Aus dem Forschungszentrum Borstel Leibniz-Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Abteilung für Immunchemie und Biochemische Mikrobiologie Kommissarische Leitung: Prof. Dr. H. Brade

Aufbau einer quantitativen massenspektrometrischen Analytik zur Untersuchung der Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen und ihre Anwendung auf Membranmikrodomänen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck - Technisch-Naturwissenschaftliche Fakultät -

> vorgelegt von Catharina Crone aus Hamburg

Lübeck 2007

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters
- 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Buko Lindner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2007

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 27.08.2007

gez. Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

- Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

INHALTSVERZEICHNIS

1. EIN	LEITUNG	9
1.1. Ziel	setzung	9
1.2. Einf	ührung in die Thematik	11
1.2.1.	Lipide	11
1.2.1.	1. Membranlipide	13
1.2.1.	2. Biosynthese von Membranlipiden	19
1.2.1.	3. Funktionen von Membranlipiden	19
1.2.2.	Biologische Membranen	20
1.2.2.	1. Struktur und biophysikalische Eigenschaften zellulärer Membranen	20
1.2.2.	2. Membranmikrodomänen in zellulären Membranen	23
1.2.3.	Methoden der Analyse von Membranmikrodomänen	25
1.2.4.	Methoden der Lipidanalytik	27
2. ME	THODEN	32
2.1. Allg	emeine Methodik	32
2.1.1.	Isolation der Membranmikrodomänen	32
2.1.2.	Charakterisierung der isolierten Membranbereiche	33
2.1.3.	Lipidextraktion und TX-100 Abtrennung	33
2.1.4.	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid	
	chromatography, HPLC)	35
2.1.5.	Massenspektrometrie	37
2.1.5.	1. Ionenquellen	37
2.1.5.	2. Massenanalysatoren	40
2.1.5.	3. Tandem-MS	48
2.1.6.	LC-MS Kopplung	50
2.1.7.	Auswertung der Spektren zur Identifizierung und Quantifizierung der	
	Substanzen	51
2.2. Mat	erialien und Versuchsdurchführungen	51
2.2.1.	Verwendete Materialien	51

2	2.2.2.	Versuchsdurchführungen	52
	2.2.2	.1. Zellkultur	52
	2.2.2	.2. Isolation der Membranmikrodomänen	54
	2.2.2	.3. Charakterisierung der Domänenaufreinigungen	58
	2.2.2	.4. Lipidextraktion	65
	2.2.2	.5. Abtrennung des Triton X-100 von den isolierten DRM	66
	2.2.2	.6. Online-Kopplung der HPLC an das ESI FT-ICR MS	67
	2.2.2	.7. Massenspektrometrische Analyse der Lipide	69
	2.2.2	.8. Auswertung der Daten	74
3.	ER	GEBNISSE	81
3.1	I. Iso	lation der Membranmikrodomänen und Verteilung der Markermoleküle	81
3	3.1.1.	Vergleich verschiedener Isolationsmethoden für Membranmikrodomänen	81
3	3.1.2.	Nachweis von Cholesterol	86
3	3.1.3.	Proteingehalt der Fraktionen	87
3.2	2. Lip	idextraktion	90
3	3.2.1.	Extraktion eines Lipidstandards	90
3	3.2.2.	Massenspektrum der organischen Phase nach Lipidextraktion einer durch	
		Methode 1 (1% Triton X-100) isolierten DRM-Fraktion	92
3	3.2.3.	Massenspektrum der organischen Phase nach Lipidextraktion einer durch	
		Methode 2 (0,1% TX-100) isolierten DRM-Fraktion	95
3.3	3. Vei	such der Abtrennung des TX-100 von DRM-Lipiden	96
3	3.3.1.	Auftrennung der DRM-Lipidextrakte mittels Dünnschichtchromatographie	96
3	3.3.2.	Auftrennung der DRM-Lipidextrakte mittels HPLC	97
3.4	4. On	line-Kopplung der HPLC an das ESI FT-ICR MS	99
3.5	5. Ma	ssenspektrometrische Detektion und Datenprozessierung	102
3	3.5.1.	Einfluss der Fettsäurereste auf die chromatographische Auftrennung	104
3	3.5.2.	Stabilität der Lipide im Laufpuffer	106
3	3.5.3.	Ladungszustand und Dimerbildung der detektierten Substanzen	107
3	3.5.4.	Messgenauigkeiten und Massenauflösung	108
	3.5.4	.1. Auflösung der Etherlipid-Signale	111
3	3.5.5.	Absolute Nachweisgrenzen	112
3	3.5.6.	Lineare Responsivität des Gerätes	114

3.6. Quantifizierung	115
3.6.1. Relative Nachweisempfindlichkeiten der Lipidspezies	116
3.6.1.1. Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeiten von den	
Fettsäurekettenlängen	116
3.6.1.2. Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeiten von den Kopfgruppen und	
von der ESI-Spraylösung	117
3.6.2. Interner Standard	120
3.6.3. Auswerteschema	121
3.7. Lipidanalytik der zellulären Extrakte	122
3.7.1. LC-MS Läufe der Extrakte	123
3.7.2. MS/MS Analysen	126
3.7.3. Verifizierung der Methodik	128
3.7.4. Lipidanalytik an DRM aus unstimulierten und stimulierten Zellen	130
3.7.4.1. Glycerophospholipide der DRM Extrakte	130
3.7.4.2. Sphingolipide der DRM Extrakte	132
3.7.5. Gesamtlipidgehalt von TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen	132
3.7.5.1. Glycerophospholipide	133
3.7.5.2. Sphingolipide	134
3.7.6. Vergleich der in den zellulären Extrakten detektierten Lipidspezies	134
3.7.6.1. Vergleich der Sättigungsgrade der detektierten Spezies	134
3.7.6.2. Vergleich der Anteile der untersuchten Lipidklassen	137
3.7.6.3. Glycosphingolipide	139
3.7.6.4. Cholesterol	140
4. DISKUSSION	142
4.1. Isolation zellulärer Membranmikrodomänen	142
4.2. Lipidextraktion und Detergenskontamination	145
4.3. Lipidanalytik	146
4.3.1. Lipidanalytik mittels ESI-FTMS	146
4.3.2. LC-Auftrennung der Extrakte und online-Kopplung an das FTMS	148
4.3.3. Quantifizierung	149
4.4. Lipidzusammensetzung der Zellextrakte	152

4.5.	Ausblick	156
5.	ZUSAMMENFASSUNG	158
6.	LITERATURVERZEICHNIS	160
ABK	ÜRZUNGSVERZEICHNIS	179

1. Einleitung

1.1. Zielsetzung

Biologische Membranen sind für das Leben unerlässlich, da sie eine Abgrenzung eines Systems zu seiner Außenwelt ermöglichen. Für die Zelle dienen sie der Kompartimentierung von Reaktionsräumen und machen so die Regulation biologischer Prozesse möglich. Dabei fungiert die Plasmamembran als äußere Hülle der Zelle. Bei eukaryotischen Zellen erfolgt eine Unterteilung der Zelle in verschiedene Organellen wie den Zellkern, die Mitochondrien und weitere Kompartimente, die jeweils durch eine Membran begrenzt werden. Zusätzlich zur Funktion der Strukturgebung wirken Zellmembranen als hochselektive Permeabilitätsschranken für Ionen und Moleküle, wodurch die Zusammensetzung des intrazellulären oder -organellen Milieus reguliert wird. Die wichtigen biologischen Energiegewinnungsprozesse der Photosynthese und der oxidativen Phosphorylierung laufen an Membranen ab. Membranen besitzen außerdem spezifische Rezeptoren für äußere Reize, oder sie erzeugen selbst Signale, die chemischer oder elektrischer Natur sein können. Bei der intra- und interzellulären Kommunikation von Zellen spielen sie somit eine zentrale Rolle.

Für Zellen des Immunsystems ist diese Kommunikation bei der Erkennung fremder Substanzen, der geregelte Weiterleitung entstehender Signale und der nachfolgenden Reaktion besonders wichtig. Strukturen der Plasmamembran treten beispielsweise als erstes mit Pathogenen in Kontakt und müssen diese zuverlässig erkennen können. Membranumschlossende Funktionseinheiten in phagocytierenden Zellen wie z.B. Makrophagen nehmen die Pathogene auf und zersetzen sie im sauren Milieu der Phagolysosomen.

Membranen entstehen durch die Selbstorganisation amphiphiler Moleküle, der Membranlipide, die in wässrigen Lösungen Doppelschichten mit speziellen physikochemischen Eigenschaften ausbilden. Mit dieser Lipid-Doppelschicht sind Proteine transmembran oder peripher assoziiert. Die Membranlipide weisen eine große chemische und strukturelle Heterogenität auf, die offensichtlich zu der strukturellen und funktionalen Vielfalt der Membranen führt. Dabei dienen die Membranlipide nicht ausschließlich als inerte Matrix für die in der Zellmembran eingelagerten Proteine, sondern erfüllen auch regulatorische Funktionen. Lipide können dabei als *second-messenger* agieren oder durch die fein gesteuerte Bereitstellung von Membranbereichen unterschiedlicher Fluiditäten eine größere Rolle an regulatorischen Prozessen spielen als bisher angenommen. Diese Membranmikrodomänen, häufig auch als "Lipid-Rafts" bezeichnet, gelten als Plattformen für die Signaltransduktion, indem sie beispielsweise Rezeptorproteine in Komplexen zusammenführen und stabilisieren. Eine genauere Kenntnis der Mechanismen ihrer Bildung und ihrer Struktur kann zu einem besseren Verständnis der regulativen Vorgänge in biologischen Systemen führen.

Sehr viele Untersuchungen befassen sich ausschließlich mit den Rezeptorkomplexen innerhalb der Membranmikrodomänen. Durch ihre strukturgebende Eigenschaft sollte aber auch ihre Lipidzusammensetzung bekannt sein. Besonders wichtig ist dabei, ob in unterschiedlichen Zellzuständen die Lipidkomposition in den Membranmikrodomänen von der Zelle reguliert wird und somit Änderungen unterliegt. Ein weiteres interessantes Beispiel für die Untersuchung der Änderung der Lipidkomposition subzellulärer Kompartimente sind die Phagosomen von z.B. Makrophagen vor und nach der Aufnahme von sich intrazellulär vermehrenden Bakterien.

Die Lipidanalytik biologischer Proben hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen und führt inzwischen, anlehnend an die Genom-, Proteom- und Glykomuntersuchungen, zum Forschungsfeld der Lipidom-Analytik (*lipidomics*). Zur Lipidzusammensetzung von Membranmikrodomänen gibt es in der Literatur allerdings bisher nur sehr wenige experimentelle Daten. Dies ist unter anderem darin begründet, dass für die Untersuchung meist nur sehr wenig Material zur Verfügung steht, die Isolation der amphiphilen Moleküle schwierig und verlustreich ist und eine Lipidanalytik aufgrund der Vielfältigkeit der chemischen Strukturen aufwändig ist. Insbesondere bei der für die Bearbeitung immunologischer Fragestellungen wichtigen Analyse von humanen Primärzellen, für die sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, ist eine Lipidanalytik daher schwierig. Zwar lassen sich mit Hlilfe immunchemischer Methoden einige Lipide sehr sensitiv nachweisen, diese Untersuchungen können aber keine nur annähernd vollständige Übersicht über die komplexe Zusammensetzung eines Lipidoms liefern.

10

Das Ziel dieser Arbeit war die Erarbeitung und Etablierung einer sensitiven, detaillierten und quantitativen Lipidanalytik, die es gestattet, Lipidmuster subzellulärer Kompartimente zu erfassen und zu vergleichen. Für die massenspektrometrische Analytik sollten die Vorteile der hochauflösenden Fourier-Transform Massenspektrometrie genutzt werden. Die Einsatzfähigkeit der Methode sollte beispielhaft durch die Erfassung der Lipidkomposition von Membranmikrodomänen unstimulierter sowie stimulierter immunkompetenter Zellen aufgezeigt werden.

1.2. Einführung in die Thematik

Zur Einführung in die Thematik soll zunächst ein Überblick der Strukturvielfalt zellulärer Lipide erfolgen. Anschließend wird auf den Aufbau biologischer Membranen und deren biophysikalische Eigenschaften eingegangen. Es werden anschließend die Modellvorstellung der Membranunterstrukturen, der Membranmikrodomänen, beschrieben und die Hinweise auf ihr Vorkommen in Zellen aufgezeigt. Zum Abschluß dieses Kapitels werden Methoden zur Untersuchung der Membrandomänen und der Lipidanalytik vorgestellt.

1.2.1. Lipide

Lipide sind von den Naturstoffklassen neben Proteinen, Kohlenhydraten und Nukleinsäuren die vierte, große Gruppe, die als gemeinsames Merkmal die Löslichkeit in apolaren Lösungsmitteln und die damit einhergehende Hydrophobizität aufweisen (von griechisch *lipos*, das Fett). Sie werden in Fettsäurederivate (z.B. Wachse, Glycerolipide, Sphingolipide, Prostaglandine) und Isoprenoide wie z.B. Steroide eingeteilt. Eine Übersicht über die Heterogenität biologischer Lipide zeigt Abbildung 1.1.



Abbildung 1.1: Hauptklassen biologisch relevanter Lipide. Beispiele für einzelne Spezies sind kursiv dargestellt. Abbildung modifiziert nach Lottspeich ¹.

So heterogen sich die Stoffklasse darstellt, so mannigfaltig sind auch die einzelnen Funktionen, die die verschiedenen Substanzen in biologischen Systemen erfüllen. Sie dienen beispielsweise als Energiespeicher, können als Hormone oder als *second messenger* aktiv an Stoffwechselprozessen teilnehmen ^{2,3} oder erfüllen strukturelle Funktionen wie die Bildung von selbst organisierten, nicht kovalenten supramolekularen Strukturen wie Micellen, Vesikeln und die Lipid-Doppelschichten biologischer Membranen ⁴.

Im Folgenden wird speziell auf die an der Bildung von biologischen Membranen beteiligten und daher im Rahmen der Arbeit behandelten Lipidklassen eingegangen. Neben der komplizierten Nomenklatur der Substanzen nach IUPAC exisitieren verschiedene Vorschläge zu vereinfachten Bezeichnungen, so auch relativ neue ⁵, was die Aktualität der Thematik verdeutlicht. Die Bezeichnung der Lipide erfolgt in dieser Arbeit anlehnend an die Nomenklatur, die von Gunstone, Harwood und Padley (Hrsg) im "Lipid Handbook", Verlag Chapman & Hall ⁶ verwendet wurde. Dabei werden die Fettsäurereste als Anzahl ihrer Kohlenstoffatome und der in der Kette enthaltenden Doppelbindungen angegeben, so steht z.B. 18:1 für eine einfach

ungesättigte, achtzehn C-Atome enthaltende Fettsäurekette. Durch die in dieser Arbeit angewandte massenspektrometrische Analytik wird die Bruttofettsäurekomposition angegeben, da die Identifizierung über die exakten Massen ohne Fragmentierungsanalysen keine Information über die Verteilung der Fettsäureketten liefert. So steht z.B. 36:2 für eine Gesamtzahl von 36 C-Atomen in den Ketten sowie zwei Doppelbindungen (Tab.1.1).

Bezeichnung nach IUPAC	Trivialbezeichnung	Bruttofettsäure- komposition
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn-</i> glycero-3- phosphoethanolamin	POPE; PE 16:0 und 18:1	36:2
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3- phosphocholin	DOPC; PC 18:1 und 18:1	36:2

Tabelle 1.1: Beispiele für die Nomenklatur von Lipiden. Dargestellt sind Beispiele für dieBezeichnungen von Glycerophospholipiden nach IUPAC, die Trivialbezeichnungen sowie dieBruttofettsäurekomposition.

Eine Membranlipidklasse teilt sich durch die unterschiedlichen Längen und Sättigungsgrade der gebundenen Fettsäurereste also in verschiedene Subspezies ein, die in dieser Arbeit vereinfacht als Spezies bezeichnet werden.

1.2.1.1. Membranlipide

In diesem Kapitel sollen zunächst die strukturgebenden Moleküle der Membranen von Säugetierzellen vorgestellt werden. Andere Organismen, wie Pflanzen oder Prokaryoten, besitzen ein teilweise davon abweichendes Spektrum an Membranlipiden, auf das in dieser Arbeit nicht eingegangen wird.

Die membranbildenden Lipide in Säugerzellen lassen sich drei Hauptgruppen zuordnen. Den größten Anteil machen dabei die Glycerophospholipide aus. Die zweite große Gruppe stellen Cholesterol und Cholesterolderivate. Die dritte Gruppe besteht aus den Sphingolipiden, die einige Untergruppen mit unterschiedlichen Strukturmerkmalen beinhaltet.

Glycerophospholipide

Das Grundgerüst der Glycerphospholipide besteht aus Glycerol, das an der C-1- und C-2-Position jeweils mit einem Fettsäurerest und an der C-3-Position mit einem Phosphat über Esterbindungen verknüpft ist (Abb. 1.2).



Glycerophospholipide

Abbildung 1.2.: Struktur der Glycerophospholipide. Das Glycerolrückgrat mit der Nummerierung der Kohlenstoffatome ist rot dargestellt. Die hier beispielhaft gezeigten Fettsäurereste können verschiedene Längen und Sättigungsgrade aufweisen. Sie können statt der gezeigten Esterbindungen auch über Etherbindungen mit dem Glycerol verknüpft sein. Die Kopfgruppe R besteht aus einem der dargestellten Alkohole.

Aufgrund der stereospezifischen Nummerierung der Kohlenstoffatome des Glycerols werden diese oft mit dem Präfix *sn* für *"stereospecific numbered*" gekennzeichnet ⁷. Die Hydroxylgruppe des C-3 des Glycerols ist mit Phosphorsäure verestert. An die Phosphorylgruppe sind die polaren Kopfgruppen des Moleküls ebenfalls über eine Esterbindung mit dem Rest des Moleküls verknüpft, die die einzelnen Glycerophospholipidklassen charakterisieren. Die Kopfgruppe ist ein Aminoalkohol wie Cholin, Ethanolamin oder Serin bzw. ein Alkohol wie Glycerol oder Inositol (Tab. 1.2).

Polare Kopfgruppe (R)	Ladung bei pH 7	Glycerophospholipidklasse	Abkürzung
-CH ₂ -CH ₂ -N+(CH ₃) ₃	zwitterionisch	Phosphatidylcholin	PC
-CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ +	zwitterionisch	Phosphatidylethanolamin	PE
-CH ₂ -CH(COO-)-NH ₃ +	negativ	Phosphatidylserin	PS
-CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH	negativ	Phosphatidylglycerol	PG
<i>myo</i> -Inositol	negativ	Phosphatidylinositol	PI

Tabelle 1.2: Kopfgruppen der Glycerophospholipide. Sie sind über das Phosphat mit dem Glycerolrückgrat verestert. Angegeben ist die Ladung des jeweiligen Gesamtmoleküls im neutralen pH-Bereich. Die Bezeichnung nach IUPAC ist im Abkürzungsverzeichnis dargestellt.

Eine Sonderform der Glycerophospholipide stellt das Cardiolipin dar, das aus zwei über ein Glycerol verknüpfte Phosphatidylglyceroleinheiten besteht ⁸. Es ist in Säugerzellen allerdings nur in den inneren Mitochondrienmembranen zu finden.

Trotz der relativ geringen Anzahl an verschiedenen Kopfgruppen exisitiert eine sehr große Anzahl an verschiedenen Glycerophospholipid-Spezies, bedingt durch die Fettsäurereste, die sich sowohl in Kettenlänge als auch in der Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden. In Glycerophospholipiden ist die Fettsäure an der C-1-Position des Glycerolrückgrates meist gesättigt, während die Fettsäuren an den C-2-Positionen meist ungesättigt sind ^{9,10}. Durch die Varianz in den Fettsäureresten können Phospholipide mit identischen Kopfgruppen sehr unterschiedliche strukturelle Eigenschaften haben. Häufige Fettsäurereste sind 16:0 (Palmitinsäure), 18:0 (Stearinsäure), 18:1 (Ölsäure) und 18:2 (Linolsäure). In natürlichen Fettsäuren liegen Doppelbindungen meist in *cis*-Konfiguration vor, was zu einem Knick in der Fettsäurekette führt. Eine als freie Fettsäure wichtige Signalsubstanz in der Zelle ist die Arachidonsäure 20:4 ¹¹.

Etherlipide

Neben den estergebundenen Fettsäureresten kommen in tierischen Geweben auch Glycerophospholipide mit ethergebundenen Fettsäureresten vor. Dabei wird zwischen Molekülen mit einer einfachen Etherbindung (2-Acyl-1-Alkyl-Glycerophospholipide,

EINLEITUNG

auch Plasmanylspezies genannt) und Molekülen mit einer Enoletherbindung (2-Acyl-1-Alkenyl-Glycerophospholipide; auch Plasmenylspezies oder Plasmalogene genannt) an der C-1-Position des Glycerols unterschieden. Der zweite Fettsäurerest an den C-2-Positionen des Glycerols ist in beiden Fällen über eine Esterbindung wie bei den Diacyl-Spezies der Glycerophospholipide verknüpft. Etherlipide kommen überwiegend mit Ethanolamin oder Cholin als Kopfgruppe vor⁶. Ihr Anteil innerhalb einer Lipidklasse variiert und kann beispielsweise in der Myelinhülle für PE bis zu 70% betragen ¹². In humanen Leukocyten steigt der Anteil von plasmenyl-PC durch die Einwirkung des *platelet-activating factor* (PAF)¹³. Dies kann ein Indiz dafür sein, dass plasmenyl-Spezies durchaus eine Rolle bei entzündlichen Vorgängen spielen, z.B. als membranassoziierte Abfänger für reaktive Sauerstoffspezies durch die vinyl-Etherbindung ^{14,15}. Die Bedeutung der Etherlipide ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

Cholesterol

Der Steroidalkohol Cholesterol ist das wichtigste tierische Sterol. Es wird in seiner Fettsäureesterform gespeichert und transportiert. In der Membran regelt es die Fluidität. Das kleine, planare Molekül ist bis auf die C-3-ständige Hydroxygruppe vollständig hydrophob, interagiert mit den Fettsäurereste der übrigen Membranlipide und kann sich daher gut in die Membranen einbauen (Abb.1.3).

Abbildung 1.3: Chemische Struktur von Cholesterol.

Sphingolipide

Sphingolipide sind komplexe Lipide mit einem langkettigen Aminoalkohol als Grundgerüst (Abb.1.4). In Säugerzellen ist dies meist Sphingosin, das eine 4,5-*trans*-Doppelbindung trägt. Zu einem geringeren Anteil wird auch Dihydrosphingosin nachgewiesen, in dem keine Doppelbindung eingeführt ist ^{2,16}. Das Sphingosin ist über eine Amidbindung mit einer langkettigen Fettsäure verbunden. Ohne weitere gebundene Gruppen wird diese Struktur als Ceramid bezeichnet. Die *N*-Acylreste der Ceramide sind häufig langkettige Fettsäurereste wie Lignocerinsäure (24:0) oder Nervonsäure (24:1).

Sind am Ceramid zusätzliche Gruppen gebunden, werden die Sphingolipide weiter in Sphingophospholipide und Glycosphingolipide unterteilt (Abb.1.1). Sphingomyelin (SM) ist das wesentliche Sphingophospholipid in Säugerzellmembranen. Es handelt sich dabei um ein Ceramid, das mit einem Cholinphosphat verestert ist. Es trägt somit die gleiche Kopfgruppe wie PC (Abb. 1.4).



Abbildung 1.4: Struktur der Sphingolipide am Beispiel des Sphingomyelins. Das Sphingosin-Rückgrat ist rot dagestellt. Ist das Sphingosin über die Amidbindung mit einer Fettsäure verknüpft, so erhält man Ceramid. Wird Ceramid mit Cholinphosphat verestert, erhält man Sphingomyelin.

Glycosphingolipide sind an der primären Hydroxygruppe des Ceramids *O*glycosidisch mit einem Mono- oder Oligosaccharidrest verbunden (Abb. 1.5). Sie werden nach der Anzahl und der Struktur der am Ceramid sitzenden Zuckereinheiten eingeteilt. Einfache Glycosphingolipide enthalten lediglich ein oder zwei ungeladene Hexosen in ihrer Kopfgruppe und werden mit einer Zuckergruppe als Kopfgruppe als Hexosylceramide oder Cerebroside bezeichnet. Das Disaccharid Lactose als Kopfgruppe führt zu einem Lactosylceramid. Vereinfacht kann z.B. ein Lactosylceramid als Gal-Glc-Cer für Galactosyl (β 1 \rightarrow 4)glucosyl ($1\rightarrow$ 1) -Ceramid beschrieben werden.



Abbildung 1.5: Glycosphingolipide. Beipiele für die Kopfgruppen in Glycosphingolipiden. Die Mono- oder Oligosaccharide sind über eine *O*-glycosidische Bindung mit dem Ceramid verknüpft. Eine oder zwei Zuckergruppen am Ceramid ergeben die Cerebroside, hier als Glucosyl- bzw. Lactosylceramid bezeichnet. Ist eine Komponente der Kopfgruppe eine Sialinsäure, so wird die Substanz als Gangliosid bezeichnet. Die Nomenklatur der in der Abbildung gezeigten Ganglioside GM1, GM2 und GM3 ist nach Svennerholm¹⁷ angezeigt.

Komplexe Glycolipide, deren Kopfgruppe eine oder mehrere Sialinsäuren enthält, werden als Ganglioside bezeichnet. Sie tragen bei pH 7.0 eine negative Ladung. In Säugerzellen ist *N*-Acetylneuraminsäure die häufigste Sialinsäure. Glucose, Galactose und *N*-Acetylgalactosamin sind weitere Zucker der Gangliosid-Kopfgruppen. Ganglioside sind sehr komplexe Substanzen, die nach der Anzahl und

Struktur sowie Bindungsart der Zuckereinheiten eingeteilt werden. Nach der Nomenklatur nach Svennerholm werden die Ganglioside nach ihrer Anzahl der Sialinsäuren im Molekül und der Abfolge in der Dünnschichtchromatographie eingeteilt ¹⁷. Bei GM1 handelt es sich beispielsweise um eine Monosialo-Gangliosid, also ein Molekül mit einer Sialinsäure (Abb. 1.5).

1.2.1.2. Biosynthese von Membranlipiden

Die de-novo Synthese von Glycerophospholipiden und Cholesterol erfolgt im endoplasmatischen Reticulum (ER)¹⁸. Die Biosynthese der Sphingolipide beginnt ebenfalls im ER mit der Synthese von Ceramid, das nachfolgend im Golgi-Apparat zu SM und Cerebrosiden erweitert wird ^{19,20}. Die weiteren Zuckerkomponenten der komplexen Glycosphingolipide werden durch Glycosyltransferasen ebenfalls im Golgi-Apparat angefügt. Die fertigen Lipidmoleküle werden hauptsächlich über Endo- und Exocytose, aber auch durch Proteine wie Flippasen oder Translokasen zu den verschiedenen Zielmembranen und -positionen transportiert²¹. Dieser Transport erfolgt sehr selektiv und erfordert daher eine genaue Regulation, da die verschiedenen Organellen unterschiedliche Zusammensetzungen ihrer sie umgebenden Membranen haben (siehe Kapitel 1.2.2).

1.2.1.3. Funktionen von Membranlipiden

Die wesentliche Funktion von Lipiden innerhalb der Zelle ist die Ausbildung von zellulären Membranen. Allen an der Membranbildung beteiligten Lipiden ist ihr mehr oder wenig ausgeprägter amphiphiler Charakter gemeinsam. Dieser ist die Grundvorausetzung zur Bildung der biologischen Membranen. Die vorgestellten Membranlipide bilden in wässrigen Umgebungen spontan Aggregate, wobei die hydrophilen Molekülteile dem wässrigen Medium zugewandt sind ⁴. Dabei bilden sich neben micellaren Strukturen auch Liposomen, die aus einer Doppelschicht Lipiden bestehen, wobei sich die Fettsäurereste der Lipide im Innern dieser Doppelschicht gegenüberstehen. Liposomen stellen die Grundstruktur biologischer Membranen stark vereinfacht dar.

Einige Lipidklassen und –spezies haben neben ihrer Funktion als Membranlipide weitere Funktionen. Beispielsweise dient PI als Vorläufermolekül für inositolbasierende *second messenger* (z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat)²². Komplexe Glycosphingolipide spielen eine große Rolle bei der Zell-Zell-Erkennung und der Zelladhäsion und dienen an der Zelloberfläche als Rezeptoren für biologisch aktive Substanzen²³.

1.2.2. Biologische Membranen

1.2.2.1. Struktur und biophysikalische Eigenschaften zellulärer Membranen

Wie bereits erwähnt, bilden die im obigen Abschnitt vorgestellten Membranlipide die Grundlage der zellulären Membranen. Biologische Membranen sind Aggregate von Lipiden und Proteinen. Das in modifizierter Form immer noch als gültig geltende Modell für die Organisation biologischer Membranen entwickelten Singer und Nicolson Anfang der Siebziger Jahre²⁴. Als sogenanntes "Flüssig-Mosaik-Modell" beschreibt es biologische Membranen als zweidimensionale Flüssigkeiten, in denen sich die einzelnen Lipide und Membranproteine permanent in lateraler Bewegung befinden.

Das Grundgerüst solcher Membranen ist eine Lipid-Doppelschicht von etwa 6 nm Dicke, in die Proteine eingebettet sind (Abb.1.6). Diese wird von hydrophoben Wechselwirkungen, van der Waals-Kräften und nicht-kovalenten Bindungen wie Wasserstoffbrücken in den Bereichen der polaren Kopfgruppen zusammengehalten²⁵. Die Proteine können dabei als integrale (transmembran) oder als periphere Membranproteine mit der Membran assoziiert sein. Die peripheren Membranproteine tragen dabei einen lipophilen Anker, der sie in der Membran festhält. Dies kann in Form einer Acylierung, einer Prenylierung oder durch die Kopplung an ein glycosiliertes Phosphatidylinositol²⁶ geschehen.



Abbildung 1.6: Flüssig-Mosaik Modell einer biologischen Membran nach Singer und Nicolson. Die Membranlipide lagern sich im wässrigen Umfeld als Lipid-Doppelschicht an, wobei die polaren Kopfgruppen nach außen orientiert sind und sich die hydrophoben Fettsäureketten im Innern der Doppelschicht befinden. In die Lipid-Doppelschicht sind transmembrane und periphere Membranproteine eingelagert.

Die Lipidzusammensetzung biologischer Membranen variiert zwischen den unterschiedlichen Membranen eukaryotischer Zellen und auch zwischen den zwei Einzelschichten der Doppelschicht. Die transversale Verteilung der Lipidklassen über die Doppelschicht ist asymmetrisch ^{27,28,29}. PC und SM sind sowohl in der Plasmamembran als auch in den intrazellulären Membranen eher auf der zur extrazellulären Seite gerichteten Schicht des Bilayers angereichert. PE und PS befinden sich hingegen eher, PS fast ausschließlich, auf der jeweils inneren Seite der Lipid-Doppelschicht. Cholesterol ist in beiden Schichten lokalisiert. Glycosphingolipide sind nur auf der äußeren Seite der Plasmamembran zu finden, in inneren Membranen nicht anzutreffen. sind sie Die Wanderung eines Moleküls von einer Membranoberfläche zur anderen wird transversale Diffusion oder "flip-flop" genannt. In Erythrocyten sind Transferraten von 5 min für PS und von bis zu mehr als 10 Stunden für PC und SM beschrieben worden ²¹. Die Transferraten hängen von der als Kopfgruppe auch von der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäurekettenreste ab ³⁰. Die Asymmetrie der Membran wird zum einen durch die sehr langsame transversale Diffusion aufrechterhalten und zum anderen durch spezielle Transport-Proteine ³¹.

Eine Änderung dieser sehr genau kontrollierten Verteilung der Lipide in den Zellmembranen ist meist ein Indiz für eine Dysfunktion oder das Zeichen für eine Änderung der Zellfunktion. So ist ein Anstieg des Anteils an PS in der äußeren Membran z.B. ein Zeichen für eine beginnende Apoptose ³², kann aber auch auf Erkrankungen wie z.B. Diabetes hinweisen ³³.

Nach der Einführung der biologischen Membranen und ihrer strukturgebenden Komponenten, der Membranlipide, soll nun auf Unterstrukturen eingegangen werden, die in Modellmembranen beobachtet wurden und deren Existenz auch in Zellmembranen inzwischen als gesichert angesehen wird. Somit muss das Flüssig-Mosaik-Modell nach Singer und Nicolson inzwischen modifiziert betrachtet werden. Jede Membranlipidspezies hat einen charakteristischen Schmelzpunkt (T_m). Die T_m variieren stark zwischen den einzelnen Lipidklassen und wird durch die chemische Strukturen der Kopfgruppe und den Fettsäureketten eines Moleküls bestimmt. So haben z.B. Sphingolipide einen hohen T_m (Bsp Palmitoyl-SM, 41,4°C) ³⁴. Im Gegensatz dazu weisen Glycerophospholipide mit ungesättigten Fettsäureresten niedrige T_m auf (Beispiel POPC, -2,9°C) ³⁵.

Bei einer Temperatur unterhalb von T_m befindet sich eine Lipid-Doppelschicht in der sogenannten Gelphase (*solid-ordered*; s_o), in der die Acylketten relativ fest und geordnet sind. Oberhalb von T_m befindet sich die Doppelschicht in der flüssig-kristallinen (*liquid-disordered*; I_d) Phase, in der die Acylketten lose gepackt und ungeordnet sind ³⁶.

Eine Doppelschicht bestehend aus einem binären Lipidgemisch mit unterschiedlichen T_m segregiert bei einer Temperatur zwischen beiden T_m in eine Gel- und eine I_d -Phase ^{37,38}. Setzt man der Doppelschicht Cholesterol zu, so entstehen statt starren s_o-Phasen Bereiche, in denen die Fettsäurereste der Lipide geordnet vorliegen, die sich aber lateral schnell bewegen, die sogenannten *liquid-ordered* (I_o) Phasen ^{39,40}. Werden zwei Lipide unterschiedlicher T_m und Cholesterol gemischt, so resultiert dies bei Temperaturen zwischen den T_m beider Lipidkomponenten in einer Doppelschicht, die sowohl I_d - als auch I_o -Phasen aufweist ^{41,42,43}. Dabei interagiert das kleine, planare und sehr hydrophobe Cholesterol mit den gesättigten Acylketten und verhindert die Bildung einer s_o-Phase ^{44,45,46}. Besonders stark ist die Wechselwirkung zwischen

Cholesterol und Sphingolipiden, da die sphingoide Base Wasserstoffbrücken zur Hydroxygruppe des Cholesterol ausbilden kann 47,48 . Auch hinzugegebene GPI-verankerte Proteine lagern sich in den I_o-Phasen ein 49 .

In einer flüssigen (I_d) Phase können sich also durch die Akkumulation bestimmter Lipidspezies rigide Bereiche (I_o) ausbilden, die sogenannten Membranmikrodomänen ³⁶. Dies ist in Abbildung 1.7 für eine Modellmembran aus DOPC, SM, Cholesterol und einem GPI-verankerten Protein dargestellt ^{49,30}.



Abbildung 1.7: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Mikrodomänenbildung in einer Modellmembran und Schema der Domänenbildung. Die Modellmembran besteht aus DOPC (2x18:1, rote Bereiche), SM (dunkle Bereiche) und Cholesterol und wurde auf eine inerte Trägersubstanz aufgebracht. Cholesterol lagert sich in beide Phasen ein. Die hellen Spitzen sind die Abbildungen der plazentalen alkalischen Phosphatase, ein GPI-verankertes Protein, das sich in den rigiden Domänen anreichert ⁴⁹. Das Schema rechts zeigt die Prinzipien der Domänenformation ³⁰. Die langen SM-Moleküle bilden mit Cholesterol eine eng gepackte, rigide Phase aus, die eine größere Dicke als die fluiden Bereiche aufzeigt und somit im Höhenbild der rasterkraftmikroskopischen Aufnahme abbildbar ist.

1.2.2.2. Membranmikrodomänen in zellulären Membranen

Zellmembranen bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Lipidklassen und -spezies mit sehr unterschiedlichen Fluiditäten und T_m. Cholesterol wirkt regulierend auf die Membranfluidität und ist in natürlichen Membransystemen mit einem großen Anteil vertreten, der bis zu 28% (w/w) am Gesamtlipidgehalt ausmachen kann ²⁵. Die Aufrechterhaltung bzw. Steuerung der Membranfluidität ist essentiell für die Funktionen der Zelle, z.B. bei der Anpassung an die Umgebungstemperatur ²⁵. Daher

EINLEITUNG

stellt sich die Frage, ob das in Modellmembranen beobachtbare Phänomen der Koexistenz verschiedener Phasen auch in natürlichen Membransystemen existiert und welche Funktion dieses haben könnte. Erste Hinweise auf eine laterale Phasenseparation in biologischen Membranen wurden an Fibroblasten gefunden, aus denen detergensresistente Membranbereiche extrahiert werden konnten ⁵⁰. Brown und Rose entdeckten 1992, dass sich auch GPI-verankerte Proteine durch die Behandlung mit kalten, nicht-ionischen Detergentien wie Triton X-100 (TX-100) nicht solubilisieren ließen ⁵¹. Diese als Detergens-resistente Membranen (DRM) bezeichneten Strukturen zeigten außer der Anwesenheit von GPI-verankerten Proteinen eine Anreicherung von Cholesterol und Sphingolipiden ^{52,53}. Das Abfangen des Cholesterol in der Zelle durch Methyl-β-Cyclodextrin verhinderte in den meisten Fällen die Ausbildung der DRM ⁵⁴. Die Resistenz gegenüber Detergentien wird der hohen Packungsdichte der Lipidmoleküle in den I_o-Domänen zugeschrieben ^{55,56} und die isolierten DRM damit den Membrandomänen in der I₀-Phase ^{57,58}. Simons und Ikonen entwickelten aus dieser Beobachtung das Modell der "lipid rafts" in 59 Zellmembranen dass die Membranmikrodomänen als Plattformen für Signalvorgänge sowie als Beteiligte an Membrantransportvorgängen beschreibt und sie somit funktionalisiert.

Membranmikrodomänen in Zellen gelten als hochdynamische Strukturen, deren Durchmesser zwischen einigen Nanometern bis zu mehreren hundert Nanometern angegeben wird ^{60,61,62,63,64}.

Als Sonderform der Membranmikrodomänen werden die Caveolen betrachtet ⁶⁵. Hier ist das mit Cholesterol interagierende Protein Caveolin mit dem rigiden Membranbereich assoziiert ^{66,67}, was zu einer Einstülpung der Membran führt. Dieses ist im Elektronenmikroskop deutlich sichtbar ⁶⁸.

Membranmikrodomänen wird eine Vielzahl zellulärer Funktionen zugesprochen. Sie erfüllen beispielsweise mannigfaltige Aufgaben bei vesikulären Transportvorgängen wie der Endocytose und Membranverteilungsprozessen ^{69,70,71,72}. Infizierende Partikel wie Prionen oder die für Alzheimer'sche Krankheit zuständigen Peptide nutzen über Membranmikrodomänen vermittelte Exocytosewege ^{73,74,75}. Viren, Bakterien und Parasiten können Membranmikrodomänen als Eintrittspforte in die Wirtszelle nutzen ^{76,77,78,79}. Membrandomänen scheinen auch an der Aufrechterhaltung der Zellstruktur beteiligt zu sein, da gezeigt wurde, dass sie mit dem Cytosklelett assoziiert sind ^{80,61}.

24

Die wichtigste Funktion der Membranmikrodomänen scheint jedoch in der transmembranen Signalübertragung zu liegen ^{81,82}.

Eine besondere Rolle spricht man ihnen bei der Signalübertragung bei Zellen des Immunsystems zu^{83,84}. Die an der adaptiven Immunantwort beteiligten *multichain immune recognition receptors* (MIRRs) sind oft membrandomänenassoziiert⁸⁵. MIRRs lösen nach der Bindung eines Liganden eine Signalkette aus, die über eine ganze Reihe an weiteren Proteinen läuft und von Proteinen wie beispielsweise src-Kinasen unterstützt wird. MIRRs sind beispielsweise der T-Zell-Rezeptor (T cell receptor, TCR) ^{86,87,77}, der B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) ⁸⁸ und der Immunglobulin E-Rezeptor FccRI, der bei einer Vernetzung zu einer Stabilisierung und Vergrößerung der mit ihm assoziierten Proteine führt⁸⁹. Zur Weiterleitung der Signale benötigte Proteine wie die Kinasen der src-Familie wurden ebenfalls in ^{83,90}. Auch bei Signalübertragungen des Membranmikrodomänen gefunden angeborenen Immunsystems spielen Membranmikrodomänen eine Rolle. Bakterielle Endotoxine, die Lipopolysaccharide (LPS), werden vom Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) in Verbindung mit MD2 erkannt ⁹¹. Auch ein GPI-verankertes Protein, das CD14, ist an der Erkennung beteiligt. TLR4 ist nach einer Stimulation der Zelle in Membranmikrodomänen zu finden Eine Verminderung des Cholesterolgehaltes der erkennenden Zelle führt zu einem Verlust der LPS-Responsivität ⁹².

Auch wenn die Untersuchung und somit der Nachweis von Membranmikrodomänen in Zellen schwierig ist, so gibt es doch eine Fülle an Hinweisen auf die Beteiligung von Membranmikrodomänen an einer Vielzahl zellulärer Prozesse.

1.2.3. Methoden der Analyse von Membranmikrodomänen

Zur Untersuchung des komplexen Themas der Domänenbildung in Membransystemen steht eine ganze Reihe an Methoden zur Verfügung. Dabei sind Untersuchungen von Modellmembranen durch deren definierte Zusammensetzung relativ einfach durchzuführen. Phasenübergänge von Lipidmischungen können beispielsweise anhand von Filmwaagenexperimenten ⁹³ und mittels IR-Spektroskopie ⁹⁴ untersucht werden. Die Domänenbildung in artifiziellen Membranen lässt sich auch mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie und der Fluoreszenzmikroskopie untersuchen ^{95,96,64,49,97}. Bei Untersuchungen *ex vivo* werden die Domänen meist wie beschrieben mit Hilfe von Detergentien isoliert. Am häufigsten wird dabei TX-100 verwendet, es wurden aber auch Studien mit anderen Detergentien wie z.B. Brij-58 und Brij 35, CHAPS und Lubrol WX durchgeführt ⁹⁸. Inzwischen wird die Extraktion der Domänen mittels des Einsatzes von Detergentien kontrovers diskutiert ^{99,100}. Diese Diskussion kann durch die Anwendung alternativer Isolationsverfahren, die die Domänen ohne die Einwirkung eines Detergenz aus dem Zellmembranverband lösen ^{101,102}, umgangen werden.

Einige Moleküle wurden als konstitutiv in den Membrandomänen angereichert gefunden. Dazu gehören z.B. das Gangliosid GM1 ^{103,104}, das 48 kDa-Protein Flotillin ^{105,106,107}, das 22 kDa-Protein Caveolin ¹⁰⁸ und auch GPI-verankerte Proteine ¹⁰⁹. Diese Moleküle werden als Marker bei der Charakterisierung zellulärer Membranmikrodomänen verwendet.

Die Untersuchung der Domänen innerhalb von Zellen ohne deren Isolation erwies sich als deutlich komplizierter, ist aber bei der Diskussion der Domänenbildung in vivo unerlässlich. Inzwischen wurden dazu eine Reihe optischer Methoden etabliert. Beispiele sind Untersuchungen fluoreszenzmarkierter Lipide mit konfokaler 110,111 Mikroskopie Experimente zur Kolokalisation von als membrandomänenassoziiert beschriebenen Molekülen erfolgten mit *Förster* resonance energy transfer (FRET) – Untersuchungen, fluorescense recovery after photobleaching (FRAP) - Untersuchungen ^{112,113,114}, und elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden an fixierten Zellen durchgeführt ¹¹⁵. Auch das *single particle* tracking ^{116,117} zeigte den Aufenthalt bestimmter markierter Moleküle in distinkten Bereichen der zellulären Membran^{61,118}.

Ein weiterer Weg, die Bildung von Membranmikrodomänen in Zellen zu untersuchen, ist das Beseitigen des zur Formation der Domänen benötigten Cholesterols z.B. durch das Abfangen des Moleküls beispielsweise durch Methyl-β-Cyclodextrin ⁸¹. Die Ergebnisse der Untersuchungen an ganzen Zellen untermauern die Annahme der Existenz von Membrandomänen in Zellen.

Die Bildung von Membranmikrodomänen ist anhand von Modellmembranen gut charakterisiert. An natürlichen und daher sehr komplexen Membransystemen ist die strukturelle Membranintegrität jedoch wenig untersucht. Dies ist durch die schwierige Handhabung der Proben bedingt. Es ist nur schwer möglich, intakte Membranbereiche natürlichen Ursprungs nach einer Extraktion in ihrer Struktur zu erhalten und zu analysieren. Daher erfolgen die meisten Untersuchungen an Membranmikrodomänen über die enthaltenden Proteine oder anhand von Kolokalisationsuntersuchungen einzelner markierter Moleküle in intakten Zellen. Eine detaillierte Aufklärung der Lipidzusammensetzung und die Berücksichtigung der biophysikalischen Eigenschaften der gefundenen Moleküle können zu einem besseren Verständnis der Bildung und Regulation der Membranstrukturen beitragen.

1.2.4. Methoden der Lipidanalytik

Eine detaillierte und vor allem quantitative Analytik aller der in einer Membran vorkommenden Lipide mit klassischen Methoden ist extrem schwierig, da es sich bei Lipiden um eine sehr heterogene Stoffklasse sehr ähnlich strukturierter Moleküle handelt. Um die Lipidzusammensetzungen von Zellen oder Zellkompartimenten direkt vergleichen zu können, bedarf es der Etablierung einer quantitativen, reproduzierbaren und detaillierten Lipidanalytik. So könnten Vergleiche der Lipidmuster zwischen verschiedenen Stadien oder Zuständen der Zellen zu neuen Erkenntnissen über die Feinstruktur, Erhaltung und die genauen Funktionen von Membranen führen. Angewandt könnte der Nachweis von Änderungen in den Lipidzusammensetzungen biologischer Proben zu diagnostischen Zwecken bei den verschiedensten pathologischen Veränderungen ausgenutzt werden.

Bei der Extraktion von Lipiden aus subzellulären Kompartimenten erhält man sehr geringe Materialausbeuten. Dies ist besonders bei Primärzellen der Fall, die nicht in großer Zahl in der Zellkultur angezogen werden können. Eine konservative Abschätzung der Lipidmenge subzellulärer Kompartimente aus einer Anzahl von 1×10^6 Zellen ergibt eine Menge von 5 ng pro Lipidspezies, was bei einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 700 u etwa 7 pmol ergibt (Abschätzung basierend auf den Annahmen: Zellradius r = 10 µm, Dichte $\varsigma = 1,2$ g/cm³, resultierende Trockenmasse: 20%, davon 2% Lipide, davon 5% zugehörig zum gewünschten Kompartiment, Isolationsverlust 50%, 100 Lipidspezies). Eine Lipidanalytik muss für solche geringen Materialmengen geeignet sein und muss dabei detaillierte sowie verlässliche Ergebnisse liefern.

Konventionell angewandte Analysemethoden Lipide die für sind Dünnschichtchromatographie (DC)¹¹⁹, die Gaschromatographie (GC)¹²⁰ oder die 121,122 Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) Diese klassischen Lipidanalysemethoden haben nicht die notwendige Empfindlichkeit und Genauigkeit, um eine detaillierte Untersuchung heterogener biologischer Proben durchführen zu können. Außerdem ist z.B. die Gaschromatographie nicht für alle Substanzen zugänglich, bzw. müssen diese vor der Analytik derivatisiert werden. Eine vollständige Analyse mittels einer Kombination der genannten Methoden und enzymatischer Spaltung der Lipide ist darüber hinaus sehr aufwändig und zeitintensiv 123,124

Sehr detaillierte Strukturinformationen (Bindungspositionen der Fettsäurereste, Doppelbindungskonfigurationen, usw.) erhält man durch NMR-Spektroskopie. Hierfür werden allerdings Materialmengen im oberen Mikrogrammbereich benötigt, und die Methodik versagt, wenn keine Reinsubstanzen, sondern komplexe Mischungen vorliegen ¹²⁵. Einige Lipidklassen lassen sich immunchemisch durch spezifische Antikörper nachweisen, wie für Ceramide ¹²⁶. Dies ist zwar eine sehr spezifische und sensitive Methode, erfasst jedoch immer nur die vom Antikörper erkannten Moleküle und ist somit für die Erfassung der Gesamtheit zellulärer Lipidzusammensetzungen (das "Lipidom") nicht geeignet.

Die Massenspektrometrie (MS) hat sich in den letzen Jahren zu einer wichtigen analytischen Methode derr Lipidanalytik etabliert ^{127,128}. Erste Untersuchungen an Lipiden führten aufgrund der schwierigen Ionisation zu einer starken Fragmentierung der Moleküle¹²⁹. Mit der Entwicklung der Elektrospray Ionisation (ESI) war es möglich, labile Moleküle intakt zu ionisieren und in die Gasphase zu bringen ^{130,131}, so ^{132,133,134}. Eine dass die Sensitivität der Messungen erhöht werden konnte massenspektrometrische Lipidanalytik mittels matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) - Ionenquellen, die meist einen sensitiveren Nachweis ermöglichen als ESI, werden in der Lipidanalytik selten angewandt ^{135,136,137} und führen bei der Analytik dieser Stoffklasse zu keiner Verbesserung der Nachweisgrenze gegenüber Analysen mittels ESI-MS¹³⁸.

Durch die in letzter Zeit an Bedeutung gewonnen Thematik der "Lipidomics"-Forschung ^{139,140,141,142,143,144} werden zunehmend komplexere und detailliertere Analysemethoden benötigt. Dabei erfolgt die Identifikation der Lipidklassen und –

28

spezies meist anhand der charakteristischen Fragmente der Moleküle nach hintereinandergeschalteten MS-Experimenten. Die Durchführung dieser Versuche geschieht dabei meist an Triple-Quadrupol-Massenspektrometern oder anderen Gerätekonfigurationen, die solche sogenannten Tandem-MS Untersuchungen erlauben ^{145,146,147,10}. Auch Methodiken zur Auftrennungen von Lipidextrakten mittels HPLC und einer direkten Kopplung mit der MS-Detektion wurden entwickelt ^{148,149,150,151}.

Um eine exakte Analyse der Komponenten durchzuführen, bietet sich die hochauflösende Fourier-transform ion cyclotron resonance MS (FT-ICR MS) an, die sehr sensitiv und mit sehr hohen Messgenauigkeiten arbeitet ^{152,153}. Veranschaulicht wird dies anhand des sogenannten Kendrick-Massendefekt-Plots^{154,155}, der in Abbildung 1.8 für Glycerophospholipide dargestellt ist. Dabei wird der Massendefekt (Nachkommastelle der exakten Masse) gegen die Nominalmasse einer Substanz aufgetragen. Dadurch ist es möglich, bei strukturell ähnlichen Substanzen, z.B. CH₂enthaltende Molekülsysteme bis zu einer Molekülmasse von 1000 u, anhand der Nachkommastellen der Massen beispielsweise den Gehalt an Heteroatomen, Doppelbindungen und Fettsäurekettenlängen direkt zu bestimmen, soweit die Messgenauigkeiten dies erlauben. Hier wird auch deutlich, dass der geringstmöglichste Abstand zwischen Glycerophospholipiden 0,03652 u beträgt (Diacyl- und Etherlipidspezies, Kapitel 1.2.1.1). Es ist also beispielsweise nicht möglich, in Triple-Quadrupol-Geräten Diacyl- und Etherlipidspezies aufzulösen und diese können für Fragmentierungsanalysen auch nicht getrennt voneinander isoliert werden.



Kendrick-Plot verschiedener Glycerophospholipide unterschiedlicher Fettsäurekettenlängen und Sättigungsgrade

Abbildung 1.8: Kendrick-Massendefekt-Plot von Glycerophospholipiden. Der Plot visualisiert die Anzahl der CH₂-Gruppen in horizontaler Richtung und die Zugehörigkeit zu den unterschiedlichen Lipidklassen anhand der Heteroatomverteilung in vertikaler Richtung. Verschiedene Spezies von PC und PE sind Isomere und haben somit die exakt gleiche Masse. Grundlage der Berechnungen sind die Summenformeln der Glycerophospholipide. In Teil a) sind in horizontaler Richtung die 14-er Abstände der unterschiedlichen Anzahl der CH₂-Gruppen ersichtlich. Doppelbindungen, die einen nominalen Massenabstand von 2 u verursachen würden, sind in der Detailansicht in Teil b) dargestellt. Hier ist auch der Massenabstand von 0,03652 u zwischen verschiedenen Diacyl- und Etherlipidspezies gezeigt.

Die Möglichkeiten der FT-ICR MS, die diese MassenMassenuntercshide jedoch auflösen kann, wurden bisher kaum für die Analytik biologischer Lipidmischungen genutzt. Lipidanalysen über die direkte Identifikation anhand der exakten ermittelten Massen beschränken sich auf einige wenige Arbeiten ^{156,157,137,158}. Eine quantitative Analytik für kleinste Mengen heterogener Mischungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie und einer direkt gekoppelten Vortrennung durch HPLC zur weiteren Verbesserung der Analytik ist bisher noch nicht beschrieben worden. Darüber hinaus können mittels der HPLC Kontaminationen in den Proben direkt vor der Messung abgetrennt werden, wie im Falle der Detergentien in den Lipidextrakten isolierter Membranmikrodomänen, die den massenspektrometrischen Nachweis empfindlich stören ^{159,160}.

2. Methoden

Zunächst wird ein allgemeiner Überblick und Einführung der verwendeten Methoden zur Lipidanalytik und zur Extraktion der Membranmikrodomänen gegeben. Anschließend werden die genauen Protokolle der durchgeführten Experimente dargestellt.

2.1. Allgemeine Methodik

2.1.1. Isolation der Membranmikrodomänen

Für eine Analyse subzellulärer Kompartimente müssen diese zunächst von den restlichen Bestandteilen der Zelle abgetrennt werden. Dabei ist es wichtig, Verunreinigungen zu vermeiden, da sonst keine verlässlichen Aussagen über die Bestandteile oder Funktionen getroffen werden können. Für die Isolation der in dieser Arbeit untersuchten Membranmikrodomänen wurden vier verschiedene Isolationsverfahren angewandt und charakterisiert, wobei zwei Verfahren der Isolation mittels verschiedener Konzentrationen an Triton X-100 (TX-100) und zwei detergensfreie Isolationsmethoden angewendet wurden. Dabei müssen jeweils die rigiden Membranbereiche zuverlässig von den fluiden Membranbereichen getrennt werden und anschließend sauber gesammelt werden können.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, werden Membranmikrodomänen standardmäßig mittels nicht-ionischer Detergentien bei einer Temperatur von 4°C aus den Membranverbänden herausgelöst und in einem Dichtgradienten vom Rest der Membrankomponenten separiert. Dabei wird meist das Detergens TX-100 in einer Konzentration von 1 Volumenprozent verwendet.

Zur Vermeidung der die Probe kontaminierenden Detergentien sind in der Literatur Methoden beschrieben, die die Domänen ohne die Verwendung eines Detergens extrahieren ^{101,102}. Diese Methoden eignen sich besonders für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse der Proben, da Detergentien die Ionisation der Analytmoleküle unterdrücken und sehr empfindlich nachgewiesen werden. Ist eine Analytik der Lipidkomponenten erwünscht, ist die Abtrennung des Detergens ohne

Verluste der gewünschten Analytmoleküle aufgrund der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften der Lipidmoleküle und der Detergensmoleküle kaum möglich.

2.1.2. Charakterisierung der isolierten Membranbereiche

Zur Überprüfung der Aufreinigungen werden die einzelnen Dichtegradientenfraktionen auf die Anreicherung von Markermolekülen, die in der Literatur als in Membranmikrodomänen angereichert beschrieben werden, untersucht. In dieser Arbeit wurden dazu das Gangliosid GM1 und das Protein Flotillin-2 ausgewählt (siehe Kapitel 1.2.3). Exemplarisch wurde außerdem die Verteilung von Caveolin-1 in Lungenendothelzellen untersucht, ein weiterer Marker, der jedoch in den verwendeten human embryonic kidney (HEK)-Zellen nur sehr gering exprimiert wird ^{161,162}. Zusätzlich wurde der Proteingesamtgehalt der Fraktionen mittels der Methode nach Bradford bestimmt ¹⁶³. Der Cholesterolgehalt der Fraktionen wurde ebenfalls ist aetestet. Cholesterol massenspektrometrisch nachweisbar. Da die Nachweisempfindlichkeiten für Cholesterol im MS jedoch sehr gering sind, wird für eine bessere Ionisationseffizienz der Substanz in der Ionenguelle vor der Messung eine Derivatisierung durchgeführt ¹⁶⁴. Durch die sehr geringen Probenmengen in den durchgeführten Versuchen wurde daher auf einen sensitiven photometrischen Nachweis zurückgegriffen ¹⁶⁵.

Exemplarisch erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenden Proteine und eine massenspektrometrische Identifikation der stärksten erhaltenden Banden bzw. Spots. Hiermit sollte die Verwendbarkeit der Fraktionen auch für komplexe Proteinbestimmungen geprüft werden.

2.1.3. Lipidextraktion und TX-100 Abtrennung

Vor einer weiteren Analyse der Lipidzusammensetzung von subzellulären Kompartimenten müssen nun die Lipide von den anderen Komponenten wie Proteinen, einzelnen Aminosäuren und Kohlenhydraten getrennt werden.

Eine Methode zur Lipidextraktion aus Geweben oder Zellen sollte idealerweise mehrere Charakteristika aufweisen. Neben der Separation der Lipide von den

33

genannten Substanzen sollte sie die zu extrahierenden Lipide ohne Verluste erfassen und im Idealfall keine zur Analyse gewünschte Lipidklassen oder Spezies diskriminieren. Sie sollte reproduzierbar und relativ einfach anzuwenden sein.

Soweit es sich bei den zu extrahierenden Substanzen um Substanzen ähnlicher Polar- oder Apolaritäten wie z.B. Triglyceride handelt, kann eine solche Extraktion relativ einfach durchgeführt werden. Die Membranlipide von Zellen haben jedoch amphiphilen Charakter und unterschiedliche Polaritäten. Sie in einem Schritt quantitativ zu extrahieren ist daher kaum möglich.

Die Löslichkeit von Membranlipiden wird durch die hydrophoben Reste wie die Fettsäureketten und die polaren Gruppen wie Phosphate oder Zuckerreste bestimmt. Bei der Extraktion aus zellulären Strukturen müssen nicht nur die einzelnen Lipidmoleküle in Lösung gebracht werden, sondern es müssen auch die im Membranverband herrschenden Wechselwirkungen wie beispielsweise Protein-Lipid-Interaktionen überwunden werden.

Für die Extraktion eines möglichst breiten Spektrums an Lipiden aus biologischen Proben wird standardmäßig die Zweiphasenextraktion nach Folch ¹⁶⁶ oder modifiziert nach Bligh und Dyer¹⁶⁷ angewandt. Dabei werden Lipide aus biologischen Proben mittels Methanol, Chloroform und Wasser im Verhältnis 2:1:0,8 extrahiert. Anschließend wird durch das Einstellen des Verhältnises auf 2:2:1,8 eine Trennung der Lösungsmittel in zwei Phasen erreicht. Die untere, überwiegend chloroformische Phase enthält die gelösten Lipide. In der Interphase sind die Proteine zu finden, die obere wässrige Phase enthält polare Komponenten. Die modifizierte Methode nach Bligh und Dyer wird bei der Extraktion von Lipiden aus Proben mit einem hohen Anteil an Wasser wie Zellkulturmedien angewandt und wurde daher in dieser Arbeit verwendet. Das in der Probe enthaltende Wasser wird dabei im Gegensatz zu der Methode nach Folch bereits in die Lösungsmittelverhältnisse zur Extraktion mit eingerechnet. Komplexe Lipide mit einem hohen Anteil an polaren Resten können bei der Extraktion nach Folch bzw. Bligh und Dyer in die obere, wässrige Phase übergehen. Wenn diese quantitativ analysiert werden sollen, so müssen sie aus der wässrigen Phase extrahiert werden.

Aufgrund der Adhäsion der Lipidmoleküle an den Extraktionsgefäßwänden wurden die Extraktionen in möglichst geringen Lösungsmittelvolumina durchgeführt. Zur Extraktion wurden ausschließlich Glasgefäße verwendet, da die verwendeten Lösungsmittel die in Plastikgefäßen enthaltenden Weichmacher mit herauslösen, welche die nachfolgenden Analysen stören. Des Weiteren wurden zur Vermeidung der Degradation der Moleküle (z.B. Autooxidation von Doppelbindungen) die Extrakte unter Stickstoff und bei - 70°C aufbewahrt.

Bei den Lipidextraktionen der detergenshaltigen Fraktionen geht das Detergens zusammen mit den Lipiden in die organische Phase über. Für eine Analytik der Substanzen über eine elektrophoretische Vortrennung oder immunchemische Nachweise ist dies unerheblich. Das Detergens kann jedoch den Nachweis des Gesamtproteingehaltes beeinflussen ¹⁶⁸ und ist auch nicht für eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse der enthaltenden Probensubstanzen geeignet ¹⁶⁰. Daher war es notwendig, das die Probe kontaminierende Detergens abzutrennen. Dies konnte durch eine Dialyse und auch durch spezifische Adsorbentien nicht erreicht werden. Auch eine Dünnschichtchromatographie führte nicht zu den 3.3.1). gewünschten Ergebnissen Die (siehe Kapitel Hochleistungsflüssigchromatographie erwies sich schließlich als Methode der Wahl zur Abtrennung des Detergens vor einer weiteren Messung der Proben.

2.1.4. Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC)

Die HPLC ist eine chromatographische Methode zur Auftrennung von Substanzen. Dabei befindet sich die stationäre Phase gepackt in einer Säule, durch die die mobile Phase mit einem hohen Druck hindurchgeleitet wird. Zur Trennung von Substanzen in heterogenen Mischungen, aber auch zur Aufkonzentrierung und Reinigung von Stoffen hat sich die high performance liquid chromatography (HPLC) als wertvolle Methode sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke erwiesen. Sie ist eine Form der Flüssigchromatographie (Partikelgrößen konventionell um 200 µm Durchmesser), bei der sich durch den hohen Druck der mobilen Phase sehr kleine Partikelgrößen (einige µm Durchmesser) der stationären Phase verwenden lassen, so dass hohe Trennleistungen erreicht werden. Die Wahl der vielfältigen stationären und mobilen Phase erlauben die Anpassung und Optimierung für die verschiedensten analytischen Fragestellungen. Man unterscheidet isokratische Arbeitsweisen, wobei die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant gehalten wird. und

Gradientenelutionen, bei denen sich die Zusammensetzung der mobilen Phase während des Laufes ändert und durch deren Anwendung die Trennleistungen oft verbessert werden können. Außerdem lassen sich mittels eines angelegten Gradienten beispielsweise auch Analyte stark unterschiedlicher Polaritäten in einem Lauf trennen.

Wie lange ein Anaylt mit der stationären Phase assoziiert bleibt (also "retentiert" wird), hängt von der Gesamtheit der Wechselwirkungen zwischen der stationären Phase und dem Analyten sowie der mobilen Phase und dem Analyten ab. Sobald die Wechselwirkungen des Analyten mit der mobilen Phase insgesamt stärker sind als die mit der stationären Phase, wird der Analyt vom Lösungsmittel aufgenommen und eluiert. Prinzipiell können zwei Arten stationärer Phasen unterschieden werden. Die sogenannten Normalphasen bestehen aus kieselgelbasierten Packungsmaterialien, die teilweise chemisch modifiziert sind. Diese Modifikationen können polare Reste wie beispielsweise Aminogruppen (-NH₂) oder Diolreste (zweiwertige Alkohole) sein. Letztere sind z.B. für die Auftrennung von mäßig apolaren bzw. polaren Substanzen Probenkomponenten bei der geeignet. Die eluieren Normalphasengut Chromatographie in der Reihenfolge steigender Polaritäten. Die Elutionskraft der verwendeten Lösungsmittel steigt mit zunehmender Polarität.

Bei der heutzutage überwiegend angewendeten Umkehrphasen-Chromatographie, auch *reversed phase (rp)* genannt, werden als Trägermaterialien Kieselgele verwendet, auf deren Oberfläche Alkylreste (meist C₄, C₈ oder C₁₈ Reste) chemisch gebunden werden. Hier beruht die Wechselwirkung überwiegend auf hydrophoben Kräften. Bei der Verwendung der *rp*-Chromatographie steigt die Elutionskraft der verwendeten Lösungsmittel mit abnehmender Polarität.

Zur Detektion der Eluenten wird meist ein UV-Detektor eingesetzt. Dazu sind eine UV-durchlässige mobile Phase sowie anregbare Elektronensysteme im Analyten notwendig. Werden diese Voraussetzungen nicht oder nur unzulänglich erfüllt, wie es beispielsweise bei Lipiden der Fall ist, so kann ein Verdampfungs-Lichtstreudetektor (*evaporative light scattering detector*, ELSD)¹⁶⁹ verwendet werden. Hier werden die aus der Säule eluierenden Analyte mit der mobilen Phase zusammen zunächst vernebelt. Anschließend wird die mobile Phase in einem Gasstrom von mehreren L/min vollständig verdampft, so dass der Analyt in Form von gasförmigen Partikeln
übrig bleibt. Ein durch diese Partikelwolke geführter Lichtstrahl erzeugt ein Streulicht, dessen Intensität proportional zur Anzahl der detektierten Moleküle ist.

2.1.5. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Methode zur Erfassung der Molekülmasse von Ionen. Somit kann die Massenspektrometrie zur Bearbeitung vielfältiger analytischer Fragestellungen genutzt werden. Hierzu zählt neben der Identifizierung und der quantitativen Erfassung der Analyte z.B. auch die Strukturaufklärung anhand von Fragmentierungsspektren. Massenspektrometer erreichen hohe Nachweisempfindlichkeiten und eignen sich zur Identifizierung einzelner Komponenten in komplexen Mischungen, was sie zu einer sehr nützlichen analytischen Methode macht.

Generell bestehen Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Nach Erzeugung der Ionen werden diese im Analysator nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis aufgetrennt und detektiert. Im Folgenden wird auf die in dieser Arbeit verwendeten Systeme, die ESI FTMS und die MALDI TOF MS, eingegangen

2.1.5.1. Ionenquellen

Vor der eigentlichen massenspektrometrischen Analyse von Molekülen müssen diese zunächst in die Gasphase überführt und ionisiert werden. Für die Analytik von großen, labilen Biomolekülen wurden daher Methoden entwickelt, die eine sanfte Ionisation gewährleisten und nach der sich die Ionen intakt nachweisen lassen. Die Einführung der Verfahren MALDI (matrix assisted laser desorption/ionisation) und ESI (electrospray ionisation) waren Meilensteine bei der Einführung der Massenspektrometrie in die biochemische Analytik. In dieser Arbeit wurden beide Methoden der Ionisation verwendet. MALDI diente zur Ionisation der Proteinfragmente nach Durchführung des peptide mass fingerprintings (siehe Kapitel 2.2.2.3). ESI-MS wurde zur Messung der Lipidstandards und der Lipidextraktionen angewandt, wobei der Term "offline-ESI" Experimente ohne eine direkte Kopplung mit einer LC-Vortrennung beschreibt. Die Bezeichnung "*online"*-Messung wird in dieser Arbeit für LC-MS Experimente verwendet.

MALDI

matrixunterstützten Laserdesorptionsionisation (matrix assisted laser Bei der desorption/ionization, MALDI)¹⁷⁰ werden die Probensubstanzen zusammen mit einer Matrixsubstanz vermischt und auskristallisiert. Dabei ist die Matrixsubstanz in einem hohen Überschuß zum Analyten vorhanden und besteht aus Substanzen, die die Laserenergie absorbieren können. So basieren Matrizes bei einer Verwendung eines üblichen Stickstofflasers mit einer Wellenlänge von 337 nm auf Substanzen mit aromatischen Strukturen. Mittels kurzer Laserimpulse von einigen Nanosekunden Dauer wird der Probe Energie zugeführt, wobei zunächst die Matrixmoleküle die Energie absorbieren und an das Festkörpergitter des Kristalls abgeben. Dabei werden die Matrix- als auch die Analytmoleküle in die Gasphase gebracht. Die Ionisation der Moleküle findet ebenso während dieses Vorganges statt. Der genaue Mechanismus ist noch nicht hinreichend geklärt ¹⁷¹ und setzt sich wahrscheinlich aus mehreren verschiedenen Mechanismen wie z.B. dem Protonentransfer zwischen Matrix- und Analytmolekülen¹⁷² oder Gasphasenreaktionen direkt nach der Desorption ¹⁷³ zusammen. Da die Analytmoleküle die zu dem gesamten Vorgang benötigte Energie lediglich indirekt aufnehmen, eignet sich MALDI besonders für die Analytik von thermolabilen Makromolekülen wie z.B. für Proteine. MALDI bildet oft verschiedene, einfach geladene Quasimolekülionen durch die Adduktionenformation mit Anlagerungsprodukten wie beispielsweise Alkalimetallen wie z.B. [M+Na]⁺ oder [M+K]⁺.

ESI

Bei der in dieser Arbeit hauptsächlich angewandten Elektrospray Ionisation (ESI) ^{174,175} werden die Probensubstanzen direkt aus der Lösung heraus ionisiert und in die Gasphase überführt. Hierzu werden die Analyte in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, durch eine Edelstahlnadel in die Quelle eingebracht und unter Einfluss einer angelegten Hochspannung kontinuierlich versprüht. Je nach Polarität des angelegten

Potentials und den Eigenschaften des Analyten bilden sich dabei positiv oder negativ geladene Tröpfchen, die durch die Verdampfung des Lösungsmittels kleiner werden. Die Tröpfchen zerfallen durch die Abstoßungskräfte der Ladungen bei dem Erreichen des sogenannten Rayleigh-Limits zu kleineren Tröpfchen ¹⁷⁶ während ihrer Bewegung durch die ESI-Quelle in Richtung des Detektors. Ist das Lösungsmittel vollständig verdampft, kommt es schließlich zur Bildung freier Ionen (Abb. 2.1). Diese sind häufig vielfach geladen und treten so z.B. als [M+nH]ⁿ⁺ auf.



Abbildung 2.1: Schema des ESI Vorganges. Die vollständig gelöste Probe wird unter Anlegen einer Hochspannung versprüht. Durch elektrochemische Prozesse in der ESI-Nadel und der angelegten Spannung bilden sich je nach Polarität der Spannung positiv oder negativ geladene Tröpfchen, die stetig kleiner werden und schließlich die geladenen, gasförmigen Analytmoleküle freigeben. Im Beispiel wird der positive Ionenmodus verwendet, d.h. es werden Ionen mit einer oder mehreren positiven Ladungen gebildet.

Die Bildung positiver oder negativer Ionen hängt vom Analyten sowie der Polarität der angelegten Spannung ab und kann mittels Zusätzen in der Spraylösung unterstützt werden. Der Term "negativer Ionenmodus" beschreibt dabei die Messung negativ geladener Ionen, der Term "positiver Ionenmodus" wird für die Messung positiv geladener Teilchen verwendet.

Der genaue Mechanismus der Ionenbildung ist unbekannt, jedoch werden zwei Modellvorstellungen diskutiert ^{177,176}. ESI ist eine sehr gut geeignete Methode zur Messung großer, labiler Moleküle. Sie erlaubt sogar die Messung nicht-kovalenter Komplexe und macht sie so zu *"wings for molecular elephants"* ¹⁷⁸. Elektrospray bildet im allgemeinen Ionenspezies verschiedener Ladungszustände, wodurch ein Ladungs-Dekonvulieren der erhaltenden Spektren nötig sein kann, d.h. eine Umrechnung aller detektierten Ladungszustände eines Moleküls auf einen Ladungszustand, wobei meist die Neutralmasse genommen wird. Es können so noch sehr große Moleküle in einem recht niedrigen *m/z*-Bereich gemessen werden. Bei kleinen Molekülen (u im Bereich bis 1500) werden mehrfach geladene Ionen selten beobachtet.

ESI ist ein konzentrationsabhängiger Prozess. Die erreichten Nachweisempfindlichkeiten sind primär von der Konzentration der Analyte und weniger von der Flussrate bzw. vom eingebrachten Volumen abhängig. Bei geringen Probenmengen ist daher das Herunterskalieren der Apparatur sinnvoll. Bei der Nano-ESI wird die zum Probeneinlaß normalerweise verwendete Elektrospray-Nadel (Durchmesser an der Spitze um 100 μ m) durch eine dünne und leitfähig beschichtete Glaskapillare ersetzt (Durchmesser an der Spitze 1-4 μ m). So werden auch Messungen mit Flussraten von einigen nL/min möglich und geringkonzentrierte Proben können entsprechend eingeengt werden ¹⁷⁹.

ESI eignet sich besonders für die Kopplung von LC-Anwendungen, da die Probe in Lösung bei kontinuierlichen Flussraten in die Quelle überführt wird und die Ionisation bei Atmosphärendruck stattfindet. Dazu müssen die HPLC Flussraten so gewählt werden, dass diese mit der ESI-Quelle kompatibel sind.

2.1.5.2. Massenanalysatoren

Nachdem die Analyten in die Gasphase überführt und ionisiert wurden, werden sie über elektrische Felder beschleunigt und in den Massenanalysator geleitet. Massenanalysatoren werden allgemein hinsichtlich ihres Auflösungsvermögens, ihrer Scangeschwindigkeiten und ihres Detektionslimits unterschieden. In dieser Arbeit wurden die Flugzeitmassenspektrometrie (*time of flight*, TOF) und die Fourier-

Transform Ionen-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) Massenspektrometrie genutzt. Dabei wurden die Messungen der Peptide des *peptide mass fingerprintings* mittels eines TOF-Analysators durchgeführt. Die Lipidstandards und –extrakte wurden mittels FT-ICR MS analysiert.

Time of flight mass spectrometry (TOF-MS)

Die Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS) ^{180,181} wird oft mit MALDI-Quellen gekoppelt, da beide gepulst arbeiten. Zusätzlich sind TOF-Analysatoren in der Lage, nahezu beliebig große Moleküle detektieren zu können. Daher eignet sich die Kopplung MALDI-TOF besonders für die Proteinanalytik. Die desorbierten Ionen werden einer Beschleunigungsspannung ausgesetzt, die jeder Ionenspezies die gleiche kinetische Energie verleiht. Die Geschwindigkeit der Ionen im Vakuum hängt nun von ihrer jeweiligen Masse ab. Aus der Zeit, die die Ionen für die feldfreie Driftstrecke im Flugrohr des Instruments benötigen, sind somit deren jeweilige Massen bestimmbar. Die Unschärfeeffekte beim Start durch die unterschiedliche Entfernung der Ionen zum Flugrohreintritt können durch die Verwendung eines Reflektors ausgeglichen werden und so zu höheren Auflösungen führen. Als Detektor dienen Sekundärelektronenvervielfacher, von denen viele einzelne zu sogenannten multi-channel-plates zusammengefasst werden, um sensitive Messungen über die gesamte Auftrittsfläche der Ionen am Flugzeitrohrende zu gewährleisten. Der in dieser Arbeit verwendete Reflektor-TOF-Analysator (siehe Kapitel 2.2.3.3) erreichte Auflösungen von etwa 6000 für Moleküle um m/z 800. Die Auflösung ist das Verhältnis der Höhe eines Signals zu seiner Breite bei halbem Intensitätsmaximum des Signals. Sie besagt letztlich, welchen Abstand zwei Signale gerade noch haben dürfen, um getrennt voneinander detektiert werden zu können. Mit den erreichten, beschriebenen Auflösungen könnten also Ionenspezies oben mit einem Massenabstand von 0,13 m/z voneinander unterschieden werden. Die relativen Massengenauigkeiten lagen um die 80 ppm.

Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS)

Die Methodik der FT-ICR MS ¹⁵² oder vereinfacht FTMS beruht auf dem Prinzip der lonenfallen, also dem der Speicherung von Ionen im elektromagnetischen Feld. Sie zeichnet sich besonders durch sehr hohe Auflösungen ($R=10^5-10^6$), höchste Messgenauigkeiten ($\Delta m = 10^{-3}$ bis 10^{-4} u) und hohe Sensitivitäten (Detektionslimit bis in den attomolaren Bereich) aus. Die nicht-destruktive Detektion der Ionen erlaubt darüber hinaus vielfältige analytische Möglichkeiten mittels Tandem-MS Experimenten (siehe Kapitel 2.1.5.3). FTMS hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.

Bei der FTMS werden die in der Quelle erzeugten Ionen in einer Ionenfalle, der ICR-Zelle, eingefangen und gehalten. Die Zelle befindet sich in einem starken, homogenen Magnetfeld. Die Teilchen werden dadurch auf eine Kreisbahn gezwungen, wobei ihre Rotationsfrequenz abhängig ist von dem Masse zu Ladungsverhältnis m/z der Ionen. Durch die Detektion eines durch die Ionen induzierten Stroms an den Detektorplatten und einer nachfolgenden Fourier-Transformation (FT) des erhaltenden Signales können die verschiedenen Massen analysiert und die m/z - Werte im Massenspektrum dargestellt werden.

Die Messungen der Zellextrakte und der Lipidstandards in dieser Arbeit wurden mittels FTMS durchgeführt. Daher soll im Folgenden diese Methode ausführlicher beschrieben werden.

FTMS Analysatoren bestehen aus vier essentiellen Komponenten. Die erste Komponente stellt der aufgrund der hohen benötigten Feldstärken supraleitende Elektromagnet dar. Je höher die Feldstärken, denen die Ionen ausgesetzt sind, desto höher die erreichten Auflösungen und der messbare Massenbereich. Die zweite Komponente ist die Zelle, in der die Ionen gespeichert und analysiert werden. Um ungewollte Kollisonen der Ionen während ihrer Kreisbewegungen in der Zelle zu vermeiden, muss die mittlere freie Wegstrecke dort maximiert werden. Dies ist nur mittels eines Ultrahochvakuums möglich und erfordert als dritte Komponente der Instrumentation ein entsprechendes Vakuumpumpensystem. Die vierte Komponente besteht aus den erforderlichen elektronischen Systemen wie Freuquenzgeneratoren und –verstärkern als auch Rechner sowie Software zur Datenerfassung, Datenprozessierung und zur Steuerung des gesamten Systems.

FTMS Analysatoren werden meist mit ESI-Quellen kombiniert. Zunächst werden die gebildeten Ionen über die Transferoptik von der Ionenquelle in die ICR-Zelle geleitet. Dabei wird der Ionenstrahl fokussiert und der Druck stetig verringert, da, trotz der Ionisation wie im Falle von ESI bei Atmosphärendruck, die ICR-Zelle wie erwähnt unter Hochvakuum betrieben wird. Außerdem können Ionen in zwischengeschalteten Multipolen gespeichert werden und so die Anzahl der pro Messzyklus in die Zelle gelangten Ionen gesteuert werden (die Zeitdauer der Speicherung in dieser Arbeit wird aufgrund der Verwendung eines Hexapols *hexapole accumulation time* genannt). Die ICR-Zelle besteht aus sechs Elektrodenplatten. Die in unserem Aufbau verwendete zylindrische Bauform der ICR-Zelle ist eine sogenannte *Infinity*-Zelle ¹⁸², die in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt ist. Dabei sind je zwei Platten orthogonal zur Richtung des magnetischen Feldes. Die Platten werden zum Einfangen, zur Anregung und zur Detektion der Ionen genutzt.



magnetisches Feld

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer ICR-Ionenzelle. Dargestellt sind die verschiedenen Elektroden zum Einfangen, zur Anregung und zur Detektion der Ionen. Abbildung modifiziert nach Bruker Daltonics, Bremen.

Beim Übertritt in die ICR-Zelle weisen die Ionen eine Eigengeschwindigkeit parallel des Magnetfeldes auf, die zu einem Verlust der Teilchen bei Berührung der dem Eintritt gegenüberliegenden Zellenwand führen würde. Durch die Generierung eines statischen elektrischen Feldes über die *trapping*-Elektroden werden die Ionen parallel zum Magnetfeld in in der Zelle gehalten. Orthogonal zum Magnetfeld werden die Ionen durch das starke Magnetfeld auf eine Kreisbahn um die Zellachse gezwungen. Das Kreuzprodukt des Vektors des magnetischen Feldes \vec{B} und der Geschwindigkeit der Ionen \vec{a} und ihrer Ledung geregutiert in einer Kreit die genkrecht zur Zellegene

der Ionen \vec{v} und ihrer Ladung q resultiert in einer Kraft, die senkrecht zur Zellachse auf das Ion wirkt und als Lorentz-Kraft F_L bezeichnet wird.

$$F_L = \left| \vec{F} \right| = \left| q \vec{v} \times \vec{B} \right| \tag{1}$$

wobei \vec{F} die resultiernde Kraft ist, q die Ladung und \vec{v} die Geschwindigkeit des betreffenden lons und \vec{B} die Flussdichte des angelegten Magnetfelds ist. Diese Kraft wirkt auf den Anteil der Bewegung des lons bei Eintritt in die Zelle, die orthogonal zum Magnetfeld verläuft. Bei der resultierenden Kreisbewegung wirkt die Zentrifugalkraft F_z der Lorentzkraft F_L entgegen. Es gilt also:

$$F_L = \left| q \vec{v} \times \vec{B} \right| = \frac{m v^2}{r} = F_Z$$
⁽²⁾

Das Ion führt nun die sogenannte Zyklotronbewegung aus. Zur Verdeutlichung ist die Zyklotronbewegung in der ICR-Zelle in Abbildung 2.3 dargestellt.



Abbildung 2.3.: Schema der Krafteinwirkung auf ein Ion in der ICR Zelle. Die auf ein geladenes Teilchen in einem Magnetfeld wirkende Lorentzkraft F_L , die ihr entgegengerichtete Zentrifugalkraft F_Z und die Eigenbewegung v dieses Teilchen zwingen es zur Ausführung einer Kreisbewegung in der ICR-Zelle, der sogenannten Zyklotronbewegung. Die Richtung der Bewegung hängt von der Polarität der Ladung des Teilchens ab.

Die Geschwindigkeit *v* auf einer Kreisbahn lässt sich als Winkelgeschwindigkeit $\omega = \frac{v}{r}$ darstellen. Daraus folgt die Zyklotrongleichung:

$$\omega = \frac{qB}{m} \tag{3}$$

wobei ω die Winkelgeschwindigkeit des Ions darstellt. Die Winkelgeschwindigkeit lässt sich mittels Division durch 2π in die Kreisfrequenz, die sogenannte Zyklotronfrequenz f_z überführen.

Aus Gleichung (3) ist ersichtlich, dass die Winkelgeschwindigkeit ω bzw. die Zyklotronfrequenz f_z in einem konstanten Magnetfeld der Flussdichte *B* ausschließlich vom Masse- zu Ladungsverhältnis des betreffenden Teilchens

abhängig ist. Die Zyklotronfrequenz stellt also für jede lonenspezies eine charakteristische Größe dar. Ist die Magnetfeldstärke bekannt, so lässt sich aus dem Kehrwert von (3) bzw. (4) das Masse-Ladungs-Verhältnis eines lons darstellen, das als m/z angegeben wird, wobei m die Masse des Teilchens in [u] und q respektive z ein Vielfaches der Elementarladung in [e] ist.

Die Messung der Zyklotronfrequenz zur Ermittlung des Masse-Ladungs-Verhältnisses eines Teilchens hat mehrere Vorteile. Zum einen ist diese Frequenz unabhängig von der kinetischen Energie des betreffenden Teilchens, so dass diese bei der Messung nicht beachtet werden muss. Gleiche Teilchen unterschiedlicher kinetischer Energien haben verschiedene Zyklotronradien, jedoch die gleichen Zyklotronfrequenzen. Dieses Charakteristikum ermöglicht das erneute Zuführung von Energie zur Detektion und zur Fragmentierung der Teilchen (siehe unten). Zum anderen können Frequenzmessungen sehr exakt durchgeführt werden und liefern somit sehr genaue Daten.

Um die Ionen auf der z-Achse in der Zelle zu halten, muss wie oben beschrieben ein trapping-Potential angelegt werden. Aufgrund dieses elektrostatischen Potentials führen die Teilchen in der ICR-Zelle nicht nur die Zyklotronbewegung aus, sondern das Potential führt auch zur Ausführung der sogenannten Magnetronbewegung. Diese ist ebenso wie die Zyklotronbewegung senkrecht zum Magnetfeld gerichtet. Die Magnetronbewegung verläuft, wie auch die durch das trapping-Potential verursachte axiale Bewegung, bei viel kleineren Frequenzen und hat somit kaum Einfluss auf die eigentliche Messung. Auf sie wird in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen. Eine genaue Beschreibung der physikalischen Prinzipien der FTMS ist im Review von Marshall, Hendrickson und Jackson¹⁸³ dargestellt. Die Detektion der Ionen erfolgt durch die Induktion eines Spiegelstroms an den Detektorplatten (Abb. 2.4). Die Radien der Zyklotronbewegung und die Kohärenz der Ionen in der ICR-Zelle reichen jedoch meist ohne eine Anregung nicht aus, um diese zu detektieren. Zur Detektion werden die Ionen daher durch ein über die Anregungsplatten eingestrahltes Hochfrequenzwechselfeld (radio frequency – rf) angeregt. Jedes Ion nimmt bei einer Übereinstimmung der eingestrahlten Frequenz mit seiner Zyklotronfrequenz die Energie des Feldes in Form von kinetischer Energie auf und vergrößert somit seinen Zyklotronradius, so dass die Ionen in die Nähe der Detektionsplatten kommen. Der resultierende Zyklotronradius ist dabei abhängig von der Energie des eingestrahlten Feldes und der Einstrahlungsdauer. Zusätzlich werden Phasenverschiebungen ausgeglichen, da die Ionen in die gleiche Phase wie das angelegte elektrische Feld gezwungen werden. Durch die Anregung bewegen sich nun also Ionen eines gleichen *m*/*z* Verhältnisses in "Paketen" auf Zyklotronradien, die nahe der Detektionsplatten verlaufen. Dadurch wird an ihnen ein messbarer Strom induziert. Die Frequenz dieses Stroms entspricht dabei der Zyklotronfrequenz der ihn induzierenden Ionen. Die Amplitude ist abstandsabhängig und proportional zur Anzahl der detektierten Ionen. Zwar bedarf es einer gewissen Anzahl an Ionen, um ein detektierbares Signal zu erhalten, zu viele Ionen jedoch wirken sich negativ auf die Auflösung der Messung aus.



Abbildung 2.4: Detektion der Ionen. Die die Zyklotronbewegung in der ICR-Zelle ausführenden Ionen werden durch eine angelegte Frequenz resonant angeregt. Dadurch wird der Radius der Zyklotronbewegung vergrößert und Phasenverschiebungen ausgeglichen. Die Ionenpakete induzieren an den Detektionselektroden einen Spiegelstrom, der in der Zeitdomäne gemessen wird. Durch eine Umwandlung mittels einer Fourier-Transformation kann die Frequenzdomäne bzw. die m/z-Werte der so detektierten Moleküle dargestellt werden.

METHODEN

Die in großen lonenpaketen wirkenden abstoßenden elektrostatischen Kräfte zwischen den Ionen stören dabei den Zusammenhalt der Ionenwolke. Die Messung der Frequenz des Stromes erfolgt über die Zeit. Das resultierende Signal kann über eine Fourier-Transformation von der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne umgewandelt werden. Die Vorgänge während der Detektion sind in Abbildung 2.4 zusammengefasst. Zur Anregung können verschiedene Modi verwendet werden. Dabei bestimmt die Breite des angeregten Frequenzbereiches den Messbereich und aufgewandte Anregungsenergie die Stärke der Anregung. die Da lonen unterschiedlicher m/z-Werte unterschiedliche Zyklotronfrequenzen haben, können gezielt einzelne, mehrere oder ganze Bereiche von m/z angeregt werden. Für die Aufnahme von Breitbandspektren wird üblicherweise die sogenannte chirp-Anregung verwendet. Dabei wird innerhalb einer bestimmten Zeit ein Frequenzbereich von bis zu mehreren MHz durchlaufen. Große Massenbereiche können so mittels eines Pulses aufgenommen werden.

Nutzt man lediglich einige Kilohertz breite Frequenzbereiche zur Anregung, so kommt es zur Anregung einzelner Ionenspezies. Umgekehrt kann man aus einer Anregung über einen breiten Frequenzbereich auch einzelne Frequenzen auslassen, so dass die Ionen mit den entsprechenden Zyklotronfrequenzen ihre Radien nicht verändern. Durch die Verwendung entsprechend hoher Anregungsenergien können die Zyklotronradien der übrigen Ionen so weit vergrößert werden, dass sich diese an der Zellwandung entladen und somit verloren gehen. Diese sogenannte SWIFT (*stored-waveform inverse Fourier-transform*) - Anregung ¹⁸⁴ wird gezielt bei MS/MS-Experimenten für die Isolation einzelner Molekülspezies eingesetzt.

2.1.5.3. Tandem-MS

Tandem-MS (oder MS/MS) bezeichnet die Hintereinanderschaltung mehrerer MS-Experimente, wobei die Ionen zwischen den einzelnen Experimenten fragmentiert werden. Die erhaltenden Fragmentierungsspektren können zur Strukturaufklärung der Moleküle beitragen. Vor einem MS/MS-Experiment erfolgt zunächst die Isolation der Molekülspezies, die untersucht werden soll, des sogenannten *parent ion*. Anschließend erfolgt die Fragmentierung über verschiedene, unten aufgeführte Methoden und die erneute Detektion der entstehenden Teilchen. Dies kann wichtige Informationen über die Struktur der Substanzen liefern, die allein aus der Informationen der exakten Masse nicht ersichtlich sind. Durch die Speicherung der Ionen in der ICR-Zelle, der nicht-destruktiven Detektion und die unterschiedlichen Anregungsmodi sind die Möglichkeiten der Tandem-MS Experimente mittels FTMS vielfältig.

Bei Tandem-MS Experimenten geht der Fragmentierung einer spezifischen Ionenspezies zunächst ihre Isolation voraus. Dies geschieht meist über eine SWIFT-Anregung, bei der das zu untersuchende Ion (*parent ion*) nicht angeregt wird und somit in der Zelle verbleibt und weiterhin achsennah in der Zelle oszilliert.

Zur Fragmentierung können mehrere Methoden eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde überwiegend die sogenannte collision induced dissociation (CID) angewandt. Dabei wird ein Stoßgas in die ICR-Zelle eingelassen. Durch die Kollision mit den Gasmolekülen wird das parent ion fragmentiert, in dem die ihm zugeführte Energie die labilsten Bindungen brechen lässt. Um sicherzustellen, dass die Ionen die nötige kinetische Energie haben, um bei einer Kollision auch tatsächlich zu fragmentieren, müssen sie zuvor angeregt werden. Dazu wird die Methode der sustained off resonance irradiation (SORI) – Anregung ¹⁸⁶ verwendet. Hierbei werden die Ionen nicht exakt mit ihrer Resonanzfrequenz angeregt. Somit vergrößert sich der Zyklotronradius der Ionen nicht stetig mit der Dauer der Anregung, sondern schwankt periodisch. Dadurch können die Ionen nicht an der Zellenwand entladen werden und gehen nicht verloren. Da sich die neutralen Gasmoleküle gleichmäßig in der Zelle verteilen, ist die Wahrscheinlichkeit einer Kollision mit den Analyten sehr hoch und macht CID zu einer zuverlässigen und relativ einfach reproduzierbaren Methode. Nach jedem Messzyklus muss allerdings das Stoßgas aus der Zelle abgepumpt werden, um das Hochvakuum aufrecht zu erhalten.

Als weitere Fragmentierungsmethode kann die *infrared multiphoton dissociation* (IRMPD) angewandt werden. Bei IRMPD wird den Ionen mittels eines axial applizierten Laserstrahls Energie zugeführt, die die Ionen fragmentieren lässt. Auch hier brechen die labilsten Bindungen des Moleküls. Dabei ist es teilweise schwierig, die Ionen zu treffen, da sie aufgrund ihrer Bewegungen den axial applizierten Laserstrahl nicht immer kreuzen. Die Methode arbeitet im Gegensatz zu CID ohne eine Beeinflussung des Vakuums in der Zelle. Eine weitere Fragmentierungsmethode ist die *electron capture dissociation* (ECD), auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

49

METHODEN

Eine unspezifische Fragmentierungsmethode, die daher nicht zu den Tandem-MS Methoden gezählt wird, ist die sogenannte *capillary skimmer dissociation* (CSD), die in der ESI-Quelle erfolgt. Durch den in der Quelle herrschenden Druck ist die Wahrscheinlichkeit einer Kollision der Ionen mit Restgasmolekülen hoch. Durch die Erhöhung der Spannungen am Kapillarausgang (in dieser Arbeit *capexit*-Spannungen genannt) erfahren die Ionen eine Beschleunigung und besitzen somit eine erhöhte kinetische Energie. Daher können die Ionen im Falle einer Kollision fragmentiert werden. Dieser Vorgang läuft unspezifisch vor dem Eintritt der Teilchen in die Zelle ab. In einigen Fällen reicht jedoch dieses wenig aufwändige und sehr schnell durchgeführte Experiment aus, um die gewünschten Informationen zu erhalten. Es ist außerdem teilweise möglich, durch diese Spannungserhöhungen Verunreinigungen der Probe teilweise zu unterdrücken und somit die Nachweisgrenzen zu erhöhen oder die Ionisation der Probenmoleküle zu beeinflussen.

2.1.6. LC-MS Kopplung

Die Verwendung eines Massenspektrometers als Detektor für chromatographische Trennläufe hat mehrere Vorteile. Zum einen kann anhand der Masse des Eluenten dieser direkt identifiziert werden, ohne weitere Analysen durchführen zu müssen. Eventuelle Schwankungen in den Retentionszeiten stören die Zuordnung der Substanzen nicht. Zum anderen können nicht vollständig getrennte Substanzen durch das Massenspektrum identifiziert und die Intensitäten zugeordnet werden. Dies kann z.B. bei sehr heterogenen Mischungen und konventionellen Detektoren ein Problem darstellen.

Für eine direkte Kopplung der HPLC an ein Massenspektrometer (auch online-Kopplung genannt) eignet sich besonders eine ESI-Ionenquelle, da hier die Analyte in Lösung mit einer konstanten Flussrate eingebracht werden und die Quelle unter Atmosphärendruck betrieben wird. Bei der Auswahl der mobilen Phase muss bei einer Kopplung an ESI-Quellen besonders darauf geachtet werden, dass alle Bestandteile flüchtig sind und hohe Salzkonzentrationen der mobilen Phase vermieden werden, damit die Vorgänge in der ESI-Quelle nicht gestört werden und keine starke Adduktionenbildung auftritt. Außerdem müssen die Flussraten der HPLC an die ESI-Flussgeschwindigkeiten (einige µL/min) angepasst werden, da sonst das Hochvakuum des Massenspektrometers gefährdet und die Effizienz der Ionisation gestört würde. Die Auftrennung muß daher an speziellen Mikrofluss- oder Nanofluss-HPLC-Systemen erfolgen oder das Standardsystem mittels eines Fluss-Splitters und dem Einbau von Kapillaren kleineren Durchmessers und den entsprechenden Säulengrößen entsprechend angepasst werden. Solche Systeme sowie die direkte Kopplung an das MS stellen besondere Anforderungen an die Vermeidung von Totvolumina im System oder die Reinheit der verwendeten Lösungsmittel. In dieser Arbeit wurde das vorhandene Standardfluss-System zu einem Mikrofluss-System umgebaut. Eine Umstellung auf ein Nanofluss-System zur weiteren Verbesserung der Auftrennung war instrumentell nicht durchführbar.

2.1.7. Auswertung der Spektren zur Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen

Zur Auswertung der großen Datenmengen wurde eine Software als Excel Add-In entwickelt, da kommerzielle Datenbanken zur Lipidanalytik bisher nicht verfügbar sind. Anhand dieser wurden die einzelnen Lipidspezies identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte anhand der Peakintensitäten und der Mittelung über die Elutionszeit der entsprechenden Lipidspezies. Es wurde mit einem bei jedem LC-MS Lauf hinzugegebenen internen Standard gearbeitet, der als Referenz diente. Durch die in den Kapiteln 2.2.2.8 und 3.6 detailliert beschriebene Auswertung war es so möglich, die vielen Lipidspezies zuzuordnen und die LC-MS-Daten zu quantifizieren, um den Lipidgehalt der untersuchten Proben zu vergleichen.

2.2. Materialien und Versuchsdurchführungen

2.2.1. Verwendete Materialien

Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Merck KG, Darmstadt und LGC Protochem, Wesel, in den für LC-MS geeigneten Reinheitsgraden bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Eigenleitfähigkeit 0,055 µS/cm). Zum Ansetzen der Standardlösungen und der zellulären Lipidextrakte

wurden ausschließlich Probenfläschen aus Glas mit Teflonschraubdeckeln verwendet (Neolab, Chromacol), um eine Kontamination mit Weichmachern auszuschließen. Zur Aufnahme der organischen Lösungen wurden Hamilton-Spritzen verwendet (Hamilton, Bonaduz, Schweiz).

Alle Zellkulturmedien, fötales Kälberserum und Puffer sowie sonstige Zusatzlösungen für die Zellkultur wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Biochrom KG, Berlin bezogen. Die für die Zellkultur verwendeten Plastikartikel stammten von der Firma Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden.

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen.

Weitere verwendete Materialien sind direkt bei der Beschreibung der entsprechenden Methoden aufgelistet.

2.2.2. Versuchsdurchführungen

2.2.2.1. Zellkultur

Anzucht

Die Versuche wurden an leicht anziehbaren und somit leicht verfügbaren kultivierbaren Zelllinien durchgeführt.

Für die Etablierung der Methode wurde die humane embryonale Epithelzelllinie HEK293 (American Type Culture Collection CRL-1573) verwendet. Die adhärenten Zellen wurden in Zellkulturflaschen unter sterilen Bedingungen in einem Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂ in *Dulbecco's modified eagle* - Medium mit fötalem Kälberserum 10% (v/v), Glutamin 2 mM, Streptomycin 100 µg/mL und Penicillin 100 U/mL angezogen. Die Subkultivierung erfolgte je nach Konfluenz der Zellen etwa alle zwei bis drei Tage. Dabei wurden diese mittels Trypsin von den Kulturflaschenwänden abgelöst, in PBS gewaschen, sedimentiert und in frischem Medium in den gewünschten Verdünnungen neu angesetzt. Die für die Stimulationsversuche verwendeten stabil TLR4/MD2-transfizierten HEK-293 Zellen wurden unter gleichen Bedingungen, jedoch mit einem Zusatz von 400 µg/mL

Zählkammer (Kleinstquadrate 0,0025 mm², Tiefe 0,1 mm; Neubauer, Hofheim) durchgeführt.

Medium HEK-293:	DMEM, Dulbecco's modified eagle medium, ohne Glucose; (Biochrom
	AG, Berlin), 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS; Linaris, Bettingen am
	Main) 2 mM Glutamin, 100 µg/mL Streptomycin, 100 U/mL Penicillin
Medium HEK293-	
TLR4/MD2:	DMEM mit 10% (v/v) FCS, 2 mM Glutamin, 100 µg/mL Streptomycin,
	100 U/mL Penicillin und 400 μg/mL Geneticin (Gibco BRL, Eggenstein).
PBS:	<i>phosphate buffered saline,</i> ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
<u>Trypsinlösung:</u>	Trypsin 10% (v/v) in PBS

Zellstimulation

Die Stimulationen durch LPS wurden an den MD2/TLR4-transfizierten HEK-293durchgeführt, da native HEK-293 Zellen aufgrund Zellen des fehlenden Rezeptorkomplexes keine LPS-Responsibilität aufweisen. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. A. Schromm zur Verfügung gestellt. Die Transfektion erfolgte mit Transfektionsvektoren für humanes TLR4 und MD2 (Prof. Douglas University of Massachusettes, USA) und wurden mittels des Golenbock, Transfektionsreagenz Polyfect (Quiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die transfizierten Zellen wurden nach einer Selektion mit 400 µg/mL Geneticin (Gibco BRL, Eggenstein) subkloniert. Die Expression der gewünschten Proteine wurde durchflußcytometrisch analysiert und die Responsivität der Klone auf die Stimuli Lipopolysaccharid (LPS) und Interleukin-1 (R&D Systems, Wiesbaden) anhand der Ausschüttung von Interleukin-8 überprüft (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ¹⁸⁷. Zur Stimulation der Zellen wurde das S-Form LPS (Wildtyp) aus Bakterien der Spezies *Escherichia coli*, Stamm K235, verwendet ¹⁸⁸. Dieses wurde in der Laborgruppe Biophysik am Forschungszentrum Borstel nach der Phenol-Wasser Methode extrahiert. Die Qualität der LPS-Präparation wurde massenspektrometrisch überprüft und das LPS zur Lagerung lyophilisiert. Zur Zellstimulation wurden die Zellen 30 min mit einer LPS-Lösung (100 ng/mL in Medium) inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen.

2.2.2.2. Isolation der Membranmikrodomänen

Isolation Detergens-resistenter Membranen (DRM)

Die Isolation der Membranmikrodomänen als DRM erfolgte nach Brown und Rose ⁵¹, adaptiert nach Su et al. ¹⁸⁹. Dabei wurden die Zellmembranen mit einem das Detergens Triton X-100 (TX-100) enthaltenden Puffer bei 4°C inkubiert und das detergens-resistente Material von den solubilisierten Membranbereichen in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten separiert.

Hierzu wurden jeweils 1x10⁶ Zellen in 750 µL Zelllysepuffer aufgenommen und auf Eis mittels Ultraschall aufgeschlossen (Cell Disrupter B15; Branson, Danbury, USA; Mikrospitze Ø 3 mm, 8 s, gepulster Modus, Duty circle 35%, Stufe 5). Die Zelltrümmer wurden bei 400 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech, Osterode). Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und bei 150000 x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert (TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TLS-55; Beckmann, Krefeld). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde als cytosolische Probe aufbewahrt. Das Sediment wurde in 100 µL TX-100 Puffer (je nach Versuch 1oder 0,1-prozentig (v/v)) aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde erneut resuspendiert. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde die Suspension mit 100 µL 85-prozentiger Saccharoselösung gemischt. Anschließend erfolgte eine Überschichtung mit 800 µL 30-prozentiger und 200 µL 5-Nach der nun folgenden Ultrazentrifugation prozentiger Saccharoselösung. (200000 x g, 19 h, 4°C) wurden Fraktionen von 150 µL Volumen vorsichtig mittels einer Pipette von oben abgenommen. Dabei waren die Membrandomänen zum Teil als Schleier im oberen Drittel des Gradienten sichtbar. Die Methode ist schematisch in Abbildung 2.5 dargestellt. Bis zu einer weiteren Analyse wurden die Fraktionen bei -20°C gelagert.

Die Isolation mittels einer 1-prozentigen TX-100-Lösung wird in dieser Arbeit als Isolationsmethode 1 bezeichnet, die Isolation mittels einer 0,1-prozentigen TX-100-Lösung als Isolationsmethode 2.



Abbildung 2.5: Schema der DRM-Isolation. Die Membranmikrodomänen werden als Detergens-resistente Membranen (DRM) mittels nicht-ionischer Detergentien (in diesem Fall Triton X-100) bei einer Temperatur von 4°C aus dem Membranverband gelöst. In einer nachfolgenden Dichtegradientenzentrifugation sammelt sich das detergens-resistente Material im Bereich geringer Dichte im Gradienten an.

Zelllysepuffer:	42 mM KCl; 10 mM HEPES, pH 7,4; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM Vanadat,
	Complete Mini Proteaseinhibitoren (Roche, Grenzach-Wyhlen) frisch
	vor Verwendung hinzu
<u>TNE</u> :	10 mM <u>T</u> ris, pH 7,5; 150 mM <u>N</u> aCl, 5 mM <u>E</u> DTA
<u>TX-100-Puffer</u> :	je nach Ansatz 1% (v/v) bzw. 0,1% (v/v) Triton X-100 in TNE
Saccharose-	
Lösungen:	85%, 30% und 5% (w/v) Saccharose in TNE

Detergensfreie Isolation der Membranmikrodomänen

Isolation der Membranmikrodomänen nach Song

Bei der detergensfreien Isolation der Domänen nach Song et al. werden die Membranmikrodomänen mittels Natriumcarbonat (Na_2CO_3) aus den Zellmembranverbänden gelöst und anschließend über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt ¹⁰². Es wurden hierzu jeweils 1x10⁶ Zellen in 750 µL Na₂CO₃-Puffer, pH 11, aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels eines Dounce-Homogenisators (Pistill B; Kontes, Vineland, USA) und einer anschließenden Ultraschallbehandlung für 3x20 s auf Eis (zwischen den Zyklen je 1 min auf Eis gekühlt; Cell Disrupter B15; Branson, Danbury, USA; gepulster Modus,

Duty Cycle 35%, Mikrospitze Ø 3 mm, Stufe 5). Es erfolgte eine erste Ultrazentrifugation bei 4°C (150000 x g für 30 min, TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TLS-55; Beckmann, Krefeld). Der Überstand wurde bis auf 100 μ L abgenommen und das entstandene Sediment mit 100 μ L 85-prozentiger Saccharoselösung resuspendiert. Die entstandende Lösung wurde mit 800 μ L 35-prozentiger und 200 μ L 5-prozentiger Saccharoselösung überschichtet. Der Gradient wurde bei 200000 x g für 19 h bei 4°C zentrifugiert (TL-100 Ultrazentrifuge, Rotor TLS-55; Beckmann, Krefeld) und anschließend in einzelnen Fraktionen von 150 μ L mittels einer Pipette von oben abgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Methode nach Song wird in dieser Arbeit als Isolationsmethode 3 bezeichnet.

Zelllysepuffer:500 mM Na2CO3, 1 mM EDTA in Wasser, pH 11.0Saccharose-lösungen:85%, 30% und 5% (w/v) Saccharose in TNE, 250mM Na2CO3

Isolation der Membranmikrodomänen nach Smart

Zur Vermeidung der Verwendung eines Detergens wurden die Membranmikrodomänen nach der von Smart et al. beschriebener Methode aus den Zellmembranen isoliert ¹⁰¹. Die Abtrennung der rigiden von den fluiden Membranbereichen geschieht ausschließlich durch die Anwendung mechanischer Energie. Die Separation der so theoretisch erhaltenden, rigiden Domänen erfolgt wie auch bei den detergensbasierten Methoden über eine Aufschwemmung des Materials im Dichtegradienten. Die Methode ist schematisch in Abbildung 2.6 dargestellt. Dabei wurden pro Ansatz 4x10⁶ Zellen zweimal in Puffer A gewaschen und schließlich in 3 mL Puffer A aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mit einem Dounce Homogenisator (2 mL Volumen, Pistill B; Kontes, Vineland, USA). Die Effizienz des Aufbruchs der Zellen wurde anhand der Anfärbung mit Trypanblau mikroskopisch kontrolliert, da bei einem erfolgten Zellaufschluss das Trypanblau in die Zellen eindringt und enthaltende Proteine blau anfärbt. Intakte Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf. Der Zellaufschluss wurde 10 min bei 1000 x g zentrifugiert (Biofuge 17RS; Heraeus Sepatech, Osterode). Der verbleibende postnukleäre Überstand (PNS) wurde auf eine 30-prozentige Percollösung geschichtet (jeweils 2 mL PNS auf 8 mL

Percollösung) und bei 84000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert (L7-55 Ultrazentrifuge, Rotor SW-28; Beckmann, Krefeld). Die Membranfraktion, etwa in der Mitte des Röhrchens sichtbar, wurde abgenommen und durch Zugabe von Puffer A auf ein Volumen von 2 mL gebracht. Die Suspension wurde auf Eis 3x beschallt (kontinuierlicher Modus, je 2x6 sec; zwischen den Beschallungen 2 min Pause auf Eis; Cell Disrupter B15; Branson, Danbury, USA; Mikrospitze Ø 3 mm, Stufe 1,5). Anschließend wurde diese mit 1,84 mL Puffer C und 0,16 mL Puffer A gemischt und mit je 5 mL des Dichtegradientenmediums Optiprep in den Konzentrationen 20%, 15% und 10% (v/v) überschichtet. Der Gradient wurde 90 min bei 52000 x g zentrifugiert (L7-55 Ultrazentrifuge, Rotor SW-28; Beckmann, Krefeld). Die oberen 5 mL wurden abgenommen, mit 4 mL Puffer C gemischt und mit 1 mL 15% Optiprep und 1 mL 5% Optiprep überschichtet. Es erfolgte eine weitere Ultrazentrifugation bei 52000 x g für 90 min bei 4°C (L7-55 Ultrazentrifuge, Rotor SW-28; Beckmann, Krefeld). Die Membranmikrodomänen sollen sich dabei etwas oberhalb der Grenze der 15- zur 5-prozentigen Optipreplösung sammeln. Die Fraktionen wurden in einem Volumen von je 600 µL mittels einer Pipette vorsichtig von oben abgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Methode nach Smart wird in dieser Arbeit als Isolationsmethode 4 bezeichnet.

<u>Puffer A</u> :	250 mM	Saccharose,	1 mM	EDTA,	20 mM	Tris,	pH 7.8,
	Proteaseh	emmer Comple	te Mini (F	Roche, Gre	enzach-Wy	hlen)	
<u>Puffer B</u> :	250 mM S	250 mM Saccharose, 6 mM EDTA, 120 mM Tris pH 7,8					
<u>Puffer C</u> :	Optiprep (Optiprep (Axis Shield PoC AS, Oslo) 50% in Puffer B					
Percollösung:	Percoll, 30	Percoll, 30% (v/v) in Puffer A					
Optiprep:	Optiprep 2	Optiprep 20%, 15%, 10% (v/v) in Puffer B					



Abbildung 2.6: Detergensfreie Membrandomänenisolation nach Smart. Die detergensfreie Isolationsmethode nach Smart isoliert die rigiden Membranbereiche durch die Anwendung von mechanischer Energie. Dabei sollen diese intakt bleiben, während die fluiden Bereiche zerstört werden. Die Abtrennung der Domänen von den restlichen Membranbestandteilen erfolgt in mehreren Zentrifugationsschritten. Die Membranmikrodomänen sammeln sich in den Bereichen geringer Dichte nach dem letzten Zentrifugationsschritt.

2.2.2.3. Charakterisierung der Domänenaufreinigungen

Die mittels der verschiedenen Isolationsmethoden erhaltenden Dichtegradientfraktionen wurden auf das Vorhandensein der Markermoleküle GM1, Flotillin-2 und exemplarisch auf Caveolin-1 untersucht. Diese Markermoleküle werden als in Membranmikrodomänen angereichert beschrieben (siehe Kapitel 1.2.3). Zur Erkennung des Gangliosids GM1 wurde nach dem Aufbringen eines Aliquots der Dichtegradientenfraktionen auf eine Nitrocellusemembran die ß-Untereinheit des Cholera-Toxins verwendet ¹⁰³. Dieses war direkt mit einer Peroxidase konjugiert und läßt sich so bei der Bereitstellung des entsprechenden Substrates detektieren. Flotillin-2 wurde über einen monoklonalen Antikörper im Western-Blot detektiert. Zusätzlich wurden der Gesamtproteingehalt nach Bradford und der Cholesterolgehalt mittels eines Cholesterolassay-Kits der Fraktionen getestet. Im Folgenden werden die verschiedenen Schritte der angewandten Nachweisverfahren dargestellt.

1D Gelelektrophorese der Proben

SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden Aliquots von jeweils 8 μ L der abgenommenen Dichtegradientfraktionen mit 2 μ L SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min in siedendem Wasser gekocht, um die Proteine zu denaturieren. Die Proben wurden anschließend auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Sammelgel 5% (w/v) Acrylamid, Trenngel 12% (w/v) Acrylamid) und im Elektrophoresesystem (Mini-Protean III; Bio-Rad, München) aufgetrennt. Dabei wurden üblicherweise Spannungen von 100 V für 30 min bis zum Übertritt der Proben in das Trenngel und anschließend 200 V für 1 h zur Auftrennung der Proben angelegt. Als Größenmarker dienten jeweils 0,5 μ L MagicMark (Invitrogen, Karlsruhe).

10% (w/v) SDS; 10% (v/v) Glycerol; 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 50 mM		
DTT; 0,01% (v/v) Bromphenolblau in Aqua dest.		
0,3% (w/v) Tris; 14,5% (w/v) Glycin; 0,1% (w/v) SDS, pH 8,8		
Aqua bidest. 4,1 mL; Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8) 2,5 mL;		
Bisacrylamid 3 mL; 10% SDS 100 μL ; TEMED 5 μL , 10% APS 50 μL		
Aqua bidest. 6,15 mL; Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8) 2,5 mL;		
Bisacrylamid 1,25 mL; 10% SDS 100 $\mu L;$ TEMED 10 $\mu L;$ 10% APS		
50 μL		

2D Gelelektrophorese der Proben

Die Auftrennung der Proteine in der 2D-Gelelektrophorese erfolgt in der ersten Dimension nach deren isoelektrischen Punkten und in der zweiten Dimension nach ihren Molekulargewichten ¹⁹⁰. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das ZOOM IPG Runner System (Invitrogen, Karlruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Probe diente das gesamte Volumen einer DRM-Fraktion (150 µL). Die Probe wurde zur Abtrennung der in der Probe enthaltenden Salze dialysiert (Micro DispoDialyzer, Massenausschlussgrenze 500 u; Harvard Apparatus, Holliston, USA) und mittels einer Acetonfällung präzipitiert. Hierzu wurde 1 mL Aceton zu der Probe gegeben und der Ansatz über Nacht bei -20°C gelagert. Die gefällten Proteine wurden anschließend bei 14000 x g für 10 min sedimentiert (Zentrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Sediment getrocknet. Die Probe wurde nun in 140 µL Rehydrierungspuffer ¹⁹¹ aufgenommen und in die Probentaschen der ZOOM-Kassette überführt. Zur isoelektrischen Fokussierung dienten ZOOM-Strips, pH 3-10. Dabei wurden zur Auftrennung Spannungen von 200 V für 15 min, 450 V für 15 min, 750 V für 15 min und 2000 V für 75 min angelegt. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgte in NuPAGE Novex Bis-Tris ZOOM-Gelen ebenfalls nach Anweisung des Herstellers. Als Proteinmarker diente 5 µL MultiMark (Invitrogen, Karlsruhe)

<u>Rehydrierungspuffer</u>: 8M Urea, 1% CHAPS, 1% ABS-14, 0,5% AB-40, 20 mM DTT, 0,5% Ampholyte (ZOOM Carrier Ampholyte, pH 3-7; Invitrogen, Karlsruhe)

Anfärbung der Proteine

Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele nach Fertigstellung der Elektrophorese einer Roti-Blue Färbung unterzogen. Roti-Blue (Carl Roth, Karlsruhe) ist eine auf Coomassie-Brilliant-Blau G250 basierende Färbelösung mit kolloidalen Eigenschaften und färbt Proteine in Gelmatrizes sehr effizient mit einer absoluten Nachweisgrenze von etwa 30 ng. Die Färbung und die anschließenden Waschschritte wurden ohne Vorinkubation laut Herstellerangabe durchgeführt. Die angefärbten Banden wurden aus dem Gel herausgeschnitten und direkt für einen tryptischen

Verdau der Proteine im Gel zur nachfolgenden massenspektrometrischen Analyse verwendet.

Peptide Mass Fingerprinting

Das *peptide mass fingerprinting* (PMF) ist eine Technik zur Identifizierung unbekannter Proteine einer Probe. Dabei werden die Proteine mittels enzymatischer Reaktionen fragmentiert und die erhaltenden Peptide massenspektrometrisch analysiert ¹⁹². Durch den Abgleich der erhaltenden Ergebnisse mit Datenbanken können die in der Probe enthaltenden Proteine identifiziert werden. Voraussetzung hierfür ist die Erfassung der Proteine in den verwendeten Datenbanken.

Tryptischer Verdau der Proben

Die Proteinbanden und -spots wurden nach einer Auftrennung über die Gelelektrophorese aus dem Gel geschnitten und tryptisch verdaut. Dabei spaltet Trypsin die Amidbindungen der C-terminalen Seite der Aminosäuren Lysin und Arginin. Hierzu wurden die Gelstücke zunächst in Waschlösung gewaschen und anschließend mit Acetonitril bedeckt, bis sie eingeschrumpft waren. Die Stücke wurden nun vollständig getrocknet und in Waschlösung rehydriert. Diese Prozedur wurde bis zur vollständigen Entfernung des Coomassie-Farbstoffes wiederholt. Die Gelpartikel wurden nun in Reduktionslösung 45 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch Alkylierungslösung ersetzt und die Probe für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Stücke wurden anschließend erneut in Waschlösung gewaschen. Die gewaschenen Proben wurden getrocknet und über Nacht bei 37°C in Trypsinlösung verdaut. Anschließend wurden die Gelstücke zunächst mit 25 mM Ammoniumbicarbonat bedeckt, dann das gleiche Volumen Acetonitril hinzugegeben und 10 min beschallt (Ultraschallbad TK 52; Bandelin Sonorex. Berlin). Der Überstand wurde abgenommen, die Gele mit der Extraktionslösung bedeckt und weitere 15 min beschallt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Alle Überstände wurden vereinigt und im Vakuumkonzentrator (Speedvac 111V; Thermo Scientific, Waltham, USA) getrocknet. Anschließend wurden die extrahierten Peptide in 0,1% Trifluoressigsäure aufgenommen, mittels Zip-Tips (C18 Packungsmaterial; Millipore, Schwalbach) gereinigt und für die MALDI-TOF Analyse vorbereitet.

Waschlösung:	100 mM Ammoniumbicarbonat $\rm NH_4CO_3$ in Wasser / Acetonitril 1:1
<u>Reduktionslösung:</u>	10 mM Dithiothreitol, 100 mM NH ₄ CO ₃ in Wasser
<u>Alkylierungslösung:</u>	55 mM lodacetamid, 100 mM NH_4CO_3 in Wasser
<u>Trypsinlösung:</u>	50 mM NH ₄ CO ₃ in Wasser + 12,5 ng/ μ L Trypsin
Extraktionslösung:	1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in 30% Acetonitril

MALDI-TOF MS Messungen und Identifikation der Proteine

Die Messungen der Proteinfragmente wurden an einem MALDI-TOF MS Reflex II der Firma Bruker Daltonics, Bremen, durchgeführt. Die Proben wurden im positiven Die Ionisation erfolgte mit einem Stickstoff-Laser Ionenmodus gemessen. $(\lambda = 337 \text{ nm})$ bei einer Beschleunigungsspannung von – 20 kV. Als Matrix diente α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CCA), die in TA (TFA 0,1% / Acetonitril 2:1) angesetzt wurde. Die Präparation erfolgte mittels der *dried-droplet* Methode. Die Kalibrierung des Gerätes wurde zuvor mit einem Proteinmix aus Angiotensin II, Insulin, Cytochrom C und BSA durchgeführt. Aus den mittels der Software ACQ 4.04 (Bruker Daltonics, Bremen) aufgenommenen Spektren wurden mit Hilfe der Software Biotools (Bruker, Daltonics, Bremen) eine Liste der monoisotopischen Massen der tryptischen Fragmente erstellt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte über den Abgleich der detektierten Fragmente mit der NCBI-Datenbank durch die Matrixscience Mascot Software (www.mascotscience.com). Der sogenannte "MOWSE score", der für jedes identifizierte Protein berechnet wird, gibt die Wahrscheinlichkeit der richtigen Identifizierung an.

Western- und Dot-Blot Analysen

Western-Blot

Zur Detektion spezifischer Proteine erfolgte zunächst die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia

Biotech; Buckinghamshire)¹⁹³. Der Blot wurde im Blotsystem Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad) bei 100 V für 1 h durchgeführt. Die nicht besetzten Bindungsstellen wurden mit Milchpulverlösung abgesättigt (1 h, 4°C). Es folgten drei Waschschritte für jeweils 15 min in Tween-TBS bei Raumtemperatur (RT). Um die nach dem Transfer auf der Membran befindlichen Moleküle zu detektieren, wurde diese zunächst mit dem entsprechenden primären Antikörper (AK) inkubiert. Die Konzentration der jeweiligen Antikörperlösungen sowie die Dauer der Inkubationen wurden individuell für die jeweiligen Antikörper angepaßt (siehe unten). Nach Ablauf der Inkubationszeit und drei erneuten Waschschritten in Tween-TBS wurde der Blot mit einem peroxidasemarkierten, sekundären Antikörper behandelt und erneut gewaschen. Die Chemilumineszenzdetektion wurde mit Hilfe des ECL-Plus Reagenz (Amersham Pharmacia Biotech) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Entwicklung der belichteten Filme (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech. Buckinghamshire) erfolgte mittels der Entwicklermaschine Curix 242S (Agfa-Gevaert, Köln). Als Kontrollen dienten jeweils 10 µg eines A431-Zelllysates, EGF stimuliert (Upstate, Lake Placid, USA) und eine bereits auf Markermoleküle positiv getestete Domänenaufreinigung.

Blotpuffer:0,3% (w/v) Tris; 1,44% (v/v) Glycin; 20% (v/v) MethanolTween-TBS:0,24% Tris; 0,8% NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,0Blockierungslösung:Magermilchpulver ("Glücksklee") 5% (w/v) in Tween-TBSEGF-stimuliertesEgF-stimuliertesA431-Zelllysat:Epitheliale, humane Karzinom-Zelllinie (Rockland, Gilberstville, USA)

Verwendete Primärantikörper:

Anti-Flotillin-2 (B-6; Santa Cruz, Heidelberg), monoklonaler AK aus der Maus, Verwendung in der Verdünnung 1:500 in T-TBS, 5% Magermilchpulver (w/v), Inkubation 1 h bei 4°C.

Anti-Caveolin-1 (BD Biosciences, Heidelberg), monoklonaler AK aus der Maus, Verwendung in der Verdünnung 1:2500 in T-TBS, 5% Magermilchpulver, Inkubation 1h bei 4°C.

Verwendeter Sekundärantikörper:

Chicken-anti-mouse (Sigma–Aldrich, Taufkirchen), *horse radish peroxidase*-konjugiert, Verwendung in der Verdünnung 1:7000 in T-TBS, 5% Magermilchpulver (w/v), Inkubation 1 h bei RT.

Dot-Blot

Zur Erfassung der Anreicherung des Gangliosids GM1 in den Fraktionen wurden Dot-Blots durchgeführt. Dabei wurde je 1 µL jeder Fraktion ohne eine weitere Vorbehandlung direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht und trocknen gelassen. Die Blockierung der freien Bindungsstellen der Membran, die Waschschritte und die Detektion erfolgten wie oben für den Western-Blot beschrieben. Durch die Verwendung der direkt *horseradish-peroxidase* (hrp)-konjugierten ß-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB), das an das GM1 bindet ¹⁰³, war ein zweiter Inkubationsschritt mit einem sekundären Antikörper jedoch nicht notwendig. Als Kontrolle wurden jeweils 100 pg (66 fmol) synthetisches GM1 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) auf die Membran aufgebracht.

Cholera Toxin,

<u>B-Untereinheit</u>: (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), direkt hrp-konjugiert, Verwendung in der Verdünnung 1:4600 in PBS, 3% BSA (w/v), Inkubation 1 h bei RT.

Gesamtproteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung der Dichtegradientfraktionen erfolgte nach Bradford ¹⁶³. Hierzu wurden 10 μ L Probe mit 800 μ L Wasser gemischt und mit 200 μ L Bradford-Reagenz versetzt. Parallel wurde eine Standardreihe mit Proteinkonzentrationen von 1, 2, 4 und 8 μ g/mL BSA (Merck KG, Darmstadt) erstellt. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen (Spektrometer Uvikon 942; Kontron, Eching). Der Proteingehalt der Proben wurde über die ermittelte Kalibrierungsgerade der Proteinstandardreihe berechnet.

CholesteroInachweis

Die Cholesterolbestimmung wurde fluorometrisch mit Hilfe des Amplex Red Cholesterol Assay Kits (Molecular Probes, Eugene, USA) laut Herstellerangabe durchgeführt. Dabei wird Cholesterol durch die zugegebenen Cholesterol-Oxidase oxidiert, was zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Die hinzugegebene *horse radish* – Peroxidase (hrp) reagiert mit dem ebenfalls zugegebenen Farbstoff Amplex Red und dem gebildeten Wasserstoffperoxid zum sogeannnten Resorufin. Dieses kann bei einer Wellenlänge von 590 nm photometrisch nachgewiesen werden ¹⁶⁵. Der Versuch wurde in 96-*well* Platten durchgeführt. Je Dichtegradientfraktion wurden 50 µL Probe eingesetzt. Die Messungen erfolgten an einem Mikroplattenlesegerät (Rainbow; Tecan, Crailsheim).

2.2.2.4. Lipidextraktion

Die Lipidextraktionen aus den wässrigen Dichtegradientfraktionen und aus den angezogenen Zellen erfolgten mittels einer Zweiphasenextraktion mit Chloroform / Methanol nach der Methode von Bligh und Dyer¹⁶⁷. Hierzu wurden zunächst 0,8 Volumenanteile der zu extrahierenden Probe mit 2 Teilen Methanol und 1 Teil Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde im Ultraschallbad (Ultraschallbad TK 52; Bandelin Sonorex, Berlin) 10 min beschallt und anschließend 25 min unter mehrmaligem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 Teil Wasser und 1 Teil Chloroform. Um eine optimale Phasentrennung zu erreichen, wurde der Ansatz bei 400 x g für 5 min zentrifugiert (UJ3, Heraeus Christ, Osterode). Die untere organische Phase wurde mittels einer Hamilton-Spritze abgenommen. Die obere wäßrige Phase wurde zweimal durch eine erneute Zugabe Teil Chloroform, Inkubation sowie Zentrifugation gewaschen. von 1 Die zusammengeführten organischen Phasen wurden im Vakuumkonzentrator vollständig getrocknet (Speedvac 111V; Thermo Scientific, Waltham, USA) und im für die weitere Anwendung verwendeten Lösungsmittel aufgenommen.

2.2.2.5. Abtrennung des Triton X-100 von den isolierten DRM

Entfernung des Detergens durch spezifische Adsorbentien

Zum Versuch, das TX-100 aus den Lipidextrakten zu entfernen, wurde das Adsorptionsharz Calbiosorb Adsorbent (Calbiochem, San Diego, USA) laut Herstellerangabe verwendet. Es handelt sich dabei um hydrophobe Kügelchen, an die die Detergensmoleküle adhärieren sollen. Das Adsorbent wurde vor einer Lipidextraktion im wässrigen Medium auf die Proben appliziert.

Dünnschichtchromatographie

Zur Separierung der isolierten Lipide wurden unmodifizierte Kieselgelplatten F₂₅₄, Plattenmaße (Kieselgel 60 Korngröße 10-12 µm, 20 x 20 cm, Merck KG, Darmstadt) als stationäre Phase und Chloroform/Methanol/ Essigsäure/Wasser 85/59/1/4 (v/v/v) als mobile Phase verwendet. Die Proben wurden in einem Volumen von 10 µL Lösungsmittel mit Hilfe einer Hamilton-Spritze an markierten Startpunkten auf die Platte aufgetragen. Der Lauf erfolgte in einer lösungsmittelgesättigten Kammer bei Raumtemperatur. Nach dem Lauf wurden die Platten getrocknet und die aufgetrennten Lipide mittels einer Primulinlösung (0,1 mg/mL in Methanol) detektiert ¹¹⁹. Die Signale wurden unter einer UV-Lampe $(\lambda = 254 \text{ nm})$ sichtbar gemacht.

Um die Spots massenspektrometrisch zu untersuchen, wurden diese ausgekratzt und die Substanzen mittels einer fünfminütigen Inkubation mit dem Laufmittel unter Ultraschall (Ultraschallbad TK 52, Bandelin Sonorex, Berlin) aus dem Kieselgel extrahiert. Eine anschließende Zentrifugation (12000 x g, Zentrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg) trennte die Kieselgelmatrix von den nun im verwendeten Lösungsmittel befindlichen Proben.

Trennung mittels HPLC

Für die Auftrennung der Lipidproben über die HPLC wurde die stationäre Normalphase Betasil-Diol 100 (Thermo Scientific, Waltham, USA) mit einer

Partikelgröße von 5 µm verwendet. Messungen, die mittels der Lichtstreudetektion durchgeführt wurden, erfolgten an einem Gilson-HPLC System und der Software Unipoint (Gilson, Middleton, USA). Die Größe der verwendeten Säule betrug 4,6 mm für den Innendurchmesser und 250 mm in der Länge, die Standardgröße für analytische HPLC-Läufe. Die Lösungsmittel wurden vor Gebrauch durch eine 0,2 µm-RC-Membran (regenerierte Cellulose, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert und mittels Helium entgast. Es wurde ein binäres Gradientensystem mit den Lösungsmitteln A (Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 80/19/1) und В (Chloroform/ Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 60/39/1) und einer Flussrate von 1 mL/min verwendet. Der angelegte Gradient betrug 0-100% B in 30 min, 100% B für 10 min und 100-0% B in 6 min. Die Detektion erfolgte über einen Lichtstreudetektor (SEDEX 55; Sedere, Lawrenceville, USA) bei 53 °C mit Einsatz von Druckluft mit einer Flussrate von 3 L/min.

2.2.2.6. Online-Kopplung der HPLC an das ESI FT-ICR MS

Die LC-MS-Messungen wurden an einem Hewlett-Packard (jetzt Agilent, Böblingen) 1100-HPLC System und der Datenerfassungssoftware HyStar 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Die Größe der verwendeten Säule betrug 0,32 mm für den Innendurchmesser und 150 mm in der Länge. Die verwendeten mobilen Phasen A (Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 86/13/1) und B (Chloroform/ Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 50/49/1) wurden über das Entgaser-Modul der Anlage entgast. Der angelegte Gradient betrug 0-100% B in 30 min, 100% B für 10 min und 100-0% B für 6 min. Die Lösungsmittel benötigten von der Pumpe bis zum Detektor 10 min, was bei der Ermittlung der zum Elutionszeitpunkt der verschiedenen Lipidklassen herrschenden Lösungsmittelverhältnisse beachtet werden musste. Die mobilen Phasen und der angelegte Gradient wurden gegenüber den Lichtstreudetektor-Messungen modifiziert, um das System zu optimieren. Bei der direkten Kopplung des HPLC-Systems und der ESI-Quelle musste eine Kompatibilität hinsichtlich der Flussraten gewährleistet sein (siehe Kapitel 2.1.6). Dazu wurde das bestehende System für Standard-HPLC Anwendungen mit Flussraten im Bereich von einem mL Lösungsmittel pro Minute so umgebaut und optimiert, dass durch einen nach der Pumpe eingebauten Splitter die Flussraten reduziert werden konnten. Die

METHODEN

Kapillaren, Verbindungen und die Probenschleife am Injektor wurden in ihren Abmessungen entsprechend angepasst. Dadurch konnten die von der Pumpe erzielten Flussraten etwa 50-fach reduziert werden (übliche Einstellungen: 200 µL/min Pumpleistung reduziert auf 3-4 µL/min vor Eintritt in die Säule). Die Flussraten ließen sich über den Widerstand anhand der Länge und des Durchmessers des Abflussschlauches am Splitter regulieren. Die Kapillarlängen zur Säule und zum Massenspektrometer wurden so kurz wie möglich gehalten. Die hinter der Säule eingesetzte Kapillare wurde direkt mit dem ESI-Sprayer verbunden (Abb. 2.7). Die Steuerung der Anlage erfolgte über HyStar 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen).



Abbildung 2.7: Schemazeichnung der LC-MS Kopplung. Der durch die Standard-Pumpe erzeugte Lösungsmittelfluss (0,2 mL/min) der mobilen Phase wurde zunächst zu einem T-Stück geleitet, das den Fluss splittet. Die resultierenden Flussraten sind über die Länge und den inneren Durchmesser (I.D.) der ableitenden Kapillaren steuerbar. Das System wurde so eingestellt, dass Flussraten von 3-4 µL in Richtung der Säule herrschten. Die Probenschleife des Injektors wurde ebenso wie alle Leitungen in ihren Abmessungen entsprechend angepasst. Die Kapillare im Anschluss an die Säule wurde direkt mit der ESI-Sprayvorrichtung verbunden. Die Abbildung ist nicht skaliert.

Das HPLC System wurde grundsätzlich durch die Injektion der reinen mobilen Phase A auf Verunreinigungen überprüft. Die Retentionszeiten wurden regelmäßig durch Messung einer Standard-Lipidmischung auf die Reproduzierbarkeit der Daten und die Unversehrtheit des Säulenmaterials untersucht. Dies war aufgrund der verwendeten mobilen Phasen besonders wichtig, da die Lebensdauer der stationären Phase durch den Ammoniakzusatz verringert wird.

Die zu untersuchenden Proben wurden erst unmittelbar vor der Injektion in das System in der mobilen Phase A gelöst.

<u>Splitter:</u>	Acurate Pre-Column Splitter, LC Packings, Dionex, Germering
Verwendete Kapillaren:	fused-silica, innere Durchmesser 20 μm und 50 $\mu m,$ Upchurch,
	Oak Harbour, USA
Verwendete Kleinteile:	Upchurch, Oak Harbour, USA und Agilent, Böblingen
ESI-Sprayer:	ES-Nebulizer G1946; Agilent, Böblingen

2.2.2.7. Massenspektrometrische Analyse der Lipide

ESI FT-ICR Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Lipidproben erfolgte an einem Apex II FT-ICR Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics, Bremen. Das Gerät ist mit einer Apollo ESI Quelle und einem aktiv abgeschirmten 7 T Magneten ausgestattet. Ein Schema des Instrumentes ist in Abbildung 2.8 dargestellt. Für Tandem-MS Experimente stehen ein Gaseinlass für CID-Untersuchungen und ein Infrarot-Laser (25 W, λ = 10,6 µm, Strahldurchmesser 3,5 mm; Synrad, Mukilteo, USA) für IRMPD-Untersuchungen zur Verfügung.

Die Messungen wurden mit den Standardeinstellungen durchgeführt. Die in Abbildung 2.8 dargestellten Geräteparameter wurden nach der *online*-Kopplung der HPLC Anlage neu angepasst.

Zur Steuerung des Gerätes, zur Aufnahme der Spektren und zur Auswertung der Daten wurde die Datenerfassungssoftware *XMass* (Bruker Daltonics, Bremen) verwendet. Die Prozessierung und Auswertung der LC-MS Läufe erfolgte mit Hilfe des Auswertungsprogrammes *Data Analysis DA* (Bruker Daltonics, Bremen).



Abbildung 2.8: Schematischer Aufbau des Apex II ESI FT-ICR Instrumentes der Firma Bruker Daltonics. Dargestellt sind die ESI-Quelle, die Transferoptik und die ICR-Zelle mit den wichtigsten Geräteparametern, die die Ionisation sowie den Transfer und das Einfangen der gebildeten Ionen in die Zelle beeinflussen. Ebenfalls dargestellt ist der Druckgradient, der von der Ionisation unter Atmosphärendruck bis zur ICR-Zelle unter Ultrahochvakuum reicht. Abbildung modifiziert nach Bruker Daltonics, Bremen.

Die Kalibrierung des ESI FT-ICR Instruments wurde im positiven Ionenmodus anhand der Fragmentierungsspektren von Angiotensin I durchgeführt (*capexit*-Spannung 180 V). Für eine Kalibirierung im negativen Ionenmodus wurde das Re-LPS aus dem *Escherichia coli* Stamm F515 (Isolates HL72) verwendet (*capexit*-Spannung 180 V). Die Flussrate bei *offline*–ESI Messungen betrug 120 µL/min. Die Temperatur des Trockengases betrug bei *offline*-ESI Messungen 200°C, bei Nano-ESI Experimenten 80°C. Die Spektren wurden mit einer Samplingrate von 512 k aufgenommen.

Probenvorbereitung

Die Lipidstandardsubstanzen (siehe Tabelle 2.1) wurden als Stammlösung (1 mg/µL) in Cloroform/Methanol 1/1 bei -70°C in Glasgefäßchen gelagert. Die Arbeitsverdünnungen wurden jeweils kurz vor der Messung hergestellt.

Um Verluste durch Degradation und Adsorption an Gefäßwänden zu vermeiden, wurden die Lipide aus Zellextrakten erst am Tag der massenspektrometrischen

Analyse isoliert. Die Zugabe der zur Injektion in die HPLC nötigen mobilen Phase A erfolgte jeweils kurz vor der Messung. Stabilitätsmessungen an Standards wurden ebenfalls durchgeführt, um eine frühzeitige Degradation der Substanzen auszuschließen.

Messungen von Standardsubstanzen

Bei den Messungen der Lipidstandards wurden überwiegend synthetische Standardsubstanzen mit definierten Fettsäurekettenlängen verwendet. Die Messungen der Lipidproben wurden aufgrund der unterschiedlichen Ionisierungseigenschaften der verschiedenen Lipidklassen in beiden Ionenmodi durchgeführt. Dabei wurden PI, PG, PS, GM1 und Ceramid im negativen Ionenmodus, PC und Cerebroside im positiven Ionenmodus gemessen. PE wurde in beiden Ionenmodi erfasst. Eine Übersicht der verwendeten Lipidstandards ist in Tabelle 2.1 gezeigt. Es wurden jeweils drei Messungen von drei voneinander unabhängigen Einwaagen durchgeführt und gemittelt.

Die synthetischen und natürlichen Lipidstandardsubstanzen wurden von Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) bezogen.

Bezeichnung	Fettsäurerest	Neutralmasse [u]	Ionenmodus	
DOPC	18:1, 18:1	785,593	positiv	
DOPE	18:1, 18:1	743,547	positiv/negativ	
DMPS	14:0, 14:0	679,442	negativ	
DMPG	14:0, 14:0	666,447	negativ	
PI	Unterschiedlich,	38.4. 886 557	negativ	
(Rinderleber)	überwiegend brutto 38:4		nogativ	
Ceramid 18:0	18:0	565,543	negativ	
Sphingomyelin (SM)	18.1	730 599	positiv	
18:1	10.1	100,000	positiv	
Cerebroside	Unterschiedlich,	827 685	positiv/negativ	
(Schweinehirn)	überwiegend 24:0	021,000		
GM1	18:0 und 20:0	18:0: 1545,876	negativ	
(Schafshirn)	10.0 010 20.0	20:0: 1573,908		

Tabelle 2.1: Verwendete Lipidstandardsubstanzen. Angegeben sind die Neutralmassen des monoisotopischen Moleküls sowie der zur Erfassung verwendete Ionenmodus.

MS/MS-Experimente

Tandem-MS Experimente an Lipidstandards wurden mittels *offline*-ESI durchgeführt. Das entsprechende *parent ion* wurde aus den heterogenen Spektren durch eine SWIFT-Anregung isoliert und mittels IRMPD oder CID fragmentiert (siehe Kapitel 2.1.5.3). Beispiele hierzu sind in Abbildung 2.9 an Lipidstandards gezeigt.


Abbildung 2.9: MS/MS Analysen an synthetischen, definierten Lipidstandards. Beispielhaft gezeigt sind die Fragmentierung des Phospholipids DMPG durch CID und die Fragmentierung des Gangliosids GM1 durch IRMPD. Die gefundenen Fragmente stimmen mit Literaturdaten überein. Beide verwendeten Fragmentierungsmethoden CID und IRMPD liefern gute, reproduzierbare Ergebnisse. Abkürzungen: Hex = Hexose; NeuAc = *N*-Acetylneuraminsäure; P = Phosphat.

Für die Charakterisierung der zellulären Lipidextrakte wurden MS/MS-Analysen zu bestimmten Zeiten des HPLC-Laufes durchgeführt. Die Versuche dienten zur Klärung der Frage, ob sich in bestimmten Elutionsbereichen die teilweise isomeren Lipidspezies PC und PE überlappen (Abb. 2.10). Die entsprechenden Fraktionen wurden *offline* gesammelt, da eine direkte *online*-MS/MS-Analyse während eines LC-MS Laufes mit der vorhandenen Gerätekonfiguration nicht möglich war. Aufgrund der kleinen Volumina wurden die entsprechenden Fraktionen mittels Nano-ESI gemessen. Dabei wurden Nano-Nadeln mit einem inneren Durchmesser von 1 bzw. 2 µm an der Spitze verwendet (Picotip; New Objective, Woburn, USA). Die Fragmentierung erfolgte hier mittels CID. Die Fragmentierungsspektren wurden mit den in der Literatur beschriebenen ^{127,128} und anhand von Lipidstandards nachvollzogenen Fragmenten den entsprechenden Spezies zugeordnet.



Molekülspezies	Berechnete monoisotopische Masse [M+H]+ [u]	Summenformel	Relative Abweichung [ppm]	
PC 34:2	758,570	C ₄₂ H ₈₁ O ₈ NP	1,29	
PE 37:2	758,570	C ₄₂ H ₈₁ O ₈ NP	1,29	
PC 34:1	760,586	C ₄₂ H ₈₃ O ₈ NP	2,14	
PE 37:1	760,586	C ₄₂ H ₈₃ O ₈ NP	2,14	

Abbildung 2.10: Isomere Lipidspezies und dazugehörige Signale. Verschiedene PC- und PE-Spezies weisen die gleiche Summenformel auf und haben daher exakt die gleichen Massen. Im positiven ionenmodus sind die rehaltenden Signale daher nicht direkt zuzuordnen. Im Beispiel sind die berechneten monoisotopischen Massen und die Messgenauigkeit mit angegeben. Zur eindeutigen Identifizierung wurden die offline gesammelten, fraglichen Substanzen einer MS/MS-Analyse unterzogen.

2.2.2.8. Auswertung der Daten

Identifizierung der Lipidspezies

Die Identifizierung der einzelnen Lipide erfolgte anhand ihrer exakten Massen. Lediglich im positiven Ionenmodus wurden, um eine Verwechslung von PC und PE Spezies gänzlich ausschließen zu können, MS/MS-Experimente durchgeführt und somit auch die Bildung charakteristischer Fragmente bei der Identifikation mit einbezogen. Durch die vielen hintereinander aufgenommenen Massenspektren über einen LC-MS Lauf und die große Heterogenität der Proben entstehen große Datenmengen. Die manuelle Auswertung dieser Daten ist allein schon hinsichtlich der Identifikation der einzelnen Spezies sehr zeitaufwändig. Um die Zuordnung der Signale zu vereinfachen, wurde die Software PeakID ([©]Göran Hübner, LG Immunchemie, Borstel) als Excel Add-In entwickelt, die die Zuordnung der Signale vereinfacht. Der Identifizierungsalgorithmus basiert zunächst auf der Berechnung der genauen Massen der Lipidspezies und dem anschließenden Vergleich mit den detektierten Massen. Dabei liegen die monoisotopischen Massen der einzelnen Kopfgruppen und Kohlenstoff-Rückgrate in einer Datenbank vor. Die Fettsäurereste werden bei jedem Abgleich berechnet und mit den Massen in der Datenbank kombiniert. Dabei werden der verwendete Ionenmodus sowie eventuell auftretende Adduktionen oder Wasserabspaltungen beachtet. In einem vom Anwender angegebenen Fehlerbereich werden die für die Identifikation in Frage kommenden Lipidspezies in ihrer Bruttofettsäurekomposition angegeben. Der Scrennshot einer Analyse ist in Abbildung 2.11 gezeigt. Die angegebenen Bezeichnungen der Spezies beziehen sich auf die Gesamtzahl aller Kohlenstoffatome der Fettsäureketten und die Gesamtzahl der in ihnen vorkommenden Doppelbindungen. In Glycerophospholipiden sind sie auf zwei Fettsäurekettenreste verteilt. Bei Substanzen mit einem Sphingosinrückgrat kann die Fettsäure genau angegeben werden.

Die Auswertesoftware umfasst alle Glycerophospholipide unterschiedlicher Sättigungsgrade der Fettsäurereste inklusive der Etherlipidspezies. Von den Sphingolipiden wurden Sphingomyelin, Ceramide, Cerebroside und komplexe Glycosphingolipide beachtet. Dabei wurde als sphingoide Base stets das in Säugerzellen am häufigsten vorkommende Sphingosin angenommen (siehe Kapitel 1.2.1.1). Dabei ist zu bemerken, dass das sogenannte Dihydrosphingosin ohne MS/MS Analysen nicht vom Sphingosinrückgrat in einem Molekül unterschieden werden kann.

75

		· · · · · · ·		- 128 X / W	00 +0 2 - 2 - 1	1 R					
D31	- /	k .				-					
	A	B		C	D	E	F	G	н	1	
enter	ed delta:	15 ppm		entered charge state:	entered mass type:	monoisotopi	c mass				
SPPR	Jor Lipids	Yes		Seek for Fatty Acids	Seek for Sphingolpids	Yes	B. I		0		
	eak Number	Measured Mass	m/2)	Measured Intensity	Inc Disc EA 22-1 H (1.)	Mass (m/2)	Dena (ppm)	Formula 041 MZE 012 DI	Result #2	Mass (m/z)	Dent
	1.3	9 007	5045	2003/10	Inc + Pho + FA 32 0 - H (1-)	809,5024	2,05/6	C41 H78 013 P1			
	10	003	6020	25523	Ino + Pho + FA 32.0 - H (1-)	801,0024	6,6496	C41 H/6 013 P1	GM + Pho + FA 419 - H (1.)	831 6176	
	15	833	6215	7543499	Ino + Pho + FA 34:2 - H (1-)	833.5190	A 1942	C43 H78 013 P1	Gly + Pho + FA 41.7 - H (1.)	833,5333	-
	15	834	6340	38781680	Ino + Pho + FA 34:1 - H (1-)	835 5337	0.4139	C43 HRD 013 P1	Qij • Filo • Filo (Fil)	000,0000	-
	152	837	5415	4001612	Ino + Pho + FA 34 0 - H (1-)	837 5493	9.3129	C43 HR2 013 P1			
	16.	849	6669	3352700	Ino + Pho + FA 35:1 - H (1-)	849 5493	7.7639	C44 HE2 O13 P1	Gly + Pho + FA 42.6 - H (1-)	849.5646	1
	16	851	5656	534873	Ino + Pho + FA 35:0 - H (1-)	851,5650	0,7583	C44 H64 O13 P1			
	167	857	5226	5435351	Ino + Pho + FA 36:4 - H (1-)	857,5180	5,3596	C45 H78 O13 P1			
	165	869	5375	12652477	Ino + Pho + FA 36:3 - H (1-)	859 5337	4,4744	C45 H80 O13 P1	Gly + Pho + FA 43.8 - H (1-)	859,5489	1
	171	861	5500	60309136	Ino + Pho + FA 36:2 - H (1-)	861,5493	0,9076	C45 H62 O13 P1	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,		
	173	863	,5645	61700512	Ino + Pho + FA 36:1 - H (1-)	863,5650	0,5260	C45 H84 O13 P1			
	183	871	5459	1148291	Ino + Pho + FA 37:4 - H (1-)	871,5337	14,0509	C45 H80 O13 P1			
	183	873	6632	3894771	Ino + Pho + FA 37:3 - H (1-)	873,5493	4,4597	C46 H82 O13 P1	Gly + Pho + FA 44.8 - H (1-)	873,5646	
	18	5 875	,6882	4003776	Ino + Pho + FA 37:2 · H (1-)	875,5850	3,7070	C46 H84 O13 P1	Gly + Pho + FA 44.7 · H (1-)	875,5802	
	187	877	,5763	857827	Ino + Pho + FA 37:1 - H (1-)	877,5806	4,9048	C46 H86 O13 P1			
	194	005	,5490	44520048	Ino + Pho + FA 38:4 - H (1-)	885,5493	0,3435	C47 H82 O13 P1			
	196	887	5637	57043120	Ino + Pho + FA 38:3 - H (1-)	887,5650	1,4131	C47 H84 O13 P1			
	196	889	,6801	28311722	Ino + Pho + FA 38:2 - H (1-)	889,5806	0,5669	C47 H86 O13 P1			
	20) 891	,6025	3407702	Ino + Pho + FA 38.1 - H (1-)	891,5963	7,0060	C47 H88 O13 P1	Gly + Pho + FA 45.6 - H (1-)	891,6115	
	204	1 899	,5598	594361	Ino + Pho + FA 39:4 - H (1-)	899,5650	5,7297	C48 H84 O13 P1			
	206	901	5740	1288528	Ino + Pho + FA 39:3 - H (1-)	901,5806	7,3253	C48 H86 O13 P1			
	216	913	5752	1153074	Ino + Pho + FA 40:4 - H (1-)	913,5806	5,9155	C49 H86 O13 P1			
	218	916	,5941	833972	Ino + Pho + FA 40.3 - H (1-)	915,5963	2,3530	C49 H88 O13 P1			
	220	917	,6166	638022	Ino + Pho + FA 40:2 - H (1-)	917,6119	5,1171	C49 H90 O13 P1	Gly + Pho + FA 47:7 - H (1-)	917,6272	
	na nor na r en d						141				

Abbildung 2.11: Screenshot der Ausgabe von PeakID. Die gemessenen Massen der aufgerufenen Peaklisten wurden mit den von PeakID berechneten Massenlisten verglichen und die entsprechenden Lipidspezies innerhalb der gewählten Parameter ausgegeben. Die gemessenen Werte, die erwarteten Werte der durch den Algorithmus ermittelten passenden Spezies, die Peakintensitäten, die relative Massenabweichungen sowie die Summenformel der Substanzen werden angegeben. Spezies bis zu einer Massengenauigkeit von 10 ppm wurden für die Datenauswertung beachtet. Die Peakliste zeigt die monoisotopischen Signale während der Elution von PI und wurde mit *Data Analysis* generiert.

Um keine möglichen Zuordnungen zu übersehen, wurde die maximal zugelassene relative Abweichung auf 10 ppm gesetzt. Der hohe Wert berücksichtigt den Umstand, dass die Spektren im Breitbandmodus aufgenommen wurden und die Kalibrierung des Massenspektrometers vor Beginn eines LC-Laufes extern erfolgte. Außerdem ist die Anzahl der in der Zelle sich aufhaltenden Ionen während eines LC-Laufes nicht konstant und unterliegt starken Schwankungen, was sich auch auf die Massengenauigkeit auswirkt. Bei einer internen Kalibrierung und bei einer kontrollierten Ionenintensität wäre die Massengenauigkeit deutlich verbessert.

Die monoisotopischen Massenzurordnung der aus *Data Analysis* generierten Massenlisten wurden vor einer PeakID-Analyse visuell anhand der aufgenommenen

Spektren überprüft, da es sonst teilweise zu einer Verwechslungen der Signale mit Isotopenpeaks, Kontaminationen oder Störfrequenzen kommen kann.

Mit Hilfe von PeakID konnten so die von *XMass* und *Data Analysis* aufgenommenen und prozessierten Daten mit der erstellten Datenbank verglichen werden.

Quantifizierung

Grundsätzlich erfolgen Quantifizierungen in der Massenspektrometrie über die Ermittlung der Signalintensitäten anhand der Integrale der Peakflächen oder anhand der Peakhöhen. In dieser Arbeit wurden die Peakintensitäten anhand der gemessenen Peakhöhen ermittelt. Das Signal zu Rausch-Verhältnis der gemessenen Signale korreliert mit den Peakintensitäten. Ab einem Signal- zu Rausch-Verhältnis von 3 wurde ein Signal als detektiert betrachtet.

Eine Molekülspezies im Massenspektrum kann bei unterschiedlichen *m*/z-Werten detektiert werden. Je nach Konzentration der Substanz, Zusammensetzung der Spraylösung, Kontamination der Probe mit Alkalimetallionen sowie Geometrie und angelegter Spannungen der Ionenquelle können die im Folgenden aufgeführten Quasimolekülionen beobachtet werden. Im positiven lonenmodus werden einfach und mehrfach positiv geladene Ionen [M+H]⁺ bzw. [M+nH]ⁿ⁺ nachgewiesen. Des Weiteren können Anlagerungen von z.B. Alkalimetallionen [M+Na]⁺ und [M+K]⁺ beobachtet werden. Im negativen lonenmodus sind das einfach geladene lon [M-H]⁻ sowie [M-nH]ⁿ⁻ nachweisbar. Auch mehrfach geladene lonen hier kann eine Adduktionenbildung z.B. mit Natrium auftreten [M+Na-2H]⁻. Dabei werden z.B. doppelt geladene lonen im positiven lonenmodus bei m/z [M+2H]/2 detektiert und die Isotopenpeaks folgen im Abstand von 1/2 u. Darüber hinaus können in beiden Ionenmodi Homo- und Heterodimere, Trimere usw. beobachtet werden wie z.B. [2M-H]⁻, [2M+H]⁺, [M₁+M₂-H]⁻¹⁹⁴. Für die Quantifizierung einer Molekülspezies müssen die Intensitäten der verschiedenen Quasimolikülionen zusammengefasst werden.

Bei der Messung der Intensitäten der Signale in äquimolaren Standardlipidmischungen mussten darüber hinaus für Standards, die nicht aus einem definierten Lipid bestanden, die Spezies unterschiedlicher Fettsäurelängen zusammengefasst werden. Dies war beispielsweise bei PI der Fall, da PI nur als natürliche Mischung, nicht aber als definierte Substanz kommerziell erhältlich ist. Es wurden Einwaagen verwendet, deren molare Masse sich auf die im mittleren Massenbereich der Mischung liegende und gleichzeitig auch am stärksten enthaltenden Spezies PI 38:4 bezog. Messreihen ergaben, dass die Summe aller im Standard enthaltenden Spezies zu der Spezies 38:4 im Verhältnis 0,78 zu 1 vorkommen. Um die anhand von Standardsubstanzen ermittelten Korrekturfaktoren zu erhalten, wurden die Intensitäten des Signals bei *m*/*z* 885,549 für [M-H]⁻ mit dem Faktor 1,78 korrigiert. Beim Standard GM1, der aus einer Mischung zweier Spezies besteht, wurde ebenso vorgegangen (Referenz hier die Spezies 18:0, *m*/*z* 1544,869 für [M-H]⁻, Korrektur um den Faktor 1,42).

Zur Quantifizierung der Zellextraktmessungen erfolgte die Zugabe eines internen Standards vor der Injektion in die HPLC. Als interner Standard wurde die synthetische Substanz Dicapryl-PE (PE 20:0) gewählt, die pro Messung in einer absoluten Menge von 1ng eingesetzt wurde. PE 20:0 ist in beiden Ionenmodi ionisierbar und kommt in natürlichen Extrakten nicht vor.

Isotopenpeaks

Kohlenstoff kommt in der Natur mit einer 1,1-prozentigen Wahrscheinlichkeit nicht als ¹²C, sondern als ¹³C Isoptop vor. Durch den hohen Anteil an C-Atomen in organischen Molekülen ist das ¹³C jedoch für deren Analytik relevant, besonders, wenn quantitative Analysen vorgenommen werden.

Während die unterschiedlichen Fettsäurereste nicht zu Signalüberschneidungen innerhalb einer Lipidklasse führen, liegen die zweifach das ¹³C-Isotop enthaltenden Spezies bezüglich der Masse sehr nah an der monoisotopischen Masse der nächsthöher gesättigten Spezies.

Dabei errechnet sich der Massenabstand aus 2 x (13 C - 12 C) - 2H und ergibt einen Wert von -0,009 u. Um die Signale auseinander zu halten, sind Auflösungen von mindestens 88800 im Massenbereich von *m*/z 800 nötig. Diese Auflösungen wurden im Breitbandmodus nicht erreicht.

Sichtbar wird das Vorhandensein von zwei Spezies allerdings in den Intensitäten der Signale. Bei den untersuchten Substanzen trägt der erste Isotopenpeak einer Substanz zu etwa 30 % zur Gesamtintensität der jeweiligen Spezies bei. Die Intensität des Signals der Spezies mit zwei ¹³C Atomen beträgt ohne

Überschneidungen mit weiteren Signalen etwa 10% des zugehörigen monoisotopischen Signals. Übersteigt das Signal diesen Wert wie in Abbildung 2.12 gezeigt, so trägt die nächsthöher gesättigte Spezies zur Gesamtintensität bei.



Abbildung 2.12: Überschneidung der Signale zweier Ionenspezies. Signale einer zwei 13 C-Atome enthaltenden, ungesättigten Lipidspezies (PI 36:2, 2 x 13 C, berechnetes *m*/z 863,5560) mit der komplett aus 12 C-Atomen bestehenden, nächsthöher gesättigten Spezies (PI 36:1, berechnetes *m*/z 863,5649). Die Auflösung des gezeigten Spektrums von 60000 reicht nicht aus, um die Signale zu trennen. Spektrum aus dem LC-MS Lauf einer DRM-Lipidextraktion im negativen Ionenmodus bei 38,4 min.

Die Intensitäten der Isotopenpeaks wurden nicht in die Daten mit eingerechnet. Für relative Vergleiche ist dies jedoch nicht relevant, da sich alle untersuchten Moleküle im gleichen Massenbereich befinden und daher eine fast gleiche Isotopenverteilung haben. Übersteigt das Signal des zweiten Isotopenpeaks den Anteil von 30% der Intensität des monoisotopischen Peaks, so wurde die Intensität als Signal der nächsthöher gesättigten Spezies gewertet, allerdings ohne Abzug der nicht zum Signals gehörenden 10% an Intensität, da dies im Rahmen des Fehlers der Messdaten liegt.

Fehlerbehandlung

Zur Beurteilung der Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode als auch der Messdaten werden die Daten, falls nicht anders vermerkt, als arithmetische Mittelwerte mindestens dreier unabhängiger Messungen und ihrer Standardabweichungen angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Isolation der Membranmikrodomänen und Verteilung der Markermoleküle

In der Literatur sind neben der Standardextraktionsmethode für Membranmikrodomänen, d.h. mit einer 1-prozentigen Triton X-100-Lösung, weitere Extraktionsmethoden beschrieben. Um eine möglichst effiziente und reproduzierbare Methode für Lipidanalytik zu erarbeiten, wurden die die verschiedenen Isolationsverfahren auf ihre Reproduzierbarkeit und ihre Eignung zur nachfolgenden massenspektrometrischen Lipidanalytik untersucht. Dabei sollte die Detergenzkontamination der Proben für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse möglichst gering gehalten werden. Die Qualität der Extraktion wurde durch das Vorhandensein der in der Literatur beschriebenen Markermoleküle GM1 und Flotillin-2 überprüft (siehe Kapitel 1.2.3 und 2.1.2). Für die Standardisolationsmethode wurde der Cholesterolgehalt festgestellt und exemplarisch untersucht, ob die isolierten Extrakte neben einer Lipidanalytik auch die massenspektrometrische Analytik von Proteinen erlauben.

3.1.1. Vergleich verschiedener Isolationsmethoden für Membranmikrodomänen

Aus HEK293-Zellen und TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen wurden die Domänen als Detergens-resistente Membranen (DRM) mit einer Tritonkonzentration von 1% (Isolationsmethode 1) und 0,1% (Isolationsmethode 2) im Lysepuffer vom Rest der Zellmembranen abgetrennt. Außerdem wurden die rigiden Bereiche durch Natriumcarbonat (Isolationsmethode 3) und durch mechanischen Zellaufschluss und mehrere Zentrifugationsschritte (Isolationsmethode 4) detergensfrei extrahiert (siehe Kapitel 2.1.1). Nach den Ultrazentrifugationsschritten in einem diskontinuierlichen Dichtegradienten sammelten sich die nicht gelösten Membranbereiche im Bereich der geringeren Dichte an. Im Gradientenröhrchen ist nach der Zentrifugation teilweise eine deutliche Bande des aufgeschwemmten Materials sichtbar (Abb. 3.1). Die

ERGEBNISSE

einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe einer Pipette manuell abgenommen und auf die Markermoleküle untersucht, die bei einer erfolgreichen Isolation eine Anreicherung in den Bereichen geringerer Dichte des Gradienten zeigen sollten.



Abbildung 3.1: Aufreinigung der Domänen als Detergens-resistente Membranen im Dichtgradienten. In TX-100-Lösung 4°C 1-prozentiger bei unlösliches Membranmaterial einer 19-stündigen nach Ultrazentrifugation im Saccharosedichtegradienten. Das Material sammelte sich zwischen der 30% (w/v) und der 5% (w/v) Saccharoselösung.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der verschiedenen Isolationsmethoden in Hinblick auf die Verteilung des Markers GM1 dargestellt. Durch die im Western-Blot nachgewiesene, hochspezifische Erkennung von GM1 durch die β-Untereinheit des Cholera Toxins (CTB) war es möglich, den Nachweis per Dot-Blot durchzuführen (siehe Kapitel 2.2.2.3).

Abbildung 3.2 zeigt die Verteilung des GM1 in den einzelnen Fraktionen des Dichtegradienten nach Anwendung der verschiedenen Isolationsmethoden. In den mit Isolationsmethode 1 (1% Triton X-100) gewonnene Fraktionen wurde GM1 in den Fraktionen 2-5 angereichert nachgewiesen. Diese Fraktionen befanden sich in dem Bereich der geringeren Dichte im Gradienten, und das aufgeschwemmte Membranmaterial ist in Abbildung 3.1 teilweise sichtbar. Im Sediment wurde kein GM1 detektiert. Eine Reduktion der Tritonkonzentration im Puffer auf 0,1% (Isolationsmethode 2) ergab nach der Fraktionierung und dem Nachweis auf GM1 eine Verteilung über den gesamten Gradienten.

Auch die Untersuchung der detergensfreien Isolationsmethode 3, bei der die Domänen durch Natriumcarbonat extrahiert werden sollten, ergab eine Verteilung von GM1 über den gesamten Gradienten. Die Isolationsmethode 4, bei der aufgrund eines größeren Volumens des Gradienten eine größere Anzahl an Fraktionen gewonnen wurde, führte ebenfalls zu einer gleichmäßigen Verteilung von GM1. Die Anreicherung von GM1 konnte nur an mit Hilfe der Isolationsmethode 1 (1% TX-100) isolierten Fraktionen reproduzierbar nachgewiesen werden.



Abbildung 3.2: Nachweis von GM1. Dot-Blot von Aliquots aus den verschiedenen Dichtegradientfraktionen nach CTB-vermittelter Detektion von GM1. Dabei war die Fraktion 1 die erste von oben abgenommene Fraktion und die der geringsten Dichte des Gradienten und die letzte Fraktion repräsentiert das Pellet. Es wurde jeweils 1 μ L der in einem Volumen von 150 μ L abgenommenen Fraktion auf die Membran appliziert. Die größere Anzahl abgenommener Fraktionen bei Anwendung der Methode 4 resultierte aus dem größeren Volumen des Dichtegradienten. Eine klare Anreicherung von GM1 war nur nach Anwendung der Isolationsmethode 1 nachzuweisen. Nach den Extraktionen mit Hilfe der anderen Methoden war GM1 im gesamten Gradienten gleichmäßig verteilt. Es wurden jeweils 1x10⁶ Zellen für die Aufreinigungen nach Methode 1 und 2 sowie 4x10⁶ Zellen bei Methode 4 verwendet.

Der immunchemische Nachweis des 48 kDa großen Proteins Flotillin-2 wurde nach vorangehender Elektrophorese der Dichtegradientenaliquots und Western-Blot durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.3). Abbildung 3.3 zeigt eine Verteilung des Moleküls im Dichtgradienten nach der Durchführung der verschiedenen Isolationsmethoden, wobei Fraktionen der Isolationsmethode 3 nicht untersucht wurden. Wie bereits im vorigen Kapitel beschriebenen Nachweis für GM1 zeigte sich nach Anwendung der Isolationsmethode 1 eine Anreicherung des Flotillin-2 in den Fraktionen 2 bis 5.

Allerdings war Flotillin-2 in geringerer Menge auch in den anderen Fraktionen und im Sediment nachzuweisen.

Der Test der mittels Isolationsmethode 2 behandelten Proben auf Flotillin-2 zeigte in Fraktion 1 und Fraktion 8 weniger starke Signale als in den restlichen Fraktionen. Wie auch die Verteilung des GM1 war allerdings keine klare Anreichung auf bestimmte Dichtebereiche feststellbar (vgl. Abb. 3.2). Das Molekül war im gesamten Bereich des Dichtegradienten zu finden. Bei Anwendung der Isolationsmethode 4 war der Marker Flotillin-2 zum Sediment hin angereichert, nicht aber in den Bereichen geringerer Dichte.



Abbildung 3.3: Nachweis von Flotillin-2. Western-Blot und immunchemische Detektion des Proteins Flotillin-2 (48 kDa). Das Molekül war nach einer Extraktion mit 1% TX-100 in den Fraktionen 2, 3 und 4 angereichert. In den übrigen Fraktionen war es in geringerer Konzentration ebenfalls nachzuweisen. Nach Anwendung der Isolationsmethode 2 (0,1% TX-100) war Flotillin-2 fast über den gesamten Dichtegradienten gleichmäßig verteilt. Nach dem mechanischen Aufschluss (Isolationsmethode 4) war Flotillin-2 fast gänzlich im Sediment zu finden. Für eine Reduktion der Proben wurde nach Anwendung dieser Methode nur jede zweite abgenommene Fraktion auf das Gel aufgetragen. Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen für die Aufreinigungen nach Methode 1 und 2 sowie 4×10^6 Zellen bei Methode 4 verwendet. Die Fraktionen der Isolationsmethode 3 (Natriumcarbonat) wurden nicht auf Flotillin getestet.

An einer DRM-Isolation aus Lungenendothelzellen wurde exemplarisch der Einfluss einer Reduktion der TX-100 Konzentration zusätzlich auf die Verteilung des Proteins Caveolin-1 getestet. Aufgrund ihrer sehr geringen Caveolin-Expression konnte dieser

ERGEBNISSE

Test nicht an den in der Arbeit sonst verwendeten HEK-Zellen durchgeführt werden. Die Extrakte wurden freundlicherweise von Frau E. Reppien, LG Lungenpharmakologie, Borstel, zur Verfügung gestellt. Nach der Aufarbeitung wurden im in Abbildung 3.4 dargestellten Versuch benachbarte Fraktionen zum Nachweis des Caveolins zusammengefasst. Es zeigte sich deutlich, dass nach einer Reduktion der TX-100 Konzentration auf 0,1% im Lysepuffer das als domänenassoziiert beschriebene Caveolin-1 nach der Ultrazentrifugation komplett im Sediment zu finden war. Die Diskrepanz zu den Daten des GM1-Nachweises nach Anwendung der Isolationsmethode 2 (siehe oben) konnte nicht erklärt werden. Bei Isolationsmethode 1 konnte auch für Flotillin-2 eine Anreicherung in bestimmten Fraktionen (hier Fraktion 3) festgestellt werden.



Abbildung 3.4: Nachweis von Caveolin-1. Einfluss der Reduktion der TX-100 Konzentration im Lysepuffer auf die Verteilung des Markermoleküls Caveolin-1 im Dichtegradienten. Verwendet wurden Lungenendothelzellen, die das Protein Caveolin-1 im Gegensatz zu HEK-Zellen exprimieren. Caveolin-1 wurde nach Anwendung der Isolationsmethode 2 komplett im Sediment nachgewiesen. Der Versuch wurde freundlicherweise von Frau E. Reppien, Lungenpharmakologie, Forschungszentrum Borstel, durchgeführt.

Die Isolation von Membranmikrodomänen mittels verschiedener Methoden zeigte, dass lediglich die Standardisolation nach Methode 1 (1% TX-100) zu reproduzierbaren Ergebnissen in der Verteilung von in der Literatur beschriebenen Membranmikrodomänenmarkern führte. Versuche, die Domänen mit einer geringer konzentrierten TX-100-Lösung oder gänzlich ohne ein Detergens zu isolieren, um möglichst kontaminationsarme Proben zu erhalten, führten auch nach der Überprüfung der Einzelschritte und Modifikationen der Methode nicht zu einer Anreicherung der Markermoleküle in einzelnen Fraktionen (Daten nicht gezeigt). Die beschriebene Methode nach Smart (Isolationsmethode 4) wurde zwischenzeitlich von den Autoren zurückgezogen ¹⁹⁵, da sie nicht reproduzierbar anwendbar ist. Eine in diesem Zuge veröffentlichte Alternativmethode der Autoren konnte ebenfalls keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern (Daten nicht gezeigt).

Diejenigen Fraktionen, die sich im Bereich geringer Dichte im Dichtegradienten sammelten und in denen die stärkste Anreicherung der Markermoleküle nachzuweisen war, wurden als DRM-Fraktionen bezeichnet und für die weiteren Versuche sowie die Lipidextraktionen genutzt.

3.1.2. Nachweis von Cholesterol

Zur weiteren Charakterisierung der Aufreinigungen mittels 1-prozentiger Tx-100-Lösung, die zu einer reproduzierbaren und in der Literatur beschriebenen Verteilung der Marker GM1 und Flotillin-2 führten, wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Cholesterolgehalt hin untersucht. Der Nachweis wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen, fluoreszenzbasierten Tests durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.3). Auch bei diesem Test zeigt sich eine Anreicherung des detektierten Moleküls in den oberen Fraktionen des Dichtegradienten (Abb. 3.5). Cholesterol ist demzufolge in den DRM-Fraktionen angereichert. Dabei erreichte die Anreicherung üblicherweise einen Wert um 6,5 μ g/mL für aus HEK-293 Zellen und bis zu 9 μ g/mL für aus TLR4/MD2transfizierten HEK-Zellen isolierten DRM. In Fraktionen, die den Bereichen höherer Dichte im Gradienten entnommen werden, lag die Cholesterolkonzentration bei einem Wert < 1 μ g/mL. Erwartungsgemäß wurde Cholesterol auch im Sediment nachgewiesen. In der ebenso getesteten, cytosolischen Fraktion war Cholesterol dagegen nur in Spuren nachweisbar.



Abbildung 3.5: Nachweis von Cholesterol. Cholesterolgehalt der Dichtegradientfraktionen von mit 1-prozentiger TX-100-Lösung inkubierten HEK-293 Zellextrakten. Erkennbar ist die typische Anreicherung der Cholesterolkonzentration in den Bereichen geringer Dichte, also in den die DRM enthaltenden Fraktionen.

3.1.3. Proteingehalt der Fraktionen

Um zu prüfen, ob es möglich ist, die Probe gleichzeitig zur Lipidanalytik auch auf ihren Proteingehalt hin massenspektrometrisch zu untersuchen, wurde zunächst der Gesamtproteingehalt der durch Isolationsmethode 1 gewonnenen Fraktionen nach Bradford bestimmt .

Die photometrischen Messungen des Proteingehaltes schwankten zwischen den einzelnen Fraktionen ohne Beachtung des Sediments zwischen 5 und 12 µg/mL. Es war keine klare Anreicherung festzustellen, die Fraktionen 1 und 2 wiesen jedoch den geringsten Proteingehalt auf (Abb.3.6). Die Daten ließen sich aufgrund der geringen Probenvolumina und Proteinkonzentrationen zudem nur schwierig reproduzieren.



Abbildung 3.6: Proteingehalt der Dichtegradientfraktionen. Der Nachweis erfolgte nach Bradford. Die Messung der optische Dichte der Proben bei 595 nm konnte über eine Standardgerade bekannter Proteinkonzentrationen in die Proteinkonzentration der Probe umgerechnet werden. Die Konzentration stieg zunächst leicht an und lag in den Fraktionen mittlerer Dichte um die 11 µg/mL. In den DRM-Fraktionen (2-5) werden unterschiedliche Proteinkonzentrationen gemessen. Höhere Konzentrationen waren im Sediment des Dichtegradienten und in der cytosolischen Fraktion nachzuweisen.

Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden daher mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels einer Rotiblue-Färbung sichtbar gemacht. Das in Abbildung 3.7 gezeigte Gel spiegelt den Gesamtproteingehalt einer DRM-Fraktion wider. Pro Fraktion wurde ein Probenvolumen von 10 µL auf das Gel aufgetragen, dies entsprach nach den oben gezeigten Messungen einer absoluten Menge von 50 bis 110 ng Protein pro Fraktion. Deutlich erkennbar ist, dass einige Proteinbanden nur in bestimmten Fraktionen des Dichtegradienten nachweisbar waren. Die markierten Banden A, D und E waren in den DRM-Fraktionen angereichert. Das Signal der Bande B nahm zu Bereichen höherer Dichte hin an Stärke zu. Bande C war erst ab Fraktion Nummer 6 zu finden. Das Sediment zeigte eine hohe Proteinkonzentration und –heterogenität. Hier waren auch viele Banden erkennbar, die in den Dichtegradientfraktionen nicht zu finden waren. Der Vergleich zur GM1- und Flotillin-2-Verteilung zeigte eine deutliche Korrelation zwischen der Verteilung der

Markermoleküle und der verschiedenen Proteinbanden. Ebenso ist zu erkennen, dass auch innerhalb der DRM-Fraktionen (Fraktionen 2-5) Unterschiede in der Verteilung und der Intensität der Banden zu beobachten waren.



Fraktionen

Abbidung 3.7: SDS-PAGE der einzelnen Dichtegradientfraktionen. Das Gel zeigt den Gesamtproteingehalt der Probe. Die Proteine wurden mittels einer Rotiblue-Färbung angefärbt. Der verwendete Marker war im eingescannten Gel schlecht zu erkennen. Einige der prominenten Banden waren einzelnen Fraktionen zuzuordnen. So waren die Banden A, D und E in den Fraktionen zu finden, in denen die Marker GM1 und Flotillin-2 immunchemisch nachgewiesen werden konnten. Bande B nahm zu den unteren Fraktionen des Dichtegradienten hin an Stärke zu. Die Bande C fand sich im Gradienten erst in den Fraktionen höherer Dichte.

Um zu bestimmen, um welche Proteine es sich dabei handeln könnte, wurde eine DRM-Fraktion (also eine Fraktion der höchsten Anreicherung der Marker) über eine zweidimensionale Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine der Probe zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und anschließend nach ihrer Größe separiert. Die erhaltenden Spots wurden ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau massenspektrometrisch analysiert (Kapitel 2.2.2.3). Es konnten so die in Abbildung 3.8 gekennzeichneten Spots als eine Proteindisulfidisomerase, die

Hitzeschockproteine HSP 60 und HSP 70, Aktin und die Malatdehydrogenase identifiziert werden.

Der sogenannte MOWSE-Score gibt dabei die Wahrscheinlichkeit an, dass das Protein korrekt identifiziert worden ist. Je höher der Wert des MOWSE-Scores über dem für jede Analyse ermittelten Signifikanzlimit liegt, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit einer falschen Identifizierung. Der MOWSE-score der Identifikation der Proteindisulfidisomerase lag knapp unter dem Signifikanzlimit, die Hitzeschockproteine wurden jedoch mit einer hohen Wahrscheinlichkeit richtig identifiziert.



Spot	Bezeichnung	MOWSE- score (Signifikanz- limit)	Masse [u]/ iso- elektrischer Punkt
1 (pos. Kontrolle)	Glutamat- dehydro- genase 1	101 (62)	62 kDa/ 7.25
2(pos. Kontrolle)	Carbonat- anhydrase	64 (62)	29 kDa/ 6.4
3	Protein- disulfid- isomerase	53 (60)	57 kDa/ 4.76
4	HSP 70	161 (60)	70 kDa/ 5.48
5	HSP 60	132 (60)	61 kDa/ 5.7
6	Aktin	98 (60)	42 kDa/ 5.29
7	MDH	61 (60)	36k Da/ 8.92

Abbildung 3.8: Zweidimensionale Gelelektrophorese einer DRM-Fraktion. Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension über den isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension über die Masse der Proteine. Die markierten Spots wurden via *peptide mass fingerprinting* den in der Tabelle rechts dargestellten Proteinen zugeordnet. Abkürzungen: HSP: Hitzeschockprotein; MDH: Malatdehydrogenase.

3.2. Lipidextraktion

3.2.1. Extraktion eines Lipidstandards

Zunächst wurde die Methodik nach Bligh und Dyer auf eine äquimolare Mischung verschiedener Lipidstandards (DOPC, DOPE, DMPG, DMPS, PI, Ceramid 18:0, SM 18:1, Cerebroside und GM1) angewandt, um einen eventuellen auch selektiven

Verlust an Lipidmaterial während der Extraktion zu untersuchen. Die Mischung wurde insgesamt dreimal extrahiert und die gesammelte organischen Phasen eingeengt. Im Anschluss wurde ein Massenspektrum im negativen Ionenmodus vor (a) und nach (b) der Lipidextraktion aufgenommen (Abb. 3.9). Die relativen Intensitäten von PG, PS, PE und PI im Massenspektrum änderten sich nicht. Die absoluten Intensitäten nahmen allerdings um eine Zehnerpotenz im Vergleich zu den Messungen vor einer Lipidextraktion ab (Daten nicht gezeigt). Bei den verwendeten Sphingolipiden blieb das relativ hydrophobe Ceramid anteilig zu den Glycerophospholipidspezies erhalten. Die verschiedenen als Standard verwendeten Lactosylceramidspezies waren nach der Extraktion nur noch teilweise in der organischen Phase detektierbar. Aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeiten dieser Substanzen waren die zugehörigen Signale nach Detailanalysen lediglich im Untergrund des Spektrums aus Abbildung 3.9 zu finden. Das Glycosphingolipid GM1 war nach einer Bligh und Dyer Extraktion in der organischen Phase nicht mehr nachzuweisen. Solche komplexen Glycolipide, die einen relativ großen polaren Molekülanteil besitzen, gingen also zum größten Teil an die wässrige Phase verloren.

Aufgrund der Darstellung der Messung im negativen Ionenmodus werden DOPC und SM 18:1 nicht nachgewiesen. Messungen im positiven Ionenmodus ergaben vergleichbare Werte.



Abbildung 3.9: Anwendung der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer auf eine Mischung aus Lipidstandards. Repräsentative Massenspektren im negativen Ionenmodus eines äquimolaren Lipidmixes aus DMPG, DMPS, DOPE, DOPC, PI, Ceramid 18:0 und Cerebrosiden a) vor und b) nach einer Lipidextraktion nach Bligh & Dyer. Die Relationen zwischen den einzelnen Glycerophospholipidspezies sowie des Ceramids blieben auch nach der Extraktion erhalten. Lactosylceramide und das Glycolipid GM1 konnten nach der Lipidextraktion nicht mehr nachgewiesen werden. Der nach einer Lipidextraktion an Intensität zunehmende Peak bei etwa *m/z* 800 konnte nicht identifiziert werden. Die Konzentration der Standards betrug vor der Lipidextraktion (a) für GM1 1 μ M und für die anderen Lipide je 2 μ M. DOPC und SM 18:1 wurden im dargestellten negativen Ionenmodus nicht abgebildet.

3.2.2. Massenspektrum der organischen Phase nach Lipidextraktion einer durch Methode 1 (1% Triton X-100) isolierten DRM-Fraktion

Die in den DRM-Fraktionen enthaltenden Lipide wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mit Hilfe der Zweiphasenextraktion nach Bligh und Dyer vom wässrigen Anteil bzw. von den im wässrigen Anteil löslichen Substanzen (Proteine, Saccharide, ect.) der Dichtegradientfraktion getrennt (siehe Kapitel 2.2.2.4). Zunächst wurde untersucht, in wie weit das in den TX-100-Aufreinigungen verwendete Detergens die massenspektrometrische Detektion der extrahierten Lipide beeinflusst. Zunächst wurden mit Hilfe der Isolationsmethode 1 (1% TX-100) gewonnene DRM-Fraktionen einer Lipidextraktion unterworfen und die erhaltende organische Phase direkt über ESI FTMS im negativen Ionenmodus analysiert (Abb. 3.10). Das Spektrum zeigt die hochgradige Verunreinigung der Probe durch das ebenso wie die Lipide in den organischen Anteil der Zweiphasenextraktion übergegangene TX-100. Eine Analytik der eigentlichen Probenmoleküle war kaum möglich. Die Ionensuppression während der Ionisation in der Quelle und die gegenseitige Beeinflussung der Ionen während der Detektion in der ICR-Zelle waren aufgrund des Überschusses an TX-100-Molekülen zu stark, um die eigentlichen Probensubstanzen ausreichend nachzuweisen. Die wenigen, im Untergrund zu findenden Glycerophospholipidspezies zeigten Signale knapp über dem Untergrundrauschen. Das bei m/z 742,544 gezeigte Signal für PE 36:2 [M-H]⁻ hatte ein Signal- zu Rausch-Verhältnis von 1,5.



Abbildung 3.10: Massenspektrometrische Analyse eines Lipidextraktes im negativen Ionenmodus einer mit Hilfe der Isolationsmethode 1 (1% Tx-100) isolierten DRM-Fraktion. Das mit in die organische Phase übergehende TX-100 dominierte das Spektrum und machte eine weitere Analyse der eigentlichen Probenzusammensetzung unmöglich. Erkennbar ist das in Massenspektren für TX-100 typische Muster.

Der charakteristische Massenabstand von $\Delta m = 44$ u zwischen den dominanten Signalen der verschiedenen TX-100 Moleküle zeigte die in unterschiedlicher Anzahl in den Molekülen enthaltenden Ethylenoxidgruppen (Abb. 3.11).



Abbildung 3.11: Struktur von TX-100. Die variable Anzahl der Ethylenoxidgruppen führte zum typischen Massenabstand von Δm = 44 u zwischen den einzelnen Molekülspezies im Massenspektrum.

3.2.3. Massenspektrum der organischen Phase nach Lipidextraktion einer durch Methode 2 (0,1% TX-100) isolierten DRM-Fraktion

Eine massenspektrometrische Analyse der mittels Methode 2 isolierten Fraktionen nach einer Lipidextraktion ergab ebenfalls starke Signale des TX-100. Im gezeigten Ausschnitt (Abb. 3.12) waren einige wenige Glycerophospholipidspezies zu finden, die sich klar vom Untergrund abhoben. Ihr Signal- zu Rausch-Verhältnis war im Gegensatz zu den Signalen der 1% TX-100-Isolate leicht erhöht (für *m*/*z* 742,544 betrug es 3,9; Daten nicht gezeigt). Eine Analytik der eigentlichen Probenmoleküle war aufgrund der immer noch starken Ionensuppression und der gegenseitigen Beeinflussung der Ionen in der Zelle nur unzureichend möglich.



Abbildung 3.12: Massenspektrometrische Analyse eines Lipidextraktes im negativen Ionenmodus einer mit Hilfe der Isolationsmethode 2 (0,1% Tx-100) isolierten DRM-Fraktion. Die Signale von TX-100 dominierten das Spektrum. Einzelne Glycerophospholipide ließen sich jedoch deutlich identifizieren, wie z.B. PS 36:1.

3.3. Versuch der Abtrennung des TX-100 von DRM-Lipiden

Da eine reproduzierbare Isolation von Membranmikrodomänen nur nach Isolationsmethode 1 unter Verwendung einer 1-prozentigen Tritonlösung durchgeführt werden konnte und TX-100 eine massenspektrometrische Analyse unmöglich macht, musste eine Methode gefunden werden, das in den Proben enthaltende Triton X-100 abzutrennen.

Aufgrund der sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften von Detergens- und Analytmolekülen ist eine Abtrennung von TX-100 schwierig durchzuführen. Gängige Verfahren zur Abtrennung von Probenkontaminationen eigneten sich zur Abtrennung des TX-100 nicht. So war z.B. eine Dialyse von TX-100 aufgrund seiner sehr niedrigen *critical micellar concentration* (cmc; 0,3 mM bei 25°C) nicht möglich. Auch die Verwendung spezifischer Detergens-Adsorbentien wie "Calbiosorb" konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die Lipidmoleküle ebenso wie das TX-100 von den Harzkügelchen adsorbiert werden. Eine solche Behandlung ist nur für Proben geeignet, bei denen die Proteinanalytik im Vordergrund steht. Ein nach der Fraktionierung durchgeführter erneuter Ultrazentrifugationsschritt sedimentierte sowohl die TX-100- als auch die Lipidmoleküle. Für eine erfolgreiche Abtrennung des TX-100 von den Lipidmolekülen verblieben also nur chromatographische Methoden.

3.3.1. Auftrennung der DRM-Lipidextrakte mittels Dünnschichtchromatographie

Um die Proben von der Detergenskontamination zu befreien, wurde zunächst die konventionell für die Lipidanalytik häufig genutzte Dünnschichtchromatographie (DC) angewandt. Versuche mit verschiedenen Lipidstandards zeigten selbst bei der Verwendung des spezifisch für Lipide geeigneten Detektionmittels Primulin eine im Vergleich zur massenspektrometrischen Analytik sehr geringe Sensitivität der Methode. Definierte Standards wurden ab einer absoluten Menge von etwa 8 µg detektiert. Mit dem verwendeten Laufmittel (siehe Kapitel 2.2.2.5) ließen sich die Standardsubstanzen gut nach ihren Kopfgruppen auftrennen. Abbildung 3.13 zeigt die Auftrennung eines synthetischen Ceramid 18:0 von TX-100 (linke Spur). Das Triton lief im verwendeten System langsamer als das Ceramid (Vergleich mit Spur 3,

ERGEBNISSE

Triton alleine). Auch eine massenspektrometrische Analyse der Spots nach einer Extraktion aus dem Kieselgel zeigte eine klare Trennung der Substanzen. Die Auftrennung eines DRM-Lipdextraktes (Spur 2) zeigte eine deutliche Bande am Start und einen breiten, verwischten Spot. Weitere Spots waren nicht zu beobachten. Eine Verdünnung des DRM-Extraktes führte zu gleichen Ergebnissen. Massenspektrometrische Analysen an aus dem Kieselgel der Platte extrahierten Fraktionen zeigten keine Lipidsignale. Auch das Material in dem breiten, nicht aufgetrennten Spot konnte nicht identifiziert werden.



Abbildung 3.13: Dünnschichtchromatographie von Lipidstandards und einer DRM-Fraktion. Eingesetzt wurden C18-Ceramid (10 µg), TX-100 (je 20 µg) und der Lipidextrakt einer DRM–Fraktion (2 µl). Laufmittel: Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser 85:59:1:4.

- 1 C18 Ceramid + TX-100
- 2 Lipidextraktion DRM-Fraktion
- 3 TX-100

Eine Mischung aus Ceramid 18:0 und TX-100 wurde klar getrennt. Beim Versuch, die Lipidextraktion einer DRM-Fraktion aufzutrennen, entstand ein breiter, verwischter Spot (Spur 2) sowie eine Bande am Startpunkt der Chromatographie.

Zur Auftrennung von Lipidstandards war die Dünnschichtchromatographie gut geeignet. Für die Analyse von Lipidextrakten aus DRM-Fraktionen bzw. zur Vorbereitung einer weiterführenden massenspektrometrischen Untersuchung der Proben kam diese Methode allerdings aufgrund der geringen Senstivität nicht in Frage.

3.3.2. Auftrennung der DRM-Lipidextrakte mittels HPLC

Als weiteres chromatographisches Verfahren zur Auftrennung von Lipiden hat sich die HPLC als verlässliche Methode erwiesen ¹⁹⁶. Als stationäre Phase wurde eine diolmodifizierte Normalphase ausgewählt, da für die Lipidanalytik mit nachfolgender hochauflösender Massenspektrometrie die Auftrennung der Lipide in der LC nach den Eigenschaften der polaren Kopfgruppe erfolgen sollte. Eine Umkehrphasen-LC zur Auftrennung primär nach den hydrophoben Eigenschaften der Fettsäureketten wurde nicht durchgeführt. Unter der Verwendung von Mischungen verschiedener Lipidstandards und TX-100 wurde die Trennleistung des verwendeten HPLC Systems überprüft und optimiert. Die Versuche wurden zunächst offline und mit Hilfe eines Lichtstreudetektors durchgeführt.



Abbildung 3.14: Auftrennung eines Lipidgemisches und TX-100 über das beschriebene HPLC System. Detektion: Lichtstreudetektor. Stationäre Phase: Betasil-Diol 100, Mobile Phase A: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 80/20/1; B: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 28-30% 60/40/1, Gradientenlauf ab der HPLC-Pumpe: A \rightarrow B 0-30 min; 100% B 30-35 min; B \rightarrow A 35-36 min. Eingesetzte Substanzmengen: Ceramid 18:0/TX-100 je 50 µg; DMPG 300 µg; DOPE 100 µg; DOPC 100 µg; PI 300 µg; DMPS 300 µg; SM 18:1 300 µg. Der innere Durchmesser der Säule betrug 4,6 mm.

Das in Abbildung 3.14 gezeigte Chromatogramm zeigt die Auftrennung einer Mischung einzelner Lipidstandards. Auf der verwendeten Normalphasensäule eluierten die Lipide nach ansteigender Polarität. Die Reihenfolge der Elution entsprach den Erwartungen im verwendeten System. GM1 als relativ polares

Glycolipid eluierte zeitlich nach Sphingomyelin und war im gezeigten Versuch nicht in der Lipidmischung enthalten.

Die Signale wurden über die Retentionszeiten der Standardlipide zugeordnet. Das Ceramid und TX-100 hatten nahezu gleiche Retentionszeiten. Die absolute Nachweisempfindlichkeit des Systems lag bedingt durch den relativ unempfindlichen Lichtstreudetektor je nach Lipid zwischen 50-150 µg pro Substanz.

Substanz	DOPC	DMPG	Cerebrosid	GM1	DOPE	ΡI	Ceramid	DMPS	Cholesterol
Relativer									
Nachweis	1,0	0,84	0,82	0,77	0,7	0,6	0,53	0,35	0,28

Tabelle3.1:RelativeNachweisintensitätenderverschiedenenLipidklassenimverwendeten HPLC System.Detektion:Lichtstreudetektor.Die Intensitäten wurden aus demVerhältnis der Peakflächen zueinander relativ zu PC bei gleichen molaren Einwaagen derProbensubstanzen berechnet.

Ein isokratischer Lauf, der lange Äquilibrierungszeiten der Säule einsparen würde, führte nicht zu der erwünschten Trennung der Substanzen. Auch das Herabsetzen des pH-Wertes (pH 10) der mobilen Phasen zur Schonung der Kieselgelsäule machte eine Trennung unmöglich (Daten nicht gezeigt).

Lipide aus DRM-Fraktionen ließen sich mit Hilfe der Lichtstreudetektion nicht nachweisen, vermutlich aufgrund der zu geringen Empfindlichkeit des Lichtstreudetektors und der im großen Lösungsmittelvolumen stark verdünnten Probe.

3.4. Online-Kopplung der HPLC an das ESI FT-ICR MS

Um die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen und detaillierte Untersuchungen über die Zusammensetzung der Analytmoleküle auch hinsichtlich ihrer Fettsäurekettenverteilung durchführen zu können, wurde die HPLC über die ESI-Quelle direkt *online* an das hochempfindliche FTMS gekoppelt. Um das Massenspektrometer als Detektor verwenden zu können, musste die HPLC Anlage so umgebaut werden, dass für die ESI-Quelle angepasste Flussraten erreicht werden konnten (siehe 2.2.2.6). Die erzielten Flussraten wurden vor jeder Messung kontrolliert und lagen zwischen 3,5 und 4 μ L/min.

Abbildung 3.15 zeigt den Totalionenstrom (*total ion current*, TIC) der Auftrennung einer Lipidstandard-Mischung a) im negativen Ionenmodus und b) im positiven Ionenmodus. Dabei wurde gegenüber der gezeigten *offline*-Messung (Abb. 3.14) der Gradient gestreckt und die mobile Phase optimiert, um eine bessere Auflösung zu erhalten. Die Mischung enthielt die Standards Ceramid 18:0, DMPG, DOPE, DOPC, DMPS, PI, SM 18:1, GM1 sowie TX-100. Die eingesetzte Menge betrug 10 pmol pro Substanz, dies entspricht bei einer Molekülmasse von 700 u 7 ng.



Abbildung 3.15: Totalionenstrom der HPLC Auftrennung einer Lipidstandardmischung und TX-100 a) im negativen und b) im positiven Ionenmodus. Detektor: ESI-FTMS. Injiziert wurde ein Lipidgemisch aus je 10 pmol pro Substanz. Die Reihenfolge der Elution entspricht den Erwartungen im verwendeten System. So wurde das relativ hydrophile GM1 mit seiner fünf Zucker tragenden Kopfgruppe am längsten in der Säule zurückgehalten und eluierte erst bei hohen Methanolanteilen der mobilen Phase.

Der TIC im negativen Ionenmodus zeigte die Auftrennung von TX-100, Ceramid, DMPG, DOPE, DMPS, PI und GM1. Der TIC im positiven Ionenmodus zeigte zusätzlich die Auftrennung von DOPC und SM. TX-100, Ceramid und DOPE wurden ebenfalls im positiven Ionenmodus detektiert. Alle Substanzen konnten über die aufgenommen Massenspektren eindeutig zugeordnet werden. Bei den in Abb. 3.15 nicht beschrifteten Signalen handelte es sich um nicht identifizierte Kontaminationen der Probe. Die absolute Nachweisgrenze der im Totalionenstrom sichtbaren Lipide lag je nach Lipid bei 1 ng bzw. bei der Annahme einer Molekülmasse von 700 u bei 1,4 pmol. Der Nachweis in den aufgenomenen Einzelspektren war sensitiver und wird in Kapitel 3.5.5 detailliert beschrieben.

Nachdem die instrumentellen Bedingungen der LC-MS Kopplung bezüglich der Flussraten, der verwendeten mobilen Phasen und des angelegten Gradienten optimiert wurden, konnte die Auftrennung der Lipidextraktion einer DRM-Fraktion erfolgen. Wie in Abbildung 3.16 für den negativen Ionenmodus gezeigt, reichten nun die Empfindlichkeit und die Trennleistung des Systems aus, um die meisten Lipidklassen frei von TX-100 nachzuweisen.



Abbildung 3.16: Totalionenstrom der HPLC-Auftrennung der Lipidextraktion einer DRM-Fraktion. Detektion: FTMS, negativer Ionenmodus. Die gestrichelte Linie stellt den Anteil der mobilen Phase A im Gradienten dar. Das TX-100 konnte erfolgreich abgetrennt werden. Das Signal bei 53 Minuten konnte nicht zugeordnet werden. Die Sensitivität des Systems reichte nun aus, um die aus DRM-Fraktionen extrahierten Lipide nachzuweisen.

3.5. Massenspektrometrische Detektion und Datenprozessierung

Im Totalionenstrom werden die Signale aller zeitgleich eluierenden Substanzen aufsummiert. Somit ist es nicht möglich, die Aufteilung in verschiedene Spezies, Ladungszustände, Dimerbildungen oder Koelutionen der Substanzen zu erkennen. Auch eventuelle Signale im Untergrund oder Verunreinigungen werden erfasst und können nicht von den eigentlichen Probensignalen unterschieden werden. Die Darstellung der Messungen als Konturplot erlaubt dagegen eine detaillierte Anaylse der einzelnen Läufe. Nach der Injektion der Probe in die Probenschleife der HPLC-Anlage wurden ieweils zehn aufeinanderfolgende massenspektrometrische Experimente (scans) über das Datenerfassungsprogramm XMass zu einem Spektrum aufsummiert. Die Spektren wurden kontinuierlich über die gesamte Dauer des chromatographischen Laufes aufgenommen. Bei einer Laufdauer von 1 h und einer Summierungsdauer von 10 s ergibt sich beispielsweise eine Anzahl von 360 hintereinander aufgenommenen Massenspektren. Die hintereinander gelegten Spektren als Aufsicht ergeben die Konturplots der LC-MS Läufe. Dabei entspricht die x-Achse den *m*/z-Verhältnissen der nachgewiesenen Substanzen, die y-Achse der Retentionszeit und die z-Achse den detektierten Intensitäten. Abbildung 3.17 zeigt einen solchen Plot für die im negativen Ionenmodus gemessene Auftrennung verschiedener Lipidstandards.



Abbildung 3.17: Konturplot eines LC-MS Laufes. Gezeigt ist die Auftrennung der Lipide Ceramid 18:0, DMPG, DOPE, PI, DMPS und GM1. Aufnahme des MS-Spektrums im negativen Ionenmodus. Die Substanzen wurden meist als einfach geladene Ionen [M-H]⁻ detektiert. GM1 wurde im dargestellten Ausschnitt als zweifach negativ geladenes Ion [M-2H]²⁻ nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.2.8). Injiziert wurde ein Lipidgemisch aus je 10 pmol pro Substanz.

Standards, die nur aus Lipiden definierter Kettenlänge bestehen (Ceramid 18:0, DMPG, DOPE, DMPS) zeigten ein Signal bei der erwarteten Masse als einfach geladenes Ion. Besonders DOPE und DMPS hatten gegenüber den anderen Lipiden relativ lange Elutionszeiten. Am Beginn des Laufes waren einige nicht identifizierbare Kontaminationen zu finden. Das Glycolipid GM1 teilte sich in dieser Probe bei m/z 771,988 und 786,011 für [M-2H]²⁻ auf die zwei Spezies 18:0 bzw. 20:0 auf (Details siehe Kapitel 2.2.2.8). PI bestand aus einer natürlichen Mischung mit verschiedenen Fettsäurekettenlängen. Daher ist in Abbildung 3.17 deutlich die Aufteilung der Probe in Spezies unterschiedlicher Fettsäurekettenlängen und somit unterschiedlicher Massen erkennbar. In Abbildung 3.18 a) ist eine Detailansicht des Konturplotes für PI Substanzen unterschiedlich dargestellt. Die für langer Fettsäureketten charakteristischen Massenabstände von 14 u (verursacht durch die unterschiedliche Anzahl an CH₂-Gruppen in den Molekülen) und die verschiedenen Sättigungsgrade der unterschiedlichen Spezies (+/-2H) sind deutlich zu erkennen. Abbildung 3.18 b) zeigt ein Massenspektrum zum Zeitpunkt 24,9 min des Laufes, an dem PI eluiert.



Abbildung 3.18: Detailansichten für PI a) im Konturplot und b) im Massenspektrum zum Zeitpunkt 24,9 Minuten. Als natürliche Mischung sind für PI verschiedene Spezies unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzungen erkennbar. Massenabstände von 14 u werden durch die unterschiedliche Anzahl an CH₂-Gruppen in den Molekülen verursacht. Massenabstände von 2 u stellen die unterschiedliche Anzahl von Doppelbindungen in den Fettsäureketten dar. Die m/z–Werte repräsentieren im verwendeten negativen lonenmodus die [M-H]⁻¹ Quasimolekülionen

3.5.1. Einfluss der Fettsäurereste auf die chromatographische Auftrennung

Die verwendete Normalphasensäule trennt die Substanzen nach ihrem polaren Anteil auf und separiert Lipide somit primär nach ihren Kopfgruppen. Eine äquimolare Mischung aus verschiedenen synthetischen PE-Spezies sollte dennoch den Einfluss der Fettsäureketten auf die chromatographische Auftrennung zeigen, da erste Versuche ergaben, dass der zugegebene kurzkettige interne Standard (siehe Kapitel 3.6.2) recht spät und vom Rest der PE Moleküle getrennt eluiert. Es zeigte sich, dass Substanzen mit kürzeren Fettsäureketten später eluieren als Substanzen mit längeren Fettsäureketten und somit größeren unpolaren Molekülanteil. Wie in Abbildung 3.19 gezeigt, lagen zwischen der mittleren Retentionszeit von synthetischen DOPE (PE 36:2) (17,5 min) und der mittleren Retentionszeit von synthetischen Dicaproyl-PE (PE 12:0) (26 min) 7,5 min. Da die Unterschiede in der Länge der Fettsäuren bei natürlich vorkommenden Lipiden nicht so groß ist wie im hier dargestellten Versuch mit dem synthetischen Dicaproyl-PE und DOPE, ist dieser Effekt bei natürlichen Lipiden zu vernachlässigen.



Abbildung 3.19: Einfluss der unterschiedlichen Fettsäurelängen auf die chromatographische Auftrennung von PE. Auftrennung von Dicaproyl-PE (2 x 6:0), Dicapryl-PE (2 x 10:0) und DOPE (2 x 18:1). Je länger die Fettsäurekette, desto früher eluierte das Lipid. Das Spektrum wurde im negativen Ionenmodus aufgenommen, die eingesetzte absolute Menge je Lipid betrug 4 ng.

105

3.5.2. Stabilität der Lipide im Laufpuffer

Um die Stabilität der Lipide zu überprüfen, wurde eine Lipidmischung (1 µM je Standard) in Gegenwart der mobilen Phase A (pH 10) bei Raumtemperatur inkubiert. Es zeigte sich, dass die Substanzen bei den gewählten Bedingungen nach 24 Stunden nur noch mit 50% der anfänglich gemessenen Intensitäten detektierbar waren (siehe beispielhaft für DOPE und DMPG in Abb. 3.20). Für das Glycolipid GM1 wurden geringere Verluste der Intensitäten gemessen (Daten nicht gezeigt). Um die tatsächliche Zusammensetzung der Proben zu erfassen, mussten die Isolate also immer frisch extrahiert gemessen werden. Die Extrakte wurden zudem zwischen den Messungen in Chloroform/Methanol-Mischungen ohne Ammoniakzusatz bei -20°C aufbewahrt, in denen im entsprechenden Zeitraum keine Veränderungen der Zusammensetzung beobachtet wurden.





3.5.3. Ladungszustand und Dimerbildung der detektierten Substanzen

Die gemessenen Substanzen traten überwiegend als einfach geladenen Spezies auf. Bei den Messungen der Standards wurden für das Glycolipid GM1 neben den einfach geladenen auch doppelt geladene Spezies bei m/z [M+2H]/2 detektiert (Abb. 3.17). In den Zellextrakten konnten dagegen zweifach geladene Spezies nicht detektiert werden.

Um die Dimerbildung zu untersuchen, wurden Konzentrationsreihen verschiedener synthetischer Standards gemessen. Während PC schon ab Konzentrationen von 0,5 pmol/µL Dimere bildete (Abb. 3.21), wurde eine Dimerbildung bei PG auch bei einer Konzentration von 50 pmol/µL nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies spiegelt sich auch in den Messungen der Zellextrakte wider. Für PC ist in allen Messungen eine Dimerbildung zu beobachten (siehe Kapitel 3.7.1). Bei den Messungen der Gesamtlipidextrakte wurde zusätzlich eine Dimerbildung bei PE beobachtet. Eine Dimerbildung der Lipide bei ESI FT-ICR Messungen ist also offenbar abhängig von der eingesetzten Konzentration der Probenlösung und der Substanzen. Titration Kopfgruppe der Eine der Extrakte zur optimalen Konzentrationseinstellung für jede Lipidklasse konnte aufgrund der geringen Probenmenge und des sehr hohen Messaufwandes nicht durchgeführt werden. Jedoch wurden die Dimerintensitäten von PC und PE bei der Auswertung mit berechnet.



Abbildung 3.21: Dimerbildung von DOPC im positiven Ionenmodus. Gemessen wurden verschiedene Konzentrationen DOPC in der mobilen Phase A mittels *offline* ESI-FTMS. Gezeigt sind die absoluten Signalintensitäten der Monomere und Dimere. Eine Dimerbildung setzt bereits bei einer Konzentration von 0,5 pmol/µL ein. Gezeigt ist der Bereich bis zu einer Konzentration von 50 pmol/µL (a) und der Auschnitt bis 1 pmol/µL im Detail (b).

3.5.4. Messgenauigkeiten und Massenauflösung

Eine Analytik mittels FT-Massenspektrometrie zeichnet sich besonders durch das erreichbare hohe Auflösungsvermögen und die hohen Messgenauigkeiten aus. Bei der Analytik von heterogenen Mischungen tragen beide Faktoren zu einer eindeutigen und schnellen Identifizierung der gemessenen Substanzen bei. Die hohe Auflösung
der Spektren macht es möglich, bezüglich der Masse sehr nahe beieinander liegende Spezies innerhalb einer Probe direkt zu identifizieren (siehe Kapitel 1.2.4). Die geringen Massenabweichungen zwischen kalkulierter und detektierter Molekülmasse erlauben eine direkte Identifikation der einzelnen Spezies, die so ohne zeitaufwändige MS/MS-Experimente durchführbar ist.

Die im Breitbandmodus (Massenbereich 200-2500 u) durchgeführten Messungen bei einer extern durchgeführten Kalibrierung im Allgemeinen führten zu Massengenauigkeiten im Bereich von < 5 ppm. Die Messgenauigkeiten für die verwendeten Lipidstandards der Messung aus Abb. 3.9a sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Es handelte sich hierbei um eine offline-ESI-FTMS Messung ohne eine Vortrennung der Substanzen. Die Daten konnten daher direkt aus dem Datenerfassungsprogramm XMass übernommen werden. Das Spektrum wurde im Breitbandmodus bei einer Sampling-Rate von 512 k aufgenommen. Die größte Abweichung in der Massengenauigkeit zwischen kalkulierter und detektierter Masse zeigte DMPG mit 3,7 ppm. Diese Ionenspezies wies im Spektrum die höchste Intensität auf. Die Auflösung der Messungen lag im Massenbereich m/z < 1000 um 40000, bei höheren *m/z* - Verhältnissen um 17000 (für GM1).

Molokül	M _{gemessen}	M _{berechnet}	ΔM=M _{berechnet}	ΔM/M	Auflösung
MOIEKUI	[u]	[u]	-M _{gemessen} [u]	[ppm]	R=M/δM
[Ceramid 18:0-H]	564,5359	564,5356	0,0003	0,5	38700
[PG 28:0-H] ⁻	665,4369	665,4394	0,0025	3,7	46400
[PS 28:0-H] ⁻	678,4347	678,4346	0,0001	0,1	46400
[PE 36:2-H] ⁻	742,5380	742,5387	0,0007	0,9	42400
[PI 38:4-H] ⁻	885,5475	885,5493	0,0018	2	35600
[GM1 18:0-H] ⁻	1544,8653	1544,8688	0,0035	2,3	16900

δM: Breite des Signals bei halbem Maximum

Tabelle 3.2: Messgenauigkeiten für einzelne Substanzen einer offline ESI-FTMS Messung. Daten des Spektrums aus Abb.3.9a. Die Daten wurden direkt aus *XMass* übernommen. Die Massengenauigkeiten lagen zwischen 0,1 und 3,7 ppm. Die erreichten Auflösungen liegen zwischen 17000 für die höheren Massenbereiche und um 40000 für *m/z* < 1000. Die Daten wurden im Breitbandmodus (*m/z* 200-2500) mit einer Sampling-Rate von 512 k aufgenommen.

ERGEBNISSE

Es wurde nun überprüft, ob die hohe Messgenauigkeit auch während einer online-Messung einer heterogenen biologischen Probe erhalten bleibt. In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse für einige ausgewählte Substanzen einer DRM-Lipidextraktion nach einem LC-MS Lauf gezeigt. Die einzelnen Spektren wurden im Breitbandmodus (*m*/z 250-2500) bei einer Sampling-Rate von 512 k aufgenommen. Im negativen Ionenmodus lagen die Massenabweichungen zwischen 0,25 und 4,2 ppm und waren somit im Mittel etwas höher als die Abweichungen der offline-Messungen in Tabelle 3.2. Die Auflösung der Signale lag bei m/z < 1000 um die 65000. Die Auflösung im Bereich m/z > 1000 liegt um 35000 (PC-Dimere, Daten nicht gezeigt). Auffallend ist dabei, dass die online-Messungen eine höhere Auflösung zeigten. Dies könnte durch eine geringfügig andere Einstellung des aufgenommenen Massenbereiches (m/z 200-2500 bzw. m/z 250-2500) zustande kommen. Die Vortrennung der Substanzen und somit eine Reduktion der Ionen in der Zelle im Gegensatz zu einer offline-Messung der Probe spielt im gezeigten Vergleich keine große Rolle, da in der offline-Messung eine wenig heterogene Lipidstandardmischung aus wenigen Spezies und ohne eine Kontamination verwendet wurde. Die Daten der Auflösung der Signale wurden aus XMass zum jeweiligen Zeitpunkt der höchsten Intensitäten übernommen.

Molokül	M _{gemessen}	M _{berechnet}	∆M=M _{berechnet}	ΔΜ/Μ	Auflösung
WOICKUI	[u]	[u]	-M _{gemessen} [u]	[ppm]	R=M/δM *
[Ceramid 24:1-H]	646,6111	646,6138	0,0027	4,2	67300
[PG 34:2-H] ⁻	745,5001	745,5020	0,0019	2,5	71400
[PS 36:1-H] ⁻	788,5432	788,5442	0,001	1,3	63200
[PE 34:1-H] ⁻	716,5203	716,5230	0,0028	3,9	67100
[PI 38:4-H] ⁻	885,5511	885,5493	0,0018	2	59400
[PC 36:2+H] ⁺	786,6011	786,6013	0,0002	0,25	63300

*δM: Breite des Signals bei halbem Maximum

Tabelle 3.3: Messgenauigkeiten für einzelne Substanzen der online ESI-FTMS Messung einer DRM-Lipidextraktion nach LC-Vortrennung. Die Daten wurden aus *Data Analysis* übernommen. Die Massengenauigkeiten lagen zwischen 0,25 und 4,2 ppm. Die Auflösungen lag um die 65000 bei m/z < 1000. Die Daten wurden im Breitbandmodus (m/z 250-2500) mit einer Sampling-Rate von 512 k aufgenommen. Die online-Messung eines LC-Laufes unterscheidet sich von offline-Messungen heterogener Proben in mehreren Punkten. Im Gegensatz zu einer offline-Messung wird bei LC-MS Läufen eine Substanz über einen weitaus längeren Zeitraum detektiert. Während im ersteren Fall üblicherweise 50 Transiente zu einem Spektrum aufsummiert werden (ein Zeitraum von etwa 1 min bei den gängigen Flussraten), wird im letzteren Fall die Substanz über ihre gesamte Elutionszeit in entsprechend vielen Spektren erfasst. Die Elutionszeiten übertreffen im Allgemeinen die Zeitdauer von 1 min (siehe Beispiel PI in Abb. 3.18a). Darüber hinaus sind durch die vielen unterschiedlichen Probenmoleküle sowie durch eventuelle Kontaminationen bei offline Messungen weitaus mehr Substanzen in der Quelle und Ionen in der ICR-Zelle als bei Messungen von vorgetrennten Proben. Dies wirkt sich, überschreiten die Konzentrationen einen bestimmten Schwellenwert, negativ auf die Messgenauigkeit des Gerätes und die Auflösung der Spektren aus. Zudem müssen die Daten der LC-Läufe über das Auswerteprogramm Data Analysis (DA) erhoben werden, welches im Erkennen des monoisotopischen Peaks teilweise geringfügig andere m/z-Werte als XMass liefert (Daten nicht gezeigt).

3.5.4.1. Auflösung der Etherlipid-Signale

Bei dem in Kapitel 1.2.4 vorgestellten Kendrick-Plot ist der kleinste auftretende Massenabstand der monoisotopischen Peaks verschiedener Phospholipidspezies $\Delta m = 0,0365$ u, dies entspricht einer Abweichung zwischen den Spezies von etwa 50 ppm. Liegt anstatt eines Diacyl-Moleküls ein Alkyl-Acyl-Molekül vor, so verschiebt sich die Masse des Moleküls bei einer zusätzlichen CH₂-Gruppe der Etherlipidspezies um diesen Wert (Abb. 3.22). Die hohe Massengenauigkeit der FTMS erlaubt eine klare Unterscheidung zwischen den Spezies.



Abbildung 3.22: Massenverschiebungen der Etherlipide. Aufgrund der Etherbindung am C-1-Kohlenstoff des Glycerolrückgrates ergibt sich bei Etherlipidspezies eine von den Diacyl-Spezies abweichende Elementarzusammensetzung. pPC = Plasmanyl- bzw. Plasmenyl-PC.

Im in Abbildung 3.23 gezeigten Spektrum einer DRM-Lipidextraktion waren eine Diacyl-PC-Spezies (*m*/*z* 720,5534) als auch eine Alkyl-Acyl-PC Spezies mit einer zusätzlichen CH₂-Gruppe (*m*/*z* 720,5899) nachzuweisen. Die beiden Spezies können in diesem Massenbereich ab einer Auflösung von 22000 getrennt werden. Im verwendeten LC-System eluierten Diacyl- und die identifizierten Etherlipidspezies einer Lipidklasse gleichzeitig. Die Zuordnung anhand der exakten Molekülmassen verhinderte eine Verwechslung mit dem Isotopenpeak der zwei ¹³C-Atome enthaltenden Alkyl-Acyl-PC Spezies bei *m*/*z* 718,5749. Der zweite ¹³C–Isotopenpeak dieser Spezies und das Signal bei *m*/*z* 720,5899 konnten nicht aufgelöst werden (siehe Kapitel 2.2.2.8). Ob eine Plasmenyl- oder Plasmanyl-Spezies (siehe Kapitel 1.2.1.1) vorliegt, kann ohne MS/MS-Analysen nicht aufgeklärt werden. Etherlipide wurden in den Zellextrakten für PE und PC nachgewiesen.



Abbildung 3.23: Aufgelöste Signale für DiacyI-PC 31:0 [M+H]⁺ 720,5534 *m/z* und AlkyI-AcyI-PC 32:0 [M+H]⁺ 720,5899 *m/z*. Ausschnitt des LC-MS Laufes einer DRM-Lipidextraktion. Massenspektrum bei 38,7 min im positiven Ionenmodus. Die absolute Massendifferenz der zwei Spezies betrug 0,03652 u. Eine Verwechslung mit dem zweiten ¹³C-Isotopenpeak der Spezies der monoisotopischen Masse bei 718,5749 *m/z* konnte ausgeschlossen werden.

3.5.5. Absolute Nachweisgrenzen

Unter der Berücksichtigung eines Signal-Rausch Verhältnisses von größer als 3 lagen die erreichbaren absoluten Nachweisgrenzen für Lipidstandards im unteren

Femtomol-Bereich. Durch die Optimierung der Spannungseinstellungen in der Ionenquelle (insbesondere der Spannung am Kapillarausgang – *capexit* Spannung) konnten die Nachweisgrenzen noch verbessert werden. Dies ist in Abbildung 3.24 am Beispiel von PE exemplarisch gezeigt. Die Nachweisempfindlichkeit im negativen Ionenmodus wurde durch eine *capexit*-Spannung von 140 V erhöht. Eine weitere Erhöhung der Spannung auf 200 V erbrachte keine signifikante weitere Verbesserung. Im positiven Modus ging die Nachweisempfindlichkeit nach einer Verbesserung bei 140 V bei einer Erhöhung der Spannung auf 200 V wieder zurück. Bei den Messungen der Zellextrakte wurde für eine sensitive Detektion eine *capexit*-Spannung von 140 V gewählt.



Abbildung 3.24: Messung des synthetischen Standards DOPE bei verschiedenen *capexit*-Spannungen. Angegeben ist das Signal zu Rausch-Verhältnis der Signale. Die verwendete DOPE-Konzentration betrug 250 fmol/µL in Chloroform/Methanol 80:20. Gemessen wurde mit *capexit*-Spannungen von 100, 140 und 200 Volt, links im negativen, rechts im positiven Ionenmodus. Die Nachweisempfindlichkeit wird in beiden Ionenmodi durch eine auf 140 V erhöhte *capexit*-Spannung verbessert.

Für die Messungen an Lipidstandards wurde ebenfalls diese Einstellung verwendet. Da es sich bei TX-100 um ein stabiles Moleküle handelt, führt die Erhöhung der *capexit*-Spannung nicht zu einer Unterdrückung der TX-100 Kontaminationen der Probe. Allerdings verbessert sich die Detektion von unterrepräsentierten Spezies in der Probe, da eine größere Anzahl an Lipidsignalen deutlich über ein Signal-Rausch Verhältnis von 3 kommen, das als Detektionsgrenze gewählt wurde.

DMPG, DOPC, SM 18:1 sowie Ceramid 18:0 konnten in *offline*-Messungen bereits in einer Konzentration um 20 fmol/µL detektiert werden. Dies entspricht bei einer Flussrate an der ESI-Quelle von 2 µL/min und einer Messdauer von 30 s einer absoluten Menge von 20 fmol. Die Nachweisgrenzen für DOPE, DMPS und PI lagen um 40 fmol. Die zu den Glycolipiden gehörenden Cerebroside und GM1 liessen sich bei den durchgeführten Messungen ab einer absoluten Menge von 120 fmol nachweisen. Bei den LC-MS Läufen wurden unter allen verwendeten Lipiden DMPG und DOPC mit 60 fmol bzw. 45 fmol am sensitivsten nachgewiesen. PI, DOPE und SM können ab 100 fmol detektiert werden. Die höchsten Nachweisgrenzen (um 600 fmol) hatten DMPS, Ceramid 18:0 und GM1.

3.5.6. Lineare Responsivität des Gerätes

Für eine quantitative Auswertung bzw. einen relativen Vergleich der Häufigkeiten der einzelnen Lipidklassen und Spezies musste sichergestellt sein, dass sich die gemessenen Signalstärken linear zur Konzentration der gemessenen Substanzen verhielten. Um den dynamischen Bereich des Gerätes festzustellen, wurden Messreihen mit verschiedenen Konzentrationen an synthetischen Standardlipiden durchgeführt. Abbildung 3.25 zeigt die Signalstärke aufgetragen gegen die Konzentration exemplarisch für Messungen von DMPG im negativen Ionenmodus. Die Responsivität verhielt sich über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich von 0,031 pmol/µL bis 25 pmol/µL linear. Im positiven Ionenmodus wurde das Experiment mit PC durchgeführt. Dabei ergaben sich geringfügig schlechtere Werte als für PG im negativen Ionenmodus (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 3.25: Dynamischer Bereich des FTMS im negativen Ionenmodus am Beispiel DMPG. Die Signalintensitäten verhalten von synthetischem sich über der Probenkonzentration über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich (0,031 bis 25 µM) linear. Im gezeigten Ausschnitt links oben im Bild ist der Konzentrationsbereich bis detailliert dargestellt, da sich hier die verwendeten Konzentrationen der 1 µM Standardsubstanzen bewegen. Der lineare Regressionskoeffizient (R²) ist mit angegeben. Als Spraylösung diente die mobile Phase A, die capexit-Spannung betrug 140 V.

3.6. Quantifizierung

Um Vergleiche zwischen Proben verschiedenen Ursprunges möglich zu machen und um insbesondere Änderungen zwischen gesunden und pathogenen Zuständen in der Lipidkomposition von Zellen z.B. in verschiedenen Stadien von Zellen oder Krankheiten zu erfassen, muss die Lipidanalytik verlässliche quantitative Daten liefern. Nach Erfassung des dynamischen Bereiches des FTMS, den erreichbaren Messgenauigkeiten und den optimierten Geräteeinstellungen (Beispiel *capexit*-Spannungen), musste nun eine Methode gefunden werden, die es erlaubt, die Intensitäten der erhaltenden Massendaten aller Lipidklassen zu normieren. Für eine Quantifizierung der verschiedenen Lipide in biologischen Proben müssen verschiedene Punkte beachtet werden, die im Folgenden kurz aufgeführt werden.

ERGEBNISSE

Zunächst muss für einen direkten Vergleich zwischen verschiedenen Proben der Lipidgehalt der Probe standardisiert werden. In dieser Arbeit wurden die DRM jeweils aus der gleichen Anzahl Zellen isoliert, d.h. die daraus extrahierte Lipidmenge entspricht, soweit nicht anders vermerkt, einem Zellzahläquivalent von 1x10⁶ (siehe Kapitel 3.5.3). Zur Messung der jeweiligen Probe wurden immer die gleichen Volumina dieses - auf die Zellzahl eingestellten - Extraktes eingesetzt. Des Weiteren müssen für eine Quantifizierung die relativen Nachweisempfindlichkeiten der einzelnen Lipidklassen und –spezies beachtet werden, sowie die Änderung dieser in den durch den HPLC-Gradienten bedingten unterschiedlichen ESI-Spraylösungen. Bei den Messungen der Intensitäten der einzelnen Spezies müssen die Intensitäten der verschiedenen Quasimolekülionen (siehe 2.2.8) aufsummiert werden. Die erhaltenden Daten müssen abschließend gegenüber einem internen Standard normiert werden. Dies ist auch wichtig, um eventuelle Schwankungen in der Geräteperformance zu korrigieren.

3.6.1. Relative Nachweisempfindlichkeiten der Lipidspezies

3.6.1.1. Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeiten von den Fettsäurekettenlängen

Der am stärksten zur Ionisationseffizienz beitragende Faktor für Lipide ist die jeweilige polare Kopfgruppe ¹²⁸. Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß auch die Struktur der Fettsäureketten zur Ionisationseffizienz bzw. zur Detektion der einzelnen Lipide beiträgt, wurde eine äquiomolare Mischung verschiedener synthetischer PE Spezies untersucht. Die eingesetzten Substanzen variierten in der Länge ihrer Fettsäurereste und in ihrem Sättigungsgrad (PE 12:0, PE 20:0, PE 32:0 und PE 36:2).

Die einzelnen Spezies zeigten alle gleiche Nachweisempfindlichkeiten (Abb. 3.26). Lediglich die sehr kurzkettige, unphysiologische PE Spezies mit zwei C 6-Fettsäureresten lieferte Signale mit geringeren Intensitäten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass innerhalb einer Lipidklasse Spezies mit einer unterschiedlichen Bruttofettsäurekomposition, die im Bereich der natürlich vorkommenden Längen liegt, gleich gut ionisiert und nachgewiesen werden.



Abbildung 3.26: Nachweis verschiedener PE-Spezies. Die extrem kurzkettige und natürlicherweise nicht vorkommende 12:0 Spezies zeigte eine leicht verminderte Nachweisempfindlichkeit, PE 20:0 sowie die auch natürlich vorkommenden Spezies PE 32:0 und PE 36:2 zeigten in der Nachweisempfindlichkeit keine Unterschiede. Die verwendete Spraylösung war die mobile Phase A, dargestellt sind die Ergebnisse der Messungen im negativen Ionenmodus. Die Konzentration der Proben betrug 1, 3 und 5 pmol/µL.

3.6.1.2. Abhängigkeit der Nachweisempfindlichkeiten von den Kopfgruppen und von der ESI-Spraylösung

Wie im vorigen Kapitel gezeigt, ist die Nachweisempfindlichkeit eines Lipids weitestgehend unabhängig von der Komposition der Fettsäurereste. Im Folgenden wurde nun der Einfluss der unterschiedlichen polaren Kopfgruppen auf den Nachweis untersucht. der einzelnen Klassen Die Nachweisempfindlichkeiten der Probensubstanzen richten sich primär nach der Effizienz der Ionisation der Substanzen in der Quelle. Diese ist durch die physikochemischen Eigenschaften des Analytmoleküls bestimmt und kann durch das verwendete Lösungsmittelgemisch, bzw. darin enthaltende Zusätze, beeinflusst werden. Um die verschiedenen Lipidklassen untereinander guantitativ zu vergleichen, müssen ihre relativen Nachweisempfindlichkeiten in den Lösungsmittelverhältnissen bestimmt werden, die zum Zeitpunkt ihrer Elution herrschen, und entsprechende Korrekturfaktoren ermittelt werden.

ERGEBNISSE

Zunächst wurde ein äquimolarer Lipidmix unter gleichbleibenden Bedingungen in verschiedenen Lösungsmittelsystemen erfasst. Verwendet wurden dabei ein für den jeweiligen Ionenmodus in den Zusätzen angepasstes Lösungsmittelsystem und eine Chloroform/Methanol-Mischung ohne Zusätze. Für die Messungen im negativen Ionenmodus wurde ein Chloroform/Methanol Gemisch mit 0,3% Ammoniaklösung 28-30% versetzt, um eine optimale Deprotonierung der Analyte zu gewährleisten. Dabei zeigte PG in der Spraylösung mit Ammoniakzusatz die stärksten Signalintensitäten, gefolgt von PI, PE und PS. Die Spraylösung ohne Zusätze führte zu einer absteigenden Intensitätsstärke von PG über PI, PS und PE (Abb. 3.27). Der Zusatz von Ammoniak wirkte sich also positiv auf die Detektion von PE und PI aus.

Für die Messungen im positiven Ionenmodus wurde ein Chloroform/Methanol-Gemisch mit 2% Essigsäure versetzt, um die Protonierung der Analyte zu unterstützen. Weitere Versuche erfolgten mit einer Spraylösung ohne Zusätze. Dabei zeigte in beiden Spraylösungen PC die stärksten Signalintensitäten, gefolgt von PE und SM (Abb. 3.27). Während sich die relative Nachweisempfindlichkeit von PC zu SM im Vergleich der beiden Spraylösungen kaum änderte, wurde PE im Spray ohne Zusätze in Relation zu PC schlechter detektiert.



Abbildung 3.27: Vergleich der relativen Intensitäten verschiedener synthetischer Lipidstandards in unterschiedlichen Spraylösungen. Im a) negativen Ionenmodus werden beispielhaft die Messungen der Substanzen DMPG, DOPE, DMPS und PI in Chloroform/Methanol 50:50 (v/v) + 0,3% Ammoniaklösung 28-30% und Chloroform/Methanol 4:1 (v/v) gezeigt. Im b) positiven Ionenmodus werden die Signale von DOPC, DOPE und SM 18:0 in Chloroform/Methanol/Essigsäure 49:49:2 (v/v/v) und in Chloroform/Methanol 4:1 (v/v) gezeigt. Gemessen wurde ein Lipidgemisch in einer Konzentration von 1 μ M je Lipid.

Wie oben gezeigt, änderten sich die relativen Nachweisempfindlichkeiten der verschiedenen Lipidklassen mit der Wahl des Lösungsmittels, mit dem sie in die ESI

ERGEBNISSE

Quelle gelangen. Durch eine direkte Kopplung der HPLC an die ESI Quelle war die verwendete ESI-Spraylösung bereits determiniert, sie bestand dann aus der mobilen Phase des LC-Laufes. Durch den angelegten Gradienten änderte sich die Spraylösung über die Dauer des Laufes. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Lipidklassen zu erreichen, wurden Lipidstandards in dem Lösungsmittelgemisch analysiert, welches ihren Retentionszeiten in der LC entsprach. Aus diesen Experimenten wurden die Korrekturfaktoren für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Lipidklassen in den durchgeführten LC-MS Läufen der Zellextrakte erstellt (Tab. 3.4). Bei der Faktorberechnung mussten außerdem die unterschiedlichen Nachweisintensitäten von PE in den verschiedenen Lösungsmittelsystemen mit beachtet werden, da PE als interner Standard genutzt wurde (siehe Kapitel 3.6.2).

Lösungsmittelsystem CHCl ₃ /CH ₃ OH/NH ₃ 28-30%	eluierende Lip und Ionenr	oidklasse nodus	Faktor relativ zu PE		Faktor PE im jeweiligen Lösungsmittelsystem	Ermittelter Faktor Normierung au	ren zur If PE
	neg	pos			pos/neg	neg	pos
86/13/1	Ceramid	#	2,25	#	0,79	Cer: 1,78	#
78/21/1	PG	#	9,58	#	0,59	PG: 5,65	#
66/33/1	PE	PE	1	1	1	PE: 1	PE: 1
55/44/1	PI	PC	1,38	5,40	1,21	PI: 1,67	PC: 6,53
50/49/1	PS	SM	2,83	0,34	0,71	PS: 2,01	SM: 0,24

Tabelle 3.4: Einfluss der sich ändernden mobilen Phase der LC auf die Nachweisempfindlichkeiten der verschiedenen Lipidstandards. Als Referenzsubstanz diente PE. Die Faktoren errechnen sich aus den jeweils relativen Nachweisintensitäten der verschiedenen Lipidklassen in den entsprechenden Lösungsmittelsystemen zur Elutionszeit der jeweiligen Substanz. Mit eingerechnet ist der Faktor, der die in verschiedenen Lösungsmittelsystemen unterschiedliche Responsivität von PE selbst beachtet.

3.6.2. Interner Standard

Mit Hilfe der relativen Nachweisempfindlichkeiten des eingesetzten internen Standards gegenüber anderen Lipidklassen können nun Aussagen über die relative Verteilung von Lipiden unterschiedlicher Klassen und Spezies in einer Probe gemacht werden. Als interner Standard wurde PE 20:0 gewählt, der in beiden Ionenmodi detektierbar ist. Die gemessenen Intensitäten des Standards wurden sowohl im negativen als auch im positiven Ionenmodus dafür genutzt, die einzelnen Spektren zu normieren. Er kommt als sehr kurzkettige Substanz in Isolaten aus natürlichen Proben nicht vor. Das von ihm erzeugte Signal war also komplett dem internen Standard zuzuordnen. Der Standard wurde direkt vor der Injektion in die HPLC zum Lipidextrakt hinzugegeben. Es wurde bei jedem LC-Lauf 1 ng absolute Menge des internen Standards zusammen mit der Probe injiziert. Da durch die in Kapitel 3.6.1.1 beschriebenen Versuche sichergestellt werden konnte, dass innerhalb einer Lipidklasse die unterschiedlichen Spezies der verschiedenen Fettsäurekettenlängen in gleichen Intensitäten detektiert wurden, konnte mit lediglich einem internen Standard gearbeitet werden.

3.6.3. Auswerteschema

Nach der qualitativen Auswertung der Daten mittels PeakID (siehe Kapitel 2.2.2.8) erfolgte die quantitative Auswertung. Hierzu wurden die unterschiedlichen Nachweisempfindlichkeiten der einzelnen Lipidklassen (siehe Kapitel 3.6.1) und das relative Vorkommen der Klassen und Spezies in den einzelnen zellulären Proben berücksichtigt. Die Normierung erfolgte über die am stärksten auftretenden Signale einer Klasse. Da Spezies mit geringer Intensität durch den erhöhten Untergrund des gemittelten Gesamtspektrums darin nicht sicher zu detektieren waren, wurden die Bereiche, in denen die einzelnen Lipidklassen eluierten, zusätzlich einzeln aufsummiert, um eine detailliertere Analytik durchführen zu können. Durch die in Kapitel 3.6.1 ermittelten Korrekturfaktoren war es nun möglich, die Daten quantitativ auszuwerten. Die Auswertung ist in Abbildung 3.28 als Flussdiagramm dargestellt.



Abbildung 3.28: Schema der Auswertung der einzelnen Läufe zur Erhebung der quantitativen Daten. Die einzelnden, hintereinander ausgeführten Schritte der Datenprozessierung sind aufgeführt. Als Resultat konnen die Daten unterschiedlicher Proben direkt verglichen werden.

3.7. Lipidanalytik der zellulären Extrakte

Nach dem oben beschriebenen Aufbau der Methodik erfolgte nun die Anwendung der Analytik auf die Messungen der DRM-Lipidextrakte. Es wurden dabei DRM-Extrakte unstimulierter sowie LPS-stimulierter TLR4/MD2-transfizierter HEK-Zellen und der Gesamtlipidextrakt unstimulierter TLR4/MD2-transfizierter HEK-Zellen untersucht. Im Folgenden werden zunächst exemplarisch einige Messergebnisse im Detail gezeigt, um die prinzipielle Anwendbarkeit der Methodik auf heterogene biologische Proben zu zeigen. Im darauf folgenden Abschnitt werden drei Messungen einer Extraktion zusammengefasst, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu demonstrieren. Anschließend werden die Daten aller durchgeführten Messungen in Tabellen dargestellt. Es handelt sich dabei um erste Ergebnisse, die zur Absicherung weiter verifiziert werden sollten.

3.7.1. LC-MS Läufe der Extrakte

In Abbildung 3.29 ist der Totalionenstrom mit dazugehörigem 2D-Plot eines LC-MS Laufes extrahierter Lipide einer DRM-Dichtegradientenfraktion im negativen lonenmodus dargestellt. Die Spektren wurden im Breitbandmodus von m/z 200 bis m/z 2000 aufgenommen, allerdings wurden keine Massenpeaks oberhalb von m/z 1300 beobachtet. Eine Dimerbildung der im negativen Modus detektierten Substanzen trat nicht auf.



Abbildung 3.29: TIC und 2D-Plot des LC-MS Laufes eines DRM-Lipidextraktes im negativen lonenmodus. PG, PE, PI und PS wurden deutlich detektiert und sind im 2D-Plot sichtbar. Die Ceramide sind im dargestellten 2D-Plot nicht zu sehen, konnten aber in den Einzelspektren detektiert werden. Die typischen Muster der verschiedenen Fettsäurekettenlängen der Substanzen sind gut erkennbar. TX-100 wurde im negativen lonenmodus nicht sehr sensitiv detektiert und war nur am Beginn des Laufes nachzuweisen.

Im 2D-Plot war das charakteristische Verteilungsmuster der verschiedenen Fettsäurekettenkompositionen innerhalb einer Lipidklasse in der Aufsicht zu sehen. Abbildung 3.30 zeigt die Einzelspektren für zwei Elutionszeiten.





Dabei zeigt Teil a) ein Spektrum zum Zeitpunkt 34,3 Minuten, in dem dreizehn verschiedene Spezies für PI nachgewiesen wurden. Teil b) der Abbildung zeigt ein Spektrum zum Zeitpunkt 46,7 Minuten. Hier konnten zehn PS Spezies zugeordnet werden. In Abbildung 3.31 ist der LC-MS Lauf einer Lipidextraktion einer DRM-Fraktion im positiven Ionenmodus dargestellt. Im positiven Ionenmodus wurde TX-100 sehr sensitiv detektiert. Dennoch waren die einzelnen Lipidspezies, wie im Falle von PC gezeigt, sauber nachzuweisen (Abb. 3.32). Deutlich ist die Dimerbildung bei PC zu erkennen (siehe Kapitel 3.5.3). Die Signale des TX-100 waren im gezeigten Spektrum noch in geringen Intensitäten zu finden. Sphingomyelinspezies konnten anhand der genauen Massen zum erwarteten Elutionszeitpunkt identifiziert werden, auch wenn sie im abgebildeten 2D-Plot nicht so deutlich wie PE oder PC sichtbar sind.



Abbildung 3.31: TIC und 2D Plot des LC-MS Laufes eines DRM-Lipidextraktes im positiven lonenmodus. TX-100 wurde sehr sensitiv detektiert und eluierte über einen langen Zeitraum. Einzelspektren im Elutionsbereich von PE und PC zeigten trotzdem nur noch wenige TX-100-Signale. Bei PC war eine Dimerbildung zu beobachten. SM ist im dargestellten 2D-Plot nicht zu erkennen, konnte in Einzelspektren aber identifiziert werden.



Abbildung 3.32: Massenspektrum eines LC-MS Laufes einer DRM-Lipidextraktion. Spektrum zum Zeitpunkt 31,1 min. PC war im positiven Ionenmodus sehr sauber nachzuweisen. Alle im oberen Ausschnitt gezeigten Signale konnten PC-Monomeren zugeordnet werden. Lediglich das Signal bei *m/z* 708 stammte von Tritonresten.

3.7.2. MS/MS Analysen

Aufgrund der Bestimmung der Spezies anhand ihrer Elutionszeit einerseits und ihrer exakten Massen andererseits wurden MS/MS-Analysen lediglich an den im positiven lonenmodus nachgewiesenen Lipiden PC und PE durchgeführt. Diese haben aufgrund ihrer gleichen elementaren Zusammensetzung exakt die gleichen Massen (siehe 3.5.4.1). PC eluierte im verwendeten LC-System zeitlich nach PE, PE eluierte jedoch über einen langen Zeitraum und somit eventuell zumindest zum Teil zusammen mit PC. Um die Zuordnung zu verifizieren und eine Verwechslung einzelner Spezies auszuschließen, wurden MS/MS-Experimente mittels SORI-CID durchgeführt. Für die Tandem-MS Untersuchungen mussten die Substanzen nach der HPLC Auftrennung gesammelt und in nachfolgenden *offline*-Experimenten

analysiert werden. Mit unserer FTMS-Gerätekonfiguration war es nicht möglich, MS/MS-Experimente direkt während eines LC-MS Laufes durchzuführen. Das Sammeln der Fraktionen über die jeweiligen Elutionszeiten wurde dabei über das MS kontrolliert. Abbildung 3.33 zeigt beispielhaft ein MS/MS Experiment im positiven Ionenmodus der Molekülspezies bei m/z 760,5434. Die relativ große Massenabweichung der gemessenen zur berechneten exakten Masse kam durch die Peakzuordnung der Software zustande, die nach der SWIFT-Isolation leicht andere Ergebnisse lieferte. Das parent-ion wurde zuvor jedoch mit einer sehr geringen Massenabweichung identifiziert. Die Substanz eluierte zu PC-charakterisitischen Zeiten. Es konnte sich allerdings nach der genauen Masse sowohl um PC 34:1 [M+H]⁺ als auch um PE 37:1 [M+H]⁺ handeln. Aufgrund des geringen Probevolumens (einige µL) wurde die Analyse mittels Nano-ESI durchgeführt. Nach der erfolgreichen SWIFT-Isolation der Molekülspezies und der nachfolgenden Einleitung des Stoßgases (Anregung 37 dB, Anregungszeit 50 ms) war das für PC typische Cholinphosphatfragment bei *m*/z 184,072 nachzuweisen. MS/MS-Experimente weiterer parent ions führten zu gleichen Ergebnissen. PE und PC wurden durch die HPLC also vollständig getrennt, ohne dass einzelne Spezies sich überschnitten.



Abbildung 3.33: SORI-CID-Fragmentierungsspektrum der Molekülspezies bei m/z 760. Das per SWIFT isolierte Signal konnte im positiven Ionenmodus der PE Spezies 37:1 [M+H]⁺ oder der PC Spezies 34:1 [M+H]⁺ zugeordnet werden. Die Intensität des *parent ion* ging nach Einlass des Stoßgases deutlich zurück. Das charakteristische Fragment für Cholinphosphat bei m/z 184 war sehr prominent. Das *parent ion* war also zweifellos ein PC.

3.7.3. Verifizierung der Methodik

Im Folgenden werden die Daten der Messungen einer Lipidextraktion dargestellt. Es soll gezeigt werden, dass die Analytik reproduzierbare Ergebnisse liefert. Als Beispiel sind in Abbildung 3.34 und Tabelle 3.5. die Daten der Lipidklassen PI, PC und SM einer DRM-Lipidextraktion gezeigt. Die Identifizierung erfolgte durch PeakID. Der maximal zugelassene Fehler zur Identifikation der Spezies lag bei 10 ppm, wobei die meisten der detektierten Substanzen einen Fehler unter 4 ppm aufwiesen.



Abbildung 3.34: Verteilung der einzelnen Bruttofettsäurekompositionen von PI, PC und SM einer DRM-Lipidextraktion. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 3.5. dargestellt. Normiert wurde jeweils auf PI 34:1, PC 34:1 und SM 16:0. Die Standardabweichung von drei Messungen ist mit angegeben.

Die Daten zeigen die relativen Intensitäten der einzelnen Spezies innerhalb der dargestellten Lipidklasse und ergaben sich aus drei gemittelten Messungen. Normiert wurde innerhalb der jeweiligen Klasse auf die Spezies, die zur späteren Auswertung zu PE 20:0 in Relation gesetzt wurde. Es handelte sich dabei um einen oder den

dominanten Massenpeak der Fraktion, um ihn zur weiteren Auswertung in den über den gesamten Lauf gemittelten Daten mit PE 20:0 in Relation setzen zu können (siehe Kapitel 3.6.3). Die Standardabweichungen lagen im negativen Ionenmodus meist unter zwei, teilweise etwas höher bis zu 5% Abweichung. Im positiven Ionenmodus waren die Abweichungen insgesamt höher, sie lagen bei SM durchschnittlich knapp unter und für PC knapp über 10%. Ausreißer mit einem Fehler um 50% ergaben sich aus der fehlenden Detektion der jeweiligen Spezies in einer der drei Messungen, die als Wert Null in die Berechnung einfloss.

	PI	PC	SM	
30:2	n.d.	1,2 +/- 0,38	14:0	3,5 +/- 0,27
30:1	n.d.	1,9 +/- 0,01	15:0	3,5 +/- 0,19
30:0	n.d.	5,8 +/- 0,32	16:1	5,2 +/- 0,5
32:2	n.d.	2,8 +/- 0,13	16:0	100 +/- 8,95
32:1	5,6 +/- 0,24	37,1 +/- 0,47	18:1	1,2 +/- 0,6
32:0	1,3 +/- 0,65	n.d.	18:0	4,4 +/- 2,2
34:3	0,7 +/- 0,03	n.d.	24:1	9,1 +/- 4,5
34:2	20,1 +/- 0,51	17,3 +/- 0,84	24:0	6,7 +/- 3,3
34:1	100 +/- 1,16	100 +/- 2,51		
35:1	8,9 +/- 0,15	n.d.		
36:4	14,2 +/- 0,15	n.d.		
36:3	33,3 +/- 0,46	n.d.		
36:2	158,5 +/- 2,37	31,4 +/- 1,76		
36:1	161,4 +/- 4,3	n.d.		
37:3	10,0 +/- 0,06	n.d.		
37:2	10,0 +/- 0,15	n.d.		
37:1	n.d.	n.d.		
38:5	16,2 +/- 8,25	n.d.		
38:4	116,3 +/- 1,06	n.d.		
38:3	149,4 +/- 2,05	0,4 +/- 0,02		
38:2	70,4 +/- 2,7	1,6 +/- 0,02		
38:1	8,7 +/- 0,14	n.d.		
39:4	1,6 +/- 0,02	n.d.		
39:3	3,2 +/- 0,04	n.d.		
40:6	6,6 +/- 3,3	n.d.		
40:5	3,9 +/- 1,95	n.d.		
40:4	2,9 +/- 0,05	n.d.		
40:3	2,2 +/- 0,02	n.d.		
40:2	1,7 +/- 0,03	n.d.		
40:1	n.d.	n.d.		

Tabelle 3.5: Verteilung der einzelnen Bruttofettsäurekompositionen von PI, PC und SM einer DRM-Lipidextraktion. Werte zu Abbildung 3.34. Validierung der Analytik anhand von repräsentativen Beispielen für PI im negativen Ionenmodus und PC und SM im positiven Ionenmodus. Dargestellt sind die Daten dreier gemittelter LC-Läufe einer Probe. Die Daten sind jeweils auf die Spezies 34:1 bzw. 16:0 normiert. Mit angegeben ist die Standardabweichung einer Messreihe. n.d. = nicht detektiert.

3.7.4. Lipidanalytik an DRM aus unstimulierten und stimulierten Zellen

Die Messungen des Lipidgehaltes der DRM erfolgten an Lipidextraktionen nach Bligh und Dyer aus DRM-Dichtgradientfraktionen, die aus unstimulierten sowie aus mit LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen isoliert wurden. Dabei wurden die Messungen dreier unabhängiger Isolationen zusammengefasst.

Die relativen Peakintensitäten innerhalb einer Lipidklasse wurden wie in Kapitel 3.7.3. ermittelt. Anschließend wurden die Korrekturfaktoren für die Intensität eines der Hauptpeaks zur Referenzsubstanz PE 20:0 und die Korrekturfaktoren für die relativen Nachweisempfindlichkeiten der einzelnen Lipidklassen angewandt. Die Daten wurden über drei Messreihen gemittelt und berechnet. Spezies, die nur in zwei von drei Messungen detektiert wurden, flossen daher mit entsprechend hoher Standardabweichung in die Daten mit ein. Spezies, die in nur einer Messung detektiert wurden, wurden nicht beachtet. Beim Auftreten von Dimeren wurde die Gesamtintensität der Dimere auf die Monomerintensitäten anteilig aufgerechnet. Zusammenfassend konnten in den DRM Extrakten eine Anzahl von 118 sich in Bruttofettsäurekomposition Kopfgruppe, oder Fettsäureverknüpfung unterscheidenden Lipidspezies mit der verwendeten Methodik nachgewiesen werden.

3.7.4.1. Glycerophospholipide der DRM Extrakte

Tabelle 3.6. zeigt die auf PE 20:0 normierten Daten zur Verteilung der verschiedenen Lipidspezies in DRM-Fraktionen. Gezeigt sind die Daten der Extrakte aus unstimulierten und mit LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen.

unstimuliert LPS stimuliert unstimuliert	
	0,76 +/: 0,29 4,23 +/: 2,65 2,21 +/: 1,44 2,94 +/: 2,13
0,29 +/- 0,16	0,29
D	0
0,40 +/- 0,2 0,40	0,40
autorial (1995) 95-8410 96:0 30:0 32:0 34:0 34:0 Summe gesattigt	Summe gesättigt

Tabelle 3.6: Auf PE 20:0 normierte Daten der Glycerophospholipide der DRM-Dichtegradientenfraktionen. Die Extrakte stammten aus unstimulierten bzw. mit LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen. Die Standardabweichung gibt den Fehler dreier unabhängiger Extraktionen an.

ERGEBNISSE

3.7.4.2. Sphingolipide der DRM Extrakte

Die quantitativ erfassten Sphingolipide in dieser Arbeit waren Sphingomyelin und Ceramid. Alle weiteren Sphingolipide konnten in den Zellextrakten nicht reproduzierbar detektiert werden. Tabelle 3.7 zeigt die Daten der erfassten Sphingomyelin- und Ceramidspezies aus DRM-Lipidextraktionen. Die Proben stammten aus unstimulierten bzw. mit LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen.

DRM	SM		Cer	
	LPS stimuliert	unstimuliert	LPS stimuliert	unstim
gesättigt				
14:0	0,45 +/- 0,21	0,67 +/- 0,33		
15:0	0,47 +/- 0,24	0,75 +/- 0,39		
16:0	22,57 +/- 5,13	32,09 +/- 7,14	0,19 +/- 0,03	0,12 +/- 0,03
18:0	1,46 +/- 0,35	1,58 +/- 0,98	0,03 +/- 0,00	
22:0			0,04 +/- 0,00	
24:0		4,51 +/- 1,36	0,13 +/- 0,01	
einfach ungesättigt				
16:1	0,58 +/- 0,26	0,89 +/- 0,42		
18:1		0,36 +/- 0,21		
24:1		4,63 +/- 1,31	0,10 +/- 0,01	
Summe	25,53	45,48	0,49	0,12

Tabelle 3.7: Gehalt an Sphingomyelin und Ceramiden in den DRM-Extrakten. Gegenübergestellt sind die Daten der Extrakte aus stimulierten bzw. aus durch LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen. Referenzsubstanz ist PE 20:0 (=1). Es wurde über drei unabhängige Messungen gemittelt.

3.7.5. Gesamtlipidgehalt von TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen

Die Zellen der Gesamtlipidextraktion wurden vor der Lipidextraktion nicht durch LPS stimuliert. Zu beachten ist, dass es sich bei diesen Daten um die Auswertung dreier Messungen einer Probe handelte.

3.7.5.1. Glycerophospholipide

In Tabelle 3.8 sind die Daten der Messung eines Gesamtlipidextraktes aus TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen dargestellt.

Gesamtlipidextrakt							
Lipidklasse	PI	PG	PS	PE	pPE	PC	pPC
Fettsäuren (brutto)							
gesättigt							
28:0						7,68 +/- 5,97	
30:0						65,89 +/- 8,59	
32:0		0,60 +/- 0,02					
Summe gesättigt	0,00	0,60	0	0	0	73,57	0
einfach ungesättigt							
28:1							
30:1						31,17 +/- 4,97	
31:1	4 49	0,08 +/- 0,04	0.04			040 70 . / 04 50	
32:1	1,13 +/- 0,024	1,55 +/- 0,02	0,34 +/- 0,01			219,73 +/- 21,59	
33.1	40.00 1/ 0.40	0,39 +/- 0,01	2 24 1/ 0.02	42 52 1/ 0.02		250 50 1/ 400 07	
34:1	16,90 +/- 0,48	11,68 +/- 0,26	2,81 +/- 0,03	13,52 +/- 0,03		250,59 +/- 132,37	
35:1	1,45 +/- 0,02	1,10 +/- 0,06	0,37 +/- 0,02	0.02 1/ 0.02			
30.1	24,34 +/- 0,80		3,36 +/- 0,09	0,93 +/- 0,03			
37.1			0.26 +/ 0.00				
30.1	∦		0,20 +/- 0,00				
40.1			0,23 +/- 0,00				
42.1							
Summa ainfach ungacättigt	42.02	14.90	7.64	22.45	0	501.40	0
Summe ennach ungesattigt	43,03	14,00	7,01	22,45	U	501,49	U
mohrfoch ungooöttigt							
mennach ungesattigt							
30.0						14 87 +/ 263	
32.2					0 27 +/- 0 04	14,07 1/- 2,03	
33.0					0,27 +/- 0,04		
34:6					1,42 +/- 0,00		
34:5					1,31 +/- 0,31		
34:4					1,12 17-0,17	038+/-036	
34.4						0,50 +/- 0,30	
34:2	3 20 +/- 0 03	6 56 +/- 0 10	0 12 +/- 0 06			93 87 +/- 24 13	
35:6	3,20 17- 0,03	0,00 17-0,15	0,12 1/- 0,00		4 47 +/- 0 73	33,07 17-24,13	
35:5					1 63 +/- 0 22		
35:2	0 52 +/- 0 25	1 53 +/- 0 03		492 +/- 0.08	1,00 17 0,22		
36:6	0,02 1/- 0,25	1,00 17- 0,00		4,02 1/- 0,00	6 64 +/- 0 92		16 08 +/- 5 25
36:5					6 61 +/- 0 63		10,00 17 0,20
36:4	4.03 +/- 0.20	0.34 +/- 0.02		1.10 +/- 0.09	2.50 +/- 0.33		
36:3	4 92 +/- 0 19	2 70 +/- 0 09		1 54 +/- 0 04	_,	4 21 +/- 4 02	
36:2	23.38 +/- 0.32	38.18 +/- 0.36	1.15 +/- 0.02	17.03 +/- 0.02		227.27 +/- 44.22	
37.7	20,00 17 0,02	00,10 17 0,00	1,10 17 0,02	11,00 17 0,02			7.51 +/- 6 6
37.6					1.09 +/- 0.22		.,
37.4	0.43 +/- 0.21				.,	1	
37:3	1.45 +/- 0.04					1	
37.2	1.48 +/- 0.01	0.58 +/- 0 01					
38:7	, , , , ,,,,	.,,,.,.,.	1	1	16,03 +/- 6.13		
38:6	li l	1	1	1	30,01 +/- 5.88		
38:5					6,22 +/- 1,13		
38:4	28,58 +/- 1,72	1,25 +/- 0,04	0,26 +/- 0,01	6,08 +/- 0,03	1,64 +/- 0,23	2,0 +/- 1,91	
38:3	24,28 +/- 1,19	0,84 +/- 0,01	0,20 +/- 0,00		0,76 +/- 0,12	3,48 +/- 3,33	
38:2	7,14 +/- 3,43	1,31 +/- 0,03	0,20 +/- 0,00	1,03 +/- 0,03	1,00 +/- 0,13	13,34 +/- 2,08	
39:7					4,56 +/- 1,87		
39:3	0,30 +/- 0,16						
40:8					6,24 +/- 4,87		
40:7					5,90 +/- 1,00		
40:6					2,78 +/- 0,39		
40:5					0,40 +/- 0,21		
40:3	0,27 +/- 0,01						
40:2	0,19 +/- 0,09					0,62 +/- 0,60	
Summe mehrfach ungesättigt	100,18	53,28	1,95	31,70	102,19	360,50	23,59
	li l						
Summe	144.01	68.68	9.55	54.16	102.19	935.56	23.59
L	,	,	-,	,	,	,	=-,

Tabelle 3.8: Daten der Gesamtlipidextraktion von TLR4/MD2-transfizierten, nichtstimulierten HEK-Zellen. Die Standardabweichung gibt hier im Gegensatz zu Tabelle 3.6.den Fehler von drei Messungen einer Probe an. PE 20:0 diente als Referenzsubstanz.

3.7.5.2. Sphingolipide

Tabelle 3.9. zeigt den Sphingomyelin und Ceramidgehalt einer Gesamtlipidextraktion aus TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen.

Gesamtlipidextrakt		
	SM	Ceramid
gesättigt		
14:0		
15:0	2,70 +/- 0,81	
16:0	111,80 +/- 38,94	
18:0	10,39 +/- 5,03	
22:0		
24:0	11,63 +/- 8,69	
einfach ungesättigt		
16:1	19,43 +/- 17,99	0,24 +/- 0,09
18:1	1,85 +/- 1,02	0,11 +/- 0,00
24:1	15,24 +/- 11,58	0,16 +/- 0,00
Summe	173,04	0,15

Tabelle 3.9: Gehalt an Sphingomyelin und Ceramiden im Gesamtlipidextrakt. Die Lipide stammen aus TLR4/MD2-transfizierten, nicht stimulierten HEK-Zellen. Referenzsubstanz ist PE 20:0 (=1).

Mit dem oben beschriebenenen Identifikations- und Auswertesystem konnten bei den Gesamtlipidextraktmessungen eine Anzahl von 103 Lipidspezies unterschiedlicher Kopfgruppe, Bruttofettsäurekomposition und Bindungsart der Fettsäurereste identifiziert werden.

3.7.6. Vergleich der in den zellulären Extrakten detektierten Lipidspezies

3.7.6.1. Vergleich der Sättigungsgrade der detektierten Spezies

Zum Vergleich der Sättigung der Fettsäureketten wurden die Daten aller detektierten Spezies, d.h. die der Glycerophospholipide und der Sphingolipide SM und Ceramid,

betrachtet (Abb. 3.35). Insgesamt konnten in den DRM-Extrakten der aus stimulierten Zellen entnommenen Proben 4%, in den Extrakten aus unstimulierten Zellen 7% und im Gesamtlipid 14% Spezies mit vollständig gesättigten Fettsäureresten beobachtet werden. Bei den einfach ungesättigten Spezies betrug der Anteil 41% im Gesamtlipidextrakt und 40% in den DRM-Extrakten stimulierten Zellen. In den DRM-Extrakten der unstimulierten Zellen lag der Anteil bei 51% an. Spezies mit einer mehrfach ungesättigten Fettsäure waren im Gesamtextrakt mit 45% und in den Extrakten aus unstimulierten Zellen mit 42% vertreten. Die DRM-Extrakte der stimulierten Zellen zeigten mit 56% den höchsten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Insgesamt wurde in den DRM-Extrakten ein verminderter Anteil an komplett gesättigten Fettsäureresten gegenüber dem Lipidgesamtextrakt nachgewiesen. Während der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäureresten im Gesamtextrakt und den DRM-Extrakten unstimulierter Zellen gleich war, nahm er in DRM-Extrakten aus LPS-stimulierten Zellen zu.



Abbildung 3.35: Prozentuale Anteile der verschiedenen Sättigungsgrade in TLR4/MD2transfizierten HEK-Zellen. Vergleich des Gesamtextraktes und der DRM aus unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen. In die Auswertung flossen die Daten der detektierten Glycerophospholipide, Sphingomyeline und Ceramide ein.

Für PC konnten drei Spezies mit vollständig gesättigten Fettsäureresten detektiert werden. Dies war bei PI und PG nur bei jeweils einer Spezies der stimulierten DRM-Extrakte der Fall. Komplett gesättigte Spezies konnten für PE und PS nicht detektiert werden (Tab. 3.6.). Die bei den Glycerophospholipiden in beiden Proben am häufigsten vertretenden Spezies waren die Bruttofettsäurekompositionen 34:1, 36:2 und 36:1 (Tab. 3.6.). Bei PC waren auch die Spezies 31:2 und 34:2 in einem hohen Anteil zu finden. Die Spezies 38:4 und 38:3 und 38:2 waren bei PI anteilig weitaus stärker als bei den anderen Glycerophospholipidklassen vertreten. Pl zeigte die Tendenz zu längeren Fettsäureketten und wies den größten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäureresten im Vergleich zu den übrigen Glycerophospholipidklassen auf. PI zeigte zudem den höchsten Grad an Heterogenität bezüglich der Bruttofettsäurekomposition. Die Fettsäuren der PE-Etherlipidspezies waren in allen Extrakten in ihrer Bruttokomposition mehrfach ungesättigt, während bei den Diacyl-Spezies auch einfach gesättigte Verteilungen auftraten. PC-Etherlipidspezies wiesen vollständig gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäurekompositionen auf. Bei PC war auffällig, dass nach einer LPS-Stimulation der Zellen die Spezies dieser Klasse insgesamt kürzere Fettsäurekettenlängen aufwiesen als vor einer Stimulation (Tab. 3.6., PC 36:2 und 38:2, gerechnet auf die Gesamtsumme PC). Den größten Anteil an vollständig gesättigten Spezies stellte SM mit der Spezies 16:0. Auffallend war hier, dass die langkettige Spezies SM 24:0 wie auch die einfach ungesättigte, langkettige Spezies 24:1 erst in den DRM-Proben der stimulierten Zellen auftraten.

Die auffälligste Änderung zwischen den stimulierten und den unstimulierten DRM-Proben war die Änderung des Ceramidgehaltes. Dieser änderte sich nicht nur absolut, sondern auch qualitativ. War vor einer Stimulation der Zellen lediglich die Spezies mit einer 16:0 Fettsäurekette zu finden, so stieg nach einer Stimulation durch LPS die Anzahl der identifizierten Spezies auf fünf an. Alle in diesen Proben neu hinzugekommenen Spezies besaßen eine längere und bis auf 24 Kohlenstoffatome ansteigende Fettsäurekette (Abb.3.36).

136



Abbildung 3.36: Änderung des Ceramidgehaltes der DRM-Fraktionen nach einer Stimulation der Zellen durch LPS. Gezeigt sind die Daten a) ohne eine Stimulation und b) nach einer Stimulation TLR4/MD2-transfizierter HEK-Zellen. Nach einer Stimulation der Zellen durch LPS stiegen die Heterogenität und die Menge der Ceramidspezies in den Proben an. Die Intensitäten sind relativ zum internen Standard PE 20:0 (=1) angegeben.

3.7.6.2. Vergleich der Anteile der untersuchten Lipidklassen

Der Vergleich der Anteile der unterschiedlichen Kopfgruppen der untersuchten Lipide ist in Tabelle 3.10 dargestellt. Die Daten beziehen sich auf die Gesamtheit der untersuchten Lipide inklusive der Ceramide und Sphingomyelin. Für die Ceramide konnte jeweils nur ein sehr geringer Anteil nachgewiesen werden, während der Anteil von SM insgesamt relativ hoch war. Die Ceramide waren in den DRM unstimulierter Zellen sowie im Gesamtlipidextrakt gegenüber den nach Stimulation isolierten DRM-Extrakten leicht erhöht. Sphingomyelin war in den DRM-Extrakten insgesamt geringer vertreten als im Gesamtlipidextrakt. Dabei betrug der SM-Anteil in den Extrakten stimulierter Proben weniger als die Hälfte als in den unstimulierten DRM-Extrakten (Tabelle 3.10).

%	DRM stimuliert	DRM unstimuliert	Gesamtlipid
PI	34,49	15,20	9,53
PG	1,99	1,87	4,55
PE	4,12	2,97	10,35
PS	0,79	0,55	0,63
PC	55,84	71,56	63,45
Cer	0,05	0,02	0,03
SM	2,72	7,82	11,45
Summe	100,00	100,00	100,00

Tabelle 3.10: Prozentuale Anteile der verschiedenen Lipidklassen in TLR4/MD2transfizierten HEK-Zellen. Untersucht wurden der Lipidgesamtextrakt und DRM-Extrakte unstimulierter bzw. durch LPS stimulierter Zellen. Angegeben sind die aufsummierten Intensitäten aller detektierten Lipide nach Anwendung der Korrekturfaktoren. Normiert wurde auf PE 20:0 (=1).

Abbildung 3.37 zeigt die prozentuale Verteilung der Glycerophospholipidklassen in den Extrakten bezogen auf die Gesamtheit der detektierten Glycero-PC PE phospholipidspezies. Die Intensitäten der bei und detektierten Etherlipidspezies wurden jeweils in die Klasse mit eingerechnet. Im Gesamtlipidextrakt stellte PC mit 71% den Hauptanteil der Glycerophospholipide, gefolgt von PE mit 12% und PI mit 11%. PG (5%) und PS (1%) waren weniger stark vertreten. Im Vergleich des Gesamtlipidextraktes mit den DRM-Extrakten war die größte Auffälligkeit der Anstieg des Anteils von PI (35%) bei stimulierten Zellen im Gegensatz zu unstimulierten Proben (16%) und dem Gesamtlipidextrakt (11%). In allen untersuchten Extrakten stellten PC-Spezies den Hauptanteil dar. PG und PE zeigten in den Proben der DRM nur geringfügige Unterschiede und waren gegenüber dem Gesamtlipidextrakt leicht vermindert. PS war insgesamt sehr gering vertreten.



Abbildung 3.37: Prozentuale Anteile der verschiedenen Glycerophospholipidklassen in TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen. Vergleich des Gesamtextraktes und der DRM aus unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen Die Gesamtheit der Glycerophospholipide inklusive der Etherlipidspezies wurde auf 100% gesetzt.

3.7.6.3. Glycosphingolipide

Glycosphingolipide wie Cerebroside. Lactosylceramide und komplexe Glycosphingolipide werden in der Literatur als in Membranmikrodomänen angereichert beschrieben. Daher sollte in dieser Arbeit auch diese Substanzklassen detektiert und quantitativ erfasst werden. Glycosphingolipide sind aufgrund ihrer verschiedenen Kopfgruppen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Zuckergruppen und deren Ladungszuständen eine sehr heterogene Lipidklasse. Ihre physikochemischen Eigenschaften differieren nicht nur innerhalb ihrer Substanzklasse, sondern unterscheiden sich auch gegenüber den Eigenschaften der anderen in dieser Arbeit erfassten Lipidklassen. Eine gemeinsame Analytik in nur einem Schritt ist daher sehr schwierig. Mit Hilfe von PeakID konnten einige Spezies anhand ihrer genauen Massen identifiziert werden. Dabei handelte es sich überwiegend um Cerebroside, also um relativ einfache Moleküle mit einer oder zwei

ERGEBNISSE

Zuckereinheiten. Diese konnten allerdings teilweise nur mittels der zur Glycerophospholipidanalytik verwendeten Lipidextraktionsmethode aus den Zellisolaten extrahiert werden (siehe Kapitel 3.2.1). Komplexere Glycosphingolipide konnten mittels dieser Methode nicht extrahiert werden. Es ist daher keinesfalls möglich, bezüglich dieser Substanzen eine guantitative Aussage zu treffen, da das verwendete Extraktionssystem für diese Anwendung nicht optimiert wurde. Ein weiteres Problem ergibt sich bei der HPLC-Auftrennung der Substanzen. Durch die sehr unterschiedlichen Polaritäten der einzelnen Spezies aufgrund der verschiedenen Standardsubstanzen zuckerhaltigen Kopfgruppen wurden im verwendeten Normalphasensystem gut aufgetrennt, hatten jedoch in sich sehr unterschiedliche Retentionszeiten. Eine Quantifizierung würde so zusätzlich erschwert. Zusammenfassend die für muss Methodik eine aussagekräftige Glycosphingolipidanalysen speziell angepasst werden.

3.7.6.4. Cholesterol

Die Bestimmung des Cholesterolgehaltes von DRM Extrakten aus unstimulierten und durch LPS stimulierten Zellen zeigte keine Unterschiede zwischen den Proben (Abb. 3.38). In den oberen Fraktionen des Dichtegradienten war Cholesterol jeweils angereichert und in gleichen absoluten Mengen nachweisbar. Dabei muss beachtet werden, dass das Cholesterol nicht massenspektrometrisch detektiert wurde (siehe Kapitel 2.2.2.3). Die durch den durchgeführten Nachweis erhaltenden absoluten Werte konnten nicht direkt mit den massenspektrometrischen Werten der anderen untersuchten Lipide verglichen werden. Zwar war die absolute Menge des zugegebenen internen Standards bekannt, jedoch treten bei den einzelnen Schritten der Analytik Verluste auf, die nicht absolut guantifiziert werden konnten. Abhilfe könnte die Zugabe des internen Standards vor der durchgeführten Lipidextraktion schaffen. Allerdings ist dann die letztendlich massenspektrometrisch detektierte des internen Standards nicht mehr absolut und die Menge bekannt Geräteperformance kann nicht überwacht werden.



Abbildung 3.38: Cholesterolgehalt der DRM-Dichtegradientfraktionen aus unstimulierten und LPS stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen. Es war kein Unterschied im Cholesterolgehalt der Proben nachweisbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, die detaillierte Lipidzusammensetzung zellulärer Membranen und Membranmikrodomänen zu erfassen und zu guantifizieren. Für die Analytik solch geringer Mengen eines sehr heterogenen Lipidgemisches wurde die hochauflösende FTMS genutzt. Die Proben wurden durch eine Mikrofluss-HPLC vorgetrennt, nach der Elution direkt in einer ESI-Quelle ionisiert und im Massenspektrometer analysiert. Zur Isolation der funktionellen Membranmikrodomänen aus TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen wurden vier verschiedene Extraktionsmethoden angewandt und die erhaltenden Extrakte zunächst biochemisch charakterisiert. Die in der Literatur beschriebenen Markermoleküle für Membranmikrodomänen (GM1, Flotillin-2) wurden lediglich in den mit Triton X-100 isolierten Fraktionen nachgewiesen. Da das Dtergens die massenspektrometrische Analyse jedoch erheblich stört, erwies sich eine Vortrennung der Extrakte und damit die Abtrennung von TX-100 von den Membranlipiden durch HPLC als unabdingbar. Für die Etablierung der Methode wurde mit einer schnell anziehbaren Zellinie gearbeitet, um das zur Präparation notwendige Material jederzeit verfügbar zu haben. Die verwendeten Probenmengen (10⁶ Zellen pro Ansatz) und Isolationsverfahren wurden jedoch so gewählt, dass die Analytik in gleicher Weise auch an Extrakten aus den für immunologische Fragestellungen wichtigen Primärzellen durchgeführt werden kann.

4.1. Isolation zellulärer Membranmikrodomänen

Als Beispiel wurden Membranmikrodomänen, die sogenannten *lipid rafts*, untersucht. Membranmikrodomänen werden unterschiedliche Funktionen in zellulären Systemen zugesprochen und sind im Fokus vieler Forschungsfelder ^{197,198,48}. Eine Kenntnis ihrer genauen Lipidzusammensetzung könnte helfen, die Dynamik und Funktion dieser Strukturen in Zellen besser zu verstehen.

Die Domänen wurden mit Hilfe von Detergentien als Detergens-resistente Membranen (DRM) sowie mittels detergensfreier Methoden isoliert. Die detergenzfreie Isolationsmethode 4 schien sich zunächst als Methode der Wahl anzubieten, da an Extrakten dieser Methode bereits massenspektrometrische Daten über die Lipidkomposition von Membrandomänen veröffentlicht wurden ¹⁹⁹. Die Schwierigkeiten der Durchführung der Methode bestanden zum einen in der genauen Dosierung der zugeführten Energien zur mechanischen Separierung der rigiden und fluiden Membranbereiche und zum anderen in der teils schwierigen manuellen Abnahme der Fraktionen nach den Zentrifugationsschritten. Eigene, umfassende Experimente zur Isolation der Domänen nach dieser Methode konnten die beschriebenen Extraktionsergebnisse nicht reproduzieren. Vor allem ließen sich die untersuchten Markermolküle zur Identifizierung der Domänen nicht in den erwarteten Fraktionen des Dichtegradienten angereichert nachweisen. Kurz nach diesen experimentellen Befunden wurde die Methode von den Autoren aus oben genannten Gründen zurückgezogen ¹⁹⁵. Auch eine in diesem Zuge alternativ vorgestellte Extraktionsmethode, deren Fraktionen ebenso bereits für massenspektrometrische Analysen verwendet wurden ²⁰⁰, ließ sich nicht reproduzieren.

Lediglich die durchgeführten Versuche mittels 1% TX-100 im Lysepuffer (Isolationsmethode 1) zeigten eine klare und reproduzierbare Anreicherung von Markermolekülen in den Bereichen geringer Dichte des Gradienten wie in der Literatur beschrieben ^{201,104,105,106,107}. Die Analytik dieser Proben ist daher besonders anspruchsvoll, da sie einen hohen Anteil an Triton X-100 enthalten.

Zur weiteren Charakterisierung und zur Überprüfung der parallelen Durchführbarkeit einer massenspektrometrischen Proteinanalyse der Proben wurde der Proteingehalt der mit Hilfe der Isolationsmethode 1 gewonnenen Fraktionen untersucht. Das 1D Gel zeigte ähnliche Muster wie in der Literatur beschrieben, wobei der Proteingehalt zum Sediment hin zunimmt und in den DRM-Bereichen einige Proteinbanden angereichert sind ²⁰². Die genaue Analyse der dominantesten Spots einer 2D-Auftrennung durch peptide mass fingerprinting führte zu einer sicheren Identifizierung der Hitzeschockproteine 60 und 70, Aktin und einer Malatdehydrogenase in den DRM-Fraktionen. Dabei gilt Aktin als in Domänen angereichert ^{203,204} und ist ein Indiz für die 205 Assoziation der Membrandomänen mit dem Cytoskelett Einige Hitzeschockproteine (HSP) werden als domänenassoziiert beschrieben ^{206,82}. Dazu gehört auch das HSP 70²⁰⁷, das sich nach einer Stimulation durch LPS mit TLR4 in den rigiden Membranbereichen kolokalisiert 208,92. Das Protein wurde in DRM-Extrakten unstimulierter, TLR4/MD2-transfizierter HEK-Zellen identifiziert, so dass

eine Anreicherung des HSP 70 in den Domänen demnach nicht erfolgen sollte. Die durch die Transfektion erreichte Überexpression des TLR4 in den Zellen könnte sich jedoch auf die Proteinverteilung innerhalb der Zellmembran auswirken und von Untersuchungen an Primärzellen abweichende Ergebnisse liefern. HSP 70 wird außerdem als intrazellulär lokalisiert beschrieben und bindet nach Zerstörung der Zelle von außen z.B. an die Plasmamembrandomänen von Makrophagen²⁰⁹. Die Anwesenheit von HSP 70 in den DRM-Extrakten könnte daher auch ein Hinweis auf eine Verschleppung der cytosolischen Fraktion nach der ersten Ultrazentrifugation sein. Die Untersuchung der DRMs bezieht sich bei der gewählten Isolationsmethode nicht nur auf die durch Triton nicht lösbaren Membranbereiche der Plasmamembran. Vor der Tritoninkubation der Zellen wird lediglich der Kern vom Rest des Zellmaterials abgetrennt. Es ist daher durchaus denkbar, dass auch Domänen anderer Organellen isoliert werden. Das Vorhandensein von Membanmikrodomänen wurde außer für Plasmamembranen auch für Membranen des Golgi-Apparates gezeigt ²¹⁰. Auch für die Mitochondrienmembranen sind Membranmikrodomänen beschrieben^{211,212}. HSP 60 ist ein in der Matrix der Mitochondrien lokalisiertes Protein²¹³. Ist es, wie vermutet, auch am Transport von Proteinen über die innere Mitochiondrienmembran beteiligt ²¹⁴, könnte die Anwesenheit des Proteins in den untersuchten Extrakten ein weiterer Hinweis auf die Domänenbildung in den Mitochondrienmembranen sein. Malatdehydrogenasen sind ebenfalls in Mitochondrien lokalisiert, kommen allerdings auch als lösliches Protein im Cytoplasma vor ^{215,216}. Daher kann die Anwesenheit des Proteins in den Extrakten auch auf eine wie oben beschriebene Verschleppung hindeuten. Genauere Analysen müssten an Domänenextraktionen aus zuvor isolierten, reinen Plasmamembranen erfolgen. Es sollte aber auch erwähnt werden, dass es bei einer subzellulären Fraktionierung immer schwierig ist, wirklich reine Fraktionen zu erhalten, und dass bei einer sensitiven Nachweismethode also auch diese Verunreinigungen mit erfasst werden. Die Proteinanalysen wurden nicht weiter verfolgt, da der Fokus der Arbeit auf der Entwicklung einer Lipidanalytik lag. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass neben den Tests auf die Markermoleküle mit immunchemischen Methoden weitere Proteine massenspektrometrisch identifiziert werden konnten, die in den mittels 1%iger TX-100-Lösung aus HEK-Zellen isolierten DRM-Fraktionen angereichert sind.
4.2. Lipidextraktion und Detergenskontamination

Vor der massenspektrometrischen Analyse der Proben mussten die Lipide aus den zellulären Extrakten isoliert werden. Eine effiziente und reproduzierbare Lipidextraktion ist gerade für eine quantitative Lipidanalytik unerlässlich und birgt eine hohe Anfälligkeit für Fehler.

Die für viele Anwendungen standardmäßig genutzte Lipidextraktion nach Bligh und Dyer konnte für die Extraktion von allen Glycerophospholipiden, Sphingomyelin und Ceramid erfolgreich verwendet werden, da die Intensitäten von Lipidstandards relativ zueinander erhalten blieben. Um eine quantitativ möglichst vollständige Extraktion der Substanzen zu erreichen, wurde jede Extraktion dreimal durchgeführt und die erhaltenden organischen Phasen zusammengefasst. Weitere Waschschritte erhöhten die Effizienz der Extraktion nicht.

Die eher polaren Glykosphingolipide gingen zum großen Teil bei der Extraktion in die wässrige Phase über. Dort konnten sie aufgrund der hohen Saccharosekonzentration durch den Dichtegradienten nicht direkt nachgewiesen werden. Eine Dialyse der wässrigen Phase über mehrere Tage führte nicht zu einer Abtrennung der Saccharose. Auch die mäßig polaren Cerebroside konnten in den Extrakten nicht identifiziert werden. Da sie zumindest teilweise in die organische Phase übergehen, sind sie in den Extrakten wahrscheinlich auch nur sehr gering vertreten und daher schwer nachzuweisen. Eine quantitative Auswertung der Daten wäre außerdem so nicht möglich. Für die Extraktion von Glycosphingolipiden muss die Methode speziell angepasst werden, z.B. durch die Verwendung einer Festphasenextraktion ²¹⁷. Auch könnten neueste Verfahren wie die sehr sensitive Messung mittels orthogonaler IR-MALDI ²¹⁸,²¹⁹ und der Ionisation und Desorption der Moleküle direkt von Dünnschichtchromatographie-Platten durchgeführt werden.

Bei der Lipidextraktion sammelten sich Detergens (TX-100)- und Lipidmoleküle in der organischen Phase. Sie konnten jedoch aufgrund ihrer sehr ähnlichen physikochemischen Eigenschaften nicht voneinander getrennt werden. Eine Trennung durch Dialyse ist aufgrund der niedrigen *cmc* nicht möglich: TX-100 bildet auch in sehr niedrigen Konzentrationen noch Micellen und kann somit die Dialysemembran nicht passieren. Die Verwendung von speziellen Adsorbentien ist generell zur Abtrennung von Detergentien mit einem niedrigen *cmc* geeignet ²²⁰. Da

die in dieser Arbeit untersuchten Lipide allerdings ebenso an die hydrophobe Oberfläche des Adsorbents binden und somit ein nicht kontrollierbarer Verlust der Probe erfolgen würde, war diese Methode, wie sich zeigte, für die untersuchten Proben nicht geeignet. Der Einsatz von spaltbaren Detergentien ist für massenspektrometrische Analysen denkbar ^{221,222}, müsste jedoch für die Domänenaufreinigung zuvor charakterisiert werden.

Mittels des verwendeten HPLC-Systems konnte TX-100 erfolgreich vom Rest der Probe abgetrennt werden, so dass eine massenspektrometrische Analyse der Proben ermöglicht wurde (siehe oben). Lediglich die Quantifizierung der Ceramide, die mit TX-100 im verwendeten HPLC-System koeluieren, könnte durch TX-100 beeinflusst worden sein. Hier ist bei einer Separation der Substanzen ein größerer Anteil an Ceramiden zu erwarten.

4.3. Lipidanalytik

4.3.1. Lipidanalytik mittels ESI-FTMS

FTMS zeichnet sich durch ihre hohe Massenauflösung und Genauigkeit aus. Diese Eigenschaften ermöglichen zuverlässige Identifikationen der meisten Lipide auch in sehr heterogenen Mischungen ¹³⁷.

Die hohen Auflösungen erlaubten selbst die Unterscheidung von Diacyl- und Etherlipidspezies. Dadurch ist eine Analytik schnell durchführbar und liefert sehr genaue Ergebnisse. Lediglich die isomeren (exakt massengleichen) PE- und PC-Spezies müssen zusätzlich einer MS/MS-Analyse unterzogen werden ¹⁴⁷. Eine Differenzierung zwischen dem zwei ¹³C-Isotope enthaltenden Spezies und der monoisotopischen, einfach höher gesättigten Spezies konnte in den durchgeführten erreicht Messungen im Breitbandmodus nicht werden. Erst ab einem Auflösungsvermögen um 90000 können solche Signale auseinander gehalten werden. Zwar sind solche Auflösungen im Hochauflösungsmodus des FTMS leicht zu erreichen, jedoch müsste der dafür gemessene Massenbereich stark eingeschränkt werden 157.

Mit Hilfe der FTMS konnten Nachweisgrenze für Lipidstandards von <20 fmol erreicht werden, die deutlich besser sind als für andere in der Literatur beschriebenen MS-Verfahren (im pmol-Bereich) für ESI Triple-Quadrupol-Geräte ^{132,223,224}.

Detergentien stören eine massenspektrometrische Analyse erheblich ¹⁵⁹, ließen sich aber für die Isolation der in dieser Arbeit untersuchten Membranmikrodomänen nicht vermeiden. Die Signale des TX-100 dominieren die Spektren nicht nur aufgrund ihres hohen Anteils in der Probe, sondern auch durch ihre leichte Ionisierbarkeit. Durch die Ionenkonzentrationen in der ESI-Quelle kommt es hohen so zu einer Ionensuppression, d.h. die Ionisation der eigentlich zu untersuchenden Lipidmoleküle wird empfindlich gestört. Des Weiteren führen hohe Ionenkonzentrationen in der ICR-Zelle zu einer Verschlechterung der Auflösung, zu einer geringeren Messgenauigkeit linearen und zum Verlust der Responsivität der Detektion. Um die massenspektrometrische Analyse mittels ESI nicht zu beeinträchtigen, sollte die Detergenskonzentration in der Probe für TX-100 0,05% nicht übersteigen ¹⁶⁰. Bei der Verwendung von 0,1% TX-100 im Lysepuffer zur DRM-Isolation sind in der organischen Phase der Lipidextraktion deutlich geringere Konzentrationen zu erwarten, dennoch wurden starke Signale des Detergens beobachtet. Eine Abtrennung der TX-100 Moleküle vor der massenspektrometrischen Analyse ist also notwendig.

In den durch HPLC vorgetrennten biologischen Extrakten alle konnten Glycerophospholipide (PC, PE, PG, PS, PI, inklusive PE- und PC-Etherlipide), Sphingomyelin und Ceramid nachgewiesen werden. Die Identifizierung der großen Datenmengen konnte über das innerhalb dieser Arbeit entwickelte Auswerteprogramm PeakID {Hübner, G., in Vorbereitung} automatisiert und somit erheblich beschleunigt werden.

Freies Cholesterol dagegen ist mittels ESI-MS aufgrund der geringen lonisationseffizienz erst nach einer Derivatisierung, wie beispielsweise einer Sulfatierung oder Acetylierung, sensitiv nachweisbar ^{254,164}. Daher wurde in dieser Arbeit ein fluoreszenzbasierter Nachweis verwendet. Vergleiche in der Literatur zwischen MS-Messungen von derivatisiertem Cholesterol und einer auf der gleichen Basis wie in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzbasierten Messung ergaben annähernd gleiche Werte ²²⁵. Komplexe Glycolipide konnten aus oben dargestellten Gründen in den Extrakten nicht nachgewiesen werden.

4.3.2. LC-Auftrennung der Extrakte und *online*-Kopplung an das FTMS

Um die Abtrennung des Triton X-100 zu erreichen und um zusätzlich die komplexen Lipidextraktionen vorzutrennen, wurden die Probenextrakte vor der massenspektrometrischen Analyse über eine HPLC getrennt.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem verwendeten HPLC-System das Triton X-100 erfolgreich von den Lipidmolekülen abgetrennt wurde.

Das System wurde außerdem dazu genutzt, die in der Probe enthaltenden Lipide nach ihren polaren Kopfgruppen aufzutrennen. Zwar schließt die Hochauflösung des zur Detektion verwendeten FTMS unter der Verwendung beider Ionenmodi eine Verwechselung der verschiedenen Spezies aus, allerdings führt die Vortrennung der komplexen Lipidextraktionen nach den enthaltenden Lipidklassen ebenso wie die TX-100 Abtrennung zu einer Reduzierung der Ionenzahl in der ESI-Quelle sowie in der ICR-Zelle. In der Probe unterrepräsentierte Spezies können somit besser identifiziert werden. Die Auflösung wird außerdem gegenüber Messungen nicht vorgetrennter, heterogener Proben erhöht und die Messsignale werden auf die vielen Einzelspektren des LC-Laufes verteilt, so dass die Spektren übersichtlicher werden. Da ESI ein konzentrationsabhängiger Prozess ist ¹⁷⁶ und bei einem entsprechend angepassten LC-System sehr kleine Probenvolumina injiziert werden können, ist es möglich, durch eine Aufkonzentrierung der Probe vor der Injektion und durch die in der Säule erfolgende Aufkonzentration der einzelnen Lipidklassen die Nachweisgrenzen zu erhöhen. Der begrenzende Faktor ist hierbei die Beladungsgrenze der verwendeten Trennsäule.

Die einzelnen Lipidklassen konnten im verwendeten System sehr gut chromatographisch voneinander getrennt werden, obwohl aufgrund der Identifikation über die *m/z*-Werte eine absolute Trennung der Eluenten außer für PC und PE nicht notwendig ist. Für die Identifikation dieser Lipidklassen sind bei einer vollständigen Separation nachfolgende Analysen nicht nötig. Zur Überprüfung der Auftrennung wurden gesammelte Fraktionen durch *offline* MS/MS-Analysen überprüft. Es zeigte sich, dass die beiden Klassen sauber voneinander getrennt werden konnten.

Zur Abtrennung des Detergens und zur Auftrennung der Lipide nach ihren unterschiedlichen Polaritäten wurden eine Diol-Normalphase und eine

Gradientenelution verwendet. Die Elution der Lipide erfolgte erwartungsgemäß nach den Kopfgruppen in der Reihenfolge der weniger polaren Lipidklassen zu den polareren Lipidklassen ^{149,150}. Einen geringfügigen Einfluss auf die Retentionszeit ließ sich auch für die Fettsäurereste der einzelnen Substanzen feststellen. Der Verbleib von Lipidmaterial in der Säule ²²⁶ konnte ebenso wie eine Degradation der stationären Phase aufgrund der chemischen Zusammensetzung der mobilen Phase durch regelmäßige Überprüfungen des Systems mittels überwachten Spül- und Standardläufen ausgeschlossen werden.

Das HPLC-System wurde für die Verwendung ESI-kompatibler Flussraten (einige µL/min) umgebaut und direkt mit dem FTMS gekoppelt. Durch die Nutzung des FTMS als Detektor konnte für DOPC eine absolute Nachweisgrenze von 45 fmol und für DMPS, Ceramide und Glycolipide von 600 fmol erreicht werden. Die in der Literatur beschriebenen Nachweisgrenzen für LC-MS-Messungen an Lipiden mittels Quadrupol- oder Ionenfallen-Instrumenten liegen im Mittel für die einzelnen Klassen im unteren Picomol-Bereich^{151,227} bis zu 700 fmol^{228,229}. Bei Messungen ohne eine direkt vorgeschaltete LC-Vortrennung konnten geringfügig niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden (siehe oben). Erwartet wurde eigentlich eine Erhöhung der Sensitivität. Dieses könnte eventuell daran liegen, dass das Lösungsmittel während des Gradientenlaufes Dichtungsmaterial oder ähnliches aus dem System löst, das im FTMS sehr sensitiv nachgewiesen wird und so zu einer Anhebung der Basislinie des Totalionenstromes führen kann. Die einzelnen Massenspektren lieferten im gewünschten Massenbereich zwar sehr saubere Signale, im unteren Massenbereich waren jedoch einige Verschmutzungen zu beobachten. Eine Vortrennung der Lipide nach ihren Kopfgruppen lässt jedoch aufgrund der oben beschriebenen Gründe eine detailliertere, besser guantifizierbare und reproduzierbarere Analyse zu.

4.3.3. Quantifizierung

Die Quantifizierung von Lipiden in den Massenspektren erfolgte über die Signalintensitäten. Dies ist möglich, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass bei der verwendeten ESI FTMS ein linearer Zusammenhang zwischen den gemessenen Signalintensitäten und den Lipidkonzentrationen der Proben besteht. Für die

quantitative Erfassung der Proben mussten die verschiedenen auch Ionisationszustände der einzelnen Moleküle (Adduktionenbildung, Mehrfachladungen, Multimerbildung) beachtet werden. Da die Auftrennung der Lipide über Normalphasen-LC anhand ihrer Kopfgruppen erfolgt, kommt es zu einer Überlappung der einzelnen, verschiedene Fettsäuren enthaltenden Spezies ^{151,226}. Somit musste für eine Quantifizierung die Mittelung aller aufgenommenen Spektren über die entsprechende Elutionszeit einer Lipidklasse erfolgen. Die erhaltenden Intensitäten wurden auf einen vor der Messung zur Probe gegeben internen Standard normiert. Durch den internen Standard konnte außerdem die Konstanz der gerätespezifischen Einstellungen überprüft werden.

Um verschiedene zelluläre Extrakte miteinander vergleichen zu können, mußte außerdem der Lipidgehalt der Extrakte normiert werden. In dieser Arbeit wurden die untersuchten DRM aus jeweils 1 x 10⁶ Zellen isoliert. Neben der Normierung des Lipidgehaltes auf ein Zellzahläquivalent ^{156,132} können die Proben beispielsweise auch über den Proteingehalt angeglichen werden ¹⁴⁴, jedoch kann sich dieser in verschiedenen Zellzuständen möglicherweise ändern. Mit Hilfe der verwendeten Normierungsmethode konnten Untersuchungen des relativen Lipidgehaltes verschiedener Proben problemlos durchgeführt werden.

Absolute Aussagen über den Lipidgehalt von biologischen Proben sind nur dann sinnvoll, wenn sichergestellt ist, dass keine bzw. genau kontrollierte Verluste während der Probenvorbereitung auftreten, wie beispielsweise bei der Isolation der gewünschten Kompartimente, der Lipidextraktion und der Lagerung. Zur Überprüfung der Effizienz der Lipidextraktion müssen z.B. vor der Durchführung weitere interne Standards hinzugegeben werden ²³⁰. Da eine genaue Quantifizierung der Verluste während der Lipidextraktion der Proben nicht erfolgte, konnten die absoluten Daten des in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzbasierten Cholesterol-Nachweises nicht direkt mit den erhaltenden massenspektrometrischen Daten verglichen werden.

Die Zellextrakte wurden zur Durchführung der LC-MS-Messungen in der Konzentration so eingestellt, dass alle Glycerphospholipidklassen sowie Ceramid und SM detektiert werden konnten. Eine Titration der Proben für eine optimale Konzentrationseinstellung müsste für jede Lipidklasse durchgeführt werden, was aufgrund der geringen Probenmengen allerdings nicht möglich ist. Eine zu starke Verdünnung der Extrakte würde die Detektion der in der Probe unterrepräsentierten Spezies verhindern. Die Messgenauigkeiten der heterogenen Zellextraktionen verschlechterten sich nicht gegenüber der Messung definierter, gering konzentrierter Standardlipide und eine Dimerbildung der Ionen trat nur bei PC auf. Dieses lässt darauf schließen, dass die Lipidkonzentrationen der eingesetzten Proben außer für PC gering genug waren, um eine gegenseitige Beeinflussung der Ionen bei der Ionisation und Detektion zu vermeiden ²²⁶.

Als interner Standard bei den LC-MS-Messungen wurde PE 20:0 verwendet, welches in natürlichen Extrakten aufgrund der sehr kurzen Fettsäurekettenlängen nicht vorkommt und in beiden Ionenmodi nachgewiesen wird. Da beschrieben wurde, dass die Nachweisempfindlichkeiten der verschiedenen Spezies einer Lipidklasse je nach Fettsäurekettenlänge variiert²³¹, wurde dies mit Hilfe von synthetischen Standards unterschiedlicher Fettsäurekettenlängen kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass nur bei extrem kurzen Fettsäurelängen Unterschiede in den Nachweisempfindlichkeiten auftraten. Die relativen Nachweisempfindlichkeiten der verschiedenen Kopfgruppen wurden für verschiedene Spraylösungen ermittelt und stimmen mit Literaturdaten überein ^{156,231}. Durch die Anwendung der erhaltenen Korrekturfaktoren für die unterschiedlichen Nachweisempfindlichkeiten der unterschiedlichen Kopfgruppen in verschiedenen Spraylösungen konnten alle erhaltenden Daten auf den internen Standard normiert werden.

Zur Quantifizierung der Glycosphingolipide müsste mit weitaus mehr Standards oder Korrekturfaktoren gearbeitet werden, da diese Lipidklasse aufgrund der verschieden großen und unterschiedliche Ladungen tragenden Oligosaccharideinheiten in der Kopfgruppe unterschiedliche Polaritäten haben und somit unterschiedliche Retentionszeiten in der HPLC aufweisen. Das System müsste also für die Analytik von Glycosphingolipiden angepasst werden ^{232,233,234}.

Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Verfahren zum instrumentellen Aufbau und zur Auswertung konnte so eine Analytik aufgebaut werden, die den Anforderungen der Untersuchung subzellulärer Lipidome bezüglich Sensitivität, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit gerecht wird. Lediglich für Glycosphingolipide müssen spezielle Trennmethoden eingesetzt werden.

4.4. Lipidzusammensetzung der Zellextrakte

Mit der erarbeiteten Methode wurde die Komposition des Lipidgesamtgehalts sowie der Detergens-resistenten Membranen an TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen untersucht. Darüber hinaus wurden in ersten Untersuchungen DRM unstimulierter und LPS-stimulierter Zellen untersucht, um zu überprüfen, ob sich ihre Lipidzusammensetzung durch die Stimulation verändert. Für TLR4 als LPS-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass dieser nach einer Stimulation der Zellen mit Domänenmarkern kolokalisiert und daher in die rigiden Membranbereiche einwandert ^{208,92}. Durch die Stimulation mit LPS und der anschließenden Signalverarbeitung in der Zelle könnte demzufolge eine Änderung der Lipidzusammensetzung der Domänen erfolgen, die dazu führt, dass die Rezeptorproteine in ihnen stabilisiert werden.

Die Diskussion erhaltenden Daten zur Lipidzusammensetzung der von Membranmikrodomänen mit der Literatur gestaltet sich schwierig, da nur wenige detaillierte Daten hierzu existieren. An Isolaten der detergensfreien Methode nach 101 195 Smart und der alternativ dazu veröffentlichten Methode wurden massenspektrometrische Untersuchungen veröffentlicht ^{199,200}. Auch an mittels 0.05%iger TX-100-Lösung isolierter Extrakte wurden Lipiddaten massenspektrometrisch ermittelt ¹⁵⁶. Alle drei zur Isolation verwendeten Methoden ließen sich in der vorliegenden Arbeit nicht reproduzierbar anwenden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, von den mittels 1% TX-100 isolierten Domänen detaillierte Daten über die enthaltenden Lipidklassen und den unterschiedlichen Fettsäurekompositionen zu erhalten. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der gemessenen Triplikate war sehr gut und wies im Allgemeinen eine Standardabweichung von unter 10% auf. Aufgrund der oben beschriebenen Problematik der Glycosphingolipidanalytik und der photometrischen Bestimmung des Cholesterolgehaltes wurden die Zusammensetzungen in Hinblick auf die Glycerophospholipide, Sphingomyelin und die Ceramide untersucht. Dabei konnten für die Messung des Gesamtlipidextraktes 103 und für die DRM 118 sich in ihrer Kopfgruppe oder Fettsäurekomposition und -bindung unterscheidende Lipide quantitativ erfasst werden. Die Detektion der Ceramide wird zwar durch das in der

HPLC koeluierende TX-100 erschwert, ein Vergleich des Ceramidgehaltes der Proben war aber dennoch möglich.

Die Methode ermittelte mit der erarbeiteten Zusammensetzung des Glycerophospholipidgehaltes der verwendeten Zellen ergab mit 71% den größten Anteil für PC. PE und PI waren mit 12% bzw. 11% in den Extrakten vertreten. PG und PS 5% bzw. 1% einen machten mit nur geringen Anteil am Glycerophospholipidgesamtgehalt aus. Diese Verteilung stimmt tendenziell mit Literaturdaten überein, in denen PC und PE als überwiegende Spezies und PS als nur gering vertretende Spezies beschrieben werden ^{235,51}. Dabei wurden wie erwartet PE und PC teilweise als plasmanyl- bzw plasmenyl-Spezies identifiziert ⁶. Der Anteil von PI in den DRM-Extrakten war höher im Vergleich zum Gesamtlipid (15,2% zu 9,5%) und stieg nach einer Stimulation der Zellen in den DRM stark an (34,5%). PI Vorläufermolekül kann als für second messenger während Signaltransduktionsvorgängen dienen ²². Eine Anreicherung könnte auf eine erhöhte Signalverarbeitung der Zelle hinweisen. Auch könnte der höhere PI-Gehalt durch ein erhöhtes Auftreten GPI-verankerter Proteine und einem Verbleib ihres Ankers während der Probenaufreinigung in der Membran erklärt werden. Eine Überexpression von CD14²³⁶, einem membranständigen, GPI-verankerten Protein, das an der LPS-Erkennung beteiligt ist, konnte durch die Überprüfung der Expression in den verwendeten Zellen über immunchemische Methoden ausgeschlossen werden.

Einfach und mehrfach gesättigte Bruttofettsäurekompositionen im waren Gesamtlipidextrakt gleichermaßen stark vertreten, der Anteil der vollständig gesättigten Spezies lag bei 14%. In Zellen kommt meist nur ein geringer Anteil von Glycerophospholipiden mit zwei vollständig gesättigten Fettsäureresten vor ²³⁷. Auch die gefundenen Fettsäureverteilungen mit den Hauptverteilungen 34:1, 34:2 und 36:2 und der Verteilung für PI hin zu höheren Fettsäuren wurden ähnlich beschreiben ²³⁸. Für PC sind, wie auch in den Extrakten gefunden, kürzere Fettsäurekettenlängen beschrieben ²⁵. In den DRM konnten keine erhöhten Anteile an vollständig gesättigten Fettsäureketten nachgewiesen werden, was aufgrund der Modellvorstellung der Bildung und Struktur der Domänen so nicht erwartet wurde ²³⁹. Nach einer LPS-Stimulation der Zellen stieg der Anteil der mehrfach gesättigten Spezies weiter an, so daß keine Stabilisierung der Strukturen allein aufgrund der Fettsäureketten der Glycerophospholipide zu vermuten ist.

Für Sphingomyelin werden überwiegend 16:0- oder höherkettigen Fettsäurerste beschrieben, was auch in den im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zellextrakten der Fall war ^{240,241}. Eine Anreicherung von SM war im Gesamtlipidextrakt gegenüber den DRM unstimulierter sowie noch verstärkt gegenüber Extrakten unstimulierter Zellen zu beobachten (siehe Tabelle 3.10). Erwartet wurde hingegen eine Anreicherung von SM in den Domänen, da Sphingomyelin eine stabilisierende Rolle bei der Formation von Membranmikrodomänen zugesprochen wird ⁴⁷. Die Daten stehen außerdem im Gegensatz zu in der Literatur veröffentlichten Daten ^{242,156,243,244}.

Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass in Zellmembranen auch ceramidreiche, rigide Domänen existieren ^{245,246}. Die Affinität von Ceramiden und Glycerophospholipiden zueinander ist gering. Da Ceramide im Gegensatz zu Sphingomyelin auch keine starke Wechselwirkung mit Cholesterol eingehen, bilden sie eigene, cholesterolarme Bereiche mit hohen Packungsdichten aus ²⁴⁷. Es wurde beschrieben, dass Cholesterol-unabhängige Membrandomänen in Zellen existieren ²⁴⁸ und dass Ceramide die strukturelle Rolle der Sterole in Membranmikrodomänen übernehmen könnten ²⁴⁹.

Der verringerte Gehalt an SM in den untersuchten DRM gegenüber dem Gesamtlipidextrakt als auch die Detektion von Ceramiden in den DRM lassen darauf schließen, daß in den untersuchten Zellen die rigiden Domänen als Ceramid- und nicht als SM/Cholesterol-angereichert existieren. Der Anstieg des Ceramidgehaltes und deren Heterogenität hin zu längeren Fettsäuren der detektierten Spezies ist ein weiteres Indiz dafür. Die Domänenformation scheint darüber hinaus weitgehend unabhängig von den Fettsäureresten der Glycerophospholipide zu sein, da hier überwiegend mehrfach gesättigte Reste detektiert werden konnten, die einer dichten Packung der Substanzen in der Membran entgegenwirken⁴⁸.

Nach der Stimulation war SM in noch geringeren Anteilen in den DRM zu finden als in den Extrakten unstimulierter Zellen. Zusätzlich wurden mehr und längerkettigere Ceramide gefunden. Geht man davon aus, dass ceramidangereicherte, nicht aber SM-angereicherte Domänen isoliert wurden, so scheinen sich diese nach einer Stimulation also weiter zu stabilisieren.

DISKUSSION

Ceramide werden *de novo* im endoplasmatischen Reticulum sythetisiert ¹⁸. Ein weiterer Weg zur Produktion von Ceramiden ist die enzymatische Hydrolyse von bereits in den Zellmembranen lokalisierten Sphingolipiden durch eine Sphingomyelinase ²⁵⁰. Es konnte gezeigt werden, daß die sogenannte saure Sphingomyelinase nach einer Stimulation der Zelle mit unterschiedlichen Stimuli in Sphingolipid-angereicherte Domänen translokalisiert ²⁵¹. Eine Stimulation der Zellen mit LPS führt darüber hinaus zu einer erhöhten Aktivität der sauren Sphingomyelinase, und das so produzierte Ceramid scheint essentiell für die Assoziation von TLR4 und lipid rafts zu sein 252. Dies wird zwar als ein CD14abhängiger Weg beschrieben, ein ebenfalls zum LPS-Rezeptorkomplex gehörendes Molekül, das die untersuchten Zellen allerdings nicht enthalten, jedoch könnten auch weitere Moleküle involviert sein.

Eine durch LPS induzierte erhöhte Sphingomyelinaseaktivität in den untersuchten Zellen könnte also zu der verstärkten Bildung von Ceramid-angereicherten, rigiden Membranmikrodomänen führen. Die erhaltenden Daten liefern hierzu erste experimentelle Hinweise anhand der Untersuchung der Lipidzusammensetzung der isolierten Domänen aus unstimulierten und LPS-stimulierten TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen.

Für eine Bestätigung dieser Hypothese bedarf es einer weiteren Verifizierung der Ergebnisse. Die Anwendung der erarbeiteten Analytik auf DRM-Extrakte stimulierter, humaner Makrophagen wird zeigen, ob sich die Befunde auch für primäre Immunzellen bestätigen.

Die Analytik der Ceramide wurde durch ihre Koelution mit TX-100 in der HPLC erschwert. Zusätzlich sollte beachtet werden, dass in der Literatur eine eventuelle Artefaktbildung bei der Verwendung von Detergentien zur Isolation von Membrandomänen diskutiert wird ¹⁰⁰. Daher müssen Untersuchungen, die *ex vivo* anhand von DRM durchgeführt werden, in der Interpretation mit Vorsicht behandelt werden ²⁵³.

4.5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit erarbeitete Methode der Lipidanalytik von Membranmikrodomänen oder anderer Zellmembranen kann für zukünftige Analysen weiter optimiert und ausgebaut werden.

Besonders wichtig ist dabei, die Glycosphingolipide und Cholesterol in ihren Anteilen direkt vergleichen zu können und zu den erfassten Lipiden in Relation setzen zu können. Dazu muss die Lipidextraktionsmethode für Glykolipide z.B. durch die Verwendung einer Festphasenextraktion optimiert werden. Für die Quantifizierung der Glycolipide sind die Anpassung der verwendeten Korrekturfaktoren oder die Verwendung zusätzlicher interner Standards unerlässlich. Zur Validierung der erhaltenden Daten ist eine verbesserte Auftrennung der Ceramide von TX-100 durch die HPLC-Systems, dass die Ceramide Anpassung des SO der störenden Einfluss Membrandomänenextrakte ohne einen des Detergens empfindlicher detektierbar werden. So könnten z.B. die stationäre Phase und die mobilen Phasen modifiziert werden, oder eine Normalphasensäule und eine Umkehrphasensäule für die HPLC-Auftrennung in Reihe kombiniert werden. Die genügend sensitive Detektion des Cholesterols im MS ohne eine notwendige Derivatisierung wäre ein weiterer Schritt, um die Domänen zu charakterisieren und ihre Struktur und Bildungsmechanismen besser zu verstehen.

Zusätzlich wäre es vorteilhaft, die Fettsäureverteilung innerhalb eines Moleküls und nicht nur die Summe der Kettenlängen und die Gesamtzahl der Doppelbindungen zu kennen. Neueste Hybrid-FTMS Geräte, die mit einem vorgeschalteten Quadrupol-Massenfilter und einer Kollisionszelle ausgerüstet sind, können datenabhängige MS/MS-Untersuchungen automatisch direkt während eines LC-MS-Laufes durchführen. Die Bestimmung der Verteilung und der Position der Fettsäurereste der Lipide könnte somit schnell *online* durchgeführt werden, ohne auf die Vorteile der akkuraten FTMS-Analytik verzichten zu müssen.

Durch die Reduktion der HPLC-Flussraten in Kombination mit *online* Nano-ESI können, falls erforderlich, die absoluten Nachweisgrenzen weiter gesenkt werden.

Inwieweit neue, massenspektrometrische Verfahren wie die *desorption electrospray ionisation* (DESI) oder das bildgebende MALDI *imaging* in der Lage sein werden, sehr sensitive Messungen direkt von Dünnschichtchromatographieplatten durchzuführen oder Membranbereiche ohne eine vorherige Extraktion aus den Zellen direkt auf ihren Lipidgehalt zu untersuchen, wird sich erst erweisen müssen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur empfindlichen Lipidanalytik von zellulären Membranmikrodomänen entwickelt. Sie beruht auf der direkten Kopplung einer Mikrofluss-HPLC mit der hochauflösenden FTMS in Verbindung mit einer teilweise automatisierten Identifikation der einzelnen Lipidspezies und einer Quantifizierung, die sowohl lipidspezifische Eigenschaften als auch MS- und HPLC-spezifische Faktoren berücksichtigt. Es wurde gezeigt, daß mit dieser Methode heterogene, zelluläre Lipidextrakte auf ihre Zusammensetzung hin detailliert analysiert und verschiedene Proben quantitativ verglichen werden können. Die Sensitivität der Methode erlaubt die Detektion und Identifikation von Lipidmolekülen im Femtomol-Bereich.

Die erarbeitete Lipidanalytik wurde dazu genutzt, die Membranmikrodomänen von LPS-responsiven, TLR4/MD2-transfizierten HEK-Zellen vor und nach der Stimulation zu untersuchen. Die Membranen von Zellen bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht, innerhalb derer rigide und fluide Bereiche exisitieren, die sich durch eine unterschiedliche Membrankomposition unterscheiden. Die rigiden Membranbereiche, die Membranmikrodomänen oder auch sogenannten *lipid rafts*, sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt und scheinen z.B. in der Signaltransduktion die Rekrutierung und Stabilisierung verschiedener Rezeptorkomplexe zu regulieren. Die Kenntnis des Lipidgehalts von Membranmikrodomänen sowie die Untersuchung, ob dieser nach einer Stimulation von Zellen einer Änderung unterliegt, können zu einem besseren Verständnis der Organisation und Dynamik dieser Unterstrukturen der Membran führen.

Zur Isolation der Membranmikrodomänen wurden vier verschiedene Extraktionsmethoden angewandt und zunächst mit Hilfe immunchemischer Methoden auf die Anwesenheit von in Domänen angereicherten Markermolekülen untersucht. Dabei zeigte sich, dass lediglich die Isolation mit Hilfe von 1% Triton X-100 zu reproduzierbaren Anreicherungen der gewählten Markermoleküle führt. Um eine massenspektrometrische Analyse dieser sogenannten DRM (<u>D</u>etergens-<u>r</u>esistenten <u>M</u>embranen) durchführen zu können, musste das Detergens zuvor von den Lipiden abgetrennt werden, da es den Nachweis empfindlich stört. Zur Vortrennung der

Proben erwies sich eine Normalphasen-HPLC als gut geeignet, die gleichzeitig die enthaltenden Lipde ihren polaren Kopfgrupen nach separierte.

Mehr als einhundert verschiedene Molekülspezies der Glycerophospholipide, Sphingomyeline und Ceramide konnten mit dem erarbeiteten Analyseverfahren in den zellulären Proben massenspektrometrisch identifiziert und guantifiziert werden. Als wichtigster Befund ergab sich, dass der SM-Anteil in den DRM-Extrakten gegenüber dem Gesamtextrakt vermindert war und nach einer Stimulation der Zellen noch weiter absank, während der Gehalt an Ceramiden zunahm und eine deutlich größere Heterogenität bezüglich der Fettsäurereste aufwies. Daraus könnte geschlossen werden, dass überwiegend Ceramid-angereicherte Membranmikrodomänen isoliert wurden, nicht aber die in der Literatur häufiger beschrieben SM/Cholesterolangereicherten Membrandomänen. Um die Bedeutung der beobachteten Veränderung der Lipidzusammensetzung bei der Signaltransduktion noch besser verstehen zu können, bedarf es jedoch einer weiteren Validierung der Daten.

Die erfolgreiche Anwendung der Methode auf zelluläre Membranmikrodomänen demonstriert die erreichte Empfindlichkeit und das Potential der erarbeiteten Methode zur detaillierten Erfassung der heterogenen Lipidzusammensetzung. Die Analytik ist daher auch für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen an Primärzellen, wie beispielsweise aus humanem Blut gewonnenen Makrophagen, geeignet, deren Untersuchung aufgrund des begrenzten Ausgangsmaterials schwierig ist.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Lottspeich F., Zorbas H. Bioanalytik, 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 2006.
- (2) Hanada K. Sphingolipids in infectious diseases. Jpn J Infect Dis. 2005;58:131-148.
- (3) Eyster KM. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. Adv Physiol Educ. 2007;31:5-16.
- (4) Seddon J.M., Templer R.H. Polymorphism of Lipid-Water Systems. Handbook of Biological Physics, Vol 1, Elsevier Science B V. 1995.
- (5) Fahy E, Subramaniam S, Brown HA et al. A comprehensive classification system for I ipids. J Lipid Res. 2005;46:839-861.
- (6) Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB (Hrsg.). The Lipid Handbook, 2nd Edition. Chapman & Hall . 1994.
- (7) Hirschmann H. The nature of substrate asymmetry in stereoselective reactions. J Biol Chem. 1960;235:2762-2767.
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML. The biosynthesis and functional role of cardiolipin.
 Prog Lipid Res. 2000;39:257-288.
- (9) Baker RR, Thompson W. Positional distribution and turnover of fatty acids in phosphatidic acid, phosphinositides, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat brain in vivo. Biochim Biophys Acta. 1972;270:489-503.
- (10) Ekroos K, Ejsing CS, Bahr U et al. Charting molecular composition of phosphatidylcholines by fatty acid scanning and ion trap MS3 fragmentation. J Lipid Res. 2003;44:2181-2192.
- (11) Brash AR. Arachidonic acid as a bioactive molecule. J Clin Invest. 2001;107:1339-1345.
- (12) Paltauf F. Ether lipids in biomembranes. Chem Phys Lipids. 1994;74:101-139.
- (13) McManus LM, Pinckard RN. PAF, a putative mediator of oral inflammation. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11:240-258.
- (14) Zoeller RA, Lake AC, Nagan N et al. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. Biochem J. 1999;338 (Pt 3):769-776.

- (15) Khaselev N, Murphy RC. Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmenyl glycerophosphocholine. J Lipid Res. 2000;41:564-572.
- (16) Holthuis JC, Pomorski T, Raggers RJ, Sprong H, van Meer G. The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. Physiol Rev. 2001;81:1689-1723.
- (17) Svennerholm L. Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides. J Neurochem. 1963;10:613-623.
- (18) Pomorski T, Hrafnsdottir S, Devaux PF, van Meer G. Lipid distribution and transport across cellular membranes. Semin Cell Dev Biol. 2001;12:139-148.
- (19) Merrill AH, Jr., Hannun YA, Bell RM. Introduction: sphingolipids and their metabolites in cell regulation. Adv Lipid Res. 1993;25:1-24.
- (20) Holthuis JC, Levine TP. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6:209-220.
- (21) Devaux PF. Phospholipid flippases. FEBS Lett. 1988;234:8-12.
- (22) Balla T. Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. J Endocrinol. 2006;188:135-153.
- (23) Hakomori S. Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. Curr Opin Hematol. 2003;10:16-24.
- (24) Singer SJ, Nicolson GL. The structure and chemistry of mammalian cell membranes. Am J Pathol. 1971;65:427-437.
- (25) Sackmann E. Biological Membranes: Architecture and Function. Handbook of Biological Physics, Vol 1, Elsevier Science B V. 1995.
- (26) Ikezawa H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. Biol Pharm Bull. 2002;25:409-417.
- (27) Yamaji-Hasegawa A, Tsujimoto M. Asymmetric distribution of phospholipids in biomembranes. Biol Pharm Bull. 2006;29:1547-1553.
- (28) Devaux PF, Morris R. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. Traffic. 2004;5:241-246.
- (29) Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. Biochem J. 1993;294 (Pt 1):1-14.
- (30) Sprong H, van der SP, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:504-513.
- (31) Daleke DL. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. J Lipid Res. 2003;44:233-242.

- (32) Greenberg ME, Sun M, Zhang R et al. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. J Exp Med. 2006;203:2613-2625.
- (33) Balasubramanian K, Mirnikjoo B, Schroit AJ. Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: Implications for apoptosis. J Biol Chem. 2007;Epub ahead of print.
- (34) Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the sphingolipids. Biochim Biophys Acta. 1995;1255:213-236.
- (35) Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. Biochim Biophys Acta. 1998;1376:91-145.
- (36) Binder WH, Barragan V, Menger FM. Domains and rafts in lipid membranes. Angew Chem Int Ed Engl. 2003;42:5802-5827.
- (37) Bar LK, Barenholz Y, Thompson TE. Effect of sphingomyelin composition on the phase structure of phosphatidylcholine-sphingomyelin bilayers. Biochemistry. 1997;36:2507-2516.
- (38) Veiga MP, Arrondo JL, Goni FM, Alonso A. Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. Biophys J. 1999;76:342-350.
- (39) Sankaram MB, Thompson TE. Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:8686-8690.
- (40) Filippov A, Oradd G, Lindblom G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. Biophys J. 2003;84:3079-3086.
- (41) de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophys J. 2003;85:2406-2416.
- (42) Veatch SL, Keller SL. A closer look at the canonical 'Raft Mixture' in model membrane studies. Biophys J. 2003;84:725-726.
- (43) Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN et al. Lipid rafts reconstituted in model membranes. Biophys J. 2001;80:1417-1428.
- (44) Miao L, Nielsen M, Thewalt J et al. From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. Biophys J. 2002;82:1429-1444.
- (45) Ohvo H, Slotte JP. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. Biochemistry. 1996;35:8018-8024.
- (46) McMullen TP, Vilcheze C, McElhaney RN, Bittman R. Differential scanning calorimetric study of the effect of sterol side chain length and structure on

dipalmitoylphosphatidylcholine thermotropic phase behavior. Biophys J. 1995;69:169-176.

- (47) Ramstedt B, Slotte JP. Membrane properties of sphingomyelins. FEBS Lett. 2002;531:33-37.
- (48) Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2004;33:269-295.
- (49) Saslowsky DE, Lawrence J, Ren X et al. Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. J Biol Chem. 2002;277:26966-26970.
- (50) Carter WG, Hakomori S. A new cell surface, detergent-insoluble glycoprotein matrix of human and hamster fibroblasts. The role of disulfide bonds in stabilization of the matrix. J Biol Chem. 1981;256:6953-6960.
- (51) Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. Cell. 1992;68:533-544.
- (52) Sot J, Bagatolli LA, Goni FM, Alonso A. Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. Biophys J. 2005.
- (53) Brown DA, London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes. J Membr Biol. 1998;164:103-114.
- (54) Ilangumaran S, Hoessli DC. Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. Biochem J. 1998;335 (Pt 2):433-440.
- (55) Schroeder R, London E, Brown D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:12130-12134.
- (56) London E. How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:203-220.
- (57) Schroeder RJ, Ahmed SN, Zhu Y, London E, Brown DA. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. J Biol Chem. 1998;273:1150-1157.
- (58) Ahmed SN, Brown DA, London E. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. Biochemistry. 1997;36:10944-10953.

- (59) Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. Nature. 1997;387:569-572.
- (60) Sharma P, Varma R, Sarasij RC et al. Nanoscale organization of multiple GPIanchored proteins in living cell membranes. Cell. 2004;116:577-589.
- (61) Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. J Cell Biol. 2002;157:1071-1081.
- (62) de Almeida RF, Loura LM, Fedorov A, Prieto M. Lipid rafts have different sizes depending on membrane composition: a time-resolved fluorescence resonance energy transfer study. J Mol Biol. 2005;346:1109-1120.
- (63) Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. Trends Cell Biol. 2001;11:492-496.
- (64) Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. Biophys J. 2002;82:2526-2535.
- (65) Stan RV. Structure of caveolae. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:334-348.
- (66) Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of caveolin-1. J Biol Chem. 2002;277:41295-41298.
- (67) Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG. Detergent-insoluble glycolipid microdomains in lymphocytes in the absence of caveolae. J Biol Chem. 1994;269:30745-30748.
- (68) Parton RG. Caveolae--from ultrastructure to molecular mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:162-167.
- (69) Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. Biochemistry. 1988;27:6197-6202.
- (70) van Meer G. Cell biology. The different hues of lipid rafts. Science. 2002;296:855-857.
- (71) Parton RG, Richards AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. Traffic. 2003;4:724-738.
- (72) Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:349-363.
- (73) Fantini J, Garmy N, Mahfoud R, Yahi N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimers and prion diseases. Expert Rev Mol Med. 2002;2002:1-22.
- (74) Lucero HA, Robbins PW. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. Arch Biochem Biophys. 2004;426:208-224.
- (75) Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. J Cell Biol. 2003;160:113-123.

- (76) Rajendran L, Simons K. Lipid rafts and membrane dynamics. J Cell Sci. 2005;118:1099-1102.
- (77) Manes S, Viola A. Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. Mol Membr Biol. 2006;23:59-69.
- (78) Zaas DW, Duncan M, Rae WJ, Abraham SN. The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:305-313.
- (79) Pelkmans L. Secrets of caveolae- and lipid raft-mediated endocytosis revealed by mammalian viruses. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:295-304.
- (80) Ritchie K, Kusumi A. Role of the membrane skeleton in creation of microdomains. Subcell Biochem. 2004;37:233-245.
- (81) Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1:31-39.
- (82) Foster LJ, De Hoog CL, Mann M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:5813-5818.
- (83) Dykstra M, Cherukuri A, Sohn HW, Tzeng SJ, Pierce SK. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. Annu Rev Immunol. 2003;21:457-481.
- (84) Pizzo P, Viola A. Lipid rafts in lymphocyte activation. Microbes Infect. 2004;6:686-692.
- (85) Drevot P, Langlet C, Guo XJ et al. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. EMBO J. 2002;21:1899-1908.
- (86) Zeyda M, Stulnig TM. Lipid Rafts & Co.: an integrated model of membrane organization in T cell activation. Prog Lipid Res. 2006;45:187-202.
- (87) Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell receptor signalling. Mol Membr Biol. 2006;23:49-57.
- (88) Pierce SK. Lipid rafts and B-cell activation. Nat Rev Immunol. 2002;2:96-105.
- (89) Field KA, Holowka D, Baird B. Structural aspects of the association of FcepsilonRI with detergent-resistant membranes. J Biol Chem. 1999;274:1753-1758.
- (90) Katagiri YU, Kiyokawa N, Fujimoto J. A role for lipid rafts in immune cell signaling. Microbiol Immunol. 2001;45:1-8.
- (91) Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. J Biol Chem. 1999;274:10689-10692.
- (92) Triantafilou M, Morath S, Mackie A, Hartung T, Triantafilou K. Lateral diffusion of Tolllike receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. J Cell Sci. 2004;117:4007-4014.
- (93) Veatch SL, Keller SL. Organization in lipid membranes containing cholesterol. Phys Rev Lett. 2002;89:268101.

- (94) Fringeli UP. The Structure of Lipids and Proteins Studied by Attenuated Total Reflection (ATR) Infrared Spectroscopy. Z Naturforsch. 1977;32c:20-45.
- (95) Roes S, Seydel U, Gutsmann T. Probing the properties of lipopolysaccharide monolayers and their interaction with the antimicrobial peptide polymyxin B by atomic force microscopy. Langmuir. 2005;21:6970-6978.
- (96) Lawrence JC, Saslowsky DE, Edwardson JM, Henderson RM. Real-time analysis of the effects of cholesterol on lipid raft behavior using atomic force microscopy. Biophys J. 2003;84:1827-1832.
- (97) Dufrene YF, Lee GU. Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. Biochim Biophys Acta. 2000;1509:14-41.
- (98) Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K. Resistance of cell membranes to different detergents. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:5795-5800.
- (99) Heerklotz H, Szadkowska H, Anderson T, Seelig J. The sensitivity of lipid domains to small perturbations demonstrated by the effect of Triton. J Mol Biol. 2003;329:793-799.
- (100) Heerklotz H. Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. Biophys J. 2002;83:2693-2701.
- (101) Smart EJ, Ying YS, Mineo C, Anderson RG. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10104-10108.
- (102) Song KS, Li S, Okamoto T et al. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. J Biol Chem. 1996;271:9690-9697.
- (103) Lian T, Ho RJ. Cholera toxin B-mediated targeting of lipid vesicles containing ganglioside GM1 to mucosal epithelial cells. Pharm Res. 1997;14:1309-1315.
- (104) Badizadegan K, Wolf AA, Rodighiero C et al. Floating cholera toxin into epithelial cells: functional association with caveolae-like detergent-insoluble membrane microdomains. Int J Med Microbiol. 2000;290:403-408.
- (105) Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE et al. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. J Biol Chem. 1997;272:13793-13802.
- (106) Dermine JF, Duclos S, Garin J et al. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. J Biol Chem. 2001;276:18507-18512.
- (107) Salzer U, Prohaska R. Stomatin, flotillin-1, and flotillin-2 are major integral proteins of erythrocyte lipid rafts. Blood. 2001;97:1141-1143.

- (108) Quest AF, Leyton L, Parraga M. Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease. Biochem Cell Biol. 2004;82:129-144.
- (109) Hanada K, Nishijima M, Akamatsu Y, Pagano RE. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. J Biol Chem. 1995;270:6254-6260.
- (110) Ishitsuka R, Sato SB, Kobayashi T. Imaging lipid rafts. J Biochem (Tokyo). 2005;137:249-254.
- (111) Schütz GJ, Kada G, Pastushenko VP, Schindler H. Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. EMBO J. 2000;19:892-901.
- (112) Mayor S, Rao M. Rafts: scale-dependent, active lipid organization at the cell surface. Traffic. 2004;5:231-240.
- (113) Rao M, Mayor S. Use of Forster's resonance energy transfer microscopy to study lipid rafts. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:221-233.
- (114) Kenworthy AK, Petranova N, Edidin M. High-resolution FRET microscopy of cholera toxin B-subunit and GPI-anchored proteins in cell plasma membranes. Mol Biol Cell. 2000;11:1645-1655.
- (115) Prior IA, Muncke C, Parton RG, Hancock JF. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. J Cell Biol. 2003;160:165-170.
- (116) Kusumi A, Ike H, Nakada C, Murase K, Fujiwara T. Single-molecule tracking of membrane molecules: plasma membrane compartmentalization and dynamic assembly of raft-philic signaling molecules. Semin Immunol. 2005;17:3-21.
- (117) Sako Y, Yanagida T. Single-molecule visualization in cell biology. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;Suppl:SS1-SS5.
- (118) Murase K, Fujiwara T, Umemura Y et al. Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. Biophys J. 2004;86:4075-4093.
- (119) White T, Bursten S, Federighi D, Lewis RA, Nudelman E. High-resolution separation and quantification of neutral lipid and phospholipid species in mammalian cells and sera by multi-one-dimensional thin-layer chromatography. Anal Biochem. 1998;258:109-117.
- (120) Tserng KY, Griffin R. Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. Anal Biochem. 2003;323:84-93.

- (121) Christie WW. Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. J Lipid Res. 1985;26:507-512.
- (122) Patton GM, Robins SJ. Separation and quantitation of phospholipid classes by HPLC. Methods Mol Biol. 1998;110:193-215.
- (123) Nakagawa Y, Horrocks LA. Separation of alkenylacyl, alkylacyl, and diacyl analogues and their molecular species by high performance liquid chromatography. J Lipid Res. 1983;24:1268-1275.
- (124) Robins SJ, Patton GM. Separation of phospholipid molecular species by high performance liquid chromatography: potentials for use in metabolic studies. J Lipid Res. 1986;27:131-139.
- (125) Schiller J, Arnold K. Application of high resolution 31P NMR spectroscopy to the characterization of the phospholipid composition of tissues and body fluids - a methodological review. Med Sci Monit. 2002;8:MT205-MT222.
- (126) Vielhaber G, Brade L, Lindner B et al. Mouse anti-ceramide antiserum: a specific tool for the detection of endogenous ceramide. Glycobiology. 2001;11:451-457.
- (127) Murphy RC, Fiedler J, Hevko J. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. Chem Rev. 2001;101:479-526.
- (128) Pulfer M, Murphy RC. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. Mass Spectrom Rev. 2003;22:332-364.
- (129) Jensen NJ, Tomer KB, Gross ML. FAB MS/MS for phosphatidylinositol, -glycerol, ethanolamine and other complex phospholipids. Lipids. 1987;22:480-489.
- (130) Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. Biochem J. 2001;355:545-561.
- (131) Han X, Gross RW. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:10635-10639.
- (132) Brügger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:2339-2344.
- (133) Lehmann WD. Massenspektrometrie in der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 1995.
- (134) Kerwin JL, Tuininga AR, Ericsson LH. Identification of molecular species of glycerophospholipids and sphingomyelin using electrospray mass spectrometry. J Lipid Res. 1994;35:1102-1114.

- (135) Jackson SN, Wang HY, Woods AS. In Situ Structural Characterization of Glycerophospholipids and Sulfatides in Brain Tissue Using MALDI-MS/MS. J Am Soc Mass Spectrom. 2007;18:17-26.
- (136) Schiller J, Suss R, Arnhold J et al. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. Prog Lipid Res. 2004;43:449-488.
- (137) Jones JJ, Stump MJ, Fleming RC, Lay JO, Jr., Wilkins CL. Strategies and data analysis techniques for lipid and phospholipid chemistry elucidation by intact cell MALDI-FTMS. J Am Soc Mass Spectrom. 2004;15:1665-1674.
- (138) Isaac G, Jeannotte R, Esch SW, Welti R. New mass-spectrometry-based strategies for lipids. Genet Eng (N Y). 2007;28:129-157.
- (139) Taguchi R, Houjou T, Nakanishi H et al. Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005;823:26-36.
- (140) German JB, Gillies LA, Smilowitz JT, Zivkovic AM, Watkins SM. Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. Curr Opin Lipidol. 2007;18:66-71.
- (141) Wenk MR. The emerging field of lipidomics. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:594-610.
- (142) Milne S, Ivanova P, Forrester J, Alex BH. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. Methods. 2006;39:92-103.
- (143) van Meer G. Cellular lipidomics. EMBO J. 2005;24:3159-3165.
- (144) Han X, Gross RW. Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. Mass Spectrom Rev. 2004.
- (145) Larsen A, Uran S, Jacobsen PB, Skotland T. Collision-induced dissociation of glycero phospholipids using electrospray ion-trap mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2001;15:2393-2398.
- (146) Houjou T, Yamatani K, Nakanishi H et al. Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:3123-3130.
- (147) Hsu FF, Turk J, Thukkani AK et al. Characterization of alkylacyl, alk-1-enylacyl and lyso subclasses of glycerophosphocholine by tandem quadrupole mass spectrometry with electrospray ionization. J Mass Spectrom. 2003;38:752-763.
- (148) Lieser B, Liebisch G, Drobnik W, Schmitz G. Quantification of sphingosine and sphinganine from crude lipid extracts by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Lipid Res. 2003;44:2209-2216.
- (149) Houjou T, Yamatani K, Imagawa M, Shimizu T, Taguchi R. A shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid

chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19:654-666.

- (150) Sommer U, Herscovitz H, Welty FK, Costello CE. LC-MS-based method for the qualitative and quantitative analysis of complex lipid mixtures. J Lipid Res. 2006;47:804-814.
- (151) Taguchi R, Hayakawa J, Takeuchi Y, Ishida M. Two-dimensional analysis of phospholipids by capillary liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2000;35:953-966.
- (152) Comisarow MB, Marshall AG. Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. Chem Phys Lett. 1974;25:282-283.
- (153) Hendrickson CL, Emmett MR. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Annu Rev Phys Chem. 1999;50:517-536.
- (154) Hughey CA, Hendrickson CL, Rodgers RP, Marshall AG, Qian K. Kendrick mass defect spectrum: a compact visual analysis for ultrahigh-resolution broadband mass spectra. Anal Chem. 2001;73:4676-4681.
- (155) Wu Z, Rodgers RP, Marshall AG. Two- and three-dimensional van krevelen diagrams: a graphical analysis complementary to the kendrick mass plot for sorting elemental compositions of complex organic mixtures based on ultrahigh-resolution broadband fourier transform ion cyclotron resonance mass measurements. Anal Chem. 2004;76:2511-2516.
- (156) Fridriksson EK, Shipkova PA, Sheets ED et al. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. Biochemistry. 1999;38:8056-8063.
- (157) Ishida M, Yamazaki T, Houjou T et al. High-resolution analysis by nano-electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for the identification of molecular species of phospholipids and their oxidized metabolites. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:2486-2494.
- (158) Schwudke D, Hannich JT, Surendranath V et al. Top-down lipidomic screens by multivariate analysis of high-resolution survey mass spectra. Anal Chem. 2007;79:4083-4093.
- (159) Loo RR, Dales N, Andrews PC. Surfactant effects on protein structure examined by electrospray ionization mass spectrometry. Protein Sci. 1994;3:1975-1983.
- (160) Funk J, Li X, Franz T. Threshold values for detergents in protein and peptide samples for mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2005;19:2986-2988.

- (161) Wang L, Connelly MA, Ostermeyer AG et al. Caveolin-1 does not affect SR-BImediated cholesterol efflux or selective uptake of cholesteryl ester in two cell lines. J Lipid Res. 2003;44:807-815.
- (162) Wharton J, Meshulam T, Vallega G, Pilch P. Dissociation of insulin receptor expression and signaling from caveolin-1 expression. J Biol Chem. 2005;280:13483-13486.
- (163) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-254.
- (164) Liebisch G, Binder M, Schifferer R et al. High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Biochim Biophys Acta. 2006;1761:121-128.
- (165) Amundson DM, Zhou M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. J Biochem Biophys Methods. 1999;38:43-52.
- (166) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem. 1957;226:497-509.
- (167) Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Med Sci. 1959;37:911-917.
- (168) Kirazov LP, Venkov LG, Kirazov EP. Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions. Anal Biochem. 1993;208:44-48.
- (169) Lutzke BS, Braughler JM. An improved method for the identification and quantitation of biological lipids by HPLC using laser light-scattering detection. J Lipid Res. 1990;31:2127-2130.
- (170) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem. 1988;60:2299-2301.
- (171) Glückmann M, Pfenninger A, Krüger R, Thierolf M, Karas M, Horneffer V et al. Mechanisms in MALDI analysis: surface interaction or incorporation of analytes? International Journal of Mass Spectrometry 210/211, 121-132. 2001.
- (172) Gimon M.E., Preston L.M., Solouki T, White M.A., Russell D.H. Are Proton Transfer Reactions of Excited States Involved in UV Laser Desorption Ionization? Organic Mass Spectrometry 27, 827-830. 1992.
- (173) Wang B, Dreisewerd K, Bahr U, Karas M, Hillenkamp F. Gas-Phase Cationization and Protonation of Neutrals Generated by Matrix-Assisted Laser Desorption. J Am Soc Mass Spectrom. 1993;4:393-398.

- (174) Dole M, Hines RL, Mack RC, Mobley LD, Ferguson MB. Molecular Beams of Macroions. J Chem Phy. 1968;49:2240-2249.
- (175) Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science. 1989;246:64-71.
- (176) Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2000;35:763-772.
- (177) Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2000;35:804-817.
- (178) Fenn JB. Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). Angew Chem Int Ed Engl. 2003;42:3871-3894.
- (179) Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. Anal Chem. 1996;68:1-8.
- (180) Stephens W. A Pulsed Mass Spectrometer With Time Dispersion. Phys Rev. 1946;69:691.
- (181) Wiley W, McLaren I. Time-of-Flight Mass Spectrometer With Improved Resolution. Rev Sci Imstrum. 1955;26:1157.
- (182) Caravatti P, Allemann M. The Infinity Cell: A New Trapped-Ion Cell With Radiofrequency Covered Trapping Electrodes for FT-ICR-MS. Organic Mass Spectrometry. 1991;26:514-518.
- (183) Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer. Mass Spectrom Rev. 1998;17:1-35.
- (184) Guan S. MAG. Stored waveform inverse Fourier trasform (SWIFT) ion excitation in traped-ion mass spectrometry: theory and applications. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes 157/158, 5-37. 1996.
- (185) McLafferty F, Bente P, Kornfeld R, Tsai S-C, Howe I. Collisional Activation Spectra of Organic Ions. J Am Chem Soc. 1973;95:2120-2129.
- (186) Gauthier J, Trautmann T, Jacobson D. Sustained Off-Resonance Irradiation for Collision-Activated Dissociation Involving FT-ICR-MS. CID Technique That Emulates Infrared Multiphoton Dissociation. Analytica Chimica Acta. 1991;246:211-225.
- (187) Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8:871-874.
- (188) McIntire FC, Sievert HW, Barlow GH, Finley RA, Lee AY. Chemical, physical, biological properties of a lipopolysaccharide from Escherichia coli K-235. Biochemistry. 1967;6:2363-2372.

- (189) Su MW, Yu CL, Burakoff SJ, Jin YJ. Targeting Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1) into lipid rafts inhibits CD3-induced T cell activation. J Immunol. 2001;166:3975-3982.
- (190) Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics. 2004;4:3665-3685.
- (191) Dobos K.M., Belisle J.T., Scott B., Rooney R. The Zoom IPGRunner System: A versatile apparatus for the analysis of complex hydrophobic proteins. Focus, Invitrogen 25[2], 7-10. 2003.
- (192) Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. Curr Biol. 1993;3:327-332.
- (193) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:4350-4354.
- (194) James PF, Perugini MA, O'Hair RA. Sources of artefacts in the electrospray ionization mass spectra of saturated diacylglycerophosphocholines: from condensed phase hydrolysis reactions through to gas phase intercluster reactions. J Am Soc Mass Spectrom. 2006;17:384-394.
- (195) Macdonald JL, Pike LJ. A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. J Lipid Res. 2005.
- (196) Patton GM, Fasulo JM, Robins SJ. Separation of phospholipids and individual molecular species of phospholipids by high-performance liquid chromatography. J Lipid Res. 1982;23:190-196.
- (197) Meder D, Simons K. Lipid Rafts, Caveolae, and Membrane Traffic. Lipid Rafts and Caveolae, Wiley-VCH. 2006.
- (198) Hancock JF. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7:456-462.
- (199) Pike LJ, Han X, Chung KN, Gross RW. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. Biochemistry. 2002;41:2075-2088.
- (200) Pike LJ, Han X, Gross RW. EGF receptors are localized to lipid rafts that contain a balance of inner and outer leaflet lipids: A shotgun lipidomics study. J Biol Chem. 2005.
- (201) Abrami L, Fivaz M, Kobayashi T et al. Cross-talk between caveolae and glycosylphosphatidylinositol-rich domains. J Biol Chem. 2001;276:30729-30736.

- (202) Sato K, Iwasaki T, Ogawa K et al. Low density detergent-insoluble membrane of Xenopus eggs: subcellular microdomain for tyrosine kinase signaling in fertilization. Development. 2002;129:885-896.
- (203) Suzuki K, Sheetz MP. Binding of cross-linked glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to discrete actin-associated sites and cholesterol-dependent domains. Biophys J. 2001;81:2181-2189.
- (204) Harder T, Simons K. Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. Eur J Immunol. 1999;29:556-562.
- (205) Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM. Plasma membraneassociated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:18992-18997.
- (206) Shah M, Patel K, Fried VA, Sehgal PB. Interactions of STAT3 with caveolin-1 and heat shock protein 90 in plasma membrane raft and cytosolic complexes. Preservation of cytokine signaling during fever. J Biol Chem. 2002;277:45662-45669.
- (207) Broquet AH, Thomas G, Masliah J, Trugnan G, Bachelet M. Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release. J Biol Chem. 2003;278:21601-21606.
- (208) Triantafilou M, Miyake K, Golenbock DT, Triantafilou K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. J Cell Sci. 2002;115:2603-2611.
- (209) Wang R, Kovalchin JT, Muhlenkamp P, Chandawarkar RY. Exogenous heat shock protein 70 binds macrophage lipid raft microdomain and stimulates phagocytosis, processing, and MHC-II presentation of antigens. Blood. 2006;107:1636-1642.
- (210) Gkantiragas I, Brugger B, Stuven E et al. Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. Mol Biol Cell. 2001;12:1819-1833.
- (211) Bini L, Pacini S, Liberatori S et al. Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. Biochem J. 2003;369:301-309.
- (212) Garofalo T, Giammarioli AM, Misasi R et al. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. Cell Death Differ. 2005;12:1378-1389.
- (213) Cheng MY, Hartl FU, Horwich AL. The mitochondrial chaperonin hsp60 is required for its own assembly. Nature. 1990;348:455-458.

- (214) Koll H, Guiard B, Rassow J et al. Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. Cell. 1992;68:1163-1175.
- (215) Shaw S, Geyer R, Alter GM. Dissociation of mitochondrial malate dehydrogenase into active soluble subunits. Biochim Biophys Acta. 2000;1478:248-256.
- (216) Friedrich CA, Ferrell RE, Siciliano MJ, Kitto GB. Biochemical and genetic identity of alpha-keto acid reductase and cytoplasmic malate dehydrogenase from human erythrocytes. Ann Hum Genet. 1988;52:25-37.
- (217) Bodennec J, Koul O, Aguado I et al. A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. J Lipid Res. 2000;41:1524-1531.
- (218) Dreisewerd K, Lemaire R, Pohlentz G et al. Molecular profiling of native and matrixcoated tissue slices from rat brain by infrared and ultraviolet laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry. Anal Chem. 2007;79:2463-2471.
- (219) Dreisewerd K, Muthing J, Rohlfing A et al. Analysis of gangliosides directly from thinlayer chromatography plates by infrared matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. Anal Chem. 2005;77:4098-4107.
- (220) Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. Biochim Biophys Acta. 2004;1666:105-117.
- (221) Norris JL, Porter NA, Caprioli RM. Mass spectrometry of intracellular and membrane proteins using cleavable detergents. Anal Chem. 2003;75:6642-6647.
- (222) Norris JL, Porter NA, Caprioli RM. Combination detergent/MALDI matrix: functional cleavable detergents for mass spectrometry. Anal Chem. 2005;77:5036-5040.
- (223) Gu M, Kerwin JL, Watts JD, Aebersold R. Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. Anal Biochem. 1997;244:347-356.
- (224) Liebisch G, Drobnik W, Lieser B, Schmitz G. High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2002;48:2217-2224.
- (225) Sandhoff R, Brugger B, Jeckel D, Lehmann WD, Wieland FT. Determination of cholesterol at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Lipid Res. 1999;40:126-132.
- (226) DeLong CJ, Baker PR, Samuel M, Cui Z, Thomas MJ. Molecular species composition of rat liver phospholipids by ESI-MS/MS: the effect of chromatography. J Lipid Res. 2001;42:1959-1968.

- (227) Hvattum E, Larsen A, Uran S, Michelsen PM, Skotland T. Specific detection and quantification of palmitoyl-stearoyl-phosphatidylserine in human blood using normalphase liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998;716:47-56.
- (228) Malavolta M, Bocci F, Boselli E, Frega NG. Normal phase liquid chromatographyelectrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of phospholipid molecular species in blood mononuclear cells: application to cystic fibrosis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004;810:173-186.
- (229) Pacetti D, Malavolta M, Bocci F, Boselli E, Frega NG. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometric analysis and quantification of phosphatidylcholine molecular species in the serum of cystic fibrosis subjects supplemented with docosahexaenoic acid. Rapid Commun Mass Spectrom. 2004;18:2395-2400.
- (230) Liebisch G, Drobnik W, Reil M et al. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). J Lipid Res. 1999;40:1539-1546.
- (231) Koivusalo M, Haimi P, Heikinheimo L, Kostiainen R, Somerharju P. Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. J Lipid Res. 2001;42:663-672.
- (232) Bielawski J, Szulc ZM, Hannun YA, Bielawska A. Simultaneous quantitative analysis of bioactive sphingolipids by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Methods. 2006;39:82-91.
- (233) Merrill AH, Jr., Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: highthroughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Methods. 2005;36:207-224.
- (234) Müthing J. Analyses of glycosphingolipids by high-performance liquid chromatography. Methods Enzymol. 2000;312:45-64.
- (235) Alberts B., Bray D., Lewis J. et al. Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage. Wiley VCH. 1995.
- (236) Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Lab Invest. 2006;86:9-22.
- (237) Connor WE, Lin DS, Thomas G et al. Abnormal phospholipid molecular species of erythrocytes in sickle cell anemia. J Lipid Res. 1997;38:2516-2528.

- (238) Blom TS, Koivusalo M, Kuismanen E et al. Mass spectrometric analysis reveals an increase in plasma membrane polyunsaturated phospholipid species upon cellular cholesterol loading. Biochemistry. 2001;40:14635-14644.
- (239) Edidin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 2003;32:257-283.
- (240) Calhoun WI, Shipley GG. Fatty acid composition and thermal behavior of natural sphingomyelins. Biochim Biophys Acta. 1979;555:436-441.
- (241) Karlsson AA, Michelsen P, Odham G. Molecular species of sphingomyelin: determination by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with electrospray and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. J Mass Spectrom. 1998;33:1192-1198.
- (242) Koumanov KS, Wolf C, Quinn PJ. Lipid composition of membrane domains. Subcell Biochem. 2004;37:153-163.
- (243) Martin RE, Elliott MH, Brush RS, Anderson RE. Detailed characterization of the lipid composition of detergent-resistant membranes from photoreceptor rod outer segment membranes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005;46:1147-1154.
- (244) Örtegren U, Karlsson M, Blazic N et al. Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. Eur J Biochem. 2004;271:2028-2036.
- (245) Bollinger CR, Teichgraber V, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains. Biochim Biophys Acta. 2005;1746:284-294.
- (246) Grassme H, Riethmuller J, Gulbins E. Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. Prog Lipid Res. 2007.
- (247) Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? FEBS Lett. 2002;531:47-53.
- (248) Hansen GH, Immerdal L, Thorsen E et al. Lipid rafts exist as stable cholesterolindependent microdomains in the brush border membrane of enterocytes. J Biol Chem. 2001;276:32338-32344.
- (249) Megha, London E. Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. J Biol Chem. 2004;279:9997-10004.
- (250) Goggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. Nat Med. 2004;10:155-160.
- (251) Gulbins E, Kolesnick R. Raft ceramide in molecular medicine. Oncogene. 2003;22:7070-7077.

- (252) Cuschieri J, Bulger E, Billgrin J, Garcia I, Maier RV. Acid sphingomyelinase is required for lipid Raft TLR4 complex formation. Surg Infect (Larchmt). 2007;8:91-106.
- (253) Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. Trends Biochem Sci. 2005;30:430-436.
- (254) Johnson DW, ten Brink HJ, Jakobs C. A rapid screening procedure for cholesterol and dehydrocholesterol by electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Lipid Res. 2001;42:1699-705

Abkürzungsverzeichnis

a.l.	absolute Intensität
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCR	B-cell receptor
BSA	bovine serum albumin
CCA	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
CD	cluster of differentiation
Cer	Ceramid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopronyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CID	collision induced dissociation
cmc	critical micellar concentration
CSD	capillary skimmer dissociation
СТВ	ß-Untereinheit des Cholera Toxins
DA	Data Analysis
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DESI	desorption electrospray ionisation
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
DMPS	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoserin
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin
DRM	detergens-resistant membranes (Detergens-resistente Membranen)
DTT	Dithiothreitol
ECD	electron capture dissociation
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELSD	evaporative light scattering detector
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	electrospray ionization
FcɛRI	Immunglobulin E-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FT	Fourier-transform

FWHM	full width at half maximum	
Gal	Galactose	
GC	Gaschromatographie	
Glc	Glucose	
GM	Monosialogangliosid	
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	
HEK	human embryonic kidney	
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonat	
HPLC	high performance liquid chromatographie	
hrp	horse radish peroxidase	
HSP	Hitzeschockprotein	
ICR	ion cyclotron resonance	
I.D.	inner diameter	
IR	Infrarot	
IRMPD	infrared multiphoton dissociation	
IUPAC	international union of pure and applied chemistry	
Lac	Lactose	
LC	liquid chromatographie	
l _d	liquid-disordered	
LG	Laborgruppe	
l _o	liquid-ordered	
LPS	Lipopolysaccharid	
М	Molekül in: [M+nH] ⁿ⁺	
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization	
MD	Myeolid differentiation protein	
MDH	Malatdehydrogenase	
MIRR	multichain immune recognition receptors	
MOWSE	molecular weight search	
MS	mass spectrometry/spectrometer (Massenspektrometrie/-meter)	
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie Experiment	
m/z	Masse- zu Ladungsverhältnis	
NCBI	national center for biotechnology information	
n.d.	nicht detektiert	
NMR	nuclear magnetic resonance	
PAF	platelet-activating factor	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	
PBS	phosphate buffered saline	
----------------	--	--
PC	Phosphatidylcholin	
PE	Phosphatidylethanolamin	
PG	Phosphatidylglycerol	
PI	Phosphatidylinositol	
pl	isoelektrischer Punkt	
PMF	peptide mass fingerprinting	
PNS	post-nuclear supernatant	
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn-</i> glycero-3-phosphocholin	
POPE	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	
pPC	plasmanyl-/plasmenyl-PC	
pPE	plasmanyl-/plasmenyl-PE	
ppm	parts per million	
PS	Phosphatidylserin	
r.l.	relative Intensität	
rp	reversed phase	
RT	Raumtemperatur	
scr	Rous sacroma virus	
SDS	sodium dodecyl sulfate	
S-Form	<i>smooth</i> -Form	
SIMS	secondary ion mass spectrometry	
SM	Sphingomyelin	
sn	stereospecific numbered	
So	solid-ordered	
SORI	sustained off resonace irradiation	
SWIFT	stored-waveform inverse Fourier-transform	
TBS	Tris buffered saline	
TCR	T-cell receptor	
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	
TFA	trifluoroacetic acid	
TLR4	Toll-like receptor 4	
T _m	Schmelztemperatur	
TNE	Tris, NaCl, EDTA	
TOF	time-of-flight	
Tris	Tris-hydroxylmethyl-aminomethan	
T-TBS	Tween-Tris buffered saline	

Tween	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
TX-100	Triton X-100
u	unified atomic mass unit
UV	Ultraviolett
v	volume
w	weight

Lebenslauf

Name Geburtsdatum Geburtsort Staatsangehörigkei	t	Catharina Crone 06.10.1976 Hamburg deutsch
Schulbildung	1983 – 1987 1987 – 1996	Grundschule Gymnasium, Hamburg
	07/1996	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Hochschulbildung	1996 - 2002	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Hauptfach: Genetik und Molekularbiologie Nebenfächer: Biochemie und Botanik
	12/2002	Abschluss: Diplom
	seit 04/2003	Promotion am Forschungszentrum Borstel, Abteilung Immunchemie und biochemische Mikrobiologie, Laborgruppe Biophysik und Laborgruppe Immunchemie
Veröffentlichungen	2005	Hübner, G., Crone, C., Lindner B. "Application of sustained off-resonance irradiation infrared multiphoton dissociation tandem mass spectrometry to the analysis of biomolecules" Eur J Mass Spectrom 2005; 11(5):483-7
	2006	Crone C., Hübner G., Lindner B. "A Mass Spectrometric Approach to Analyze the Lipid Composition of Detergent-Resistant Membranes Isolated from Cells" ThP 350, Proceedings of the 54 th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, WA, May 28-June 1, 2006
Auszeichnungen	2004	Posterpreis "Jochen Franzen Preis" der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)
	2006	Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS)

Danksagung

Ich bedanke mich bei PD Dr. Buko Lindner für die Betreuung, für sein großes Interesse an der Arbeit, für die ständige Gesprächsbereitschaft und wertvollen Ratschläge.

Des Weiteren möchte ich Prof. Ulrich Seydel, PD Dr. Thomas Gutsmann, Prof. E.T. Rietschel und Prof. U. Zähringer danken.

Prof. Dr. Thomas Peters danke ich für die Übernahme der Begutachtung der Dissertation. Prof. Otto Holst danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Gutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Göran Hübner, der mir mit Rat und Tat stets zur Seite stand und dem auch die aufmunternden Worte nie ausgingen.

Regina Engel, Laborgruppe Strukturbiochemie, danke ich für die Hilfe bei der HPLC. Ein Dankeschön auch an Dr. Christian Ihling, Universität Halle-Wittenberg, der mir bei der Kopplung der HPLC und des MS eine große Hilfe war. Dr. Eike Reppien und Florian Hohrenkamp danke ich für die Durchführung des Caveolin-Tests bzw. für die Anfertigung der 2D-Proteingele.

Der gesamten Arbeitsgruppe Biophysik gilt mein Dank für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Besonders Arne Böhling und Jörg Howe ein ganz großes Dankeschön für das stete Mutmachen und die große Hilfe. Danke auch an Nina Hahlbrock, Brigitte Kunz und Helga Lüthje. Vielen Dank PD Dr. Andra Schromm für die Diskussionsbereitschaft und guten Tips hinsichtlich der biologischen Versuche. Bei Dr. Jörg Andrä bedanke ich mich für das kritische Durcharbeiten des Manuskriptes und viele Tips und Hinweise. Prof. Klaus Brandenburg einen Dank für die Durchsicht der Arbeit.

Thomas, Arne und Katja einen Dank für das gute Gelingen unserer kleinen Fahrgemeinschaft.

Danke an alle meine Freunde und an Johanna für ihren Beistand jenseits der fachlichen Fragen und für entspannte Stunden.

Roland danke ich für seine unendliche Geduld, seinen ansteckenden Optimismus und dass ich stets auf ihn zählen konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie immer für mich da waren.

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2003 bis Juni 2007 in den Laborgruppen Biophysik und Immunchemie des Forschungszentrums Borstel unter der Leitung von PD Dr. Buko Lindner angefertigt.

Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Weder vor noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 20.06.2007

Catharina Crone