

# Bile acids and their precursor 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one as potential metabolic biomarkers variation in health and disease

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Steiner, Carine

**Publication date:**

2011

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006706562>

**Rights / license:**

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

Diss. ETH No. 19802

**BILE ACIDS AND THEIR PRECURSOR**  
**7 $\alpha$ -HYDROXY-4-CHOLESTEN-3-ONE AS POTENTIAL**  
**METABOLIC BIOMARKERS: VARIATION IN HEALTH AND DISEASE**

A dissertation submitted to the  
ETH Zürich

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by

**Carine Steiner**

Eidg. dipl. Apothekerin

born on August 18<sup>th</sup>, 1981

citizen of

Lausanne (VD) and Altishofen (LU), Switzerland

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, 2011

## SUMMARY

Bile acids are well known as an excreted end product of cholesterol metabolism and as an important adjuvant for intestinal lipid adsorption. In addition, bile acids are increasingly recognized as signaling molecules due to their ability to activate the nuclear factor farnesoid X receptor (FXR), through which they regulate their own biosynthesis and modulate both lipid and glucose metabolism. Consequently, they are considered as potential biomarkers for metabolic disorders. Bile acids represent a complex class of structurally closely related compounds, which all vary in their ability to activate FXR. In addition, they undergo enterohepatic circulation, during which metabolisation by intestinal bacteria generates further complexity. In order to differentiate between newly synthesized bile acids and the ones found in the circulation after reabsorption from the intestine, we used the bile acid precursor 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), which has been shown to reflect bile acid biosynthesis.

The first part of this work consisted in the development and improvement of two methods based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) for the quantification of the 15 major human bile acids as well as C4 in serum. These methods have the advantages of requiring a low sample volume (100 $\mu$ l for each method) as well as identical stationary and mobile phases, and an identical ionization source. This allows both methods to be used in a combined manner, providing information on the composition of the bile acid pool on one hand and on the relative amount of newly synthesized bile acids on the other.

In a second step, we evaluated bile acids and C4 as potential biomarkers for metabolic syndrome (MetS), type 2 diabetes mellitus (T2DM) and coronary artery disease (CAD) in a cohort of 150 subjects. While no difference was observed for bile acid concentrations between the different groups, C4 levels were significantly increased in patients with MetS and T2DM as compared to the controls. However, C4 was not superior to the canonical components for MetS and T2DM. Moreover, bile acids and C4 showed a high interindividual variability, which limited the possibility of observing any further differences.

In addition, we investigated bile acid concentrations in relation to high density lipoprotein (HDL) metabolism, which is thought to mediate the reverse transport of cholesterol from peripheral cells to the liver for conversion into bile acids. We analysed the bile acid distribution among plasma lipoproteins as well as bile acid concentrations in 52 patients with functionally relevant mutations in six different HDL genes as well as in 50 unaffected family members (controls). Although a significant amount of bile acids were found to be associated with plasma lipoproteins, mainly with HDL, this did not affect bile acid concentrations in

patients with monogenic defects of HDL metabolism as compared to the controls. We also quantified bile acids in lipoprotein-depleted serum (LPDS) and HDL lipoprotein fractions from patients with one deficient allele for the scavenger receptor BI (SCARB1), which mediates the hepatic uptake of HDL cholesterol, as well as in controls. Here also, no difference in bile acid levels or composition was observed between mutated patients and controls. In this study, we also observed a high interindividual variability for bile acid concentrations.

Due to the high interindividual variability observed in the two studies, we went on to investigate the diurnal profiles of bile acids and C4 in four healthy volunteers. Serum concentrations of conjugated bile acids depended mainly on prandial effects, whereas serum levels of unconjugated bile acids were influenced mainly by chronobiologic effects with an acrophase during the night and early morning. C4 showed two peaks during the day, which seemed to be independent of prandial effects since the concentrations started to increase already before food intake.

In conclusion, we have demonstrated that serum levels of C4, but not of bile acids, are elevated in patients with MetS and T2DM. However, the association of C4 with these diseases was not superior to that of the canonical components used to diagnose MetS and T2DM. We also showed that a significant amount of bile acids are associated with lipoproteins, namely HDL, but that this did not affect bile acid levels in patients with monogenic disturbances of HDL metabolism. Finally we provided evidence that extensive diurnal rhythm and postprandial responses contribute to the high intra- and hence, interindividual variability of bile acids and C4. This high intraindividual variation makes it difficult to standardize sampling time and compromises the clinical use of bile acids and C4 as biomarkers.

## RESUME

Les acides biliaires sont connus en tant que produits d'excrétion du métabolisme du cholestérol ainsi qu'en tant qu'adjuvants primordiaux à la digestion intestinale des lipides. De plus, les acides biliaires sont de plus en plus reconnus comme molécules de signalisation, de par leur capacité à activer le récepteur nucléaire *farnesoid X receptor* (FXR). Grâce à ce mécanisme, ils contrôlent leur propre biosynthèse et sont capables de moduler le métabolisme du glucose et celui des lipides. En conséquence, ils sont considérés comme biomarqueurs potentiels pour certains troubles du métabolisme. Les acides biliaires représentent une classe complexe de composés de structure semblable, qui varient pourtant au niveau de leur potentiel d'activation du FXR. De plus, ils suivent un cycle enterohépatique, durant lequel leur métabolisation par la flore intestinale ajoute à la complexité existante. Afin de pouvoir différencier les acides biliaires nouvellement synthétisés de ceux qui ont été réabsorbés par l'intestin, il est possible de quantifier leur précurseur  $7\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), dont il a été montré qu'il reflétait la biosynthèse des acides biliaires.

La première partie de ce travail a consisté en le développement et l'amélioration de deux méthodes utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour la quantification dans le sérum des 15 principaux acides biliaires chez l'être humain ainsi que du C4. Ces méthodes ont l'avantage de nécessiter un faible volume d'échantillon (100 $\mu$ l pour chaque méthode), des phases stationnaires et mobiles identiques ainsi que de la même technique d'ionisation. Ceci permet d'utiliser les deux méthodes de façon combinée et renseigne d'une part sur la composition du pool d'acides biliaires circulant et fournit d'autre part une mesure relative de la quantité d'acides biliaires nouvellement synthétisés.

Dans une deuxième étape, nous avons évalué les acides biliaires et C4 en tant que biomarqueurs potentiels pour le syndrome métabolique, le diabète de type 2 ainsi que pour les cardiopathies coronariennes dans une cohorte de 150 sujets. Alors qu'aucune différence ne fût observée entre les différents groupes pour les acides biliaires, les niveaux de C4 furent significativement plus élevés chez les patients souffrant du syndrome métabolique ainsi que du diabète que chez les contrôles. C4 ne fut toutefois pas supérieur aux marqueurs usuels pour le syndrome métabolique et le diabète. En outre, les concentrations d'acides biliaires et de C4 présentèrent une grande variabilité interindividuelle, ce qui a potentiellement limité l'observation de différences supplémentaires.

Nous avons aussi examiné les concentrations d'acides biliaires en relation avec le métabolisme des lipoprotéines de haute densité (LHD), qui servent au transport du cholestérol

à partir des tissus périphériques vers le foie pour qu'il y soit converti en acides biliaires. Nous avons analysé la distribution des acides biliaires parmi les lipoprotéines plasmatiques ainsi que leurs concentrations chez 52 patients avec des mutations affectant la fonction de six différents gènes des LHD et chez 50 parents sains (contrôles). Bien qu'une quantité significative d'acides biliaires ait été associée avec les lipoprotéines plasmatiques, principalement avec les LHD, ceci n'affecta pas les concentrations plasmatiques d'acides biliaires chez les patients présentant des mutations des gènes du métabolisme des LHD par rapport aux contrôles. Nous avons aussi quantifié les acides biliaires dans du sérum sans lipoprotéines ainsi que dans la fraction contenant les LHD qui provenaient de contrôles et de patients avec un allèle défectueux pour le gène du *scavenger receptor BI* (SCARB1), dont la protéine sert à l'absorption par le foie du cholestérol transporté par les LHD. Nous n'avons pas non plus observé de différences entre les patients atteints et les contrôles, ni au niveau des concentrations, ni au niveau de la composition du pool des acides biliaires. Dans cette étude nous avons aussi observé une grande variabilité interindividuelle des concentrations d'acides biliaires.

En raison de la variabilité interindividuelle observée dans les deux études, nous avons examiné le profil diurne des acides biliaires et du C4 dans quatre sujets sains. Les concentrations plasmatiques des acides biliaires conjugués furent principalement influencées par des effets prandiaux alors que les acides biliaires non conjugués semblèrent dépendre surtout d'effets chronobiologiques avec des concentrations maximales pendant la nuit et tôt le matin. C4 présenta deux pics durant la journée qui semblèrent être indépendants d'effets prandiaux car l'élévation des concentrations commença déjà avant la prise de nourriture.

En conclusion, nous avons démontré que les concentrations plasmatiques de C4, mais pas des acides biliaires, sont plus élevées chez les patients souffrant du syndrome métabolique et de diabète de type 2 que chez les contrôles. L'association de C4 avec ces pathologies ne fut toutefois pas supérieure à celle observée pour les marqueurs traditionnels du syndrome métabolique et du diabète. Nous avons aussi montré qu'une quantité significative d'acides biliaires était associée avec les lipoprotéines plasmatiques, notamment avec les LHD, mais que ceci n'affectait pas les concentrations totales d'acides biliaires dans les patients ayant des mutations dans les gènes du métabolisme des LHD. Finalement, nous avons prouvé que la présence d'un rythme diurne et d'effets prandiaux contribuait à la grande variabilité intra- et par conséquent interindividuelle des concentrations d'acides biliaires et de C4. Cette variabilité complique la standardisation de l'heure de la prise de sang et compromet ainsi l'utilisation clinique des acides biliaires et de C4 en tant que biomarqueurs.

## ZUSAMMENFASSUNG

Gallensäuren sind gut bekannt als ausgeschiedenes Endprodukt vom Cholesterinmetabolismus sowie als ein wichtiges Hilfsmittel für die Fettverdauung im Darm. Zusätzlich werden Gallensäuren wegen ihrer Fähigkeit, den nukleären Rezeptor *farnesoid X receptor* (FXR) zu aktivieren, zunehmend als Signalmoleküle anerkannt. Durch diesen Mechanismus regulieren sie ihre eigene Biosynthese, können aber dadurch auch den Lipid- und Glukosemetabolismus modulieren. Infolgedessen werden Gallensäuren als potenzielle Biomarker für metabolische Krankheiten betrachtet. Gallensäuren stellen eine komplexe Mischung strukturell ähnlicher Verbindungen dar, die aber alle unterschiedlich stark FXR aktivieren können. Zusätzlich sind Gallensäuren Teil eines enterohepatischen Zyklus, dabei erfahren sie weitere strukturelle Änderungen durch Darmbakterien was zu einer noch höheren Komplexität führt. Um die neu synthetisierten Gallensäuren von den vom Darm wiederaufgenommenen Gallensäuren unterscheiden zu können, benutzt man den Gallensäurevorläufer  $7\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one (C4). Es wurde nachgewiesen, dass C4 die Gallensäurebiosynthese widerspiegelt.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand aus der Entwicklung und Optimierung zweier Methoden für die Quantifizierung der 15 Hauptgallensäuren sowie von C4 im menschlichen Serum. Diese Methoden basieren auf Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie und haben den Vorteil, dass sie ein kleines Probenvolumen benötigen (100 $\mu$ l für jede Methode). Zusätzlich benötigen sie identische stationäre sowie mobile Phasen für die Chromatographie und die gleiche Ionisierungsquelle. Dies ermöglicht uns beide Methoden in kombinierter Weise zu verwenden und ergibt einerseits die Zusammensetzung des Gallensäurepools und andererseits ein relatives Ausmass der Gallensäurebiosynthese.

Im zweiten Teil dieser Arbeit haben wir die Gallensäuren und C4 als mögliche Biomarker für das metabolische Syndrom (MetS), Typ 2 Diabetes Mellitus (T2DM) und Koronare Herzkrankheit (KHK) in einer Kohorte von 150 Probanden evaluiert. Für die Gallensäurenkonzentrationen wurden keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Probanden beobachtet, während die C4-Konzentrationen in den MetS und T2DM Patienten signifikant erhöht waren im Vergleich zu den Kontrollen. Allerdings war C4 den üblichen Biomarkern für MetS und T2DM untergeordnet. Ausserdem wiesen Gallensäuren- und C4-Konzentrationen eine hohe interindividuelle Variabilität, weshalb die Beobachtung von weiteren potenziellen Unterschieden beschränkt war.

Wir haben zusätzlich den Zusammenhang von Gallensäurenkonzentrationen mit dem *high density Lipoprotein* (HDL) Metabolismus untersucht. Wir haben die Gallensäurenverteilung

innerhalb Plasmalipoprotein-Fraktionen analysiert. Anschliessend haben wir die Gallensäuren in 52 Patienten mit funktionell relevanten Mutationen in sechs verschiedenen HDL Genen, sowie in 50 nicht betroffenen Angehörigen (Kontrollen) quantifiziert. Obwohl bedeutende Mengen Gallensäuren mit Plasmalipoproteinen, hauptsächlich mit HDL assoziiert waren, hat sich dieser Effekt auf die Gallensäurenkonzentrationen in Patienten mit monogenen Defekten im HDL Metabolismus nicht ausgewirkt im Vergleich zu den Kontrollen. Wir haben die Gallensäuren auch in lipoproteinfreiem Serum und in der HDL-Fraktion von Patienten mit einem defektem Allel für das *scavenger receptor BI* Gen (SCARB1), dessen Protein die hepatische Aufnahme von HDL vermittelt, sowie in Kontrollen quantifiziert. Auch hier wurden keine Unterschiede bezüglich Gallensäurenkonzentrationen oder Zusammensetzung zwischen Patienten mit Genmutationen und Kontrollen beobachtet. Schlussendlich wurde auch hier eine hohe interindividuelle Variabilität der Gallensäurenkonzentrationen beobachtet.

Wegen der in beiden Studien beobachteten hohen Variabilität haben wir das diurnale Profil von Gallensäuren und C4 in vier gesunden Probanden untersucht. Serum konjugierte Gallensäurenkonzentrationen hingen hauptsächlich von prandialen Effekten ab, während Serum unkonjugierte Gallensäurenkonzentrationen vor allem durch chronobiologischen Effekte beeinflusst wurden mit maximaler Konzentration während der Nacht und des frühen Morgens. C4 wies während des Tages zwei Peaks auf, die unabhängig von prandialen Effekten zu sein schienen, da die Konzentrationen schon vor der Nahrungsaufnahme zu steigen began.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass Serumkonzentrationen von C4, aber nicht von Gallensäuren in Patienten mit MetS und T2DM im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist. Jedoch war die Assoziation von C4 mit diesen Krankheiten nicht stärker als die von den üblichen Biomarkern für MetS und T2DM. Wir haben auch nachgewiesen, dass signifikante Mengen Gallensäuren mit Lipoproteinen, nämlich mit HDL assoziiert sind aber dass dies auf die Gallensäurenkonzentrationen in Patienten mit monogenen Störungen im HDL Metabolismus keinen Effekt hat. Letzlich haben wir nachgewiesen, dass der diurnale Rhythmus und die prandialen Effekte zur hohen intra- und damit interindividuellen Variabilität von Gallensäuren- und C4-Konzentrationen beitragen. Diese hohe intraindividuelle Variation erschwert die Standardisierung des Zeitpunktes für die Blutentnahme und beeinträchtigt den klinischen Nutzen von Gallensäuren und C4 als Biomarker.