

Muhd Fauzi Safian
Dr. sc. hum.

Development and Applications of Quantitative Methods for Phosphate and Phospholipid Microanalysis by Electrospray Mass Spectrometry

Promotionsfach: Biochemie
Doktorvater: Prof. Dr. Wolf-Dieter Lehmann

Deutsche Zusammenfassung

Eine neue Mikrobestimmungsmethode von freiem Phosphat mit Stabilisotopenverdünnung und Elektrospray-Massenspektrometrie wurde eingeführt. Die Methode wurde optimiert für den spezifischen Nachweis von Phosphat in Gegenwart von Sulfat, was auch für großen Überschuss von Sulfat gilt. Dies wurde durch Einsatz der Tandem-Massenspektrometrie erreicht. Es wurde eine unterschiedliche Nachweis-Effizienz für normales Phosphat und Sauerstoff-18 markiertes Phosphat beobachtet und eine Korrektur dafür beschrieben. Die neue Methodik zur Phosphat-Mikroquantifizierung wurde an zwei Beispielen zur Bestimmung von gebundenem Phosphat erprobt. Von Phosphopeptiden wurde gebundenes Phosphat mit Alkalischer Phosphatase abgespalten und von Phospholipiden wurde Phosphat mit Flusssäure freigesetzt. Ebenfalls auf der Grundlage von Isotopenverdünnung und Elektrospray-Massenspektrometrie wurde zusätzlich ein neues Verfahren zur Mikroquantifizierung von zellulären Phospholipid-Klassen erarbeitet. Das Verfahren dazu basiert auf Lipidextraktion, Freisetzung der Kopfgruppen mit Flusssäure und deren Quantifizierung gegen Stabilisotopen-markierte interne Standards. In Proben von Normalgewebe aus dem Gastrointestinaltrakt sowie in Proben von gastrointestinalen Stromatumoren wurde mit dieser Methodik die Verteilung von Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, sowie von Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol quantitativ bestimmt. Es ergab sich ein schwacher Hinweis auf einen höheren Gesamt-Gehalt an Phospholipiden in Tumorgewebe aber kein Hinweis auf eine unterschiedliche Verteilung der

Phospholipid-Klassen. Schließlich wurden die Fettsäure-Profile von intaktem Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin in den genannten Proben untersucht. Dabei zeigte sich eine schwache Präferenz hin zu mehr gesättigten Fettsäuren in Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol bei Tumoren, die auf ein verändertes Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten des Fettsäure-Synthese Wegs und der Fettsäure-Desaturasen hinweisen könnte. Schließlich wurde ein verstärktes Auftreten von freier 12-Hydroxyeicosatetraensäure in Normalgewebe gegenüber Tumorgewebe gefunden. Insgesamt wurden neue quantitative Mikromethoden für die Bestimmung von freiem und gebundenem Phosphat sowie für die Phospholipid-Klassenbestimmung eingeführt und in Anwendung auf klinische Proben demonstriert.