische Isoformen der PKC aktivieren, die dazu in der Lage sind, die IGF-I mRNA Synthese zu inhibieren<sup>84</sup>. Das Zusammenspiel zwischen IGF-I und Bradykinin lässt sich mitunter auch auf Entzündungsprozesse erweitern, wobei IGF-I und Bradykinin inverse Funktionen zukommen: IGF-I werden antiinflammatorische Effekte zugeschrieben<sup>1,21</sup>, wohingegen Bradykinin bei Entzündungen vermehrt ausgeschüttet wird<sup>85</sup>. Insbesondere für chronisch entzündliche Zustände der Gefäße wie beispielsweise Atherosklerose, ist dieser Zusammenhang von Bedeutung: Atherosklerose ist mit niedrigen IGF-I Spiegeln assoziiert<sup>10</sup> und auch das Kallikrein-Kinin-System spielt hier eine Rolle<sup>59</sup>.

Neben Bradykinin und seinem aktiven Metaboliten Bradykinin (des-arg) zeigt ein drittes Peptid eine inverse Relation zu IGF-I: Cyclo (leu-pro), das zu der großen Familie der Zyklischen Dipeptide gehört. Diese Metaboliten haben anti-mutagene und anti-tumor Eigenschaften; für Cyclo (leu-pro) selbst wurden wachstumsinhibierende Effekte beschrieben<sup>86</sup>.

## 4.4 Aminosäurestoffwechsel

Die stärkste Assoziation in der vorliegenden Studie zeigte sich zu Betain und dem Lysinabkömmling Pipecolat. Ein Betain-induzierter Anstieg der GH- und IGF-I-Spiegel, der zudem mit einem Cortisolabfall einhergeht, ist für männliche Probanden bereits beschrieben<sup>87</sup>. Wird dieses für Frauen angenommen, sind unsere gefundene positive Assoziation zu Betain und inverse Assoziation zu Cortisol mit diesen Beobachtungen konsistent. Zudem wurden einige direkte Relationen zwischen Betain und IGF-I beobachtet: Betain steigert nach Inhibierung mit Ethanol die hepatische IGF-I Sekretion über den p42/44 MAPK Pathway<sup>88</sup> und stimuliert die Freisetzung von GH und IGF-I<sup>89</sup>. Insgesamt kommt somit Betain-abhängig ein höherer IGF-I Spiegel zustande. Als wichtiger Methylgruppendonator erhält Betain die Konzentration und Regeneration von Methionin und S-Adenosylmethionin in der Leber<sup>90</sup> für physiologische Entgiftungs- und Syntheseprozesse - ein Prozess, der auch die Verfügbarkeit von hepatischem IGF-I und die anabole Wirkung von IGF-I beeinflussen könnte. Zudem lässt sich eine weitere Verbindung über Erkrankungen herstellen, für die veränderte Spiegel von IGF-I und Betain beschrieben wurden: Diese umfassen kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes und Komponenten des Metabolischen Syndroms wie Dyslipidämie<sup>90,91</sup>.

Die Aminosäure Pipecolat, für die wir eine starke inverse Assoziation mit IGF-I fanden, kommt als Lysin-Abbauprodukt vor<sup>92</sup>. Für alimentäres Lysin und IGF-I ist ein positiver Zusammenhang beschrieben<sup>93</sup>, worüber sich indirekt eine Verbindung zu unserer beobachteten inversen Assoziation herstellen ließe (vermindertes Vorkommen von Pipecolat bei reduzierter Lysin-Degradation). Für Pipecolat selbst ist bisher keine Assoziation mit IGF-I beschrieben. Es lassen sich eventuell Zusammenhänge zu Zelldifferenzierung und -proliferation<sup>94,95</sup>, Protein- und Glukosemetabolismus<sup>92</sup> sowie physiologischer Leber- und endokriner Funktion <sup>96</sup> herstellen.

Zusammengefasst sind mit Bradykinin, Betain und Pipecolat drei sehr stark assoziierte Metabolite in der vorliegenden Veröffentlichung Bestandteile des Protein-, Peptid- und Aminosäure-Stoffwechsels, welcher insgesamt stark von IGF-I beeinflusst wird. Zusätzlich finden sich für die drei Metabolite Überschneidungen mit wichtigen Feldern der IGF-I Funktionen wie Minderung metabolischer Erkrankungen, inflammatorischen Prozessen und eventuell Wachstum, Differenzierung und Proliferation.

## 4.5 Lysolipide und Fettsäuren

Wie einleitend erläutert, ist IGF-I mit dem Fettstoffwechsel assoziiert<sup>21,27</sup>. In dieser Analyse zeigen sich Assoziationen zu Glycerophospholipiden, Phosphatidylinositolen und Phosphatidylcholinen. Eine IGF-I-induzierte Abnahme der Polyphosphoinositol-Lipidmasse im Nukleus ist bereits beschrieben<sup>97</sup>, zudem bewirkt die IGF-I-Signaltransduktion über PI3K einen Anstieg der cytoplasmatischen Phosphatidyl-Inositol-Phosphate (PIP<sup>3</sup>)<sup>12</sup>, was sich insgesamt auf die Phospholipid-Derivate im Plasma auswirken könnte. Auch weitere Plasmalipidmetabolite sind in der vorliegenden Studie bei Frauen vor allem invers mit IGF-I assoziiert. IGF-I scheint den Lipid-stoffwechsel auf transkriptioneller Ebene zu beeinflussen<sup>21</sup> und führt zu einem Abfall von freien Fettsäuren und Triglyceriden im Blut<sup>7</sup>. Wobei nicht-veresterte Fettsäuren wiederum einen inhibierenden Effekt auf die GH Sekretion haben<sup>6</sup>, sodass wechselseitige Regulationsmechanismen bestehen. Wir fanden zudem starke Assoziationen für die Lysolipide (1-Stearoyl-Glycerophosphoethanolamin (Synonym: Lysophosphatidylethanolamin) und 1-Palmitoyl-

Glycerophosphat) und den Unbekannten X-11372 mit freiem IGF-I. 1-Stearoyl-Glycerophosphoethanolamin ist ein Phospholipidderivat, das von der Phospholipase A2 generiert wird<sup>98</sup>. Lysophospholipide sind typischerweise bei inflammatorischen Zuständen erhöht<sup>98</sup>, unter anderem Lysophosphatidylcholin bei Atherosklerose<sup>99</sup>. IGF-I kann das Vorkommen eini-Phospholipid-Abkömmlinge verändern, insbesondere Lysophosphatidylethanolamin ger selbst<sup>100</sup>. Palmitoleat ist eine häufige Komponente von Glyceriden in humanem Fettgewebe, bei adipösen Menschen erhöht und hat Einfluss auf die Insulinsensitivität<sup>101</sup>, wie bereits für Palmitat in der Veröffentlichung diskutiert. Palmitoleat und 1-Palmitoyl-Glycerophosphat können als häufige und repräsentative Metaboliten für die vorwiegend inverse Assoziation von IGF-I mit Fettsäureabkömmlingen gesehen werden. Zusammenfassend sind für viele assoziierte Fettsäurederivate funktionelle und pathophysiologische Schnittpunkte mit IGF-I zu finden, insbesondere für Inflammation und Insulin-assoziiert.



 Abbildung 6: Netzwerk von Plasmalipiden inklusive Fettsäuren, eingefärbt nach der false discovery rate (FDR) für ihre

 Assoziation mit der IGF-I/IGFBP-3 Ratio. GE = glycerophosphoethanolamine; GC = glycerophosphocholine.
 21

#### 4.6 Translation in den klinischen Kontext und Ausblick

Die beträchtlichen Geschlechtsunterschiede im IGF-I assoziierten Metabolom sind zur Aufklärung geschlechtsspezifischer epidemiologischer Unterschiede von Bedeutung. Inwiefern auch klinische Therapieansätze darauf abgestimmt werden müssen, bleibt in zukünftigen Studien zu klären. Außerdem wären Kinder und Adoleszente eine Kohorte von besonderem Interesse zukünftiger Studien, um den Einfluss der prä- und postpubertären Steroidhormone auf das Metabolom abbilden zu können. SHIP TREND umfasst Probanden erst ab einem Alter von 20 Jahren, sodass hier dazu keine Aussage getroffen werden kann.

Wie zuvor und in der Veröffentlichung ausführlich beschrieben, haben viele der assoziierten Metabolite Überschneidungspunkte mit IGF-I assoziierten Erkrankungen. Für kardiovaskuläre Erkrankungen im Allgemeinen fanden wir Cortisol und Betain, für Atherosklerose Bradykinin und Lysophosphatidylderivate. Die Regulierung von IGF-I modulierten Entzündungszuständen könnte von Bradykinin, Cortisol, DHEA, dem Prostaglandin E1-Vorläufer Dihomo-linolenat, Lysophosphatidylderivaten und dem Docosapentaenoat-Abkömmling Docosahexaenoatsäure beeinflusst werden. Zudem können die IGF-I assoziierten Metabolite Palmitat, Palmitoleat, Cortisol, DHEA und Betain bei Pathologien des Insulinstoffwechsels, insbesondere Diabetes mellitus, eine Rolle spielen. Auch für den Zusammenhang von IGF-I mit Dyslipidämie und dem Metabolischen Syndrom kommen Cortisol und Betain als Mediatoren infrage. Bei Wachstum, Zelldifferenzierung sowie Tumorerkrankungen könnten für die Metabolite Cyclo (leu-pro), Pipecolat, die Lysophosphatsäure 1-Palmitoyl-Glycerophosphat und alpha-Hydroxyisovalerate funktionelle Zusammenhänge vermutet werden. Diese Aufzählung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit und erlaubt nur einen groben Einblick in die vielfältigen metabolischen Prozesse, die den IGF-I assoziierten Erkrankungen zugrunde liegen. Zukünftige Forschungsinitiativen werden zeigen, welche unserer Hypothesen sich bestätigen wird und welche der Metabolite tatsächlich eine pathogenetisch relevante Rolle spielen. Es bleibt zu klären, welche Metabolite potentielle Biomarker für Erkrankungen aus dem metabolischen Spektrum sind sowie zur Entwicklung therapeutischer Ansätze dienen können.

Die therapeutische Anwendung von IGF-I selbst ist von großem Interesse und wird bereits in klinischen Studien getestet<sup>1,9</sup>: Die IGF-I Präparate (*mecasermin, mecasermin rinfabate* und *polyethylene glycol modified IGF-1*<sup>9</sup>) erzielten bereits positive Effekte bei der Therapie von metabolischen Erkrankungen in Hinblick auf Insulinsensitivität und Dyslipidämie sowie Osteopenie/Osteoporose<sup>21</sup>. Aus Studien zum Effekt auf Muskeldystrophien<sup>102</sup> sowie der Therapie von angeborenen Entwicklungsstörungen wie dem Rett-Syndrom und dem Fragilen X-Syndrom<sup>103</sup> gibt es positive Ergebnisse. Auch zur Therapie des akuten Nierenversagens liegen erste vielversprechende Forschungsergebnisse vor<sup>104</sup>. Limitationen der klinischen Anwendung sind vor allem die IGF-I/IGF-IR-assoziierte Tumorgenese, hinzu kommen unter anderem Katarakt und renale Hypertrophie<sup>8,9,105</sup>. Ergebnisse verschiedener Studien zur Anwendung von IGF-IR-Antikörpern in der Tumortherapie erbringen bisher keine signifikanten Therapievorteile, wobei weitere Investigation in Biomarker-selektierten Patientengruppen gefordert wird<sup>106</sup>.

## 4.7 Stärken und Limitationen

Die größte Stärke der vorliegenden Publikation ist die große Probenanzahl in Kombination mit der Anwendung von Metabolic Profiling aus Plasma und Urin mittels MS, welche derzeit die Methode mit der höchsten Auflösungskraft darstellt. Die non-targeted Herangehensweise ermöglicht die effektive und sensitive Erfassung des metabolischen Profils von einem globalen Gesichtspunkt aus, ohne Fokussierung auf bereits bekannte Stoffwechselwege. Auf eine bisher einzigartige Weise konnten so multiple Assoziationen zwischen IGF-I und dem Metabolom erfasst werden. Es sollten trotzdem einige Limitationen in Betracht gezogen werden: Durch den Querschnittscharakter der Studie sind Erkenntnisse über dynamische Veränderungen in Bezug auf IGF-I oder mögliche Wechselbeziehungen zu Komorbiditäten nur eingeschränkt zu gewinnen. Zudem gründen sich die präsentierten Ergebnisse nur auf die gegenwärtige Studienpopulation, sodass eine Replikation in unabhängigen populationsbasierten Patientenkohorten erforderlich ist. Trotz der Limitationen zeigt die vorliegende Studie einige beachtliche Hypothesen über die IGF-I Effekte auf molekularer Ebene, was einen weiteren Teil zum Verständnis der IGF-I assoziierten Erkrankungen über Akromegalie und GH-Insuffizienz hinaus beiträgt.

#### 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Studie ist die erste, die den breiten Effekt von IGF-I auf den menschlichen Metabolismus abbildet. Es zeigt sich ein facettenreiches Bild aus IGF-I assoziierten Metaboliten in Plasma und Urin, das die vielfältigen biologischen Effekte von IGF-I repräsentiert. Ein besonderer Befund ist die große Diskrepanz zwischen Frauen und Männern in den metabolischen Profilen von IGF-I, die eine Verbindung zu geschlechtsspezifischen Assoziationen zwischen IGF-I und bevölkerungsrelevanten Erkrankungen darstellen könnte. Zudem konnte der Zusammenhang von IGF-I mit dem Lipidstoffwechsel sowie Peptiden und Aminosäuren bestätigt werden. Für einige dieser Assoziationen gibt es nach aktuellem Forschungsstand bereits molekulare zellbiologische Erklärungsansätze.

Viele der detektierten Metaboliten lassen sich in den Zusammenhang zu IGF-I assoziierten Erkrankungen einordnen: beispielsweise Betaine und Cortisol mit kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes, Dyslipiämie und dem Metabolischen Syndrom. Bradykinin und einige Fettsäurederivate sowie Cortisol verbinden IGF-I mit inflammatorischen Prozessen, ihre inverse Assoziation mit IGF-I kann unter anderem zur Erklärung des Zusammenhangs mit endothelialen Entzündungsprozessen wie der Atherosklerose beitragen. Für andere Metabolite ergeben sich Assoziationen zu Wachstum und Zelldifferenzierung, darunter Phospholipide sowie Aminosäure- bzw. Peptidabkömmlinge.

Unsere Daten bestätigen den vielfältigen Einfluss von IGF-I auf den menschlichen Metabolismus, wie aus vorherigen Experimentalstudien beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse aus relativ gesunden Probanden erlaubt die Identifikation von IGF-I assoziierten Biomarkern. Warum sich nur für einige spezifische Repräsentanten pro Stoffgruppe signifikante Assoziationen ergeben und welche spezifischen molekularen zellbiologischen Prozesse dem zugrunde liegen, kann hier nicht allumfassend beantwortet werden. Zur weiteren Überprüfung der generierten Hypothesen, zur Klärung der genauen pathophysiologischen Auswirkungen von IGF-I auf den Metabolismus und auch zur Findung neuer Diagnose- und Therapiekonzepte für IGF-I assoziierte Erkrankungen, sind weitere unabhängige, interventionelle und experimentelle Studien erforderlich.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALS	Acid Labile Subunit
ALT	Alanin-Amino Transferase
AST	Aspartat-Amino Transferase
BMI	Body Mass Index
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
DHEA(-S)	Dehydroepiandrosteron (-sulfat)
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FDR	False Discovery Rate
(e)GFR	(geschätzte) Glomeruläre Filtrationsrate
GGM	Gaussian Graphical Model
GGT	Gamma-Glutamyl Transferase
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
Grb2	Growth Receptor Binding Protein 2
GSK3	Glykogen Synthase Kinase-3
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
HDL	High-Density Lipoprotein
hsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
IGFBP	Insulin-like Growth Factor binding protein
IGF-I	Insulin-like Growth Factor I
IGF-IR	Insulin-like Growth Factor I Rezeptor
IL	Interleukin
IRS	Insulin Receptor Substrate
JAK/STAT	Januskinase/Signal Transducers and Activators of Tanscription
LDL	Low-Density Lipoprotein
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NF-kB	Nuclear Transcriptional Factor-kB
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OPLS	Orthogonal Projections to Latent Structures
РІЗК	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
РКС	Proteinkinase C
RR	Blutdruck
SD	Standardabweichung
SHC	Scr-homology collagen
SHIP	Study of Health in Pomerania
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
VIP	variable influence on projection

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1. Puche, J. E. & Castilla-Cortázar, I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. *J. Transl. Med.* **10**, 1–29 (2012).
- 2. Ohlsson, C., Mohan, S., Sjögren, K., Tivesten, Å., Isgaard, J., Isaksson, O., Jansson, J.-O. & Svensson, J. The Role of Liver-Derived Insulin-Like Growth Factor-I. *Endocr. Rev.* **30**, 494–535 (2009).
- 3. D'Ercole, A. J., Applewhite, G. T. & Underwood, L. E. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev. Biol.* **75**, 315–328 (1980).
- 4. Rotwein, P., Bichell, D. P. & Kikuchi, K. Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 358–364 (1993).
- 5. Lee, H., Kim, S. R., Oh, Y., Cho, S. H., Schleimer, R. P. & Lee, Y. C. Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways: A novel therapeutic approach for asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **50**, 667–677 (2014).
- 6. Vijayakumar, A., Yakar, S. & LeRoith, D. The Intricate Role of Growth Hormone in Metabolism. *Front. Endocrinol.* (*Lausanne*). **2**, 1–11 (2011).
- 7. Jones, J. I. & Clemmons, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* **16**, 3–34 (1995).
- 8. Juul, A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Hormone and IGF Research* **13**, 113–170 (2003).
- 9. Ren, J. & Anversa, P. The insulin-like growth factor I system: Physiological and pathophysiological implication in cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome. *Biochem. Pharmacol.* **93**, 409–417 (2015).
- 10. Bach, L. A. Endothelial cells and the IGF system. J. Mol. Endocrinol. 54, R1–R13 (2015).
- Siddle, K., Ursø, B., Niesler, C. A., Cope, D. L., Molina, L., Surinya, K. H. & Soos, M. A. Specificity in ligand binding and intracellular signalling by insulin and insulin-like growth factor receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 513–525 (2001).
- 12. Chitnis, M. M., Yuen, J. S. P., Protheroe, A. S., Pollak, M. & Macaulay, V. M. The Type 1 Insulin-Like Growth Factor Receptor Pathway. *Clin. Cancer Res.* **14**, 6364–6370 (2008).
- 13. Troncoso, R., Ibarra, C., Vicencio, J. M., Jaimovich, E. & Lavandero, S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 128–137 (2014).
- 14. Jung, H. J. & Suh, Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front. Genet.* 5, 1–13 (2015).
- 15. Vincent, A. M. & Feldman, E. L. Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horomone IGF Res.* **12**, 193–197 (2002).
- 16. Asati, V., Mahapatra, D. K. & Bharti, S. K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **109**, 314–341 (2016).
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.* 22, 153– 183 (2001).
- 18. Wagner, E. F. & Nebreda, A. R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**, 537–549 (2009).
- Pugazhenthi, S., Boras, T., O'Connor, D., Meintzer, M. K., Heidenreich, K. A. & Reusch, J. E.-B. Insulin-like Growth Factor I-mediated Activation of the Transcription Factor cAMP Response Element-binding Protein in PC12 Cells. J. Biol. Chem. 274, 2829–2837 (1999).
- 20. Cianfarani, S., Germani, D., Rossi, L., Argiro, G., Boemi, S., Lemon, M., Holly, J. & Branca, F. IGF-I and IGFbinding protein-1 are related to cortisol in human cord blood. *Eur. J. Endocrinol.* **138**, 524–529 (1998).
- 21. Aguirre, G. A., De Ita, J. R., Garza, R. G. & Castilla-Cortazar, I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *J. Transl. Med.* **14**, 1–23 (2016).
- Lam, C. S. P., Chen, M.-H., Lacey, S. M., Yang, Q., Sullivan, L. M., Xanthakis, V., Safa, R., Smith, H. M., Peng, X., Sawyer, D. B. & Vasan, R. S. Circulating Insulin-Like Growth Factor-1 and Its Binding Protein-3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1479–1484 (2010).
- 23. Oh, J., Kim, J.-Y., Park, S., Youn, J.-C., Son, N. H., Shin, D.-J., Lee, S.-H., Kang, S.-M., Jee, S. H. & Jang, Y. The relationship between insulin-like growth factor-1 and metabolic syndrome, independent of adiponectin. *Clin. Chim. Acta* **413**, 506–510 (2012).
- Friedrich, N., Nauck, M., Schipf, S., Völzke, H., Brabant, G. & Wallaschofski, H. Cross-sectional and longitudinal associations between insulin-like growth factor I and metabolic syndrome: A general population study in german adults. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 29, 452–462 (2013).
- 25. Friedrich, N., Thuesen, B., Jorgensen, T., Juul, A., Spielhagen, C., Wallaschofksi, H. & Linneberg, A. The

Association Between IGF-I and Insulin Resistance: A general population study in Danish adults. *Diabetes Care* **35**, 768–773 (2012).

- 26. Sjogren, K., Wallenius, K., Liu, J.-L., Bohlooly-Y, M., Pacini, G., Svensson, L., Tornell, J., Isaksson, O. G. P., Ahren, B., Jansson, J.-O. & Ohlsson, C. Liver-Derived IGF-I is of Importance for Normal Carbohydrate and Lipid Metabolism. *Diabetes* **50**, 1539–1545 (2001).
- 27. Eggert, M.-L., Wallaschofski, H., Grotevendt, A., Nauck, M., Völzke, H., Samietz, S. & Friedrich, N. Crosssectional and longitudinal relation of IGF1 and IGF-binding protein 3 with lipid metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* **171**, 9–19 (2014).
- 28. Ungvari, Z. & Csiszar, A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: Recent advances. Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences **67 A**, 599–610 (2012).
- 29. Juul, A., Scheike, T., Davidsen, M., Gyllenborg, J. & Jørgensen, T. Low Serum Insulin-Like Growth Factor I Is Associated With Increased Risk of Ischemic Heart Disease. *Circulation* **106**, 939–944 (2002).
- Saber, H., Himali, J. J., Beiser, A. S., Shoamanesh, A., Pikula, A., Roubenoff, R., Romero, J. R., Kase, C. S., Vasan, R. S. & Seshadri, S. Serum Insulin-Like Growth Factor 1 and the Risk of Ischemic Stroke. *Stroke* 48, 1760–1765 (2017).
- Koentges, C., Pepin, M. E., Müsse, C., Pfeil, K., Alvarez, S. V. V., Hoppe, N., Hoffmann, M. M., Odening, K. E., Sossalla, S., Zirlik, A., Hein, L., Bode, C., Wende, A. R. & Bugger, H. Gene expression analysis to identify mechanisms underlying heart failure susceptibility in mice and humans. *Basic Res. Cardiol.* 113, 1–17 (2018).
- 32. Jaffa, A. A., LeRoith, D., Roberts, C. T., Rust, P. F. & Mayfield, R. K. Insulin-like growth factor I produces renal hyperfiltration by a kinin-mediated mechanism. *Am. J. Physiol.* **266**, F102-7 (1994).
- Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C. & Paolisso, G. Insulin/IGF-I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Metab.* 285, E1064–E1071 (2003).
- 34. Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Hurwitz, A., Ricciarelli, E., Hernandez, E. R., Roberts, C. T., Leroith, D. & Rosenfeld, R. Insulin-like growth factors: the ovarian connection. *Hum. Reprod.* **6**, 1213–1219 (1991).
- 35. Böker, J., Völzke, H., Nauck, M., Hannemann, A. & Friedrich, N. Associations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 with bone quality in the general adult population. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **88**, 830–837 (2018).
- Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M. & Koutsilieris, M. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 7, 208–218 (2007).
- 37. Hattori, N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.* **19**, 187–197 (2009).
- 38. Smith, T. J. Insulin-like growth factor-I regulation of immune function: a potential therapeutic target in autoimmune diseases? *Pharmacol. Rev.* **62**, 199–236 (2010).
- 39. Lohr, J., Grotevendt, A., Nauck, M., Völzke, H., Wallaschofski, H. & Friedrich, N. Relation of insulin-like growth factor-I and IGF binding protein 3 with markers of inflammation: results of a population-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **80**, 148–154 (2014).
- Laughlin, G. A., Barrett-Connor, E., Criqui, M. H. & Kritz-Silverstein, D. The Prospective Association of Serum Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-Binding Protein-1 Levels with All Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Older Adults: The Rancho Bernardo Study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 114–120 (2004).
- 41. van Bunderen, C. C., van Nieuwpoort, I. C., van Schoor, N. M., Deeg, D. J. H., Lips, P. & Drent, M. L. The Association of Serum Insulin-Like Growth Factor-I with Mortality, Cardiovascular Disease, and Cancer in the Elderly: A Population-Based Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 4616–4624 (2010).
- Friedrich, N., Haring, R., Nauck, M., Lüdemann, J., Rosskopf, D., Spilcke-Liss, E., Felix, S. B., Dörr, M., Brabant, G., Völzke, H. & Wallaschofski, H. Mortality and Serum Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I and IGF Binding Protein 3 Concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 1732–1739 (2009).
- 43. Teumer, A., Qi, Q., Nethander, M., Aschard, H., Bandinelli, S., Beekman, M., Berndt, S. I., Bidlingmaier, M., Broer, L., Cappola, A., Ceda, G. P., Chanock, S., Chen, M. H., Chen, T. C., Chen, Y. D. I., Chung, J., Del Greco Miglianico, F., Eriksson, J., Ferrucci, L., *et al.* Genomewide meta-analysis identifies loci associated with IGF-I and IGFBP-3 levels with impact on age-related traits. *Aging Cell* **15**, 811–824 (2016).
- 44. Ziv, E. & Hu, D. Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity. *Ageing Res. Rev.* **10**, 201–4 (2011).
- 45. Junnila, R. K., List, E. O., Berryman, D. E., Murrey, J. W. & Kopchick, J. J. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 366–376 (2013).
- 46. Roessner, U. & Bowne, J. What is metabolomics all about? *Biotechniques* 46, 363–365 (2009).

- 47. Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C. & Wijmenga, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Anal. Chim. Acta* **750**, 82–97 (2012).
- 48. Evans, A. M., DeHaven, C. D., Barrett, T., Mitchell, M. & Milgram, E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal. Chem.* **81**, 6656–6667 (2009).
- Völzke, H., Alte, D., Schmidt, C. O., Radke, D., Lorbeer, R., Friedrich, N., Aumann, N., Lau, K., Piontek, M., Born, G., Havemann, C., Ittermann, T., Schipf, S., Haring, R., Baumeister, S. E., Wallaschofski, H., Nauck, M., Frick, S., Arnold, A., *et al.* Cohort Profile: The Study of Health in Pomerania. *Int. J. Epidemiol.* **40**, 294–307 (2011).
- Shin, S., Fauman, E. B., Petersen, A., Krumsiek, J., Santos, R., Huang, J., Arnold, M., Erte, I., Forgetta, V., Yang, T., Walter, K., Menni, C., Chen, L., Vasquez, L., Valdes, A. M., Hyde, C. L., Wang, V., Ziemek, D., Roberts, P., *et al.* An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nat. Genet.* 46, 543–550 (2014).
- 51. Krumsiek, J., Suhre, K., Illig, T., Adamski, J. & Theis, F. J. Gaussian graphical modeling reconstructs pathway reactions from high-throughput metabolomics data. *BMC Syst. Biol.* **5**, 1–16 (2011).
- 52. Do, K. T., Kastenmüller, G., Mook-Kanamori, D. O., Yousri, N. A., Theis, F. J., Suhre, K. & Krumsiek, J. Network-based approach for analyzing intra- and interfluid metabolite associations in human blood, urine, and saliva. *J. Proteome Res.* **14**, 1183–1194 (2015).
- 53. Hietaniemi, M., Pöykkö, S. M., Ukkola, O., Päivänsalo, M. & Antero Kesäniemi, Y. IGF-I concentrations are positively associated with carotid artery atherosclerosis in women. *Ann. Med.* **37**, 373–382 (2005).
- 54. Span, J. P. T., Pieters, G. F. F. M., Sweep, F. G. J., Hermus, A. R. M. M. & Smals, A. G. H. Gender Differences in rhGH-Induced Changes in Body Composition in GH-Deficient Adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4161–4165 (2001).
- 55. Rochlani, Y., Pothineni, N. V. & Mehta, J. L. Metabolic Syndrome: Does it Differ Between Women and Men? *Cardiovasc. Drugs Ther.* **29**, 329–338 (2015).
- 56. Gurka, M. J., Vishnu, A., Santen, R. J. & Deboer, M. D. Progression of Metabolic Syndrome Severity During the Menopausal Transition. *J. Am. Heart Assoc.* **5**, 1–9 (2016).
- Reusch, J. E. B., Rajendra Kumar, T., Regensteiner, J. G., Zeitler, P. S., Arany, Z., Merz, B., Noel, C., Barrett-Connor, E., Boyle, K., Brown, L., Clegg, D., Cree-Green, M., Dabelea, D., Friedman, J., Goodyear, L., Graham, Hill-Golden, S., Huebschmann, A., Jenkins, M., *et al.* Identifying the critical gaps in research on sex differences in metabolism across the life span. *Endocrinology* **159**, 9–19 (2018).
- Krumsiek, J., Mittelstrass, K., Do, K. T., St??ckler, F., Ried, J., Adamski, J., Peters, A., Illig, T., Kronenberg, F., Friedrich, N., Nauck, M., Pietzner, M., Mook-Kanamori, D. O., Suhre, K., Gieger, C., Grallert, H., Theis, F. J. & Kastenm??ller, G. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics* 11, 1815–1833 (2015).
- 59. Duchene, J. & Ahluwalia, A. The kinin B1receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* **9**, 125–131 (2009).
- 60. Cyr, M., Lepage, Y., Blais, C., Gervais, N., Cugno, M., Rouleau, J.-L. & Adam, A. Bradykinin and des-Arg(9)bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**, H275–H283 (2001).
- 61. Christiansen, J. J., Fisker, S., Gravholt, C. H., Bennett, P., Svenstrup, B., Andersen, M., Feldt-Rasmussen, U., Christiansen, J. S. & Jørgensen, J. O. L. Discontinuation of estrogen replacement therapy in GH-treated hypopituitary women alters and rogen status and IGF-I. *Eur. J. Endocrinol.* **152**, 719–726 (2005).
- 62. Meinhardt, U. J. & Ho, K. K. Y. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clin. Endocrinol.* (*Oxf*). **65**, 413–422 (2006).
- Cano, A., Castelo-Branco, C. & Tarín, J. J. Effect of menopause and different combined estradiol-progestin regimens on basal and growth hormone-releasing hormone-stimulated serum growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1, and IGFBP-3 levels. *Fertil. Steril.* 71, 261–267 (1999).
- 64. Nugent, A. G., Leung, K.-C., Sullivan, D., Reutens, A. T. & Ho, K. K. Y. Modulation by progestogens of the effects of oestrogen on hepatic endocrine function in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **59**, 690–698 (2003).
- 65. Goodman-Gruen, D. & Barrett-Connor, E. Effect of replacement estrogen on insulin-like growth factor-I in postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 4268–4271 (1996).
- 66. Jørgensen, J. O. L., Christensen, J. J., Krag, M., Fisker, S., Ovesen, P. & Christiansen, J. S. Serum insulin-like growth factor I levels in growth hormone-deficient adults: Influence of sex steroids. *Horm. Res.* **62**, 73–76

(2004).

- 67. Leung, K.-C., Johannsson, G., Leong, G. M. & Ho, K. K. Y. Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr. Rev.* **25**, 693–721 (2004).
- 68. Barrou, Z., Charru, P. & Lidy, C. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 24, 233–241 (1997).
- 69. Traish, A. M., Kang, H. P., Saad, F. & Guay, A. T. Dehydroepiandrosterone (DHEA)-A precursor steroid or an active hormone in human physiology (CME). *Journal of Sexual Medicine* **8**, 2960–2982 (2011).
- 70. Janssen, J. A. M. J. L., Stolk, R. P., Pols, H. A. ., Grobbee, D. E., de Jong, F. H. & Lamberts, S. W. J. Serum free IGF-I, total IGF-I, IGFBP-1 and IGFBP-3 levels in an elderly population: relation to age and sex steroid levels. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **48**, 471–478 (1998).
- 71. Porter, F. D. & Herman, G. E. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.* **52**, 6–34 (2011).
- 72. Pham-Huu-Trung, M. T., Villette, J. M., Bogyo, A., Duclos, J. M., Fiet, J. & Binoux, M. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on enzymatic activity in human adrenocortical cells. Interactions with ACTH. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **39**, 903–909 (1991).
- 73. Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P. E., Briegel, J., Keh, D. & Kupfer, Y. Corticosteroids for treating sepsis. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD002243 (2015). doi:10.1002/14651858.CD002243.pub3
- Annane, D., Renault, A., Brun-Buisson, C., Megarbane, B., Quenot, J.-P., Siami, S., Cariou, A., Forceville, X., Schwebel, C., Martin, C., Timsit, J.-F., Misset, B., Ali Benali, M., Colin, G., Souweine, B., Asehnoune, K., Mercier, E., Chimot, L., Charpentier, C., *et al.* Hydrocortisone plus Fludrocortisone for Adults with Septic Shock. *N. Engl. J. Med.* **378**, 809–818 (2018).
- 75. Sakayama, K., Mashima, N., Kidani, T., Miyazaki, T., Yamamoto, H. & Masuno, H. Effect of cortisol on cell proliferation and the expression of lipoprotein lipase and vascular endothelial growth factor in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 471–479 (2008).
- 76. Anagnostis, P., Athyros, V. G., Tziomalos, K., Karagiannis, A. & Mikhailidis, D. P. The pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: A hypothesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94**, 2692–2701 (2009).
- 77. Whitworth, J. A., Williamson, P. M., Mangos, G. & Kelly, J. J. Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vascular health and risk management* **1**, 291–299 (2005).
- McCarthy, T. L., Centrella, M. & Canalis, E. Cortisol Inhibits the Synthesis of Insulin-Like Growth Factor-I in Skeletal Cells. *Endocrinology* 126, 1569–1575 (1990).
- 79. Agha, A. & Monson, J. P. Modulation of glucocorticoid metabolism by the growth hormone IGF-1 axis. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* **66**, 459–465 (2007).
- 80. Roelfsema, F., Moolenaar, A. J. & Frölich, M. The influence of bromocriptine and transsphenoidal surgery on urinary androgen metabolite excretion in acromegaly. *Acta Endocrinol. (Copenh).* **107**, 302–11 (1984).
- 81. Liao, S. F., Wang, T. & Regmi, N. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *Springerplus* **4**, 1–12 (2015).
- 82. Webb, J. G., Tan, Y., Jaffa, M. A. & Jaffa, A. A. Evidence for prostacyclin and cAMP upregulation by bradykinin and insulin-like growth factor 1 in vascular smooth muscle cells. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **30**, 61–71 (2010).
- Lowe, W. L., Yorek, M. A., Karpen, C. W., Teasdale, R. M., Hovis, J. G., Albrecht, B. & Prokopiou, C. Activation of protein kinase-C differentially regulates insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor messenger RNA levels. *Mol. Endocrinol.* 6, 741–752 (1992).
- 84. Lowe, W. L., Yorek, M. A. & Teasdale, R. M. Ligands that activate protein kinase-C differ in their ability to regulate basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **132**, 1593–1602 (1993).
- 85. Ricciardolo, F. L. M., Folkerts, G., Folino, A. & Mognetti, B. Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling. *Eur. J. Pharmacol.* **827**, 181–188 (2018).
- 86. Rhee, K.-H. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have antimutagenic properties. *Int. J. Antimicrob. Agents* **24**, 423–427 (2004).
- Apicella, J. M., Lee, E. C., Bailey, B. L., Saenz, C., Anderson, J. M., Craig, S. A. S., Kraemer, W. J., Volek, J. S. & Maresh, C. M. Betaine supplementation enhances anabolic endocrine and Akt signaling in response to acute bouts of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**, 793–802 (2013).
- Lee, M. S., Kim, M.-S., Park, S. Y. & Kang, C.-W. Effects of betaine on ethanol-stimulated secretion of IGF-I and IGFBP-1 in rat primary hepatocytes: involvement of p42/44 MAPK activation. *World J. Gastroenterol.* 12, 1718–22 (2006).
- 89. Cholewa, J. M., Guimarães-Ferreira, L. & Zanchi, N. E. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids* **46**, 1785–1793 (2014).

- 90. Lever, M. & Slow, S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin. Biochem.* **43**, 732–744 (2010).
- 91. Ueland, P. M. Choline and betaine in health and disease. J. Inherit. Metab. Dis. 34, 3–15 (2011).
- 92. Sato, T., Ito, Y. & Nagasawa, T. Regulatory effects of the L-lysine metabolites, L-2-aminoadipic acid and Lpipecolic acid, on protein turnover in C2C12 myotubes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 2168–2175 (2016).
- 93. Miura, Y., Kato, H. & Noguchi, T. Effect of dietary proteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) messenger ribonucleic acid content in rat liver. *Br. J. Nutr.* **67**, 257–65 (1992).
- Wang, L., Schulz, T. C., Sherrer, E. S., Dauphin, D. S., Shin, S., Nelson, A. M., Ware, C. B., Zhan, M., Song, C.-Z., Chen, X., Brimble, S. N., McLean, A., Galeano, M. J., Uhl, E. W., D'Amour, K. A., Chesnut, J. D., Rao, M. S., Blau, C. A. & Robins, A. J. Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood* 110, 4111–4119 (2007).
- 95. Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A. & Thomson, J. A. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* **24**, 185–187 (2006).
- 96. Yao, W., Gu, H., Zhu, J., Barding, G., Cheng, H., Bao, B., Zhang, L., Ding, A. & Li, W. Integrated plasma and urine metabolomics coupled with HPLC/QTOF-MS and chemometric analysis on potential biomarkers in liver injury and hepatoprotective effects of Er-Zhi-Wan. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 7367–7378 (2014).
- 97. Divecha, N., Banfić, H. & Irvine, R. F. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-I) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase. *EMBO J.* **10**, 3207–14 (1991).
- 98. Schober, C., Schiller, J., Pinker, F., Hengstler, J. G. & Fuchs, B. Lysophosphatidylethanolamine is in contrast to choline generated under in vivo conditions exclusively by phospholipase A2but not by hypochlorous acid. *Bioorg. Chem.* **37**, 202–210 (2009).
- 99. Matsumoto, T., Kobayashi, T. & Kamata, K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis. *Curr. Med. Chem.* **14**, 3209–3220 (2007).
- 100. Jiang, Y., Ma, H., Su, X., Chen, J., Xu, J., Standard, J., Lin, D. & Wang, W. IGF-1 Mediates Exercise-Induced Phospholipid Alteration in the Murine Skin Tissues. *J. Nutr. Food Sci.* **52**, 1–6 (2012).
- 101. Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., Slentz, C. A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B. R., Yancy, W. S., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R. S., Millington, D. S., *et al.* A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance. *Cell Metab.* **9**, 311–326 (2009).
- 102. Rinaldi, C., Bott, L. C., Chen, K., Harmison, G. G., Katsuno, M., Sobue, G., Pennuto, M. & Fischbeck, K. H. Insulinlike growth factor (IGF)-1 administration ameliorates disease manifestations in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Mol. Med.* 18, 1261–8 (2012).
- 103. Vahdatpour, C., Dyer, A. H. & Tropea, D. Insulin-like growth factor 1 and related compounds in the treatment of childhood-onset neurodevelopmental disorders. *Front. Neurosci.* **10**, 1–8 (2016).
- 104. Feng, G., Zhang, J., Li, Y., Nie, Y., Zhu, D., Wang, R., Liu, J., Gao, J., Liu, N., He, N., Du, W., Tao, H., Che, Y., Xu, Y., Kong, D., Zhao, Q. & Li, Z. IGF-1 C Domain-Modified Hydrogel Enhances Cell Therapy for AKI. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 2357–2369 (2016).
- 105. Sachdev, D. & Yee, D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1–12 (2007).
- 106. Qu, X., Wu, Z., Dong, W., Zhang, T., Wang, L., Pang, Z., Ma, W. & Du, J. Update of IGF-1 receptor inhibitor (ganitumab, dalotuzumab, cixutumumab, teprotumumab and figitumumab) effects on cancer therapy. Oncotarget 8, 29501–29518 (2017).

## 8. ANHANG

8.1 Wissenschaftliche Publikation	32
Metabolic Fingerprints of Circulating IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 Ratio: A Multifluid Metabolomics Study. Knacke H, Pietzner M, Do KT, Römisch-Margl W, Kastenmüller G, Völker U, Völzke H, Krumsiek J, Artati A, Wallaschofski H, Nauck M, Suhre K, Adamski J, Friedrich N. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Dec;101(12):4730-4742. Epub 2016 Oct 6.	
8.2 Supplement	45
8.3 Eidesstattliche Erklärung	56
8.4 Tabellarischer Lebenslauf	57
8.5 Danksagung	58

# Metabolic Fingerprints of Circulating IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 Ratio: A Multifluid Metabolomics Study

Henrike Knacke, Maik Pietzner, Kieu Trinh Do, Werner Römisch-Margl, Gabi Kastenmüller, Uwe Völker, Henry Völzke, Jan Krumsiek, Anna Artati, Henri Wallaschofski, Matthias Nauck, Karsten Suhre, Jerzy Adamski, and Nele Friedrich\*

**Objective:** IGF-1 is known for its various physiological and severe pathophysiological effects on human metabolism; however, underlying molecular mechanisms still remain unsolved. To reveal possible molecular mechanisms mediating these effects, for the first time, we associated serum IGF-1 levels with multifluid untargeted metabolomics data.

**Methods:** Plasma/urine samples of 995 nondiabetic participants of the Study of Health in Pomerania were characterized by mass spectrometry. Sex-specific linear regression analyses were performed to assess the association of IGF-1 and IGF-1/IGF binding protein 3 ratio with metabolites. Additionally, the predictive ability of the plasma and urine metabolome for IGF-1 was assessed by orthogonal partial least squares analyses.

**Results and Conclusions:** We revealed a multifaceted image of associated metabolites with large sex differences. Confirming previous reports, we detected relations between IGF-1 and steroid hormones or related intermediates. Furthermore, various associated metabolites were previously mentioned regarding IGF-1-associated diseases, eg, betaine and cortisol in cardiovascular disease and metabolic syndrome, lipid disorders, and diabetes, or have previously been found to associate with differentiation and proliferation or mitochondrial functionality, eg, phospholipids. bradykinin, fatty acid derivatives, and cortisol, which were inversely associated with IGF-1, might establish a link of IGF-1 with inflammation. For the first time, we showed an association between IGF-1 and pipecolate, a metabolite linked to amino acid metabolism. Our study demonstrates that IGF-1 action on metabolism is tractable, even in healthy subjects, and that the findings provide a solid basis for further experimental/clinical investigation, eg, searching for inflammatory or cardiovascular disease- or metabolic syndrome-associated biomarkers and therapeutic targets. (*J Clin Endocrinol Metab* 101: 4730–4742, 2016)

Physiologically, the GH/IGF-1 axis is known to promote growth, differentiation, and proliferation and to maintain physiological function and metabolism of very different tissues including neuronal tissue (1), human ovary and testicle (2, 3), liver stroma (4), and the kidney (5) as well as the cardiovascular system including the heart (6). The major part of circulating IGF-1 is bound to IGF binding protein 3 (IGFBP-3) in a ternary complex with acid labile subunit (7). The IGF-1 to IGFBP-3 ratio is a commonly used estimate of free, biologically active IGF-1 (8).

In recent years, IGF-1 and its influence on pathological metabolic conditions were widely discussed (9, 10). Beyond the overt disease of the GH/IGF-1 axis, acromegaly related to elevated IGF-1 and GH deficiency associated with lower IGF-1 levels (8), there is evidence that low IGF-1 levels are causally related to cerebrovascular and cardiovascular diseases with higher risks for ischemic stroke and congestive heart failure (11). Moreover, lower IGF-1 levels were associated with insulin resistance, metabolic syndrome, and lipid disorders (9, 12, 13), and low as well as very high IGF-1 is linked to an increased all-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197 Printed in USA

Copyright © 2016 by the Endocrine Society Received July 6, 2016. Accepted October 3, 2016. First Published Online October 6, 2016

<sup>\*</sup> Author Affiliations are shown at the bottom of the next page.

Abbreviations: BP, blood pressure; DHEA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; FDR, false discovery rate; GFR, glomerular filtration rate; GGM, Gaussian graphical model; GGT, y-glutamyl transferase; IGFBP-3, IGF binding protein 3; LDL, low-density lipoprotein; MS, mass spectrometry; NAD, nicotinamide dinucleotide; PLS, partial least square; OPLS, orthogonal partial least squares; PNC1, pyrimidine nucleotide carrier 1; UTP, uridine 5-triphosphate; VIP, variable importance in projection.

cause mortality (14). However, the underlying pathophysiological links are still barely understood.

To further elucidate the possible mechanism behind the above-mentioned effects of IGF-1, the present study aims to assess the associations of IGF-1 and the IGF-1 to IGFBP-3 ratio with the plasma and urine metabolome in a large diabetes-free sample from the general population. The metabolome comprises a huge variety of small organic molecules (metabolites), which can be quantified and identified by mass spectrometry (MS) and/or nuclear magnetic resonance spectroscopy to capture the physiological states of an organism. Metabolite profiling allows for a virtually hypothesis free testing on the associations of an endogenous regulator like IGF-1 and alterations on the molecular level (15), which could provide a link between the reported IGF-1 associated diseases. We used an untargeted approach based on MS, which generates a diverse panel of metabolites spanning multiple classes to comprehensively address this issue.

#### **Materials and Methods**

#### **Study population**

The Study of Health in Pomerania (SHIP-Trend) is a population-based study located in West Pomerania, a rural region in northeast Germany (16). A stratified (age, sex, and city/county of residence) random sample of 8826 adults aged 20-79 years was drawn from population registries. Sample selection was facilitated by centralization of local population registries in the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. Baseline examinations were conducted between 2008 and 2012. In total, 4420 choose to participate (50.1% response). All participants gave written informed consent before taking part in the study. The study was approved by the local ethics committee and conformed to the principles of the Declaration of Helsinki.

For a subsample of 995 subjects without self-reported diabetes, plasma and urine metabolomics data based on MS as well as IGF-1 and IGFBP-3 measurements were available.

#### Laboratory measurements and phenotypic characterization

Smoking status (current, former, or never-smokers), daily alcohol consumption, and physical activity ( $\geq 2$  h training a week) were assessed using computer-aided personal interviews. Waist circumference was measured to the nearest 0.1 cm using an inelastic tape midway between the lower rib margin and the iliac crest in the horizontal plane. Hypertension was defined as an increased blood pressure (BP) (systolic BP of  $\geq$ 140 mm Hg or a diastolic BP of  $\geq$ 90) or the use of antihypertensive medication. The definition of liver disease was based on self-reported liver disease or serum  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT), aspartate-amino transferase, or alanine-amino transferase activities greater than the population mean + 2 × SD.

Fasting blood samples were drawn from the cubital vein in the supine position before noon. Spot urine samples were collected in the same time frame. The samples were analyzed immediately or stored at  $-80^{\circ}$ C prior analyses. Serum IGF-1 and IGFBP-3 levels were determined by automated two-site chemiluminescent immunoassays on the IDS-iSYS (Immunodiagnostic Systems). The assays were performed according to the manufacturer's recommendations by skilled technical personal. The interassay coefficient of variation was 3.5% or 8.3% at high level, 4.3% or 8.8% at median level, and 6.3% or 10% at low level in the IGF-1 or IGFBP-3 assay, respectively. Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, aspartate-amino transferase, alanine-amino transferase, and GGT were measured by standard methods (Dimension VISTA; Siemens Healthcare Diagnostics).

#### **Metabolomics measurements**

Nontargeted metabolomics analysis for metabolic profiling was conducted at the Genome Analysis Center (Helmholtz Zentrum München, Germany). A detailed description of metabolite measurements, annotations, and data processing is given in the supplemental information. Briefly, two separate liquid chromatography and tandem MS analytical methods were used as previously published (17) to obtain a broad metabolite spectra in plasma and urine samples in an untargeted manner. Several preprocessing steps were performed, which are described in more detail in the Supplemental Data. Briefly, raw ion counts of metabolites were rescaled with the median of each runday to avoid differences caused by daily variations of platform performances. Metabolites were kept only if a valid estimation (more than three observations) of the median within a runday was possible. In case of urine, samples were additionally normalized to account for diurnal dilution using probabilistic quotient normalization (18). Afterward all metabolites were log2 transformed. Finally, robust multivariate outlier exclusion based on principle component analyses was performed. With respect to the generation of Gaussian graphical models (GGMs), missing values were imputed for metabolites with less than 20% missing values using sampling from truncated log-normal distributions or multiple imputations by chained equations. After preprocessing, 475 plasma and 558 urine metabolites remained for the statistical analyses.

#### **Statistical analysis**

For descriptive analyses, continuous data were expressed as median (25th, 75th quartile) and nominal data as percentage. For bivariate comparison of men and women, the Mann-Whitney U test (continuous data) or  $\chi^2$  test (nominal data) was used. In a first step, linear regression models were performed with

Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (H.K., M.P., H.W., M.N., N.F.) and Institute for Community Medicine (H.V.), University Medicine Greifswald, Interfaculty Institute for Genetics and Functional Genomics (U.V.), University Medicine and Ernst-Moritz Arndt-University Greifswald, and German Center for Cardiovascular Research (M.N., N.F.), partner site Greifswald, 17475 Greifswald, Germany; Institute of Computational Biology (K.T.D., J.K., K.S.), Helmholtz-Zentrum München, and German Center for Diabetes Research (J.K.), and Institute of Bioinformatics and Systems Biology (W.R.-M., G.K.), Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, and Institute of Experimental Genetics (A.A., J.A.), Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany; and Germany Center for Diabetes Research (J.A.), 85764 München-Neuherberg, Germany; Schwerpunktpraxis für Diabetes und Hormonerkrankungen (H.W.), 99094 Erfurt, Germany; Weill Cornell Medical College in Qatar (K.S.), Education City, Qatar Foundation, Doha, Qatar; Lehrstuhl für Experimentalle Genetik (J.A.), Technische Universität München, 85350 Freising-Weihenstephan, Germany; Research Center for Prevention and Health (N.F.), Capital Region of Denmark, 2600 Glostrup, Denmark

IGF-1 or IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels as independent and plasma or urine metabolites as dependent variable. For this purpose IGF-1 levels were log transformed. To avoid spurious results in linear regression from a single outlier, additional univariate outliers for each metabolite were excluded based on a more than 3 SD-fold deviation from the mean. All models were separately performed for men and women and adjusted for age, smoking, physical activity, waist circumference, hypertension, liver disease, and LDL-cholesterol.

To account for multiple testing, we adjusted the *P* values by controlling the false discovery rate (FDR) at 5% using the Benjamini-Hochberg procedure. GGMs for the plasma and urine metabolome data were calculated because of their ability to mirror physiological dependencies (19). An extensive description of the procedure can be found in the Supplemental Data. Briefly, GGMs rely on full-order partial correlations, which mean that a correlation between two metabolites exists only if it is independent from all remaining metabolites in the data set. Significant partial correlations after Bonferroni correction were visualized as network.

In addition to the single associations, we additionally performed orthogonal partial least squares (OPLS) to test for a predictive signature of the plasma or urine metabolome for IGF-1 or IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels. OPLS is a modification of the partial least square (PLS) regression analysis. PLS is a regression method that finds the relation between predictor variables (X, here the metabolites) and dependent variables (Y, here log[IGF-1] or IGF-1 to IGFBP-3 ratio). In improvement over PLS, OPLS divides the systematic variation in X into two parts: one is linearly related to Y and represents the predictive part (predictive components), and one is orthogonal to Y (orthogonal components) and is therefore unrelated to Y.

The predictive ability of the model  $(Q^2)$ , defined as correctly explained variance, was estimated by 7-fold cross-validation. For this, the data set was partitioned into seven equal-sized subsamples. Based on six of seven subsamples, a model was built, which was used for the prediction of the left-out data. This process was repeated seven times with each of the seven subsamples used exactly once for the prediction. For the whole sample, the predicted data are then compared with the original data and the  $Q^2$  was calculated. The metabolites were mean centered and Pareto scaled. For the presentation of the results, we used score plots and the variable importance in projection (VIP; see Supplemental Data). The statistical analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS statistical software, version 9.4; SAS Institute), R 3.0.1 (R Foundation for Statistical Computing; version 3.0.1), and SIMPCA-P + 13.0.02 (Umetrics AM).

#### Results

General characteristics of the study population are presented in Table 1. Women were more often a neversmoker, consumed less alcohol, were less often affected by hypertension, and had lower glycated hemoglobin and estimated glomerular filtration rate (GFR) values compared with men. With respect to hormone levels, IGF-1 levels were comparable, in which the IGFBP-3 levels were higher in women, resulting in a lower IGF-1 to IGFBP-3 ratio in women compared with men.

Among women, linear regression revealed 23 or 38 plasma metabolites significantly associated with IGF-1 or IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels, respectively (Table 2 and Supplemental Tables 1 and 2). In plasma, 19 metabolites were related to both IGF-1 and IGF-1 to IGFBP-3 ratio (Figure 1). With respect to urine, nine metabolites were related to IGF-1 and 21 to IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels, with seven urine metabolites found for both (Table 3 and Supplemental Figure 1). Among men, only three and four plasma metabolites as well as one and seven urine metabolites.

	, ,		
Characteristics	Men (n = 439)	Women (n = 556)	P Value*
Age, y	50 (39; 61)	51 (41; 60)	.95
Smoking, %			<.01
Never-smokers	31.5	50.6	
Former smokers	45.7	28.1	
Current smokers	22.8	21.3	
Physically active, %	72.9	73.6	.81
Alcohol consumption, g/d	8.5 (3.0; 18.4)	2.4 (0.7; 5.5)	<.01
Waist circumference, cm	94 (86; 102)	81 (74; 90)	<.01
Hypertension, %	44.1	35.3	<.01
Liver disease, %	9.3	9.2	.93
HbA1c, %	5.2 (4.9; 5.5)	5.1 (4.8; 5.5)	<.01
Total cholesterol, mmol/L	5.3 (4.6: 6.1)	5.5 (4.9; 6.3)	<.01
Triglycerides, mmol/L	1.31 (0.92; 1.91)	1.15 (0.84; 1.62)	<.01
eGFR, mL/min per 1.72 m <sup>2</sup>	91 (81: 104)	88 (76: 101)	<.01
IGF-1, na/mL	141 (114: 174)	132 (106: 173)	.06
IGFBP-3, ng/mL	4092 (3475; 4695)	4254 (3652; 4951)	<.01
IGF-1 to IGFBP-3 ratio	0.035 (0.029: 0.041)	0.031 (0.026: 0.038)	<.01

Abbreviations: HbA1c, glycated hemoglobin; eGFR, estimated glomerular filtration rate. Continuous data are expressed as median (25th percentile; 75th percentile); nominal data are given as percentages.

\*  $\chi^2$  test (nominal data) or Mann-Whitney test (interval data) was performed.

#### **Table 1.** General Characteristics of the Study Population

# Table 2. Significantly Associated Plasma Metabolites With IGF-1 to IGFBP-3 Ratio or Log IGF-1 Levels in Women and Men

		IGF-1 to I	GFBP-3 Ratio	Log IGF-	1
Metabolite	Class	β	FDR	β	FDR
Women					
Betaine	Amino acid	10.6	2.37E <sup>-06</sup>	0.155	$4.08E^{-02}$
Pipecolate	Amino acid	-16.0	8.77E <sup>-05</sup>	-0.352	$5.54E^{-03}$
α-Hydroxyisovalerate	Amino acid	-10.0	3.02E <sup>-03</sup>	-0.215	3.73E <sup>-02</sup>
Threonine	Amino acid	-7.5	1.22E <sup>-02</sup>	-0.233	$5.54E^{-03}$
Bradykinin	Peptide	-51.0	1.29E <sup>-05</sup>	-1.010	1.17E <sup>-02</sup>
Bradykinin, des-arg(9)	Peptide	-63.0	1.87E <sup>-04</sup>	-1.131	3.73E <sup>-02</sup>
Cyclo(leu-pro)	Peptide	-15.0	1.22E <sup>-02</sup>	-0.398	3.17E <sup>-02</sup>
Phenylalanyltryptophan	Peptide	-7.6	2.15E <sup>-02</sup>	-0.013	9.56E <sup>-01</sup> *
Cortisol	Lipid	-15.0	8.77E <sup>-05</sup>	-0.275	$2.45E^{-02}$
1-Palmitovlglycerophosphate	Lipid	-13.0	2.89E <sup>-04</sup>	-0.254	$2.45E^{-02}$
1-Palmitoylglycerophosphoethanolamine	Lipid	-11.0	$7.75E^{-04}$	-0.095	$5.43E^{-01}$
Pregnanediol-3-glucuronide	Lipid	19.1	3.02E <sup>-03</sup>	0.373	$1.21E^{-01}*$
1-Oleovlalycerophosphoinositol*	Lipid	-14.0	$3.14E^{-03}$	-0.325	$2.44E^{-02}$
1-Palmitovlglycerophosphoinositol <sup>a</sup>	Lipid	-10.0	$1.12E^{-02}$	-0.234	3.73E <sup>-02</sup>
Palmitate (16:0)	Lipid	-5.7	$1.21E^{-02}$	-0.097	2.61E <sup>-01</sup> *
1-Linoleovlalycerophosphocholine (18:2n6)	Lipid	7.8	$1.22E^{-02}$	0.152	1.66E <sup>-01</sup> *
Dihomo-linolenate (20.3n3 or n6)	Lipid	-6.1	$1.22E^{-02}$	-0.084	4 19F <sup>-01</sup> *
Docosapentaenoate (n6 DPA: 22:5n6)	Lipid	-87	$1.43F^{-02}$	-0.258	$1.17E^{-02}$
Pregn steroid monosulfate	Lipid	12.0	$1.83E^{-02}$	0 202	2 97F <sup>-01</sup> *
Palmitoleate (16:1n7)	Lipid	-9.0	$2.56E^{-02}$	-0.179	2.25F <sup>-01</sup> *
$5\alpha$ -Pregnan-3 $\beta$ 20 $\alpha$ -diol disulfate	Lipid	17 7	$3.17F^{-02}$	0 422	1 14F <sup>-01</sup> *
1-Stearoylolycerophosphoethanolamine	Lipid	-8.8	$3.90F^{-02}$	-0.167	2 85F <sup>-01</sup> *
Enjandrosterone sulfate	Lipid	12.2	8 33F <sup>-02</sup>	0 402	$3.66E^{-02}$
Nicotinamide	Cofactors and vitamins	-11.0	$1.59E^{-02}$	-0.363	5.00L 5.54F <sup>-03</sup>
Biliverdin	Cofactors and vitamins	87	$1.83E^{-02}$	0 117	$4.76F^{-01}*$
Uridine	Nucleotide	47	$2.91F^{-02}$	0.149	$1.52E^{-02}$
5-Methyluridine (ribothymidine)	Nucleotide	49	$4.78F^{-02}$	0.145	1.52C $1.17F^{-02}$
X-20845	Unknown	-66.0	$9.55E^{-05}$	-1 227	$4.08E^{-02}$
X-11736	Unknown	-80.0	1.87F <sup>-03</sup>	-1.831	$2.45E^{-02}$
X-18140	Unknown	-10.0	1.07E 1.11F <sup>-02</sup>	-0.145	3 38F <sup>-01</sup> *
X-11442	Unknown	11.0	$1.21F^{-02}$	0 111	5 79F <sup>-01</sup> *
X-18039	Unknown	-18.0	$1.27E^{-02}$	-0.531	1 17F <sup>-02</sup>
X-11372	Unknown	8.2	$2.08F^{-02}$	0.090	$6.08E^{-01}*$
X-16934	Unknown	10.0	2.002 2.08F <sup>-02</sup>	0.076	7 78F <sup>-01</sup> *
X-11441	Unknown	97	2.002 2.43F <sup>-02</sup>	0.116	$5.45E^{-01}*$
X-12844	Unknown	8.2	2.45 2 59F <sup>-02</sup>	0.409	2 39F <sup>-06</sup>
X-16044	Unknown	-14.0	2.000 2.80F <sup>-02</sup>	-0.131	$6.76E^{-01}*$
X-16946	Unknown	83	$4.06E^{-02}$	0.151	$4.08E^{-02}$
X-11795	Unknown	6.8	4.00L $4.46E^{-02}$	0.156	$1.67E^{-01}*$
X-11444	Unknown	8.6	5.43F <sup>-02</sup> *	0.403	$1.07$ E $1.46$ F $^{-04}$
X-16124	Unknown	32.2	1 30F <sup>-01</sup> *	1 192	7.40L $7.44F^{-02}$
Men	Onknown	52.2	1.502	1.152	2.77L
	Amino acid	14 4	1 30F <sup>-02</sup>	0313	8 38F-02*
Cyclo(leu-pro)	Pentide	-21 9	$1.69E^{-02}$	-0 473	$1.06F^{-01}*$
10-Undecenoate (11·1n1)	Lipid	13.4	$2.63E^{-02}$	0 185	4 86F <sup>-01</sup> *
$1$ -Pentadecanov/glycerophosphocholine ( $15\cdot$ 0)	Lipid	11 2	$1.03E^{-01}*$	0 411	3 33F <sup>-02</sup>
1-Margarovlglycerophosphocholine (17:0)	Lipid	10.5	1 37F <sup>-01</sup> *	0.456	$1.52E^{-02}$
X-11799	Unknown	-41 2	$2.46F^{-02}$	-0.879	1 48F <sup>-01</sup> *
X-12844	Unknown	4.7	5.56E <sup>-01</sup> *	0.291	$4.50E^{-02}$

\*Nonsignificant regarding FDR.

olites were associated with IGF-1 and IGF-1 to IGFBP-3 ratio serum levels, respectively, with no overlap in both body fluids (Table 2 and 3, Figure 1). No overlap was seen for men and women, except one unknown plasma metabolite (X-12844). Together with the generally lower number of associations in men, we decided to focus on women in the following analyses.

In women, plasma betaine showed the strongest positive, whereas bradykinin and pipecolate the strongest negative association with IGF-1 to IGFBP-3 ratio (Table 2). Moreover, two clusters of steroid derivatives became obvious by visual inspection of the overlaid GGM among women. The first cluster includes metabolites related to dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S; Figure 2). Af-



**Figure 1.** Corrected *P* values from univariate linear regression analysis of metabolites associated with IGF-1 and the IGF to IGFBP-3 ratio among women in plasma (left panel) and urine (right panel). The dotted line denotes a FDR of 0.05, displaying the significance threshold. Red marked metabolites were associated with both IGF-1 and the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Regression models were adjusted for age, smoking, alcohol consumption, physical activity, waist circumference, liver diseases, LDL cholesterol, and hypertension.

ter FDR correction, positive relations of IGF-1 to IGFBP-3 ratio values with plasma steroids including pregnenolone sulfate, pregnanediol-3-glucuronide, and  $5\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ ,  $20\alpha$ -diol disulfate as well as urine steroids including epiandrosterone sulfate or androsterone sulfate were detectable (Table 2). Furthermore, DHEA-S (plasma:  $\beta = 8.27$ , P = .0266; FDR 0.172; urine:  $\beta = 28.40$ , P = .0025; FDR 0.057) and 21-hydroxypregnenolone disulfate (plasma:  $\beta = 6.39, P = .0314$ ; FDR 0.195; urine:  $\beta = 7.54, P =$ .0229; FDR 0.241) were positively associated with IGF-1 to IGFBP-3 ratio in both plasma and urine, even if the estimates missed statistical significance after correction. The second set of steroid derivatives clustered around cortisol and 11-ketoetiocholanolone glucuronide whereby the latter metabolite was detectable only in urine (Figure 2). In particular, the IGF-1 to IGFBP-3 ratio was positively related to urinary levels of 11-ketoetiocholanolone and to connected unknown urine metabolites. Furthermore, plasma cortisol levels showed a significantly negative association in plasma, whereas a trend toward a positive relation with urinary tetrahydrocortisone levels ( $\beta = 6.18$ , P = .011, FDR 0.149) became apparent.

Moreover, several plasma lipid metabolites, eg, palmitate or 1-stearoylglycerophosphoethanolamine, were negatively associated with the IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels (Table 2). In addition to the mentioned clusters, positive relations of IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels with urinary levels of tyrosine and histidine were detected (Table 3).

Four OPLS models were fitted to identify plasma or urine metabolites that could fairly predict IGF-1 or IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels (Figure 3 and Supplemental Figure

2). Three models (plasma: IGF-1 to IGFBP-3 ratio; urine: IGF-1, IGF-1 to IGFBP-3 ratio) included one predictive and one orthogonal component and one model (plasma: IGF-1) one predictive and two orthogonal components. The predictive ability  $Q^2$  ranges from 27.8% to 41.3% (plasma: IGF-1 41.3%, IGF-1 to IGFBP-3 ratio: 32.9%; urine: IGF-1 33.1%, IGF-1 to IGFBP-3 ratio 27.8%). Using a VIP cutoff greater than 1, we detected 37 or 58 plasma metabolites as well as 45 or 55 urine metabolites, which were important for the prediction of IGF-1 or IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels, respectively (Supplemental Table 3). In all models, the metabolites with the highest VIP again included steroid derivatives as DHEA-S, androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, pregnan steroid monosulfate, or  $5\alpha$ -pregnan- $3\beta$ ,  $20\alpha$ -diol disulfate, confirming the above-mentioned results (Supplemental Figures 3 and 4). Further plasma metabolites associated with the IGF-1 to IGFBP-3 ratio found in linear regression and OPLS were, for example, bradykinin and palmitate. With respect to urine metabolites, the amino acids tyrosine and histidine were confirmed (Supplemental Figure 4).

#### Discussion

Using a multifluid metabolomics approach, the present study aimed to screen for metabolic alterations in relation to IGF-1 and the IGF-1 to IGFBP-3 ratio in an epidemiological setting.

#### Steroids

In the present study, IGF-1 or the IGF-1 to IGFBP-3 ratio levels were associated with two steroid clusters

Table 3.	Significant Associated Urine Metabolites With IGF-1 to IGFBP3 Ratio or Log IGF-1 Levels in Women and
Men	

		IGF-1 to IG	GFBP3 Ratio	Log IGF-1	
Metabolite	Class	β	FDR	β	FDR
Women					
11-Ketoetiocholanolone glucuronide	Lipid	17.7	7.70E <sup>-04</sup>	0.490	6.57E <sup>-04</sup>
Androsteroid monosulfate 2	Lipid	26.7	2.08E <sup>-03</sup>	0.347	3.20E <sup>-01</sup> *
Androsterone sulfate	Lipid	19.7	7.28E <sup>-03</sup>	0.429	8.81E <sup>-02</sup> *
Epiandrosterone sulfate	Lipid	21.8	1.57E <sup>-02</sup>	0.383	3.11E <sup>-01</sup> *
Tyrosine	Amino acid	11.1	3.65E <sup>-03</sup>	0.143	3.48E <sup>-01</sup> *
Homocitrulline	Amino acid	-8.9	$2.07E^{-02}$	-0.188	2.18E <sup>-01</sup> *
Histidine	Amino acid	9.5	4.51E <sup>-02</sup>	0.182	2.65E <sup>-01</sup> *
Imidazole lactate	Amino acid	-8.4	4.71E <sup>-02</sup>	-0.062	7.50E <sup>-01</sup> *
Pro-hydroxy-pro	Amino Acid	6.9	5.17E <sup>-02</sup> *	0.220	2.43E <sup>-02</sup>
X-12846	Unknown	16.1	3.51E <sup>-05</sup>	0.353	1.50E <sup>-03</sup>
X-11444	Unknown	12.4	3.21E <sup>-04</sup>	0.352	$2.24E^{-04}$
X-12689	Unknown	-12.0	$4.08E^{-04}$	-0.205	1.12E <sup>-01</sup> *
X-12844	Unknown	11.6	$4.98E^{-04}$	0.391	$4.84E^{-06}$
X-12122	Unknown	-12.0	7.28E <sup>-03</sup>	-0.213	2.57E <sup>-01</sup>
X-17357	Unknown	10.4	7.28E <sup>-03</sup>	0.373	7.05E <sup>-05</sup>
X-17340	Unknown	10.2	7.28E <sup>-03</sup>	0.240	5.17E <sup>-02</sup> *
X-16397	Unknown	-8.3	7.37E <sup>-03</sup>	-0.150	2.31E <sup>-01</sup> *
X-17339	Unknown	8.6	7.37E <sup>-03</sup>	0.155	2.31E <sup>-01</sup> *
X-12687	Unknown	14.0	1.24E <sup>-02</sup>	0.423	5.90E <sup>-03</sup> *
X-12258	Unknown	19.0	1.57E <sup>-02</sup>	0.468	6.40E <sup>-02</sup> *
X-11357	Unknown	-14.0	3.38E <sup>-02</sup>	-0.265	2.65E <sup>-01</sup> *
X-12026	Unknown	8.4	$4.90E^{-02}$	0.274	1.54E <sup>-02</sup>
X-01911		-11.0	3.32E <sup>-01</sup> *	-0.522	3.07E <sup>-02</sup>
Men					
4-Guanidinobutanoate	Amino acid	-19.3	2.25E <sup>-02</sup>	-0.460	1.61E <sup>-01</sup> *
Isobutyrylglycine	Amino acid	15.0	3.66E <sup>-02</sup>	0.367	1.61E <sup>-01</sup> *
Ethyl glucuronide	Xenobiotics	-49.9	3.66E <sup>-02</sup>	-1.009	2.53E <sup>-01</sup> *
C-mannosyltryptophan	Amino acid	2.9	3.10E <sup>-01</sup> *	0.158	1.74E <sup>-02</sup>
X-12760	Unknown	18.1	4.99E <sup>-03</sup>	0.276	2.61E <sup>-01</sup> *
X-20327	Unknown	-43.1	4.99E <sup>-03</sup>	-0.874	1.61E <sup>-01</sup> *
X-17323	Unknown	15.3	2.58E <sup>-02</sup>	0.345	1.61E <sup>-01</sup> *
X-11799	Unknown	-40.3	$3.66E^{-02}$	-0.760	2.71E <sup>-01</sup> *

\*Nonsignificant regarding FDR.

(DHEA-S and cortisol) in women. Regarding DHEA-S, previous studies (20) detecting positive relations of DHEA-S or epiandrosterone sulfate, a DHEA-S derivative, with IGF-1, were confirmed. DHEA-S, the sulfated form of dehydroepiandrosterone, represents the most abundant steroid in humans (21). Dehydroepiandrosterone is the precursor of androstenedione, a substrate for T and estradiol synthesis (22). This synthesis pathway connects the inhibitory effect of estrogen and the observed positive influence of DHEA-S on IGF-1 level: with decreasing estrogen synthesis rate, the inhibitory effect of estrogen becomes lower and IGF-1 as well as DHEA-S would increase due to lower consumption. The lowering effect of estrogen on IGF-1 levels most likely takes place in the hepatocytes via inhibition of hepatic IGF-1 mRNA production (23, 24). This complex interplay between steroid hormones and IGF-1 levels might partly explain the detected sex differences. Furthermore, the association between sex steroids and IGF-1 might be taken into account by the interpretation of IGF-1-associated metabolic diseases: in the reproductive period, men more often suffer from hypertension, insulin resistance, and dyslipidemia (25) than women, but with increasing age and during the hormonal changes in postmenopausal transition, female prevalence rises (25, 26) as well. Thus, the observed association between sex steroids and IGF-1 is of special interest in gender epidemiology and the pathophysiology of metabolic diseases.

The second detected cluster centers on cortisol and its relatives. Cortisol is synthesized and released into circulation from the adrenal cortex and is involved in the physiological response to inflammatory processes and stress (27, 28). It has negative influence on cell proliferation (29) and is positively associated with insulin resistance (30), lipid disorders (31), and metabolic syndrome (30) as well as cardiovascular disease (32). Thus, cortisol achieves the exact opposite metabolic effects than IGF-1, which matches their negative asso-



Figure 2. Left panels, Cortisol (upper part)- and DHEA-S (lower part)-related subnetwork from the overlay of the plasma (blue) and urine (orange) GGM with integration of results from linear regression analyses for the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Metabolites were highlighted by increased node size and darker colors if they showed a significant association with the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Right panels, Mean with 95% confidence interval (CI) for significant metabolites over quartiles of IGF-1 to IGFBP-3 ratio in urine (orange) and plasma (blue). Par.corr, partial correlation.

ciation in our study and suggests a functional triangle. McCarthy et al (33) described a cortisol-mediated decrease in *IGF-1* transcripts and IGF-1 protein in fetal rat osteoblast cells, which is in concordance with a reported inverse correlation (34) between cortisol and IGF-1 in human cord blood. Agha and Monson (35) reviewed the relationship between IGF-1 and glucocorticoid metabolism and concluded that IGF-1 mediates an inhibition of  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, leading to a reduced cortisol synthesis. Moreover, hydrocortisone, the therapeutic form of cortisol, induced very low IGF-1 levels in women with GH deficiency (23, 36). Similar results of a lower IGF-1 to IGFBP-3 ratio after hydrocortisone replacement were found among women with hypopituitarism (37). Furthermore, a small part of cortisol metabolites (3%–5%) is excreted in urine as, for example,

11-ketoetiocholanolone (38). In acromegaly patients an increased urinary excretion of 11-ketoetiocholanolone was shown, with a normalization of both after treatment (38). Our strong positive association between urinary 11-ketoetiocholanolone and the IGF-1 to IGFBP-3 ratio confirms these findings, even in a population without GH disorders.

In summary, we detected different IGF-1-associated metabolites between men and women, which could be due to generally different metabolite profiles or due to mutual dependence of IGF-1 and steroid hormone levels. The negative association with cortisol in particular might point to the fact that IGF-1 influences inflammatory response, which is accompanied by the negative association with bradykinin as an inflammatory marker.



**Figure 3.** OPLS regression analyses for modeling IGF-1 and IGF to IGFBP-3 ratio based on plasma metabolites among women. Left panels, OPLS score plots for log(IGF-1) (top line) and IGF-1 to IGFBP-3 ratio (bottom line) showing the predictive component t(1) and the first orthogonal component  $t_0(1)$ . Values were colored according to quintiles of distribution of either IGF-1 or the IGF-1 to IGFBP-3 ratio using a blue (low) to red (high) gradient. Right panels, Corresponding variable influence on projection (VIP) values of the predictive component. The five metabolites with the highest VIP were mentioned. Colors refer to physiological entities of metabolites.

#### Peptides

In our study, the peptide bradykinin and its active metabolite bradykinin (des-arg) (39), were strongly negatively related to the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Previous studies already linked bradykinin to IGF-1 signaling by showing that both compounds activate mitogen activated protein kinase and stimulate prostacyclin synthesis (40). Furthermore, bradykinin is known to lower IGF-1-promoted effects on ERK1/2-mediated cell proliferation (41), whereas IGF-1 strengthens bradykinin-induced rises in intracellular calcium concentration, inositol-1,4,5-triphosphate and inositol tetrakispohosphate levels (42). Concerning our observed relation, bradykinin indeed has already been described to lower IGF-1 mRNA levels in fibroblast cells (43) by activation of the protein kinase C. Lowe et al (43) observed that IGF-1 mRNA decrease is often accompanied by an increase in intracellular phos-

phatidylcholine-derived metabolites such as choline and phosphocholine (44). These metabolites mediate the activation of specific isoforms of the protein kinase C that are capable of inhibiting IGF-1 mRNA synthesis (44). Interestingly, we found 1-linoleoylglycerophosphocholine, a phosphocholine derivative, to be positively associated with the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. The fact that some phosphocholine derivatives activate specific protein kinase C isoforms that lower IGF-1 levels and the finding of IGF-1-induced translocation and activation of the protein kinase C to the nuclear region (45) argues for a complex involvement of (phospho-)cholines and activation of the protein kinase C isoforms in the interaction of IGF-1 and bradykinin. As indicated above, this could be of special importance in the regulation of inflammatory response, in which IGF-1 and bradykinin have inverse function with high IGF-1 levels to reduce inflammatory responses, whereas bradykinins are increased in inflammation. This is of interest in chronic inflammatory vascular diseases, eg, atherosclerosis, which is associated with low IGF-1 and in which the kallikrein-kinin system plays a role as well (46).

#### Amino acids

In addition to bradykinin, the amino acid derivatives pipecolate and betaine revealed associations with the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Apicella et al (47) detected a decrease in cortisol after betaine intake that was accompanied by a betaine-induced increase in GH and IGF-1 among men. Assuming a similar effect in women, these findings are consistent with our detected positive relations with betaine and negative association with cortisol. Moreover, betaine and IGF-1 were linked on the functional level. Similar to IGF-1 (12, 48, 49), low betaine was associated with cardiovascular disease, metabolic syndrome, lipid disorders, and diabetes (50, 51). Betaine is an N-trimethylated amino acid that has antioxidant and organic osmolyte activity (52) and protects against cellular stress (53), and both processes are also assumed for IGF-1. Furthermore, betaine decreased IGFBP-1 secretion after inhibition with ethanol resulting in higher IGF-1 levels (54), and seemed to stimulate IGF-1 release and IGF-1 receptor signaling pathways (55). Due to the strong reproducible association and known interactions, we assume betaine to play a major role in IGF-1-associated metabolic diseases.

For pipecolate, a metabolite involved in the catabolic pathway of lysine, we detected a strong inverse association with IGF-1. Interestingly, previous studies (56, 57) reported positive relations between lysine and IGF-1. Thus, our data could be explained by a possible suppressed degradation of lysine, which connects an increase in IGF-1 with a decrease in pipecolate levels. To the best of our knowledge, pipecolate itself has not been described to be associated with IGF-1 levels before. However, studies demonstrated a major role of pipecolate in cell differentiation and proliferation (58) and showed that pipecolate levels are dependent on physiological liver (59), endocrine function, and respiratory chain activity (60), which all represent physiological targets of IGF-1 as well. However, further research is necessary to validate and clarify the causal association between pipecolate and IGF-1.

Taken together, the in the present study, three strongest associated metabolites are members of the protein/peptide/amino acid metabolism which in general is known to be strongly influenced by IGF-1 actions, and additionally, they represent three major fields of IGF-1 action: 1) lowering metabolic diseases (betaine), 2) inflammatory processes (bradykinin) and 3) possibly growth, differentiation, and proliferation (pipecolate) (61).

#### Lipids

IGF-1 was associated with various representatives of glycerophospholipids, phosphatidylinositolm, and phosphatidylcholine. In addition to the above-mentioned IGF-1-induced protein kinase C translocation and activation, Divecha et al (45) observed an IGF-1-induced decrease in polyphosphoinositol lipid mass in the nuclei, which was seen in different studies and could be caused by IGF-1 stimulated nuclear phosphoinositidase, which hydrolyzes polyphosphoinositol lipids (62). The depletion of related intermediates from plasma in response to increasing IGF-1 levels as observed here might be an indication for the described effect. Moreover, it is known that IGF-1 is associated with lipid metabolism (12) and that low IGF-1 levels are followed by up-regulated fatty acid metabolism (63).

In line with these findings, we observed negative association of IGF-1 with the unsaturated fatty acids palmitoleate docosapentaenoate and dihomolinolenate and saturated palmitate. Palmitate occurs as a component in multiple other associated lipids and has an opposite effect on insulin physiology than IGF-1. It decreased  $\beta$ -cell viability and was elevated in diabetes (64). Dihomolinolenate is a prostaglandin E1 precursor, and its negative association with IGF-1 could support the thesis of low inflammatory response under IGF-1 influence in addition to prostaglandin E1 has been described to stimulate IGF-1 secretion (65). A direct relative of docosapentaenoate, docosahexaenoic acid, is known to have influence on inflammatory processes as well (66). Palmitoleate and the metabolite 1-palmitoyl-glycerophosphate might occur as representatives of the negative association between fatty acid derivatives and IGF-1 because of their key role and high incidence in lipid metabolism: 1-palmitoyl-glycerophosphate is the major lysophosphatidic acid in plasma, which has functions in growth and differentiation processes as well as in cancer (67), and its association can be explained just by its incidence in plasma. Palmitoleate, also known as 9-hexadecenoic acid, is a common compound of glycerides in human adipose tissue and might occur as one associated metabolite because in fatty acid biosynthesis, it is the final fatty acid compound before glycero(phospho-)lipid synthesis and fatty acid elongation take place. Thus, we suppose an important role for the fatty acid derivatives dihomolinolenate and docosapentaenoate in IGF-1 have an influence on inflammation. Interventional human studies found interactions of IGF-1 with nonesterified fatty acids but showed increased blood fatty acids levels (68), especially palmitic acid (69), after IGF-1 administration. Why in men fatty acids and IGF-1 show rather positive than negative relations as is also seen in our data remains to be solved in future investigation.

#### Energy metabolism and mitochondrial function

Our study revealed a negative association between nicotinamide and IGF-1 in plasma, suggesting an influence of IGF-1 on the energy status of the cells in peripheral tissues. This suggestion relies on the central role of the cofactor nicotinamide dinucleotide (NAD) in the citric acid cycle as an energy conductor. Nicotinamide in turn forms an essential part of NAD. IGF-1 was described to stabilize the mitochondrial membrane potential (70) that is essential for the function of the respiratory chain and maintains citric acid cycle activity under hypoxia (71). The present results may imply a mediating role of NAD in these processes.

Furthermore, the nucleotides uridine and 5-methyluridine, which derive from the pyrimidine metabolism, were positively associated with IGF-1. Interestingly, the expression of the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier PNC1 is dependent on IGF-1 signaling via the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mechanistic target of rapamycin (PI3-K-mTOR) pathway. PNC1 is a carrier that prefers to transport uridine 5-triphosphate (UTP), and mitochondrial UTP-concentration was shown to be directly dependent on PNC1 availability. Cellular UTP content did not vary in dependence on PNC1. PNC1 expression and correlated UTP levels play a role in maintaining physiological mitochondria function for cell growth and differentiation (72). The ability of maintaining physiological mitochondria function has already been attributed to IGF-1 (70, 71).

# Sex differences in the association of IGF-1 with the metabolome

As mentioned in the previous sections, we revealed a strong sex dependence with more metabolites being significantly associated in females. In line with our results, various reports revealed a sex dependency in relation to IGF-1, eg, in GH secretion (73) or therapy (74), pattern of cardiovascular risk factors (75), and even mortality (49). A bit contradictory, GH-deficient men were more sensitive to GH administration than women and also induced changes were more accentuated in men (74). However, especially low circulating IGF-1 levels seemed to be a metabolic risk factor in men (49); hence, the general healthy state of the present study population might in part explain the unexpected missing of significant findings in men. In addition, the general higher metabolite concentrations in men (76) possibly blunted the small variations in IGF-1 levels seen in the present population. To further investigate possible reasons for these discrepancies, we applied random forest regression analyses embedded in a twostage cross-validation procedure to compile a signature of metabolic variables (anthropometric measures, blood lipids, markers of glucose metabolism, inflammation, and liver disease as well as lifestyle parameters) in addition to the metabolome to predict either log(IGF-1) or the IGF-1 to IGFBP-3 ratio in men and women, respectively (Supplemental Figure 5). Statistical relevance of the variables was confirmed by Boruta feature (77) selection (Supplemental Figure 6). Age and waist circumference were independent of sex, the most important predictors for both log(IGF-1) and the IGF-1 to IGFBP-3 ratio (Supplemental Figures 5 and 6).

With respect to log(IGF-1), further parameters with high impact were other anthropometric variables, the estimated GFR, or blood lipids. The most obvious differences were observed with respect to the importance of GGT in men and the presence of hypertension in women. Notably, both conditions greatly differed between the sexes because men consumed a greater amount of alcohol, which alters serum GGT activities, and had a higher prevalence of hypertension. More pronounced differences in the prediction profile became obvious with respect to the IGF-1 to IGFBP-3 ratio. Whereas in men a high influence of parameters of liver function could be observed, the IGF-1 to IGFBP-3 ratio seems to rely to a greater extend on blood lipids among women. We would expect that these sex-specific metabolic conditions affecting either log(IGF-1) or the IGF-1 to IGFBP-3 ratio would even translate in the metabolome analyses despite adjustment for most of the named variables and might partly explain the different findings in men and women. An example would be the strong associations between the IGF-1 to IGFBP-3 ratio and plasma lipid species in women, which was not seen in men. As outlined above, blood lipid parameters are important predictors of the IGF-1 to IGFBP-3 ratio: among women and because high-density lipoprotein and LDL cholesterol particles are carriers of such or even composed thereof, this might be an additional explanation for the association observed. Similarly, this might hold true for the association between log(IGF-1) and bradykinin seen only in women. Bradykinin is a potent vasodilator (39), and hence, the observation that hypertension is an important condition in the prediction of log(IGF-1) in women but not in men further strengths the impact of different metabolic conditions in men and women.

In addition to the sex-specific metabolic conditions affecting the GH/IGF-1 axis, the distinct association between steroids and IGF-1 as demonstrated in the present study might be a further explanation for the sex differences. In general, the impact of the sex on the outcome of clinical medical research is well recognized (78) and further research is needed to clarify the found differences is respect to the metabolome.

#### Conclusion

To the best of our knowledge, we are the first to demonstrate the broad IGF-1 effects on the whole metabolism in the human body. We revealed a multifaceted image of associated plasma and urine metabolites, which revealed a strong difference between men and women. Confirming previous reports, we detected relations between IGF-1 and steroid hormones. Furthermore, several associated metabolites were also found to be related with IGF-1 associated diseases, eg, betaine and cortisol in cardiovascular disease and metabolic syndrome, lipid disorders, and diabetes, or were known to be associated with differentiation and proliferation as well as mitochondrial functionality, eg, phospholipids and pipecolate. Bradykinin, fatty acid derivatives, and cortisol metabolism might establish a link of IGF-1 with inflammation. All of these metabolites were negatively associated with IGF-1 and play a major role in (eg, endothelial) inflammation processes.

Our data clearly confirm the broad range of IGF-1 action on human metabolism as suggested by previous experimental studies. Furthermore, our investigation of healthy subjects suggests promising biomarkers of IGF-1 action on metabolism, which have to be confirmed in independent and interventional studies to further elucidate the metabolic fate of IGF-1.

## Acknowledgments

We thank Bianca Schmick (Genome Analysis Center) for her expert technical assistance.

Address all correspondence and requests for reprints to: Nele Friedrich, PhD, Institute for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, University Medicine Greifswald, Ferdinand-Sauerbruch-Straße NK, D-17475 Greifswald, Germany. E-mail: nele.friedrich@uni-greifswald.de.

This work is also part of the research project Greifswald Approach to Individualized Medicine.

This work was supported by grants from the German Federal Ministry of Education and Research (Grants 01ZZ0403, 01ZZ0103, 01GI0883, and AtheroSysMed 03IS2061B) and the Ministry for Education, Research, and Cultural Affairs as well as the Ministry of Social Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania. The Greifswald Approach to Individualized Medicine consortium is supported by the Federal Ministry of Education and Research and the Ministry of Cultural Affairs of the Federal State of Mecklenburg-West Pomerania (Grant 03IS2061A). A part of this study was supported by a German Center Diabetes Research (DZD e.V.) grant (to J.A.).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

#### References

 Brooker GJ, Kalloniatis M, Russo VC, Murphy M, Werther GA, Bartlett PF. Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. J Neurosci Res. 2000;59:332–341.

- 2. Ojeda SR, Dissen GA. Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 1994;5:317–323.
- Sofikitis N, Giotitsas N, Tsounapi P, Baltogiannis D, Giannakis D, Pardalidis N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 2008;109:323–330.
- Skrtic S, Wallenius V, Ekberg S, Brenzel A, Gressner AM, Jansson JO. Insulin-like growth factors stimulate expression of hepatocyte growth factor but not transforming growth factor β1 in cultured hepatic stellate cells. *Endocrinology*. 1997;138:4683–4689.
- Rabkin R, Schaefer F. New concepts: growth hormone, insulin-like growth factor-I and the kidney. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14: 270–276.
- Colao A. The GH-IGF-1 axis and the cardiovascular system: clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;69:347–358.
- 7. Ohlsson C, Mohan S, Sjogren K, et al. The role of liver-derived insulin-like growth factor-I. *Endocr Rev.* 2009;30:494–535.
- Juul A, Dalgaard P, Blum WF, et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-1, IGF-1I, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:2534–2542.
- 9. Lam CS, Chen MH, Lacey SM, et al. Circulating insulin-like growth factor-1 and its binding protein-3: metabolic and genetic correlates in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1479–1484.
- Ren J, Anversa P. The insulin-like growth factor I system: physiological and pathophysiological implication in cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome. *Biochem Pharmacol*. 2015;93:409–417.
- 11. Ungvari Z, Csiszar A. The emerging role of IGF-1 deficiency in cardiovascular aging: recent advances. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2012;67:599–610.
- 12. Eggert ML, Wallaschofski H, Grotevendt A, et al. Cross-sectional and longitudinal relation of IGF1 and IGF-binding protein 3 with lipid metabolism. *Eur J Endocrinol*. 2014;171:9–19.
- Friedrich N, Thuesen B, Jorgensen T, et al. The association between IGF-1 and insulin resistance: a general population study in Danish adults. *Diabetes Care*. 2012;35:768–773.
- Burgers AM, Biermasz NR, Schoones JW, et al. Meta-analysis and dose-response metaregression: circulating insulin-like growth factor I (IGF-1) and mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:2912– 2920.
- 15. Roessner U, Bowne J. What is metabolomics all about? *Biotechniques*. 2009;46:363–365.
- 16. Völzke H, Alte D, Schmidt CO, et al. Cohort profile: the Study of Health in Pomerania. *Int J Epidemiol*. 2011;40:294–307.
- Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Anal Chem.* 2009;81:6656–6667.
- Dieterle F, Ross A, Schlotterbeck G, Senn H. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem.* 2006;78:4281–4290.
- 19. Do KT, Kastenmuller G, Mook-Kanamori DO, et al. Networkbased approach for analyzing intra- and interfluid metabolite associations in human blood, urine, and saliva. *J Proteome Res.* 2015; 14:1183–1194.
- Janssen JA, Stolk RP, Pols HA, Grobbee DE, de Jong FH, Lamberts SW. Serum free IGF-1, total IGF-1, IGFBP-1 and IGFBP-3 levels in an elderly population: relation to age and sex steroid levels. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48:471–478.
- 21. Barrou Z, Charru P, Lidy C. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging. Arch Gerontol Geriatr. 1997;24:233–241.
- 22. Traish AM, Kang HP, Saad F, Guay AT. Dehydroepiandrosterone

(DHEA)—a precursor steroid or an active hormone in human physiology. J Sex Med. 2011;8:2960–2982; quiz 2983.

- Jorgensen JO, Christensen JJ, Krag M, Fisker S, Ovesen P, Christiansen JS. Serum insulin-like growth factor I levels in growth hormone-deficient adults: influence of sex steroids. *Horm Res.* 2004; 62(suppl 1):73–76.
- Goodman-Gruen D, Barrett-Connor E. Effect of replacement estrogen on insulin-like growth factor-I in postmenopausal women: the Rancho Bernardo Study. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:4268– 4271.
- Rochlani Y, Pothineni NV, Mehta JL. Metabolic syndrome: does it differ between women and men? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2015;29: 329–338.
- Gurka MJ, Vishnu A, Santen RJ, DeBoer MD. Progression of metabolic syndrome severity during the menopausal transition. J Am Heart Assoc. 2016;5.
- Gross JJ, Wellnitz O, Bruckmaier RM. Cortisol secretion in response to metabolic and inflammatory challenges in dairy cows. J Anim Sci. 2015;93:3395–3401.
- Dickerson SS, Kemeny ME. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull.* 2004;130:355–391.
- Sakayama K, Mashima N, Kidani T, Miyazaki T, Yamamoto H, Masuno H. Effect of cortisol on cell proliferation and the expression of lipoprotein lipase and vascular endothelial growth factor in a human osteosarcoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008; 61:471–479.
- Anagnostis P, Athyros VG, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Clinical review: the pathogenetic role of cortisol in the metabolic syndrome: a hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94:2692–2701.
- Brindley DN. Role of glucocorticoids and fatty acids in the impairment of lipid metabolism observed in the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19(suppl 1):S69–S75.
- Whitworth JA, Williamson PM, Mangos G, Kelly JJ. Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1: 291–299.
- McCarthy TL, Centrella M, Canalis E. Cortisol inhibits the synthesis of insulin-like growth factor-I in skeletal cells. *Endocrinology*. 1990;126:1569–1575.
- Cianfarani S, Germani D, Rossi L, et al. IGF-1 and IGF-binding protein-1 are related to cortisol in human cord blood. *Eur J Endocrinol*. 1998;138:524–529.
- Agha A, Monson JP. Modulation of glucocorticoid metabolism by the growth hormone-IGF-1 axis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;66: 459–465.
- Fisker S, Jorgensen JO, Vahl N, Orskov H, Christiansen JS. Impact of gender and androgen status on IGF-1 levels in normal and GHdeficient adults. *Eur J Endocrinol.* 1999;141:601–608.
- Christiansen JJ, Fisker S, Gravholt CH, et al. Discontinuation of estrogen replacement therapy in GH-treated hypopituitary women alters and rogen status and IGF-1. *Eur J Endocrinol*. 2005;152:719– 726.
- Roelfsema F, Moolenaar AJ, Frolich M. The influence of bromocriptine and transsphenoidal surgery on urinary androgen metabolite excretion in acromegaly. *Acta Endocrinol (Copenb)*. 1984;107: 302–311.
- Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, et al. Bradykinin and des-Arg(9)bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H275–H283.
- Webb JG, Tan Y, Jaffa MA, Jaffa AA. Evidence for prostacyclin and cAMP upregulation by bradykinin and insulin-like growth factor 1 in vascular smooth muscle cells. J Recept Signal Transduct Res. 2010;30:61–71.
- Alric C, Pecher C, Cellier E, et al. Inhibition of IGF-1-induced Erk 1 and 2 activation and mitogenesis in mesangial cells by bradykinin. *Kidney Int*. 2002;62:412–421.
- 42. Pandiella A, Meldolesi J. Reinforcement of signal generation at B2

bradykinin receptors by insulin, epidermal growth factors, and other growth factors. J Biol Chem. 1989;264:3122–3130.

- Lowe WL Jr, Yorek MA, Karpen CW, et al. Activation of protein kinase-C differentially regulates insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor messenger RNA levels. *Mol Endocrinol*. 1992;6:741–752.
- 44. Lowe WL Jr, Yorek MA, Teasdale RM. Ligands that activate protein kinase-C differ in their ability to regulate basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*. 1993;132:1593–1602.
- 45. Divecha N, Banfic H, Irvine RF. The polyphosphoinositide cycle exists in the nuclei of Swiss 3T3 cells under the control of a receptor (for IGF-1) in the plasma membrane, and stimulation of the cycle increases nuclear diacylglycerol and apparently induces translocation of protein kinase C to the nucleus. *EMBO J.* 1991;10:3207– 3214.
- Regoli D, Gobeil F. Kinins and peptide receptors. *Biol Chem.* 2016; 397:297–304.
- 47. Apicella JM, Lee EC, Bailey BL, et al. Betaine supplementation enhances anabolic endocrine and Akt signaling in response to acute bouts of exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113:793–802.
- Friedrich N, Nauck M, Schipf S, Volzke H, Brabant G, Wallaschofski H. Cross-sectional and longitudinal associations between insulin-like growth factor I and metabolic syndrome: a general population study in German adults. *Diabetes Metab Res Rev.* 2013;29: 452–462.
- Friedrich N, Haring R, Nauck M, et al. Mortality and serum insulinlike growth factor (IGF)-I and IGF binding protein 3 concentrations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:1732–1739.
- 50. Ueland PM. Choline and betaine in health and disease. J Inherit Metab Dis. 2011;34:3–15.
- 51. Konstantinova SV, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, Bleie O, Ueland PM. Divergent associations of plasma choline and betaine with components of metabolic syndrome in middle age and elderly men and women. *J Nutr.* 2008;138:914–920.
- Lever M, Slow S. The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem*. 2010; 43:732–744.
- Ji C, Kaplowitz N. Betaine decreases hyperhomocysteinemia, endoplasmic reticulum stress, and liver injury in alcohol-fed mice. *Gastroenterology*. 2003;124:1488–1499.
- Lee MS, Kim MS, Park SY, Kang CW. Effects of betaine on ethanolstimulated secretion of IGF-1 and IGFBP-1 in rat primary hepatocytes: involvement of p42/44 MAPK activation. World J Gastroenterol. 2006;12:1718–1722.
- Cholewa JM, Guimaraes-Ferreira L, Zanchi NE. Effects of betaine on performance and body composition: a review of recent findings and potential mechanisms. *Amino Acids*. 2014;46:1785–1793.
- Bolze MS, Reeves RD, Lindbeck FE, Elders MJ. Influence of selected amino acid deficiencies on somatomedin, growth and glycosaminoglycan metabolism in weanling rats. J Nutr. 1985;115:782–787.
- Liao SF, Wang T, Regmi N. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *Springerplus*. 2015;4:147.
- Wang L, Schulz TC, Sherrer ES, et al. Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood.* 2007;110:4111–4119.
- 59. Yao W, Gu H, Zhu J, et al. Integrated plasma and urine metabolomics coupled with HPLC/QTOF-MS and chemometric analysis on potential biomarkers in liver injury and hepatoprotective effects of Er-Zhi-Wan. Anal Bioanal Chem. 2014;406:7367–7378.
- 60. Baas JC, van de Laar R, Dorland L, et al. Plasma pipecolic acid is frequently elevated in non-peroxisomal disease. *J Inherit Metab Dis*. 2002;25:699–701.
- 61. Russell-Jones DL, Umpleby AM, Hennessy TR, et al. Use of a leucine clamp to demonstrate that IGF-1 actively stimulates protein synthesis in normal humans. *Am J Physiol*. 1994;267:E591–E598.
- 62. Martelli AM, Gilmour RS, Bertagnolo V, Neri LM, Manzoli L,

**Cocco L.** Nuclear localization and signalling activity of phosphoinositidase C $\beta$  in Swiss 3T3 cells. *Nature*. 1992;358:242–245.

- 63. Thankamony A, Capalbo D, Marcovecchio ML, et al. Low circulating levels of IGF-1 in healthy adults are associated with reduced β-cell function, increased intramyocellular lipid, and enhanced fat utilization during fasting. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:2198–2207.
- 64. Dixon G, Nolan J, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. Arachidonic acid, palmitic acid and glucose are important for the modulation of clonal pancreatic β-cell insulin secretion, growth and functional integrity. *Clin Sci (Lond)*. 2004;106:191–199.
- 65. Lipinsky PV, Sirotin IV, Skoroglyadov AV, et al. Effects of prostaglandin E1 on callus formation in rabbits. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16:247.
- 66. Darghosian L, Free M, Li J, et al. Effect of ω-three polyunsaturated fatty acids on inflammation, oxidative stress, and recurrence of atrial fibrillation. *Am J Cardiol.* 2015;115:196–201.
- 67. Shen Z, Wu M, Elson P, et al. Fatty acid composition of lysophosphatidic acid and lysophosphatidylinositol in plasma from patients with ovarian cancer and other gynecological diseases. *Gynecol Oncol.* 2001;83:25–30.
- Bianda TL, Hussain MA, Keller A, et al. Insulin-like growth factor-I in man enhances lipid mobilization and oxidation induced by a growth hormone pulse. *Diabetologia*. 1996;39:961–969.
- Liang G, Cline GW, Macica CM. IGF-1 stimulates de novo fatty acid biosynthesis by Schwann cells during myelination. *Glia*. 2007;55: 632–641.
- 70. Lai HC, Liu TJ, Ting CT, Sharma PM, Wang PH. Insulin-like

growth factor-1 prevents loss of electrochemical gradient in cardiac muscle mitochondria via activation of PI 3 kinase/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol.* 2003;205:99–106.

- 71. Pi Y, Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. Mitochondrial involvement in IGF-1 induced protection of cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury. *Mol Cell Biochem*. 2007;301:181–189.
- Floyd S, Favre C, Lasorsa FM, et al. The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Mol Biol Cell*. 2007;18: 3545–3555.
- 73. Span JP, Pieters GF, Sweep CG, Hermus AR, Smals AG. Gender difference in insulin-like growth factor I response to growth hormone (GH) treatment in GH-deficient adults: role of sex hormone replacement. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:1121–1125.
- 74. Span JP, Pieters GF, Sweep FG, Hermus AR, Smals AG. Gender differences in rhGH-induced changes in body composition in GHdeficient adults. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:4161–4165.
- 75. Unden AL, Elofsson S, Brismar K. Gender differences in the relation of insulin-like growth factor binding protein-1 to cardiovascular risk factors: a population-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005; 63:94–102.
- Krumsiek J, Mittelstrass K, Do KT, et al. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics*. 2015; 11:1815–1833.
- 77. Kursa MB, Rudnicki WR. Feature selection with the boruta package. J Stat Softw. 2010;36:1–13.
- Morselli E, Frank AP, Santos RS, Fatima LA, Palmer BF, Clegg DJ. Sex and gender: critical variables in pre-clinical and clinical medical research. *Cell Metab.* 2016;24:203–209.

## **Supplemental figures**



**Supplemental Figure 1.** Corrected p-values from univariate linear regression analysis of metabolites associated with IGF-I and IGF/IGFBP3 ratio among women in plasma (left panel) and urine (right panel). The dotted line denotes a false discovery rate (FDR) of 0.05, displaying the significance threshold. Orange marked metabolites are related either to IGF-I or the IGF-I/IGFBP-3 ratio. Regression models are adjusted for age, smoking, alcohol consumption, physical activity, waist circumference, liver diseases, LDL cholesterol and hypertension.



**Supplemental Figure 2.** OPLS analyses for modelling IGF-I and IGF-I/IGFBP-3 ratio based on **urine metabolites** among women. Left side: OPLS score plots for log IGF-I (top line) and IGF-I/IGFBP-3 ratio (bottom line) showing the predictive component t[1] and the first orthogonal component t<sub>0</sub>[1]. Right side: Corresponding variable influence on projection (VIP) values of the predictive component. The five metabolites with the highest VIP were mentioned.



**Supplemental Figure 3.** Corrected p-values from univariate linear regression analysis of **plasma metabolites** associated with IGF-I (left side) and IGF/IGFBP3 ratio (right side) against the variable influence on projection (VIP) values based on orthogonal partial least squares (OPLS) regression analyses among women.



**Supplemental Figure 4.** Corrected p-values from univariate linear regression analysis of **urine metabolites** associated with IGF-I (left side) and IGF/IGFBP3 ratio (right side) against the variable influence on projection (VIP) values based on orthogonal partial least squares (OPLS) regression analyses among women.



**Supplemental Figure 5.** Final results from random forest regression analyses predicting log(IGF-I) (*upper panel*) and the IGF-I/IGFBP-3 ratio (*lower panel*) in men (*left panel*) and women (*right panel*) in a two-stage cross validation. For each hormone and sex the dotchart shows the mean and standard deviation of a weighted (root mean square error) rank for the ten most important variables across the 10 outer loops. Additionally, explained (R<sup>2</sup>) and predicted variance (Q<sup>2</sup>) are displayed as boxplots. eGFR = estimated glomerular filtration rate; GGT = gamma-glutamyl transpeptidase; AST = aspartate amino transferase; ALT = alanine amino transferase.



**Supplemental Figure 6.** Boxplots of importance measures from Boruta feature selection with a random forest as classifier for prediction of log(IGF-I) (left panel) and the IGF-I/IGFBP-3 ratio (right panel) in men (upper panel) and women (lower panel), respectively. Green boxes indicate significant (p<0.01) important variables to explain serum hormone concentrations. Blue boxes indicate variation in shadow variables used to assess random noise. WC = waist circumference; GGT =  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase; AST = aspartate transaminase; HbA1c = glycated hemoglobin; ALT = alanine transaminase.

# Supplemental tables

**Supplemental Table 1.** Metabolites with variable importance in projection (VIP) > 1 resulting from OPLS models in women.

Plasma			Urine		
	IGF-I/IGFBP3	IGF-I		IGF-I/IGFBP3	IGF-I
	ratio			ratio	
5alpha-pregnan-3beta,20alpha-diol disulfate	2.476	2.201	andro steroid monosulfate 2	3.888	3.263
pregnanediol-3-glucuronide	2.286	1.716	DHEA-S	3.336	2.787
DHEA-S	2.223	2.290	4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate (2)	3.162	2.956
pregn steroid monosulfate	2.115	1.928	androsterone sulfate	3.090	2.826
pregnenolone sulfate	1.877	1.901	epiandrosterone sulfate	2.918	2.390
epiandrosterone sulfate	1.873	1.976	andro steroid monosulfate (1)	2.698	2.351
1-oleoylglycerol (1-monoolein)	1.773	1.705	etiocholanolone glucuronide	2.521	2.461
androsterone sulfate	1.760	1.921	21-hydroxypregnenolone disulfate	2.372	2.149
eicosapentaenoate (EPA; 20:5n3)	1.547	1.054	pregnen-diol disulfate	2.080	2.104
docosapentaenoate (n3 DPA; 22:5n3)	1.542	1.383	4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate (1)	1.986	2.226
CMPF	1.517	1.268	histidine	1.913	1.664
palmitoleate (16:1n7)	1.514	1.254	X - 17736	1.865	1.388
bilirubin (Z,Z)	1.463		CMPF	1.821	1.585
10-heptadecenoate (17:1n7)	1.453	1.314	X - 16087	1.736	1.731
X - 11372	1.424	1.029	salicyluric glucuronide	1.656	1.357
eicosenoate (20:1n9 or 11)	1.362	1.146	X - 18838	1.499	1.603
andro steroid monosulfate 2	1.357	1.323	X - 12258	1.459	1.037
X - 11880	1.316	1.101	X - 12122	1.402	
hexanoylcarnitine	1.288	1.267	X - 12704	1.360	1.043
butyrylcarnitine	1.287		X - 01911	1.359	1.407
pregnen-diol disulfate	1.275	1.428	tryptophan	1.354	
X - 02269	1.273	1.124	X - 16397	1.344	
10-nonadecenoate (19:1n9)	1.258	1.219	X - 20620	1.313	1.156
X - 12096	1.241	1.093	N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG)	1.295	1.593
docosahexaenoate (DHA; 22:6n3)	1.239		X - 13726	1.280	1.213
hydroxybutyrylcarnitine	1.239	1.174	X - 13844	1.274	1.326
X - 11299	1.210		X - 16774	1.267	1.002
1-arachidonoylglycerophosphoinositol	1.191		X - 11357	1.251	
X - 11469	1.189		tyrosine	1.230	
X - 11564	1.185	1.041	4-ethylphenylsulfate	1.228	
gamma-glutamylvaline	1.185		X - 12329	1.211	
21-hydroxypregnenolone disulfate	1.176	1.050	N-acetylaspartate (NAA)	1.206	1.443

myristoleate (14:1n5)	1.161	1.113	N-acetyl-1-methylhistidine	1.200	
C-glycosyltryptophan	1.161	1.083	glycocholenate sulfate	1.195	
cyclo(leu-pro)	1.160		homovanillate sulfate	1.194	1.228
bradykinin, des-arg(9)	1.158		glycylproline	1.171	1.196
bradykinin	1.151		N6-acetyllysine	1.139	1.088
1-stearoylglycerophosphoethanolamine	1.106		X - 11593	1.136	
palmitate (16:0)	1.101		N-acetylthreonine	1.126	1.123
1-palmitoylglycerophosphate	1.082		uracil	1.121	1.143
4-acetamidobutanoate	1.079		X - 17353	1.120	1.350
gamma-glutamylisoleucine	1.072		X - 17185	1.109	
urea	1.071		X - 12722	1.093	
1-eicosapentaenoylglycerophosphoethanolamine	1.071		5-hydroxyhexanoate	1.090	
dihomo-linolenate (20:3n3 or n6)	1.059		4-vinylphenol sulfate	1.081	
glutamate	1.057		hydroquinone sulfate	1.073	1.085
N1-Methyl-2-pyridone-5-carboxamide	1.045		X - 12511	1.045	
oleate (18:1n9)	1.043		N-acetylhistidine	1.043	
3-(4-hydroxyphenyl)lactate	1.034		X - 17348	1.034	1.235
1-palmitoylglycerophosphoinositol	1.030		phenylcarnitine	1.033	1.286
cortisone	1.021	1.015	X - 17303	1.028	
X - 12095	1.018		X - 17320	1.026	
myristate (14:0)	1.015		X - 12636	1.024	
4-androsten-3beta,17beta-diol disulfate (2)	1.015	1.162	dihydroferulic acid	1.006	
15-methylpalmitate	1.009		X - 17453	1.000	
gamma-glutamylphenylalanine	1.007		sucrose		1.271
xanthine	1.004		creatine		1.270
X - 02249	1.000		3-methylhistidine		1.208
glycoursodeoxycholate		1.257	X - 11440		1.175
X - 11315		1.183	X - 12753		1.113
X - 17323		1.150	guanine		1.072
pyroglutamine		1.091	X - 17361		1.061
gamma-glutamyltyrosine		1.090	7,8-dihydroneopterin		1.058
palmitoylcarnitine		1.065	X - 13709		1.045
X - 17612		1.029	N-acetyl-beta-alanine		1.023
oleoylcarnitine		1.004	1,7-dimethylurate		1.016

3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoate (CMPF), dehydroisoandrosterone sulfate (DHEA-S), 15-methylpalmitate (isobar with 2-methylpalmitate).

Supplemental Table 2 and 3 are presented in an extra excel file (Supplemental tables.xlsx).

### **Supplemental methods**

#### Metabolomics Measurements

Non-targeted metabolomics analysis for metabolic profiling was conducted at the Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München. Two separate LC-MS/MS analytical methods mere used as previously published, i.e. in positive and in negative ionization modes, were used to detect a broad metabolite panel (Evans et al. 2009 19624122). In this study, samples were divided into two sets according to the biological matrices of the samples, i.e. plasma and urine. On the day of extraction, samples were thawed on ice. A 100µL of the sample were pipetted into a 2mL 96-well plate. In addition to study samples, a human pooled reference plasma sample (Seralab, West Sussex, United Kingdom) and another pooled reference matrix of each sample set (Seralab, West Sussex, United Kingdom) were extracted and placed in 1 and 6 wells, respectively, of the 96-well plate. These samples served as technical replicates throughout the data set to assess process variability. Beside those samples, 100µL of water was extracted as samples and placed in 6 wells of the 96-well plate to serve as process blanks. Protein was precipitated and the metabolites were extracted with  $475 \mu L$ methanol, containing four recovery standards to monitor the extraction efficiency. After centrifugation, the supernatant was split into 4 aliquots of 100µL each onto two 96-well microplates. The first 2 aliquots were used for LC-MS/MS analysis in positive and negative electrospray ionization mode. Two further aliquots were kept as a reserve. The extracts were dried on a TurboVap 96 (Zymark, Sotax, Lörrach, Germany). Prior to LC-MS/MS in positive ion mode, the samples were reconstituted with 0.1% formic acid (50µl for plasma, 100µl for urine). Whereas samples analyzed in negative ion mode were reconstituted with 6.5mM ammonium bicarbonate (50µl for plasma, 100µl for urine), pH 8.0. Reconstitution solvents for both ionization modes contained internal standards that allowed monitoring of instrument performance and also served as retention reference markers. To minimize human error, liquid handling was performed on a Hamilton Microlab STAR robot (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland). LC-MS/MS analysis was performed on a linear ion trap LTQ XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany) coupled with a Waters Acquity UPLC system (Waters GmbH, Eschborn, Germany). Two separate columns (2.1 x 100 mm Waters BEH C18, 1.7 µm particle-size) were used either for acidic (solvent A: 0.1% formic acid in water, solvent B: 0.1% formic acid in methanol) and or for basic (A: 6.5mM ammonium bicarbonate, pH 8.0, B: 6.5mM ammonium bicarbonate in 95% methanol) mobile phase conditions, optimized for positive and negative electrospray ionization, respectively. After injection of the sample extracts, the columns were developed in a gradient of 99.5% A to 98% B over an 11 min run time at 350µLl/min flow rate. The eluent flow was directly run through the ESI source of the LTQ XL mass spectrometer. The mass spectrometer analysis alternated between MS and data-dependent MS/MS scans using dynamic exclusion and the scan range was from 80-1000 m/z. Metabolites were identified by Metabolon, Inc. from the LC-MS/MS data by automated multiparametric comparison with a proprietary library, containing retention times, m/z ratios, and related adduct/ fragment spectra (Lawton et al. 2008 18384253). Identification criteria for the detected metabolites are described in Evans et al. (Evans et al. 2009 19624122). Quality control methods and normalization of metabolite levels are explained in detail in the supplement.

#### Metabolomics Measurements: Quality Control and Normalization of Metabolite Levels

To correct for daily variations of platform performance, the raw ion count of each metabolite was rescaled by the respective median value of the run day. Valid estimation of the median was ensured by keeping only metabolites with at least three measured values on more than the half of the run days. This procedure resulted in 475 and 558 metabolites for plasma and urine, respectively, available for the present analysis. 263 metabolites were measured in both bio fluids. We chose probabilistic quotient normalization (PQN) (Dieterle et al. 2006 16808434) to account for diurnal variation of urine samples, since this procedure was shown to be superior to the common creatinine scaling. For this purpose we calculated a mean-pseudo-spectrum depending on metabolites with measurements for all participants (131 urine metabolites). Subsequently, we calculated a dilution factor as the median quotient between the reference spectrum and each sample. Of note, urine creatinine and the estimated dilution factor were highly correlated (r=0.91, p<0.001) within the present study sample. Afterwards all metabolite levels were log<sub>2</sub>-transformed. Separately for plasma and urine samples we performed multivariate outlier detection using an algorithm proposed by Filzmoser et al. (Filzmoser et al. 2008) as implemented in the *pcout* function within the R package *mvoutlier*. The algorithm provides an outlier score for each sample based on a weighted combination of location and scatter estimations using principle component analysis and the Mahalanobis distance on a robustly scaled data matrix. The default parameters were used for the identification process, except the critical value for the location outliers was set to 4, as it corresponds to a 4 SD exclusion criteria. The minimum score was used as cut-off for outlier identification. As a result 13 and 8 samples from plasma and urine were excluded, respectively.

### Gaussian graphical models (GGMs)

Briefly, GGMs are based on partial correlations, which represent the correlation between two metabolites correcting for all remaining metabolites. We additionally included age, sex and BMI as covariates to account for major confounding factors. Edges in the GGMs were declared significant if both partial and Pearson correlation were significant at  $\alpha = 0.05$  after Bonferroni correction for all possible edges (correcting for  $\binom{p}{2}$  tests, where p is the number of metabolites). Since GGM calculation requires a full data matrix, imputation of missing values was necessary. The influence of the imputation was minimized by exclusion of all metabolites with more than 20% missing values, resulting in 263 and 399 metabolites in plasma and urine, respectively. Assuming missing values mainly due to low concentrations of metabolites, the distribution of each metabolite on a run day could be estimated as a left-censored log-normal distribution prior normalization. Hence, we reconstructed

these distributions based on maximum likelihood estimation and sampled missing values from the censored part of the distribution. This procedure was only applied for metabolites with at least ten observations on the specific run day. Remaining missing values were imputed by multiple chained equations using the R-package '*mice*'. Both approaches are expected to rather lower (truncated sampling) or maintain (*mice*, using predictive mean matching) correlations between metabolites than falsely increasing them. Since each data set (plasma and urine) contained a ratio of observations to metabolites of about 2:1 we decided to use a shrinkage estimator based approach as implemented in the R-package '*GeneNet*' (Opgen-Rhein et al. 2007 17683609) to generate the GGMs following previous work (Do et al. 2015 25434815). The GGMs derived for plasma and urine were overlaid to visualize inter-fluid dependencies comprising 576 unique nodes and 681 edges. The network was visualized using the freely available software Cytoscape 3.2.1 (http://www.cytoscape.org/). Subsequently, results from linear regression analyses were mapped on the graph to visually inspect altered clusters of metabolites.

#### Variable Importance on PLS projection (VIP)

The VIP score summarizes the influence on the dependent variables ( $_{Y}$ , here IGF-I or IGF-I/IGFBP-3) of every predictor variable ( $X_k$ , here all plasma or urine metabolites and age) in a given PLS model. The VIP score for the variable  $X_k$  is defined as

$$VIP_{Ak} = \sqrt{\sum_{a=1}^{A} \left( w_{ak}^{2} + * (SSY_{a-1} - SSY_{a}) * \frac{K}{(SSY_{a} - SSY_{A})} \right)}$$

Where *K* is the number of predictors, *A* the number of total dimensions,  $(w_{ak})^2$  the squared PLS weight of variable  $X_k$  for dimension a,  $(SSY_{a-1} - SSY_a)$  the explained sum of squares of the PLS dimension a and  $(SSY_a - SSY_A)$  the total explained sum of squares of the PLS model. The Sum of squares of all VIP's is equal to the number of terms in the model hence the average VIP is equal to 1. Terms with large VIP, larger than 1, are the most relevant for explaining Y.

#### Random Forest Regression

Predictive signatures for log(IGF-I) and the IGF-I/IGFBP-3 ratio were built on the following phenotypic characteristics using random forest regression: age, waist circumference, height, weight, hip circumference, glycated hemoglobin, fibrinogen, creatinine, glucose, cystatin C, estimated glomerular filtration rate, presence of hypertension or liver disease, smoking behavior, amount of alcohol consumption, physical activity, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, cholesterol, serum activities of gamma-glutamyl transpeptidase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and lipase. Feature selection and validation of the performance were assessed in a shuffled two-stage procedure implying the separation of 100 subjects each for independent validation. The inner loop consisted of a feature selection approach as the random forest (500 trees) was trained

with all variables and prediction was performed on the left data. Subsequently, the importance of each variable during this process was obtained based on the permutation of the out-of-bag data and weighted by the achieved root mean square error of prediction. The ten highest ranking variables were now used to build a new random forest which was validated on the unseen remaining subjects (outer loop). Once more weighted variable importance was obtained and finally the ten top ranking candidates were presented (Supplemental Figure 5). Both, the inner and outer loops were repeated ten times. The random forest was implemented in R using the package '*randomForest*'. To compile whether the selected variables were significant predictors of either log(IGF-I) or the IGF-I/IGFBP-3 ratio we employed Boruta feature selection (Kursa et al. 2010). Briefly, this procedure adds noisy variables to the feature matrix which are derived by randomly shuffling original variables. Importance of the variables is obtained using Z-scores derived from the loss of accuracy when omitting a variable. Finally, Z-scores of original features are compared with their noisy shadows to test for a significant contribution.

#### References

Dieterle, F., et al. (2006). "Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics." <u>Anal Chem</u> **78**(13): 4281-4290.

Do, K. T., et al. (2015). "Network-based approach for analyzing intra- and interfluid metabolite associations in human blood, urine, and saliva." J Proteome Res 14(2): 1183-1194.

Evans, A. M., et al. (2009). "Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems." <u>Anal Chem</u> **81**(16): 6656-6667.

Filzmoser, P., et al. (2008). "Outlier identification in high dimensions." <u>Computational Statistics and Data Analysis</u> **52**(3): 1694-1711.

Kursa, M. B. and W. R. Rudnicki (2010). "Feature Selection with the Boruta Package." Journal of Statistical Software **36**(11).

Lawton, K. A., et al. (2008). "Analysis of the adult human plasma metabolome." <u>Pharmacogenomics</u> **9**(4): 383-397.

Opgen-Rhein, R. and K. Strimmer (2007). "From correlation to causation networks: a simple approximate learning algorithm and its application to high-dimensional plant gene expression data." <u>BMC Syst Biol</u> 1: 37.

## 8.3 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum

Unterschrift

## 8.4 Tabellarischer Lebenslauf

## Henrike Knacke

пеннке кнаске	
Geburtsdatum und -ort	07.02.1992 in Eutin
Adresse	Krete 22a
	23701 Eutin
E-Mail	h.knacke@gmx.de
Telefon	+49 160 91934453
Familienstand	Ledig, keine Kinder
Ausbildung	
1998 - 2002	Gustav-Peters-Grundschule, Eutin-Fissau
2002 - 2011	Carl-Maria-von-Weber-Gymnasium, Eutin
10.06.2011	Allgemeine Hochschulreife
04.06 16.09.2012	Pflegepraktikum Sana Klinik Eutin
seit 01.10.2012	Studium an der Universität Greifswald, Humanmedizin
10.09.2014	Physikum
12.10.2017	Zweites Staatsexamen Humanmedizin
20.11.2017 - 21.10.2018	Praktisches Jahr, Wahlfach Neurologie
20.12.2018	Drittes Staatsexamen Humanmedizin
Famulaturen	
29.07 28.08.2015	Neurologie und Rehabilitation. BDH-Klinik Greifswald
11.11 27.11.2016	Anästhesie und Notfallmedizin, Sana Klinik Ostholstein, Eutin
01.02 28.02.2017	Praxis für Pädiatrie, Pulmonologie und Allergologie, Berlin Prenzlauer Allee
01.03 15.03.2017	Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsmedizin Greifswald
17.03 31.03.2017	Klinik für Allgemeine Neurologie, Universitätsklinikum Münster
22.05 06.06.2017	Internistische Notaufnahme, Universitätsmedizin Greifswald
Publikationsliste	"Metabolic Fingerprints of Circulating IGF-1 and the IGF-1/IGFBP-3 Ratio: A Multifluid Metabolomics Study." Knacke H, Pietzner M, Do KT, Römisch- Margl W, Kastenmüller G, Völker U, Völzke H, Krumsiek J, Artati A, Wal- laschofski H, Nauck M, Suhre K, Adamski J, Friedrich N. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Dec;101(12):4730-4742. Epub 2016 Oct 6.
Auslandsaufenthalte	
01.2018 bis 03.2018	Praktisches Jahr, ½ Tertial Chirurgie in Iowa, USA
09.2011 bis 04.2012	Work & Travel in Australien, Neuseeland, Bali
2009	Zweiwöchiger Austausch mit China
2007	Teilnahme am deutsch-französischen Austauschprogramm Brigtte-Sauzay
Sprachkenntnisse	Englisch (fließend), Französisch (fließend), Spanisch (Grundkenntnisse)
Stipendien	
01.10.2015 - 30.09.2017	Deutschlandstipendium der Universität Greifswald
Freizeitaktivitäten	Laufen, Schwimmen, Lesen, Musik

## 8.5 Danksagung

## Mein besonderer Dank gilt

Frau PD Dr. rer. med. Nele Friedrich und Herrn Dr. rer. nat. Maik Pietzner für die Überlassung des Dissertationsthemas, die biomathematische Auswertung und grafische Darstellung sowie die konstante engagierte Betreuung und Geduld,

Herrn Prof. Dr. med. Henri Wallaschofski für die Hilfestellung bei der Klärung medizinischer Fragen,

den Koordinatoren und Mitarbeitern der SHIP-Studie, insbesondere den Kollegen des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Greifswald, für die zur Verfügung gestellten Daten, sowie den Kollegen des Helmholtz Zentrums München für die apparative Unterstützung,

allen Co-Autoren der Publikation für konstruktive Beiträge, Korrekturen und Hilfestellungen,

meinen Eltern Antje Hahn und Dr. med. Peer G. Knacke, meinen Schwestern, meinen Freunden und Mitbewohnern für den liebevollen Rückhalt und die stetige Motivation

sowie den Förderern des Deutschlandstipendiums für die finanzielle Unterstützung.