



## Doctoral Thesis

# Searching for novel cardiometabolic biomarkers method development for differential approaches and analysis of lipids involved in lipoprotein metabolism

**Author(s):**

Karuna, Ratnaningrum Dewi

**Publication Date:**

2010

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006234763> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 19152

**Searching for Novel Cardiometabolic Biomarkers:  
Method Development for Differential Approaches and  
Analysis of Lipids Involved in Lipoprotein Metabolism**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
RATNANINGRUM DEWI KARUNA  
M.Sc., Leiden University in the Netherlands

born January 11, 1977

citizen of Indonesia

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner  
Prof. Dr. Katharina M. Rentsch, co-examiner  
Prof. Dr. Arnold von Eckardstein, co-examiner  
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner

Zürich 2010

## SUMMARY

The current strategy for the prevention of cardiovascular diseases (CVD) is to stratify patients at risk for CVD using different algorithms. However, this has resulted in a high false-positive rate, for example, of 68% and 86% for high and intermediate CVD risks, respectively, in the Munster Heart Study (PROCAM). Novel biomarkers are hence needed to improve the reliability and the cost-benefit relationship of preventative measures. Since a biomarker should ideally be an indicator of normal and pathogenic processes as well as pharmacologic responses to a therapeutic intervention, the potential candidate new markers are those that are relevant to the pathophysiology of atherosclerosis. Several candidates have emerged, for example 27-hydroxycholesterol (27OHC), sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingolipids and phospholipids.

Research over the last decade has revealed that HDL plays a pivotal role in the pathophysiology of atherosclerosis, mainly due to its role in removing the excess of cholesterol in peripheral cells via a reverse cholesterol transport pathway. However, HDL also displays pleiotropic effects on the cardiovascular system which are independent of the reverse cholesterol transport mechanism. 27OHC and S1P are of potential interest due to their roles in HDL metabolism and function.

Published LC-MS methods for the analysis of 27OHC still lacked sensitivity for the measurement in animal models (single mouse) and lipoprotein fractions. Due to this reason, an LC-MS method using atmospheric pressure photoionization (APPI) has been developed and validated. The method was more sensitive than the published LC-APCI-MS or GC-MS methods, enabling us to analyse as little as 15  $\mu$ L sample volume with a lower limit of quantification (LLOQ) of 40 ng/mL or 4.9 pmol on column.

Subsequently, the role of 27OHC in relation to cholesterol metabolism was evaluated for the first time in patients with monogenic disorders affecting HDL metabolism. In most cases, the defects in HDL metabolism affected the 27OHC concentrations in HDL in a similar degree as the cholesterol concentrations. The most important exception was observed in samples from individuals with mutations in the lecithin:cholesterol acyl transferase (LCAT) gene. A reduced LCAT activity appeared to impair the 27OHC esterification in the plasma compartment more pronouncedly than the cholesterol esterification. In addition, several defects in HDL metabolism led to a re-distribution of 27OHC into apoB-containing lipoproteins, which was not observed for cholesterol.

An LC-MS method was developed and validated for the analysis of S1P in plasma and lipoprotein fractions. The method was subsequently used to investigate the determinants of circulating S1P in patients with inborn errors of HDL metabolism. Although only  $\leq 5\%$  of HDL particles carry one S1P molecule, both mildly and severely lowered HDL concentrations limited the quantity of S1P in plasma. By contrast, high concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I did not influence S1P levels in plasma. Since S1P exerts several anti-atherogenic functions of HDL, these findings are in agreement with the concept of a threshold concentration of HDL or apoA-I which is needed for atheroprotection.

Since there exist biochemical interactions among different lipids involved in cholesterol metabolism, profiling of lipids may reveal more key determinants in the pathogenesis of atherosclerosis. A sphingo- and phospholipid profiling project has been started, in which a method has been developed using a combination of normal phase HPLC separation and parent-ion scanning by a triple quadrupole mass spectrometer. Feasibility of the method was demonstrated in patients with stable coronary heart disease.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die aktuelle Strategie zur Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen beruht auf der Risikostratifizierung der Patienten mittels verschiedener Algorithmen. Dies führt jedoch bei einer grossen Zahl von Personen zu einer Überschätzung des Risikos. So wird das Risiko für ein kardiovaskuläres Risiko zum Beispiel in der Münsteraner PROCAM Studie um 68% beziehungsweise 86% bei Patienten mit einem hohen oder intermediären Risiko überschätzt. Deshalb braucht es neue Biomarker, die eine bessere und zuverlässigere Einschätzung des Risikos ermöglichen. Idealerweise sollte ein Biomarker ein Indikator für normale oder pathologische Prozesse sowie das Ansprechen auf therapeutische Massnahmen darstellen. Deshalb leiten sich Kandidaten für neue Biomarker für die Erkennung von kardiovaskulären Erkrankungen aus der Pathophysiologie der Atherosklerose ab. Mögliche Kandidaten sind zum Beispiel 27-Hydroxycholesterin (27OHC), Sphingosin-1-phosphat (S1P), sowie allgemein die Sphingo- und Phospholipide.

Die Forschung in den letzten Jahren hat klar gezeigt, dass das HDL, vor allem durch seinen Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber (reverser Cholesterintransport), eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose spielt. HDL hat aber auch noch verschiedene pleiotrope Effekte auf das kardiovaskuläre System, welche unabhängig vom reversen Cholesterintransport sind. Durch ihre Rollen im HDL Stoffwechsel und seinen pleiotropen Funktionen sind 27OHC und S1P in dieser Beziehung von speziellem Interesse.

Publizierte Methoden zur Bestimmung von 27OHC waren zu wenig empfindlich für die Bestimmung in Tiermodellen (einzelne Mäuse) oder in der HDL-Fraktion von humanen Proben. Aus diesem Grund wurde eine LC-MS – Methode mit Atmosphärendruck Photoionisation (APPI) entwickelt und validiert. Die neue Methode ist viel empfindlicher als bisher publizierte LC-APCI-MS- oder GC-MS – Methoden und erlaubte uns, Probenvolumina von 15 µl mit einer Quantifizierungsgrenze (LLOQ) von 40 ng/ml oder 4.9 pmol pro Injektion zu untersuchen.

Im Anschluss wurde die Rolle von 27OHC im Verhältnis zum Cholesterinstoffwechsel zum ersten Mal in Patienten mit monogenen Erkrankungen im HDL-Stoffwechsel untersucht. In den meisten Fällen waren die 27OHC - Konzentrationen in ähnlicher Weise verändert wie die Cholesterinkonzentration. Die wichtigste Ausnahme waren Individuen mit Mutationen im Gen für die Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Eine Reduktion der LCAT –

Aktivität führte zu einer grösseren Reduktion des veresterten 27OHC im Plasma als des veresterten Cholesterins. Zusätzlich führten verschiedene Gendefekte im HDL – Stoffwechsel zur einer Umverteilung von 27OHC in ApoB enthaltende Lipoproteine. Dieser Effekte wurde für das Cholesterin nicht beobachtet.

Es wurde ebenfalls eine LC-MS – Methode für die Bestimmung von S1P im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen entwickelt und validiert. Diese Methode wurde anschliessend dazu verwendet, die Konzentration von S1P in Patienten mit angeborenen Defekten im HDL – Stoffwechsel zu untersuchen. Obwohl nur weniger als 5% der HDL – Partikel ein S1P – Molekül beinhalten, führten sowohl leichte als auch massive Erniedrigungen der HDL – Konzentration zu einer Beschränkung der S1P – Menge im Plasma. Da S1P verschiedene anti-atherogene Funktionen in HDL ausübt, stimmen diese Resultate mit dem Konzept, dass es für die Atheroprotektion durch HDL oder ApoA-I eine Grenzkonzentration gibt, überein.

Da es zwischen den verschiedenen Lipiden, die im Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielen, unterschiedliche biochemische Interaktionen gibt, können durch das Erstellen eines Lipidprofils mehr Schlüssesubstanzen in der Pathogenese der Atherosklerose erkannt werden. Ein Projekt zum Profiling von Sphingo- und Phospholipiden wurde initiiert und eine Methode entwickelt, die eine Kombination zwischen Normalphasen HPLC und Parent-ion Scan mittels eines Triple-Stage-Quadrupol - Gerätes darstellt. Durch das Profiling von Proben von Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit konnte die Anwendbarkeit der Methode gezeigt werden.