

# Molecular signatures of myocardial infarction

Citation for published version (APA):

Mezger, S. T. P. (2022). *Molecular signatures of myocardial infarction: a multidisciplinary analytical approach*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20220712sm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2022

## DOI:

[10.26481/dis.20220712sm](https://doi.org/10.26481/dis.20220712sm)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 10

Summary

Samenvatting

## Summary

Myocardial infarction (MI), also known as a heart attack, is the most common cardiovascular disease (CVD) and the leading cause of death worldwide [1, 305]. A (partial) obstruction of the coronary artery leads to deprivation of oxygen and nutrients to the cardiac tissue and insufficient removal of metabolites, resulting in cell dysfunction, cell injury and/or death. To limit the size of the injured myocardium, timely and accurate diagnosis and subsequent treatment are essential. The diagnosis of MI in acute chest pain patients is based on clinical signs and symptoms, their electrocardiogram (ECG) and the detection of cardiac biomarkers in the blood circulation, preferably the gold standard cardiac troponins (either cTnT or cTnI). Therapies after MI are focused on restoration of the blood flow, by intervention and/or thrombolytic treatment. In some cases, this sudden reperfusion can have a detrimental effect and worsen injury, the so-called ischemia/reperfusion (I/R) injury.

In this thesis, research into MI and cardiac I/R injury was performed to improve our knowledge on the molecular signatures of MI, using a multidisciplinary approach. One of the techniques used is mass spectrometry imaging (MSI), a powerful tool to analyze the molecular content of a tissue while retaining the spatial information. In **chapter 2**, trends and applications of MSI for CVD research are described and an overview of the published protocols and their results is provided. Next, we presented an optimized spatial-omics protocol in which conductive slides were used for matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MSI, followed by laser capture microdissection (LMD) and in-depth proteomics (**chapter 3**). Then, in **chapter 4** this protocol was applied to investigate protein alterations after cardiac I/R in a rat model. Here, on-tissue protein MALDI-MSI was used to guide the spatially resolved proteomics analysis. The infarct core showed a downregulation of proteins related to energy metabolism, while proteins associated to coagulation and immune response were upregulated, compared to unaffected tissue. The identified protein signature and pathways can be used to guide future research and enhance the knowledge and understanding of the processes in the heart after I/R. Furthermore, we described a multimodal approach in **chapter 5** to investigate both the spatial and temporal lipid signatures of cardiac I/R in a mouse model. The combination of LC-MS/MS, MALDI-MSI and high mass resolution MALDI-MSI with data-dependent acquisition (DDA) of on-tissue tandem MS, revealed distinct profiles of glycerolipids, phospholipids and sphingolipids in the infarct tissue.

Additionally, examining the correlation between lipids and immune cell infiltration revealed among others a strong correlation of PC 32:0 and macrophage infiltration. Further validation is required to determine if these lipids can be used as a marker reflecting the disease state.

In the second part of this thesis, the diagnostic cardiac troponins (cTn) are the central topic. With the introduction of the high-sensitivity cTn assays a couple of years ago, the diagnosis of MI significantly improved, especially for earlier and smaller infarctions. However, the specificity for MI decreased as elevated hs-cTn concentrations are frequently found in non-MI patients, which complicates clinical decision making, even with resampling algorithms. Based on previous work, we hypothesized that the molecular composition of cTn in the blood circulation might be used to differentiate between MI and non-MI conditions. For cTnT, the composition was previously described in patients without persistent ST-elevation MI (NSTEMI) [23] and in patients with end-stage renal disease (ESRD) [25]. For NSTEMI patients, the presence of the ternary cTn T-I-C complex, full size cTnT (40 kDa) and cTnT fragments (29 kDa and 15-18 kDa) was shown, while in ESRD patients only small cTnT fragments (15-18 kDa) were found. Here, in **chapter 6**, additional experiments in marathon runners reveal that also in this population only the smaller cTnT fragments are present. Based on these findings, it is speculated that a novel cTnT immunoassay should target cTnT forms  $\geq 29$  kDa to be more specific for the acute phase of MI. Finally, we addressed the composition of cTnI (**chapter 7**) and compared NSTEMI patients with ESRD patients and marathon runners. In all populations we mainly observed cTnI as part of the binary cTn I-C complex. Additionally, only the early presenting patient showed a minor presence (approximately 4 %) of the ternary cTn T-I-C complex, suggesting this might be used as an indication of the time elapsed after MI onset.

Overall, the work presented in this thesis contributes to the detailed knowledge on the molecular signatures of MI, from protein and lipid alterations in tissue after I/R injury to the cTn composition in blood of MI and non-MI populations. This might be of interest to a broad audience: from the scientific community that benefits from the spatial-omics workflow and the molecular signatures obtained, to industrial partners who can develop improved immunoassays for a better MI diagnosis and treatment. Eventually, this facilitates healthcare professionals in more precise decision making and may result in better patient care.

# Samenvatting

Myocardinfarct (MI), ook wel bekend als een hartinfarct, is de meest voorkomende cardiovasculaire ziekte (CVD) en de belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd [1, 305]. Een (gedeeltelijke) vernauwing van de kransslagader leidt tot een verminderde toevoer van zuurstof en voedingsstoffen aan het myocardium (het hartweefsel) en een onvoldoende afvoer van metabolieten. Dit heeft cel dysfunctie, cel beschadiging en/of celdood tot gevolg. Om de grootte van het beschadigde myocardium te beperken, zijn een tijdige en accurate diagnose en behandeling van levensbelang. De diagnose van MI bij patiënten met acute pijn op de borst klachten wordt gebaseerd op klinische signalen en symptomen, het electrocardiogram (ECG) en de detectie van cardiale biomarkers in de bloedcirculatie, bij voorkeur de gouden standaard cardiaal troponine (cTnT of cTnI). Behandelingen van MI zijn gericht op het herstellen van de bloedstroom (zogenaamde reperfusie), dit kan door een interventie en/of medicijnen zoals een antistollingsmiddel. Helaas heeft deze plotselinge reperfusie in sommige gevallen een nadelig effect en verergert het de beschadiging aan het myocardium; de zogeheten ischemie/reperfusie (I/R) schade.

In dit proefschrift is onderzoek naar MI en cardiale I/R schade uitgevoerd om de kennis van de moleculaire profielen van MI te verbeteren, gebruik makend van een multidisciplinaire aanpak. Een van de gebruikte technieken is beeldvormende massa spectrometrie (MSI), een krachtige techniek voor de moleculaire analyse van weefsel waarbij de ruimtelijke informatie behouden blijft. In **hoofdstuk 2** werden trends en toepassingen van MSI voor CVD beschreven en gaven we een overzicht van de gepubliceerde protocollen en hun resultaten. Daarna presenteerden we een geoptimaliseerd 'spatial-omics' protocol waarbij geleidende microscoopglasjes gebruikt worden voor matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)-MSI gevolgd door weefsel selectie met laser capture microdissection (LMD) en proteomics (oftewel eiwit identificatie; **hoofdstuk 3**). Vervolgens is dit protocol toegepast in **hoofdstuk 4** om de eiwit veranderingen in een rattenhart na I/R te onderzoeken. De ruimtelijke eiwitprofielen, verkregen met MALDI-MSI, zijn hier gebruikt om de regio-specifieke proteomics analyse te sturen. In vergelijking met niet-aangedaan weefsel liet de kern van het infarct een vermindering van energie metabolisme eiwitten en een toename van eiwitten belangrijk voor stolling en immuunrespons zien. Het geïdentificeerde eiwitprofiel en de bijbehorende biologische signaalwegen kunnen gebruikt worden om toekomstig onderzoek te sturen en de kennis en het begrip van de processen in het hart na I/R te verbeteren. Daarnaast hebben we een multimodale aanpak beschreven in **hoofdstuk 5**, waarmee we zowel het ruimtelijke lipiden profiel als de lipiden veranderingen in de tijd na cardiaal I/R in een muizenmodel onderzocht hebben. De combinatie van LC-MS/MS, MALDI-MSI en hoge massa resolutie MALDI-MSI gekoppeld met data

afhankelijke acquisitie (DDA) voor lipidenidentificatie direct van het weefsel, liet verschillende profielen zien voor glycerolipiden, fosfolipiden en sphingolipiden in het infarct weefsel. De aanvullende evaluatie van de correlatie tussen lipiden en immuun cel infiltratie liet onder andere een sterke correlatie zien tussen PC 32:0 en macrofaag infiltratie. Verdere validatie is nodig om te beoordelen of deze lipiden gebruikt kunnen worden als een marker die de status van de ziekte weer kan geven.

In het tweede deel van dit proefschrift staan de cardiaal troponines (cTn) centraal. De introductie van hoog sensitieve cTn testen een aantal jaren geleden heeft de diagnose van MI significant verbeterd, met name voor de vroege en kleinere infarcten. Echter is daarmee de specificiteit voor MI afgenomen, nu ook verhoogde cTn concentraties gemeten worden in niet-MI patiënten. Hierdoor wordt de klinische besluitvorming bemoeilijkt, zelfs bij gebruik van seriële cTn metingen. Gebaseerd op voorgaand werk is de hypothese gevormd dat de moleculaire compositie van cTn in de bloedcirculatie gebruikt zou kunnen worden voor de differentiatie tussen MI en niet-MI condities. Voor cTnT is deze compositie eerder beschreven in MI patiënten zonder ST segment-verhoging (NSTEMI) [23] en in patiënten met chronisch nierfalen (ESRD) [25]. In NSTEMI-patiënten zijn ternaire cTn T-I-C complex, cTnT (40 kDa) en cTnT fragmenten (29 kDa en 15-18 kDa) beschreven, terwijl in ESRD-patiënten alleen kleine cTnT fragmenten (15-18 kDa) werden gevonden. In **hoofdstuk 6** zijn aanvullende experimenten met serum van marathonlopers gedaan en hieruit blijkt dat ook in deze populatie alleen kleine cTnT fragmenten aanwezig zijn. Gebaseerd op deze bevindingen wordt gespeculeerd dat een nieuwe cTnT test gericht op vormen van minimaal 29 kDa specifiek zou zijn voor de acute fase van MI. Uiteindelijk bestudeerden we de compositie van cTnI (**hoofdstuk 7**) en vergeleken we deze in NSTEMI-patiënten, ESRD-patiënten en marathonlopers. In al deze populaties is gevonden dat cTnI aanwezig is als onderdeel van het binaire cTn I-C complex. Daarnaast is een minimale aanwezigheid (ongeveer 4%) van het ternaire cTn T-I-C complex gevonden in alleen de vroege patiënt, wat suggereert dat deze aanwezigheid een indicatie kan zijn voor de verstreken tijd na de start van het infarct.

In zijn geheel draagt het werk gepresenteerd in dit proefschrift bij aan de kennis over de moleculaire profielen van MI, van eiwit en lipiden veranderingen in weefsel na I/R schade tot de cTn compositie in bloed van MI en niet-MI populaties. Een breed publiek kan hierin geïnteresseerd zijn: van de wetenschappelijke gemeenschap die voordeel heeft van de 'spatial-omics' workflow en de verkregen moleculaire profielen tot industriële partners die een verbeterde cTn test kunnen ontwikkelen, waardoor de MI diagnose en behandeling verbetert. Uiteindelijk zal dit de gezondheidszorg helpen de precisie van klinische besluitvorming te verhogen en daarmee de patiëntenzorg te verbeteren.