

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

M.Sc. Katharina Wozny

aus: Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2018

Charakterisierung komplexer Lipidome

mittels Reverser Phase-UPLC-HRMS/Tandemmassenspektrometrie

Gutachter: Prof. Dr. Britta Brügger

Dr. Emmanuel Gaquerel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Britta Brügger für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Gruppe durchführen zu können. Das Thema der Arbeit bot die Möglichkeit, mich mit vielzähligen methodischen Entwicklungen zu beschäftigen. Ich bedanke mich vor allem für ihre stetige Bereitschaft zu Diskussionen und die Bereitstellung der ausgezeichneten Ausstattung des Labors.

Der Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Dieter Lehmann möchte ich für die enge Zusammenarbeit und die zahlreichen Diskussionen bei der Entwicklung der Methode für die Regioisomer-Analyse und des Projekts der Nicht-Lipid-Kontaminanten danken.

Der MassMap GmbH und Co. KG danke ich für die Überlassung der Software MassMap und die in enger Kooperation vorgenommene Implementierung von speziell auf die in dieser Arbeit erzeugten Daten zugeschnittenen Modulen.

Dem BMBF-Projektpartner, der Gruppe um Prof. Dr. Berna S. Akbulut von der Marmara-Universität in Istanbul, danke ich für die Zusammenarbeit und für die Möglichkeit, bei einem Gastaufenthalt die dort verwendeten Methoden näher kennenlernen zu können.

Zusammenfassung

Charakterisierung komplexer Lipidome mittels Reverser Phase-UPLC- HRMS/Tandemmassenspektrometrie

Katharina Wozny

Betreuer: Prof. Dr. Britta Brügger

In dieser Arbeit wurden detaillierte Untersuchungen zu generellen Aspekten der massenspektrometrischen Lipidanalytik durchgeführt. Dies umfasste das Ermitteln von für die Quantifizierung geeigneten Konzentrationsbereichen in komplexen Mischungen, die Untersuchung des Lipid-Ionisierungsverhaltens in Zwei-Komponenten-Mischungen, den Vergleich der Effizienz gängiger Lipidextraktionsverfahren und Untersuchungen zu Nicht-Lipid-Kontaminanten in RP-UPLC-MS-Analysen. Unter der Bedingung des Vorliegens einer direkten Proportionalität waren Quantifizierungen in einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 30 µM pro Lipidklasse möglich. Es wurden Hinweise für mögliche Abweichungen von der direkten Proportionalität abhängig von Flussrate gefunden. Die Untersuchungen der Zwei-Komponenten-Mischungen lieferten keine Hinweise auf eine intermolekulare Beeinflussung der Ionisierung. Die Verwendung von Glas im Vergleich zu Plastik lieferte keine signifikanten Unterschiede des Kontaminanten-Gehalts. In dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Untersuchungen zur Spezifität von verschiedenen gemischten Full-MS/Fragmentierungsscans zeigten, dass Full-MS/AIF-Scans für erste Charakterisierungen von komplexen Proben geeignet sind und bei chemisch reinen Proben ohne Koelution von Spezies Ergebnisse qualitativ gleichwertig zu denen von targeted-MS/MS-Scans liefern. Die Software MassMap hat sich aufgrund der Möglichkeit einer benutzerfreundlichen Bewertung identifizierter Signale als geeignetes Software-Tool für die Auswertung von Datensätzen mit unterschiedlichen Scanmethoden erwiesen. Des Weiteren wurde eine neuartige Methode für die dGPL-Regioisomer-Analyse mit Hilfe von UPLC-targeted-MS/MS im Negativmodus etabliert. Hiermit konnten die Regioisomer-SICs mit Hilfe eines dedizierten Auswerte-Moduls der Software MassMap rekonstruiert und die Regioisomer-Anteile in Mischungen ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden außerdem *E. coli*-Lipidomveränderungen in Abhängigkeit von der Wachstumszeit und die Wirkung der Roemerin-Behandlung auf *E. coli* K12 TB1 untersucht. PE-Spezies und PG-Spezies mit gleicher Fettsäurezusammensetzung zeigten ein paralleles Verhalten der Speziesanteiländerungen mit zunehmender Wachstumszeit. Innerhalb der exponentiellen Phase wurden fast keine signifikanten Speziesanteiländerungen gefunden, während zwischen der exponentiellen und der stationären Phase eine Vielzahl signifikanter Unterschiede gefunden wurde. Roemerin wies keinen rein bakteriostatischen Effekt auf *E. coli* auf. Bei der Behandlung von *B. subtilis* 168 mit Berberin, Boldin und Roemerin wurde nur für Roemerin eine antibakterielle Aktivität gefunden, die mit signifikanten metabolischen und morphologischen Veränderungen der Zellen einherging.

Summary

Characterization of complex lipidomes using reversed-phase UPLC-HRMS/tandem mass spectrometry

Katharina Wozny

Supervisor: Prof. Dr. Britta Brügger

In this work detailed investigations regarding fundamental aspects of mass spectrometric lipid analysis were performed. This included the determination of the adequate concentration range for lipid quantification in complex mixtures, investigations concerning lipid ionization in two-component mixtures, the comparison of extraction efficiencies of currently employed lipid extraction methods and investigations concerning non-lipid contaminants in RP-UPLC-MS analyses. With direct proportionality of intensity and concentration being an indispensable condition, quantifications were found to be possible for lipid concentrations ranging from 1 nM to 30 μ M per lipid class. In addition, it was found that deviations from direct proportionality are dependent on the flow rate. Investigations of two-component mixtures did not provide evidence for intermolecular interference of ionisation. The use of glass in comparison to plastic did not lead to significant differences in the content of non-lipid contaminants. Comparisons between different full MS/fragmentation experiments showed that the combination of full MS and AIF scans is suitable for the initial characterization of complex samples and leads to results qualitatively comparable to those obtained by targeted MS/MS scans in case of chemically pure samples without co-elution of species. The software MassMap has proven suitable for the evaluation of data sets with a variety of scan methods due to the possibility of a user-friendly evaluation of all identified signals. In addition, a novel method for the dGPL regioisomer analysis using UPLC-targeted MS/MS in negative ion mode was developed. By means of this method regioisomer SICs could be reconstructed using a dedicated evaluation module of the software MassMap. With this approach, regioisomer purity of mixtures was demonstrated to be possible. In this work investigations regarding lipidome changes of *E. coli* in dependence of the growth time and investigations regarding the effect of the treatment of *E. coli* K12 TB1 with the alkaloid roemerine were carried out. PE and PG species with the same fatty acid composition exhibited a parallel behaviour concerning relative intensities of species upon longer incubation times. Within the exponential growth phase only a small number of significant changes of relative intensities of species were found, whereas between the exponential and the stationary phase a number of significant changes were found. The effect of roemerine on *E. coli* was found to be not solely bacteriostatic. Treatment of *B. subtilis* 168 with berberine, boldine and roemerine showed an antimicrobial activity only for roemerine which was accompanied by significant metabolic and morphological changes of the bacterial cells.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Struktur von Lipiden	1
1.2. Synthese von Lipiden	5
1.3. Funktion von Lipiden	5
1.4. Lipidomics: Entwicklungen bis heute	6
1.5. Bakterielle Membranen: Eigenschaften und Lipidomics-Untersuchungen	10
1.6. Generelle Aspekte bei der Antibiotika-Entwicklung	16
1.7. Zielsetzung dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Materialien	20
2.1.1. Geräte und Software	20
2.1.2. Chemikalien, Lipide und sonstige Materialien	20
2.1.3. Bakterienstämme und Alkaloide	24
2.2. Methoden	24
2.2.1. Phosphatbestimmung	24
2.2.2. Milde Alkalische Hydrolyse	25
2.2.3. Phospholipase A ₂ -Verdau von Lipidstandards	25
2.2.4. Lipidextraktion nach Folch	25
2.2.5. Saure Bligh und Dyer-(SBD)-Lipidextraktion	26
2.2.6. Methyl-tert-Butylether-(MTBE)-Lipidextraktion	26
2.2.7. Butanol-Methanol-(BUME)-Lipidextraktion	27
2.2.8. Herstellung von LB-Medium und Glycerinstocks	27
2.2.9. Bakterienwachstum für Alkaloidbehandlung	27
2.2.10. Transmissionselektronen-Mikroskopie-(TEM)-Aufnahmen von Bakterien	28
2.2.11. Probenvorbereitung für UPLC-Analyse	29
2.2.12. UPLC-Analysen	29
2.2.13. Direktinfusionsmessungen	30
2.2.14. Massenspektrometrische Analysen mit der QTRAP 5500	30
2.2.15. Massenspektrometrische Analysen mit dem QExactive	31
2.2.16. Generelles zur Auswertung von MassMap	31
2.2.17. Regioisomer-Analyse mit MassMap	32
3. Untersuchung genereller Aspekte der Lipidanalytik	35
3.1. Direktinfusionsexperimente mit Chip-basierter Probeninfusion	36
3.2. Direktinfusionsexperimente mit Spritzenpumpe	38
3.3. Direktinfusionsexperimente mit UPLC	40

	Seite
3.4. Untersuchung von Zwei-Komponenten-Mischungen	45
3.5. Vergleich der Effizienz verschiedener Extraktionsverfahren für bakterielle Lipide	49
3.6. Untersuchungen zu Nicht-Lipid Kontaminanten	50
3.7. Zusammenfassende Diskussion	55
4. Lipidomuntersuchungen mit RP-UPLC-MS	58
4.1. Lipidomuntersuchung von <i>E. coli</i> – Kinetik-Analysen und Datenauswertung	59
4.2. Analyse von gemischten UPLC-Full-MS/Fragmentierungsexperimenten	63
4.3. Untersuchung von TG-Standards mittels gemischter Full-MS-Fragmentierungs- scans	68
4.4. Zusammenfassende Diskussion	71
5. Quantitative Regioisomer-Analyse von gemischten Diacylglycerophospholipiden (dGPL) mit UPLC-targeted-MS/MS	73
5.1. Etablierung von Verfahren zur Analyse von Fettsäureanionen-Fragmenten aus UPLC-MS/MS-Experimenten für Regioisomer-Analysen	74
5.2. Rekonstruktion von Regioisomer-SICs mittels Fragmentierungsmodul (MassMap)	81
5.3. Regioisomer-Analyse von chemisch synthetisierten Standards sowie Spezies von Proben biologischen Ursprungs	84
5.4. Komplementäre Methoden zur Regioisomer-Analyse: PLA ₂ -Verdau und Mittlerer [FS]-Quotient	87
5.5. Regioisomer-Reinheitsgraph	91
5.6. Zusammenfassende Diskussion	94
6. Untersuchung des Effekts von Alkaloiden auf <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	96
6.1. Lipidom-Untersuchungen von <i>E. coli</i>	96
6.2. Untersuchung der Wirkung des Alkaloids Roemerin auf <i>E. coli</i>	105
6.3. Untersuchung der Wirkung von drei Alkaloiden auf <i>B. subtilis</i>	116
6.4. Zusammenfassende Diskussion	120
Referenzen	123

1. Einleitung

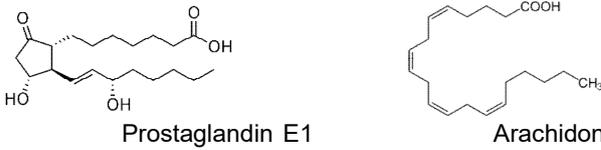
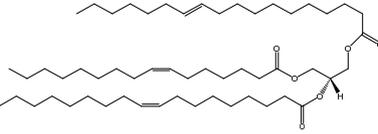
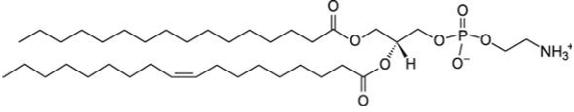
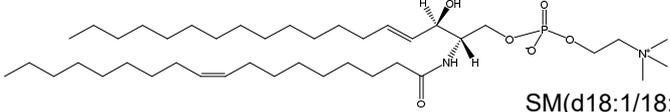
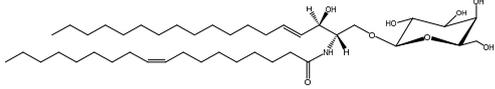
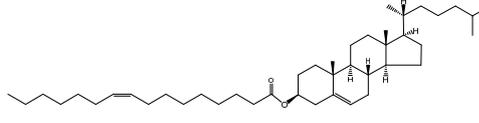
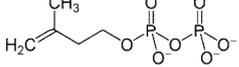
1.1. Struktur von Lipiden

Lipide sind die fettlöslichen Bestandteile von Zellmembranen, die im Jahr 1925 von Gorter und Grendel erstmals als „layer of lipoids, of which the polar groups are directed to the inside and to the outside“ beschrieben wurden [1]. Damit wurde bereits impliziert, dass diese Lipid-Strukturen als Doppelschichten organisiert sind. Bei den Lipiden, die in Zellmembranen gefunden werden, handelt es hauptsächlich um amphiphile Phospholipide, bestehend aus Glycerin, einer polaren Kopfgruppe und hydrophoben Kohlenwasserstoffketten. Die Bildung von Lipid-Doppelschichten liegt der Tatsache zugrunde, dass starke hydrophobe Anziehungskräfte zwischen den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten bestehen ([2], [3]). Die physikochemische Beschaffenheit von Membranen kann dabei stark variieren. So können Membranen einen gelartigen, einen so genannten flüssig-geordneten/kristallinen-Zustand, und einen flüssig-ungeordneten Zustand einnehmen ([4], [5]). Lipide können in folgende in Tabelle 1 gezeigte Lipidkategorien eingeteilt werden ([6], [7]). Für jede Kategorie ist jeweils mindestens ein Vertreter gezeigt. Bei den Fettsäureacylen handelt es sich um Grundbausteine biologischer Lipide [6]. Arachidonsäure ist einer der wichtigsten Vertreter und Vorläufer der Eicosanoide. Bei Eicosanoiden handelt es sich um mehrfach oxidierte Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen [8]. Zu aus Arachidonsäure gebildeten Eicosanoiden zählen Prostaglandine (Beispiel in Tabelle 1 gezeigt), Leukotriene und andere Struktur-Derivate [8]. Bei den Glycero- und Glycerophospholipiden handelt es sich um Fettsäureester von Glycerin [6]. Die Glycerolipide werden je nach Anzahl der an das Glycerinmolekül veresterten Fettsäuren in Monoacylglyceride (MG), Diacylglyceride (DG) und Triacylglyceride (TG) unterteilt. Glycerolipide spielen eine wichtige Rolle als Speichermoleküle und Signalmoleküle [6]. Im Unterschied zu Glycerolipiden ist bei den Glycerophospholipiden (GPL) ein Phosphatmolekül mit dem Glycerinmolekül verestert. In Tabelle 1 ist als Beispiel für ein Glycerophospholipidmolekül der Klasse Phosphatidylethanolamin (PE) gezeigt. Auf die Kategorie der Glycerophospholipide wird im Folgenden noch genauer eingegangen. Sphingolipide besitzen als zugrundeliegenden Grundbaustein Sphingosin, das *de novo* aus Serin und einem langkettigen Fettsäureacyl-Coenzym A-Molekül synthetisiert wird [6]. Sphingolipide können strukturell in mehrere Klassen eingeteilt werden, u.a. Sphingosin mit Amid-verknüpfter Fettsäure (z.B. Ceramide) und komplexere Sphingolipide, bei denen Kopfgruppen an das Sphingosin-Molekül mit einer Phosphodiesterverknüpfung verestert sind [6]. Bei dem als Beispiel für Sphingolipide gezeigten Molekül handelt es sich um ein so genanntes Sphingomyelin, ein Ceramid mit Phosphocholin-Kopfgruppe. In den

Saccharolipiden wird der in den zuvor erwähnten Glycero- und Glycerophospholipiden enthaltene Grundbaustein Glycerin durch ein Zuckermolekül ersetzt [6]. Saccharolipide kommen oft als Zuckerderivate vor, z.B. als phosphorylierte oder acetylierte Varianten [6].

Tabelle 1

Lipidkategorien nach [6]. Für jede Lipidkategorie ist jeweils mindestens ein Vertreter gezeigt. Verwendete Abkürzungen sind TG für Triacylglycerid, PE für Phosphatidylethanolamin, SM für Sphingomyelin, GalCer für Galactosylceramid, CE für Cholesterinester und PP für Pyrophosphat. Das „d“ in der Bezeichnung der Sphingolipide und Saccharolipide steht für „dihydroxyliert“.

Kategorie	Beispiel Vertreter
Fettsäureacyl	 <p>Prostaglandin E1 Arachidonsäure</p>
Glycerolipide	 <p>TG(16:1/18:1/18:1)</p>
Glycerophospholipide	 <p>PE(16:0/18:1)</p>
Sphingolipide	 <p>SM(d18:1/18:1)</p>
Saccharolipide	 <p>GalCer(d18:1(4E)/18:1(9Z))</p>
Sterol-Lipide	 <p>CE(16:1)</p>
Polyketide	 <p>Isopentenyl-PP</p>

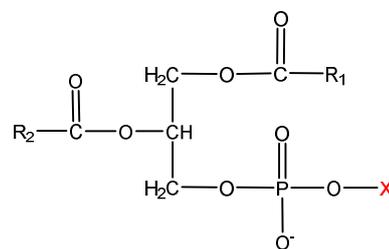
Weitere Lipidkategorien sind Sterol-Lipide und Polyketide. Sterol-Lipide besitzen vielfältige zelluläre Funktionen. Zum Beispiel sind das Sterol-Lipid Cholesterin und dessen Derivate neben GPL und Sphingomyelin essentielle Membranbestandteile in Säugerzell-Membranen [6]. Sterol-Lipide fungieren auch als Hormone und sind wichtige zelluläre Signalmoleküle ([9],

[6]. Polyketide werden aus Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) gebildet und besitzen wichtige Funktionen als Antioxidantien und bei der Oligo/Polysaccharid-Biosynthese und dem -Transport (Polyprenol-Phosphatzucker) [6].

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von GPL. GPL werden üblicherweise in die in Tabelle 2 gezeigten Klassen eingeteilt. Sie bestehen aus einem Glycerin-Molekül, zwei aliphatischen Kohlenwasserstoffresten und einer Kopfgruppe, die über eine Phosphodiesterbindung an das Glycerin verestert ist.

Tabelle 2

Grundstruktur von Glycerophospholipiden (oben in der Abbildung) und Glycerophospholipidklassen. Mit X wird die an das Phosphatmolekül veresterte Kopfgruppe bezeichnet.



Name X-OH	Formel -X	Name Klasse (Abkürzung)
Wasser	-H	Phosphatidsäure (PA)
Ethanolamin	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Phosphatidylethanolamin (PE)
Cholin	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	Phosphatidylcholin (PC)
Serin	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COO}^-$	Phosphatidylserin (PS)
Myo-Inositol		Phosphatidylinositol (PI)
Glycerin	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$	Phosphatidylglycerin (PG)
Phosphatidylglycerin		Diphosphatidylglycerin/Cardiolipin (CL)

Bei Cardiolipin handelt es sich um ein komplexes GPL, das aus zwei Glycerin-Molekülen, zwei Phosphatmolekülen und dementsprechend vier Kohlenwasserstoffresten aufgebaut ist. Cardiolipin ist ein wesentlicher Bestandteil bakterieller Membranen, worauf in Kapitel 1.5. noch genauer eingegangen wird, und wird in Eukaryonten vor allem in Mitochondrien produziert [10]. Die Benennung der GPL erfolgt auf Grund der Kopfgruppen. Die Abkürzungen der GPL-Klassen sind der Tabelle in Klammern hinter dem Namen der Klasse

angegeben. Aufgrund der Bindung von drei voneinander verschiedenen Substituenten an die C-Atome des Glycerins, erfolgt eine stereospezifische Nummerierung der Kohlenstoffpositionen im Glycerin. Die Fettsäuren sind bei GPL über eine Esterbindung an die *sn-1*- und/oder *sn-2*-Position des Glycerins gebunden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Hydroxylgruppe an der *sn-1*- bzw. an der *sn-2*-Position des Glycerins alkyliert/alkenyliert (sog. Plasmalogene) ist [6]. Die Kopfgruppe, die mit einer Phosphodiesterbindung an das zentrale Glycerinmolekül gebunden ist, befindet sich in *sn-3*-Position. Eine Ausnahme stellen Lipide der Klasse PA dar. Üblicherweise ist die Fettsäure in *sn-2*-Position eher längerkettig und ungesättigt [11]. Es kommen bei GPL auch so genannte Lysospezies vor, die anstelle von zwei Fettsäuren nur eine an Glycerin veresterte Fettsäure besitzen. Generell unterscheidet man innerhalb der GPL zwischen neutralen und anionischen GPL [12]. Zu den neutralen GPL zählen diejenigen der Klassen PC und PE, zu den anionischen GPL zählen die Lipide der Klassen PA, PS, PI, PG und CL. In eukaryontischen Zellen machen die Lipide der Klassen PC und PE mehr als 50% aller Lipide in der Zelle aus ([13], [14]), während die Hauptlipide in Prokaryonten den Klassen PE, PG und CL angehören ([15], [16], [17], [13]). Der Anteil der GPL-Klassen variiert je nach Zelltyp und auch zwischen Organellen [18]. Außerdem sind die GPL asymmetrisch in der Lipiddoppelschicht, d.h. zwischen der inneren und der äußeren Membranhälfte, verteilt ([19], [18]).

In herkömmlichen Lipidom-Analysen werden pro GPL-Klasse ca. 100 Spezies identifiziert, d.h. für alle GPL-Klassen können ca. 1000-3000 Lipidspezies mit einer Analyse erfasst werden. Trotz der relativ geringen Anzahl von Grundbausteinen ist aufgrund der Kombination von verschiedenen Fettsäuren und der Verknüpfung des Grundkörpers an verschiedene Kopfgruppen eine enorme Komplexität des Lipidoms mit >100.000 Lipidspezies für alle Lipidkategorien möglich ([6], [11], [7]). Der Grund für diese große Komplexität des Lipidoms ist bisher allerdings noch nicht verstanden ([16], [7]). Die Lipidzusammensetzung innerhalb einer Zelle kann stark variieren, z.B. sind deutliche Unterschiede zwischen der Plasmamembran und den Organellmembranen zu beobachten [12]. Man unterscheidet generell zwischen zwei Membransystemen, den Membranen des Endoplasmatischen Reticulum (ER), und einem Membransystem, das die Plasmamembran und aus der Plasmamembran gebildete Organelle einschließt ([20], [12]). Bei den Membranen des ER-Membransystems, zu dem auch die Kernhülle und das cis-Golgi-Netzwerk zählen, handelt es sich um nur leicht negativ geladene, fast neutrale Membranen mit lockerer Lipidpackung, während man beim Plasmamembransystem hauptsächlich anionische Lipide in dichter Packung vorfindet ([20], [12]). Diese enge Packung der Lipide hat u.a. mit dem relativ hohen Anteil an Cholesterin (30-40%) zu tun [21]. Cholesterin spielt in Eukaryonten eine wichtige

Rolle bei der Regulation der Membranfluidität [22]. Zusätzlich findet die Regulation der Membranfluidität über den Sättigungsgrad der GPL statt, der vom ER zur Plasmamembran sinkt.

1.2. Synthese von Lipiden

Die Hauptorte der GPL-Biosynthese in eukaryontischen Zellen sind das ER und die Mitochondrien ([23], [16]). In Bakterien sind die für die Phospholipidsynthese benötigten Enzyme membrangebunden [17]. Man geht davon aus, dass die Synthese auf bzw. innerhalb der inneren Membranhälfte der im Zellinneren liegenden Lipiddoppelschicht stattfindet [17]. Der erste Schritt der Phospholipidsynthese ist in allen Organismen die Acylierung von Glycerin-3-Phosphat, um PA zu bilden [16]. Ausgehend von PA-Molekülen werden Diacylglycerin (DG) und Cytosin-Diphosphat-Diacylglycerin (CDP-DG) gebildet. Aus DG werden im Folgenden Lipide der Klassen PE und PC gebildet. Details zur Synthese von Lipiden der Klassen PE und PC sind von Eugene Kennedy Mitte der 1950er-Jahre das erste Mal genauer untersucht und aufgeklärt worden, weshalb der Stoffwechselweg als *Kennedy pathway* bezeichnet wird ([24], [10]). Aus CDP-DG werden die GPL der Klassen PI, PG und CL gebildet [16]. Die Lipidsynthese in Prokaryonten entspricht im Wesentlichen der in Eukaryonten, allerdings ist sie in Eukaryonten deutlich komplexer. Dies hängt nicht nur mit der Kompartimentierung der Synthese zusammen, sondern auch mit der größeren Diversität von eukaryontischen Lipiden mit unterschiedlichen Kopfgruppen und Fettsäurevarianten [16]. Ein weiterer Aspekt des eukaryontischen Lipidoms ist, dass sich die Anpassung an von außen auf die Zelle wirkenden Einflüsse deutlich stärker auf das Lipidom auswirkt, während bei Prokaryonten die Kopfgruppen-Zusammensetzung der GPL relativ unabhängig von äußeren Einflüssen ist ([16], [11]). Details zur bakteriellen Lipidsynthese und zu Lipidomics-Untersuchungen von bakteriellen Lipiden werden in Kapitel 1.5. behandelt.

1.3. Funktion von Lipiden

In den ersten Membranmodellen wurden Lipide nur als passiv agierende, strukturelle Membranbestandteile betrachtet [11]. Im Laufe der Forschungen wurden immer weitere Anhaltspunkte dafür gefunden, dass es sich bei Lipiden um alles andere als passiv agierende Moleküle handelt. Eine wesentliche Aufgabe von Lipiden besteht in der Funktion als Permeabilitätsbarriere zwischen zellulären Kompartimenten, sowohl extrazellulär als auch intrazellulär ([23], [7], [18]). Eine weitere Funktion besteht in der Aufrechterhaltung von elektrochemischen Gradienten und der Energiespeicherung als TG und Sterolester in so genannten *lipid droplets* ([7], [18]). Zum Beispiel spielen Vertreter der Klasse CL in

Eukaryonten und Prokaryonten eine wesentliche Rolle bei der Modulierung der Ladungsleitung in Form von Protonen über die Membran [25]. Lipide spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion als intrazelluläre *first* und *second messenger*-Moleküle [18]. Beispiele für Lipidkategorien, deren Vertreter eine wichtige Rolle als Signalmoleküle spielen, sind u.a. GPL (z.B. PI), Fettsäureacyl (Eicosanoide) und Sphingolipide ([11], [7]). Seit den 1980er-Jahren gerieten vermehrt Membranproteine in den Fokus [26]. Bereits 1935 wurde von Daniell und Davson gefunden, dass Membranen nicht „nackt“, sondern mit Proteinen bedeckt sind. Lipide sind nicht nur wichtig als „Einbettungsmoleküle“ für Membranproteine, sondern sind auch strukturell wichtig für Proteine, z.B. im Hinblick auf Proteinkonformationen [19]. Der in der Membran mit Proteinen assoziierte Anteil von Phospholipiden ist relativ klein [2]. Lipide und Proteine sind in dem von Singer und Nicholson 1972 postulierten *fluid mosaic model* assoziiert. Dabei bildet die fluide Lipidmembran die Matrix für globuläre integrale Membranproteine [2]. Die Lipiddoppelschicht wurde hierbei als sehr homogene Matrix angenommen, in die Proteine locker verteilt eingelagert sind, und die keinen wesentlichen Einfluss auf die Membranfunktion hat ([19], [5]). Später wurde diese Hypothese allerdings revidiert, da gefunden wurde, dass Membranproteine in speziellen Lipiddomänen bzw. Lipidclustern und in so genannten *lipid rafts* anzutreffen sind [19]. Lipiddomänen bzw. Lipidcluster zeichnen sich nicht nur durch eine Variation der Lipidzusammensetzung, sondern auch durch eine Variation der mit den Lipiden assoziierten Membranproteine aus [19]. *Lipid rafts* sind als (Glyco)Sphingolipid-Cholesterinreiche Mikrodomänen beschrieben, die hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften einen flüssig-geordneten Zustand einnehmen ([27], [4]). *Lipid rafts* zeichnen sich zusätzlich durch eine hochflexible, durch intra- und extrazelluläre Stimuli veränderbare Lipidzusammensetzung aus, weshalb sie eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion einnehmen ([5], [4]). Die meisten der in *lipid rafts* anzutreffenden Proteine zeichnen sich entweder durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker oder durch eine Acylierung, d.h. Myristoylierung oder Palmitoylierung, aus [4].

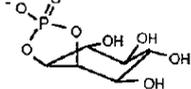
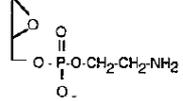
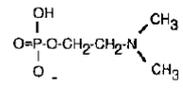
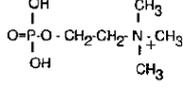
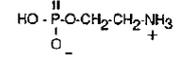
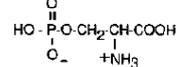
1.4. Lipidomics: Entwicklungen bis heute

Bei Lipidomics handelt es sich im Vergleich zu anderen *omics*-Feldern, z.B. Genomics, und Proteomics, um ein relativ neues Forschungsfeld ([11], [26]). Lipidomics ist, genauso wie Glycomics, ein Teilbereich von Metabolomics ([28], [21]). Lipidomics lässt sich als vollständige Charakterisierung aller Lipide in einem bestimmten Zelltyp beschreiben [7]. Damit besteht ein Zugang zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die es Lipiden ermöglichen, die vielzähligen zellulären Funktionen, die im vorherigen Kapitel genauer

behandelt wurden, auszuüben [29]. Wie bei anderen *omics*-Feldern ist auch bei Lipidomics die Probenpräparation ein äußerst wichtiger Teil des analytischen Prozesses. Wichtig ist dabei das Entfernen bzw. das deutliche Reduzieren von Substanzen, die bei der späteren Analyse störend sein könnten, z.B. Proteine oder Nicht-Lipid Kontaminanten. Üblicherweise werden hierfür gut etablierte Lipidextraktions-Protokolle verwendet, z.B. die Bligh und Dyer-Extraktion oder die MTBE-Extraktion (Details siehe Kapitel 2.2.5. und 2.2.6.). Eine weitere Möglichkeit ist die Proben-Vorpräparation über Dünnschichtchromatographie. Für die Analyse der Lipidmoleküle wird heute fast ausschließlich Massenspektrometrie (MS) verwendet. Als Ionisierungsmethode hat sich die Electrospray-Ionisierung (ESI) etabliert. Die Anwendbarkeit von ESI für große Biomoleküle wurde erstmals 1989 von Fenn und Mitarbeitern beschrieben [30]. Bei ESI handelt es sich um eine relativ milde Ionisierungsmethode, bei der vor allem größere und fragile Moleküle aus Lösungen heraus ionisiert werden können [30]. Die Ionenausbeute der Analytmoleküle wird maßgeblich durch die Affinität zur Tröpfchen-Oberfläche, als so genannte „Oberflächenaktivität“ bezeichnet, bestimmt [31]. Mit Hilfe von ESI können Moleküle ohne vorherige Derivatisierung sensitiv detektiert werden [32]. Ein wesentlicher Vorteil von ESI besteht zudem in der Kompatibilität mit allen gängigen Typen von Massenanalysatoren. Die bei der Ionisierung mit ESI gemessenen Ionenintensitäten stehen in direktem Zusammenhang mit der Analyt-Konzentration [30]. Bei Lipidomics werden heutzutage üblicherweise zwei Strategien angewandt, die Kopplung von Nano-ESI an Massenspektrometer mit geringer oder hoher Massenauflösung mit der Möglichkeit von so genannter fokussierter Tandemmassenspektrometrie (MS^2 oder MS^3) oder die Kopplung von LC-MS an MS-Geräte. Die Verwendung von Nano-ESI mit Flussraten von 20-50 nL/min bietet die Möglichkeit, Messungen auch bei geringen Probenvolumina durchzuführen, wodurch geringe Probenmengen einer Messung zugänglich sind [33]. Die Messung von Lipiden mit Nano-ESI-Sprays erfolgt in der Regel automatisiert. Bei diesen Messungen handelt es sich um so genannte Direktinfusionsmessungen, d.h. die Lipidlösungen werden direkt in das Massenspektrometer eingespeist. Die Detektion von Lipid-Molekülionen erfolgt mit Hilfe von so genannten Precursorion-Scans (Prec-Scans) bzw. Neutralverlust (*neutral loss*, NL)-Scans mit hoher Sensitivität [34]. Die üblicherweise bei der Analyse von GPL verwendeten spezifischen Scan-Modi sind in Tabelle 3 zusammengefasst (modifiziert nach [34]).

Tabelle 3

Zusammenfassung der GPL-spezifischen Scan-Modi (Precursorion-Scans und Neutralverlust-Scans) im Positiv (pos.)- und Negativmodus (neg.). Die Tabelle wurde nach [34] modifiziert.

specificity	polarity	fragment structure	scan mode	fragment type
all [M-H] ⁻ ions of glycerophospholipids	neg.		precursor of 153	glycerol-phosphate -H ₂ O
phosphatidylinositol	neg.		precursor of 241	head group -H ₂ O
phosphatidylserine	neg.	$\text{CH}_2 = \underset{\text{NH}_2}{\text{C}} \cdot \text{COOH}$	neutral loss of 87	head group -H ₃ PO ₄
phosphatidylethanolamine	neg.		precursor of 196	dilyso -H ₂ O
sphingomyelin	neg.		sCID + precursor of 168	head group (demethylated)
phosphatidylcholine and sphingomyelin	pos.		precursor of 184	head group
phosphatidylethanolamine	pos.		neutral loss of 141	head group
phosphatidylserine	pos.		neutral loss of 185	head group

Alternativ zu Direktinfusionsmessungen besteht die Möglichkeit, die Lipidmoleküle vor der MS-Analyse mit Hilfe von Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) aufzutrennen. Vorteile der LC-Trennung bestehen in der Dekonvolution von komplexen Lipidgemischen, d.h. der Auftrennung der Lipide nach Klassen bzw. Spezies, und der deutlichen Reduktion von Ionensuppressionseffekten durch Ionen, die nicht von Analytmolekülen herrühren. Eine große Herausforderung bei Lipidomics ist die eindeutige Annotierung von Lipidsignalen [35]. Die Annotierung von strukturell verschiedenen Molekülen mit identischer Summenformel ist oft nur möglich unter Zuhilfenahme von Fragmentierungsscans und/oder unter Zuhilfenahme der bei LC-Trennungen erhaltenen Informationen [35]. Zu den üblicherweise eingesetzten MS/MS-Modi zählen untargeted MS/MS, z.B. *all ions fragmentation* (AIF) und *in-souce collision-induced dissociation* (SID), *focused-Lipidomics-Scan*methoden wie Produktion-/Precursorion-Scans, NL-Scans und targeted-MS/MS (*selected reaction monitoring*: SRM, *multiple reaction monitoring*: MRM) [28].

Große technische Fortschritte, vor allem die Entwicklung der Orbitrap als Massenanalysator und der *ultra high performance liquid chromatography* (UPLC), ermöglichten es, Lipidomics zur Charakterisierung von sehr komplexen Proben einzusetzen. Mittlerweile gibt es unzählige Beispiele für Untersuchungen von komplexen gesamtzellulären Lipidomen ([36], [37], [38]), Organellen [39], und Geweben [40]. Die Orbitrap als Massenanalysator wurde im Jahr 2000 von Makarov beschrieben [41]. Orbitrap-Geräte weisen eine hohe Massengenauigkeit, eine hohe Massenauflösung (100.000-200.000) und einen großen dynamischen Bereich auf [41]. Im Unterschied zu Orbitrap-Geräten zeichnen sich die bei Tripel-Quadrupol-Geräten üblicherweise verwendeten Methoden dadurch aus, dass ausgewählte Ionen fragmentiert werden, die durch einen Massenoffset, der spezifisch für das zu analysierende Molekülion ist, selektiert werden ([42], [43]). In diesen so genannten MRM-Experimenten, z.B. NL-Scans und Prec-Scans, erfolgt die Detektion eines Signals nur dann, wenn das Lipidion den passenden m/z-Wert für das Precursorion und das Produktion besitzt [43]. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist in diesen MRM-Spektren signifikant verbessert im Vergleich zu so genannten Full-MS-Scans, d.h. Scans von intakten Molekülionen [43]. Bei hochauflösenden Orbitrap-Massenspektrometern liegt der Fokus auf der Aufnahme von Full-MS-Scans, d.h. einem *screening* nach bekannten und unbekanntem Komponenten mit einer Selektivität von weniger als 5 ppm [42]. Eine weitere, besonders bei der Analyse von Lipidmolekülen, einsetzbare Eigenschaft von aktuell eingesetzten Orbitrap-Geräten, ist die Möglichkeit des schnellen Umschaltens zwischen Negativionen- und Positivionen-Scans [42]. Dies dient der Verifizierung von Lipidmolekülionen, die in beiden Modi ionisieren.

Zusätzlich zu den Entwicklungen bei Massenspektrometern revolutionierte der Einsatz von UPLC-Geräten die Analytik auf dem Gebiet von Lipidomics. Die Entwicklung der UPLC begann Ende der 1990er-Jahre bzw. Anfang der 2000er-Jahre [44]. Bei der UPLC gibt es deutliche Unterschiede zur *high performance liquid chromatography* (HPLC). Bei UPLC-Trennungen werden im Vergleich zu HPLC-Trennungen Partikelgrößen unter 2 µm (Säulendurchmesser 1-3 mm) verwendet [44]. Die UPLC bietet den Vorteil, dass eine deutlich verbesserte chromatographische Auflösung und Empfindlichkeit mit kürzeren Trennzeiten als bei der HPLC erreicht wird [44]. Die bei der UPLC verwendeten Säulenmaterialien sind außerdem mechanisch äußerst robust und können über einen breiten pH-Bereich eingesetzt werden [44]. Bei den für die Lipidtrennungen angewandten Festphasen unterscheidet man generell zwischen reverser Phase (RP), *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) und Normalphase (NP). HILIC und NP werden in Lipidomics für die Auftrennung der Lipidklassen verwendet, d.h. es erfolgt eine Auftrennung abhängig von der Polarität der Kopfgruppe [32]. Eine Speziestrennung ist mit HILIC und NP allerdings nicht möglich ([32], [45]). Bei RP handelt es sich um ein anderes Trennprinzip, bei

dem eine Trennung nach Hydrophobizität erfolgt. Bei RP werden Lipidklassen nur angetrennt, dafür ist aber eine gute Auftrennung der Lipidspezies möglich. Lipidspezies werden abhängig von der Hydrophobizität der Kopfgruppe und dem Sättigungsgrad der Acylreste aufgetrennt. Dadurch kann es vorkommen, dass Spezies unterschiedlicher Klassen koeluiieren.

Für die Auswertung von Lipidomics-Datensätzen steht mittlerweile eine Vielzahl von Softwares zur Verfügung. Üblicherweise werden bei allen gängigen, eingesetzten Softwares folgende grundlegende Schritte durchlaufen: Datenimport, Untergrund-Korrektur, Peak-Detektion, *de-isotoping* (Überprüfung der Übereinstimmung des experimentellen mit dem theoretisch erwarteten Isotopen-Clusters und anschließende Korrektur) und Identifizierung [46]. Beim letzten Schritt, der Identifizierung von Lipidspezies, werden üblicherweise Datenbanken eingesetzt, die theoretisch mögliche Lipidspezies enthalten, oder es werden Listen von Molekülen erstellt, nach denen in den Datensätzen, die entweder über Direktinfusionsmessungen oder LC-MS-Analysen generiert wurden, gesucht werden soll. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Workflows für die Lipidom-Analyse mit Hilfe von LC-MS und der anschließenden Datenauswertung. Es wurde hierfür die Software MassMap eingesetzt. Bei MassMap ist die automatische Identifizierung auf eine möglichst geringe Wahrscheinlichkeit für falschpositive Identifizierungen hin optimiert. In Zweifelsfällen fordert die Software den Benutzer dazu auf, die Signale manuell anhand einer detaillierten Inspektion der primären Daten zu bewerten. Außerdem bietet MassMap im Gegensatz zu anderen Softwares die Möglichkeit, alle Signale bei Bedarf manuell zu bewerten. Beim Großteil der eingesetzten Softwares ist eine Bewertung der identifizierten Signale durch den Benutzer nicht vorgesehen, sondern es werden lediglich Listen mit den Detailinformationen zu den Identifizierungen ausgegeben.

1.5. Bakterielle Membranen: Eigenschaften und Lipidomics-Untersuchungen

Generell weisen Prokaryonten und Eukaryonten deutliche Unterschiede in der Membranbeschaffenheit auf. In Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung von eukaryontischen Membranen (A) und von prokaryontischen Membranen (B) gezeigt. Ein wesentlicher Unterschied ist das Vorliegen eines periplasmatischen Raumes bei Prokaryonten zwischen der äußeren und der inneren Membran. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen eukaryontischen und prokaryontischen Membranen ist, dass bei prokaryontischen Zellen eine Vielzahl von Zuckerpolymer-Molekülen auf der Zellaußenseite, d.h. an der äußeren Zellmembran, gebunden ist. Bei Eukaryonten sind lediglich

Zuckerstrukturen von Glycoproteinen oder von Glycolipiden zu finden. Generell bezeichnet man die Membran und andere Strukturen, die die Zelle umgeben, als Zellhülle [47]. Prokaryonten besitzen im Vergleich zu Eukaryonten eine deutlich komplexere Zellhülle, was daher rührt, dass die Zellhülle von Prokaryonten als strukturell variabler Schutz des Zytoplasmas gegen äußere, in vielen Fällen sehr variable Einflüsse, dient [47].

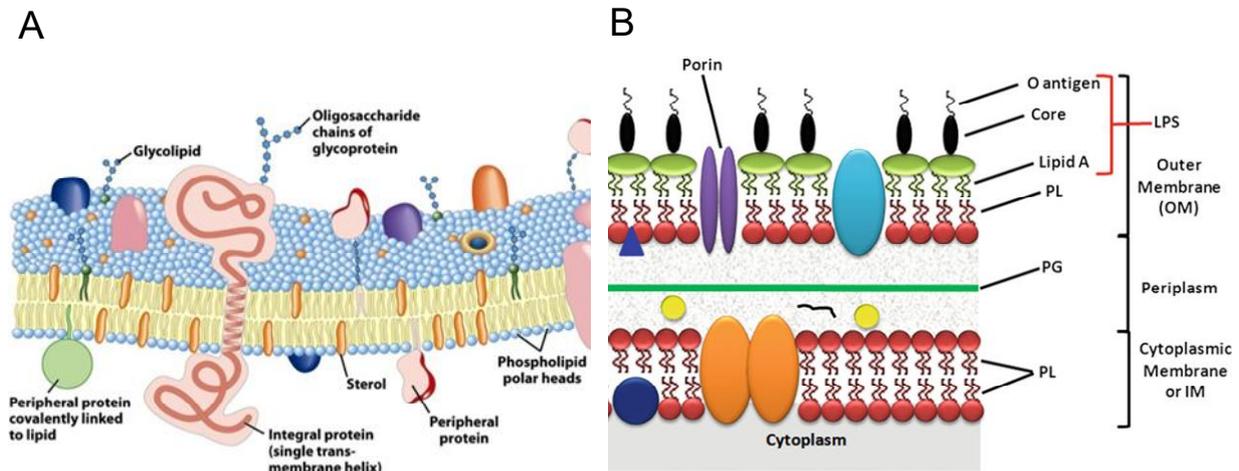


Abbildung 1

Schematische Darstellungen der eukaryontischen (A) und der prokaryontischen Zellmembran (B). A wurde aus Lehninger, Principles of Biochemistry, fifth edition 2008 entnommen, B aus [48].

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Eukaryonten und Prokaryonten sind die in den Zellmembranen vorkommenden Phospholipide. Die Lipidzusammensetzung für Eukaryonten und Prokaryonten ist in Tabelle 4 gezeigt. Die Haupt-Lipidklassen bei Eukaryonten sind PC, PE, Sphingolipide und Cholesterin, während es bei Prokaryonten PE, PG und CL sind. Anstelle von Cholesterin sind in Bakterien häufig strukturell zu Cholesterin ähnliche Sterol-Lipide zu finden, worauf weiter unten noch genauer eingegangen wird. Als Beispiel für prokaryontische Membranen ist in Tabelle 4 die Lipidzusammensetzung einer *E. coli*-Zelle gezeigt. Generell können bakterielle Membranen sehr unterschiedliche Lipidzusammensetzungen besitzen. Dies ist unter anderem davon abhängig, ob es sich um ein grampositives oder ein gramnegatives Bakterium handelt, um welchen Stamm des Bakteriums es sich handelt und in welcher Umgebung sich das Bakterium befindet [47]. Zu diesen äußeren Bedingungen gehören u.a. Temperatur, pH-Wert oder die Konzentration von Nährstoffen, z.B. Kohlenstoffquellen oder Salzen.

Tabelle 4

Vergleich der Anteile der in eukaryontischen und prokaryontischen Membranen vorkommenden Lipidklassen. Exemplarisch für Prokaryonten ist *E. coli* gezeigt. PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PG: Phosphatidylglycerin, CL: Cardiolipin, PI: Phosphatidylinositol. Die Werte sind aus [14] und [49] zusammengetragen.

Lipide	Eukaryont	<i>E. coli</i>
PC	30-40%	0%
PE	10-20%	70-80%
PG	1%	15-20%
CL	1%	5-10%
PI	8%	0%
Sphingolipide	5-10%	0%
Cholesterin	10-15%	0%

Da in dieser Arbeit die Analyse von bakteriellen Lipidomen eine wesentliche Rolle spielt, stehen im Folgenden die strukturellen Eigenschaften bakterieller Zellmembranen und die Synthese von bakteriellen Lipiden im Fokus. Bei Prokaryonten gibt es deutliche Unterschiede im Aufbau der Zellhülle zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien, wie in Abbildung 2 zu sehen ist (modifiziert nach [47]). Ein wesentlicher Unterschied zwischen grampositiven (A) und gramnegativen Bakterien (B) ist das Fehlen der äußeren Membran bei grampositiven Bakterien, sodass nur bei gramnegativen Bakterien ein periplasmatischer Raum zwischen der inneren und der äußeren Membranschicht existiert [47]. Um das Zytoplasma dennoch zu schützen, sind grampositive Bakterien von dicken Schichten aus Peptidoglykanen umgeben, die um ein Vielfaches dicker sind als die von gramnegativen Bakterien [47]. Neben Peptidoglykanen spielen auch andere Polymere bei grampositiven Bakterien eine wichtige Rolle, z.B. Teichonsäuren, die entweder an Lipidkopfgruppen (LTA) oder an Peptidoglykane (WTA) gebunden sind. Die äußere Membran von gramnegativen Bakterien ist keine „klassische“ Membran, da die äußere Schicht der äußeren Membran nicht aus Phospholipiden besteht, sondern aus Glycolipiden und Lipopolysacchariden (LPS) [50].

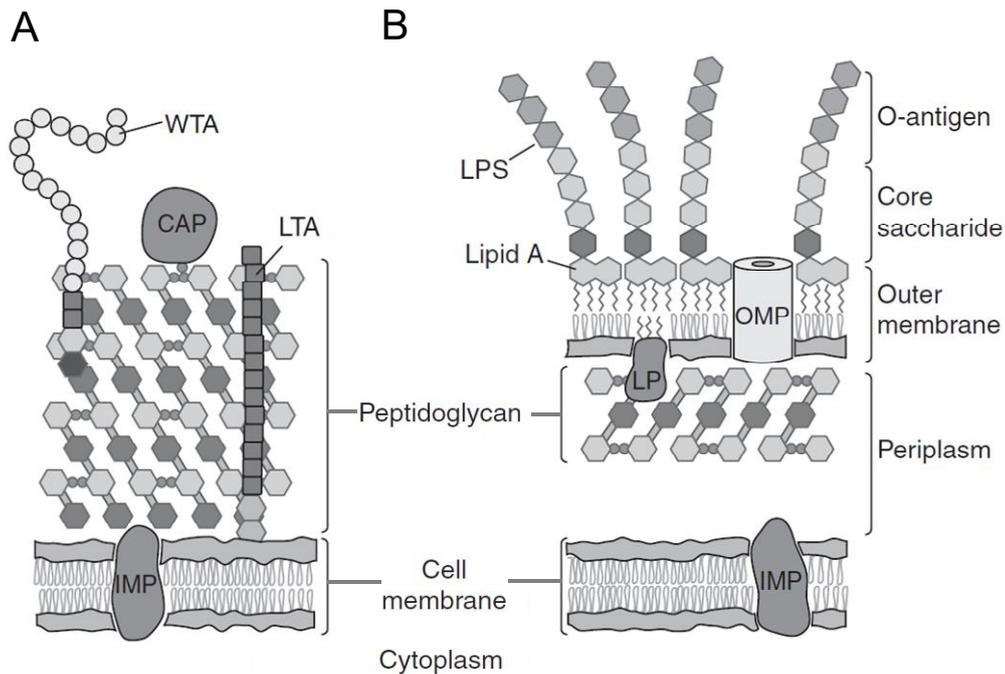


Abbildung 2

Schematische Darstellungen der Zellhüllen von grampositiven (A) und gramnegativen Bakterien (B). Die Abbildung wurde modifiziert nach [47]. CAP: *covalently attached protein*, IMP: *integral membrane protein*, LP: Lipoprotein, LPS: Lipopolysaccharid; LTA: *lipoteichoic acid*, OMP: *outer membrane protein*, WTA: *wall teichoic acid*.

Die Haupt-GPL-Klassen bakterieller Lipidome sind im Wesentlichen PE, PG und CL, ein kleiner Anteil ist der Klasse PS zugehörig, wobei Lipide der Klasse PE nicht in allen grampositiven Bakterien vorkommen ([51], [52], [53], [48]). In grampositiven Bakterien ist der relative Anteil an negativ geladenen GPL, d.h. hauptsächlich PG, größer als bei gramnegativen Bakterien [54]. In gramnegativen Bakterien bildet PE als zwitterionisches GPL die Hauptklasse, während die Anteile anderer Lipidklassen wie PG und CL eine starke Abhängigkeit von der Wachstumsphase zeigen ([53], [54]). Die zwitterionischen Lipide der Klasse PE, genauso wie Lipide der Klasse PC in eukaryontischen Zellen, sind aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften wesentlich für die physikalischen Membraneigenschaften verantwortlich, d.h. beispielsweise für Membran-Phasenübergänge und für die Stimulation von Transportprozessen/-systemen [16]. Lipiduntersuchungen haben gezeigt, dass in der *sn-1*-Position von GPL-Molekülen in gramnegativen Bakterien hauptsächlich die Fettsäure C16:0 zu finden ist, und dass in der *sn-2*-Position einfach ungesättigte Fettsäuren, in den meisten Fällen C16:1 und C18:1, gefunden werden [54]. Im Gegensatz dazu enthalten die GPL in grampositiven Bakterien hauptsächlich gesättigte und häufig auch verzweigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 15 und 17 C-Atomen [54]. In *E. coli* sind ca. 90% der in der Zelle vorhandenen Fettsäuren in Phospholipiden gebunden und der Rest wird von der Zelle in die Bausteine von LPS eingebaut [53]. Abhängig von den jeweiligen

Wachstumsbedingungen finden häufig Modifizierungen der Fettsäurereste statt, vor allem *cis-trans*-Isomerisierungen und Cyclopropanierungen von Doppelbindungen ([55], [56]). Modifikationen der Fettsäuren spielen in Prokaryonten eine wesentliche Rolle bei der Regulierung der Membranfluidität. Diese Regulierung findet im Wesentlichen über die Veränderung der FS-Kettenlänge, des FS-Sättigungsgrades und über die zuvor beschriebenen Modifikationen statt ([57], [58], [15]). Hinsichtlich der Lokalisierung der GPL-Synthese besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen Eukaryonten und Prokaryonten. Da in fast allen Bakterien intrazelluläre Organelle fehlen, finden alle in Eukaryonten mit der ER-Membran assoziierten GPL-Syntheseschritte in Prokaryonten an bzw. in der inneren Membran statt [47]. Der wichtigste Acyl-Donor bei der GPL-Synthese in Bakterien ist das Acyl-Carrier-Protein (ACP) [59]. Alle GPL werden ausgehend von der PA-Grundstruktur gebildet ([59], [16]). Ein Schlüssel-Intermediat in der Synthese der zwitterionischen PE-Moleküle und der anionischen PG-Moleküle ist CDP-DG) [16], das in Kapitel 1.2. bereits erwähnt wurde. Cardiolipin wird durch die Kondensation von zwei PG-Molekülen gebildet ([59], [16]).

Eine Besonderheit des bakteriellen Lipidoms ist das Fehlen von Sterol-Lipiden, von denen der Hauptvertreter in Eukaryonten in den meisten Fällen Cholesterin ist [60]. Anstelle von Sterolen finden sich in Prokaryonten Sterol-Analoga, so genannte Hopanoide [60]. Das Grundgerüst von Hopanoiden, das Hopan, besteht im Gegensatz zu Sterolen, denen das so genannte Sterin zugrunde liegt, aus einem Fünfring und vier Cyclohexan-Ringen [60]. Das Sterin ist in der Struktur des Cholesterins in Abbildung 3 A rot eingefärbt, der Hopan-Grundkörper ist in der Struktur des Hopans blau eingefärbt (siehe Abbildung 3 B). Strukturell gehören Hopane zu den Triterpen-Isoprenoiden, d.h. sie bestehen aus 30 C-Atomen [60]. Bei der in Abbildung 3 B gezeigten Struktur des Diploptens handelt es sich um das in Prokaryonten am häufigsten vorkommende Hopanoid-Molekül [60]. Die Wirkung von Hopanoiden entspricht der von Sterol-Lipiden, d.h., dass die Einlagerung von Hopanoiden zu einer Verringerung der Membranfluidität bzw. zu einer Erhöhung der Membranordnung führt [60], wie es in Abbildung 3 C schematisch gezeigt ist.

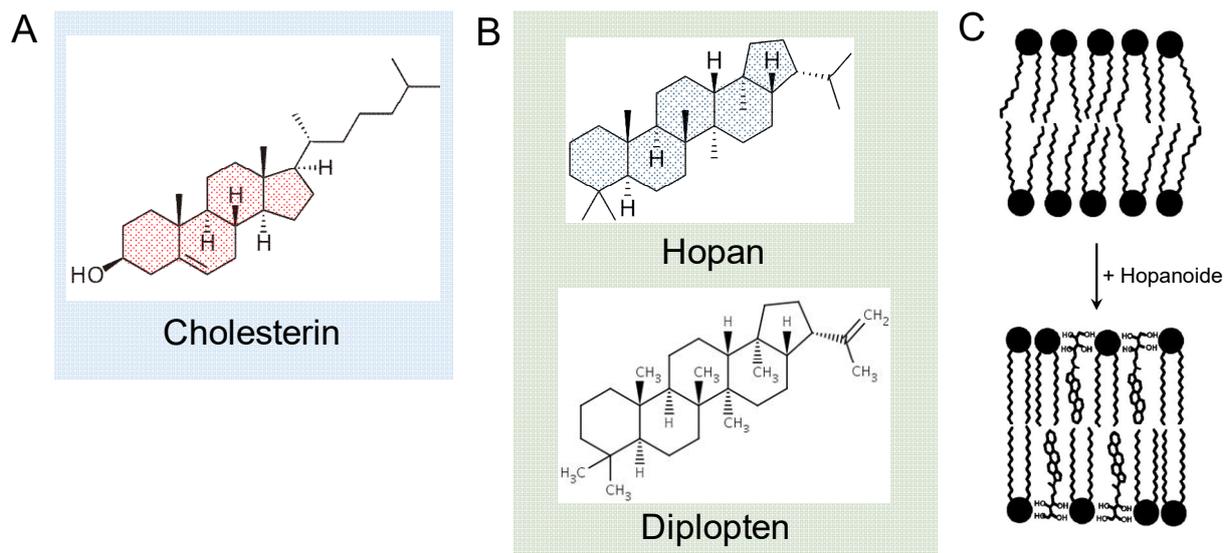


Abbildung 3

Cholesterin und in Bakterien vorkommende Cholesterin-Analoga. Struktur von Cholesterin (A), in rot eingefärbt, ist die allen Sterolen zugrundeliegende 4-Ring-Struktur des Sterins. In B sind die Strukturen zweier bakterieller Hopanoid-Moleküle gezeigt. Die allen Hopanoiden zugrunde liegende Struktur Hopan ist in B in grün eingefärbt. In C ist die Wirkung von Hopanoiden bei Insertion in die Membran gezeigt (modifiziert nach [60]).

Mittlerweile gibt es zahlreiche detaillierte Untersuchungen zu bakteriellen Lipidomen, sowohl von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien. Die ersten Lipidom-Untersuchungen in den 1960er-Jahren befassten sich hauptsächlich mit dem *E. coli*-Lipidom ([61], [62], [63]). Unter Anderem wurden mit Kinetikstudien die Lipidomveränderungen abhängig von der Temperatur, vom Wachstumsmedium und von der jeweiligen Wachstumsphase der Bakterienzellen untersucht ([63], [64]). Die Ergebnisse zeigten, dass in der stationären Phase im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase eine erhöhte Umwandlung von ungesättigten Fettsäuren zu Cyclopropan-Fettsäuren und ein Austausch von Lipiden der Klasse PG gegen solche der Klasse CL stattfinden ([63], [64]). Bei Cardiolipin wurde gefunden, dass abhängig von der Wachstumsphase, dem Sauerstoffgehalt und der Temperatur eine Veränderung der FS-Zusammensetzung und des CL-Anteils am Gesamtlipidom auftritt [25]. Hinsichtlich der Lipidom-Untersuchung wurde vor allem für *E. coli* auf Grund des Status' als Modellorganismus eine Vielzahl von Lipidomics-Untersuchungen durchgeführt ([63], [65], [66]). Ein Aspekt der Lipidom-Analyse, der dem Bereich Metabolomics zuzuordnen ist, ist die Fettsäure-Analyse mit Gaschromatographie-(GC)-MS. Üblicherweise werden mit GC-MS Methylester-Derivate von Fettsäuren, als so genannte FAMES (*fatty acid methyl ester*) bezeichnet, mit Hilfe von entsprechenden FAME-Standards quantifiziert. Entsprechende Untersuchungen wurden u.a. in [67] im Detail behandelt. Mittlerweile rücken bei Lipidomics zunehmend LC-MS(/MS)-Untersuchungen in den Vordergrund. Mit Hilfe von LC-MS(/MS) ist sowohl die Identifizierung einer Vielzahl von

Phospholipid-Spezies unterschiedlicher Klassen möglich, als auch die detaillierte Charakterisierung von GPL-Fettsäure-Varianten und Diacyl-Regioisomeren ([66]). Bei GPL-Fettsäure-Varianten handelt es sich um GPL-Moleküle mit gleicher Summenformel (Isobare), aber unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung. Unter Diacyl-GPL-Regioisomeren versteht man Diacyl-GPL, bei denen die gleichen Fettsäure-Reste im Molekül vorkommen, die aber in den *sn-1/sn-2*-Positionen invertiert sind.

1.6. Generelle Aspekte bei der Antibiotika-Entwicklung

Den Beginn der Antibiotika-Entwicklung bildet die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming Ende der 1920er-Jahre [68]. Die goldene Ära der Antibiotika-Entwicklung war in den 1940er-Jahren bis 1960er-Jahren [69]. Zu diesen Entdeckungen zählte die Entdeckung des Streptomycins durch Selman Waksman und Mitarbeiter in den 1940er-Jahren [70]. Die rasante Entwicklung und Entdeckung von Antibiotika hielt bis zu den 1960er-Jahren an, ging allerdings auch einher mit der gleichzeitigen Ausbildung von Antibiotika-Resistenzen [69]. Obwohl der Bedarf an neuen wirksamen Antibiotika groß ist, wurden seit den 1960er-Jahren keine neuen Klassen von Antibiotika mehr entwickelt, d.h. bei den neu gefundenen antimikrobiell wirkenden Substanzen handelt es sich in den meisten Fällen um Derivate bereits existierende Antibiotika [69]. Der Fokus der großindustriellen Entwicklung liegt auf der Entwicklung und Produktion von Breitbandantibiotika, d.h. von Substanzen, die wachstumshemmend gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Bakterien-Gattungen/-Stämme wirken und gleichzeitig auf den Patienten eine möglichst geringe toxische Wirkung haben [71]. Das größte Problem besteht heutzutage in der fehlenden Entwicklung neuer Antibiotika und der Resistenz gegen fast alle gängigen eingesetzten Antibiotika ([69], [71], [72]). Besonders die Behandlung von Patienten in Krankenhäusern birgt die Gefahr von Infektionen mit (multi)resistenten Keimen [72]. Multiresistente Stämme werden unter der Abkürzung „ESKAPE“ (*Enterococcus spp.* (spp.: mehrere Spezies), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spp.*) zusammengefasst ([69], [72]). Eine wesentliche Herausforderung bei der Antibiotika-Entwicklung ist, dass die antimikrobielle Substanz zuerst einmal an ihren Wirkungsort gelangen muss. Dies stellt häufig bereits das erste Problem dar, da der Zelleintritt von Antibiotika, die häufig amphiphile Moleküle sind, z.B. bei gramnegativen Bakterien erschwert ist [69]. Der Grund dafür ist zum einen die äußere Membran, die als robuster Schutz gegen Fremdstoffen von außen dient und zum anderen die so genannten *multidrug-resistant* (MDR)-Efflux-Pumpen [69]. MDR-Pumpen sind Antiporter und dienen der Erkennung von Fremdstoffen und deren effektivem Ausschleusen [69]. Zu

den bekannten Angriffspunkten von Antibiotika zählen die DNA/mRNA-Synthese, die Zellwand-Synthese, der Folsäure-Metabolismus und die Protein-Biosynthese ([73], [69]). Die Angriffspunkte sowie die entsprechenden Antibiotika-Klassen sind in Abbildung 4 gezeigt (Abbildung aus [69]).

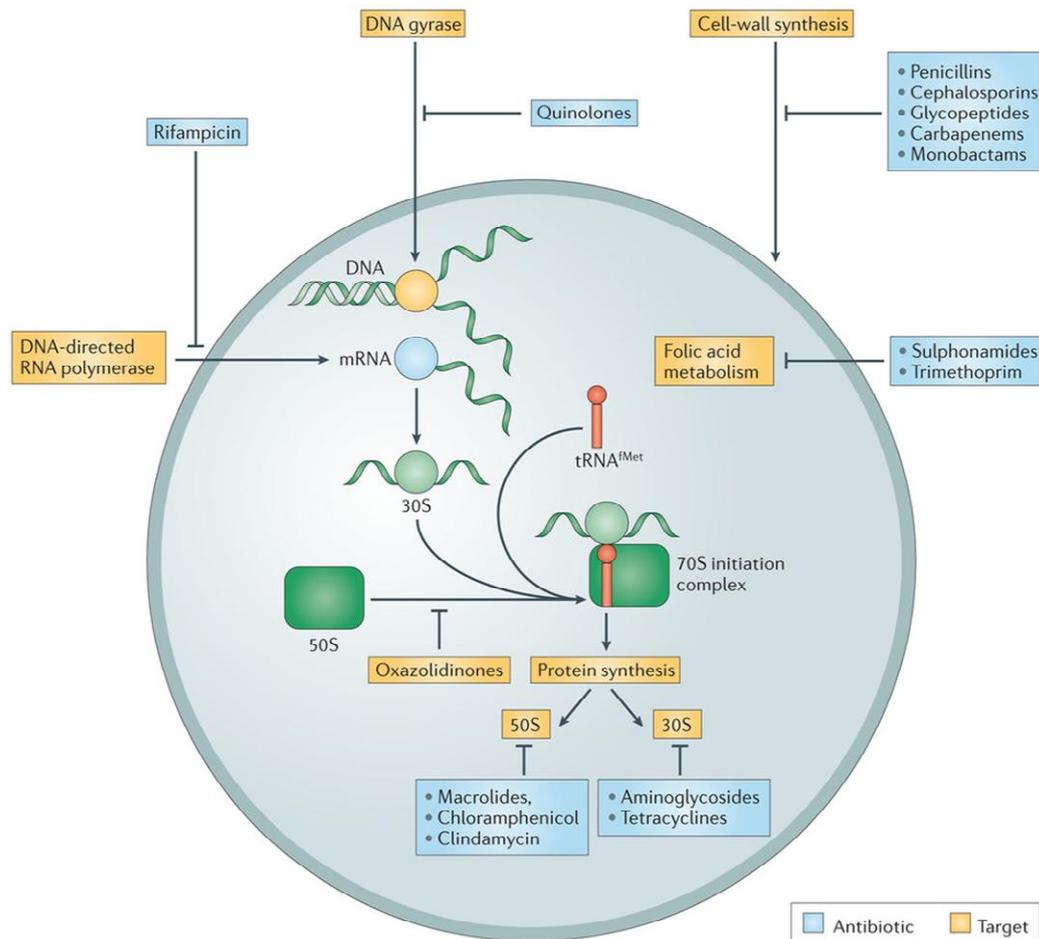


Abbildung 4

Schematische Darstellung von Antibiotika-Targets in Bakterien. In den blauen Kästen sind die zu den Targets zugehörigen Antibiotika-Klassen gezeigt. Die Abbildung wurde aus [69] entnommen.

Aufgrund der großen Nachfrage nach antimikrobiell wirksamen Substanzen werden z.B. synthetische chemische Strukturbibliotheken erstellt und es wird vermehrt nach natürlich vorkommenden antimikrobiellen Substanzen gesucht [74]. Eine heutzutage häufig verwendete Quelle für antimikrobiell wirkende Substanzen sind sekundäre Pflanzenmetabolite, die zur Abwehr von Mikroorganismen, Insekten und Herbivoren gebildet werden [75]. Antimikrobiell wirksame „Phytochemikalien“ können entsprechend ihrer

Grundgerüste in die in Abbildung 5 gezeigten Kategorien eingeteilt werden (Cowan 1999). Da Alkaloide eine wesentliche Rolle in dieser Arbeit spielen (siehe Kapitel 6), werden diese hier näher behandelt. Alkaloide sind heterozyklische stickstoffhaltige Substanzen, die in Bakterien, Pflanzen, Pilzen und Tieren zu finden sind und u.a. als Grundgerüste für Antibiotika-Klassen, z.B. Quinolone, dienen ([75], [74]). Alkaloide wirken u.a. bakteriozid und stören bzw. inhibieren die bakterielle Zelladhäsion und Biofilm-Bildung [75]. Als Beispiel für Alkaloide ist Berberin gezeigt, ein Benzylisochinolin-Alkaloid [76]. Berberin ist ein hydrophobes Kation, das in der Zelle auf die Membran und als DNA-interkalierende Substanz wirkt und nur durch MDR-Pumpen aus der Zelle geschleust werden kann [69].

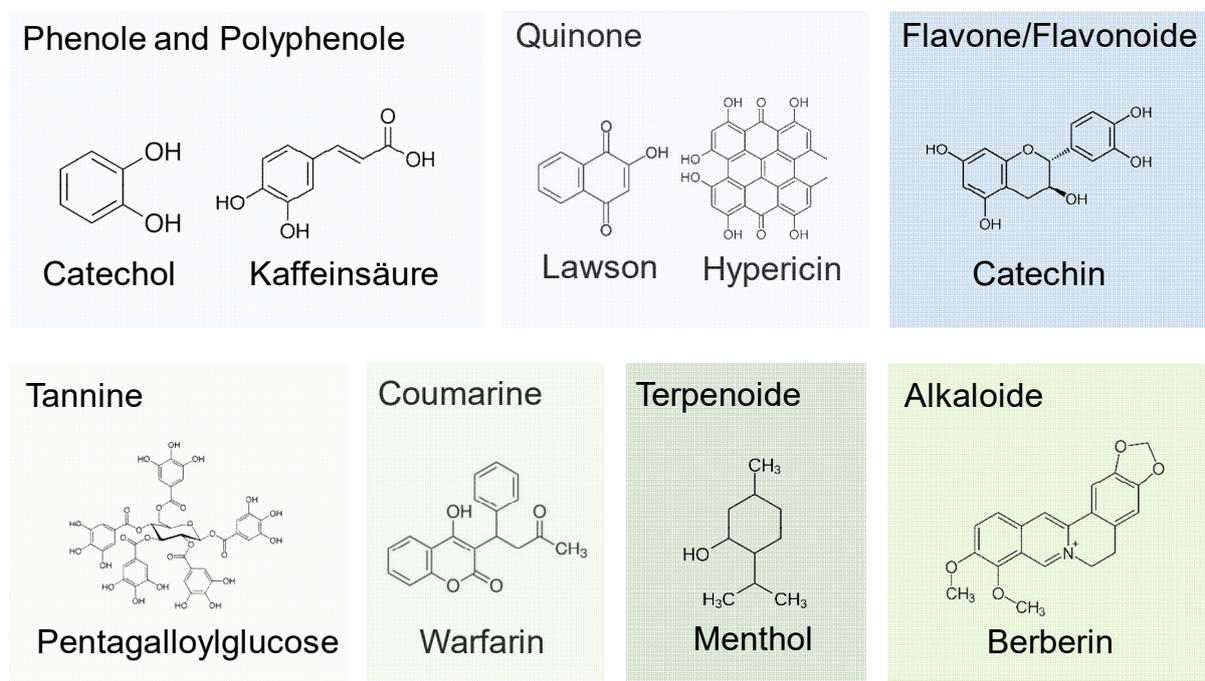


Abbildung 5

Klassen antimikrobiell wirkender pflanzlicher Sekundärmetabolite. Für jede der gezeigten Klassen ist jeweils mindestens ein Vertreter gezeigt. Die Einteilung entspricht der nach [75].

In dieser Arbeit spielt neben Berberin auch das Isochinolin-Alkaloid Roemerin eine Rolle, dessen Struktur in Abbildung 6 gezeigt ist. Roemerin ist aus einem Aporphin-Gerüst aufgebaut, das in der Abbildung in grün eingefärbt ist, während Berberin Isochinolin, in blau eingefärbt, als Grundgerüst zugrunde liegt. Untersuchungen zeigten, dass Roemerin antimikrobiell und fungizid wirkt und eine Anti-Malaria-Wirkung besitzt ([77], [78]).

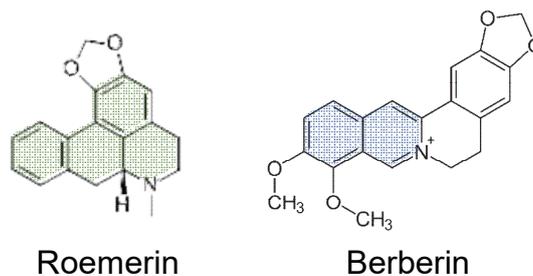


Abbildung 6

Strukturen von zwei Vertretern pflanzlicher Alkaloide. Bei Roemerin handelt es sich um ein Aporphin-Alkaloid, dessen Grundgerüst in grün eingefärbt ist. Bei dem Benzylisochinolin-Alkaloid Berberin ist das Isochinolin-Grundgerüst in blau eingefärbt.

1.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Für eine Vielzahl von antimikrobiell wirksamen Substanzen ist der direkte Effekt auf die Zellen sehr gut charakterisiert, wohingegen die komplexen zellulären Prozesse der Bakterien als Reaktion, d.h. Veränderungen auf Transcriptom-Ebene und biochemische Stoffwechselwege, weit weniger verstanden sind [73]. Besonders bei aus Pflanzen isolierten antimikrobiellen Substanzen sind die Wirkmechanismen oft komplett unbekannt [69].

Im Zuge dieser Arbeit, das Teil eines BMBF-Projekts war, sollte deshalb der Effekt von Alkaloiden auf bakterielle Zellen untersucht werden. Als Modellorganismus für gramnegative Bakterien wurde *E. coli* verwendet, als Vertreter für grampositive Bakterien *B. subtilis*. Zur Aufklärung bzw. zum besseren Verständnis des Wirkmechanismus wurde eine Kombination aus Transcriptomics, Proteomics und Lipidomics verwendet. Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Dr. Akbulut von der Marmara Universität (Istanbul) durchgeführt. Der experimentelle Teil der Transcriptomics- und Proteomics-Untersuchungen wurde in Istanbul durchgeführt. Der wesentliche Teil bestand bei dieser Arbeit in der Etablierung einer UPLC-MS(/MS)-Methode zur Charakterisierung bakterieller Lipidome. Der Fokus lag hierbei auf der LC-MS-Analyse von bakteriellen GPL. Im Zuge der Etablierung der Lipidomics-Methode wurden auch generelle Aspekte der massenspektrometrischen Lipidanalytik untersucht. Dazu gehörten die Ionisierung von Lipiden, die Untersuchung der Effizienz gängiger Lipid-Extraktionen, Untersuchungen zu Nicht-Lipid-Kontaminanten und zur quantitativen Regioisomer-Analyse mit Hilfe von UPLC-MS-Analysen. Im Zuge dieser Untersuchungen waren die Etablierung von geeigneten MS-Methoden zur Charakterisierung der Lipidmoleküle und die Datenauswertung mit der Software MassMap von zentraler Bedeutung.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte und Software

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte und deren Hersteller zusammengefasst.

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Hersteller
Centrifuge 5427 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Dionex UltiMate 3000 (RS Pump, RS Autosampler, RS Column Compartment)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Eppendorf ThermoMixer™	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Feinwaage ABJ-NM/ABS-N	KERN (Balingen, Deutschland)
HERAEUS Megafuge 16 R Centrifuge	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Magnetrührer MR200	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
MEGA STAR 1.6 R	VWR (Radnor, USA)
Microcentrifuge	StarLab (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter Seven Multi	Mettler-Toledo (Columbus, USA)
QTRAP® 5500	SCIEX (Darmstadt, Deutschland)
QExactive™ Hybrid Quadrupole Orbitrap	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Schüttelinkubator TH15	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, Deutschland)
Schüttler/Vortexer Vibrax VXR basic	IKA-Werke (Staufen im Breisgau, Deutschland)
Schüttelwasserbad LSB Aqua Pro	Grant (Shepreth, Vereinigtes Königreich)
Spektralphotometer GENESYS 10S	Thermo Scientific (Waltham, USA)
TriVersa NanoMate®	Advion Inc. (Ithaca, USA)
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries (Schwäbisch-Gmünd, Deutschland)
Waage EW	KERN (Balingen, Deutschland)

Als Software wurden in dieser Arbeit Analyst® (SCIEX, Version 1.5.2) Thermo Xcalibur (Version 3.0.63), Chromeleon (Version 6.80), Thermo Exactive Tune (Version 2.9 Build 2.926), GRAMS/AI™ Spektroskopie-Software (Thermo Scientific, Version 8.0) und MassMap (MassMap GmbH & Co. KG, Freising) verwendet.

2.1.2. Chemikalien, Lipide und sonstige Materialien

In Tabelle 6 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien zusammengefasst. Alle in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Lipidstandards und Lipidmischungen sind gesondert in Tabelle 7 zusammengefasst. Die in dieser Arbeit verwendeten sonstigen Materialien sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien (ohne Lipide)

Chemikalie	Spezifikationen/Bestellnummer (Anbieter)
Acetonitril	CHROMASOLV™ LC-MS Ultra/14261 (Riedel-de Haën) ^a
Agar	05040 (Sigma-Aldrich) ^b
Ameisensäure	LC-MS grade/56302 (Honeywell Fluka™) ^c
Ammoniumbicarbonat	40867 (Honeywell Fluka™) ^c
Ammoniumformiat	LC-MS grade/14266 (Honeywell Fluka™) ^c
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	M1019 (Sigma-Aldrich) ^b
L(+)-Ascorbinsäure	52,0100 (AppliChem) ^d
Bactotrypton	211705 (BD) ^e
Butanol (BuOH)	CHROMASOLV™ Plus, for HPLC, ≥99.7%/ 34867 (Riedel-de Haën) ^a
Chloroform (CHCl ₃)	Puriss. p.a., Reag. ISO, Reag. Ph. Eur., 99.0-99.4% (GC)/32211 (Riedel de Haën) ^a
Ethylacetat (EtAc)	Certified AR for Analysis/10386320 (Fisher Chemicals) ^f
Glycerin	A3552,0500 (AppliChem) ^d
HCl	6M HCl-Lösung (6N)/15606880 (Fisher Chemicals)
Heptan	N-Heptane, Certified AR for Analysis/1000170 (Fisher Chemicals) ^f
H ₂ KPO ₄	P9791 (Sigma-Aldrich) ^b
Methanol (MeOH)	CHROMASOLV™, for HPLC, ≥99.9%/15604580 (Fisher Chemicals) ^f LC-MS CHROMASOLV™/15614740 (Fisher Chemicals) ^f
Methyl-tert-Butylether (MTBE)	CHROMASOLV™ for HPLC, ≥99.8%/34875 (Sigma-Aldrich) ^b
NaCl	31434 (Sigma-Aldrich) ^b
Nährbouillon für Mikrobiologie	105443 (Merck) ^b
NH ₄ OH	25%, Certified AR for Analysis/10171700 (Fisher Chemicals) ^f
1x PBS	D8662 (Sigma-Aldrich) ^b
Perchlorsäure	70%; 99.999% Trace Metals Basis/311421 (Merck) ^b
Phospholipase A ₂ (Schweinepankreas)	P6534 (Sigma-Aldrich) ^b
Piperidin	Rein, Lösung/10528820 (Fisher Chemicals) ^f
2-Propanol (IPA)	CHROMASOLV™ Plus, for HPLC, 99.9%/650447 (Riedel-de Haën) ^a
Triethylamin (TEA)	Reinheit >99.5%/471283 (Sigma-Aldrich) ^b
Wasser	CHROMASOLV™ LC-MS Ultra/14263 (Riedel-de Haën) ^a CHROMASOLV™ Plus, for HPLC/34877 (Riedel-de Haën) ^a
Zitronensäuremonohydrat	C1909 (Sigma-Aldrich) ^b

^a: Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland), ^b: Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), ^c: Honeywell Fluka™ (Seelze, Deutschland), ^d: AppliChem (Darmstadt, Deutschland), ^e: BD (San Jose, USA), ^f: Fisher Chemicals (Hampton, USA)

Tabelle 7: Verwendete Lipide

Lipidstandard/Lipidmix	FS <i>sn-1/sn-2/sn-3</i>	Bestellnummer (Hersteller)
PA 37:4	17:0/20:4	LM1402 (Avanti) ^a
PE 37:4	17:0/20:4	LM1102 (Avanti) ^a
PS 37:4	17:0/20:4	LM1302 (Avanti) ^a
PI 37:4	17:0/20:4	LM1502 (Avanti) ^a
PC 34:1	16:0/18:1 18:1/16:0	850457 (Avanti) ^a 850475 (Avanti) ^a
PC 30:0	14:0/16:0 16:0/14:0	850445 (Avanti) ^a 850454 (Avanti) ^a
PC 34:0	16:0/18:0 18:0/16:0	850456 (Avanti) ^a 850465 (Avanti) ^a
PC 36:1	18:0/18:1 18:1/18:0	850467 (Avanti) ^a 850476 (Avanti) ^a
PS-Mix Gehirn (Rind)	-	840032 (Avanti) ^a
PA-Mix Hühnerei	-	840101 (Avanti) ^a
PC-Mix Leber (Rind)	-	840053 (Avanti) ^a
PE-Mix E.coli	-	840027 (Avanti) ^a
PG-Mix E.coli	-	841188 (Avanti) ^a
D5 TG Standardmix	-	LM6000 (Avanti) ^a
TG 24:0	8:0/8:0/8:0	33-0800 (Larodan) ^b
TG 30:0	10:0/10:0/10:0	33-1000 (Larodan) ^b
TG 36:0	12:0/12:0/12:0	33-1200 (Larodan) ^b
TG 42:0	14:0/14:0/14:0	33-1400 (Larodan) ^b
TG 48:0	16:0/16:0/16:0	33-1600 (Larodan) ^b
TG 46:0	16:0/14:0/16:0	34-1612 (Larodan) ^b
TG 52:1	16:0/18:1/18:0	34-3001 (Larodan) ^b
TG 52:4	18:2/18:2/16:0	34-1862 (Larodan) ^b
TG 54:2	18:0/18:2/18:0	34-1812 (Larodan) ^b
TG 56:2	18:1/18:1/20:0	34-1824 (Larodan) ^b
TG 56:10	20:5/20:5/16:0	34-2016 (Larodan) ^b

^a: Avanti (Alabaster, USA), ^b: Larodan (Solna, Schweden)

Tabelle 8: Verwendete sonstige Materialien

Materialien	Bestellnummer (Anbieter)
ACQUITY UPLC CSH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 1 mm x 150 mm (Waters)	186005294 (MZ-Analysentechnik GmbH) ^a
ACQUITY UPLC CSH C18 VanGuard Pre-Column 1.7µm, 2,1 x 5mm (Waters)	186005303 (MZ-Analysentechnik GmbH) ^a
Advion ESI Chip™ D-Chip 4 mikron	HD_D (Advion, Inc.) ^b
16 x 100 mm Culture C-Tubes PTFE-faced Cap	15-415 358646 (Wheaton) ^c
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 mL, Eppendorf Quality™	E-2306 (Neolab) ^d
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2.0 mL, Eppendorf Quality™	E-2307 (Neolab) ^d
100 mL Glasflaschen	231852404 (DWK Life Sciences) ^e
Microman-Pipetten	
50-250 µL	AB15256 (Gilson) ^f
10-100 µL	KN05061 (Gilson) ^f
1-10 µL	KM05619 (Gilson) ^f
Spitzen für Microman	
50-250 µL (CP250)	F148014 (Neolab) ^d
10-100 µL (CP100)	F148013 (Neolab) ^d
1-10 µL (CP10)	F148412 (Neolab) ^d
Pasteurpipetten 150 mm, G12-1701	612-1720 (VWR) ^g
Pierce™ Negative Ion Calibration Solution	88324 (Thermo Scientific) ^h
Pierce™ LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution	88322 (Thermo Scientific) ^h
Pierce™ Negative Ion Calibration Solution	88324 (Thermo Scientific) ^h
Pierce™ LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution	88322 (Thermo Scientific) ^h
Pipetman-Pipetten	
100-1000 µL	LB26106 (Gilson) ^f
20-200 µL	LB28201 (Gilson) ^f
2-20 µL	KM22929 (Gilson) ^f
1-10 µL	LB22620 (Gilson) ^f
Spitzen für Pipetman	
100-1000 µL	70.762 (Sarstedt AG & Co.) ⁱ
2-20 µL, 20-200 µL	70.760.002 (Sarstedt AG & Co.) ⁱ
1-20 µL	771290 (Greiner bio-one) ^j
16 x 100 mm Pyrex-Röhrchen, Culture tubes, GPI 15-415 Screw Cap, GPI 15-415, Phenolic, PTFE-Liner	10170163 (Corning) ^k
Verex™ Cert+ Vial Kit, 9mm, Screw top, Maximum Recovery (CD) Clear 33 + PTFE/Silicone	AR0-9921-13-D (Phenomenex) ^l
Verex Insert, 6mm Dia., 300µL, Clear 51 Conical Bottom, w/ bottom spring, silanized	AR1-4623-12 (Phenomenex) ^l

^a: MZ-Analysentechnik GmbH (Mainz, Deutschland), ^b: Advion, Inc. (Ithaca, USA), ^c: Wheaton (New Jersey, USA), ^d: Neolab (Heidelberg, Deutschland), ^e: DWK Life Sciences (New Jersey, USA), ^f: Gilson (Limburg an der Lahn, Deutschland), ^g: VWR (Radnor, USA), ^h: Thermo Scientific (Waltham, USA), ⁱ: Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland), ^j: Greiner bio-one (Kremsmünster, Österreich), ^k: Corning (Corning, USA), ^l: Phenomenex (Torrance, USA)

2.1.3. Bakterienstämme und Alkaloide

E. coli K12 TB1 wurde von der Gruppe von Prof. Dr. Akbulut (Marmara Universität, Istanbul) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um den Genotyp: F- ara Δ (lac-proAB) [Φ 80dlac Δ (lacZ)M15] rpsL(StrR) thi hsdR. Bei den für die Experimente verwendeten *B. subtilis*-Zellen handelte es sich um *B. subtilis* 168, ebenfalls zur Verfügung gestellt von der Gruppe von Prof. Dr. Akbulut (Marmara Universität, Istanbul). Alle für die Experimente verwendeten Alkaloide, d.h. Roemerin, Berberin und Boldin wurden freundlicherweise von der Gruppe von Prof. Dr. Akbulut (Marmara Universität, Istanbul) als reine Feststoffe zur Verfügung gestellt.

2.2. Methoden

2.2.1. Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung wurde wie in [79] beschrieben durchgeführt. Für die Standardkurve wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Stoffmenge [nmol]	Volumen 0,4 mM KH_2PO_4 [μL]	Volumen Wasser [μL]
0	0	500
2	5	495
5	12,5	487,5
10	25	475
20	50	450
30	75	425
40	100	400

Die Phosphatbestimmung wurde in Wheaton-Röhrchen durchgeführt. Als Wasser-Qualität wurde HPLC-Grade verwendet. Zu den für die Standardkurve verwendeten wässrigen KH_2PO_4 -Lösungen wurden ebenso wie zu den getrockneten Lipidextrakten 150 μL Perchlorsäure pipettiert. Die Lösungen wurden anschließend bei 180°C im Heizblock für 40 min inkubiert. Anschließend wurden 500 μL Wasser HPLC-Grade zugegeben. Anschließend wurden 400 μL einer 1:1-Mischung von 1,25% Ammoniummolybdat und 5% Ascorbat zu den Proben und den Standardlösungen gegeben. Die Lösungen wurden für 5 min bei 100°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben wurden die Lösungen in Plastiküvetten überführt und es wurde die Extinktion bei 797 nm gemessen. An die Punkte der Standardkurve wurde eine lineare Trendlinie mit Excel angepasst und mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung wurde die Phosphat-Menge für die Lipidextrakte berechnet.

2.2.2 Milde Alkalische Hydrolyse

Zu den getrockneten Lipidextrakten wurden 2 mL MeOH gegeben. Zum Resuspendieren wurden die Proben sorgfältig gevortext (5 min bei 2000 rpm) und für 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden 2 mL 25% NH₄OH zugegeben und die Mischung wurde gevortext. Danach erfolgte die Inkubation für 2,5 Stunden bei 50°C im Schüttelwasserbad (unter leichtem Schütteln). Die Proben wurden abschließend unter N₂-Strom getrocknet.

2.2.3. Phospholipase A₂-Verdau von Lipidstandards

Für den Verdau wurden 200 pmol Lipidstandard in ein 2 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und unter einem N₂-Strom getrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in einer Mischung aus 490 µL 1x PBS und 10 µL 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Mischung wurde für 2 min bei 2000 rpm sorgfältig gevortext. Anschließend wurde 1 µL der Enzymlösung (≥ 600 U/mg) zugegeben und die Mischung wurde für 4 Stunden bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend erfolgte die Lipidextraktion durch Zugabe von 500 µL Chloroform und 500 µL Methanol und anschließendes Vortexen für 2 min bei 2000 rpm. Nach der Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge für 3 min bei 1000 x g (4°C) wurde die untere (CHCl₃-) Phase in ein Pyrex-Röhrchen überführt und die Lipide wurden unter einem N₂-Strom getrocknet.

2.2.4. Lipidextraktion nach Folch

Das Vorgehen entspricht dem in [80] beschriebenen Protokoll. Als erster Schritt erfolgte das Vorlegen der Lipidstandards in ein Pyrex-Röhrchen. Anschließend wurde die Probe zupipettiert. Zur Probe wurde ein 20-mal größeres Volumen einer 2:1 Chloroform/MeOH-Mischung gegeben. Im Fall von Probenvolumina unter 200 µL wurde auf ein Gesamtprobenvolumen von 200 µL mit 155 mM NH₄HCO₃-Puffer aufgefüllt. Die Mischung wurde für 10 min bei 500 rpm bei Raumtemperatur im Schüttler geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 60 µL Wasser und die Zentrifugation für 2 min bei 1000 x g (4°C). Die obere Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein Glasvial transferiert. Die untere Phase (Chloroform-Phase) wurde maximal 2-mal mit 100 µL einer 1:1-Mischung aus MeOH/H₂O gewaschen. Anschließend erfolgten die Zentrifugation und das Abnehmen der oberen Phase. Der Lipidextrakt, der sich in der unteren Phase befand, wurde unter einem N₂-Strom getrocknet.

2.2.5. Saure Bligh und Dyer-(SBD)-Lipidextraktion

Das Vorgehen entspricht dem in [81] beschriebenen Protokoll. Als erster Schritt erfolgte das Vorlegen der Lipidstandards in ein Pyrex-Röhrchen. Das Röhrchen wird im Folgenden als x^I bezeichnet. Anschließend wurde die zu extrahierende Probe zugegeben und das Gesamtvolumen der Probe wurde mit Wasser auf 500 μL aufgefüllt. Danach wurden 1,9 mL SBD (40 mL MeOH/20 mL CHCl_3 /300 μL 37%-ige HCl) zupipettiert. Es erfolgte kurzes Vortexen, die Zugabe von 500 μL CHCl_3 und 500 μL Wasser und ein erneutes Vortexen (2 min, 2000 rpm). Die Lösung wurde bei 1000 $\times g$ für 2 min (4°C) zentrifugiert und die organische Phase (untere Phase) wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues Glasröhrchen (x^{II}) überführt. Es wurden 500 μL CHCl_3 zu Röhrchen x^I und 500 μL CHCl_3 und 500 μL Wasser zu Röhrchen x^{II} gegeben. Anschließend wurden beide Röhrchen gevortext und zentrifugiert. Die organische Phase von Röhrchen x^{II} wurde in ein neues Glasröhrchen (x) überführt und die organische Phase von Röhrchen x^I wurde in Röhrchen x^{II} überführt. Es erfolgte ein erneutes Vortexen und Zentrifugieren der Lösung von x^{II} . Die organische Phase von x^{II} wurde danach in x überführt. Der Lipidextrakt in x wurde unter einem N_2 -Strom getrocknet.

2.2.6. Methyl-tert-Butylether-(MTBE)-Lipidextraktion

Das Vorgehen entspricht dem in [82] beschriebenen Protokoll. Als erster Schritt erfolgte das Vorlegen der Lipidstandards in Pyrex-Röhrchen. Dieses Röhrchen wird im Folgenden als x^I bezeichnet. Anschließend wurde die Probe dazupipettiert, wobei das Probenvolumen mit 155 mM NH_4HCO_3 -Puffer auf 200 μL aufgefüllt wurde. Nach der Zugabe von 1,5 mL MeOH wurde die Mischung für 2 min bei 2000 rpm im Schüttler gevortext. Anschließend wurden 5 mL MTBE zugegeben und die Mischung würde für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln (500 rpm) inkubiert. Nach der Zugabe von 1,25 mL Wasser wurde die Mischung für 10 min bei Raumtemperatur stengelassen und anschließend für 10 min bei 1000 $\times g$ (4°C) zentrifugiert. Die organische (obere) Phase wurde mit einer Pasteurpipette in ein Röhrchen x^{II} überführt. Zum Nachextrahieren der Lösung in x^I wurden 2 mL einer Mischung aus MTBE/MeOH/ H_2O (10/3/2,5 v/v/v, obere Phase) zugegeben und die Mischung wurde wiederum 10 min bei Raumtemperatur stengelassen und für 10 min bei 1000 $\times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase aus x^I in x^{II} überführt. Der Lipidextrakt wurde unter einem N_2 -Strom getrocknet.

2.2.7. Butanol-Methanol-(BUME)-Lipidextraktion

Das Vorgehen entspricht dem in [83] beschriebenen Protokoll. Als erster Schritt erfolgte das Vorlegen der Lipidstandards in Pyrex-Röhrchen. Dieses Röhrchen wird im Folgenden als x^I bezeichnet. Anschließend wurde die Probe (maximales Volumen: 100 μ L) zupipettiert. Nach der Zugabe von 1 mL einer 3:1-Mischung von BuOH und MeOH wurde die Mischung für 10 min im Schüttler gevortext (2000 rpm). Anschließend wurden 500 μ L einer 3:1-Mischung von Heptan und Ethylacetat dazugegeben. Die Mischung wurde für 5 min bei 500 rpm im Schüttler geschüttelt. Es erfolgte die Wiederholung der Zugabe der Heptan/Ethylacetat-Mischung und des Schüttelschrittes. Anschließend wurde 1 mL 1%-ige Essigsäure zugegeben und die Mischung wurde wiederum für 5 min geschüttelt. Nach dem Stehenlassen der Mischung wurden 1,25 mL der organischen (oberen) Phase in ein zweites Röhrchen (x^{II}) überführt. Es wurden 1,1 mL Heptan/EtAc (3:1) zu Röhrchen x^I gegeben und die Mischung wurde für 5 min geschüttelt und anschließend für 5 min stehengelassen. 1,1 mL der organischen Phase von x^I wurden in Röhrchen x^{II} überführt. Für die Nachextraktion wurden 830 μ L Heptan/EtAc (3:1) zu x^I zugegeben. Die Mischung wurde wiederum für 5 min geschüttelt, dann für 5 min stehengelassen und anschließend wurde die organische Phase in Röhrchen x^{II} überführt. Der Lipidextrakt in x^{II} wurde unter einem N_2 -Strom getrocknet.

2.2.8. Herstellung von LB-Medium und Glycerinstocks

Für das LB-Medium wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl in 800 mL Millipore-Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt und es wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 L aufgefüllt. Danach wurde das LB-Medium zur weiteren Verwendung in Glasröhrchen (Übernachtskulturen) bzw. Erlenmeyerkolben autoklaviert (121°C für 15 min). Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden 15 g Agar pro Liter Medium verwendet.

Glycerinstocks wurden aus *E. coli*-Einzelkolonien gewonnen. Dafür wurde *E. coli* K12 TB1 auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft bei 37°C über Nacht (180 rpm) inkubiert. 500 μ L der Übernachtskultur wurden mit 500 μ L einer sterilen 50%-igen(v/v)-Glycerinlösung durch zweimaliges Invertieren gemischt und bei -80°C gelagert.

2.2.9. Bakterienwachstum für Alkaloidbehandlung

Um reproduzierbare Wachstumskurven zu erhalten, wurden die Wachstumsexperimente mit und ohne Alkaloid mit einer zweistufigen Vorkultur durchgeführt. Für die erste Vorkultur

wurden 5 mL LB-Medium mit 25 μ L Glycerinstock angeimpft und über Nacht (8-14 Stunden) bei 37°C (180 rpm) inkubiert. Für die zweite Vorkultur wurden 20 mL LB-Medium mit 200 μ L der ersten Vorkultur angeimpft und bei 37°C (180 rpm) bis zu einem OD_{600 nm}-Wert von 0,7 (log-Phase) inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (50 mL in 250 mL Erlenmeyerkolben) mit 1 mL der zweiten Vorkultur angeimpft (1% Animpfung). Der OD_{600 nm}-Wert wurde im Stundentakt bzw. Halbstundentakt überprüft, bis der OD_{600 nm}-Wert 0,5 betrug. Ein Kolben wurde mit der Alkaloid-Lösung in DMSO (finale Konzentration von Roemerin in der Kultur: 100 μ g/mL, Ausgangslösung: 10 mg/mL) versetzt und ein Kolben als Kontrolle mit 500 μ L DMSO (finale Konzentration DMSO in der Kultur: 1% (v/v)). Es wurden 500 μ L-Aliquots zu den Zeitpunkten t=0 min (Startpunkt der Alkaloid-Behandlung), t=30 min und t=60 min für eine nachfolgende Lipidom-Analyse genommen. Es wurde darauf geachtet, dass nicht mehr als 10% des Gesamtvolumens der Bakterienkultur an Aliquots entnommen wurden, da ansonsten eine negative Beeinflussung des Bakterienwachstums auftritt. Die Bakteriensuspension, die als Aliquots entnommen wurden, wurde bei 5000 x g für 15 min (4°C) pelletiert und drei Mal mit 500 μ L 155 mM NH₄HCO₃ gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden das Pellet in 500 μ L 155 mM NH₄HCO₃ resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bakterielle Lipide wurden mit der MTBE-Extraktion (Kapitel 2.2.6) gewonnen.

2.2.10. Transmissionselektronen-Mikroskopische (TEM)-Aufnahmen von Bakterien

Im Fall von *E. coli* K12 TB1-Zellen wurde wie unter 2.2.9. beschrieben eine 5 mL-Vorkultur mit 25 μ L Glycerinstock angeimpft und über Nacht (8-14 Stunden) bei 37°C (180 rpm) inkubiert. Für die zweite Vorkultur wurden 20 mL LB-Medium mit 200 μ L der ersten Vorkultur angeimpft und bei 37°C (180 rpm) bis zu einem OD_{600 nm}-Wert von 1,0 inkubiert. Es wurde dann 1 mL für die TEM-Aufnahmen aus der Kultur entnommen und bei 2000 x g für 7 min in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit jeweils 500 μ L 1x PBS durchgeführt, d.h. die Zellpellets wurden immer wieder durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500 μ L 1x PBS resuspendiert. Im Fall von einer Alkaloidbehandlung der Zellen wurde 60 min nach dem Start der Behandlung (OD_{600 nm}: 0,5) 1 mL der Kultur entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Alle TEM-Aufnahmen wurden von Dirk Fleming von der Electron Microscopy Facility des Biochemie-Zentrums Heidelberg durchgeführt. Für die Harzschnitte mit anschließender Negativkontrastierung von *E. coli* K12 TB1 wurden wie oben beschrieben 1 mL der Kultur bei einer OD_{600 nm} von ca. 1 entnommen und bei 5000 x g für 2 min (4°C) in einer Eppendorf-Zentrifuge pelletiert. Anschließend wurde das Medium mit einer Pipette abgenommen und es erfolgte die Zugabe

von 1 mL 2% Glutaraldehyd in 100 mM Caco-Puffer. Die Lösungen wurden von der Electron Microscopy Core Facility der Universität Heidelberg (EMCF, CellNetworks) zur Verfügung gestellt. Die Harzschnitte der *E. coli* K12 TB1-Zellen wurden von der EMCF durchgeführt.

Bei *B. subtilis* 168-Zellen wurde auch zuerst eine Übernachtskultur gezogen (vgl. *E. coli* K12 TB1). Die Übernachtskultur wurde 1:100 mit Nährmedium verdünnt und die Zellen wurden bis zu einer OD_{600 nm} von 0,5-0,6 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend entweder mit Alkaloid für 60 min behandelt oder es wurde das dem Volumen des Alkaloids in DMSO entsprechende Volumen zur Kultur gegeben. Die Zellen wurden wie oben für *E. coli* K12 TB1 beschrieben für TEM pelletiert und gewaschen.

2.2.11. Probenvorbereitung für UPLC-Analyse

Alle Lipidstandards bzw. Lipidextrakte wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie in einer Mischung aus 3 Teilen Laufmittel A (60% Acetonitril/40% H₂O/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂) und 2 Teilen Laufmittel B (90% 2-Propanol/10% Acetonitril/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂) resuspendiert. Das Resuspendieren erfolgte durch Vortexen für 2 min und eine anschließende Inkubation im Ultraschallbad für 2 min. Die Lösung wurde danach in silanisierte Glasinserts überführt, die zuvor in 1,5 mL-Eppendorf-Reaktionsgefäßen platziert wurden, und bei 3000 x g für 2,5 min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde das Glasinsert mit einer Pinzette in das Probenvial eingesetzt. Im Fall der Analyse von Lipiden der Klassen PA, PS und PI wurde je 1 µL einer 100 mM-Lösung des Zitatmonohydrats in das Probenvial gegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit dem Lösungsmittel vermischt.

2.2.12. UPLC-Analysen

Für die UPLC-Analysen von Lipidstandards und kommerziell erhältlichen Lipidmischungen wurden in dieser Arbeit Gesamtlipidkonzentrationen im Bereich von 1-10 µM verwendet. Bei *E. coli*-Extrakten wurden Konzentrationen von 20-50 µM verwendet. Die Analysen wurden mit dem Ultimate[®] 3000 UPLC-System durchgeführt. Als Säule wurde eine ACQUITY UPLC[®] CSH[™] C18 1.7µm, 1.0 x 150 mm-Säule von Waters verwendet. Die Säulenofentemperatur betrug 55°C, die des Autosamplers 20°C. Die Flussrate betrug 100 µL/min. Die Laufmittelzusammensetzungen waren wie folgt: 60% Acetonitril/40% H₂O/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂ (Laufmittel A), 90% 2-Propanol/10% Acetonitril/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂ (Laufmittel B). NH₄HCO₂ wurde in den beiden Laufmitteln gelöst. In Laufmittel B war NH₄HCO₂ erst nach mindestens 12 Stunden und anschließender Behandlung im Ultraschallbad löslich. Beide

Laufmittel wurden vor der Verwendung für 5 min im Ultraschallbad entgast. Der Gradient war wie folgt: 0 min: 40% Laufmittel B (LM B), 3 min: 50% LM B, 9 min: 54% LM B, 9,1 min: 70% LM B, 17-22 min: 90% LM B and 22.5-30 min: 40% LM B. Vor der Lagerung wurde die Säule zuerst mit 50% MeOH/50% H₂O und anschließend mit Acetonitril gespült.

2.2.13. Direktinfusionsmessungen

Die Direktinfusionsmessungen in dieser Arbeit wurden entweder Chip-basiert (NanoMate, Advion), mit der Spritzenpumpe oder mit Hilfe der UPLC durchgeführt. Die Flussraten der einzelnen Messmethoden waren wie folgt: 60-250 nL/min (Chip-basiert, NanoMate), 15 µL/min (Spritzenpumpe) und 100 µL/min (UPLC). Die mit Chip-basierter/Spritzenpumpe-Direktinfusion gemessenen Proben waren in einer 1:3-Mischung von MeOH und 0,05% Triethylamin in MeOH gelöst. Im Fall der UPLC-Messung wurden die Proben in einer 1:1-Mischung aus Laufmittel A und Laufmittel B (siehe Kapitel zu UPLC-Trennung) gelöst. Alle Messungen wurden mit dem QExactive durchgeführt. Im Fall von Direktinfusionsmessungen mit der UPLC wurde eine Kombination aus Viper-Tubings mit den Dimensionen 750 x 0,1 mm und 650 x 0,1 mm verwendet, um zu gewährleisten, dass der Druck über dem benötigten Minimalruck von 5 bar liegt. Es wurden folgende NanoMate-Einstellungen verwendet: 4 µm Innendurchmesser (D-Chip), *Vent headspace*: ja, *volume of air to aspirate*: 10% des Probenvolumens, *air gap before chip*: ja, *pre-wetting*: ja, *contact closure delay*: 10 s, *pre-piercing depth*: 9.0 mm, Gasdruck: 0.5 psi, Spannung: 1,25 kV, Negativmodus. Für die Direktinfusionsmessungen mit der Spritzenpumpe und der UPLC wurde die HESI-Quelle des QExactive verwendet. Die Einstellung der HESI-Quelle waren wie folgt: Scanbereich: m/z 550-1000, Auflösung bei m/z 200: 140.000, Negativmodus, Anzahl Microscans: 3, AGC-Target: 1e6, Maximale Injektionszeit: 50, Flussrate Sheath-Gas: 10 [beliebige Einheit], Flussrate Auxilliary-Gas/Sweep-Gas: 0 [beliebige Einheit], Spray-Spannung: 4 kV, Kapillartemperatur: 350°C, RF-Level S-Linse: 50.

2.2.14. Massenspektrometrische Analysen mit der QTRAP 5500

Die Steuerung des Massenspektrometers erfolgte mit der Software Analyst. In dieser Arbeit wurden Neutralverlust-(NL)-Scans für Lipide der Klassen PE und PG im Positivmodus aufgenommen. Die Geräteeinstellungen waren wie folgt: Verlust von 141 Da (PE)/Verlust von 189 Da (PG), Aulösung Q1 und Q3: Unit, Scan-Rate: 200 Da/s, MR-Pause: 5,007 ms, Step Size: 0,1 Da, Massenbereich: 400-800 Da (PE) und 400-910 Da (PG). Weitere Parameter waren *declustering potential* (DP): 100, *entrance potential* (EP): 7, Kollisionsenergie: 25 und *collision cell exit potential* (CXP): 19.

2.2.15. Massenspektrometrische Analysen mit dem QExactive

Die Steuerung des Massenspektrometers erfolgte mit der Software Thermo Xcalibur. Full-MS-Scans wurden im Positiv- sowie im Negativmodus mit den folgenden Einstellungen aufgenommen: Sheath-Gas-Flussrate: 4 [beliebige Einheit], Auxilliary-Gas-/Sweep-Gas-Flussrate: 0 [beliebige Einheit], Spray-Spannung: 4 kV, Kapillar-Temperatur: 320°C, RF-Level S-Linse: 50, AGC-target: 1e6, maximale Ionentransferzeit: 200 ms, m/z-Scanbereich: 150-1500. Für die Auflösung (bei m/z 200) wurde im Fall von alternierenden Full-MS/AIF-Experimenten (AIF: *all ions fragmentation*) ein Wert von 140.000 und im Fall von Full-MS/targeted-MS/MS-Experimenten ein Wert von 35.000 eingestellt. AIF-Scans wurden mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 35% aufgenommen.

Kombinierte Full-MS/targeted-MS/MS-Experimente wurden ausschließlich im Negativmodus aufgenommen. Die Parameter für targeted-MS/MS-Scans wurden wie folgt gewählt: m/z-Scanbereich: 150 bis 900 u, Standardladungszahl: 1, Auflösung bei m/z 200: 17.500, AGC-target: 2e5, maximale Ionentransferzeit: 100 ms, Isolationsfenster Precursor-Ionen: 2.0 m/z, erste Masse: 100 m/z, NCE: 25%. Targeted-MS/MS-Scans wurden mit einer Samplingrate von durchschnittlich 12 Hz aufgenommen. Die Targetliste beinhaltete lediglich die Masse des zu fragmentierenden Moleküls. Die Retentionszeitfenster für die Fragmentierung erstreckten sich von 8 bis 20 min.

2.2.16. Generelles zur Auswertung mit MassMap

Der erste Schritt bestand in der Konvertierung der Rohdaten-Files (Xcalibur: raw-Files, Analyst: .wiff-Files) in mzXML-Files. Für die Konversion wurde die „MS convert“-Option der *open source*-Software Proteowizard [84] verwendet. Für die Konversion wurden die folgenden Einstellungen verwendet: Ausgabe-Format: mzXML, binary encoding precision: 32-bit, Aktivieren der Checkbox „write index“ sowie „tpp compatibility“, Filter: MS level=1. Die resultierenden mzXML-Files wurden in so genannte mmp-Files (MassMap- Fileformat) mit Hilfe des Filekonvertierungs-Moduls der Software konvertiert. Im Fall von mit Direktinfusionsmessungen erzeugten Datensätzen wurden nach der Konvertierung in mmp-Files mit Hilfe der Schaltfläche „Erzeugung LC/MS-File mit Massenspektrum“ so genannte „dummy-mmp“-Files erzeugt, die in ihrer Struktur Datensätzen aus LC-MS-Experimenten entsprechen. Für Mischexperimente aus Full-MS mit AIF bzw. targeted-MS/MS erfolgte eine Trennung der Full-MS-Scans von den Fragmentierungsscans mit Hilfe der Schaltfläche „Extraktion von Full-Scans aus mmp-Files“.

Anschließend wurde für Datensätze eine so genannte pepmap-Auswertung mit einer zuvor erstellten Liste von Molekülen (lis-File) durchgeführt. Es handelte sich dabei um eine

halbautomatische Auswertung, d.h. im Fall von Signalen, die nicht automatisch verifiziert werden konnten, erfolgte eine Bewertung durch den Benutzer. Für die Quantifizierung wurden sowohl bei Full-MS- als auch bei Fragmentierungsscans ausschließlich die ersten beiden Isotopenpeaks verwendet. AIF-Scans wurden bezüglich der Auswertung wie Full-MS-Scans behandelt. Bei der Auswertung von gemischten Full-MS/targeted-MS/MS-Scans wurden zunächst die Full-MS-Scans ausgewertet. In einem nächsten Schritt wurde mit dem MassMap-Modul „Fragmentierungs-Analyse“ nach zu intakten Molekülen gehörigen Fragmentensignalen gesucht. Die Zuordnung von Fragmenten zu Mutterionen erfolgte aufgrund des Kriteriums der Koelution von Mutterionen-Signalen und Fragmentensignalen. Nach der Identifizierung der Fragmentensignalen bestand die Möglichkeit, mit dem im nächsten Absatz beschriebenen Verfahren eine Regioisomer-Analyse durchzuführen.

2.2.17. Regioisomer-Analyse mit MassMap

Der erste Schritt in der Datenkonvolution besteht in der Auswahl eines Retentionszeitfensters, das die zu berücksichtigenden Datenpunkte enthält (Fit-Intervall) und die Auswahl einer minimalen relativen Intensität der [FS]⁻SICs (Quotienten-Limit). Die relativen Intensitäten beziehen sich auf die Maximalintensitäten der entsprechenden Peaks. Das Quotienten-Limit wird für die Erstellung eines Quotienten-Chromatogramms verwendet (Definition siehe unten). Es werden hierbei lediglich diejenigen Datenpunkte berücksichtigt, die sich oberhalb des Quotienten-Limits der beiden [FS]⁻SICs befinden.

Das Vorgehen basiert auf folgenden Informationen der Datensätze:

- Datenpunkte (t_i^P, y_i^P) mit $i = 1, 2, \dots, N_P$. Die Nummern t_i^P und y_i^P stehen für die Zeitwerte und die Intensitätswerte der N_P Datenpunkte des SIC-Chromatogramms des Lipid-Precursor-Ions im Fitintervall.
- Datenpunkte (t_i^{F1}, y_i^{F1}) mit $i = 1, 2, \dots, N_{F1}$ und (t_i^{F2}, y_i^{F2}) mit $i = 1, 2, \dots, N_{F2}$. Die Auswahl der Zahlen t_i^{F1} , y_i^{F1} , t_i^{F2} and y_i^{F2} erfolgt in gleicher Weise wie es im vorherigen Absatz für die Sics der Precursor-Ionen beschrieben ist. Mit F1 und F2 werden die Fragmentionen der Fettsäure 1 bzw. 2 bezeichnet.
- Datenpunkte (t_i^Q, q_i) mit $i = 1, 2, \dots, N_Q$. Die Zahlen t_i^Q stehen für die Zeitwerte der Datenpunkte der Fettsäure-SICs. Die Zahlen q_i werden als $q_i = y_i^{F1} / y_i^{F2}$ berechnet.

Bei den Basis-Funktionen $f_1(t)$ and $f_2(t)$, die an die chromatographischen Peaks gefittet werden, handelt es sich um modifizierte Gaußsche Glockenkurven, deren Form durch folgende Parameter festgelegt wird:

$$\text{Formel 1} \quad f_i(t) = \exp\left(-\left[\frac{|t - t_{\max,i}|}{w_{\text{eff}}}\right]^{e_{\text{eff}}}\right) \text{ mit } i = 1, 2$$

$$\text{Formel 2} \quad \text{a) } w_{\text{eff}} = \frac{h_{a,i} \cdot w_a + h_{b,i} \cdot w_b}{h_{a,i} + h_{b,i}}$$

$$\text{b) } e_{\text{eff}} = \frac{h_{a,i} \cdot e_a + h_{b,i} \cdot e_b}{h_{a,i} + h_{b,i}}$$

$$\text{Formel 3} \quad \text{a) } h_{a,i} = \frac{1}{1 + \exp\left(2 \cdot \frac{(t - t_{\max,i})}{w_a}\right)}$$

$$\text{b) } h_{b,i} = \frac{1}{1 + \exp\left(2 \cdot \frac{(t_{\max,i} - t)}{w_b}\right)}$$

Die Parameter $t_{\max,1}$ und $t_{\max,2}$ bezeichnen die Lage der Maxima der Peaks des Regioisomers 1 bzw. des Regioisomers 2. Beide Basis-Funktionen nehmen für $t = t_{\max,1}$ bzw. $t_{\max,2}$ ihren Maximalwert 1 an.

Aufgrund der Annahme, dass die Regioisomere abgesehen von einer leichten chromatographischen Trennung das gleiche chromatographische Verhalten zeigen, besitzen die Basis-Funktionen die gleiche Form. Die Peakform wird durch die Parameter w_a and w_b definiert, die die Peakbreite des linken bzw. des rechten Teils des Peaks festlegen. Im Fall von identischen Werten für w_a and w_b gilt ein konstanter Wert für die Peakbreite. Anderenfalls zeigt der effektive Peakbreiten-Parameter w_{eff} einen Verlauf von w_a bis w_b , wobei w_{eff} gegen den ersten Wert für t -Werte strebt, die deutlich unterhalb von $t_{\max,i}$ liegen, während w_{eff} gegen den zweiten Wert für t -Werte strebt, die deutlich oberhalb von $t_{\max,i}$ liegen. Die Änderung von w_a bis w_b wird mit Hilfe der Gewichtungsfunktionen $h_{a,i}$ and $h_{b,i}$ bewerkstelligt. Die Funktionen $h_{a,i}$ variieren von 1 bis 0 für t -Werte deutlich unterhalb von $t_{\max,i}$ hin zu Werten deutlich über $t_{\max,i}$. Das gleiche Vorgehen wird auch bei der Veränderung des effektiven Exponenten e_{eff} verwendet, der sich von Werten e_a im linken Teil des Peaks zu Werten e_b am rechten Teil des Peaks bewegt. Wenn zusätzlich zu identischen Werten für w_a and w_b die Parameter e_a und e_b einen Wert von 2 betragen, handelt es sich bei den Basis-Funktionen um Gaußkurven. Durch die Wahl von unterschiedlichen Werten für w_a und w_b sowie für e_a und e_b ermöglicht die Methode die Simulation einer Vielzahl von mehr oder weniger asymmetrischen glockenförmigen Kurven.

Bei der *least square fitting*-Methode, die in der MassMap[®]-Routine verwendet wird, handelt es sich um den sogenannten *steepest descent*-Typ. Zusätzlich zur Bestimmung der Peakform-Parameter w_a , w_b , e_a und e_b wird es angewendet, um die Lagen $t_{\max,1}$ and $t_{\max,2}$ der Peakzentren der beiden Peaks sowie die Koeffizienten $c_{P,1}$, $c_{P,2}$, $c_{F1,1}$, $c_{F1,2}$, $c_{F2,1}$ and $c_{F2,2}$ zu bestimmen. Zusammen mit den Funktionen $f_1(t)$ and $f_2(t)$ bestimmen die Koeffizienten die gefitteten Intensitätswerte:

Formel 4

$$\begin{aligned} \text{a) } y_{i,\text{Fit}}^P &= c_{P,1} \cdot f_1(t_i^P) + c_{P,2} \cdot f_2(t_i^P) \text{ mit } i = 1, 2, \dots, N_P \\ \text{b) } y_{i,\text{Fit}}^{F1} &= c_{F1,1} \cdot f_1(t_i^{F1}) + c_{F1,2} \cdot f_2(t_i^{F1}) \text{ mit } i = 1, 2, \dots, N_{F1} \\ \text{c) } y_{i,\text{Fit}}^{F2} &= c_{F2,1} \cdot f_1(t_i^{F2}) + c_{F2,2} \cdot f_2(t_i^{F2}) \text{ mit } i = 1, 2, \dots, N_{F2}. \end{aligned}$$

Die folgende Summe von quadrierten Residuen wird minimiert, um einen simultanen Fit der drei chromatographischen Peaks (SIC-Peak des Precursor-Ions und der [FS]-SIC-Peaks) und der Quotientenwerte zu ermöglichen:

Formel 5

$$\text{ChiSquare} := \sum_{i=1}^{N_P} \left(\frac{y_{i,\text{Fit}}^P - y_i^P}{\max(y^P)} \right)^2 + \sum_{i=1}^{N_{F1}} \left(\frac{y_{i,\text{Fit}}^{F1} - y_i^{F1}}{\max(y^{F1})} \right)^2 + \sum_{i=1}^{N_{F2}} \left(\frac{y_{i,\text{Fit}}^{F2} - y_i^{F2}}{\max(y^{F2})} \right)^2 + 3 \cdot \sum_{i=1}^{N_Q} \left(\frac{y_{i,\text{Fit}}^{F1}}{y_{i,\text{Fit}}^{F2}} - q_i \right)^2$$

$\max(y^X) := \text{Maxima der Werte } y_1^X, y_2^X, \dots, y_{N_X}^X \text{ (X = P, F1, F2)}$

Das Dividieren mit den Werten $\max(y^X)$ wird durchgeführt, um ähnliche Beiträge der drei gefitteten Peaks zu gewährleisten. Bei der Multiplikation mit der letzten Summe der *least square fitting*-Residuen mit „3“ handelt es sich um eine empirische Festlegung. Die Anwendung des Faktors führte zu einer Verbesserung der Verlässlichkeit der erhaltenen Fitkoeffizienten.

Im Fall von bekannten Ionisierungsausbeuten für die beiden Fettsäurefragmente des früher eluierenden Regioisomers wird der Fit auf einen der beiden Koeffizienten, $c_{F1,1}$ oder $c_{F2,1}$, beschränkt, wobei der jeweils andere Koeffizient aus dem bekannten Wert des Quotienten mit $Q_1 = c_{F1,1} / c_{F2,1}$ berechnet wird. Im Fall von bekannten Ionisierungsausbeuten für die beiden Fettsäurefragmente des später eluierenden Regioisomers kann der bekannte Wert des Quotienten mit $Q_2 = c_{F1,2} / c_{F2,2}$ in gleicher Weise verwendet werden für die Bestimmung der Koeffizienten $c_{F1,2}$ and $c_{F2,2}$. Anderenfalls können die gefitteten Koeffizienten dafür genutzt werden, um die Quotientenwerte Q_1 und Q_2 experimentell zu bestimmen.

3. Untersuchung genereller Aspekte der Lipidanalytik

Wie in der Einleitung bereits behandelt, kann mit Hilfe von ESI eine Vielzahl von Molekülen unterschiedlicher Stoffklassen mit hoher Sensitivität detektiert werden. Dafür ist in den meisten Fällen keine Derivatisierung der Analytmoleküle notwendig ([34], [85]). Die gemessene Ionenintensität hängt im Wesentlichen von der Analyt-Konzentration in der Spray-Lösung ab [30]. Die Quantifizierung mit ESI ist mittlerweile etabliert. Der dynamische Bereich umfasst üblicherweise mindestens zwei Größenordnungen ([86], [31], [87]). Die wesentliche Bedingung für eine einfache Quantifizierung ist die Notwendigkeit des Vorliegens einer direkten Proportionalität zwischen gemessener Intensität und Analyt-Konzentration. Die Erfüllung dieser Bedingung muss vor der Quantifizierung getestet werden.

Bei der ESI-Ionisierung von Lipiden spielen u.a. die Gesamtlipidkonzentration sowie das verwendete Lösungsmittel und die Polarität der Kopfgruppe eine wesentliche Rolle ([88], [87]). Zusätzlich hängt die Ionisierungseffizienz von der Kettenlänge der FS-Acylreste ab [87]. Generell sollte möglichst eine Beeinflussung der Ionisierung zwischen Analytmolekülen durch koionisierende Substanzen vermieden werden. Bei diesen koionisierenden Substanzen kann es sich z.B. um andere Lipidmoleküle in einer komplexer Mischung handeln oder um Schwermetall-Ionen und Moleküle aus der Matrix. Der Zweck der im Folgenden gezeigten Experimente bestand in der Untersuchung verschiedener grundlegender Parameter für die Lipidanalytik mit ESI-MS. Es wurden u.a. verschiedene gängige Methoden der Direktinfusion im Negativ-Ionisierungsmodus getestet (Chip-basierte Direktinfusion, Spritzenpumpe und UPLC), die sich deutlich in den verwendeten Flussraten unterscheiden. Eine Fragestellung hier war, ob die Flussraten zu einer Beeinflussung der Ionisierung führen. Untersucht wurden sowohl relativ komplexe Lipidmischungen als auch einfache Zwei-Komponenten-Mischungen. Diese Messungen ermöglichten es, Informationen über die intermolekulare Beeinflussung der Ionisierung zwischen Lipidmolekülen zu erhalten. Die für die Messungen gewählten Lipidkonzentrationen entsprachen dem üblicherweise bei der Messung von biologischen Proben vorliegenden Konzentrationsbereich (1 nM bis 10 μ M). In diesem Kapitel sind auch die Ergebnisse der Untersuchung der Extraktionseffizienz verschiedener Standard-Lipid-Extraktionsmethoden für bakterielle Lipide (Näheres in Kapitel 3.6.) und die Ergebnisse von Untersuchungen zu Nicht-Lipid-Kontaminanten bei LC-MS-Messungen gezeigt.

3.1. Direktinfusionsexperimente mit Chip-basierter Probeninfusion

Bei Lipidomics-Untersuchungen wird häufig Nano-ESI verwendet. Chip-basierte Probeninfusionsmessungen werden üblicherweise in den Fällen angewandt, in denen die Probenmenge bzw. das Probenvolumen begrenzt sind. Die Ionisierung erfolgt hierbei automatisiert mit Hilfe eines Pipettier-/Ionisierungsroboters. Die Flussrate beträgt hierbei 60 bis 250 nL/min. Bei den unten gezeigten Experimenten wurde die Ionisierung von Lipiden der drei Hauptklassen in Bakterien, PE, PG und CL, untersucht. Dafür wurden äquimolare Mischungen mit folgenden Konzentrationen pro Lipidklasse im Negativmodus analysiert: 1, 2, 4, 8, 17 und 33 μM . Bei den oberen Konzentrationen handelte es sich um relativ hohe Konzentrationen für Lipidomics-Messungen. Alle Lipide wurden in 0,5% Triethylamin in MeOH gelöst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 gezeigt. Für jede Klassen sind jeweils zwei Spezies gezeigt. Es wurden hierfür Spezies mit deutlich unterschiedlichen Speziesanteilen in der Mischung ausgewählt.

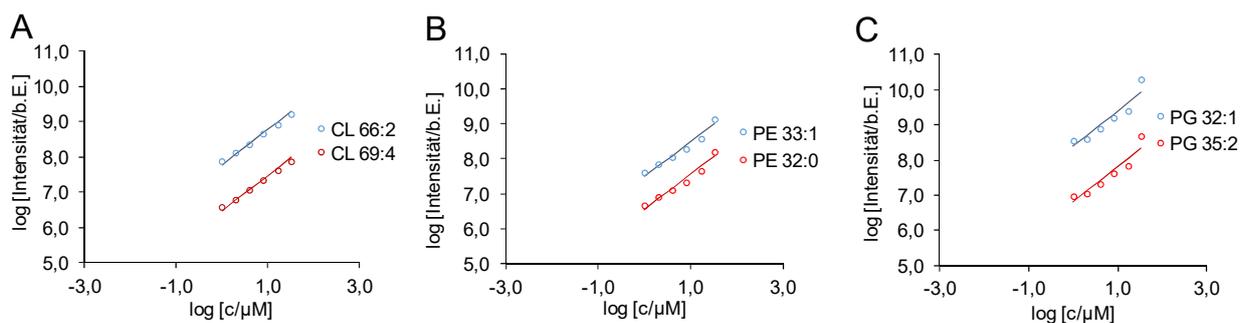


Abbildung 7

Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Lipiden der Klassen CL, PE und PG sind in A, B und C gezeigt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration pro Klasse. Die Lipidkonzentrationen waren 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 17 μM und 33 μM . Für jede Klasse sind exemplarisch zwei Spezies mit deutlich unterschiedlichen Speziesanteilen in der Mischung gezeigt. Bei den gezeigten Geraden handelt es sich um Geraden mit der Steigung 1, die so an die Datenpunkte angepasst wurden, dass die Summe der Fehlerquadrate minimiert wurde. Es handelt sich bei den Messungen um Einfachbestimmungen. b.E.: beliebige Intensität.

Für alle Klassen bestand kein eindeutiger Hinweis auf Abweichungen von einer direkten Proportionalität zwischen der Intensität und der Konzentration. Geraden mit einer Steigung von 1 sind demnach als Trendlinien geeignet. Bei Lipiden der Klasse PG schien der Messpunkt bei der höchsten Konzentration herauszufallen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die gemessenen Zusammenhänge leicht gekrümmt sein könnten. Die zugehörigen Speziesprofile sind in Abbildung 8 gezeigt. Alle Klassen zeigten sehr konstante Speziesprofile ohne Konzentrationsabhängigkeit.

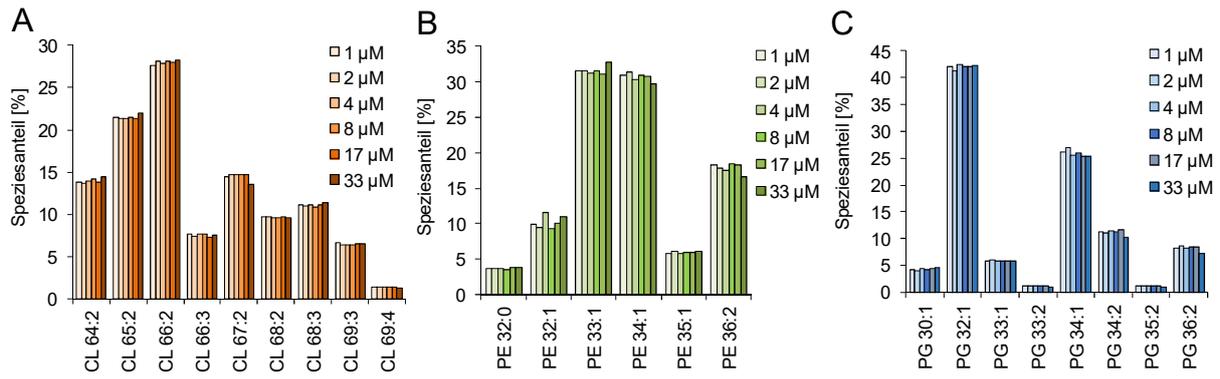


Abbildung 8

Speziesverteilungen von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen von kommerziell erhältlichen *E. coli*-Lipidmischungen. Untersucht wurden Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Speziesverteilungen für Lipide der Klassen CL, PE bzw. PG für den in Abbildung 7 gezeigten Konzentrationsbereich dargestellt.

In Abbildung 9 sind die Abweichungen der Speziesanteile von den mittleren Speziesanteilen gezeigt. Es war kein Zusammenhang zwischen der Streuung der Werte und den mittleren Anteilen erkennbar. Ebenso waren keine Ausreißer, d.h. Werte außerhalb des mit der doppelten Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls (graue Linie in Diagrammen) zu erkennen. Die Speziesanteile waren mit einem Fehler von weniger als ca. 0,5% bestimmbar.

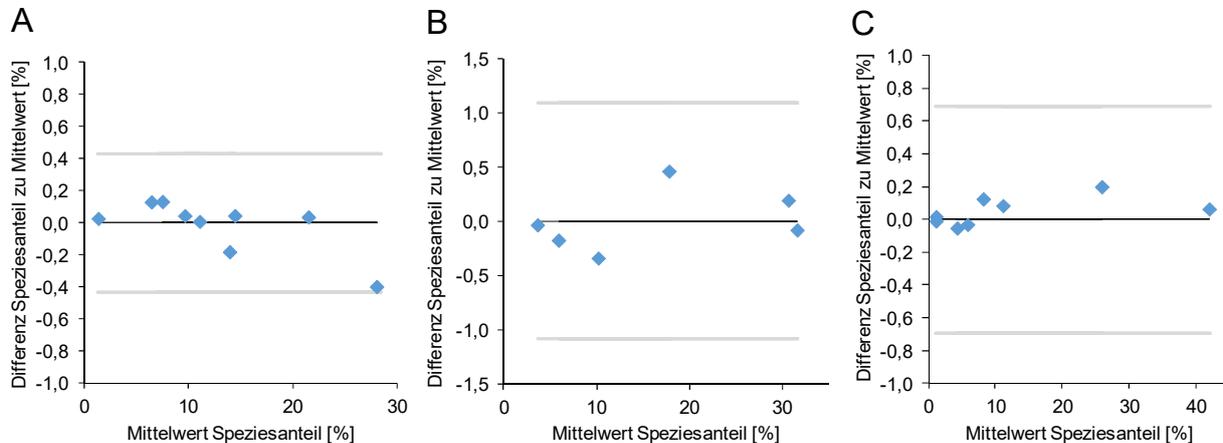


Abbildung 9

Differenzen der einzelnen Speziesanteile und der mittleren Speziesanteile von Abbildung 8 als Funktion des Mittelwerts des Speziesanteils (blaue Rauten). Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Differenzen für CL, PE und PG gezeigt. Die grauen horizontalen Linien geben die Grenzen des für die doppelte Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls an. Die Standardabweichung wurde für jede Klasse getrennt unter Verwendung aller Messpunkte berechnet.

Bei den untersuchten Konzentrationen, gerade im oberen Bereich, handelte es sich um deutlich höhere Konzentrationen als normalerweise vorliegend bei Lipidom-Untersuchungen.

Deshalb war eine Erweiterung des Konzentrationsbereichs besonders hin zu niedrigeren Konzentrationen notwendig. Ein weiterer Aspekt ist, dass bei Chip-basierten Direktinfusionsmessungen aufgrund der Flüchtigkeit der organischen Lösungsmittel, in denen die Lipide gelöst sind, häufig die Gefahr von Nozzle-zu-Nozzle-Kontaminationen besteht. Da später in der Arbeit der Fokus auf LC-MS-Analysen liegt, sollte im Folgenden auch getestet werden, wie sich die Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge bei höheren Flussraten (10-100 $\mu\text{L}/\text{min}$) verhalten. Im nächsten Kapitel wurden deshalb die Chip-basierten Direktinfusionsmessungen mit der Spritzenpumpe wiederholt.

3.2. Direktinfusionsexperimente mit Spritzenpumpe

Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.1. gezeigten Chip-basierten Direktinfusionsexperimenten betrug die Flussrate bei der Spritzenpumpe 15 $\mu\text{L}/\text{min}$. Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge der Experimente sind in Abbildung 10 gezeigt. Die gemessenen Intensitäten der ausgewählten Spezies lagen für alle Klassen in der gleichen Größenordnung wie bei den Chip-basierten Direktinfusionsmessungen. Bei Lipiden der Klasse PE wurde der Messpunkt für die höchste Konzentration aus den Anpassungen herausgenommen, da er als Ausreißer deklariert wurde. In allen Diagrammen sind sowohl eine Gerade mit Steigung 1 als auch ein Polynom 2. Grades eingezeichnet.

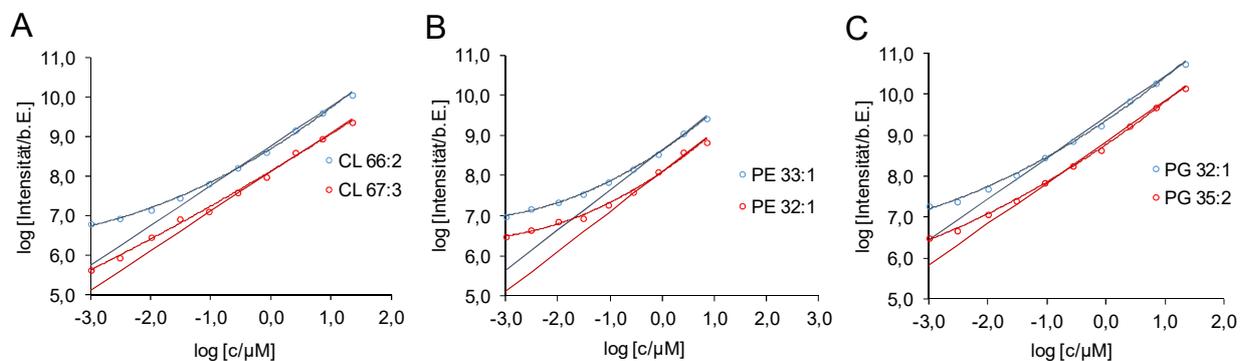


Abbildung 10

Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Direktinfusionsmessungen mit der Spritzenpumpe von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell Lipidmischungen von Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Lipiden der Klassen CL, PE und PG sind in A, B und C gezeigt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration pro Klasse. Die Lipidkonzentrationen waren 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 91 nM, 274 nM, 823 nM, 2,4 μM , 7 μM und 22 μM . Für jede Klasse sind exemplarisch zwei Spezies mit deutlich unterschiedlichem Speziesanteil in der Mischung gezeigt. Bei den gezeigten Geraden handelt es sich um Geraden mit der Steigung 1, die so an die Datenpunkte angepasst wurden, dass die Summe der Fehlerquadrate minimiert wurde. Bei den polynomischen Kurven handelt es sich um Excel-Trendlinien in Form eines Polynoms 2. Grades.

Es sind deshalb Geraden und Polynomen in den Diagrammen dargestellt, da bei allen Klassen zwei Bereiche zu beobachten waren. Im unteren Konzentrationsbereich, d.h. unterhalb von $0,1 \mu\text{M}$, handelte es sich um einen Bereich mit deutlich nicht direkt proportionalem Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhang. Im Gegensatz dazu gab es beim Konzentrationsbereich oberhalb von $0,1 \mu\text{M}$ keine Hinweise für eine wesentliche Abweichung von direkter Proportionalität. Demnach wäre in diesem Konzentrationsbereich eine Quantifizierung möglich. In Abbildung 11 sind die zugehörigen Speziesverteilungen für denjenigen Konzentrationsbereich mit direkter Proportionalität aus Abbildung 10 gezeigt. Ebenso wie bei den Chip-basierten Direktinfusionsmessungen zeigten auch die Spritzenpumpen-Ergebnisse sehr konstante Speziesprofile ohne Konzentrationsabhängigkeit. Der Konzentrationsbereich, für den die Klassen-Speziesprofile gezeigt sind, entsprach im Wesentlichen dem der Chip-basierten Direktinfusionsmessung.

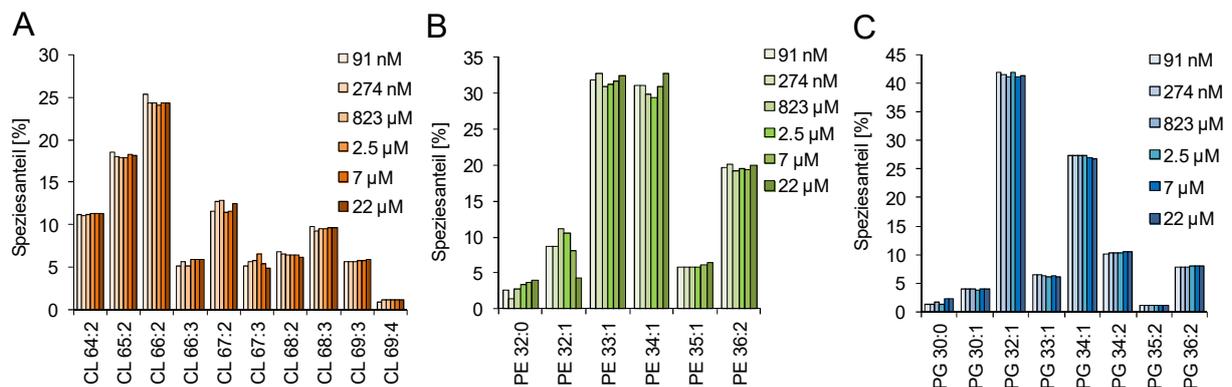


Abbildung 11

Speziesverteilungen von Spritzenpumpen-Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Verteilungen für Lipidspezies der Klassen CL, PE bzw. PG gezeigt für den Konzentrationsbereich, bei dem in Abbildung 10 eine direkte Proportionalität gefunden wurde.

In Abbildung 12 sind die zu den in Abbildung 11 gezeigten Speziesverteilungen gehörigen Differenzen der Speziesanteile der mittleren Speziesverteilungen gezeigt. Die Abweichungen lagen bis auf einen Wert für die Lipide der Klasse CL im Rahmen der doppelten Standardabweichung.

Eine weitere Möglichkeit der Direktinfusionsmessung ist die Verwendung einer HPLC/UPLC-Anlage. Dies bietet ähnlich wie die Chip-basierte Messung die Möglichkeit der automatisierten Probeninjektion. Deswegen wurden die Chip-basierten Messungen und die mit der Spritzenpumpe durchgeführten Experimente noch einmal mit der UPLC wiederholt. Die Ergebnisse sind im nachfolgenden Kapitel im Detail behandelt.

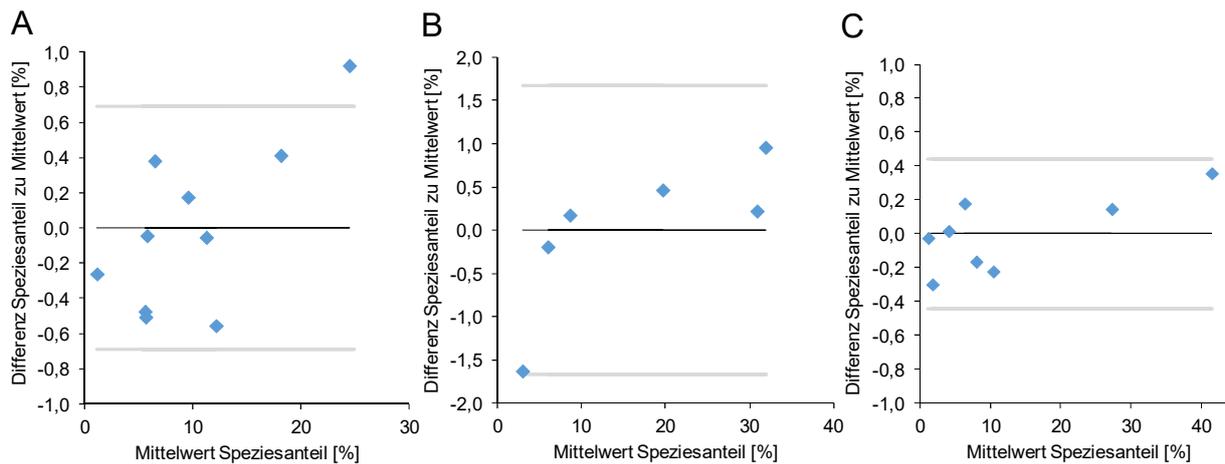


Abbildung 12

Differenzen der einzelnen Speziesanteile und der mittleren Lipidspeziesanteile von Abbildung 11 als Funktion des Speziesanteil-Mittelwerts (blaue Rauten). Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Differenzen für die Lipidspezies der Klassen CL, PE und PG gezeigt. Die grauen horizontalen Linien geben die Grenzen des für die doppelte Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls an. Die Standardabweichung wurde für jede Klasse getrennt unter Verwendung aller Messpunkte berechnet.

3.3. Direktinfusionsexperimente mit UPLC

Im Vergleich zu den im vorherigen Kapitel gezeigten Messungen mit der Spritzenpumpe wurde der Konzentrationsbereich auf Konzentrationen unter 1 nM ausgedehnt. Gleichzeitig umfasste der verwendete Konzentrationsbereich nur Konzentrationen bis 300 nM. Die Flussrate betrug 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, also ca. das Zehnfache der Flussrate der Spritzenpumpe. Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge der UPLC-Messungen sind in Abbildung 13 gezeigt. Auf den ersten Blick war auffällig, dass die Ergebnisse der UPLC-Messungen Unterschiede zu den zuvor gezeigten Ergebnissen aufwiesen. Hinsichtlich der Lösungsmittelzusammensetzung gab es keine Unterschiede zur Chip-basierten Messung und der Spritzenpumpen-Messung. Die Einstellungen der (H)ESI-Quelle entsprachen denen der Spritzenpumpen-Messungen. Die gemessenen UPLC-Intensitäten waren bei einem direkten Vergleich mit den Chip-basierten Messungen und denen mit der Spritzenpumpe um mindestens eine Größenordnung geringer. Es war zusätzlich eine Abweichung der Werte bei sehr niedrigen Konzentrationen zu beobachten, was ein Hinweis auf das Verlassen des dynamischen Bereichs sein könnte. Generell gab es bei Cardiolipin im Bereich von 45 nM bis 300 nM und bei PE und bei PG im Bereich von 3 nM bis 300 nM keine eindeutigen Hinweise auf nicht direkte Proportionalität. Die Schwankungen der Werte waren generell höher als bei den zuvor gezeigten Messungen, was an den vergleichsweise geringen Intensitätswerten gelegen haben könnte.

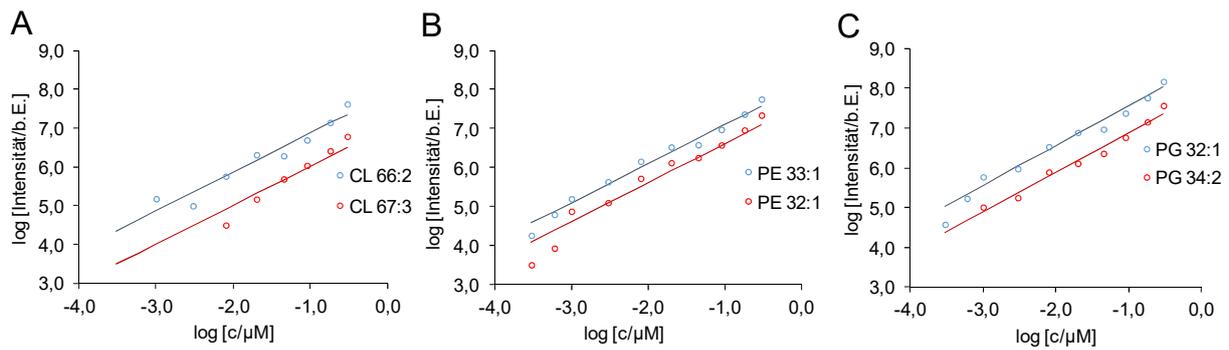


Abbildung 13

Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von UPLC-Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Lipidspezies der Klassen CL, PE und PG sind in A, B und C gezeigt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration pro Klasse. Die Lipidkonzentrationen waren 0,3 nM, 0,6 nM, 1 nM, 3 nM, 8 nM, 20 nM, 45 nM, 90 nM, 180 nM und 300 nM. Für jede Klasse sind exemplarisch zwei Spezies mit deutlich unterschiedlichem Speziesanteil in der Mischung gezeigt. Bei den gezeigten Geraden handelt es sich um Geraden mit der Steigung 1, die so an die Datenpunkte angepasst wurden, dass die Summe der Fehlerquadrate minimiert wurde. b.E.: beliebige Einheit.

Die zugehörigen Speziesprofile für Lipide der drei Klassen sind in Abbildung 14 gezeigt. Die Cardiolipin-Profile waren in einem Konzentrationsbereich von 90 nM bis 300 nM konstant, die Lipidspeziesprofile der Klassen PE und PG von 45 nM bis 300 nM.

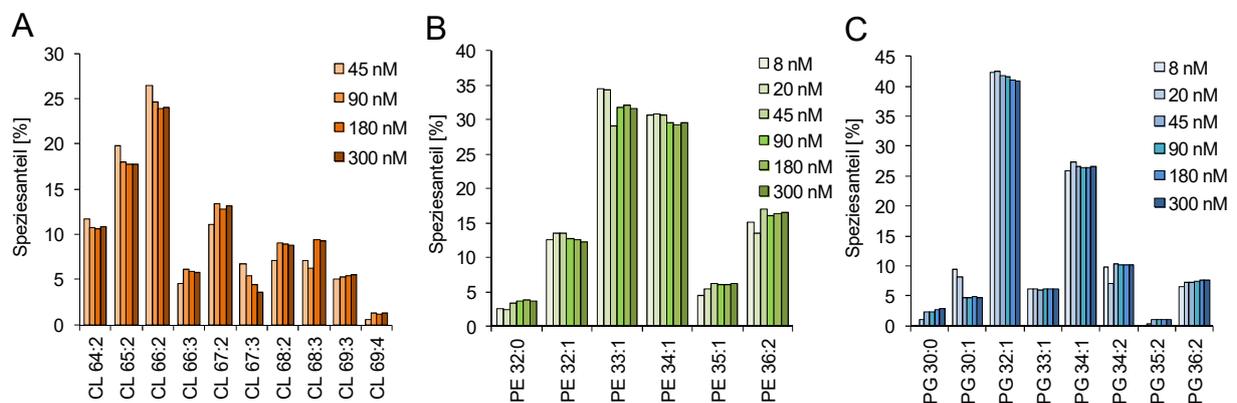


Abbildung 14

Speziesverteilungen von UPLC-Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Verteilungen für Lipidspezies der Klassen CL, PE bzw. PG gezeigt für den oberen Konzentrationsbereich aus Abbildung 13.

Die zugehörigen relativen Abweichungen von den mittleren Speziesverteilungen sind in Abbildung 15 gezeigt. Es war auffällig, dass im Vergleich zur Spritzenpumpe eine deutlich höhere Streuung zu beobachten ist und die Werte für die Standardabweichung ungefähr doppelt so groß waren.

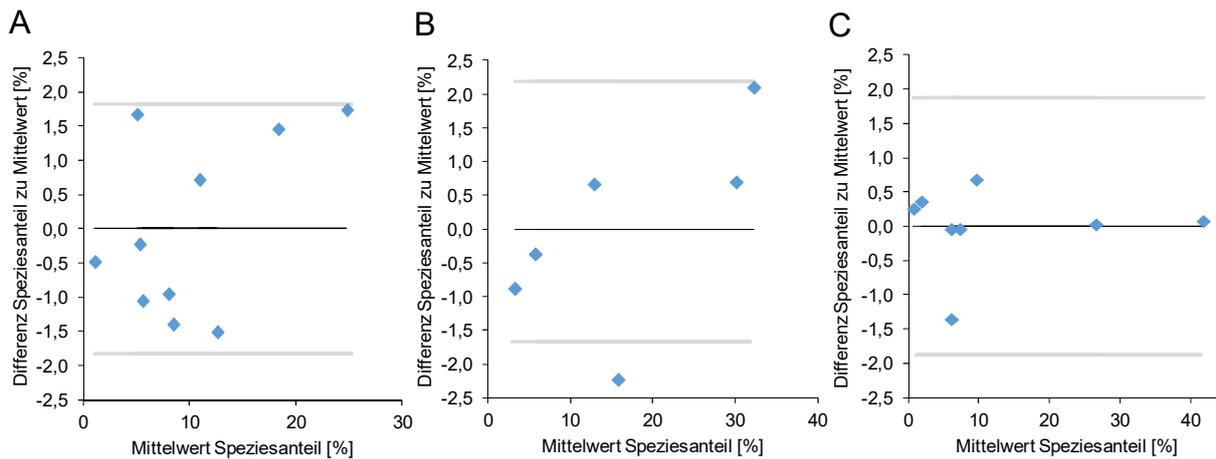


Abbildung 15

Relative Differenzen der Speziesverteilungen für Spezies aus Abbildung 14. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen von Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Gezeigt sind die Differenzen der Speziesanteile zur mittleren Verteilung für Lipidspezies der Klassen CL (A), PE (B) und PG (C). Die Werte für die einzelnen Spezies sind als blaue Rauten im Diagramm gezeigt. Die grauen horizontalen Linien geben die Grenzen des für die doppelte Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls an.

Zusätzlich zur Analyse der Lipide in der TEA-Lösung in MeOH wurden die Experimente auch mit den UPLC-Laufmitteln durchgeführt. Die Lipide wurden hierzu in einer 1:1 Mischung aus Laufmittel A (60% Acetonitril/40% H₂O/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂) und Laufmittel B (90% 2-Propanol/10% Acetonitril/0,1% Ameisensäure/10 mM NH₄HCO₂) gelöst und analysiert. Die HESI-Quelleneinstellungen entsprachen denen der zuvor gezeigten UPLC-Experimente. In Abbildung 16 sind die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge gezeigt. Die Detektierbarkeit der beiden Cardiolipin-Spezies schien durch die Verwendung der UPLC-Laufmittel minimal negativ beeinflusst zu werden.

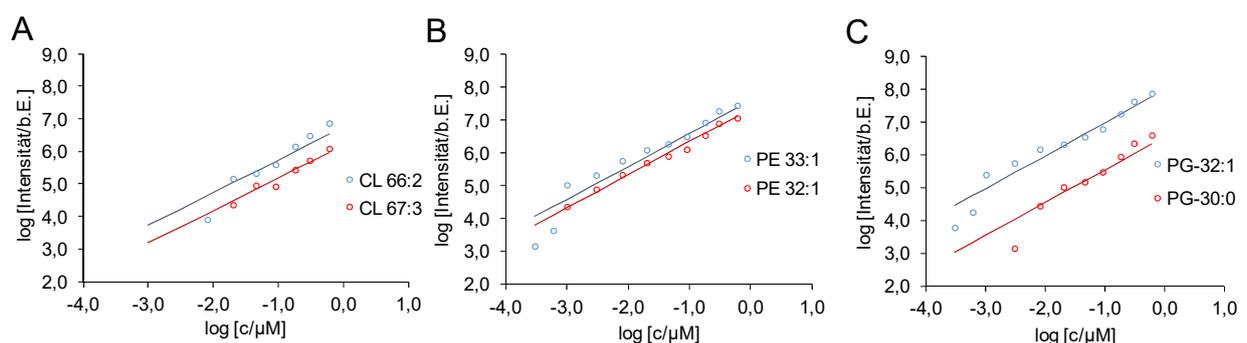


Abbildung 16

Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von UPLC-Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Die logarithmierten Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von Lipidspezies der Klassen CL, PE und PG sind in A, B und C gezeigt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration pro Klasse. Die Lipidkonzentrationen waren 0,3 nM, 0,6 nM, 1 nM, 3 nM, 8 nM, 20 nM, 45 nM, 90 nM, 180 nM, 300 nM und 600 nM. Für jede Klasse sind exemplarisch zwei Spezies mit deutlich unterschiedlichem Speziesanteil in der Mischung gezeigt. Bei den gezeigten Geraden handelt es sich um Geraden mit der Steigung 1, die so an die Datenpunkte angepasst wurden, dass die Summe der Fehlerquadrate minimiert wurde.

Bezüglich der Spezies war auffällig, dass die Intensitäten der beiden PE-Spezies näher beieinander und die der beiden PG-Spezies deutlich weiter auseinander lagen als dies bei der UPLC-Messung mit MeOH zu beobachten war. Die gemessenen Intensitäten lagen klassenübergreifend in der gleichen Größenordnung wie die der zuvor gezeigten UPLC-Messungen. Wie bei den vorherigen UPLC-Messungen mit MeOH/TEA war eine Abweichung der Intensitäten bei sehr niedrigen Konzentrationen (<1 nM) zu beobachten. Über 1 nM lag kein Hinweis gegen eine direkte Proportionalität vor.

In Abbildung 17 sind die zu Abbildung 16 gehörigen Speziesprofile für den oberen Konzentrationsbereich, d.h. von 20 nM bis 600 nM für PE und PG bzw. 45 nM bis 600 nM für CL, gezeigt. Die Streuung der CL-Werte in Abbildung 16 war auch beim Speziesprofil zu erkennen. Die Schwankungen betragen bei manchen Spezies über 5%. Es lagen allerdings keine Hinweise dafür vor, dass eine Quantifizierung nicht möglich wäre. Die Speziesprofile von Lipiden der Klassen PE und PG waren in dem gezeigten Konzentrationsbereich konstant.

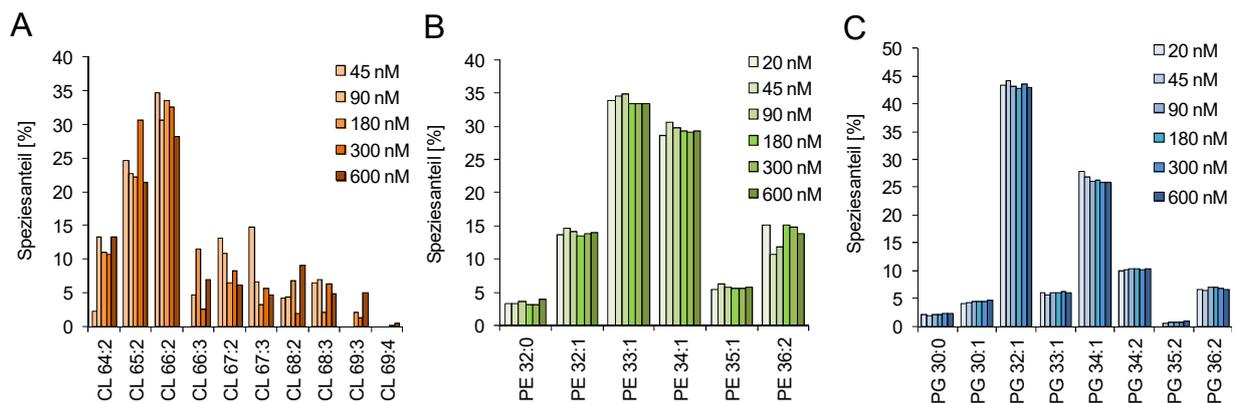


Abbildung 17

Speziesverteilungen von *E. coli*-Lipidmischungen von UPLC-Direktinfusionsmessungen. Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen von Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Gezeigt sind die Verteilungen für Lipidspezies der Klassen CL (A), PE (B) und PG (C) für die in der Legende angegebenen Konzentrationen pro Klasse.

In Abbildung 18 sind die zu Abbildung 17 gehörigen Differenzen der Speziesanteile und der mittleren Speziesanteile gezeigt. Für Lipidspezies der Klassen PE und PG entsprachen die Standardabweichungen denen der Ergebnisse mit MeOH/TEA. Aufgrund der großen Schwankungen der Speziesanteile bei der Klasse CL lag die doppelte Standardabweichung bei über 4%.

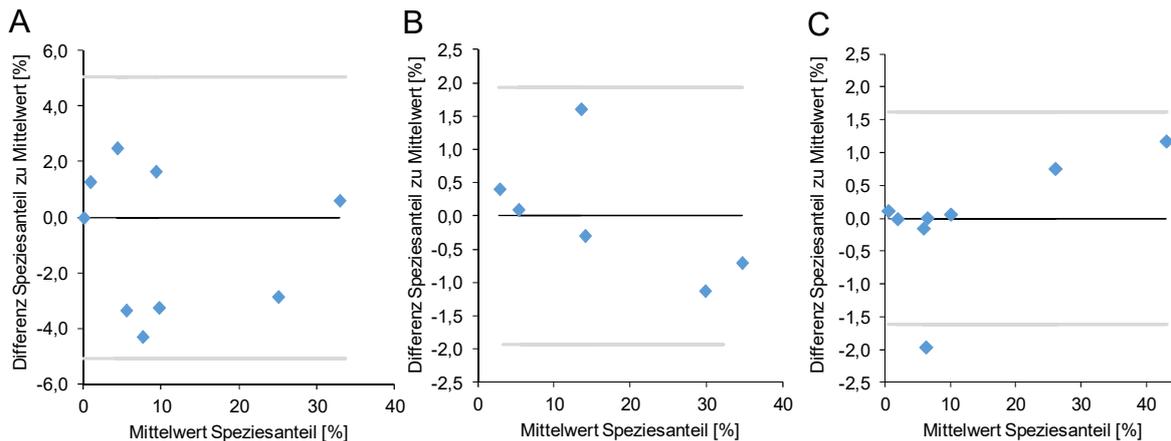


Abbildung 18

Differenzen der einzelnen Speziesanteile und der mittleren Lipidspeziesanteile aus Abbildung 17 als Funktion des Speziesanteil-Mittelwerts (blaue Rauten). Untersucht wurden kommerziell erhältliche Lipidmischungen der Klassen Cardiolipin (CL), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). In A, B und C sind die Differenzen für Lipidspezies der Klassen CL, PE und PG gezeigt. Die grauen horizontalen Linien geben die Grenzen des für die doppelte Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls an. Die Standardabweichung wurde für jede Klasse getrennt unter Verwendung aller Messpunkte berechnet.

Da es sich bei den bisher verwendeten äquimolaren Mischungen aus Lipiden der Klassen PE, PG und CL um relativ komplexe Mischungen handelte, wurde zusätzlich eine Direktinfusions-Messung nur mit der PE-Mischung mit den gleichen UPLC-Messbedingungen wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 gezeigt.

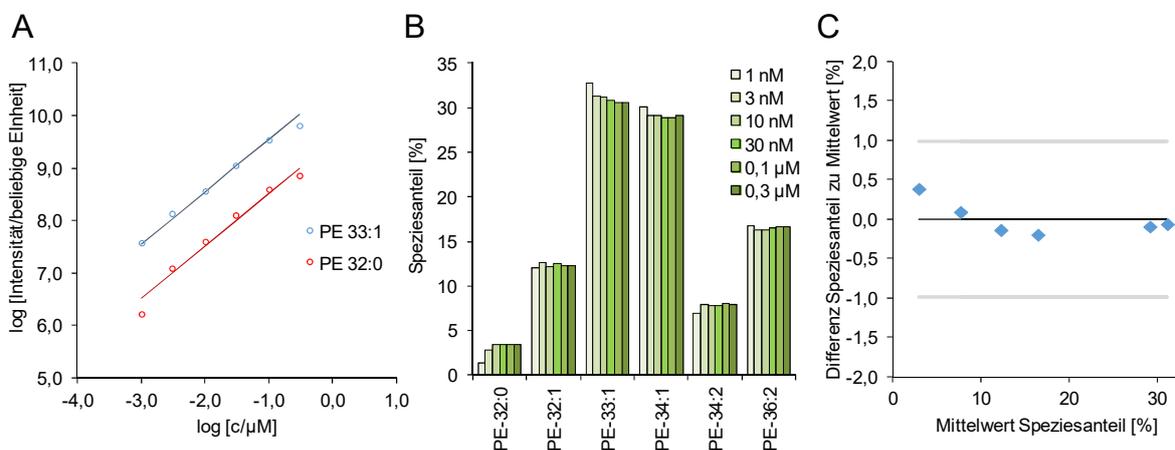


Abbildung 19

Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge von UPLC-Direktinfusionsmessungen von kommerziell erhältlichen *E. coli*-PEs. Die logarithmierten Intensitäts-/Konzentrations-Zusammenhänge von zwei exemplarisch ausgewählten PE-Spezies mit deutlich unterschiedlichem Speziesanteil in der Mischung sind in A gezeigt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um die Konzentration pro Klasse. Die Lipidkonzentrationen waren 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM. Bei den gezeigten Geraden handelt es sich um Geraden mit der Steigung 1, die so an die Datenpunkte angepasst wurden, dass die Summe der Fehlerquadrate minimiert wurde. Die zu A zugehörigen PE-Speziesverteilungen für die in der Legende angegebenen Konzentrationen sind in B gezeigt. Die Differenzen der einzelnen Speziesanteile und der mittleren Lipidspeziesanteile als Funktion des Speziesanteil-Mittelwerts (blaue Rauten) sind in C gezeigt. Die grauen horizontalen Linien geben die Grenzen des für die doppelte Standardabweichung bestimmten Konfidenzintervalls an. Die Standardabweichung wurde für jede Klasse getrennt unter Verwendung aller Messpunkte berechnet.

Es sind die Intensitäts-Konzentrations-Zusammenhänge (Abbildung 19 A), die PE-Speziesverteilung (Abbildung 19 B) und die Differenzen der einzelnen Speziesanteile und der mittleren Speziesanteile als Funktion des Speziesanteil-Mittelwerts (Abbildung 19 C) gezeigt. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 1 nM bis 300 nM gewählt. Die gemessenen Intensitäten lagen um zwei Größenordnungen über denen der PE-Spezies, die aus einer Mischung von PE, PG und CL gemessen wurden. Dies war vermutlich der Grund dafür, dass eine Abweichung der Intensität bei der Spezies bei PE 32:0 erst beim untersten Konzentrationswert zu beobachten war. Bei den Speziesprofilen (Abbildung 19 B) waren auch nur leichte relative Intensitätsunterschiede bei einer Konzentration von 1 nM feststellbar. Die Differenzen der relativen Intensitäten (Abbildung 19 C) betragen lediglich 0,1% bis 0,4%. Trotz der relativ geringen Lipidkonzentration gab es keinerlei Hinweise dafür, dass eine Quantifizierung nicht möglich ist.

3.4. Untersuchung von Zwei-Komponenten-Mischungen

Bei den in Kapitel 3.1. bis 3.3. gezeigten Mischungen handelte es sich um relativ komplexe Mischungen, d.h. pro Klassen wurden 5 bis 10 Hauptspezies gefunden. Aus diesem Grund wurden in diesem Kapitel einfache Mischungen aus nur zwei PE-Standardmolekülen untersucht. Alle im Folgenden untersuchten Moleküle bestanden aus zwei einfach ungesättigten Fettsäuren. Es wurden Mischungen von zwei Standardpaaren untersucht, PE 28:2/PE 40:2 und PE 40:2/PE 44:2. Die Standardmoleküle wiesen alle den gleichen Sättigungsgrad, aber Unterschiede in der Fettsäure-Kettenlänge auf. Die Mischungen der Standards wurden in den Verhältnissen 1:10 bis 10:1 untersucht. Bei den Messungen handelte es sich um UPLC-Direktinfusionsmessungen, die mit einer 1:1-Mischung aus UPLC-Laufmittel A und UPLC-Laufmittel B durchgeführt wurden. Die Mischungen wurden im Positiv- und im Negativmodus untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen für das erste Standardpaar sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Es ist bekannt, dass die Ionenausbeute von Glycerophospholipiden mit erhöhter Fettsäure-Kettenlänge abnimmt (Koivusalo et al. 2001). Daher wurden die experimentellen Intensitäten für den längerkettigeren Standard in der Mischung, d.h. PE 40:2, mit einem Faktor korrigiert. Dieser wurde aus äquimolaren Messungen der beiden Standards bestimmt. Das experimentelle Verhältnis stimmte für alle Messungen sehr gut mit dem theoretisch erwarteten Verhältnis überein. Bei den Mischungen 3:1 und 10:1 PE 28:2/PE 40:2 lagen die Werte über den erwarteten Verhältnissen. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche intermolekulare Beeinflussung bei der Ionisierung sein.

Tabelle 9

Molare Verhältnisse und absolute Intensitäten für Mischungen aus den zwei PE-Standards PE 28:2 und PE 40:2. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-Direktinfusionsmessungen im Positivmodus (Details siehe Kapitel 2.2.12). Die absoluten Intensitäten von PE 40:2 wurden mit einem Korrekturfaktor von 1,62 multipliziert. Der Korrekturfaktor wurde als Mittelwert aus 16 äquimolaren Mischungen aus PE 28:2/PE 40:2 ermittelt. Die gezeigten Intensitäten sind das Ergebnis von Einzelmessungen.

Molares Verhältnis PE 28:2/PE 40:2	PE 28:2	PE 40:2	Experimentelles Verhältnis
0.10	1.22E+09	1.12E+10	0.109
0.33	3.51E+09	1.13E+10	0.311
1	3.26E+09	2.91E+09	1.12
3	9.41E+09	2.30E+09	4.10
10	9.25E+09	8.30E+08	11.1

Das gleiche Experiment wurde mit Mischungen von PE 40:2 und PE 44:2 wiederholt. Diese beiden Standards weisen eine deutlich ähnlere Fettsäure-Kettenlänge im Vergleich zu PE 28:2 und PE 40:2 auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gezeigt. Auch hier stimmten die experimentellen Werte gut mit den theoretisch erwarteten Verhältnissen überein. Beim Verhältnis 10:1 PE 40:2/44:2 lag das experimentell erhaltene Verhältnis im Vergleich zu PE 28:2/40:2 deutlich unter dem erwarteten Verhältnis. Es könnte sich bei dem Datenpunkt um einen Ausreißer handeln.

Tabelle 10

Molare Verhältnisse und absolute Intensitäten für Mischungen aus den zwei PE-Standards PE 40:2 und PE 44:2. Bei den Messungen handelt es sich um Direktinfusionsmessungen mit der UPLC im Positivmodus (Details siehe Kapitel 2.2.12). Die absoluten Intensitäten von PE 44:2 wurden mit einem Korrekturfaktor von 1,22 multipliziert. Der Korrekturfaktor wurde als Mittelwert aus 16 äquimolaren Mischungen aus PE 40:2/PE 44:2 ermittelt. Die gezeigten Intensitäten sind das Ergebnis von Einzelmessungen.

Molares Verhältnis PE 40:2/PE 44:2	PE 40:2	PE 44:2	Experimentelles Verhältnis
0.10	1.22E+09	1.40E+10	0.0872
0.33	4.18E+09	1.43E+10	0.291
1	4.63E+09	4.64E+09	1.00
3	1.34E+10	3.81E+09	3.51
10	9.95E+09	1.49E+09	6.67

In Abbildung 20 sind die normierten korrigierten Verhältnisse für die beiden Standardpaare im Positivmodus gezeigt. In Abbildung 20 A ist das Paar PE 28:2/PE 40:2, in Abbildung 20 B das Paar PE 40:2/PE 44:2 gezeigt. Die Werte wurden erhalten durch Korrektur der Ionisierungseffizienz-Unterschiede sowie durch Multiplikation der Intensitäten mit einem Faktor für den relativen Anteil in Mischung im Fall von nicht äquimolaren Mischungen. Der Idealwert „1“ ist als rote gestrichelte Linie in den Diagrammen dargestellt.

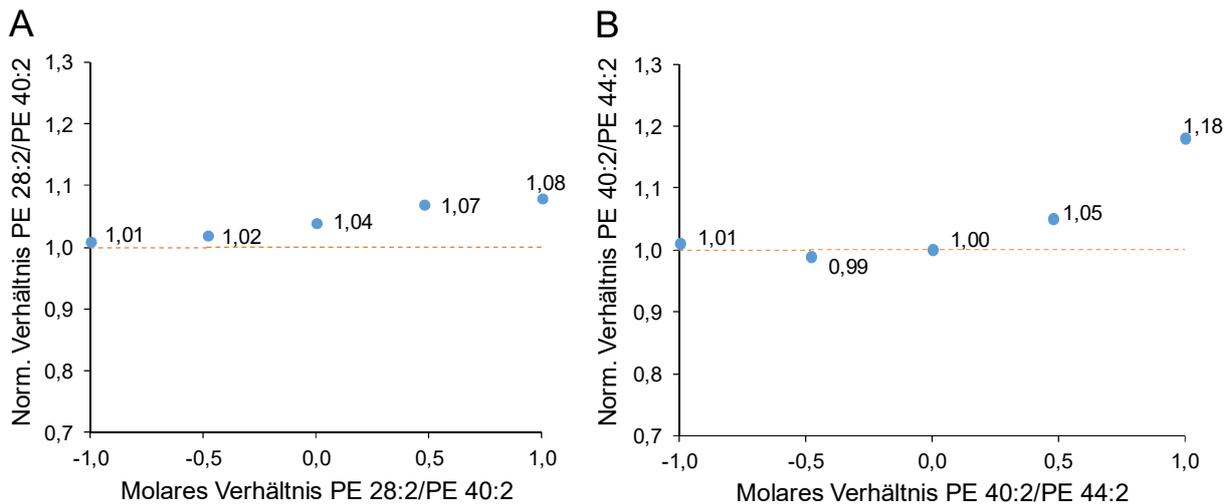


Abbildung 20

Normierte („Norm.“) Verhältnisse für die Standardpaare PE 28:2/PE 40:2 (A) und PE 40:2/PE 44:2 (B) als Funktion der theoretischen molaren Verhältnisse (blaue Punkte). Die Werte sind das Ergebnis von UPLC-Direktinfusionsmessungen im Positivmodus. Die rote gestrichelte horizontale Linie entspricht jeweils dem Wert 1 für das theoretische Verhältnis nach Korrektur von Ionisierungsausbeuten-Unterschieden und dem relativen Anteil in der Mischung. Die normierten Verhältnisse wurden als Quotient aus den Mittelwerten ($n=2$) der experimentell bestimmten Verhältnissen und den theoretische erwarteten Verhältnissen berechnet. Die Werte sind als Datenbeschriftungen in den Diagrammen gezeigt. Norm.: Normiert.

Bei den Mischungen 10:1 waren besonders bei PE 40:2/PE 44:2 Abweichungen größer als 10% zu beobachten. Dabei handelte es sich vermutlich um einen Ausreißer. Bei den restlichen Werten beliefen sich die Differenzen auf einen Wert von unter 10% (maximal $\pm 0,08$). Das heißt, die Verhältnisse entsprachen im Rahmen einer Unsicherheit von 5 bis 10% den theoretisch erwarteten Werten. Die Standardmischungen wurden auch im Negativmodus durchgeführt. Die Ergebnisse für die Mischung aus PE 28:2/PE 40:2 sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die Tendenzen der experimentellen Verhältnisse bei den molaren Verhältnissen 3:1 und 10:1 (PE 28:2/PE 40:2) entsprachen denen der Messungen im Positivmodus.

Tabelle 11

Molare Verhältnisse und absolute Intensitäten für Mischungen aus den zwei PE-Standards PE 28:2 und PE 40:2. Bei den Messungen handelt es sich um Direktinfusionsmessungen mit der UPLC im Negativmodus (Details siehe Kapitel 2.2.12). Die absoluten Intensitäten von PE 40:2 wurden mit einem Korrekturfaktor von 1,83 multipliziert. Der Korrekturfaktor wurde als Mittelwert aus 16 äquimolaren Mischungen aus PE 28:2/PE 48:2 ermittelt. Die gezeigten Intensitäten sind das Ergebnis von Einzelmessungen.

Molares Verhältnis PE 28:2/PE 40:2	PE 28:2	PE 40:2	Experimentelles Verhältnis
0.10	2.97E+08	2.78E+09	0.107
0.33	9.46E+08	3.16E+09	0.300
1	7.66E+08	7.05E+08	1.09
3	2.53E+09	6.50E+08	3.90
10	2.44E+09	2.17E+08	11.2

Die Ergebnisse für die Mischungen von PE 40:2 und PE 44:2 sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die experimentellen Verhältnisse stimmten deutlich besser mit den erwarteten molaren Verhältnissen überein als bei den Messungen im Positivmodus. Es gab keine Hinweise auf eine intermolekulare Beeinflussung der Ionisierung zwischen den beiden Standardmolekülen.

Tabelle 12

Molare Verhältnisse und absolute Intensitäten für Mischungen aus den zwei PE-Standards PE 40:2 und PE 44:2. Bei den Messungen handelt es sich um Direktinfusionsmessungen mit der UPLC im Negativmodus (Details in Kapitel 2.2.12). Die absoluten Intensitäten von PE 44:2 wurden mit einem Korrekturfaktor von 1,22 multipliziert. Der Korrekturfaktor wurde als Mittelwert aus 16 äquimolaren Mischungen aus PE 40:2/PE 44:2 ermittelt. Die gezeigten Intensitäten sind das Ergebnis von Einzelmessungen.

Molares Verhältnis PE 40:2/PE 44:2	PE 40:2	PE 44:2	Experimentelles Verhältnis
0.10	2.91E+08	3.25E+09	0.0895
0.33	9.53E+08	3.20E+09	0.298
1	1.02E+09	1.02E+09	1.00
3	3.02E+09	8.47E+08	3.57
10	2.49E+09	2.34E+08	10.6

In Abbildung 21 sind die normierten korrigierten Verhältnisse für die beiden Standardpaare im Negativmodus gezeigt. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zu den Werten der Positivmodus-Messungen eine geringere Abweichung vom erwarteten Wert.

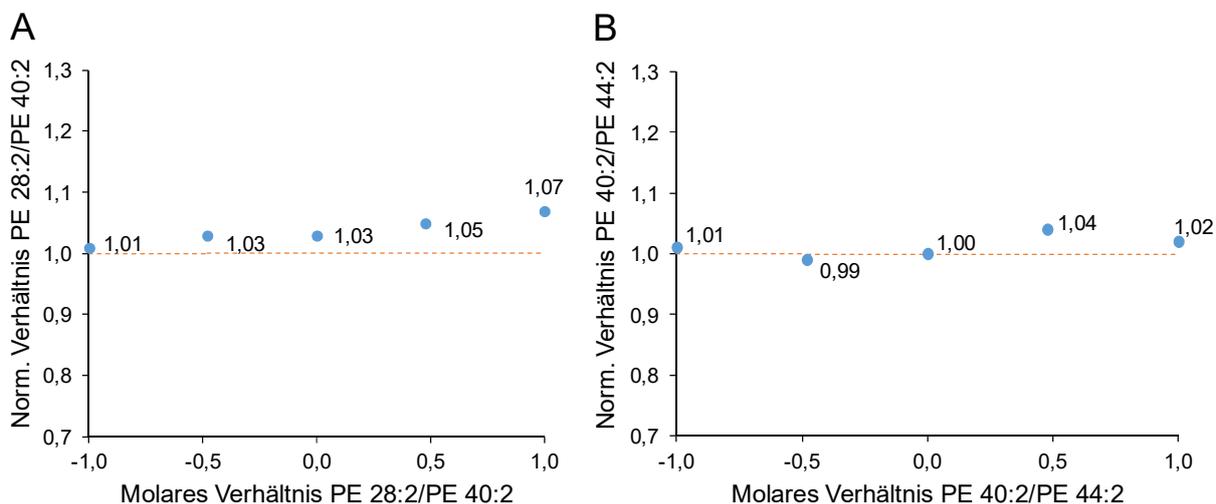


Abbildung 21

Normierte („Norm.“) Verhältnisse für die Standardpaare PE 28:2/PE 40:2 (A) und PE 40:2/PE 44:2 (B) als Funktion der theoretischen molaren Verhältnisse (blaue Punkte). Die Werte sind das Ergebnis von UPLC-Direktinfusionsmessungen im Negativmodus. Die rote gestrichelte horizontale Linie entspricht dem Wert 1 für das theoretische Verhältnis nach Korrektur von Ionisierungseffizienz-Unterschieden und dem relativen Anteil in der Mischung. Die normierten Verhältnisse wurden als Quotient aus den Mittelwerten (n=2) der experimentell bestimmten Verhältnissen und den theoretische erwarteten Verhältnissen berechnet. Die Werte sind als Datenbeschriftungen in den Diagrammen gezeigt.

3.5. Vergleich der Effizienz verschiedener Extraktionsverfahren für bakterielle Lipide

Der Fokus im weiteren Verlauf der Arbeit lag auf der UPLC-Analyse von bakteriellen Lipidomen (*E. coli* und *B. subtilis*). Die Lipidextraktion war dabei ein wesentlicher Teil der Probenvorbereitung. Im Folgenden wurde deshalb die Extraktionseffizienz verschiedener gängiger Extraktionsmethoden getestet. Getestet wurden zwei Extraktionsmethoden mit Chloroform (Folch-Extraktion und SBD-Extraktion) und zwei ohne Chloroform (BUME-Extraktion und MTBE-Extraktion). Insgesamt wurden 5 nmol *E. coli*-Lipide extrahiert. Die Extraktionseffizienzen, die in Tabelle 13 für die getesteten Extraktionsmethoden gezeigt sind, wurden mit Hilfe von vor der Extraktion zugegebenen internen Standards ermittelt. Für jede GPL-Klasse wurde mindestens ein Standard zugegeben.

Tabelle 13

Extraktionseffizienzen von vier verschiedenen Extraktionsmethoden (in grau hinterlegt) für *E. coli*-Lipide. Die Lipidextrakte wurden mit LC-MS im Negativmodus analysiert. Die absoluten Lipidmengen in pmol wurden mit Hilfe von internen Standards für jede Klasse berechnet. Insgesamt wurden ca. 5 nmol *E. coli*-Lipide extrahiert. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier technischen Replikaten. BUME: Butanol-Methanol-Extraktion, MTBE: Methyl-tert-Butylether-Extraktion, SBD: saure Bligh & Dyer-Extraktion.

Lipid	Extraktionseffizienz [pmol]			
	BUME	Folch	MTBE	SBD
LPE	127 ± 8	334 ± 61	145 ± 9	296 ± 81
PE	2363 ± 163	3536 ± 234	3949 ± 302	3132 ± 149
LPG	36 ± 7	185 ± 26	83 ± 8	175 ± 27
PG	404 ± 32	588 ± 23	762 ± 90	603 ± 91
CL	133 ± 28	76 ± 11	136 ± 16	71 ± 13

Für die BUME-Extraktion wurde im Vergleich zu den anderen untersuchten Extraktionen bei PE, der GPL-Hauptklasse in *E. coli*-Bakterien, die geringste Extraktionseffizienz gefunden. Auch bei PG war die Extraktionseffizienz am geringsten im Vergleich zu den anderen Methoden. Bei LPE und LPG wiesen die Extraktionen mit Chloroform eine um einen Faktor 2 bis 3 höhere Ausbeute auf, allerdings gleichzeitig auch eine relativ hohe Standardabweichung im Vergleich zu MTBE und BUME. Die Ursache dafür ist unbekannt. Bei den Cardiolipinen zeigten die BUME- und die MTBE-Extraktion fast eine doppelt so hohe Effizienz. Klassenübergreifend betrachtet war die MTBE-Extraktion im Vergleich aller Extraktionen am besten für die Extraktion von bakteriellen Lipiden geeignet. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ausschließlich die MTBE-Extraktion für die Extraktion von bakteriellen Lipiden verwendet.

3.6. Untersuchungen zu Nicht-Lipid-Kontaminanten

Im Zuge der in 3.5. beschriebenen LC-MS-Analysen rückte der Aspekt von Nicht-Lipid-Kontaminanten in den Fokus. Bei diesen Kontaminanten handelte es sich besonders im Positivmodus um auffällig prominente Signale. Der Lipidanteil betrug in den Basepeak-Chromatogrammen deshalb oft nur 1-5% aller Signale (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Quelle für diese Nicht-Lipid-Kontaminanten kann u.a. die Lipidextraktion sein, d.h., die Kontaminanten könnten bereits in den für die Extraktion verwendeten Lösungsmitteln enthalten sein. Eine weitere mögliche Quelle stellen bei der Probenpräparation eingesetzte Plastikoberflächen dar, d.h. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße und Tubings des UPLC-Systems. Kontaminanten werden üblicherweise in zwei Gruppen eingeteilt, *Leachables* und *Extractables* (Jenke et al. 2013). *Extractables* sind organische und/oder anorganische Substanzen, die besonders unter extremen Bedingungen, d.h. beispielsweise sehr hohem/niedrigem pH-Wert oder hoher Temperatur aus einem System durch organische Lösungsmittel herausgelöst werden [89]. Bei *Leachables* handelt es sich um eine Untergruppe von *Extractables*. *Leachables* sind mit der Zeit aus einem System herausgelöste Substanzen. Bei diesen Substanzen kann es sich z.B. um chemische Additiva und deren Verunreinigungen/Derivate oder Abbauprodukte handeln (Jenke et al. 2013). *Extractables* und *Leachables* spielen eine große Rolle bei der Produktion und besonders der Verpackung von Pharmaprodukten [89].

Um herauszufinden, welche Kontaminanten bei Lipidom-Untersuchungen in den LC-MS-Analysen im Positivmodus auftreten, wurden prominente Signale anhand ihrer monoisotopischen Masse identifiziert. Die Massen wurden mit Hilfe der Software Thermo Xcalibur ausgelesen und es wurde anschließend eine Online-Suche in Molekül-Datenbanken durchgeführt. In Tabelle 14 sind die in RP-LC-MS-Läufen identifizierten Haupt-Kontaminanten zusammengefasst. Die gefundenen Moleküle und deren Derivate zeigen eine extrem hohe Ionisierungsausbeute im Positivmodus und sind in einem Massenbereich zu finden, der dem von GPL entspricht. Häufig wurde eine Elution der Kontaminanten über den gesamten Retentionszeitbereich beobachtet.

Tabelle 14

Gängige Kontaminanten aus RP-LC-MS-Analysen. Die Kontaminanten wurden anhand ihrer monoisotopischen Masse in den LC-MS-Datensätzen identifiziert. Bei den Bezeichnungen der Kontaminanten handelt es sich um die handelsüblichen Substanz-Bezeichnungen. amu: *atomic mass unit*.

Bezeichnung Kontaminante	Monoisotopische Masse neutral [amu]
Irgafos126	604.30826
Irgafos168	646.45148
Irgafos168 _{ox}	662.44640
Irganox245	586.35057
Irganox415	358.19665
Irganox565	588.38955
Irganox1010	1176.78408
Irganox1024	552.39270
Irganox1076	530.46990
Irganox1330	774.59510
Irganox3114	783.51864
EBS	592.59068
Hostanox03	794.47577
Lauramid_DEA	287.24604
Erucamid	337.33447
Ultranox626	604.30826
Pationix901	358.30831
Millad3988	414.20424
DEHP	390.27701
Bisphenol M	346.19328

Da im Folgenden in dieser Arbeit ausschließlich die MTBE-Extraktion für die Extraktion von bakteriellen Lipiden verwendet wurde, wurden MTBE-Extrakte und anschließende LC-MS-Analysen auf das Vorliegen von Nicht-Lipid-Kontaminanten hin untersucht. Um die Probenkomplexität möglichst gering zu halten, wurde für die Untersuchungen eine kommerziell erhältliche *E. coli*-PE-Mischung verwendet. PE wurde deshalb ausgewählt, da sie sowohl im Positiv- als auch im Negativmodus hohe Ionisierungsausbeuten aufweisen. Im Folgenden wurden die Ergebnisse von drei Experimenten verglichen, MTBE-Extraktion von PE-Mischung, PE-Mischung ohne Extraktion und PE-Mischung nach Zugabe der MTBE-Extraktionslösung. Beim letzten Experiment handelte es sich nur um eine kurze Inkubationszeit mit der Extraktionslösung. Damit sollte getestet werden, ob die Kontaminanten aus der Extraktionslösung stammen könnten. Bei der Probenvorbereitung wurde eine Mischung aus Glas- und Plastikoberflächen verwendet. Die PE-Mischung wurde

mit Hamilton-Spritzen in Glasröhrchen pipettiert und es erfolgte die Extraktion bzw. nur die Zugabe von Extraktionslösung. Die Lipide wurden unter einem Stickstoffstrom getrocknet, resuspendiert und in Plastikvials für die UPLC-Messung überführt. Die Ergebnisse dieser Experimente im Positivmodus sind in Abbildung 22 gezeigt. Gezeigt sind die absoluten Intensitäten von Nicht-Lipid-Kontaminanten und Lipid-Signalen und zugehörige Speziesverteilungen der PE-Mischungen.

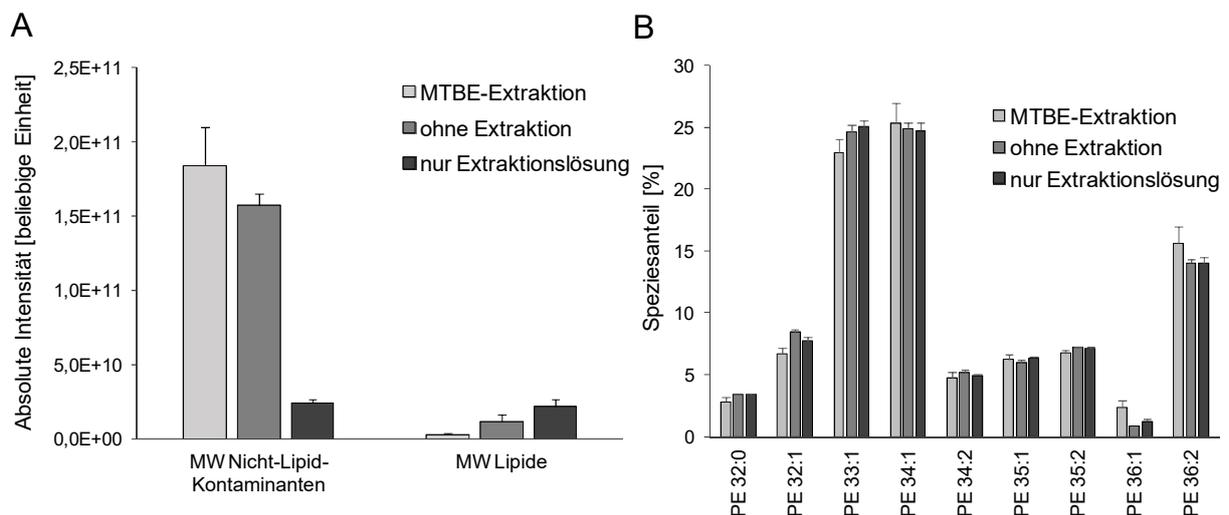


Abbildung 22

Absolute Intensitäten von Nicht-Lipid-Kontaminanten und Lipid-Signalen im Positivmodus und Speziesverteilungen der untersuchten Lipidmischung. In A sind die absoluten Intensitäten für einen kommerziell erhältlichen *E. coli*-PE-Mix mit MTBE-Extraktion, ohne Extraktion und mit nur Extraktionslösung gezeigt. In B sind die zugehörigen Speziesprofile der Messungen aus (A) gezeigt. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichungen von Dreifachmessungen. MW: Mittelwert.

Im Rahmen der in den Diagrammen gezeigten Standardabweichungen bestand kein Hinweis auf das Vorliegen von signifikanten Unterschieden zwischen absoluten Kontaminanten-Intensitäten in der PE-Mischung mit und ohne MTBE-Extraktion. Im Rahmen der Unsicherheiten in Abbildung 22 B waren keine Unterschiede zwischen den Speziesverteilungen der drei untersuchten Bedingungen zu beobachten. Bei der PE-Mischung mit einer kurzen Inkubationszeit mit der Extraktionslösung wurde eine signifikant geringere Kontaminanten-Intensität gefunden. Bei der Lipidsignal-Intensität war das umgekehrte Bild zu beobachten, d.h. die höchste Intensität wurde beim Experiment „nur Extraktionslösung“ gefunden. Entscheidend bei der Analyse ist das Kontaminanten-Lipid-Verhältnis. Dieses betrug bei der mit MTBE extrahierten PE-Mischung 69, ohne Extraktion 14 und bei nur Extraktionslösung 1.

Die gleiche Untersuchung zu Kontaminanten wurde auch im Negativmodus gemacht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 gezeigt. Im Unterschied zum Positivmodus entsprach die

Kontaminanten-Intensität derjenigen Probe, die nur kurz mit der Extraktionslösung inkubiert wurde, der derjenigen ohne Extraktion. Die Lipid-Intensität bei der PE-Mischung „nur Extraktionslösung“ war um einen Faktor von ca. 2 höher als ohne Extraktion.

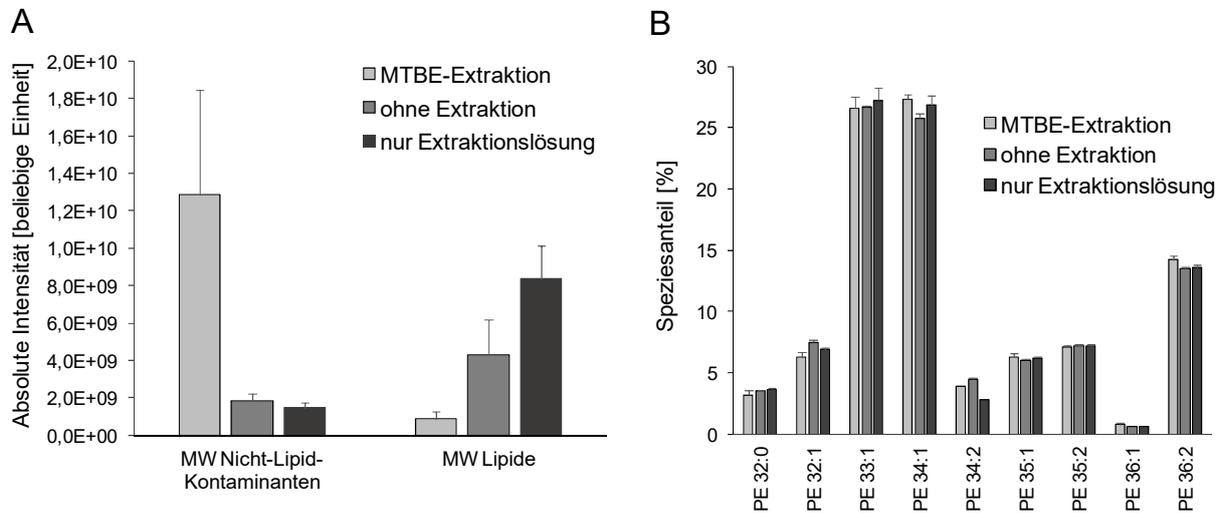


Abbildung 23

Absolute Intensitäten von Nicht-Lipid-Kontaminanten und Lipid-Signalen im Negativmodus und Speziesverteilungen der untersuchten Lipidmischung. In A sind die absoluten Intensitäten für einen kommerziell erhältlichen *E. coli*-PE-Mix mit MTBE-Extraktion, ohne Extraktion und mit nur Extraktionslösung gezeigt. In B sind die zugehörigen Speziesprofile der Messungen aus (A) gezeigt. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichungen von Dreifachmessungen. MW: Mittelwert.

Die Speziesprofile der drei Bedingungen zeigten im Rahmen der Unsicherheiten keine Unterschiede. Die Verhältnisse von Kontaminanten zu Lipiden waren im Vergleich zu den Messungen im Positivmodus deutlich günstiger. Mit MTBE-Extraktion wurde ein Verhältnis von 15 gefunden, ohne Extraktion von 0,17 und bei der Messung „nur Extraktionslösung“ ein Verhältnis von 0,42. Die Untersuchungen zu Nicht-Lipid-Kontaminanten mit der PE-Mischung wurden auch mit einer biologischen Probe durchgeführt. Als Probe wurde ein MTBE-Extrakt von *E. coli*-Lipiden verwendet. Diesmal wurden bei der Probenvorbereitung entweder ausschließlich Glas- oder Plastikoberflächen verwendet. Diese Experimente sollten klären, ob die Vermeidung von Plastikoberflächen zu einer Minimierung des Gehalts an Nicht-Lipid-Kontaminanten führt. Die Messungen wurden wiederum im Positiv- und Negativmodus durchgeführt. Die Ergebnisse für die Messungen im Positivmodus sind in Abbildung 24 gezeigt. Im Rahmen der Unsicherheiten waren keine Unterschiede der Speziesverteilungen zwischen Glas und Plastik zu beobachten. Bei zwei CL-Spezies, CL 64:2 und CL 69:3, waren die Unterschiede in den relativen Anteilen zwischen Glas und Plastik höher als bei den anderen Spezies (3-5%). Die Ursache dafür ist unbekannt. Das Kontaminanten zu Lipid-Verhältnis betrug bei Glas 26 und bei Plastik 31. Die Verwendung von Glas scheint demnach nicht zu einer wesentlichen Verminderung des Kontaminanten-Gehalts zu führen.

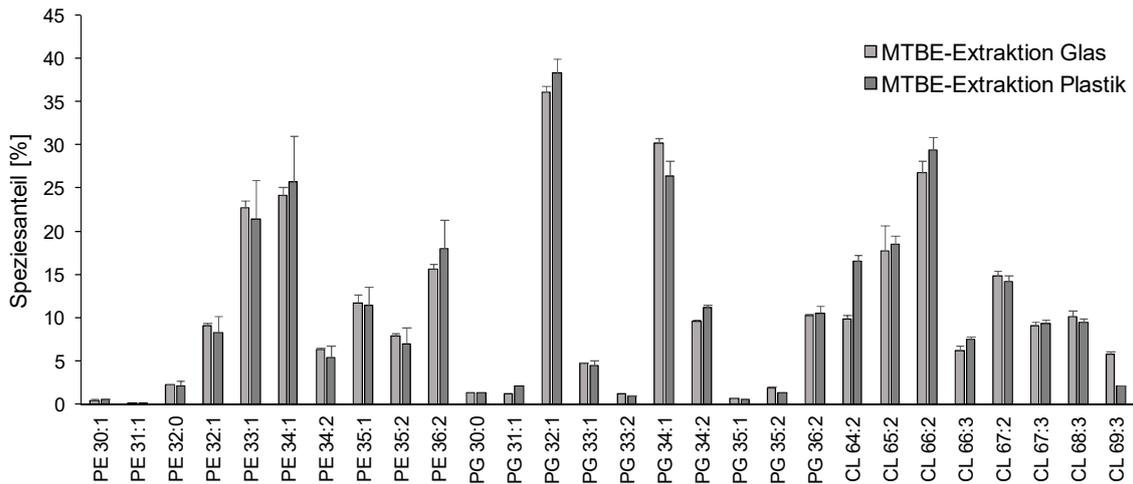


Abbildung 24

Speziesverteilungen von MTBE-Extraktionen von *E. coli*-Lipiden. Es handelt sich bei den Speziesanteilen um die Ergebnisse von RP-LC-Messungen im Positivmodus. Gezeigt sind die Hauptspezies der GPL-Klassen PE, PG und CL. Die Speziesanteile sind für jede Klasse jeweils auf 100% normiert. Die Bezeichnungen „MTBE-Extraktion Glas“ bzw. „MTBE-Extraktion Plastik“ geben an, dass bei der Extraktion und de LC-MS-Probenvorbereitung ausschließlich Glas- bzw. Plastikoberflächen zum Einsatz kamen. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichungen von Dreifachmessungen.

Die Ergebnisse für die Messungen im Negativmodus sind in Abbildung 25 gezeigt. Auch hier waren im Rahmen der Unsicherheiten keine Unterschiede der Speziesverteilungen feststellbar. Das Verhältnis von Kontaminanten zu Lipiden betrug im Negativmodus 10 (Glas) bzw. 12 (Plastik). Damit wiesen die Messungen ein um einen Faktor von 2 bis 3 günstigeres Kontaminanten-Lipid-Verhältnis als im Positivmodus auf.

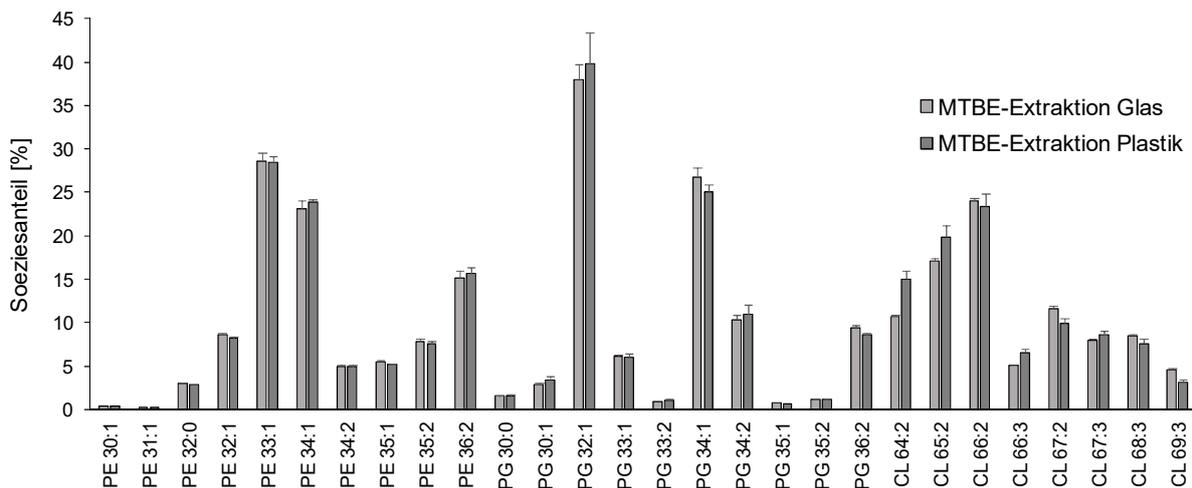


Abbildung 25

Speziesverteilungen von MTBE-Extraktionen von *E. coli*-Lipiden. Es handelt sich bei den Speziesanteilen um die Ergebnisse von RP-LC-Messungen im Negativmodus. Gezeigt sind die Hauptspezies der GPL-Klassen PE, PG und CL. Die Anteile sind für jede Klasse jeweils auf 100% normiert. Die Bezeichnungen „MTBE-Extraktion Glas“ bzw. „MTBE-Extraktion Plastik“ geben an, dass bei der Extraktion und de LC-MS-Probenvorbereitung ausschließlich Glas- bzw. Plastikoberflächen zum Einsatz kamen. Bei den Fehlerbalken handelt es sich um die Standardabweichungen von Dreifachmessungen.

3.7. Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurden Direktinfusionsmessungen von *E. coli*-Lipidmischungen Chip-basiert, mit der Spritzenpumpe und der UPLC durchgeführt. Bei den Direktinfusionsmessungen von Lipidmischungen der Klassen PE, PG und CL mit Chip-basierter Probeninfusion wurden eine direkte Proportionalität gefunden sowie von der Konzentration unabhängige, konstante Speziesprofile für alle untersuchten GPL-Klassen im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 bis 33 μM . Im untersuchten Konzentrationsbereich trat noch kein Verlassen des dynamischen Bereiches auf. Dies war eher bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ($<1 \mu\text{M}$) zu beobachten. Deshalb wurde der untersuchte Konzentrationsbereich auf Konzentrationen bis 1 nM ausgedehnt. Diese Direktinfusionsmessungen wurden nun mit der Spritzenpumpe mit einer Flussrate von 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ und der UPLC mit einer Flussrate von 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt. Bei den Messungen mit der Spritzenpumpe wiesen die Intensitäts-Konzentrations-Graphen im unteren Konzentrationsbereich, d.h. unterhalb von 0,1 μM , eine Krümmung auf. Bei Konzentrationen von 0,1 μM bis 20 μM lagen keine Hinweise gegen direkte Proportionalität vor. In dem Bereich mit direkter Proportionalität wurden sehr stabile Speziesprofile gefunden. In diesem Konzentrationsbereich ist eine Quantifizierung möglich. Bei den Messungen mit der UPLC, sowohl mit MeOH/TEA als auch mit den UPLC-Laufmitteln, wurden generell größere Streuungen der gemessenen Ionenintensitäten beobachtet. Zusätzlich handelte es sich bei den gemessenen Intensitäten im Vergleich zur Spritzenpumpe um eine Größenordnung geringere Intensitäten. Es wurden hierbei sehr niedrige Konzentrationen bis zu einer Konzentration von 0,3 nM untersucht. Unterhalb einer Konzentration von 1 nM war eine Abweichung der Intensitäten bei Konzentrationen zu beobachten. Bei Konzentrationen oberhalb von 1 nM gab es keine Hinweise gegen das Vorliegen einer direkten Proportionalität und die Speziesprofile waren im Rahmen der Unsicherheit stabil. Vergleiche der Direktinfusionsmessungen mit der UPLC und der Spritzenpumpe zeigten, dass die Flussrate auch bei gleichen Ionisierungsbedingungen, d.h. Lösungsmittel und ESI-Quellen-Parameter Auswirkungen auf die Tröpfchenbildung zu haben scheint.

Oft sind die in der Literatur zu findenden untersuchten Konzentrationsbereiche deutlich höher als die in dieser Arbeit untersuchten. In Koivusalo et al. 2001 ist zu finden, dass die Intensitäten bei einem Ionenfallen-Gerät bis zu einer Spezies-Konzentration von ca. 1 μM direkt proportional ist. Bei Konzentrationen größer als 5 μM zeigt die Intensität nicht mehr eine direkt proportionale Abhängigkeit von der Konzentration mehr (siehe Abbildung 6 in [87]). Im Vergleich zu den hier gezeigten Ergebnissen handelte es sich um Konzentrationsbereiche, in denen bei allen Methoden der Direktinfusion in dieser Arbeit

direkte Proportionalität erhalten wurde. Ein weiterer Punkt, der in [87] erwähnt wurde, ist, dass die Abhängigkeit der geräteabhängigen Sensitivität von der physikochemischen Beschaffenheit der Lipide, d.h. vom Lösungsmittel und den Messparametern, durch die Zugabe von internen Standards erst zu zuverlässigen Quantifizierungs-Ergebnissen führt. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann diese Hypothese nicht bestätigt werden. Die Zugabe von geeigneten internen Standards ist zwar sinnvoll, da diese weitestgehend physikochemisch identische Eigenschaften vergleichbar mit denen der Analytmoleküle aufweisen und somit die Intensitäten der Analytmoleküle auf die der entsprechenden Standards bezogen werden können. Allerdings kann die Zugabe von Standards eine nicht vorliegende direkte Proportionalität nicht korrigieren. Im Gegenteil, sie könnte zu einer Erhöhung der Komplexität der Mischung und zu falschen Quantifizierungs-Ergebnissen führen. Ein besserer Ansatz besteht im Testen des Vorliegens einer direkten Proportionalität mit der Mischung von Standards und zu untersuchender Probe. Es sollte auf die Wahl einer geeigneten Standardmenge relativ zur Probenmenge geachtet werden. Sowohl für Standards als auch für die Probe muss notwendigerweise ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen Intensität und Konzentration in dem für die Quantifizierung verwendeten Konzentrationsbereich vorliegen. Erst unter diesen Umständen können valide Quantifizierungs-Ergebnisse erhalten werden.

Ein weiterer genereller Punkt bei der Analyse sind Ionensuppressions-Effekte. In [88] steht dazu: „The variation of PL species response when analyzed in mixture is probably due to ion suppression“. Die Ionisierungsausbeuten zwischen Spezies können stark variieren, allerdings muss deshalb noch keine Ionensuppression vorliegen. Generell spielt Ionensuppression bei Direktinfusionsmessungen eine deutlich größere Rolle als bei LC-Trennungen, da bei LC eine Auftrennung komplexer Mischungen vor der MS-Analyse stattfindet. Das Vorliegen von Ionensuppressions-Effekten muss vor der Messung der zu quantifizierenden Analyt-Moleküle getestet werden. Ionensuppression kann dann auftreten, wenn große Konzentrationsunterschiede zwischen Molekülen in einer Mischung bestehen oder einzelne Spezies in der Mischung sehr hohe Ionisierungsausbeuten aufweisen.

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Zwei-Komponenten-Mischungen untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung der Mischungen aus zwei PE-Standards, wobei nur der Parameter der Kettenlänge variiert wurde, lieferten keine Hinweise auf eine intermolekulare Beeinflussung der Ionisierung. Die Intensitäten der längerkettigeren Standards in der Mischung wurden korrigiert. Nach der Korrektur der Unterschiede der Ionisierungsausbeuten mit einem Korrekturfaktor sowie dem Multiplizieren der Intensitäten mit einem Faktor für den relativen Anteil in Mischung im Fall von nicht äquimolaren Mischungen bestanden keine Hinweise auf eine Abweichung von Idealwert „1“.

Bei den in Kapitel 3.6. beschriebenen LC-MS-Messungen wurde eine Vielzahl von Nicht-Lipid-Kontaminanten identifiziert. Diese Kontaminanten waren besonders in Full-MS-Datensätzen im Positivmodus zu finden. Die identifizierten Kontaminanten wurden im Weiteren dazu verwendet, um den Kontaminanten-Gehalt in LC-MS-Datensätzen zu untersuchen. Die Untersuchungen zeigten, dass das Verhältnis von Kontaminanten zu Lipiden im Positivmodus einen Faktor 2 bis 3 ungünstiger ist als im Negativmodus. Der Grund dafür ist die hohe Ionisierungsausbeute der Kontaminanten im Positivmodus. Der Vergleich von Glas und Plastik bei der Probenpräparation ergab keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Kontaminanten-Gehalts. Es ist generell von Vorteil, auf Plastikoberflächen, wenn möglich, zu verzichten. Antioxidantien wie z.B. Irgafos und Irganox sind in allen transparenten Plastikgefäßen enthalten und stellen potentielle *Extractables/Leachables* dar. Deshalb sollten Hamilton-Spritzen und Glaspipetten zum Pipettieren und silanierte Probenvials/-inlets bei der UPLC-Analyse verwendet werden.

4. Lipidomuntersuchungen mit RP-UPLC-MS

In dieser Arbeit stand die Trennung von Lipiden mit *reversed-phase* (RP)-Flüssigkeitschromatographie (LC) im Fokus. Mit RP-LC werden Lipidspezies unterschiedlicher Klassen voneinander getrennt. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit detaillierteren Untersuchungen zur Probencharakterisierung mit Full-MS in Kombination mit Fragmentierungsmethoden. Es wurden drei verschiedene Fragmentierungsmethoden, *all ions fragmentation* (AIF), topN und targeted-MS/MS, auf ihre Spezifität hin getestet. Für Moleküle, die mit LC und Full-MS-Scans analysiert werden, erhält man zum einen die Information über die genaue monoisotopische Masse aufgrund der hohen Auflösung von Full-MS-Scans, sowie zusätzlich die Information über die Retentionszeit der molekularen Ionen. Die drei untersuchten Fragmentierungsmethoden unterscheiden sich grundsätzlich hinsichtlich ihrer Spezifität und der Auflösung. Bei AIF handelt es sich um eine nicht zielgerichtete Fragmentierung, bei der das gesamte Ionenpaket zu einem gegebenen Zeitpunkt fragmentiert wird. Die Scans weisen aber die hohe Massenauflösung von Full-Scans auf. Bei Orbitrap-Geräten beträgt die FWHM-Auflösung bei m/z 1000 üblicherweise 50.000 bis 100.000. topN-Scans zeichnen sich im Gegensatz dazu durch eine relativ geringe Massenauflösung aus. Hierbei erfolgt die Fragmentierung der N intensivsten Signale zu einem gegebenen Zeitpunkt. Targeted-MS/MS ist von den drei untersuchten Fragmentierungsmethoden diejenige mit der höchsten Spezifität, da hier die gezielte Auswahl von zu fragmentierenden Precursor-Ionen erfolgt. Targeted-MS/MS-Scans besitzen eine geringe Auflösung, dafür aber eine hohe Datenpunkt-Dichte aufgrund von Scanraten bis 12 Hz [42].

Eine wesentliche Rolle spielte die Auswertung von LC-MS-Datensätze, die mit den beschriebenen Full-MS/MS²-Scanmethoden erzeugt werden. Im Folgenden wurde hierfür die Software MassMap eingeführt. Im Zuge dieser Arbeit wurden einige neue Module in die Software implementiert, von denen im Folgenden zwei neue Module vorgestellt werden. Außerdem wird der generelle Arbeitsablauf bei der Datenauswertung vorgestellt. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse von Untersuchungen zur Präzision der Probenextraktion und der UPLC-MS-Messung anhand von bakteriellen Lipidextrakten gezeigt sowie die Ergebnisse von Untersuchungen zu UPLC-MS-Analysen mit Full-MS in Kombination mit den drei oben erwähnten MS/MS-Scanmethoden zur Charakterisierung von *E. coli*-GPL und TG-Standardspezies mit definierter Fettsäure-Zusammensetzung. Alle im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind das Ergebnis von MassMap-Auswertungen.

4.1. Lipidomuntersuchungen von *E. coli* – Kinetik-Analysen und Datenauswertung

Zunächst wurde die Präzision von LC-Messungen getestet. Diese Tests wurden anhand von *E. coli*-MTBE-Lipidextrakten durchgeführt. Im Folgenden werden die wesentlichen Charakteristika der Software MassMap vorgestellt. Die Software basiert auf der Identifizierung von Molekülen mit Hilfe einer vom Benutzer eingespeisten Liste mit Informationen zur monoisotopischen und zur Average-Masse der Analytmoleküle, dem so genannten *lis*-File. Die Identifizierung erfolgt semi-automatisch mit Hilfe des so genannten *pepmap*-Moduls. Der erste Schritt besteht in der automatischen Identifizierung von Signalen. Bei Signalen, die einer Verifizierung durch den Benutzer bedürfen, erfolgt eine so genannte Benutzerbewertung der Signale. Die Signale werden dem Benutzer in einem Fenster vergleichbar zu dem in Abbildung 26 dargestellten gezeigt.

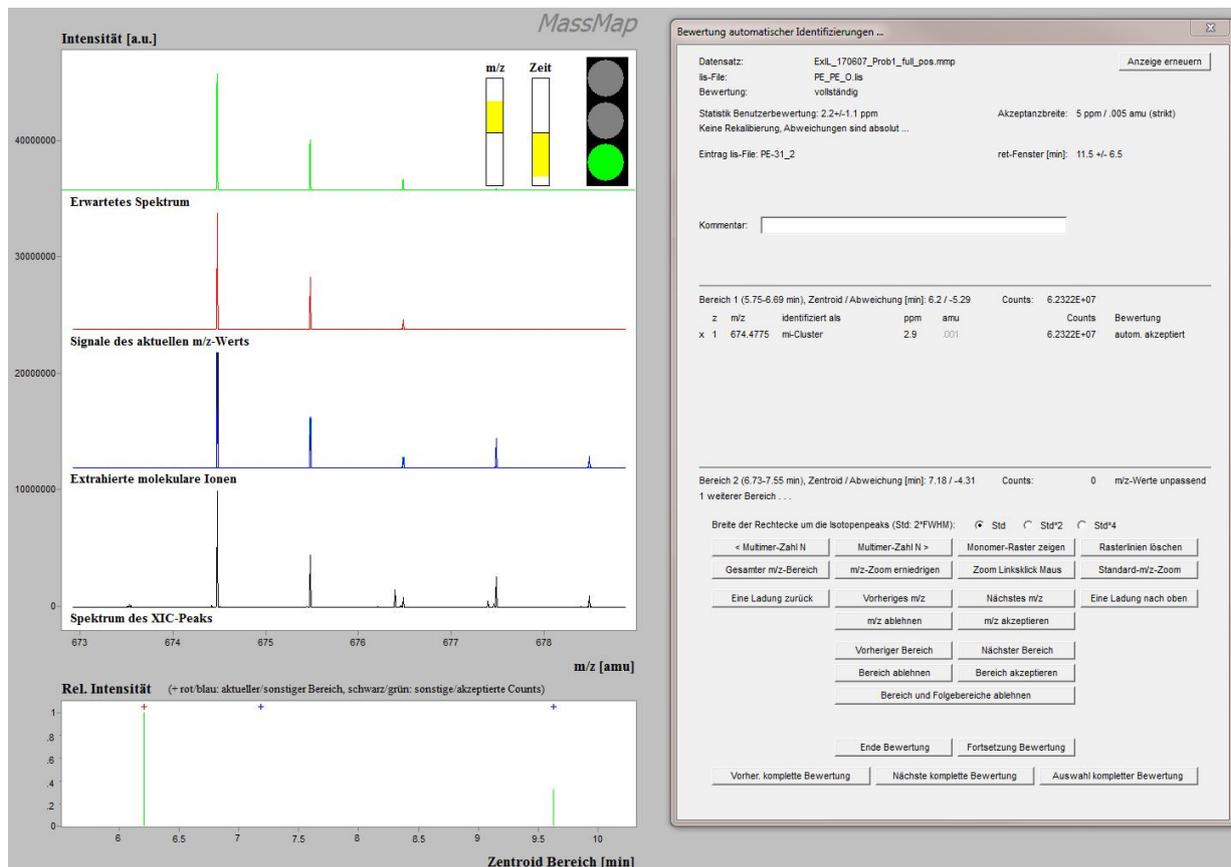


Abbildung 26

Beispiel für Fenster bei der Benutzerbewertung des *pepmap*-Moduls der Software MassMap. Auf der linken Seite des Fensters sind Zooms um das Isotopencluster des aktuellen Signals gezeigt. Dargestellt sind von oben nach unten das erwartete Spektrum (hellgrün), die Signale des aktuellen m/z-Werts (rot), die extrahierten molekularen Ionen (blau) und das Spektrum des XIC-Peaks (schwarz). Im unteren Teilfenster auf der linken Seite sind alle im Retentionszeitbereich gefundenen Signale als vertikale Linien gezeigt. Im grauen Bereich auf der rechten Seite des Bildschirms sind zusätzliche Detail-Informationen das Signal betreffend angezeigt.

Die Software bietet die Möglichkeit, alle identifizierten Signale, d.h. auch automatisch von der Software akzeptierte Signale, im Detail anzuschauen und zu bewerten. Die Bewertung von Signalen aus LC-MS-Datensätzen durch den Benutzer erfolgt anhand der Massenabweichung von der theoretisch erwarteten m/z -Masse, dem Retentionszeitbereich, der Intensität (Counts) und der Übereinstimmung des Isotopenspektrums des molekularen Ions mit dem erwarteten Spektrum. Mit Hilfe der Software ist die Suche nach einer großen Anzahl von Molekülen möglich. Des Weiteren bietet die Software im Vergleich zur manuellen Suche von Signalen in Datensätzen eine erleichterte, detaillierte Bewertung. Für den Fall von nicht automatisch identifizierten Signalen besteht zusätzlich die Option der softwareunterstützten manuellen Identifizierung. Die Software bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten der Ausgabe der Informationen zu identifizierten Signalen, u.a. die Ausgabe in ein Text-File für den Import in Tabellenkalkulations-Programme (z.B. Excel), die Berechnung des Chromatogramms aller identifizierten Signale und die Berechnung des so genannten Differenz-Chromatogramms. Beim Differenz-Chromatogramm handelt es sich um das nach der Subtraktion aller identifizierten Signale verbleibende Chromatogramm. Die Grundlage von MassMap ist die Software GRAMS. Diese ermöglicht die Darstellung und genauere Untersuchung von Spektren und Chromatogrammen. Ein Beispiel ist in Abbildung 27 gezeigt. Gezeigt sind die Basepeak-Chromatogramme identifizierter GPL-Signale für fünf in Serie gemessene UPLC-MS-Messungen von *E. coli*-MTBE-Extrakten.

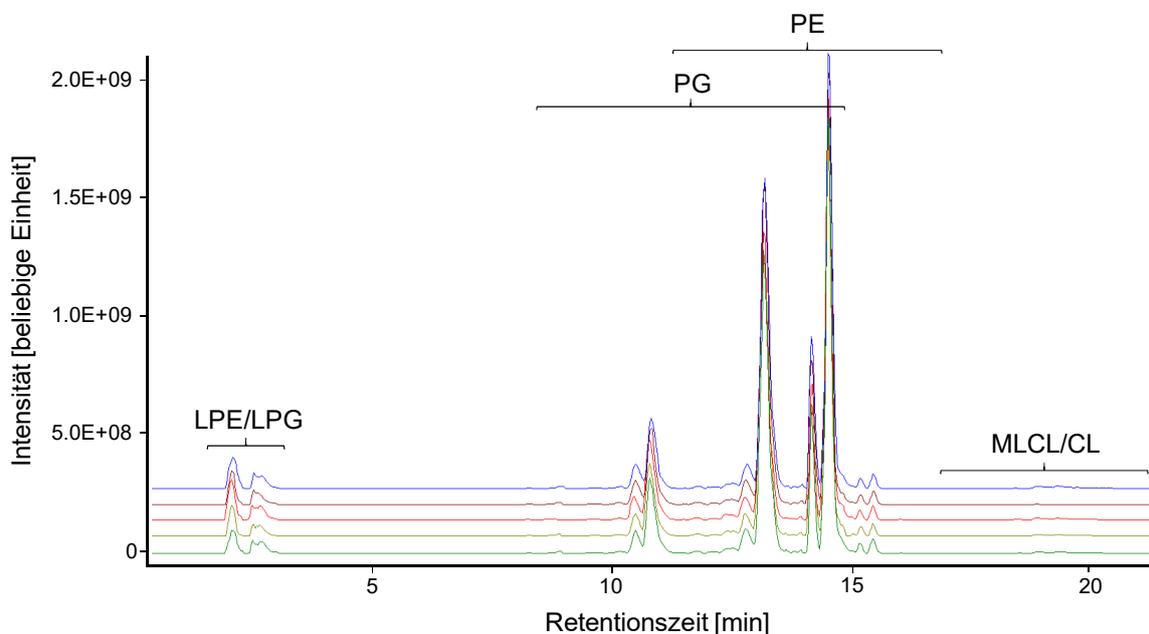


Abbildung 27

RP-Basepeak-Chromatogramme von identifizierten Lipidsignalen aus *E. coli*-MTBE-Lipidextrakten. Mit geschweiften Klammern sind die Elutionsbereiche von Spezies der Klassen Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Lysophosphatidylglycerin (LPG), Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylethanolamin (PE) Monolysocardiolipin (MLCL) und Cardiolipin (CL) eingezeichnet. Bei den gezeigten fünf Chromatogrammen handelt es sich um in einer Messserie gemessene technische Replikate von MTBE-Extraktion/UPLC-MS-Messung.

Die Chromatogramme sind im *stacked*-Modus dargestellt, um die Zusammengehörigkeit von identischen Signalen besser sichtbar zu machen. Alle Chromatogramme zeigen eine sehr gute Überlappung. Für den Fall, dass Retentionszeitunterschiede vorlagen, waren diese nur marginal. Dies spricht für das Vorliegen einer hohen Reproduzierbarkeit der LC-MS-Läufe. Anschließend wurde nun die Präzision des gesamten Arbeitsablaufes, d.h. der MTBE-Extraktion und der UPLC-Messung, genauer untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe der Wachstumskinetik von *E. coli*. In Abbildung 28 sind die Lipidspeziesprofile der drei *E. coli*-Lipid-Hauptklassen PE, PG und CL für vier Zeitpunkte aus unterschiedlichen Stadien der Wachstumsphase (3, 4, 5 und 6 Stunden) gezeigt. Gezeigt sind die Hauptspezies der GPL-Klassen LPE, LPG, PE und PG. Bei den Hauptspezies war klassenübergreifend eine signifikante Veränderungen der Speziesanteile in Abhängigkeit von der Wachstumszeit zu beobachten. Detaillierte Untersuchungen hierzu sind in Kapitel 6 gezeigt.

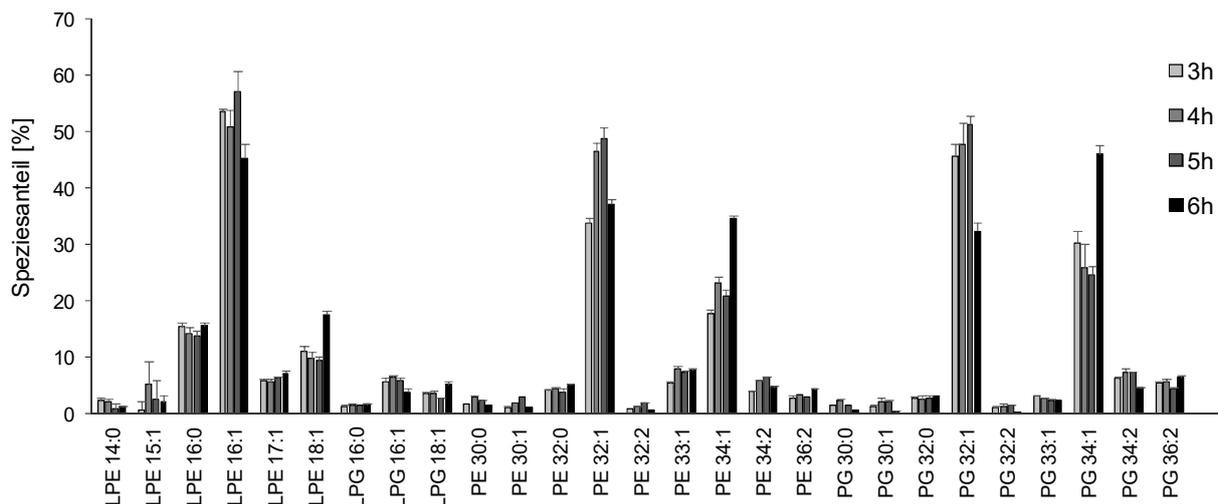


Abbildung 28

Speziesverteilungen von RP-UPLC-Messungen von MTBE-Extrakten von *E. coli*-Lipiden. Untersucht wurden die Lipidom-Veränderungen in abhängig der Wachstumszeit. Gezeigt sind die Hauptspezies der GPL-Klassen Lysophosphatidylethanolamin (LPE), Lysophosphatidylglycerin (LPG), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylglycerin (PG). Die Standardabweichungen von Vierfach-Messungen sind als Fehlerbalken im Balkendiagramm dargestellt. Die untersuchten Zeitpunkte in der Wachstumskurve sind in der Legende als „3h“ (3 Stunden), „4h“ (4 Stunden), „5h“ (5 Stunden) und „6h“ (6 Stunden) abgekürzt.

Bei den Speziesanteilen wurden mittlere Unterschiede von maximal 3% gefunden, bei den Retentionszeiten von maximal 0,08 min. Diese Informationen waren im Weiteren wichtig für die Bewertung von möglichen Speziesprofil-Veränderungen durch Alkaloid-Behandlungen von Bakterien (siehe Kapitel 6).

Im Zuge dieser Untersuchungen wurden drei neue Funktionen in bereits bestehende Module und zwei neue Auswerte-Module in MassMap implementiert. Bei der ersten neuen Funktion handelte es sich um die Option, mit Hilfe eines so genannten lip-Files, das Lipid-Strukturinformationen und Informationen über Modifikationen und Addukte enthält, Listen mit Lipidmolekül-Massen zu erstellen. Die zweite neue Funktion war Teil eines wesentlichen Auswerte-Moduls, des so genannten pepmap-Moduls. Es bietet die Möglichkeit, im Fall von überlappenden Isotopenclustern Überlappungskorrekturen durchzuführen. Dies ist besonders bei Direktinfusionsmessungen von Bedeutung, da keine Auftrennung der Lipide vor der MS-Messung erfolgt. Die dritte neue Funktion bestand in der Zerlegung von Multi-Experiment-Datensätzen, d.h. gemischten Full-MS/Fragmentierungsexperimenten. Bei den beiden neuen Modulen handelte es sich um ein Modul für die Fit-Auswertung zur Regioisomer-Reinheitsanalyse (Details in Kapitel 5.2.) und ein Modul für die Bestimmung von Zusammenhängen für eine Serie von Analysen. Bei letzterem Modul werden den einzelnen Analysen Werte einer Größe zugeordnet, z.B. Zeitdauer oder Konzentration. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhängen handelte es sich um die Speziesanteil-Veränderungen in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Diese Daten werden im Folgenden als Kinetik-Daten bezeichnet.

Als Beispiel für einen PDF-Report einer solche Kinetik-Auswertung ist in Abbildung 29 für das Molekül PE 32:1 (aus Verteilung von Abbildung 28) gezeigt. Mit Hilfe des Kinetik-Moduls ist eine Analyse der Detail-Informationen zu den einzelnen technischen Replikaten (Abbildung 29 A) und eine Darstellung der relativen Intensität der Replikate (Abbildung 29 B) möglich. Zusätzlich ist der Mittelwert aller Identifizierungen als rote Linie in B gezeigt. Es besteht im Modul auch die Möglichkeit, für den Verlauf der Daten einen geeigneten Fit zu verwenden. Bei den gezeigten Beispieldaten wurde eine konstante Funktion verwendet. Anhand der Residuen kann die Abweichung von der verwendeten Fit-Funktion beurteilt und somit die Qualität des verwendeten Fits bewertet werden. Mit Hilfe dieses Tools kann eine Vielzahl von Spezies analysiert werden. Dies ist von besonderem Interesse im Falle von auftretenden Veränderungen einzelner Spezies unter veränderten Bedingungen, d.h. unter Variation eines Parameters, z.B. in Abhängigkeit der Wachstumszeit, der Temperatur oder der Behandlung mit Substanzen.

A

Report für Serie pepmap-Analysen, Daten eines Signals
(6h)

MassMap®

```

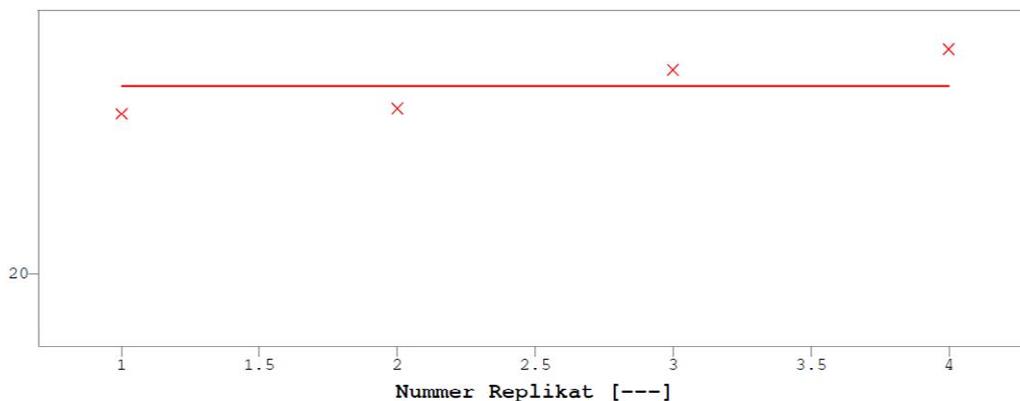
Molekül: PE-32_1
Anzahl Identifizierungen: 4
Anzahl akzeptierter Identifizierungen: 4
Angepasste relative Intensitäten [%]: 26.9037590027
Mittlere relative Intensität [%]: 26.904

#: Nummer des _res_summary-Files der Analyse
Variable: Wert für Nummer Replikat in ---
RRT: Relative Retentionszeit
Int/IntRel/IntFit/Res: Absolute Intensität/relative Intensität/angepasste relative Intensität/Residuum
Fett gedruckte Zahlen: Für den Fit nicht verwendete relative Intensitäten
# Variable Zeit [min] RRT Int (a.u.) IntRel [%] IntFit [%] Res [%]
1 1 13.27 n.z. 5.5785E+08 25.865 26.904 1.039
2 2 13.28 n.z. 9.1289E+08 26.064 26.904 0.840
3 3 13.27 n.z. 1.1337E+09 27.460 26.904 -0.556
4 4 13.32 n.z. 1.1763E+09 28.227 26.904 -1.323
Standardabw. 0.021 n.z. n.z. n.z. n.z. 0.980

```

B

Relative Intensität [%]

**Abbildung 29**

Beispiel für einen Ergebnis-Report des Kinetik-Auswertemoduls in MassMap für die Spezies PE 32:1. Es handelt sich bei den Messungen um die in Abbildung 28 gezeigten. In A sind Detailinformationen zu den vier technischen Replikaten gezeigt, RRT (relative Retentionszeit), Int (Intensität), IntRel (relative Intensität), IntFit (Intensität Fit) und Res (Residuen). In B sind die relativen Intensitäten der einzelnen Replikate (rote Kreuze) gezeigt sowie die mittlere relative Intensität als rote horizontale Linie.

4.2. Analyse von gemischten UPLC-Full-MS/Fragmentierungsexperimenten

Eine Möglichkeit für eine erste Charakterisierung von komplexen biologischen Proben sind gemischte LC-Full-MS/Fragmentierungsanalysen. Aus hochaufgelösten LC-(Full-)MS-Datensätzen erhält man die Information zur exakten Masse +/- wenige ppm Unsicherheit bei hochauflösenden Massenspektrometern und die Retentionszeit-Information zu den identifizierten Signalen. Im Folgenden wird unterschieden zwischen Molekülen und Signalen. Die Identifizierung eines Moleküls mit einem bestimmten m/z-Wert und einer bestimmten Retentionszeit wird im Folgenden als Signal bezeichnet. Ein Molekül kann als mehrere Signale identifiziert werden. Es handelt sich dann um eine so genannte Mehrfach-Identifizierung eines Moleküls. In Abbildung 30 ist der generelle Arbeitsablauf bei der

Auswertung von LC-MS-Datensätzen mit MassMap schematisch als Flussdiagramm dargestellt.

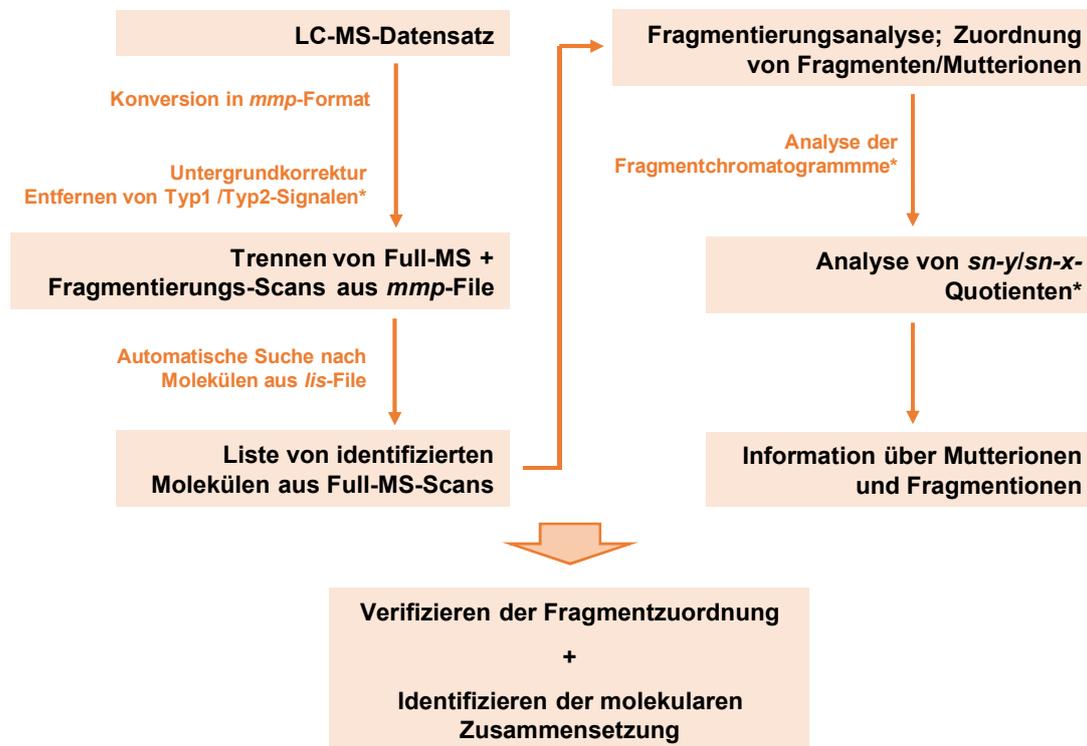


Abbildung 30

Flussdiagramm für die Auswertung von LC-MS-Datensätzen mit gemischten Full-MS/Fragmentierungs-Experimenten mit MassMap. Die Operationen sind in orange gezeigt. Optionale Schritte sind mit * gekennzeichnet. AIF: *all ions fragmentation*, *mmp*: Abkürzung für Files im MassMap-Fileformat, *lis-File*: Text-File mit Liste von Molekülmassen.

In dem oben gezeigten Flussdiagramm sind optionale Schritte mit * gekennzeichnet. Bei diesen Schritten handelt es sich um die Entfernung von Typ1-Signalen, d.h. üblicherweise ionisierenden Bestandteilen des Eluentensystems, und von Typ2-Signalen, d.h. unstrukturiertem, „weißem“ Rauschen, und der Analyse von Fragmentchromatogrammen. Die Entfernung von Typ1/Typ2-Signalen dient der Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses und führt zu einer signifikanten Verringerung der Filegrößen. Die Analyse von Fragmentchromatogrammen wird üblicherweise dann angewandt, wenn z.B. targeted-MS/MS-Daten mit hoher Datenpunkt-Dichte zur Verfügung stehen, wie dies in Kapitel 5.2. im Detail behandelt wird. Der erste Schritt bestand in der Konversion der LC-MS-Datensätze in das MassMap-Fileformat (*mmp*-Files). Anschließend erfolgte das Trennen von Full-MS- und Fragmentierungs-Scans. Molekulare Ionen wurden in Full-MS-Scans mit der so genannten *pepmap*-Auswertung („Automatische Suche nach Molekülen aus *lis-File*“) identifiziert. Die Zuordnung von Fragment-Signalen erfolgte auf zwei Arten. Für den Fall, dass sich die Fragmentierungs-Scans wie Full-MS-Scans verhielten, erfolgte eine *pepmap*-Auswertung

(1). Bei diesen Fragmentierungsscans kann es sich um AIF-Scans oder auch um Fragmentierungs-Scans aus Quellen-Fragmentierung handeln. Die Zuordnung der Fragmente erfolgte nach der Auswertung der Full-Scans anhand der Koelution von Signalen intakter Moleküle und Fragmentionen-Signalen. Der dafür verwendete Algorithmus tolerierte dabei Retentionszeitsunterschiede bis maximal 0,05 min. Im zweiten Fall erfolgte die Zuordnung von Fragmenten zu zugehörigen Mutterionen mit Hilfe des MassMap-Fragmentierungsmoduls (2). Diese Auswertung wurde bei topN-Scans und targeted-MS/MS-Scans angewandt. Das erwähnte Fragmentierungsmodul war eines der neuen MassMap-Module. In Abbildung 31 ist exemplarisch das Fenster für die Auswahl von Signalen für die Suche nach Fragmenten und anschließende Fragmentierungs-Auswertung gezeigt. Bei den Daten handelte es sich um ein gemischtes Full-MS/targeted-MS/MS-Experiment mit einer kommerziell erhältlichen PC-Mischung. Das BIC-(*baseline-corrected ion current*)-Chromatogramm des Beispiel-Moleküls PC 38:4 ist in schwarz gezeigt.

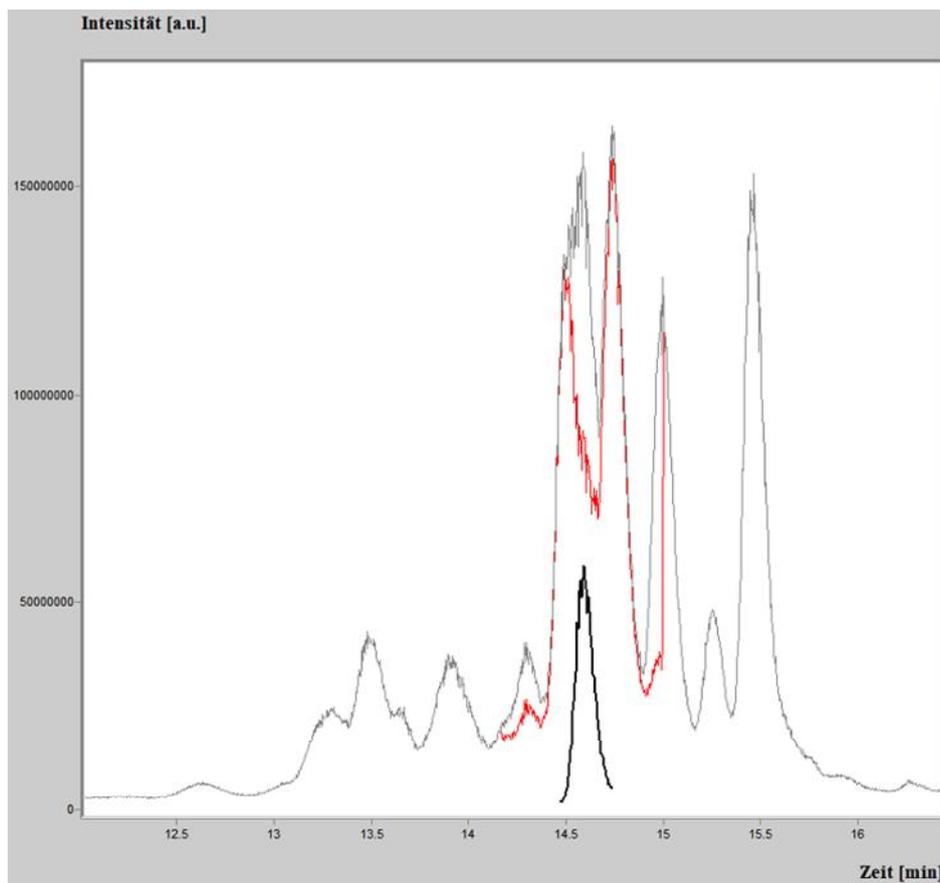


Abbildung 31

Screenshot aus dem Fragmentierungsmodul der Software MassMap. Es wurde eine kommerziell erhältliche PC-Mischung analysiert. Bei den Daten handelt es sich um gemischte Full-MS/targeted-MS/MS-Experimente, bei denen jeweils die Hauptspezies fragmentiert wurden. In grau ist das *baseline-corrected ion current*-(BIC)-Chromatogramm gezeigt. In rot sind die Elutionsprofile von identifizierten Signalen mit gefundenen Fragmenten gezeigt und in schwarz ist der Peak des aktuell betrachteten Signals gezeigt. a.u.: *arbitrary units*.

Im Fall (2) erfolgte die Identifizierung von koelulierenden Fragmentionen-Signalen mit Hilfe des MassMap-Fragmentierungsmoduls. Ein Beispiel für das Auswertefenster des Fragmentierungsmoduls ist in Abbildung 32 für das Molekül PC 38:4 gezeigt. Auf der linken Seite ist das monoisotopische Cluster gezeigt, in hellgrün sind die mit dem aus den Full-Scans identifiziertem Molekül koelulierenden Isotopenpeaks eingefärbt.

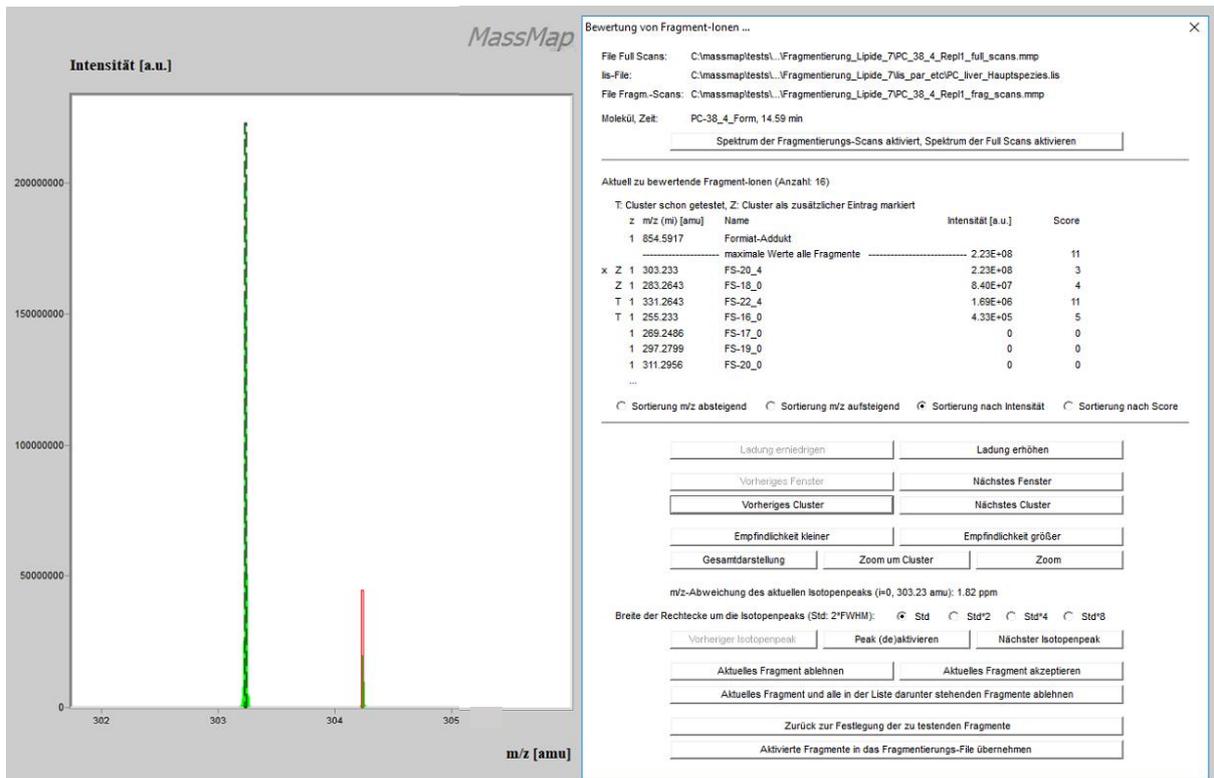


Abbildung 32

Screenshot des Bewertungsfensters für die Bewertung von identifizierten Fragmenten im Fragmentierungsmodul der Software MassMap. Gezeigt ist die Auswertung exemplarisch für ein gemischtes Full-MS/targeted-MS/MS-Experiment des Moleküls PC 38:4. Auf der linken Seite des Fensters ist das Isotopencluster eines identifizierten Fettsäure-Fragments (FS 20:4) gezeigt. In hellgrün sind die Isotopenpeaks eingefärbt, bei denen eine Koelution mit den molekularen Ionen des im Full-Scan identifizierten Molekül vorliegt. Im rechten Teil des Fensters sind Detail-Informationen zu den Fragment-Identifizierungen gezeigt sowie Schaltflächen zur Auswahl von Darstellungsoptionen und zur Bewertung der gezeigten Signale. Der aktuell betrachtete Peak des Isotopenclusters ist mit einer gestrichelten Linie umrandet. a.u.: arbitrary units.

Bei Fettsäure-Fragmenten war der dritte Isotopenpeak ohne wesentlichen Beitrag im Isotopencluster, daher wurde er nicht für die Quantifizierung verwendet. Auf der rechten Seite sind Detail-Informationen zur Fragmentierungs-Analyse gezeigt. Hier erfolgt die Auswahl der Fragmente für die Bewertung. Zusätzlich finden sich dort Informationen zur Intensität und dem Score der identifizierten Fragment-Ionen, Darstellungsoptionen (Zoom, Veränderung der Empfindlichkeit, Deaktivieren von Isotopenpeaks) und weitere Bewertungsoptionen. Die zuvor beschriebenen MassMap-Auswerte-Tools wurden im

Folgenden für die Untersuchung einer biologischen Probe (*E. coli*) verwendet. Verglichen wurden AIF, targeted MS/MS und top5. Die Ergebnisse für die Fragmentierung von PE- und PG-Hauptspezies mit den drei unterschiedlichen Fragmentierungs-Methoden sind in Tabelle 15 gezeigt. Als Fragmente wurden hauptsächlich Fettsäuren gefunden. Diese stellten im Negativmodus bei denen in dieser Arbeit gewählten Fragmentierungsenergien (siehe Kapitel 2.2.14.) die prominentesten Fragmente von GPL dar. Zusätzlich wurden auch noch Fragmente mit einer abgespaltenen Fettsäure gefunden („min. FS X“).

Tabelle 15

Gefundene Fragmente für AIF, targeted-MS/MS und top5 von *E. coli*-Lipidspezies der GPL-Klassen PE und PG. Die Lipidspezies stammen aus MTBE-Extrakten von *E. coli* K12 TB1. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-MS/MS-Messungen im Negativmodus mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 35% (QExactive, Thermo). Die Auswertung der Daten erfolgte mit MassMap. Fehlende Fragment-Identifizierungen sind mit „-“, gekennzeichnet. FS: Fettsäure, AIF: *all ions fragmentation*, min. FS: Molekül minus Fettsäure.

Lipidspezies	AIF	targeted-MS/MS	top5
PG 30:1	FS 14:0, FS 16:1, min. FS 16:1	-	FS.14:0, FS 16:1
PG 31:1	FS 14:0, FS 15:0, FS 16:1, FS 17:1	-	FS 17:1
PG 32:1	FS 16:0, FS 16:1, min. FS 16:0, min. FS 16:1	FS 16:0, FS 16:1	FS 14:0, FS 16:0, FS 16:1, FS 18:1
PG 33:1	FS 16:0, FS 17:1, min. FS 16:0, min. FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1
PG 33:2	FS 16:1, FS 17:1	FS 16:1, FS 17:1	FS 16:1, FS 17:1
PG 34:1	FS 16:0, FS 18:1, min. FS 16:0, min. FS 18:1	FS 16:0	FS 16:0, FS 18:1
PG 34:2	FS 16:1, FS 18:1, min. FS 18:1	FS 16:1, FS 18:1	FS 16:1, FS 18:1
PE 30:1	FS 14:0, FS 16:1	FS 16:1	FS 14:0, FS 16:1
PE 31:1	FS 14:0, FS 15:0, FS 16:1, FS 17:1	-	FS 14:0, FS 17:1
PE 32:1	FS 14:0, FS 16:0, FS 16:1, FS 18:1, min. FS 16:1	FS 16:0, FS 16:1	FS 14:0, FS 16:0, FS 16:1, FS 18:1
PE 33:1	FS 16:0, FS 17:1, min. FS 16:0, min. FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1
PE 33:2	FS 16:1, FS 17:1	FS 17:1	-
PE 34:1	FS 16:0, FS 16:1, FS 18:0, FS 18:1, min. FS 18:1	FS 16:0, FS 18:1	FS 16:0, FS 18:1
PE 34:2	FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1	FS 16:1, FS 18:1	FS 17:1

Generell wurde eine höhere Verifizierungssicherheit erreicht, wenn außer Fettsäuren noch andere molekülspezifische Fragmente gefunden werden. Der Grund dafür ist, dass Fettsäuren häufig Kontaminanten sind. Mögliche Quellen könnten die Laborluft, das ESI-Spraygas, Lösungsmittel oder Labor-Materialien sein. Zu den Haupt-Fettsäurekontaminanten gehören besonders die Fettsäuren 16:0, 18:0 und 18:1 (Daten nicht gezeigt). Auffällig war, dass bei AIF im Vergleich zu targeted-MS/MS und top5 mehr Fettsäure-Fragmente gefunden wurden und Fragmente mit einer abgespaltenen Fettsäure („min. FS“). Der Grund dafür ist vermutlich die mildere Fragmentierung bei AIF.

Die gleiche Untersuchung wurde auch mit Cardiolipin-Spezies durchgeführt. Im Vergleich zu Diacylglycerophospholipiden zeigen CL ein deutlich komplexeres Fragmentierungsverhalten. Sie besitzen insgesamt vier Acylreste und die Fragmentierung der Moleküle ist an vielen Stellen möglich. Ein Angriffspunkt für die Fragmentierung ist die Esterbindung an Glycerin-

Molekülen (FS) und die Fragmentierung an der Glycerophosphatbindung (G-P und G-P-G). Die Ergebnisse von gemischten Full-MS-Experimenten mit AIF, targeted-MS/MS und top5 mit bakteriellen CL-Spezies sind in Tabelle 16 gezeigt. Bei AIF wurden genau wie bei den in Tabelle 15 gezeigten Ergebnissen für PE- und PG-Spezies mehr Fragmente bei den AIF-Experimenten gefunden. Neben Fettsäuren wurden auch Fragmente gefunden, bei denen ein Teil des Cardiolipins fehlt (G-P), sowie Fragmente, bei denen ein Phosphat fehlt (G-P-G). Dies führte im Fall der AIF-Scans zu einer Erhöhung der Spezifität.

Tabelle 16

Untersuchung von *E. coli*-CL-Spezies mit drei unterschiedlichen Fragmentierungs-Methoden. Die CL-Spezies stammen aus MTBE-Extrakten von *E. coli* K12 TB1. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-MS/MS-Messungen im Negativmodus mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 45% (QExactive, Thermo). Die Auswertung der Daten erfolgte mit MassMap. FS: Fettsäure, AIF: *all ions fragmentation*, G-P: Glycerinphosphat, G-P-G: Glycerinphosphatglycerin.

Lipidspezies	AIF	targeted-MS/MS	top5
CL 64:2	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 15:0 G-P FS 16:0, G-P FS 16:1, G-P FS 17:1, G-P FS 15:0 G-P-G FS 16:0, G-P-G FS 17:1	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 15:0	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1
CL 65:2	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 15:0, FS 18:1 G-P FS 16:0, G-P FS 16:1, G-P FS 17:1, G-P FS 15:0, G-P FS 18:1 G-P-G FS 16:0, G-P-G FS 17:1	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1
CL 66:2	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1 G-P FS 16:0, G-P FS 16:1, G-P FS 17:1, G-P FS 18:1 G-P-G FS 16:0, G-P-G FS 17:1	FS 15:0, FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1	FS 15:0, FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1
CL 67:2	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1 G-P FS 16:0, G-P FS 17:1, G-P FS 18:1 G-P-G FS 16:0, G-P-G FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1
CL 68:2	FS 16:0, FS 16:1, FS 17:1, FS 18:1 G-P FS 16:0, G-P FS 16:1, G-P FS 17:1, G-P FS 18:1 G-P-G FS 16:0, G-P-G FS 17:1	FS 16:0, FS 17:1	FS 15:0, FS 16:0, FS 17:1, FS 18:1

4.3. Untersuchung von TG-Standards mittels gemischter Full-MS/Fragmentierungsscans

Gemischte Full-MS/Fragmentierungsexperimente wie bei PE, PG und CL wurden auch mit TG-Molekülen durchgeführt. In diesem Fall erfolgte die Messung im Positivmodus, in dem TG als Ammonium-Addukte detektiert werden (UPLC-Laufmittel mit 10 mM Ammonium-Formiat). Die Ergebnisse der Fragmentierung von fünffach deuterierten TG-Spezies mit AIF sind in Tabelle 17 gezeigt. Es wurden einfachgeladene Fragmente gefunden, die einen Verlust des Ammonium-Addukts sowie einen Wasser-Verlust aufwiesen („DG min. H₂O“). In der Tabelle sind auch die Retentionszeiten der intakten Molekülen und der Fragmente angegeben. Im Folgenden werden Signale dann als koeluiierend bezeichnet, wenn die Retentionszeitunterschiede weniger als 0,03 min betragen. Bei allen Standards lag eine

Koelution mit den zugehörigen Fragmenten (Diff. Retentionszeiten = 0,01 min) vor. Alle Standards waren mit Hilfe der Fragmente eindeutig identifizierbar.

Tabelle 17

Fünffach deuterierte kommerziell erhältliche TG-Standards und zugehörige AIF-Fragmente. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-MS/MS-Messungen im Positivmodus mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 35% (QExactive, Thermo). Die Auswertung der Daten erfolgte mit MassMap. Für die Intaktmassen und die zugehörigen Fragmente sind die Retentionszeiten und die Intensitäten angegeben. d5: fünffach deuteriert, FS: Fettsäure, AIF: *all ions fragmentation*, min. H₂O: Wasserverlust.

TG-Spezies (<i>sn-1/sn-2/sn-3</i>)	AIF-Fragmente	Retentionszeit [min]	Intensität [bel. Einheit]
TGd5 62:16 (20:5/22:6/20:5)		17.77	5.04E+10
	DG 40:10 min. H ₂ O	17.76	1.90E+09
	DG 42:11 min. H ₂ O	17.76	4.94E+09
TGd5 58:11 (20:4/18:3/20:4)		18.99	3.92E+10
	DG 40:8 min. H ₂ O	18.98	7.59E+08
	DG 38:7 min. H ₂ O	18.98	7.44E+09
TGd5 44:1 (14:0/16:1/14:0)		19.07	8.22E+09
	DG 30:1 min. H ₂ O	19.07	4.53E+10
	DG 28:0 min. H ₂ O	19.07	2.23E+10
TGd5 58:7 (20:2/18:3/20:2)		19.93	1.54E+10
	DG 40:4 min. H ₂ O	19.92	4.99E+10
	DG 38:5 min. H ₂ O	19.93	5.61E+09
TGd5 48:1 (15:0/18:1/15:0)		20.19	9.86E+09
	DG 33:1 min. H ₂ O	20.18	5.05E+10
	DG 30:0 min. H ₂ O	20.19	2.58E+10
TGd5 51:1 (17:0/17:1/17:0)		20.96	3.55E+10
	DG 34:1 min. H ₂ O	20.95	1.84E+10
TGd5 50:0 (16:0/18:0/16:0) oder (19:0/12:0/19:0)		21.21	2.38E+10
	DG 32:0 min. H ₂ O	21.22	1.55E+09
	DG 38:0 min. H ₂ O	21.22	2.78E+09
	DG 31:0 min. H ₂ O	21.22	9.15E+09
TGd5 60:1 (20:0/20:1/20:0)		23.02	9.82E+09
	DG 40:1 min. H ₂ O	23.03	5.27E+09

Im Fall von mindestens zwei identifizierten Fragmenten wies das Intensitäts-Verhältnis der Fragmente auf das Fettsäure-Verhältnis im TG-Molekül hin, d.h. die höhere Intensität wurde für dasjenige Fragment gefunden, das aus der Abspaltung der häufiger vorkommenden Fettsäure entstand. Dies traf für die Mehrzahl der untersuchten TG-Spezies zu. In dieser Arbeit wurden noch weitere TG-Standards, diesmal ohne Deuterierung, untersucht. Verglichen wurden die Ergebnisse von AIF und targeted-MS/MS. Die Ergebnisse des Full-MS/AIF-Experiments sind in Tabelle 18 gezeigt. Alle Standards wurden mittels zugehöriger Fragmente identifiziert, obwohl bei den beiden Standards TG 52:4 und TG 46:0 jeweils nur ein Fragment gefunden wurde. Wie zuvor bereits beobachtet, wies das Fragment, das aus

Abspaltung der häufiger vorkommenden Fettsäure entstanden ist, wiederum eine höhere Intensität auf.

Tabelle 18

TG-Standards und zugehörige AIF-Fragmente. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-MS/MS-Messungen im Positivmodus mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 35% (QExactive, Thermo). Die Auswertung der Daten erfolgte mit MassMap. Für die Intaktmassen und die zugehörigen Fragmente sind die Retentionszeiten und die Intensitäten angegeben. FS: Fettsäure, AIF: *all ions fragmentation*, min. H₂O: Wasserverlust.

TG-Spezies (<i>sn-1/sn-2/sn-3</i>)	AIF-Fragmente	Retentionszeit [min]	Intensität [bel. Einheit]
TG 56:10 (20:5/20:5/16:0)		18.68	1.63E+11
	DG 36:5 min. H ₂ O	18.69	1.92E+10
	DG 40:10 min. H ₂ O	18.69	2.80E+09
TG 52:4 (18:2/18:2/16:0)		19.83	3.16E+10
	DG 34:2 min. H ₂ O	19.83	1.06E+10
TG 46:0 (16:0/14:0/16:0)		20.21	3.52E+10
	DG 30:0 min. H ₂ O	20.20	1.63E+10
TG 52:1 (16:0/18:1/18:0)		21.18	1.91E+10
	DG 32:0 min. H ₂ O	21.19	2.05E+08
	DG 34:1 min. H ₂ O	21.19	4.89E+09
TG 54:2 (18:0/18:2/18:0)		21.25	1.84E+09
	DG 36:0 min. H ₂ O	21.26	2.79E+08
	DG 36:2 min. H ₂ O	21.26	8.32E+08
TG 56:2 (18:1/18:1/20:0)		21.63	1.65E+10
	DG 36:2 min. H ₂ O	21.64	4.44E+09
	DG 38:1 min. H ₂ O	21.64	7.46E+09

In Tabelle 19 sind die den Full-MS/AIF-Experimenten entsprechenden Ergebnisse für die Full-MS/targeted-MS/MS-Untersuchungen gezeigt. Alle TG-Standards konnten anhand der gefundenen Fragmente eindeutig identifiziert werden. Im Vergleich zu AIF wiesen die targeted-MS/MS-Analysen eine noch höhere Spezifität auf, z.B. bei TG 52:1. Es war auffällig, dass die Intensitäten bei targeted-MS/MS-Fragmenten bis zu einem Faktor 10 geringer waren als die der AIF-Fragmente. Dies hatte vermutlich damit zu tun, dass es sich bei AIF im Vergleich zu targeted-M/MS um eine mildere Fragmentierungsmethode handelt, da bei AIF die Fragmentierung des gesamten Ionenpakets erfolgt und bei targeted-MS/MS eine Auswahl der Precursor stattfindet.

Tabelle 19

TG-Standards und zugehörige targeted-MS/MS-Fragmente. Bei den Messungen handelt es sich um UPLC-MS/MS-Messungen im Positivmodus mit einer normierten Kollisionsenergie (NCE) von 35% (QExacte, Thermo). Die Auswertung der Daten erfolgte mit MassMap. Für die molekularen Ionen und die zugehörigen Fragmente sind die Retentionszeiten und die Intensitäten angegeben. FS: Fettsäure, AIF: *all ions fragmentation*, min. H₂O: Wasserverlust.

TG-Spezies (<i>sn-1/sn-2/sn-3</i>)	Fragmente targeted-MS ²	Retentionszeit [min]	Intensität [bel. Einheit]
TG 56:10 (20:5/20:5/16:0)		18.66	2.78E+11
	DG 36:5 min. H ₂ O	18.67	2.71E+08
	DG 40:10 min. H ₂ O	18.68	2.34E+07
TG 52:4 (18:2/18:2/16:0)		19.84	5.75E+10
	DG 34:2 min. H ₂ O	19.84	6.66E+08
	DG 36:4 min. H ₂ O	19.84	2.80E+08
TG 46:0 (16:0/14:0/16:0)		20.22	5.98E+10
	DG 30:0 min. H ₂ O	20.21	1.29E+09
	DG 32:0 min. H ₂ O	20.23	4.59E+08
TG 52:1 (16:0/18:1/18:0)		21.21	3.52E+10
	DG 34:0 min. H ₂ O	21.20	2.99E+08
	DG 34:1 min. H ₂ O	21.22	3.82E+08
	DG 36:1 min. H ₂ O	21.22	3.54E+08
TG 54:2 (18:0/18:2/18:0)		21.28	3.59E+09
	DG 36:0 min. H ₂ O	21.29	2.58E+07
TG 56:2 (18:1/18:1/20:0)		21.68	3.49E+10
	DG 36:2 min. H ₂ O	21.66	3.07E+08
	DG 38:1 min. H ₂ O	21.66	5.77E+08

4.4. Zusammenfassende Diskussion

Untersucht wurden in dieser Arbeit *E. coli*-Lipidspezies und TG-Standardspezies, d.h. geladene Lipide wie die der Klassen PE und PG und neutrale Lipide wie TG von komplett gesättigt bis mehrfach ungesättigt, mit gemischten Full-MS/Fragmentierungsscans. Im Negativmodus wurden Fettsäuren als vorherrschende Fragmente gefunden. Da Fettsäuren üblicherweise als Kontaminanten in Messungen auftreten, sind häufig zusätzliche Fragmente erwünscht. Die vorherrschenden Fragmente bei der Fragmentierung von TG-Standards im Positivmodus waren Fragmente mit einer abgespaltenen Fettsäure, die einen Verlust des Ammonium-Addukts sowie einen Wasserverlust aufwiesen (DG-H₂O). Der Vergleich von AIF mit targeted-MS/MS und topN für *E. coli*-Lipidspezies ergab, dass alle PE- und PG-Spezies mit allen drei Fragmentierungs-Methoden eindeutig identifiziert werden konnten. Bei AIF wurden aufgrund der mildereren Art der Fragmentierung mehr Fragmente gefunden als bei targeted-MS/MS und top5. Die höhere Anzahl an Fragmenten bei AIF und die höhere Massenauflösung dienen damit als Ausgleich für die geringere Spezifität von AIF-Scans. AIF lieferte bei chemisch reinen Proben ohne Koelution von Spezies qualitativ gleichwertige

Ergebnisse zu deutlich spezifischeren Fragmentierungsmethoden wie targeted-MS/MS. Bei den top5-Experimenten handelt es sich bezüglich der Spezifität um eine Mischung aus AIF und targeted-MS/MS. Hier werden die intensivsten Signale zu einem gegebenen Zeitbereich fragmentiert. Dies bringt oft keine wirklichen Vorzüge, da die Auflösung nicht so hoch ist wie bei AIF und die Spezifität nicht mit der von targeted-MS/MS-Scans vergleichbar ist. Der Einsatz von topN-Scans kann, genauso wie der von AIF-Scans, allerdings nützlich sein für eine erste Charakterisierung von komplexen Proben. Für eine erste Lipidom-Charakterisierung ist die Verwendung von gemischtem Full-MS/AIF-Experiment in Positiv- und Negativmodus sinnvoll. Damit kann eine Vielzahl an Informationen aus einem einzigen UPLC-Lauf mit einer Laufzeit von 30 min gewonnen werden. Bei sehr komplexen Proben könnte dies nicht ausreichend sein. Dort ist eine genauere Spezies-Charakterisierung mit targeted-MS/MS-Experimenten mit möglichst hoher Datenpunkt-Dichte nötig.

MassMap hat sich als geeignetes Software-Tool für die Auswertung von Datensätzen mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Scanmethoden erwiesen. Die Software bietet die Möglichkeit einer benutzerfreundlichen Bewertung aller identifizierten Signale und der Suche nach großen Listen von Molekülen. Aus diesem Grund wurde MassMap für die Datenauswertung aller im Folgenden gezeigten Daten verwendet.

5. Quantitative Regioisomer-Analyse von gemischten Diacylglycerophospholipiden (dGPL) mit UPLC-targeted-MS/MS

Neben der Charakterisierung von Lipidspezies und Lipidspeziesvarianten in biologischen Proben steht auch die Regioisomer-Charakterisierung von Phospholipidspezies mit zwei oder mehr verschiedenen Fettsäureacylresten immer mehr im Fokus ([90], [91]). Gemischte dGPL bestehend aus den Acylgruppen A und B treten als die beiden Regioisomere $A(sn-1)/B(sn-2)$ und $B(sn-1)/A(sn-2)$ auf. Für eine detaillierte Charakterisierung von Lipidspezies-Regioisomeren ist üblicherweise eine Derivatisierung, ein enzymatischer Verdau, z.B. mit PLA_2 , oder ein zusätzliches MS-Modul, z.B. *ion mobility*, nötig [92]. Aktuell existieren mehrere MS-basierte Methoden für die quantitative Analyse von Regioisomer-Mischungen. Eine Methode ist die so genannte Differentielle Mobilitäts-Massenspektrometrie (DMS), die in Schneider et al. 2016 zusammengefasst ist und die eine zusätzliche Trenndimension vor der MS/MS-Analyse bietet. Mit DMS wurde eine fast vollständige Basislinien-Trennung der beiden Regioisomere PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 erreicht, wodurch eine Quantifizierung der relativen Anteile der beiden Regioisomere möglich ist [92]. Ein anderer Ansatz besteht in der Generierung von Fragmentationen mit regiospezifischen m/z-Werten mittels der Kombination von Kollisions- und Ozon-induzierter Dissoziation (ESI-CID-/OzID) [93]. Eine weitere, vor Kurzem veröffentlichte Methode besteht in der Regioisomer-Analyse kombiniert mit der Bestimmung der Doppelbindungsposition mit Hilfe von MS^3 . Dabei wird eine Kombination von CID (*collision-induced dissociation*) und anschließender Photodissoziation eingesetzt [94]. Hierfür ist allerdings, genauso wie bei DMS, eine Modifizierung der MS-Instrumentation notwendig.

Im Folgenden wird eine neuartige Methode für die quantitative Regioisomer-Analyse von dGPL mit Hilfe von Fettsäureanionen-Quotienten vorgestellt. Fettsäure-Fragmente sind hochintensive Fragmente von dGPL im Negativmodus. Die relative Intensität von Fettsäure-Fragmenten ist stark abhängig von den experimentellen Bedingungen, der GPL-Klasse und auch vom Typ der Fettsäuren [91]. Bei den hier gezeigten Fragmentierungsdaten handelt es sich um Daten aus UPLC-targeted-MS/MS-Experimenten im Negativmodus. Die entwickelte Methode wurde sowohl für dGPL-Spezies aus biologischen Proben sowie für kommerziell erhältliche Standards getestet. Zusätzlich werden noch zwei andere komplementäre Methoden für die Regioisomer-Analyse im Detail vorgestellt und es wird eine graphische Methode für die Visualisierung der Regioisomer-Reinheit präsentiert.

5.1. Etablierung des Verfahrens zur Analyse von Fettsäureanionen-Fragmenten aus UPLC-MS/MS-Experimenten für Regioisomer-Analysen

Wie zuvor erwähnt, treten dGPL mit den Acylgruppen A und B als die beiden Regioisomere $A(sn-1)/B(sn-2)$ und $B(sn-1)/A(sn-2)$ auf. Dies ist in Abbildung 33 schematisch gezeigt.

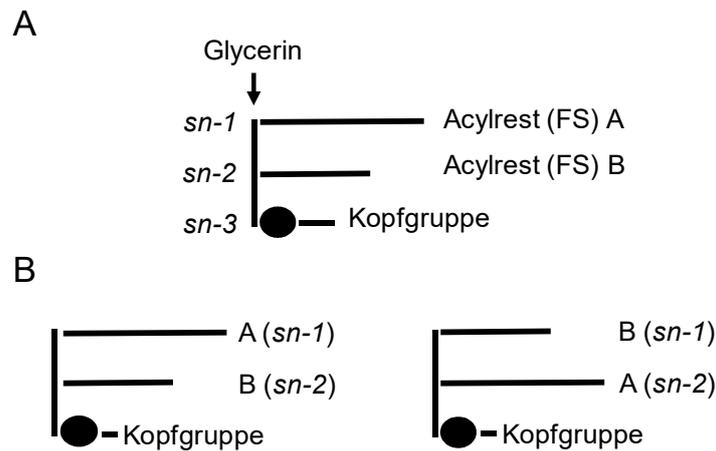


Abbildung 33

Schematische Struktur von Glycerophospholipiden und Regioisomer-Varianten. In A ist die Struktur eines dGPL-Moleküls gezeigt, das die beiden Acylreste A und B und die mit einer Phosphodiesterbindung (Phosphat: ●) verknüpfte Kopfgruppe umfasst. In B sind die beiden Regioisomer-Varianten $A(sn-1)/B(sn-2)$ und $B(sn-1)/A(sn-2)$ gezeigt.

In Abbildung 34 ist schematisch dargestellt, welche Informationen aus LC-MS-Analysen auf dem MS^1 - und MS^2 -Level für ein hypothetisches dGPL-Molekül PX 34:2 mit potentiellen Regioisomer-Varianten erhalten werden können. Um die Information im Fall der Analysen vom Typ b), d.h. falls empirisch gefunden wird, dass die beiden Acylisomere PX 16:1_18:1 und PX 16:0_18:2 chromatographisch getrennt sind, zu erhalten, können auch nicht zielgerichtete Fragmentierungsscans wie AIF und topN verwendet werden. Um die Regioinformation ohne eine solche Trennung anhand der Analysen vom Typ c) zu erhalten, müssen targeted-MS/MS-Scans verwendet werden. Moleküle, für die keine Information zum Vorliegen von entsprechenden Regioisomer-Varianten vorliegt, werden im Folgenden als Proben bezeichnet.

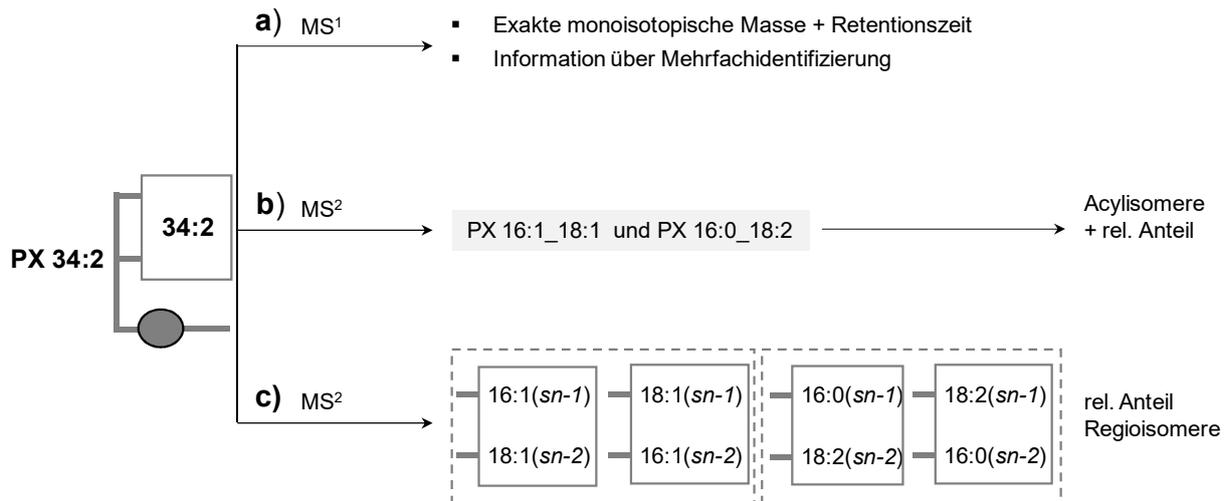


Abbildung 34

Schematische Darstellung der Informationen, die auf LC-MS(MS^1)-Level und LC-MS/MS(MS^2)-Level für ein hypothetisches GPL-Molekül PX 34:2 erhalten werden. X: Kopfgruppe, graues Oval: Phosphatgruppe. Die Schreibweise PX 16:1_18:1 bedeutet, dass keine Regioinformation zu den Fettsäuren vorliegt [35].

Das Ergebnis von targeted-MS/MS-Analysen im Negativmodus für zwei kommerziell erhältliche PC 34:1-Standardproben ist in Abbildung 35 gezeigt. In Abbildung 35 A ist PC 16:0/18:1 und in Abbildung 35 B ist PC 18:1/16:0 gezeigt. Bei beiden Proben wurde für das Fragment der *sn*-2-Position eine höhere Intensität als für das in der *sn*-1-Position gefunden. Es ist bekannt, dass die Ionenintensitäten der Fettsäure-Fragmente von PCs unterschiedlich sind, und dass die *sn*-2-Position mit einem höheren Anteil zu finden ist (Huang et al. 1992). Das *sn*-2/*sn*-1-Verhältnis beträgt üblicherweise 2-3 [95].

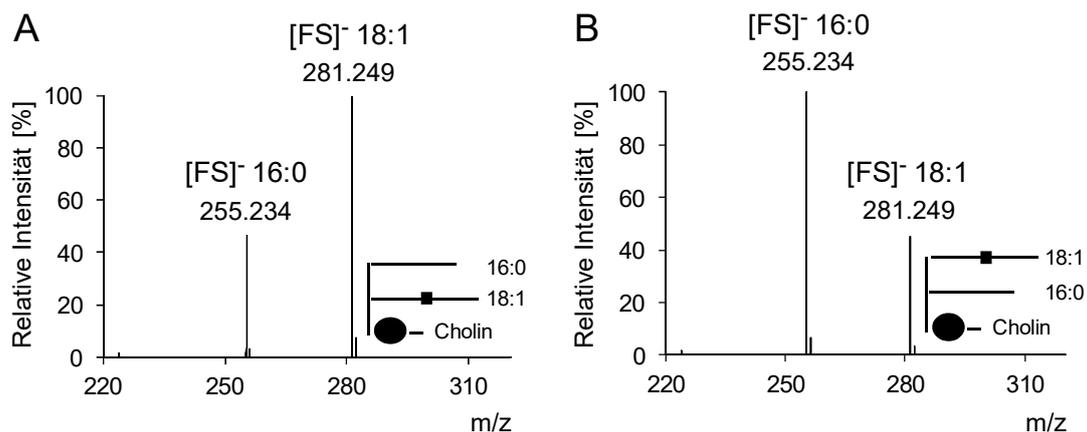


Abbildung 35

UPLC-targeted-MS/MS-Analysen von zwei kommerziell erhältlichen PC 34:1-Standardproben im Negativmodus. In A sind das Spektrum von PC 16:0(*sn*-1)/18:1(*sn*-2) und die zugehörige schematische Struktur gezeigt. In B sind entsprechend das Spektrum von PC 18:1(*sn*-1)/16:0(*sn*-2) und die zugehörige Struktur gezeigt. Für die targeted-MS/MS-Analysen wurde das Formiataddukt-Ion ($[M+Formiat]^-$) mit einem m/z -Wert von 804.576 als Precursor ausgewählt. [FS]⁻: Fettsäureanion. Schematische Darstellung der Phosphatgruppe als schwarzes Oval und der Doppelbindung als schwarzes Quadrat.

Von den beiden oben gezeigten PC 34:1-Standardproben wurden Datensätze mit alternierenden Full-Scans und Fragmentierungsscans aufgenommen. Dadurch, dass pro UPLC-Lauf nur jeweils eine Standardprobe mit targeted-MS/MS fragmentiert wurde, konnte sowohl für die molekularen Ionen als auch für die Fragmente die komplette chromatographische Information über den UPLC-Peak erhalten werden. In Abbildung 36 A und B sind die *selected ion current chromatograms* (SICs) der molekularen Ionen der beiden Standardproben PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 zusammen mit den zugehörigen *sn-2/sn-1*-Fettsäureanion ([FS⁻]) -Intensitätsverhältnissen gezeigt. In Abbildung 36 C und D sind die SICs der beiden Fettsäureanionen mit *m/z* 255 (FS 16:0) und *m/z* 281 (FS 18:1) im Overlay-Modus gezeigt. Durch die Normierung auf die maximale Intensität wurden die absoluten Intensitätsunterschiede der beiden Fragmente eliminiert. Dadurch wurde deutlich, dass zwischen den [FS⁻]-SICs bei beiden Standardproben minimale Retentionszeitunterschiede vorlagen. Diese Unterschiede liegen in der Größenordnung von 200-500 ms. Diese Retentionszeitverschiebung wurde bei der Standardprobe PC 16:0/18:1 am deutlichsten an der Peak-Vorderflanke beobachtet, während sie bei der Standardprobe PC 18:1/16:0 am deutlichsten an der hinteren Flanke des UPLC-Peaks zu beobachten war.

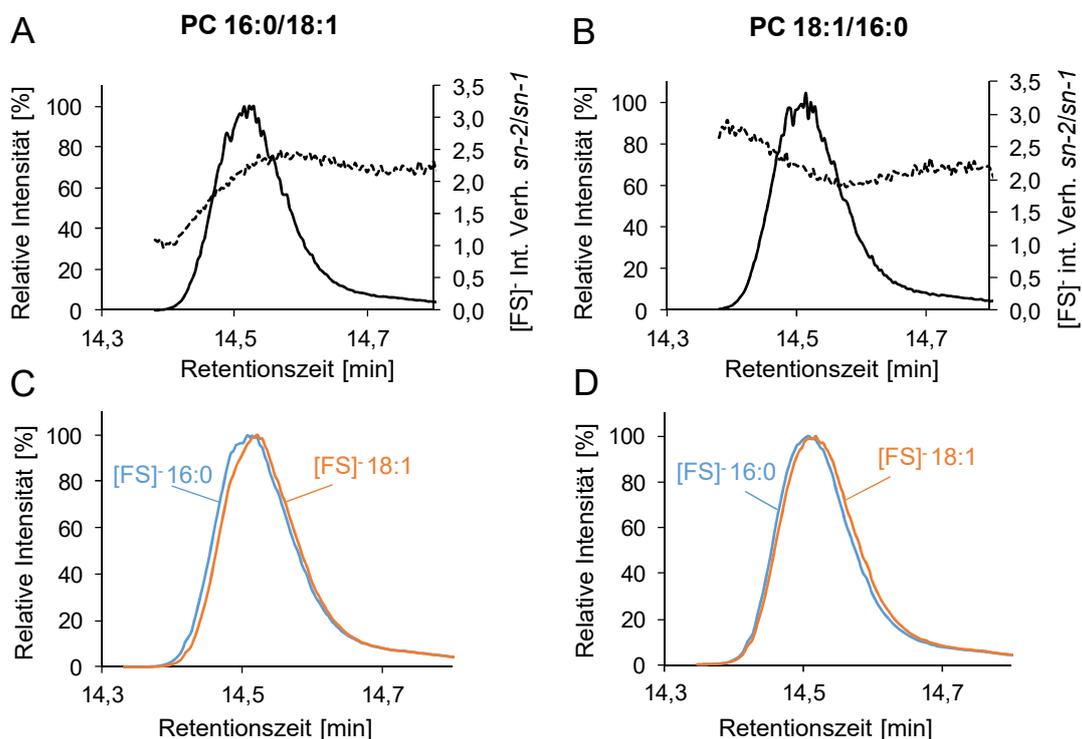


Abbildung 36

UPLC-MS/MS-Daten für zwei PC 34:1-Regioisomer-Standardproben. Elutionsprofile aus Full-MS-Scans (durchgezogene dünne schwarze Kurve) und zugehörige *sn-2/sn-1*-Intensitätsverhältnisse von Fettsäureanionen ([FS⁻]) aus targeted-MS/MS-Scans (gestrichelte dünne schwarze Kurve) für PC 16:0/18:1 (A) und PC 18:1/16:0 (B). Int. Verh.: Intensitätsverhältnis. SIC-Elutionsprofile von targeted-MS/MS-Analysen der [FS⁻]-Fragmente *m/z* 255 (blau) und *m/z* 281 (orange) von PC 16:0/18:1 (C) und PC 18:1/16:0 (D). Die Fragmentionen-SICs wurden auf die Intensität des Maximums normiert.

Zusätzlich zu den leicht gegeneinander verschobenen [FS]⁻-SICs war auffällig, dass die *sn-2/sn-1*-Verhältnisse beider untersuchter Standardproben einen nicht konstanten Verlauf über den UPLC-Peak aufwiesen (Abbildung 36 A und B). Im Fall der Probe PC 16:0/18:1 nahm das *sn-2/sn-1*-Verhältnis von der Vorderflanke zur Hinterflanke des UPLC-Peaks zu, während bei der Standardprobe PC 18:1/16:0 das gegenteilige Verhalten zu beobachten war. Beide Befunde weisen darauf hin, dass es sich bei beiden Standardproben um nicht vollständig regioisomerreine Moleküle handelt. Im Folgenden sollte unter Zuhilfenahme von Simulationen dieser Befund der Retentionszeitverschiebungen zwischen den [FS]⁻-SICs und der nicht konstanten *sn-2/sn-1*-Verhältnisse verifiziert werden. Dafür wurden die in Kapitel 5.2. bestimmten Regioisomerreinheits-Werte für die beiden Proben PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 verwendet. Die gefundenen Verunreinigungen waren für PC 16:0/18:1 18% und für PC 18:1/16:0 12%. Bei den Simulationen wurde das *sn-2/sn-1*-Verhältnis auf 3 festgelegt, wie es für die beiden untersuchten PC-Moleküle näherungsweise gefunden wurde. Für das acylinvertierte Regioisomer wurde jeweils ein Wert von 1/3 verwendet. Dieser Wert ist zu erwarten, falls die Ausbeuten der Acyl-Anionen nur von der Position und nicht von der detaillierten Struktur der Acyl-Reste abhängen. Die Ergebnisse der Simulationen sind in Abbildung 37 gezeigt. Die beiden Proben wurden als Probe PX FS1/FS2 und als Probe PX FS2/FS1 bezeichnet. Als simulierte Peaks der reinen Regioisomere, in der Abbildung als Isomer I und Isomer II bezeichnet, wurden Gauß-Peaks mit einer FWHM-Breite von ca. 0,2 min verwendet. Dieser Wert entspricht den in dieser Arbeit für experimentell gefundene UPLC-Peaks gefundenen Werten. Als Retentionszeitverschiebung zwischen den beiden reinen Regioisomeren wurde, um eine möglichst gute Übereinstimmung mit dem Experiment von Abbildung 36 zu erreichen, ein Wert von 0,04 min gewählt. Gezeigt sind die Summen der SICs der molekularen Ionen der zwei nicht regioisomerreinen Proben PX FS1/FS2 (A) und PX FS2/FS1 (D), die normierten [FS]⁻-SICs (B, E) und die in der Simulation verwendeten SICs der molekularen Ionen der isomerenreinen Moleküle (C, F). Im Fall der Probe PX FS1/FS2 (A) ist eine Zunahme des *sn-2/sn-1*-Verhältnisses von der vorderen bis zur hinteren Flanke des UPLC-Peaks zu beobachten, während bei der Probe PX FS2/FS1 eine Abnahme des *sn-2/sn-1*-Verhältnisses von der vorderen bis zur hinteren Flanke des UPLC-Peaks zu beobachten ist. Die simulierte Situation entspricht somit derjenigen Situation, die bei den beiden Standardproben in Abbildung 36 experimentell gefunden wurde. Auch die in B und E simulierten normierten SICs der FS-Ionen entsprechen in wesentlichen Punkten der in Abbildung 36 in C und D gezeigten experimentell gefundenen Situation. Anhand der in Abbildung 37 C und F gezeigten Situation konnte somit simuliert werden, dass, unter der Annahme, dass Isomer I der Standardprobe PC 16:0/18:1 entspricht und Isomer II der Standardprobe PC 18:1/16:0,

die Probe 18:1/16:0 als Verunreinigung früher als Probe 16:0/18:1 eluiert und bei der Probe 18:1/16:0 die Probe 16:0/18:1 am hinteren Teil des Peaks eluiert.

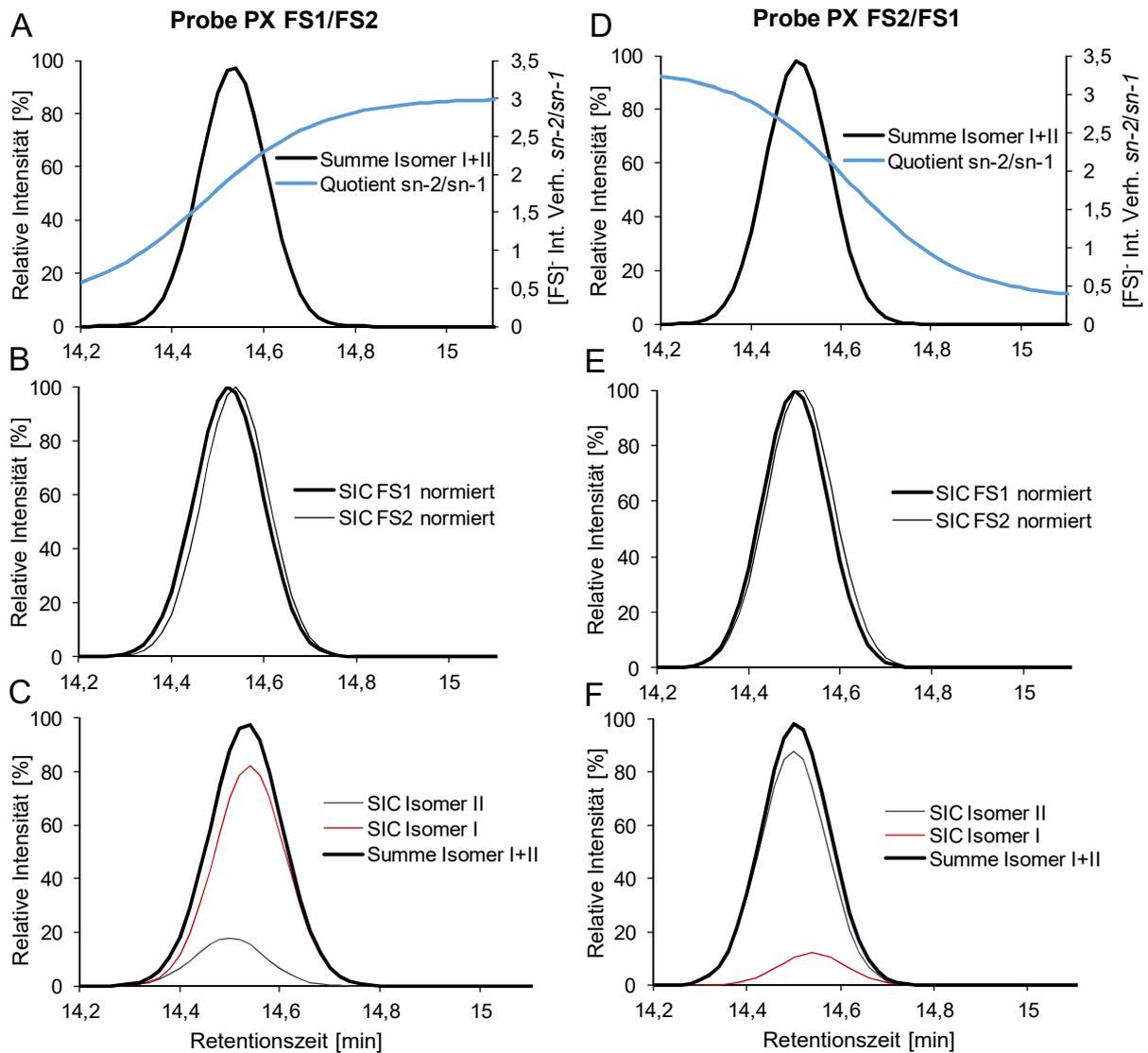


Abbildung 37

Simulation der Analyse von zwei mit dem jeweiligen invertierten Regioisomer verunreinigten PX-Proben. Die beiden reinen Regioisomere werden im Folgenden als Isomer I und Isomer II bezeichnet. Die angenommenen Verunreinigungen der Proben PX FS1/FS2 und PX FS2/FS1 mit dem jeweils acylinvertierten Regioisomer entsprechen den für die Standards PC 16:0/18:1 bzw. PC 18:1/16:0 gefundenen Werten (18% bzw. 12%). Für die maximalen $sn-2/sn-1$ -Verhältnisse der reinen Isomere I wurde ein Wert von 3 verwendet. Die Peaks der reinen Regioisomere sind Gauß-Peaks mit einer FWHM-Breite von ca. 0,2 min. (A),(D) Simulierte Summen-SICs der molekularen Ionen und zugehörige $sn-2/sn-1$ -Quotienten für die beiden Proben PX FS1/FS2 und PX FS2/FS1. (B),(D) Overlay der auf die maximale Intensität normierten SICs der Fettsäuren FS1 und FS2. (C),(F) Simulierte Summen-SICs der molekularen Ionen und der den Summen zugrunde liegenden SICs der beiden reinen Regioisomere. Als Retentionszeitunterschied zwischen den reinen Isomeren I und II wurde ein Wert von 0,04 min gewählt.

Anhand der Simulation würde man erwarten, dass sich das *sn-2/sn-1*-Verhältnis in Abbildung 36 A im hinteren Bereich des Peaks asymptotisch an den Wert des reinen Isomers I annähern sollte. In gleicher Weise sollte sich der Quotientenwert für die Probe 18:1/16:0 in Abbildung 36 B im hinteren Bereich des Peaks an den reziproken Wert des reinen Isomers I annähern. Dass das erwartete Verhalten bei keiner der beiden Proben beobachtet wird, könnte ein Hinweis dafür sein, dass im Ablauf des Peaks ein isobares Molekül eluiert, dessen *sn-2/sn-1*-Verhältnis einen Wert von etwas mehr als 2 aufweist. Die Natur dieses Moleküls konnte nicht geklärt werden.

Bei targeted-MS/MS-Analysen werden neben den bereits vorgestellten Fettsäureanionen noch zwei weitere Typen von Fragmenten gefunden, die in Abbildung 38 am Beispiel der Standardprobe PC 16:0/18:1 dargestellt sind. Auf der linken Seite sind jeweils die Fragment-SICs dargestellt und auf der rechten Seite die Unterschiede in den relativen Intensitäten in Abhängigkeit der Retentionszeit. Beim ersten Fragment-Typ (Abbildung 38 A) handelt es sich um Fragmente, die in Zusammenhang mit der Kopfgruppe stehen. Gezeigt sind das Ion der Kopfgruppe als Dimethylaminophosphat-Anion (m/z 168) und das nach Kopfgruppen-Verlust übrigbleibende Anion (m/z 744). Der zweite Fragment-Typ (Abbildung 38 B) sind Fettsäureanionen, die das Resultat des Brechens der Esterbindungen am Glycerinmolekül sind. Beim dritten Fragment-Typ (Abbildung 38 C) handelt es sich um aus dem Neutralverlust von Fettsäuren resultierende Anionen. Experimentell wurde gefunden, dass es sich bei den Fettsäure-Fragmenten (Abbildung 38 B) um die prominentesten Fragmentationen der drei Typen im Negativmodus handelt. Die Fettsäureanionen weisen im Vergleich zu den beiden anderen Fragmenttypen eine um eine Größenordnung höhere Intensität auf. Dadurch bieten Fettsäuren als Fragmente den Vorteil einer sehr hohen Sensitivität, da sie auch bei sehr geringen Precursor-Ionen-Intensitäten immer noch detektierbar sind (Daten nicht gezeigt, empirischer Befund). Hinsichtlich der Unterschiede der relativen Intensitäten der Fragmente, die für die drei Fragment-Typen jeweils auf der rechten Seite der Abbildung gezeigt sind, weisen die Kopfgruppen-Fragmente die geringsten Unterschiede und die der Neutralverlust-Fragmente der Fettsäuren die höchsten Unterschiede auf. Diese Unterschiede sind gleichbedeutend mit der Spezifität der Fragmente für die fragmentierten Precursor-Ionen. Bei den Fragment-SICs in Abbildung 38 A ist eine fast vollständige Überlappung zu sehen, während bei B eine leichte Antrennung und eine stärkere Antrennung bei C zu beobachten ist. Das bedeutet, dass die Neutralverlust-Fragmente von Fettsäuren die höchste Spezifität aufweisen, gefolgt von den Fettsäureanionen. Die Fragmente, die in Zusammenhang mit der Kopfgruppe stehen, weisen praktisch keine Regioisomer-Spezifität auf. Wie zuvor bereits erwähnt handelt es sich bei PC 34:1 um eine nicht vollständig regioisomerreine Standardprobe. Dies äußert sich anhand

der in Abbildung 38 gezeigten Daten dadurch, dass bei den Fragmenten in Abbildung 38 B und C eine Antrennung der Fragmentionen-SICs zu beobachten ist. Diese ist dadurch bedingt, dass die Fragmentionen-Ausbeuten nicht konstant sind über den UPLC-Peak. Bei einem regioisomerreinen Molekül dürften weder Unterschiede in der Fragmentionen-Ausbeute noch eine chromatographische Trennung von Regioisomeren beobachtet werden.

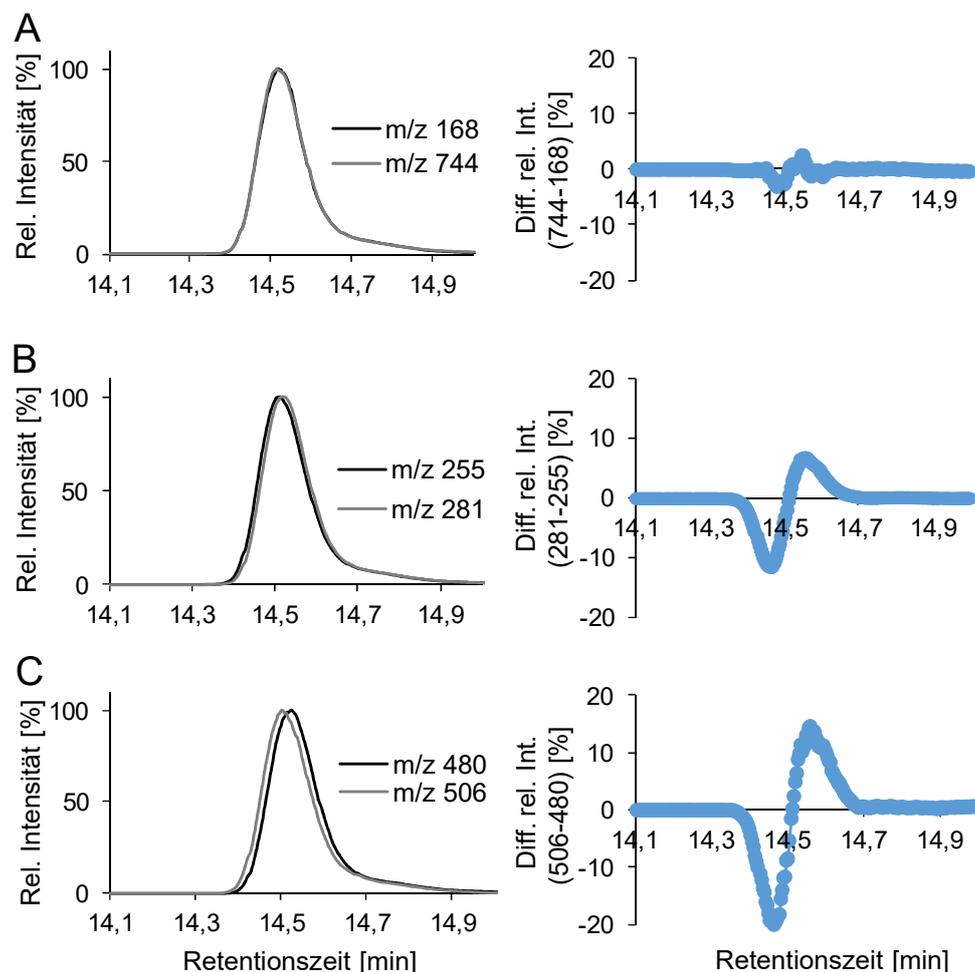


Abbildung 38

Drei unterschiedliche Fragmenttypen und die zugehörigen Unterschiede in den relativen Intensitätsanteilen für die nicht regioisomerreine Standardprobe PC 34:1(16:0/18:1). Es handelt sich um UPLC-targeted-MS/MS-Analysen im Negativmodus. Auf der linken Seite sind die auf die Peak-Maxima normierten SICs dargestellt, während auf der rechten Seite die Differenzen der relativen Intensitäten (Diff. rel. Int.) der jeweiligen Ionenpaare zu sehen sind. (A) Fragmente, die in Zusammenhang mit der Kopfgruppe stehen, d.h. das Dimethylaminophosphat-Anion (m/z 168) und das Fragment nach Kopfgruppen-Verlust (m/z 744). (B) Fettsäure-Anionen FS 16:0 (m/z 255) und FS 18:1 (m/z 281). (C) Fragmente nach Neutralverlust der Fettsäuren.

Die Rekonstruktion der experimentellen Regioisomer-SICs sowie die Details zur Bestimmung der Regioisomer-Reinheit in den beiden PC-Standardproben PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 werden im folgenden Kapitel im Detail behandelt.

5.2. Rekonstruktion von Regioisomer-SICs mittels Fragmentierungsmodul (MassMap)

Aus den Massenspektren der targeted-MS/MS-Experimente allein kann die Information über den relativen Anteil von Regioisomeren in einer Mischung nur gewonnen werden, wenn die relativen [FS]-Ionisierungsausbeuten für die beiden reinen Regioisomere bekannt sind. Es hat sich herausgestellt, dass auch ohne die Kenntnis dieser Verhältnisse eine zuverlässige Bestimmung des relativen Anteils der Regioisomere möglich ist, falls sich die beiden Regioisomere wenigstens geringfügig chromatographisch unterscheiden, und falls das $sn-x/sn-y$ -Verhältnis der SICs deutlich von eins verschieden ist. Bei den meisten GPL-Klassen handelt es sich bei $sn-x$ um die $sn-2$ -Position und bei $sn-y$ um die $sn-1$ -Position. Ausnahmen stellen Spezies der GPL-Klassen PA, PI und PS dar [91]. Die Auswertung der targeted-MS/MS-Daten erfolgte in dieser Arbeit mit der Software MassMap. Es wurden Daten der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Regioisomer-Reinheitsanalyse als neues Modul in MassMap zu implementieren. Dieses „Analyse der Fragmentchromatogramme“ genannte Modul kann eingesetzt werden, nachdem die zu den Precursor-Ionen der targeted-MS/MS-Scans gehörigen [FS]-Ionen festgelegt wurden. Die Konstruktion des Moduls ist eine Fit-Routine, die dazu dient, die SICs der reinen Regioisomere in einer Regioisomer-Mischung zu rekonstruieren.

Als erster Schritt der Rekonstruktion erfolgt die Festlegung des Zeitintervalls, in dem die für die Rekonstruktion zu verwendenden Datenpunkte liegen (im Weiteren als Fitintervall bezeichnet). Zusätzlich wird die minimale relative Intensität der Datenpunkte der [FS]-SICs festgelegt, für die die Berechnung der Quotientenwerte erfolgt (Quotienten-Limit). Die Festlegung des Fitintervalls und des Quotienten-Limits ist notwendig, um die Anpassungen nicht durch eventuelle überlappende Fremdsignale oder durch Datenpunkte sehr geringer Intensität zu verfälschen. Bei den Basis-Funktionen, die an die chromatographischen Peaks angepasst werden, handelt es sich um modifizierte Gaußpeaks, bei denen sich der Parameter für die Peakbreite kontinuierlich vom linken Peakende zum rechten Peakende verändert. Durch die kontinuierliche Veränderung dieses Parameters ist es möglich, mit einer kleinen Anzahl anzupassender Parameter asymmetrische Peakformen zu generieren, mit denen sich dennoch flexible, zufriedenstellende Anpassungen der experimentell beobachteten Peaks erreichen lassen. Details zu den verwendeten Funktionen sind in Kapitel 2.2.16. zu finden. Eine wesentliche Grundannahme der Anpassung besteht darin, dass Regioisomere abgesehen von einer leichten Retentionszeitverschiebung das gleiche chromatographische Verhalten zeigen. Das heißt, dass alle angepassten SIC-Peaks (SIC-Peak des Mutterions und Peaks der beiden [FS]-SICs) als Superposition von zwei gleichen Basis-Funktionen dargestellt werden, die geringfügig gegeneinander verschoben sind. Die dritte simultan angepasste Funktion ist der Quotient der beiden [FS]-SICs. Als wesentliches

Ergebnis der Anpassungen erhält man die Elutionsprofile der beiden reinen Regioisomerspezies, aus denen sich deren relative Anteile berechnen lassen. Diese Rekonstruktion der reinen Regioisomer-SICs ist nur möglich bei einer ausreichend hohen Datenpunktdichte der targeted-MS/MS-Daten, d.h. im Bereich von 50-200 Datenpunkten über die Peakbreite. Aus diesem Grund wurde pro UPLC-Lauf immer nur ein Molekül untersucht. Details sind in Kapitel 2.2.14. zu finden. Das Ergebnis einer solchen Auswertung ist am Beispiel der beiden Standards PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 in Abbildung 39 gezeigt. Die Retentionszeitdifferenzen für die [FS]⁻-SICs und die rekonstruierten reinen Regioisomer-SICs betragen 0.38 s bzw. 2.2 s für PC 16:0/18:1 und 0.29 s bzw. 1.8 s für PC 18:1/16:0.

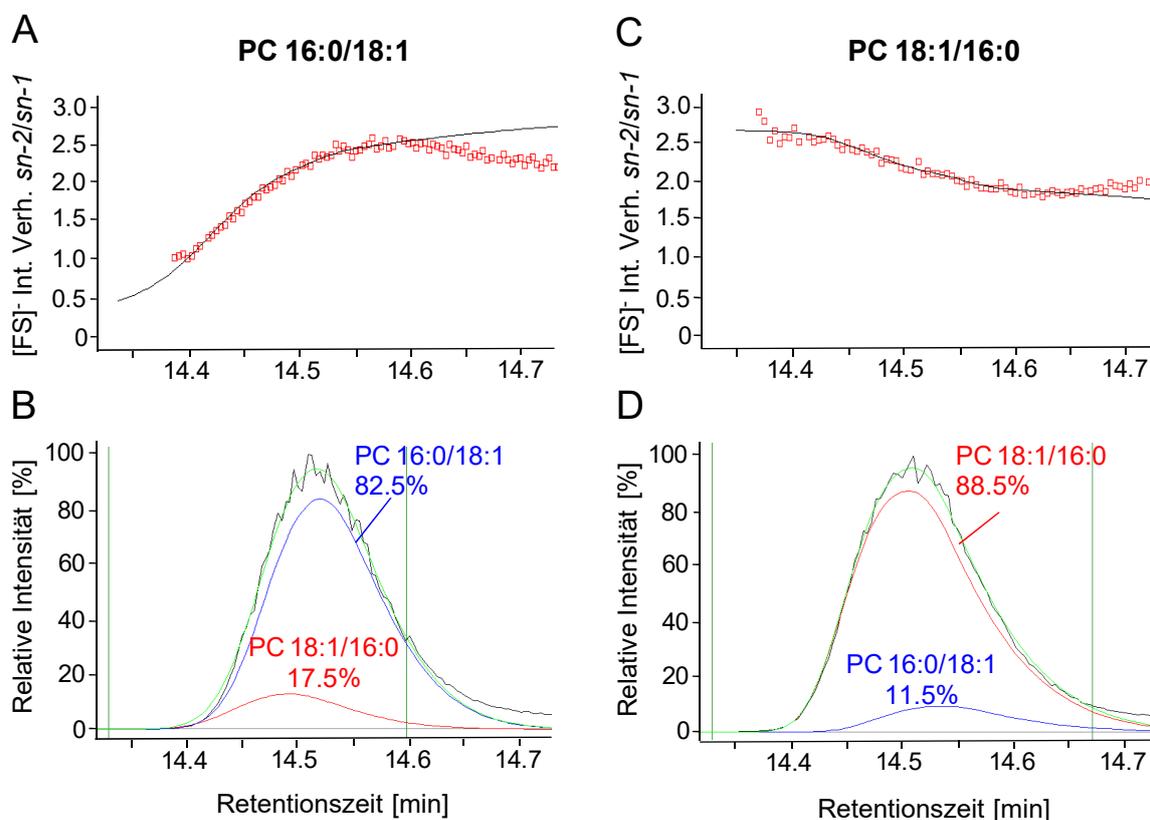


Abbildung 39

Regioisomer-Analyse mit Hilfe von MassMap für die beiden Standardproben PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0. A und C: Experimentelle (offene rote Quadrate) und angepasste (schwarz) $sn-2/sn-1$ -Verhältnisse der Fettsäureanion-([FS]⁻)-SICs für PC 16:0/18:1 bzw. PC 18:1/16:0. B: Experimenteller SIC des m/z -Wertes 804.576 der Standardprobe PC 16:0/18:1 (schwarz) und mit MassMap rekonstruierte Elutionsprofile für den reinen PC 16:0/18:1-Standard (blau), den reinen PC 18:1/16:0-Standard (rot) und die Summe beider Regioisomere (hellgrün). D: Experimenteller SIC des m/z -Wertes 804.576 der Standardprobe PC 18:1/16:0 (schwarz) und mit MassMap rekonstruierte Elutionsprofile für den reinen PC 16:0/18:1-Standard (blau), den reinen PC 18:1/16:0-Standard (rot) und die Summe beider Regioisomere (hellgrün). Die vertikalen Linien (grün) in B und D geben die Grenzen des für die Rekonstruktion verwendeten Fitintervalls an. Als Verhältniszerte wurde für das maximale $sn-2/sn-1$ -Verhältnis ein Wert von 3,1 und für das inverse Verhältnis ein Wert von 0,3 verwendet.

Wesentliche Kriterien für die Bewertung des Fits mit Hilfe des Moduls sind die Güte der Anpassung der einzelnen SICs und die Güte der Anpassung des Verlaufs des $sn-x/sn-y$ -Verhältnisses. Falls es die experimentellen Daten nicht zulassen, zuverlässige Werte für die $sn-x/sn-y$ -Verhältnisse der beiden reinen Regioisomere zu bestimmen, besteht die Möglichkeit, diese Verhältnisse fest vorzugeben. Neben den relativen Anteilen der reinen Regioisomere in einer Mischung liefert die Auswertung mit MassMap die beiden [FS]-Verhältnisswerte der beiden Regioisomere. Außerdem werden die Retentionszeitdifferenzen der reinen Regioisomere erhalten.

Wie sich aus der Analyse von chemisch synthetisierten Standards unterschiedlicher Klassen ergab, sind die Retentionsunterschiede der beiden Regioisomere abhängig von der Fettsäurekettenlänge und dem Sättigungsgrad der Fettsäuren. Dies erklärt, warum bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die bei GPL bevorzugt in der $sn-2$ -Position gefunden werden, größere Retentionszeitunterschiede der Fettsäureanionen-SICs als bei dGPL mit einfach ungesättigten Fettsäuren gefunden wurden. Die Retentionszeitunterschiede der FS-SICs und der rekonstruierten Regioisomer-SICs sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Es ist auffällig, dass die Retentionszeitunterschiede der rekonstruierten SICs um einen Faktor von 5 bis 10 größer sind als die der [FS]-SICs.

Tabelle 20

Retentionszeitunterschiede für experimentelle Fettsäureanionen-SICs und rekonstruierte Regioisomer-SICs für ausgewählte kommerziell erhältliche dGPL-Standards. Die Werte wurden mit der Software MassMap erhalten. ΔRZ : Retentionszeitunterschied, StAbw.: Standardabweichung. Bei allen Werten handelt es sich um die Ergebnisse von Vierfachmessungen.

Standard ($sn-1/sn-2$)	$\Delta RZ_{\text{FS-Anionen}} \pm \text{StAbw. [s]}$	$\Delta RZ_{\text{rekonstruierte SICs}} \pm \text{StAbw. [s]}$
PC 34:1 (16:0/18:1)	0.4 \pm 0.02	1.5 \pm 0.1
PC 36:1 (18:0/18:1)	0.2 \pm 0.01	1.2 \pm 0.1
PE 37:4 (17:0/20:4)	0.5 \pm 0.02	4.7 \pm 0.1
PI 37:4 (17:0/20:4)	0.6 \pm 0.02	6.5 \pm 1.1
PS 37:4 (17:0/20:4)	0.5 \pm 0.05	6.7 \pm 0.5

Das beschriebene Verfahren der Auswertung mit MassMap wurde sowohl für verschiedene chemisch synthetisierte Standards als auch für Proben biologischen Ursprungs eingesetzt. Die Ergebnisse sind im nächsten Kapitel zusammengefasst.

5.3. Regioisomer-Analyse von chemisch synthetisierten Standards sowie Spezies von Proben biologischen Ursprungs

Mit Hilfe des im vorherigen Kapitel beschriebenen Verfahrens wurden zunächst kommerziell erhältliche chemisch synthetisierte Lipid-Standards auf ihre Regioisomer-Reinheit hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 gezeigt. Für alle untersuchten Lipide sind neben den Werten für die Regioisomer-Reinheit auch die Werte der *sn-2/sn-1*-Quotienten der Fettsäureanionen angegeben. Bei den negativ geladenen GPL-Klassen PA, PS und PI handelt es sich bei den in der zweiten Spalte gezeigten Intensitätsquotienten um *sn-1/sn-2*-Quotienten anstelle der *sn-2/sn-1*-Quotienten, die bei den übrigen GPL-Klassen angegeben sind. Der Grund dafür ist, dass für das Fettsäureanion, das von der *sn-1*-Position stammt, bei den negativ geladenen GPL-Klassen PA, PS und PI eine größere Intensität gefunden wird [91]. Bis auf PA 37:4 weisen alle 17:0/20:4-Standards eine Regioisomer-Reinheit von über 90 bis 95% auf. Die Regioisomer-Reinheit der vier PC-Standards, d.h. zweier Paare von insgesamt vier verfügbaren chemisch synthetisierten Regioisomer-Standardpaaren, liegt unter 90%. Bei PC 18:1/18:0 wurde bei einer Reinheit von 75% eine noch höhere Verunreinigung mit dem acylinvertierten Regioisomer beobachtet.

Tabelle 21

Regioisomer-Reinheiten für chemisch synthetisierte Standards unterschiedlicher GPL-Klassen. Die Reinheitswerte und die Quotientenwerte wurden mit Hilfe der Software MassMap bestimmt. Bei den Werten in der Spalte „Mittelwert Quotient Intensität [FS]“ handelt es sich um *sn-2/sn-1*-Quotienten. Ausnahmen, bei denen es sich um *sn-1/sn-2*-Quotienten handelt, sind mit * gekennzeichnet. Alle Werte sind das Ergebnis von Vierfachmessungen. Bei den angegebenen Unsicherheiten der Mittelwerte handelt es sich um die Standardabweichungen. [FS]: Fettsäureanion.

Standard (<i>sn-1/sn-2</i>)	Mittelwert Quotient Intensität [FS]	Mittelwert Regioisomer-Reinheit [%]
PA 37:4 (17:0/20:4)	3.6 ± 0.01*	87.0 ± 1.7
PE 37:4 (17:0/20:4)	2.4 ± 0.01	95.6 ± 0.2
PS 37:4 (17:0/20:4)	2.1 ± 0.2*	99.0 ± 0.2
PI 37:4 (17:0/20:4)	1.3 ± 0.01*	93.7 ± 3.1
PC 34:1 (16:0/18:1)	2.7 ± 0.03	82.5 ± 2.5
PC 34:1 (18:1/16:0)	2.8 ± 0.02	88.5 ± 1.5
PC 36:1 (18:0/18:1)	2.8 ± 0.01	88.7 ± 0.4
PC 36:1 (18:1/18:0)	2.7 ± 0.04	74.8 ± 0.9

Neben chemisch synthetisierten Standardproben wurden auch Proben biologischen Ursprungs untersucht. Das Ziel war hierbei, zu testen, ob die Regioisomer-Reinheit von chemisch synthetisierten Lipiden der von Proben biologischen Ursprungs entspricht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 gezeigt. Analysiert wurden jeweils die Hauptspezies der Mischungen mit UPLC-targeted-MS/MS. Bei den Quotienten war zu beobachten, dass die Werte bei den negativ geladenen GPL PA und PS (nicht PI) größer wurden mit

zunehmendem Grad an ungesättigten Fettsäuren. Dies ist bei den PCs nicht zu beobachten. Bei einigen Spezies, z.B. PA 38:4 und PI 38:5, wurden zusätzlich Varianten mit anderer Fettsäurezusammensetzung gefunden. Generell wies der Großteil der analysierten Lipide eine Regioisomer-Reinheit von über $98 \pm 1-3\%$ auf.

Tabelle 22

Regioisomer-Reinheiten für ausgewählte Lipide einer PA-Mischung, einer PS-Mischung und einer kommerziell erhältlichen PC-Mischung biologischen Ursprungs. Bei der PA-Mischung handelt es sich um eine Präparation aus Hühnerlei, die PS-Mischung stammte aus Rinderhirn und die PC-Mischung wurde aus Schweineleber gewonnen. Die Quotientenwerte und die Reinheitswerte wurden mit MassMap erhalten. Bei den Werten in der Spalte „Mittelwert Quotient Intensität [FS]“ handelt es sich um *sn-2/sn-1*-Quotienten. Ausnahmen, bei denen es sich um *sn-1/sn-2*-Quotienten handelt, sind mit * gekennzeichnet. Die Werte sind das Ergebnis von Vierfachmessungen. Bei den angegebenen Unsicherheiten der Mittelwerte handelt es sich um die Standardabweichungen. [FS]: Fettsäureanion.

Spezies (<i>sn-1/sn-2</i>)	Mittelwert Quotient Intensität [FS]	Mittelwert Regioisomer-Reinheit [%]
PA 34:1 (16:0/18:1)	$2.6 \pm 0.03^*$	94.7 ± 2.5
PA 34:2 (16:1/18:1)	$2.7 \pm 0.02^*$	> 99
PA 34:2 (16:0/18:2)	$2.7 \pm 0.01^*$	> 99
PA 36:1 (18:0/18:1)	$2.8 \pm 0.05^*$	> 99
PA 36:2 (18:0/18:2)	$2.7 \pm 0.01^*$	> 98
PA 36:2 (18:1/18:1)	n.z.	n.z.
PA 38:4 (16:0/22:4)	$5.9 \pm 0.4^*$	> 99
PA 38:4 (18:0/20:4)	$3.9 \pm 0.01^*$	> 99
PA 38:5 (16:0/22:5)	$6.7 \pm 0.2^*$	> 98
PA 38:5 (18:0/20:5)	$4.6 \pm 0.1^*$	> 98
PS 36:1 (18:0/18:1)	$2.4 \pm 0.01^*$	> 99
PS 36:2 (18:1/18:1)	n.z.	n.z.
PS 36:2 (18:0/18:2)	$2.7 \pm 0.08^*$	> 99
PS 38:1 (18:1/20:0)	$2.4 \pm 0.04^*$	> 98
PS 38:1 (20:1/18:0)	$2.4 \pm 0.03^*$	> 98
PS 40:4 (18:0/22:4)	$2.7 \pm 0.01^*$	> 99
PS 40:5 (18:0/22:5)	$4.4 \pm 0.2^*$	> 99
PS 40:6 (18:0/22:6)	$5.1 \pm 0.1^*$	> 98
PI 36:1 (18:0/18:1)	$1.2 \pm 0.4^*$	> 99
PI 36:2 (18:0/18:2)	$1.0 \pm 0.004^*$	> 99
PI 38:3 (18:0/18:3)	$1.1 \pm 0.001^*$	> 99
PI 38:4 (18:0/18:4)	$1.3 \pm 0.003^*$	> 99
PI 38:5 (16:0/22:5)	$1.1 \pm 0.03^*$	> 98
PI 38:5 (18:1/20:4)	$1.2 \pm 0.02^*$	> 99
PI 38:5 (18:0/20:5)	$0.9 \pm 0.2^*$	> 98
PC 34:1 (16:0/18:1)	3.2 ± 0.03	95.9 ± 1.0
PC 34:2 (16:0/18:2)	3.1 ± 0.01	91.7 ± 2.0
PC 36:1 (18:0/18:1)	3.3 ± 0.01	95.7 ± 1.3
PC 36:2 (18:0/18:2)	3.2 ± 0.02	> 99
PC 38:3 (18:0/20:3)	3.1 ± 0.02	> 98
PC 38:4 (18:0/20:4)	2.9 ± 0.02	> 99

Zusätzlich zu den kommerziell erhältlichen biologischen Lipidmischungen wurden auch selbst präparierte Lipide von *E. coli* K12 TB1 untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammen mit den Ergebnissen einer kommerziell erhältlichen *E. coli*-Lipidmischung gezeigt. Es war dabei auffällig, dass diejenigen Lipidspezies, bei denen die längerkettige Fettsäure an der *sn-1*-Position des Glycerins gebunden ist, z.B. bei PE 34:2 und PG 34:2, nur eine Regioisomer-Reinheit von ca. 80% aufwiesen, während die übrigen Spezies im Rahmen der experimentellen Unsicherheit regioisomerrein zu sein schienen.

Tabelle 23

Regioisomer-Reinheiten für PE- und PG-Spezies einer kommerziell erhältlichen *E. coli*-Mischung und einer Lipidpräparation von *E. coli* K12 TB1. Im oberen Teil der Tabelle sind die Ergebnisse für die Spezies der kommerziell erhältlichen Mischung gezeigt, im unteren Teil die von *E. coli* K12 TB1. Die Quotientenwerte und die Reinheitswerte wurden mit Hilfe der Software MassMap erhalten. Die Werte sind das Ergebnis von Vierfachmessungen. Bei den angegebenen Unsicherheiten der Mittelwerte handelt es sich um die Standardabweichungen. [FS]: Fettsäureanion.

Spezies (<i>sn-1/sn-2</i>)	Mittelwert Quotient [FS] <i>sn-2/sn-1</i>	Mittelwert Regioisomer- Reinheit [%]
PE 31:1 (14:0/17:1)	3.1 ± 0.03	> 98
PE 32:1 (16:0/16:1)	3.1 ± 0.01	> 99
PE 33:1 (16:0/17:1)	3.1 ± 0.02	> 99
PE 34:1 (16:0/18:1)	2.8 ± 0.01	93.3 ± 0.8
PE 34:2 (18:1/16:1)	2.2 ± 0.01	82.3 ± 1.6
PG 31:1 (14:0/17:1)	2.9 ± 0.1	> 99
PG 32:1 (16:0/16:1)	2.9 ± 0.01	> 99
PG 33:1 (16:0/17:1)	2.9 ± 0.05	> 98
PG 34:1 (16:0/18:1)	2.9 ± 0.01	> 99
PG 34:2 (18:1/16:1)	2.2 ± 0.09	91.8 ± 0.4
PE 31:1 (15:0/16:1)	3.2 ± 0.03	> 99
PE 31:1 (16:0/15:1)	3.1 ± 0.02	> 99
PE 32:1 (16:0/16:1)	3.2 ± 0.01	> 99
PE 33:1 (16:0/17:1)	3.1 ± 0.02	> 99
PE 34:1 (16:0/18:1)	3.0 ± 0.01	> 97
PE 34:1 (18:0/16:1)	3.2 ± 0.05	> 99
PE 34:2 (18:1/16:1)	2.5 ± 0.01	83.5 ± 1.6
PG 31:1 (14:0/17:1)	3.0 ± 0.08	> 98
PG 32:1 (14:0/18:1)	2.6 ± 0.03	> 99
PG 32:1 (16:0/16:1)	2.9 ± 0.01	> 99
PG 33:1 (16:0/17:1)	2.9 ± 0.05	> 99
PG 34:1 (16:0/18:1)	2.8 ± 0.02	> 99
PG 34:2 (18:1/16:1)	2.1 ± 0.08	92.7 ± 1.6

5.4. Komplementäre Methoden zur Regioisomer-Analyse: PLA₂-Verdau und Mittlerer [FS]-Quotient

Die Ergebnisse der in Kapitel 5.2. vorgestellten in dieser Arbeit etablierten Methode sollten im Folgenden mit Hilfe von zwei komplementären Standardmethoden, dem Phospholipase A₂-(PLA₂)-Verdau und der Berechnung der Regioisomer-Reinheit aus dem mittleren Fragmentionen-Quotienten bestätigt werden. Beim PLA₂-Verdau handelt es sich um einen klassischen Ansatz zur Bestimmung der Reinheit von dGPL-Molekülen. Das Enzym besitzt eine hohe Spezifität für die Abspaltung von Fettsäure in *sn*-2-Position des Glycerins [96]. Wichtig für die Regioisomer-Reinheitsanalyse ist, dass die Vollständigkeit des Verdau gewährleistet sein muss. Die Entwicklung eines geeigneten Verdau-Protokolls war deshalb Teil dieser Arbeit. Es wurden die optimale Ca²⁺-Konzentration und ein für den Verdau optimales Puffersystem ermittelt (Details in Kapitel 2.2.3.). Der PLA₂-Verdau ist nur für einzelne Moleküle anwendbar, d.h. kann nicht für Mischungen eingesetzt werden, da ansonsten die Zuordnung der Verdauprodukte zum unverdauten Molekül nicht möglich ist. Der PLA₂-Verdau wurde deshalb nur für die Analyse von Standardproben eingesetzt. Die Verdauprodukte wurden mit RP-UPLC analysiert. Ein Beispiel eines solchen Chromatogramms ist in Abbildung 40 gezeigt. Es wurde durch den PLA₂-Verdau der Standardprobe PC 18:1/18:0 erhalten. Alle gezeigten Basepeak-Chromatogramme wurden auf 100% normiert, um das intakte Standardmolekül und die Fragmente auf einen Blick sehen zu können. Die Intensitätsunterschiede zwischen den PC-Lysopezies (LPC), den Fettsäuren (FS) und dem intakten unverdauten Molekül betragen in diesem Fall zwei Größenordnungen.

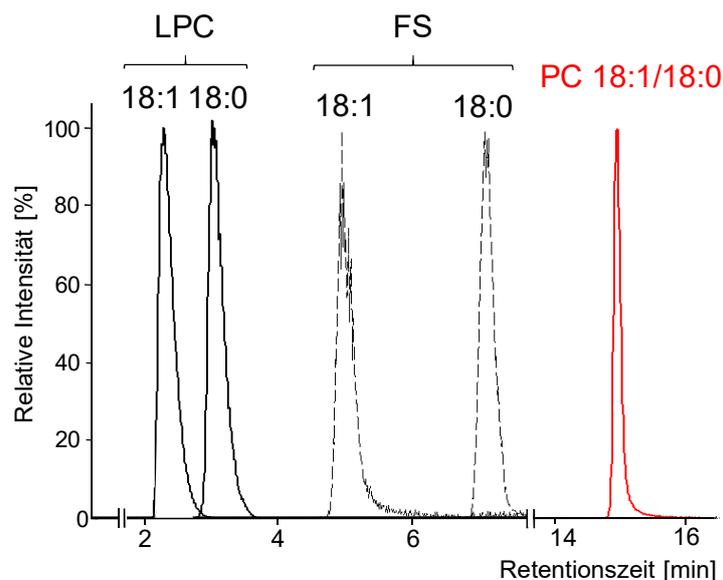


Abbildung 40

PLA₂-Verdau der Standardprobe PC 18:1/18:0. Gezeigt sind die auf das jeweilige Peakmaximum normierten Basepeak-Chromatogramme, wie sie für eine RP-UPLC-MS-Analyse im Negativmodus für die Ausgangsprobe und die Verdauprodukte erhalten wurden. LPC: Lyso-PC, FS: Fettsäure.

Bei den Lysospezies handelte es sich um die intensivsten Fragmente, gefolgt von den Fettsäuren. Für die Bestimmung der Regioisomer-Reinheit wurden die Lyso-Spezies verwendet, da die Fettsäuren, wie zuvor bereits erwähnt, als Kontaminanten in LC-MS-Analysen auftreten.

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse für alle in dieser Arbeit untersuchten kommerziell verfügbaren Standardproben gezeigt. Zusätzlich zu den einfach ungesättigten PC-Standards (vgl. Tabelle 21) sind auch die Ergebnisse der vollständig gesättigten Standardproben PC 30:0 und PC 34:0 gezeigt. Die Regioisomer-Reinheitsanalyse von vollständig gesättigten Spezies ist mit MassMap deshalb nicht möglich, da bei diesen Spezies keine chromatographische Trennung der Regioisomere beobachtet wird. Eine Verschiebung der Fragmentationen-SICs wurde nur beim Vorliegen von mindestens einer Doppelbindung in den Fettsäureacylresten gefunden (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen einer empirisch gefundenen Unsicherheit von 3 bis 5% entsprachen die mit dem PLA₂-Verdau ermittelten Regioisomer-Reinheiten denen der mit der Fit-Auswertung (siehe Kapitel 5.2.) ermittelten Werten. Der einzige Wert, bei dem keine Übereinstimmung zwischen PLA₂ und dem mit der Fit-Auswertung ermittelten Wert gefunden wurde, ist der Standard PA 37:4. Bei PA-Molekülen waren MassMap-Fits aufgrund der großen Peakbreite und der stark asymmetrischen Peakform, die unter den standardmäßig verwendeten UPLC-Bedingungen vorlagen, problematisch. Deshalb wurde zur Verbesserung der Peakform vor der UPLC-Analyse 1 mM Citratmonohydrat-Lösung zugesetzt. Dies führte zu einer Verminderung der Wechselwirkung der PA-Moleküle mit der stationären Phase der RP-Säule. Dadurch wurde eine deutliche Verschmälerung der chromatographischen Peaks erreicht (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 24

Ergebnisse der Untersuchung der Regioisomer-Reinheiten von Standardproben mit PLA₂-Verdau und mit MassMap. Alle Werte sind das Ergebnis von Vierfachmessungen. Bei den angegebenen Unsicherheiten der Mittelwerte handelt es sich um die Standardabweichungen. n.z.: nicht zutreffend.

Standard (<i>sn-1/sn-2</i>)	Mittelwert Regioisomer-Reinheit PLA ₂ [%]	Mittelwert Regioisomer-Reinheit MassMap [%]
PA 37:4 (17:0/20:4)	96.2 ± 0.4	87.0 ± 1.7
PE 37:4 (17:0/20:4)	97.0 ± 1.1	95.6 ± 0.2
PS 37:4 (17:0/20:4)	99.3 ± 0.3	99.0 ± 0.2
PI 37:4 (17:0/20:4)	99.0 ± 0.6	93.7 ± 3.1
PC 30:0 (14:0/16:0)	83.3 ± 1.2	n.z.
PC 30:0 (16:0/14:0)	97.1 ± 0.4	n.z.
PC 34:0 (16:0/18:0)	97.2 ± 0.1	n.z.
PC-34:0 (18:0/16:0)	92.2 ± 0.7	n.z.
PC 34:1 (16:0/18:1)	83.6 ± 1.1	82.5 ± 1.3
PC 34:1 (18:1/16:0)	88.1 ± 1.0	88.5 ± 1.1
PC 36:1 (18:0/18:1)	92.5 ± 1.6	88.7 ± 0.8
PC 36:1 (18:1/18:0)	86.1 ± 1.0	89.7 ± 1.1

In dieser Arbeit wurde zusätzlich eine Methode zur Bestimmung der Regioisomer-Reinheit etabliert, die auf der Ermittlung der Regioisomer-Reinheit mit Hilfe des mittleren [FS]-Quotienten basiert.

Die Ausgangslage, die bei Regioisomer-Mischungen üblicherweise auftritt, ist in Abbildung 41 gezeigt. Bei dem MS/MS-Spektrum einer Mischung von zwei Isomeren I und II (C) handelt es sich um die Summe der beiden reinen Komponenten gezeigt in A und B, deren relative Anteile im Weiteren als Anteil I und Anteil II bezeichnet werden. Das Fragmentionen-Intensitätsverhältnis $R_{\text{exp}}=F2/F1$ der Mischung kann aus der Mischungszusammensetzung und mit Hilfe von H, dem Anteil des intensiveren Fragmentions, berechnet werden. Es wird hierbei angenommen, dass H für beide Isomere den gleichen Wert besitzt. Diese Annahme bedeutet, dass die Ionenausbeute der Fragmentionen nur von der Position, an der die Fettsäuren an den Glycerinrest gebunden sind, abhängt.

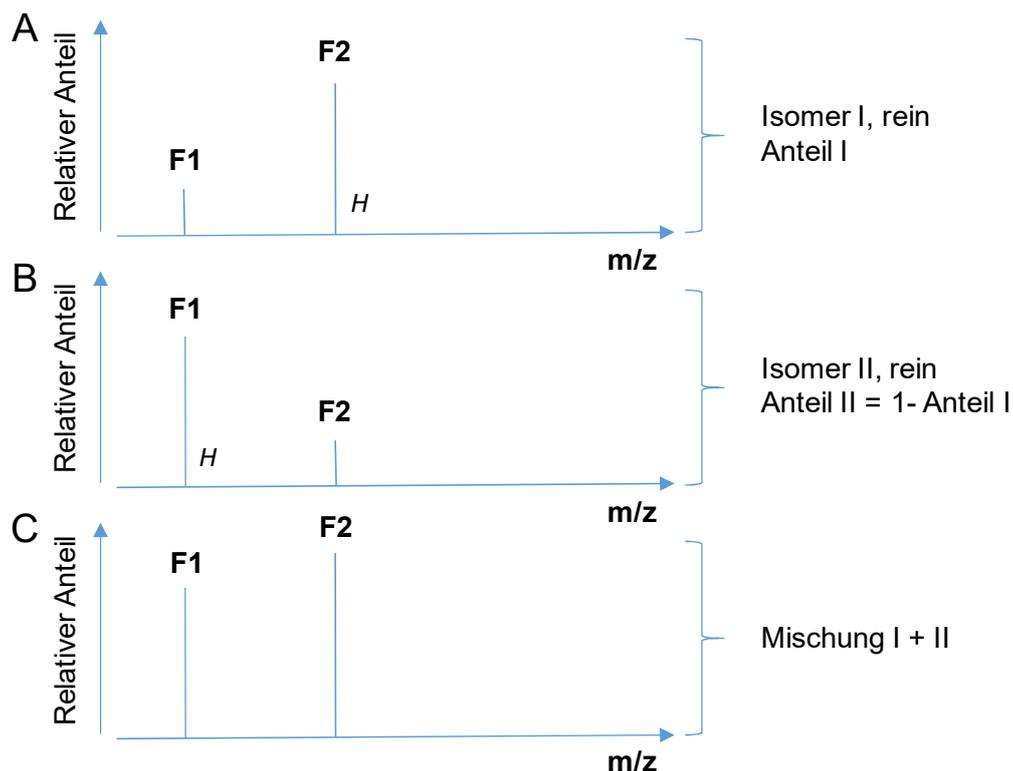


Abbildung 41

Schematische Darstellung der MS/MS-Spektren für die zwei reinen Regioisomere Isomer I (A) und Isomer II (B) sowie die Mischung der beiden Regioisomere (C). Die relativen Anteile der Regioisomere sind als Anteil I und Anteil II bezeichnet. F1 und F2 bezeichnen die beiden Fragmentionen. Bei H handelt es sich um den Anteil des jeweils intensiveren Fragmentions.

Die Berechnung der Regioisomer-Zusammensetzung erfolgt auf der Basis des experimentell bestimmten Fragmentionen-Intensitätsverhältnisses R_{exp} und der Variablen H . H lässt sich aus dem Verhältnis R_{rein} des intensiveren und des weniger intensiven Fragmentions einer regioisomerreinen Probe als $H=R_{rein}/(1+ R_{rein})$ bestimmen. Als Beispiel entspricht ein R_{rein} -Wert von 3 einem H -Wert von 0,75. Für den Anteil I ergibt sich mit den gemachten Angaben und Definitionen:

$$\text{Anteil } I = \frac{H + R_{exp} \cdot H - 1}{2H + 2R_{exp} \cdot H - R_{exp} - 1}$$

Um die Reproduzierbarkeit der Integration der Fragmentionen-SICs zu gewährleisten, erfolgt die Peakintegration innerhalb eines Bereichs, der sich von 2% relativer Intensität (bezogen auf das Maximum des Peaks) an der Peakvorderflanke bis zu 5% relativer Intensität an der Peakhinterflanke erstreckt. Durch die Annahme, dass die Ionenausbeute der beiden Fragmentionen nur von der *sn*-Position abhängig ist, sind die R_{rein} -Werte der Isomere I und II reziprok zueinander. In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Regioisomer-Reinheit mit der Fit-Auswertung, dem PLA₂-Verdau und dem zuvor beschriebenen mittleren [FS]-Verhältnis für vier PC-Standards und die entsprechenden Spezies biologischen Ursprungs zusammengefasst. Die Reinheitswerte der drei unabhängigen Methoden stimmen im Rahmen der Unsicherheit überein.

Tabelle 25

Regioisomer-Reinheiten für einzelne PC-Spezies und zugehörige PC-Spezies aus einem kommerziell erhältlichen PC-Leberextrakt. Die Reinheitswerte wurden mit PLA₂-Verdau (Reinheit [%] PLA₂), durch Quotienten-Berechnung von integrierten [FS]-SICs (Reinheit [%] Verh. Fläche) und einem Fitmodul der Software MassMap (Reinheit [%] MassMap) erhalten. Die Werte in der Spalte „[FS] *sn*-2/*sn*-1 Verh. Fläche“ wurden durch Quotienten-Berechnung von integrierten [FS]-SICs erhalten. Bei den Werten handelt es sich um die Mittelwerte von Vierfachmessungen und bei den angegebenen Unsicherheiten um die Standardabweichungen. Std.: Standard, [FS]: Fettsäureanion, Verh.: Verhältnis, n.z.: nicht zutreffend.

Analyt (<i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -1)	Regioisomer (<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2)	Reinheit [%]	[FS] <i>sn</i> -2/ <i>sn</i> -1	Reinheit [%]	Reinheit [%]
		PLA ₂	Verh. Fläche	Verh. Fläche	MassMap
Std. PC 16:0/18:1	16:0/18:1	83.6 ± 1.1	2.1 ± 0.01	84.7 ± 0.01	82.5 ± 1.3
	18:1/16:0	16.4 ± 1.1		15.3 ± 0.01	17.5 ± 1.3
Std. PC 18:1/16:0	18:1/16:0	88.1 ± 1.0	2.2 ± 0.01	86.5 ± 0.01	88.5 ± 1.1
	16:0/18:1	11.9 ± 1.0		13.5 ± 0.01	11.5 ± 1.1
Leber PC 16:0/18:1	16:0/18:1	n.z.	3.0 ± 0.02	97.8 ± 0.01	95.9 ± 1.0
	18:1/16:0	n.z.		2.2 ± 0.01	4.1 ± 1.0
Std. PC 18:0/18:1	18:0/18:1	92.5 ± 1.6	2.5 ± 0.01	90.9 ± 0.01	88.7 ± 0.8
	18:1/18:0	7.5 ± 1.6		9.1 ± 0.01	11.3 ± 0.8
Std. PC 18:1/18:0	18:1/18:0	86.1 ± 1.0	2.3 ± 0.01	88.4 ± 0.01	89.7 ± 1.1
	18:0/18:1	13.7 ± 1.0		11.6 ± 0.01	10.3 ± 1.1
Leber PC 18:0/18:1	18:0/18:1	n.z.	3.2 ± 0.01	99.9 %	99.9 %
	18:1/18:0	n.z.		0.1 %	0.1 %

5.5. Regioisomer-Reinheitsgraph

Zusätzlich zur Bestimmung der Regioisomer-Reinheit mit den vorgestellten Methoden wurde im Zuge dieser Arbeit zusätzlich ein Graph für die bildliche Darstellung der Regioisomer-Reinheit etabliert, der als „Regioisomer-Reinheitsgraph“ bezeichnet wurde. In diesem Graphen wird das experimentelle $sn-2/sn-1$ -[FS]-Intensitätsverhältnis als Funktion der normierten Intensitätssumme der beiden Fragmentionen aufgetragen. Damit werden die aus den Rohdaten experimentell bestimmten Fragmentionen-Intensitäten mit dem Elutionsprofil des Analyten in Zusammenhang gebracht. Als Beispiele für solche Regioisomer-Reinheitsgraphen sind in Abbildung 42 die Graphen für die beiden PC-Standardproben PC 16:0/18:1 (A) und PC 18:0/18:1 (B) zusammen mit den entsprechenden Äquivalenten aus Rinderleber-Extrakten gezeigt (C und D). Der in den Graphen als gestrichelte orangefarbene Linie eingezeichnete R_{rein} -Wert von 3.18 wurde experimentell aus regioisomerenreinen PC-Spezies biologischen Ursprungs bestimmt. Anhand der Reinheitsgraphen ist zu erkennen, dass die beiden PC-Spezies biologischen Ursprungs eine höhere Regioisomer-Reinheit als ihre synthetischen Äquivalente besitzen.

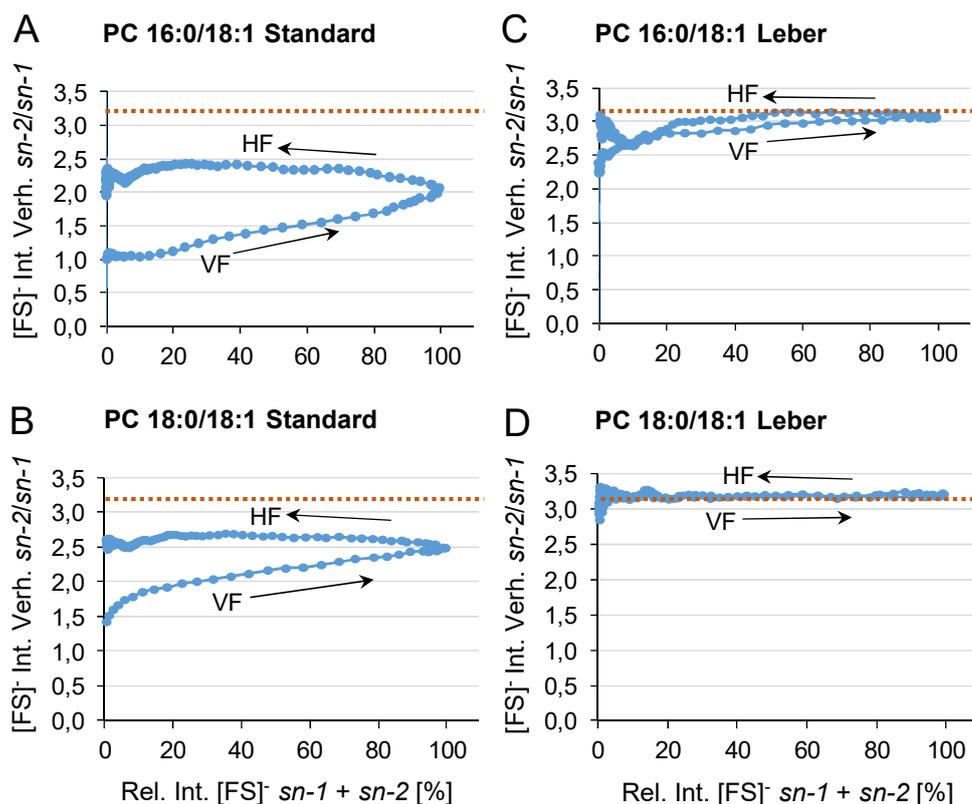


Abbildung 42

Regioisomer-Reinheitsgraphen für vier ausgewählte PC-Spezies. A: Standard PC 16:0/18:1, $R_{\text{exp}} = 2.13$, Reinheit = 84.7%. B: Standard PC 18:0/18:1, $R_{\text{exp}} = 2.49$, Reinheit = 90.9%. C: PC 16:0/18:1 aus Leber, $R_{\text{exp}} = 2.99$, Reinheit = 97.8%. D: PC 18:0/18:1 aus Leber, $R_{\text{exp}} = 3.18$, Reinheit = 99.9%. Für alle analysierten PC-Spezies ist ein R_{rein} -Wert von 3.18 als gestrichelte Linie eingezeichnet (dunkelorange). VF (Vorderflanke) und HF (Hinterflanke) der chromatographischen Peaks. [FS]: Fettsäureanion, Int. Verh.: Intensitätsverhältnis, rel. Int.: relative Intensität.

Indikatoren für die Regioisomer-Reinheit sind zum einen das mittlere $sn-2/sn-1$ -Verhältnis und zum anderen die Spreizung dieses Verhältnisses zwischen der Vorderflanke (VF) und der Hinterflanke (HF) des chromatographischen Peaks. Der Reinheitsgraph erlaubt bei sehr reinen Regioisomeren, wie dies in Abbildung 42 D bei der Spezies PC 18:0/18:1 aus Rinderleber zu sehen ist, das Ermitteln des R_{rein} -Wertes. Experimentell wurde gefunden, dass der R_{rein} -Wert nahezu identisch für alle dGPL-Spezies innerhalb einer Klasse ist. Aus diesem Grund ist in Abbildung 42 für alle untersuchten Spezies der gleiche R_{rein} -Wert als gestrichelte orange horizontale Linie eingezeichnet. Ausnahmen stellen dGPL mit mehrfach ungesättigten Fettsäureresten, d.h. Spezies mit mehr als vier Doppelbindungen, dar. Der R_{exp} -Wert ist direkt mit der Regioisomer-Reinheit verknüpft, d.h. größere Werte weisen auf eine höhere Regioisomer-Reinheit hin. In Abbildung 43 sind die Reinheitsgraphen von vier weiteren PC-Spezies aus einer Rinderleber-PC-Mischung von Avanti gezeigt. Alle Spezies wiesen eine Regioisomer-Reinheit von über 96% auf. Es war keine echte Spreizung zwischen Vorder- und Hinterflanke der Peaks zu erkennen. Bei PC 18:0/20:4 wurde aufgrund des Vorkommens der mehrfach ungesättigten Fettsäure FS 20:4 ein R_{rein} -Wert von 2.85 gefunden, der aus biologischen Extrakten bestimmt wurde (siehe Abbildung 43 D).

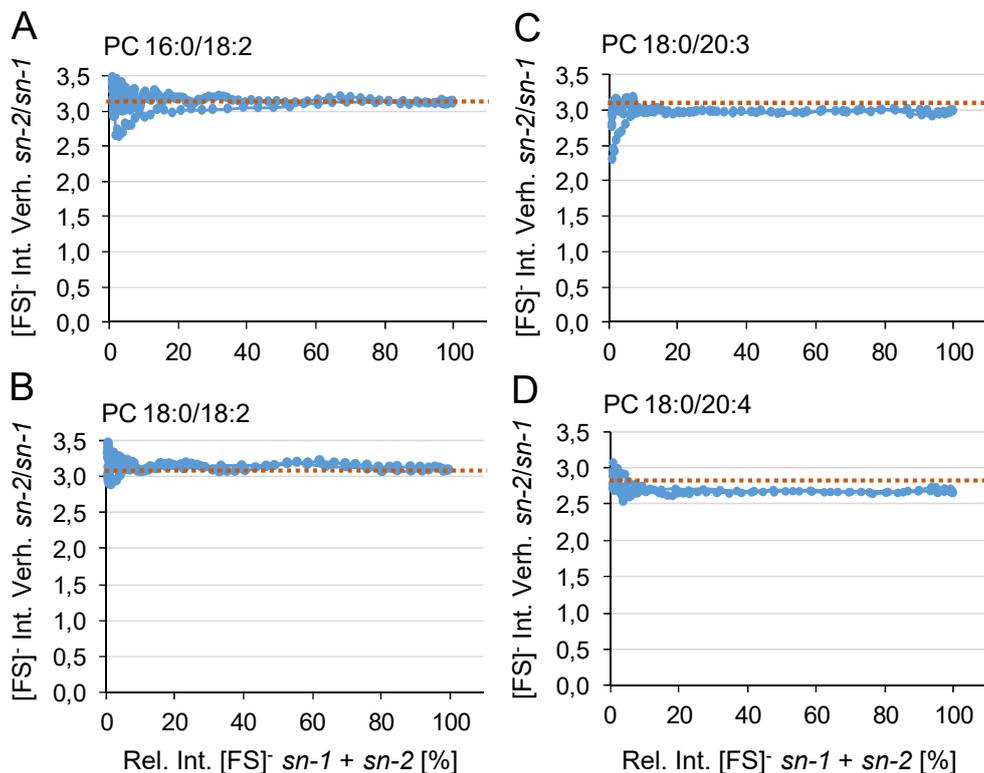


Abbildung 43

Regioisomer-Reinheitsgraphen für vier ausgewählte PC-Spezies aus einer kommerziell erhältlichen Rinderleber-PC-Mischung. A: PC 16:0/18:2, $R_{\text{exp}} = 3.11$, Reinheit = 97.8%. B: PC 18:0/18:2, $R_{\text{exp}} = 3.18$, Reinheit > 99%. C: PC 18:0/20:3, $R_{\text{exp}} = 3.09$, Reinheit > 98%. D: PC 18:0/20:4, $R_{\text{exp}} = 2.80$, Reinheit = 96.1%. Für die Spezies in A, B und C ist ein R_{rein} -Wert von 3.18 und für die Spezies in D von 2.85 als gestrichelte Linie eingezeichnet (orange). VF (Vorderflanke) und HF (Hinterflanke) der chromatographischen Peaks. [FS]⁻: Fettsäureanion, Int. Verh.: Intensitätsverhältnis, rel. Int.: relative Intensität.

In Abbildung 44 sind die Reinheitsgraphen für drei ausgewählte PE-Spezies und drei ausgewählte PG-Spezies aus einer kommerziell erhältlichen *E. coli*-Lipidmischung gezeigt. Die beiden Spezies mit einer Fettsäure-Zusammensetzung von 16:0/16:1 wiesen eine sehr hohe Regioisomer-Reinheit von über 99% auf, während die beiden 18:1/16:1-Spezies Anteile des acylinvertierten Regioisomers von ca. 15% aufwiesen. Interessanterweise war die Spezies PG 16:0/18:1 regioisomerrein, während PE 16:0/18:1 eine Regioisomer-Reinheit von 95% aufwies.

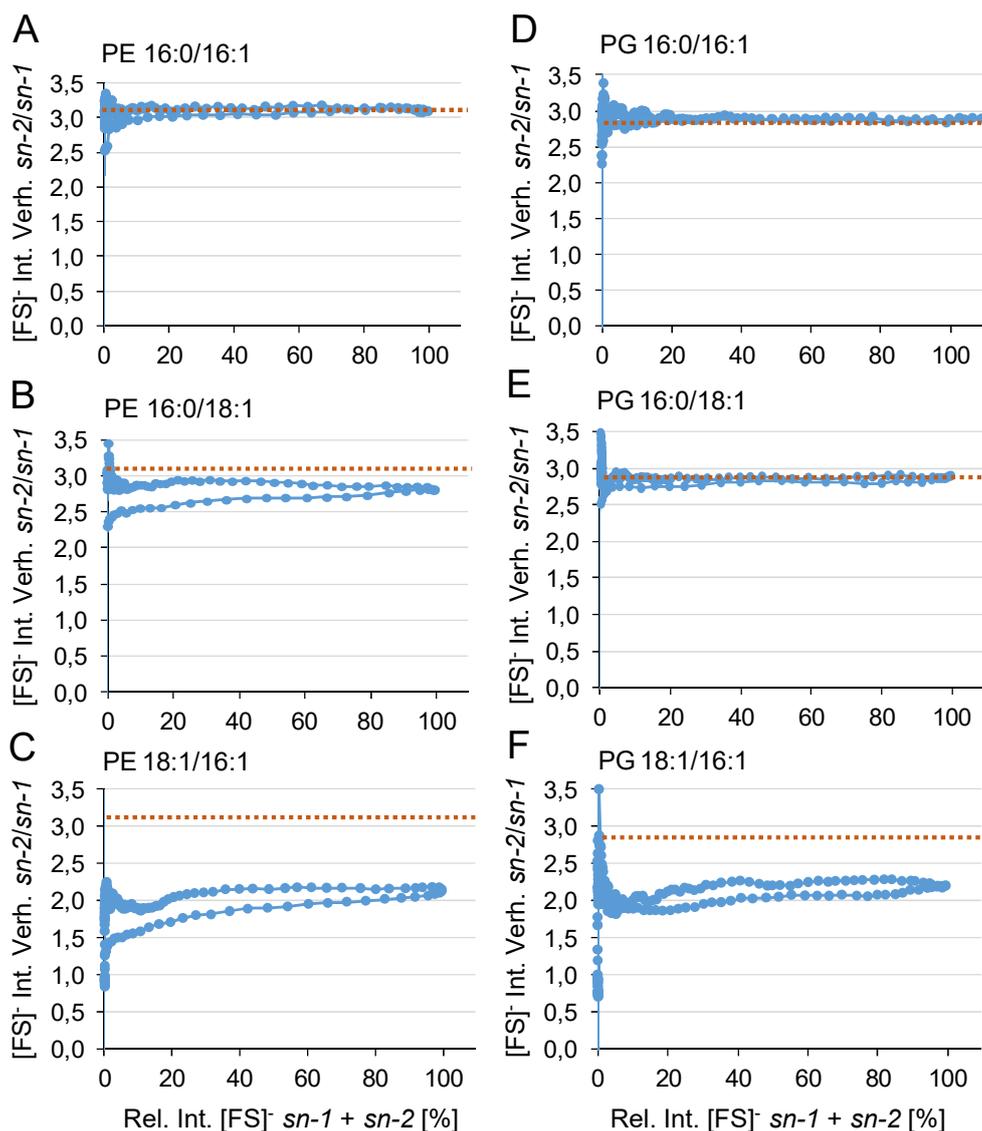


Abbildung 44

Regioisomer-Reinheitsgraphen für drei ausgewählte PE-Spezies und drei PG-Spezies aus einer kommerziell erhältlichen *E. coli*-Lipidmischung. A: PE 16:0/16:1, $R_{exp} = 3.14$, Reinheit > 99%. B: PE 16:0/18:1, $R_{exp} = 2.75$, Reinheit = 94,6%. C: PE 18:1/16:1, $R_{exp} = 2.22$, Reinheit = 86,6%. D: PG 16:0/16:1, $R_{exp} = 2.93$, Reinheit > 99%. E: PG 16:0/18:1, $R_{exp} = 2.80$, Reinheit = 98,2%. F: PG 18:1/16:1, $R_{exp} = 2.19$, Reinheit = 87,9%. Für die PE-Spezies wurde ein R_{rein} -Wert von 3.12 und für die PG-Spezies wurde ein R_{rein} -Wert von 2.95 als gestrichelte Linie eingezeichnet (orange). VF (Vorderflanke) und HF (Hinterflanke) der chromatographischen Peaks. [FS]: Fettsäureanion, Int. Verh.: Intensitätsverhältnis, rel. Int.: relative Intensität.

5.6. Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Methode für die Regioisomer-Analyse von Diacylglycerolphospholipiden mit UPLC-targeted-MS/MS entwickelt (Wozny et al. 2018, Manuskript eingereicht). Dafür wurden Fettsäureanionen als intensive Fragmentensignale mit positionsspezifischen Ionsierungsausbeuten genutzt. Diese Eigenschaft wurde bereits zuvor genutzt für die Strukturzuweisung von PC-Spezies und für die Aufnahme von Kalibrierungskurven, die die Zusammensetzung von Regioisomer-Mischungen mit dem [FS]-*sn-2/sn-1*-Verhältnis in Relation setzen [97]. Allerdings wurde dieses Konzept bisher noch nicht systematisch für die quantitative Regioisomer-Analyse angewendet. Der Vorteil des in dieser Arbeit vorgestellten Verfahrens ist, dass keine Derivatisierung und kein Geräte-*add-on* notwendig sind. Die Daten stammen aus UPLC-targeted-MS/MS-Analysen mit hoher Datenpunktdichte im Negativmodus. Die hohe Datenpunktdichte über den UPLC-Peak ermöglicht die Rekonstruktion von Regioisomer-SICs mit Hilfe eines speziell dafür entwickelten Auswerte-Moduls der Software MassMap. Es wurde im Zuge dieser Arbeit ein neues Modul in enger Zusammenarbeit mit MassMap entwickelt, das diese Rekonstruktion mit Hilfe von einer dedizierten Fit-Auswertung ermöglicht. Kleine Retentionszeitdifferenzen in der Größenordnung von 200 bis 500 ms in Kombination mit quantitativen Unterschieden in MS/MS-Spektren von dGPL-Regioisomeren erlauben die Quantifizierung von relativen Anteilen von Regioisomeren. Die Regioisomer-Analyse wurde sowohl für kommerziell verfügbare dGPL-Standardproben als auch für Proben aus Lipidextrakten biologischen Ursprungs durchgeführt. Die chemisch synthetischen Standardproben wiesen eine Regioisomer-Unreinheit von 5 bis 15% auf, während die Proben biologischen Ursprungs eine signifikant höhere Regioisomer-Reinheit aufwiesen.

Alternativ zur Bestimmung des Regioisomer-Anteils mit MassMap wurde ein PLA₂-Verdau und die Berechnung der Regioisomer-Reinheit aus dem mittleren Fragmenten-Quotienten verwendet. Der PLA₂-Verdau kann nur bei Einzelspezies, d.h. bei Standardspezies, verwendet werden. Zusätzlich zur Bestimmung der Regioisomer-Reinheit mit den vorgestellten Methoden wurde im Zuge dieser Arbeit ein Graph für die bildliche Darstellung der Regioisomer-Reinheit etabliert, der so genannte Regioisomer-Reinheitsgraph. Dieser Graph ermöglicht eine schnelle erste graphische Beurteilung der Regioisomer-Reinheit von dGPL-Spezies.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Regioisomer-Reinheitsanalyse mit UPLC-targeted-MS/MS-Analysen in Kombination mit der Datenauswertung mit MassMap ermöglichte die Regioisomer-Analyse von einer Vielzahl von Spezies biologischen Ursprungs unabhängig vom untersuchten Organismus. Targeted-MS/MS-Analysen sind generell dann

sinnvoll, wenn Gesamtlipidom-Analysen Hinweise auf Veränderungen bei dGPL-Spezies liefern. Ein Beispiel dafür wäre z.B. der Vergleich von dGPL-Spezies von Gewebe aus einem kranken und einem gesunden Organismus. Bei sehr guter chromatographischer Trennung der dGPL-Spezies können erste Informationen über die Regioisomer-Reinheit auch aus alternierenden Full-MS/AIF-Experimenten gewonnen werden.

6. Untersuchung des Effekts von Alkaloiden auf *E. coli* und *B. subtilis*

Bei Alkaloiden handelt es sich um eine von mehreren Klassen sekundärer Pflanzenmetabolite. Es wurden bereits einige Vertreter mit antibakterieller Wirkung identifiziert [75]. Das Ziel der im Folgenden gezeigten Untersuchungen war es, den Effekt von ausgewählten Alkaloid-Kandidaten auf das Lipidom von *E. coli* als gramnegativem Vertreter und von *B. subtilis* als grampositivem Vertreter zu untersuchen. Bei *E. coli* wurde der Effekt des Alkaloids Roemerin untersucht, bei *B. subtilis* der Effekt der drei Alkaloide Roemerin, Boldin und Berberin. Neben den Lipidom-Analysen mittels RP-UPLC-MS-Analysen wurden Transmissionselektronen-Mikroskopie(TEM)-Untersuchungen der Zellen durchgeführt, um mögliche alkaloidabhängige morphologische Veränderungen untersuchen zu können. Um den Effekt der Alkaloide noch näher zu betrachten, wurden neben den Lipidomics-Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit auch Proteomics- und Transcriptomics-Untersuchungen diskutiert. Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte durch den Partner des BMBF-Projekts in der Gruppe um Prof. Dr. Akbulut (Marmara Universität, Istanbul) ([77], [78]).

Neben der Lipidom-Untersuchung von alkaloidbehandelten Zellen wurden in dieser Arbeit für *E. coli* auch generelle Lipidomveränderungen in Abhängigkeit der Wachstumszeit für *E. coli* im Detail untersucht.

6.1. Lipidom-Untersuchungen von *E. coli*

Zunächst wurden generelle Veränderungen des Lipidoms des Stammes *E. coli* K12 TB1 in Abhängigkeit der Wachstumszeit untersucht. Dafür wurden Lipidom-Messungen von Zellen in unterschiedlichen Phasen des Wachstums mit RP-UPLC-MS durchgeführt. Eine exemplarische Wachstumskurve von *E. coli* K12 TB1 ist in Abbildung 45 gezeigt. An die Punkte mit den Zeiten von 1 h bis 2,8 h, bei denen sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wurde eine Gerade angepasst (orange). Die für die Lipidom-Untersuchung gewählten Zeitpunkte waren 2h (mittlere exponentielle Phase), 2h 40min (späte exponentielle Phase), 3h 20min (Übergang von der späten exponentiellen Phase zur stationären Phase) und 3h 50min (stationäre Phase). Für die Darstellung der zu den einzelnen untersuchten Zeitpunkten gehörigen Profile der Hauptspezies der Klassen PE und PG wurden die logarithmierten Anteile verwendet, da die Unterschiede der Anteile innerhalb einer Klasse oft bis zu zwei Größenordnungen betragen. Zusätzlich zu teilweise deutlichen Unterschieden der Speziesanteile innerhalb einer Klasse wurden auch Änderungen der Anteile einzelner Lipide in Abhängigkeit von der Wachstumszeit beobachtet. Hierbei wiesen PE-Spezies und PG-Spezies mit gleicher Fettsäurezusammensetzung ein paralleles

Verhalten bei Zu- oder Abnahmen mit zunehmender Wachstumszeit auf. Im Rahmen der Unsicherheiten lagen bei PE/PG 32:0 und PE/PG 34:1 eine leichte Tendenz zur Zunahme vor, während für PE/PG 33:1 eine eindeutige Zunahme und im Fall von PE/PG 32:1 und PE/PG 34:2 eine leichte Abnahme zu beobachten waren.

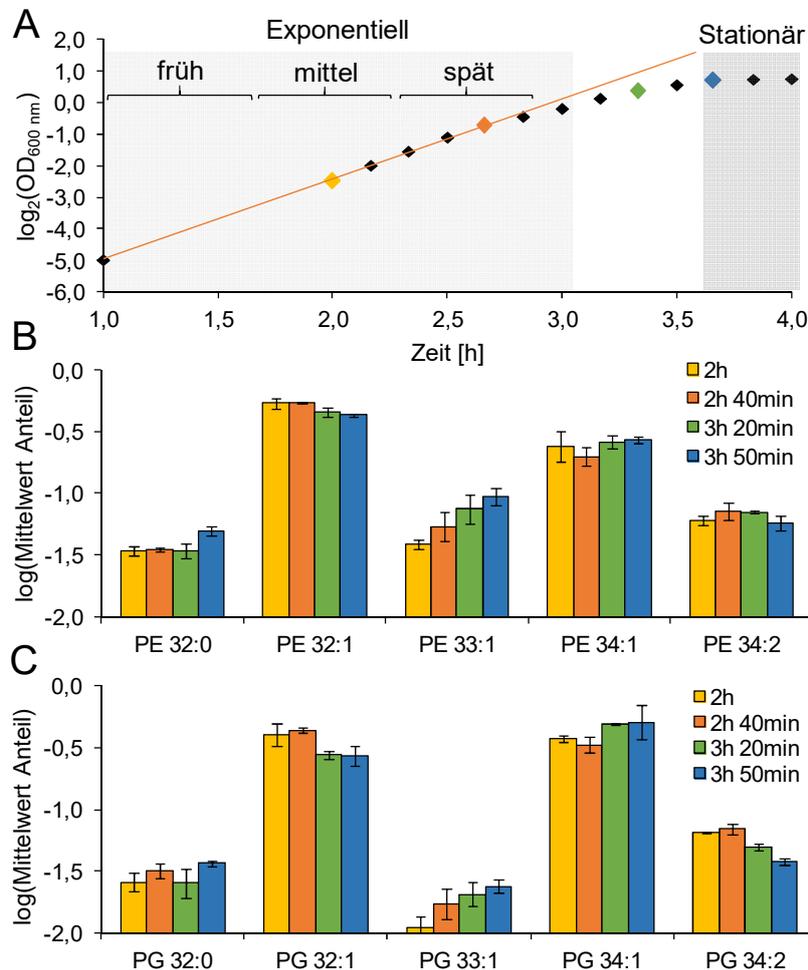


Abbildung 45

Wachstumskurve von *E. coli* K12 TB1 und Profile der Hauptspezies der Lipidklassen PE und PG für ausgewählte Zeitpunkte. (A) An die zur exponentiellen Wachstumsphase gehörigen Punkte (1 h bis 2,7 h) wurde eine Gerade angelegt (orange). Die Lipidprofile in B (PE) und C (PG) sind das Ergebnis von UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Die gewählten Zeitpunkte sind 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min. Diese Zeitpunkte sind in A fett hervorgehoben und mit dem in B und C gewählten Farbcode eingefärbt. Die Werte sind das Ergebnis von Doppelbestimmungen. Bei den gezeigten Unsicherheiten handelt es sich um die Abweichungen von den mittleren Anteilen.

Generell wurden im Folgenden ausschließlich die klassenbezogenen Speziesanteile für die Beurteilung von Lipidom-Veränderungen verwendet. Bei dieser Normierung spielen die Intensitäten der Hauptspezies innerhalb einer Klasse, mit denen ca. 70% der Gesamtintensität erfasst wurden, eine wesentliche Rolle. Alle Veränderungen sind demnach relativ zu betrachten, d.h. es können keine Aussagen über absolute Zu- oder Abnahmen von Speziesanteilen getroffen werden. Die Speziesanteil-Werte haben sich als geeignet für die

Beurteilung von Veränderungen erwiesen, da die relativen Schwankungen üblicherweise 2 bis 5% betragen (empirisch gefunden). Alternativ wurde auch eine Normierung auf die Zellzahl ($OD_{600\text{ nm}}$ -Werte) und die Summe der Intensitäten von internen Standards getestet. Mit der Normierung auf die Summe der Standard-Intensitäten ließen sich Schwankungen der MS-Detektionsempfindlichkeit, die auf Schwankungen des Sprays beruhten, in der Regel gut korrigieren. Die Messung von $OD_{600\text{ nm}}$ -Werten war üblicherweise mit einem relativen Fehler von maximal 10% behaftet. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass eine Normierung auf die Zellzahl und auf MS-Intensitätssummen gut möglich sei. Entgegen dieser Annahme erwies sich diese Normierung als nicht geeignet.

In Abbildung 46 sind die bei der Untersuchung der Wachstumskinetik aus Abbildung 45 erhaltenen, über die Zeitpunkte 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min gemittelten detaillierten Speziesprofile mit allen identifizierten Spezies pro Klasse gezeigt. Zusätzlich zu den oben diskutierten Klassen PE und PG sind die Klassen CL und LPE/LPG gezeigt. Die Anteile wurden innerhalb einer Klasse auf 100% normiert. Die Unterschiede zwischen den Speziesanteilen innerhalb einer Klasse betragen zwei bis annähernd vier Größenordnungen (siehe z.B. Lysospezies, Abbildung 46 C).

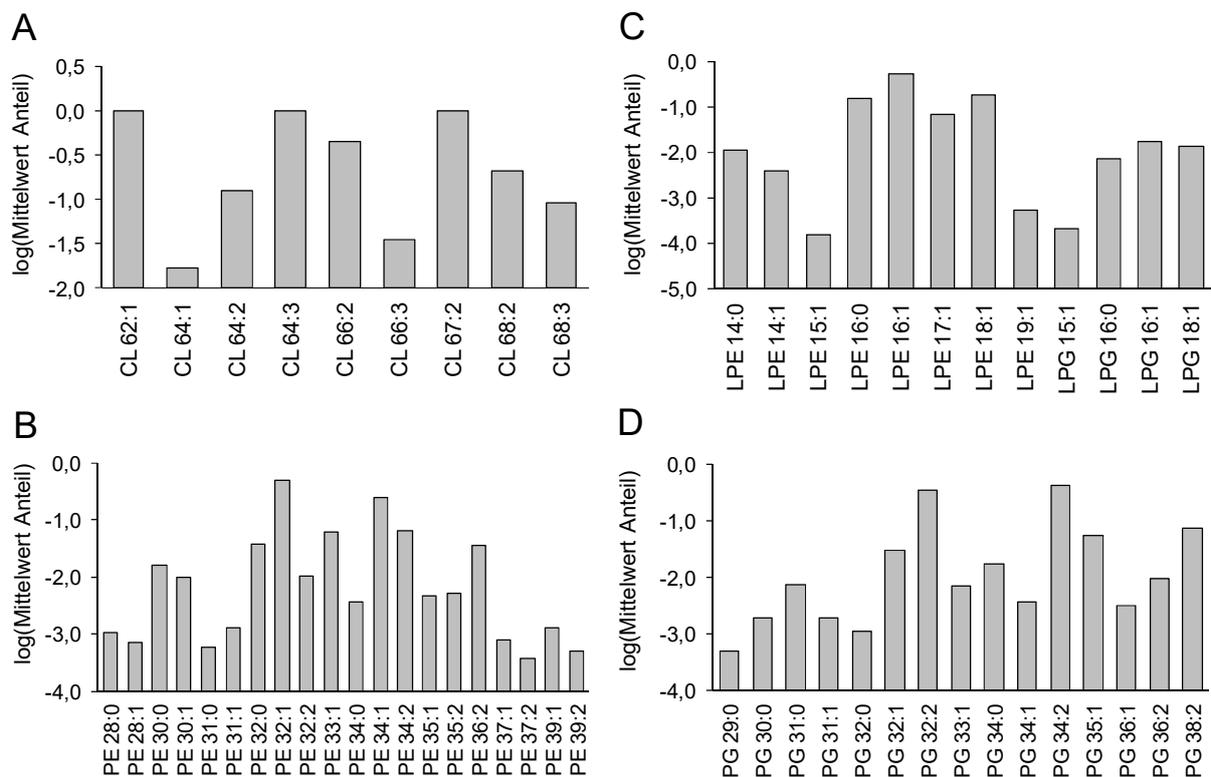


Abbildung 46

Speziesprofile wie sie anhand der Untersuchung der Wachstumskinetik von *E. coli* K12 TB1 für die Klassen CL (A), PE (B), LPE und LPG (C) sowie PG (D) erhalten wurden. Gezeigt sind die logarithmierten mittleren Speziesanteile für die in Abbildung 45 gezeigten vier Zeitpunkte 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min. Die Lipidprofile sind das Ergebnis von UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Es handelt sich bei den Werten um die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die relativen Intensitäten sind innerhalb einer Klasse auf 100% normiert.

Die in Abbildung 45 gezeigten Profile der Hauptspezies der Klassen PE und PG sind der Abbildung 47 B und D als Punktdiagramme dargestellt. Durch die Punkte der Mittelwerte der Speziesanteile der Zeiten 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min wurden lineare Trendlinien gelegt (schwarze Kurven). Damit lassen sich die Veränderungen der Speziesanteile offenbar gut beschreiben. Die so bestimmten Werte der Steigungen sind über den untersuchten Zeitbereich gemittelte, effektive Werte. Durch die ausreichende Güte der Anpassungen erwiesen sich diese Werte als geeignet für die statistische Bewertung von Trends der Speziesanteile innerhalb der Lipidklassen.

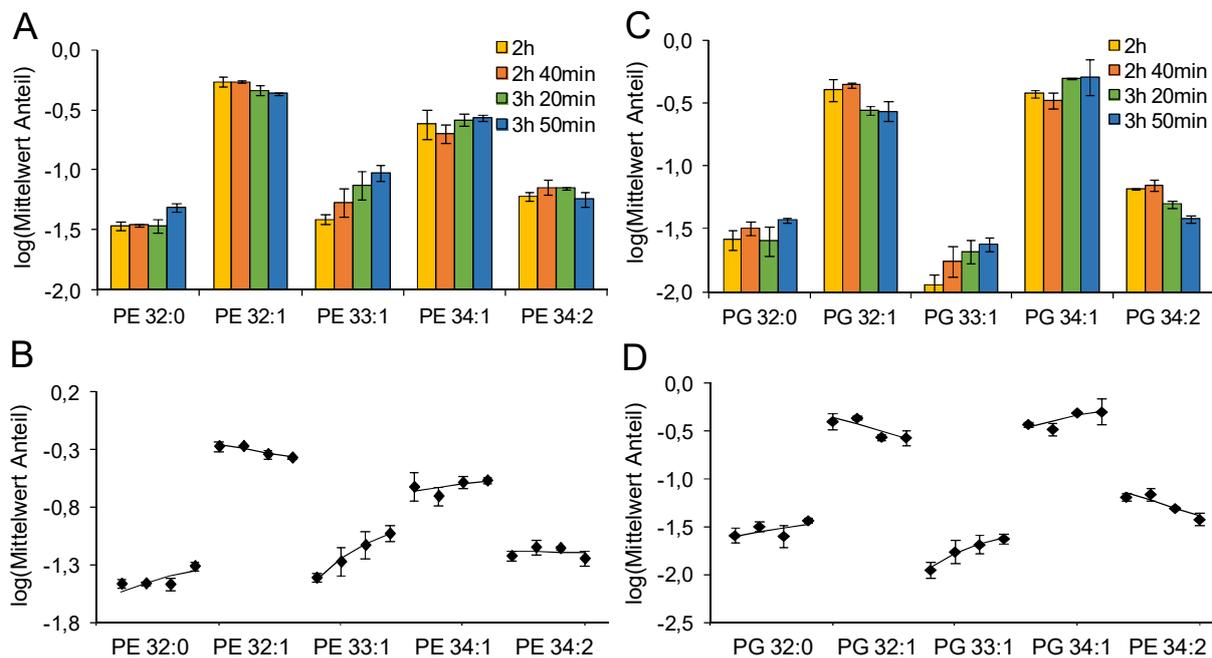


Abbildung 47

Speziesprofile wie sie für die Untersuchung der Wachstumskinetik von *E. coli* K12 TB1 erhalten wurden. A und C: Histogrammdarstellung für die Klassen PE (A) und PG (C); B und D: Punktdiagramm-Darstellung der Daten für PE (B) und PG (D). Die untersuchten Zeitpunkte sind 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50 min. Die Werte sind das Ergebnis von UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Es handelt sich bei den Werten um die Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Die Anteile wurden innerhalb einer Klasse auf 100% normiert. Bei den Unsicherheiten handelt es sich um die Abweichungen von den mittleren Anteilen.

Für den Test, ob es sich bei Änderungen der Anteile um signifikante Trends handelt, wurden deshalb im Folgenden lineare Regressionsanalysen verwendet. In Excel steht dafür die Funktion „RGP“ zur Verfügung. Diese Funktion liefert neben anderen Kenngrößen die Werte für die Steigung und den Standardfehler der Steigung. Für die Bewertung der Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse wurde ein Score etabliert, der folgendermaßen aus der Steigung s und dem Standardfehler der Steigung Δs berechnet wurde, wie sie mit der Funktion RGP von Excel erhalten wurden:

$$\text{Score} := \begin{cases} 0, & \text{falls } t := \Delta s / |s| < 1/2 \\ -t_{\infty}(f,t), & \text{falls } t \geq 1/2 \text{ und } s < 0 \\ +t_{\infty}(f,t), & \text{falls } t \geq 1/2 \text{ und } s > 0 \end{cases}$$

mit $t_{\infty}(f,t) := a(f) \cdot \ln(t) + b(f)$

und $f :=$ Anzahl der Freiheitsgrade der Geradenanpassung.

Die Funktion $t_{\infty}(f,t)$ dient dazu, die t-Werte, wie sie mit der Anpassung an die endlich vielen Datenpunkte erhalten werden, auf den Grenzfall unendlich vieler Datenpunkte umzurechnen. Die Anzahl der Freiheitsgrade ist gleich der um 2 verminderten Anzahl der Datenpunkte. Die Konstanten $a(f)$ und $b(f)$ wurden erhalten durch eine Anpassung der kritischen t-Werte für unendlich viele Freiheitsgrade an die kritischen t-Werte für die in der vorliegenden Arbeit zutreffende Anzahl der Freiheitsgrade. Für die Anpassung nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate wurden die kritischen t-Werte für Flächenwerte von 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 0,975, 0,99 und 0,995 verwendet (entnommen aus [98]). Damit wurden folgende Werte erhalten:

f	a(f)	b(f)
2	0,7735	0,8132
4	1,1052	0,8516
8	1,3135	0,9075
10	1,3581	0,9218
28	1,4777	0,9627

Mit den so bestimmten Funktionen lassen sich die kritischen t-Werte mit einem betragsmäßigen Fehler von weniger als 0,1 auf die Situation für unendlich viele Freiheitsgrade umrechnen. Dieser Fehler ist für die weitere Verwendung der Score-Werte ohne praktischen Belang. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine gefundene Steigung nicht zufällig, d.h. statistisch signifikant ist, ist mindestens 85%, falls der Betrag des Score-Wertes größer als 1,04 ist (einseitiger t-Test). Weiterhin ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Steigungswert echt ist, mindestens 95% bzw. mindestens 99%, sofern der Betrag des Score-Wertes größer als 1,65 bzw. 2,33 ist. Der Score ist zusätzlich so definiert, dass positive und negative Steigungen zu Score-Werten mit dem gleichen Vorzeichen führen. Die Score-Werte wurden verwendet, um einen Farbcode zur Visualisierung der Richtung und der Signifikanz der Trends zu etablieren. Dem Farbcode lagen die Festlegungen zugrunde, dass für Score-Werte mit Beträgen unterhalb von 1, d.h. für Trends ohne oder mit nur geringer Signifikanz, ein heller Grauton verwendet wurde. Rot- bzw. Blautöne wurden verwendet, um mehr oder weniger signifikante positive bzw. negative Trends anzuzeigen. Für Trends mit hoher Signifikanz, d.h. für Trends mit Score-Werten, deren Betrag größer oder gleich 3 ist, wurden

ein sattes Rot oder sattes Blau verwendet. Den Fällen mit betragsmäßig geringeren Score-Werten wurden zunehmend blässere Rot- und Blautöne zugeordnet.

Die Ergebnisse einer solchen linearen Regressionsanalyse sind für die Daten der Untersuchung der Wachstumskinetik (von Abbildung 45) in Tabelle 26 für Lipide der Klassen PE und PG gezeigt. Es wurden die Veränderungen der Speziesanteile für die Zeitpunkte untersucht, in denen sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, d.h. bei 2h, 2h 10min, 2h 20min, 2h 30min und 2h 40min. Als Niveau für signifikante Änderungen wurde ein Score-Wert von $\geq 2,5$ festgelegt. Die meisten gefunden Speziesanteil-Änderungen waren nicht signifikant. Dies entsprach der Erwartung, da sich die Zellen in einer homogenen Wachstumsphase befinden. Die beiden Spezies PE 35:2 und PG 33:1 sind als einzige in einem satten (Rot)-Farbton eingefärbt, d.h. sie wiesen eine signifikante Zunahme des Speziesanteils auf.

Tabelle 26

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Anteile identifizierter Spezies der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1. Untersucht wurden die Zeitpunkte 2h ($OD_{600\text{ nm}}: 0,180$), 2h 10min ($OD_{600\text{ nm}}: 0,254$), 2h 20min ($OD_{600\text{ nm}}: 0,345$), 2h 30min ($OD_{600\text{ nm}}: 0,470$) und 2h 40min ($OD_{600\text{ nm}}: 0,605$). Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Anteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie oben im Text beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Doppelbestimmungen von RP-UPLC-MS-Messungen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der relativen Intensitäten handelt. Der Farbcode in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der relativen Intensität (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text zu entnehmen.

Spezies	Steigung/Mittelwert [h]		Spezies	Steigung/Mittelwert [h]	
	Steigung	Score		Steigung	Score
PE 28:0	0,00	0,0	PG 29:0	0,72	0,4
PE 28:1	0,61	0,7	PG 30:0	0,16	1,2
PE 29:0	-0,80	-2,9	PG 31:0	0,60	0,4
PE 30:0	-0,01	0,0	PG 31:1	-0,39	-0,9
PE 30:1	0,89	1,6	PG 32:0	-0,06	0,0
PE 31:0	-0,91	-2,2	PG 32:1	0,15	1,1
PE 31:1	-0,75	-2,5	PG 32:2	0,58	0,9
PE 32:0	0,10	0,0	PG 33:1	0,64	3,0
PE 32:1	0,01	0,0	PG 34:0	-0,99	-1,4
PE 32:2	0,73	1,7	PG 34:1	-0,30	-1,3
PE 33:0	-2,29	-2,1	PG 34:2	0,27	1,1
PE 33:1	0,45	2,4	PG 35:1	-0,04	0,0
PE 34:0	-0,55	-1,3	PG 36:1	-0,68	-1,5
PE 34:1	-0,36	-2,3	PG 36:2	-0,18	-1,3
PE 34:2	0,34	2,4	PG 38:2	0,44	1,1
PE 35:1	0,40	1,3			
PE 35:2	0,76	3,1			

Der Großteil der PE- und PG-Spezies zeigte eine Abnahme des Speziesanteils (blaue Einfärbung). Zusätzlich zu den oben gezeigten Untersuchungen der Veränderung der Speziesanteile in der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Lipidprofile für die Zeitpunkte 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min untersucht, wie sie in Abbildung 45 und Abbildung 47 gezeigt sind. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 27 gezeigt. Die Veränderungen der Speziesanteile waren für PE und PG gleichsinnig. Bei den Spezies bis zu einer Summe der Länge der Fettsäurereste von 32 wurden Abnahmen der Speziesanteile, ab 33 C-Atomen wurden Zunahmen der Speziesanteile gefunden. Die Hauptspezies PE/PG 32:1 zeigten eine signifikante Abnahme des Speziesanteiles in Abhängigkeit der Wachstumszeit, während die zweite Hauptspezies PE/PG 34:1 eine Zunahme aufwies.

Tabelle 27

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Anteile identifizierter Spezies der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1. Untersucht wurden die Zeitpunkte 2h (OD_{600 nm}: 0,180), 2h 40min (OD_{600 nm}: 0,605), 3h 20min (OD_{600 nm}: 1,280) und 3h 50min (OD_{600 nm}: 1,670). Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Anteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie oben im Text beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Doppelbestimmungen von RP-UPLC-MS-Messungen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der relativen Intensitäten handelt. Der Farbcode in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der relativen Intensität (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text zu entnehmen.

Spezies	Steigung/Mittelwert [h]		Spezies	Steigung/Mittelwert [h]	
	Steigung	Score		Steigung	Score
PE 28:0	-0,77	-2,2	PG 29:0	0,93	1,2
PE 28:1	-1,27	-2,2	PG 30:0	-1,22	-2,9
PE 29:0	-0,94	-2,4	PG 31:0	0,34	0,0
PE 30:0	-0,51	-2,4	PG 31:1	-1,99	-3,0
PE 30:1	-0,84	-2,8	PG 32:0	-0,15	-0,4
PE 31:0	-0,42	-1,5	PG 32:1	-0,68	-3,4
PE 31:1	-0,78	-2,8	PG 32:2	-1,38	-2,5
PE 32:0	-0,03	0,0	PG 33:1	0,26	1,5
PE 32:1	-0,25	-2,9	PG 34:0	1,10	2,5
PE 32:2	-0,75	-2,7	PG 34:1	0,59	3,4
PE 33:0	1,64	1,2	PG 34:2	-0,49	-2,2
PE 33:1	0,49	2,4	PG 35:1	1,07	1,9
PE 34:0	0,26	0,5	PG 36:1	1,16	2,6
PE 34:1	0,40	3,0	PG 36:2	0,51	2,5
PE 34:2	-0,03	-0,2	PG 38:2	0,06	0,0
PE 35:1	0,28	0,8			
PE 35:2	0,67	2,3			
PE 36:2	0,53	2,8			
PE 37:1	1,70	1,1			
PE 37:2	0,75	2,9			

In den Kapiteln 6.2. und 6.3. sind die Ergebnisse der Untersuchungen des Effekts von Alkaloiden auf bakterielle Zellen zusammengefasst. Alle in dieser Arbeit getesteten Alkaloide wurden in DMSO gelöst. Die finale Konzentration von DMSO in der Kultur betrug 1%. Es wurde deshalb untersucht, ob Veränderungen der Hauptspezies-Anteile der Klassen PE und PG in Abhängigkeit von der Wachstumszeit für Zellen in Kulturen mit 1% DMSO denen für Zellen in Kulturen ohne Zusatz von 1% DMSO entsprechen. Erwartet wurde, dass DMSO in der verwendeten Konzentration zu keinen signifikanten Änderungen des Lipidoms führen sollte. Es wurden dabei die Zeitpunkte für die Lipidom-Analyse gewählt, die den untersuchten Zeitpunkten bei den später gezeigten Daten zur Alkaloid-Behandlung von bakteriellen Zellen entsprachen, d.h. die OD_{600 nm}-Werte der Zellen entsprachen 0,5, 0,9 und 1,2. In Abbildung 48 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen für drei unterschiedliche Experimente gezeigt, Kulturen mit 1% DMSO gemessen mit RP-UPLC-MS, Kulturen mit 1% DMSO gemessen mit Chip-basierter Direktinfusion (QTRAP) und Kulturen ohne DMSO gemessen mit Direktinfusion.

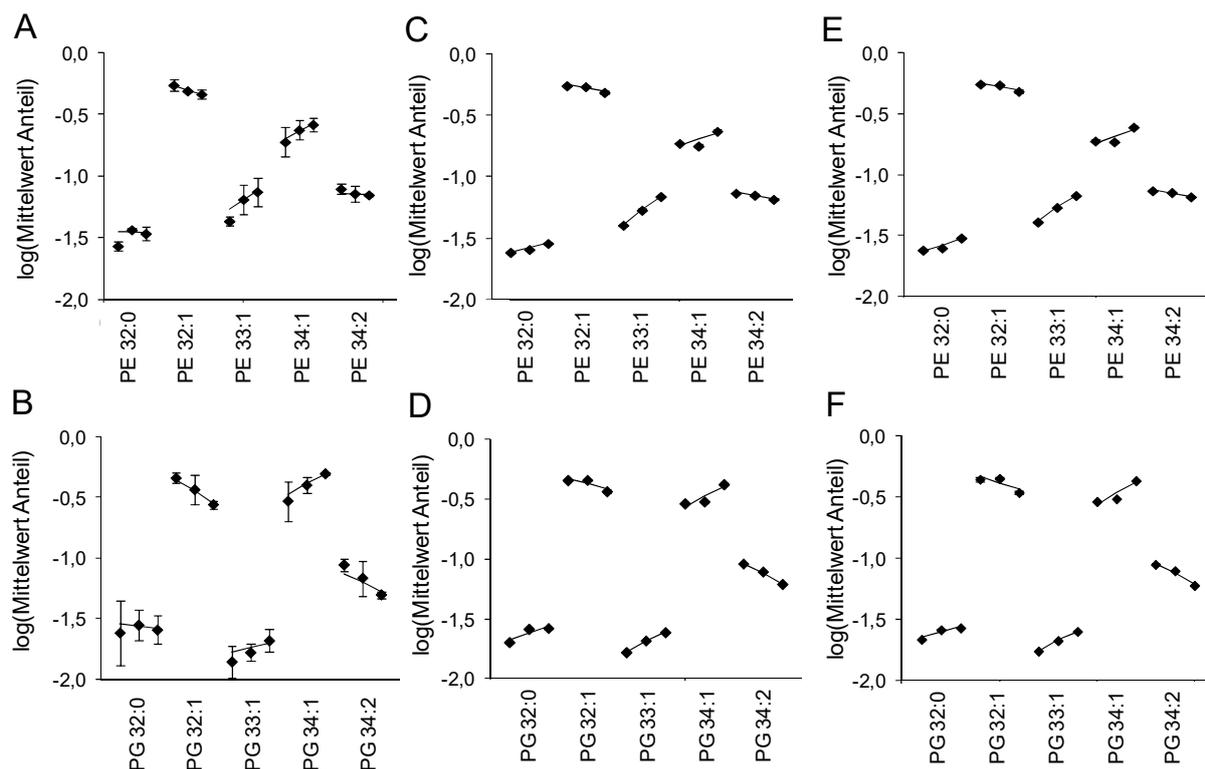


Abbildung 48

Veränderungen der mittleren Anteile für Hauptspezies der Klassen PE und PG von Kulturen von *E. coli* K12 TB1 mit 1% DMSO und ohne DMSO. Die Lipidspezies-Anteile sind von links nach rechts für Zellen mit OD_{600 nm}-Werten von 0,5, 0,9 und 1,2 gezeigt. Die Diagramme in A und B sind das Ergebnis von RP-UPLC-MS-Analysen im Positivmodus (ohne DMSO), die in C, D, E und F sind das Ergebnis von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen im Positivmodus (C und D mit 1% DMSO, E und F ohne DMSO). Bei den RP-UPLC-MS-Messungen (A und B) handelt es sich um die Mittelwerte von Doppelbestimmungen, bei den Direktinfusionsmessungen (C bis F) um die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen. Bei den Unsicherheiten handelt es sich bei A und B um die Abweichungen von den mittleren Anteilen und bei C, D, E und F um die Standardabweichungen.

Gezeigt sind die Hauptspezies der Klassen PE und PG. Der Trend der Veränderung der Anteile war bei allen Spezies unabhängig von der Klasse, der Art der Messung (UPLC oder Direktinfusion) und des Vorhandenseins von DMSO in der Kultur gleichgerichtet. Zusätzlich wurden lineare Regressionsanalysen wie weiter oben im Detail beschrieben mit den Datensätzen „+DMSO“ und „-DMSO“ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die PE- und PG-Spezies zeigten gleichgerichtete Veränderungen der relativen Intensitäten aller Spezies bei „+DMSO“ und „-DMSO“. DMSO hat also in der Konzentration von 1% keinen wesentlichen Einfluss auf das *E. coli*-Lipidom.

Tabelle 28

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen für die Anteile verschiedener Spezies der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1 kultiviert in Medien mit 1% DMSO (+ DMSO) und ohne DMSO (- DMSO). Die Lipidspezies-Anteile sind von links nach rechts für Zellen mit OD_{600 nm}-Werten von 0,5, 0,9 und 1,2 gezeigt. Es sind nur diejenigen Spezies gezeigt, bei denen entweder bei „+DMSO“ oder bei „-DMSO“ Score-Werte von $\geq 2,5$ gefunden wurden. Es handelt sich bei den Werten um Vierfachbestimmungen von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen im Positivmodus. Angegeben sind die Quotienten aus der Steigung und dem Mittelwert der Anteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie im Text beschrieben. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der relativen Intensitäten handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der relativen Intensität (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text zu entnehmen.

Spezies	"+ DMSO"		"- DMSO"		Spezies	"+ DMSO"		"- DMSO"	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 28:0	-0,37	-2,4	-0,46	-2,8	PG 28:0	-0,31	0,0	-0,96	-2,8
PE 30:0	-0,15	-2,2	-0,15	-2,6	PG 30:0	-0,38	-2,7	-0,39	-2,7
PE 30:1	-0,28	-2,2	-0,34	-2,8	PG 30:1	-0,67	-3,2	-0,72	-3,6
PE 30:2	-0,61	-3,3	-0,68	-4,2	PG 30:2	-1,02	-1,9	-1,11	-3,3
PE 31:0	-0,38	-2,8	-0,35	-3,8	PG 31:0	-0,59	-1,3	-0,85	-2,9
PE 31:2	-0,60	-1,6	-0,81	-2,4	PG 32:0	0,25	2,3	0,21	2,7
PE 32:0	0,17	2,9	0,23	3,1	PG 32:1	-0,21	-3,1	-0,24	-2,9
PE 32:1	-0,12	-3,4	-0,13	-3,3	PG 32:2	-0,77	-4,2	-0,78	-4,3
PE 32:2	-0,45	-3,4	-0,49	-3,7	PG 33:1	0,38	4,3	0,37	4,8
PE 33:1	0,53	5,3	0,49	5,5	PG 34:1	0,38	3,4	0,41	3,5
PE 33:2	0,60	4,1	0,60	3,9	PG 34:2	-0,39	-4,4	-0,38	-4,2
PE 34:1	0,24	2,7	0,27	3,0	PG 35:0	-0,53	-1,3	-0,63	-2,6
PE 34:2	-0,12	-2,7	-0,11	-2,8	PG 35:1	0,47	3,6	0,60	2,8
PE 35:0	-0,53	-3,5	-0,35	-1,6	PG 35:2	0,37	2,7	0,36	1,9
PE 35:1	0,44	3,0	0,51	3,3	PG 36:0	-1,43	-2,7	-0,77	-1,3
PE 35:2	0,75	4,7	0,72	4,6	PG 36:1	0,44	2,7	0,94	2,8
PE 36:0	-0,85	-2,3	-1,06	-2,4					
PE 36:1	0,51	2,6	0,73	2,9					

6.2. Untersuchung des Effekts des Alkaloids Roemerin auf *E. coli*

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zu Lipidomics-Untersuchungen, Proteomics-/Transcriptomics-Untersuchungen und TEM-Untersuchungen von mit Roemerin behandelten im Vergleich zu unbehandelten *E. coli*-Zellen gezeigt. In Abbildung 49 sind die Wachstumskurven von *E. coli* K12 TB1 für die Kontrolle (DMSO) und für die Inkubation mit Roemerin-Konzentrationen von 25, 50 und 100 µg/mL gezeigt. Die Behandlung mit Roemerin wurde in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase bei einem OD_{600 nm}-Wert von ca. 0,5 gestartet. Bei einer Konzentration von 50 µg/mL war nach vier Stunden bereits ein merkliches Abknicken der Wachstumskurve zu beobachten. Bei 100 µg/mL war ein stark gehemmtes Zellwachstum zu beobachten, was ein Hinweis auf eine bakteriostatische Wirkung von Roemerin ist. Für die Untersuchung des Roemerin-Effekts wurde deshalb bei den im Folgenden gezeigten Experimenten eine Konzentration von 100 µg/mL verwendet.

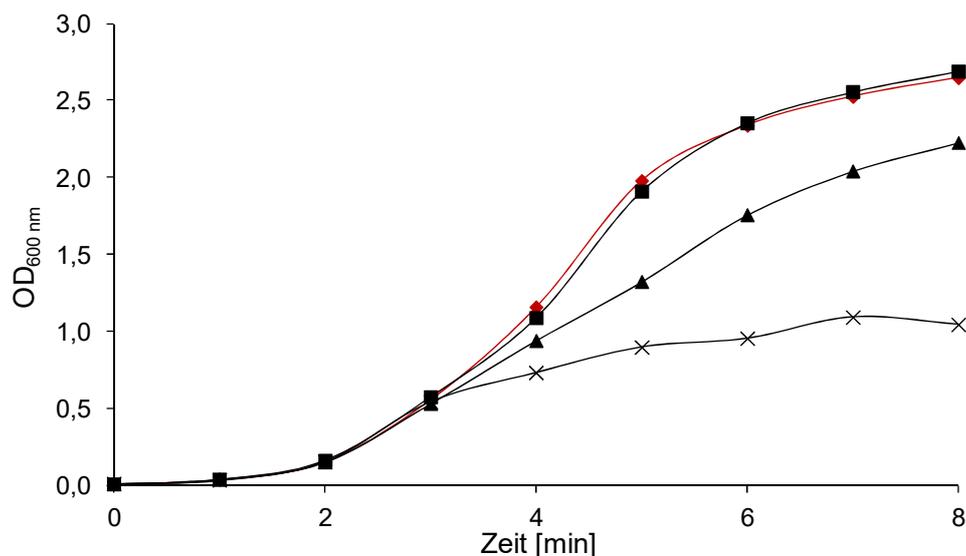


Abbildung 49

Wachstumskurven von *E. coli* K12 TB1 mit 1% DMSO und verschiedenen Konzentrationen des Alkaloids Roemerin. Die Behandlung mit 1% DMSO wurde als Kontrolle verwendet (rote Rauten). *E. coli*-Zellen wurden mit Roemerin in den Konzentrationen 25 µg/mL (schwarze Quadrate), 50 µg/mL (schwarze Dreiecke) und 100 µg/mL (schwarze Kreuze) inkubiert. Die Durchführung der Experimente erfolgte durch den Projekt-Partner um Prof. Dr. Berna Akbulut (Marmara-Universität, Istanbul).

Die in Kapitel 6.1. im Detail behandelte statistische Bewertung der Veränderungen von Speziesanteilen wurde in diesem Kapitel auf die Speziesanteile von Kontrollzellen und von mit Roemerin behandelten Zellen angewandt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 gezeigt. Die untersuchten Zeitpunkte für die Alkaloidbehandlung waren 3h (OD_{600 nm}-Wert: ca. 0,5), 3h 30min (OD_{600 nm}: ca. 0,9) und 4h (OD_{600 nm}: ca. 1,2). Generell wurden mehr

hochsignifikante Änderungen der Speziesanteile (sattes Blau und sattes Rot) bei der Kontrolle gefunden als in den mit Roemerin behandelten Zellen. Dies ist dann zu erwarten, falls eine bakteriostatische Wirkung von Roemerin die wesentliche Wirkung darstellt. Bei den alkaloidbehandelten Zellen wurden jedoch andere Spezies mit signifikanter Änderung der Speziesanteile als bei den Kontrollzellen gefunden (z.B. PE 30:1, PE 32:2 und PE 34:2). Dies ist ein Hinweis auf zusätzliche Effekte, das heißt, Roemerin wirkt offenbar nicht ausschließlich bakteriostatisch.

Tabelle 29

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1. Untersucht wurden die Zeitpunkte 3h ($OD_{600\text{ nm}}: 0,5$), 3h 30min ($OD_{600\text{ nm}}: 0,9$) und 4h ($OD_{600\text{ nm}}: 1,2$). Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Zehnfachbestimmungen von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	DMSO		Roemerin		Spezies	DMSO		Roemerin	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 28:0	-0,49	-3,0	-0,03	0,0	PG 28:0	-1,05	-3,0	0,17	0,0
PE 28:1	0,14	0,0	0,52	1,0	PG 30:0	-0,31	-3,0	0,08	0,2
PE 30:0	-0,01	-2,2	0,00	0,0	PG 30:1	-0,32	-2,7	0,10	0,8
PE 30:1	-0,11	-1,7	0,11	2,6	PG 30:2	-1,57	-2,3	-0,43	-1,8
PE 31:0	-0,41	-3,5	-0,08	-0,8	PG 31:0	-0,80	-2,3	-0,21	-1,1
PE 31:1	0,06	1,1	0,13	1,6	PG 31:1	-0,14	-0,9	0,21	1,6
PE 31:2	-0,75	-2,5	0,22	0,1	PG 32:0	0,01	0,0	-0,60	-3,2
PE 32:0	0,01	0,0	-0,34	-3,9	PG 32:1	-0,05	-1,5	0,08	1,6
PE 32:1	-0,07	-3,4	0,00	0,0	PG 32:2	-0,30	-2,3	-0,10	-1,3
PE 32:2	-0,08	-0,6	0,22	3,1	PG 33:1	0,26	3,4	-0,19	-2,4
PE 33:0	-1,59	-2,2	0,53	1,5	PG 34:1	0,18	3,1	-0,04	-0,8
PE 33:1	0,39	3,5	-0,24	-2,7	PG 34:2	-0,13	-2,1	0,05	0,5
PE 33:2	0,64	4,5	-0,11	-1,1	PG 35:0	-0,49	-2,5	-0,60	-3,0
PE 34:1	0,07	1,8	-0,10	-2,6	PG 35:1	0,28	2,6	-0,46	-2,2
PE 34:2	0,06	1,3	0,20	3,4	PG 35:2	0,27	2,2	-0,12	-0,5
PE 34:3	-0,42	-2,0	-0,44	-2,3	PG 36:0	-1,34	-1,9	-0,71	-0,8
PE 35:0	-0,33	-2,3	-0,01	0,0	PG 36:1	0,12	0,1	-0,15	-0,8
PE 35:1	0,16	2,3	-0,20	-2,5	PG 36:2	-0,17	-2,1	-0,15	-0,9
PE 35:2	0,66	4,5	-0,14	-2,1	PG 37:2	-0,25	-0,7	-1,44	-2,6
PE 36:0	-1,20	-2,6	-0,05	0,0	PG 38:2	-0,46	-0,6	-0,12	0,0
PE 36:1	0,06	0,0	-0,05	0,0					
PE 36:2	0,10	1,7	0,13	1,3					
PE 38:2	-0,18	-0,7	0,52	2,0					
PE 38:3	-1,08	-2,4	-0,11	0,0					

Um einen besseren Überblick über die Änderungen in alkaloidbehandelten Zellen zu erhalten, sind in Tabelle 30 lediglich die signifikanten Speziesanteil-Änderungen (Score-Werte $\geq 2,5$) für die Kontrollzellen und die mit Roemerin behandelten Zellen zusammengefasst. Bei den Spezies, die in Roemerin signifikante Veränderungen der Speziesanteile zeigten, handelte es sich nicht um die Spezies, die in der Kontrolle verändert waren. Auffällig war, dass zwei zweifach ungesättigte PE-Spezies, PE 32:2 und PE 34:2, eine signifikante Zunahme des Speziesanteils aufwiesen, während bei der Kontrolle keinerlei Veränderungen festzustellen waren. Interessanterweise wiesen die PG-Spezies bei Roemerin ausschließlich eine Abnahme der Speziesanteile auf, zeigten also kein paralleles Verhalten zu PE-Spezies, wie dies bei den unbehandelten Zellen der Fall war.

Tabelle 30

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1. Untersucht wurden die Zeitpunkte 3h ($OD_{600\text{ nm}}$: 0,5), 3h 30min (OD_{600} : 0,9) und 4h (OD_{600} : 1,2). Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Es sind nur diejenigen Spezies gezeigt, die entweder bei DMSO oder bei Roemerin Score-Werte von $\geq 2,5$ besitzen. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Zehnfachbestimmungen von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	DMSO		Roemerin		Spezies	DMSO		Roemerin	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 28:0	-0,49	-3,0	-0,03	0,0	PG 28:0	-1,05	-3,0	0,17	0,0
PE 30:1	-0,11	-1,7	0,11	2,6	PG 30:0	-0,31	-3,0	0,08	0,2
PE 31:0	-0,41	-3,5	-0,08	-0,8	PG 30:1	-0,32	-2,7	0,10	0,8
PE 31:2	-0,75	-2,5	0,22	0,1	PG 32:0	0,01	0,0	-0,60	-3,2
PE 32:0	0,01	0,0	-0,34	-3,9	PG 33:1	0,26	3,4	-0,19	-2,4
PE 32:1	-0,07	-3,4	0,00	0,0	PG 34:1	0,18	3,1	-0,04	-0,8
PE 32:2	-0,08	-0,6	0,22	3,1	PG 35:0	-0,49	-2,5	-0,60	-3,0
PE 33:1	0,39	3,5	-0,24	-2,7	PG 35:1	0,28	2,6	-0,46	-2,2
PE 33:2	0,64	4,5	-0,11	-1,1	PG 37:2	-0,25	-0,7	-1,44	-2,6
PE 34:1	0,07	1,8	-0,10	-2,6					
PE 34:2	0,06	1,3	0,20	3,4					
PE 35:1	0,16	2,3	-0,20	-2,5					
PE 35:2	0,66	4,5	-0,14	-2,1					
PE 36:0	-1,20	-2,6	-0,05	0,0					

In Tabelle 31 sind die signifikanten Speziesanteil-Veränderungen aus Kapitel 6.1. für die linearen Regressionsanalysen der Untersuchungen zur Wachstumskinetik gezeigt. Auf der linken Seite sind die Analysen für Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase gezeigt, auf der rechten Seite für Zellen in der späten exponentiellen und dem Beginn der stationären Phase. Die genaueren Untersuchungen der Speziesveränderungen in den Wachstumsphasen sollten einem besseren Verständnis der in alkaloidbehandelten Zellen beobachteten Speziesanteil-Veränderungen dienen. Die Veränderungen der Speziesanteile, die für DMSO in Tabelle 30 gefunden wurden, entsprachen den auf der rechten Seite der Tabelle 31 dargestellten Veränderungen, wohingegen die durch Roemerin-Behandlung hervorgerufenen Veränderungen der Speziesanteile nicht den Veränderungen von Zellen in der stationären Phase entsprachen. Der Effekt von Roemerin ist somit eindeutig nicht ausschließlich bakteriostatisch.

Tabelle 31

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1 aus Untersuchungen der Wachstumskinetik (siehe Kapitel 6.1.). Auf der linken Seite wurden die Zeitpunkte 2h, 2h 10min, 2h 20min, 2h 30min und 2h 40min untersucht und auf der rechten Seite die Zeitpunkte 2h, 2h 40min, 3h 20min und 3h 50min. Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Doppelbestimmungen von RP-UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	Steigung/Mittelwert [h]		Spezies	Steigung/Mittelwert [h]	
	Steigung/Mittelwert	Score		Steigung/Mittelwert	Score
PE 29:0	-0,80	-2,9	PE 30:1	-0,84	-2,8
PE 31:1	-0,75	-2,5	PE 31:1	-0,78	-2,8
PE 35:2	0,76	3,1	PE 32:1	-0,25	-2,9
PG 33:1	0,64	3,0	PE 32:2	-0,75	-2,7
			PE 34:1	0,40	3,0
			PE 36:2	0,53	2,8
			PE 37:2	0,75	2,9
			PG 30:0	-1,22	-2,9
			PG 31:1	-1,99	-3,0
			PG 32:1	-0,68	-3,4
			PG 32:2	-1,38	-2,5
			PG 34:0	1,10	2,5
			PG 34:1	0,59	3,4
			PG 36:1	1,16	2,6
			PG 36:2	0,51	2,5

Neben der linearen Regressionsanalyse für die mit Direktinfusionsmessungen erhaltenen Daten aus Tabelle 29 wurden auch Analysen für RP-UPLC-MS-Daten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 32 gezeigt. Die untersuchten Proben entsprachen denjenigen, die den Ergebnissen aus Tabelle 29 zugrundelagen. Die Experimente unterschieden sich lediglich in der Anzahl der gemessenen biologischen Replikate, d.h. bei mit RP-UPLC-MS wurden nur vier anstelle von zehn biologischen Replikaten analysiert. Aufgrund der geringeren Anzahl an Replikaten wiesen einige Speziesanteil-Änderungen im Vergleich zu den Direktinfusionsmessungen weniger signifikante Änderungen auf, die Ergebnisse entsprachen aber im Wesentlichen denjenigen der Direktinfusionsmessungen aus Tabelle 30.

Tabelle 32

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile der Klassen PE und PG von *E. coli* K12 TB1. Untersucht wurden die Zeitpunkte 3h (OD₆₀₀: 0,5), 3h 30min (OD₆₀₀: 0,9) und 4h (OD₆₀₀: 1,2). Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es sind nur diejenigen Spezies gezeigt, bei denen entweder bei DMSO oder bei Roemerin Score-Werte von $\geq 2,5$ gefunden wurden. Es handelt sich bei den Werten um Vierfachbestimmungen von RP-UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	DMSO		Roemerin		Spezies	DMSO		Roemerin	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 28:1	-0,47	-2,9	-0,47	0,0	PG 30:2	-0,47	-3,3	-0,47	-2,6
PE 29:0	-0,98	-2,6	-0,22	-0,9	PG 32:2	-0,48	-2,6	-0,18	-1,2
PE 32:0	0,16	1,6	-0,35	-2,7	PG 33:1	0,50	3,2	-0,33	-2,3
PE 32:1	-0,14	-3,0	0,01	0,0	PG 33:2	0,95	2,9	-0,01	0,0
PE 33:0	-0,98	-3,1	-0,45	-2,2	PG 34:2	-0,20	-2,5	0,01	0,0
PE 33:1	0,65	3,5	-0,14	-2,1	PG 35:2	0,75	3,4	-0,15	-0,1
PE 33:2	0,81	4,0	0,08	0,0	PG 38:2	-0,60	-2,7	-0,19	-0,8
PE 34:0	0,61	2,1	-0,35	-2,7					
PE 35:2	0,98	4,1	-0,02	0,0					

Alternativ wurden auch Normierungen auf die Intensitäten einzelner Spezies (z.B. interne Standards) und/oder die Normierung auf die OD_{600 nm}-Werte untersucht. Wie bereits in

Kapitel 6.1. erwähnt, waren Änderungen der Speziesanteile relativ zu der Änderung der Summe der Spezies mit den hauptsächlichen Intensitäten zu betrachten. In Abbildung 50 sind die Logarithmen der einzelnen OD_{600 nm}-Werte sowie der Summen aller identifizierten Lipide der Direktinfusionsmessungen (QTRAP) und der RP-UPLC-MS-Messungen (QExactive) als Funktion der Wachstumszeit gezeigt. Es wurde eine lineare Regressionsanalyse mit Hilfe der RGP-Funktion der logarithmierten OD_{600 nm}-Werte aus A und D durchgeführt. Der inverse Steigungswert entspricht der Verdopplungszeit. Es handelte sich hierbei um eine effektive Verdopplungszeit für das Zellwachstum von der späten exponentiellen Phase bis zum Beginn der stationären Phase. Für DMSO wurde ein Wert von ca. 40 min erhalten, für Roemerin ein Wert von ca. 80 min. Demnach wiesen die alkaloidbehandelten Zellen ein um einen Faktor von 2 verlangsamtes Wachstum auf.

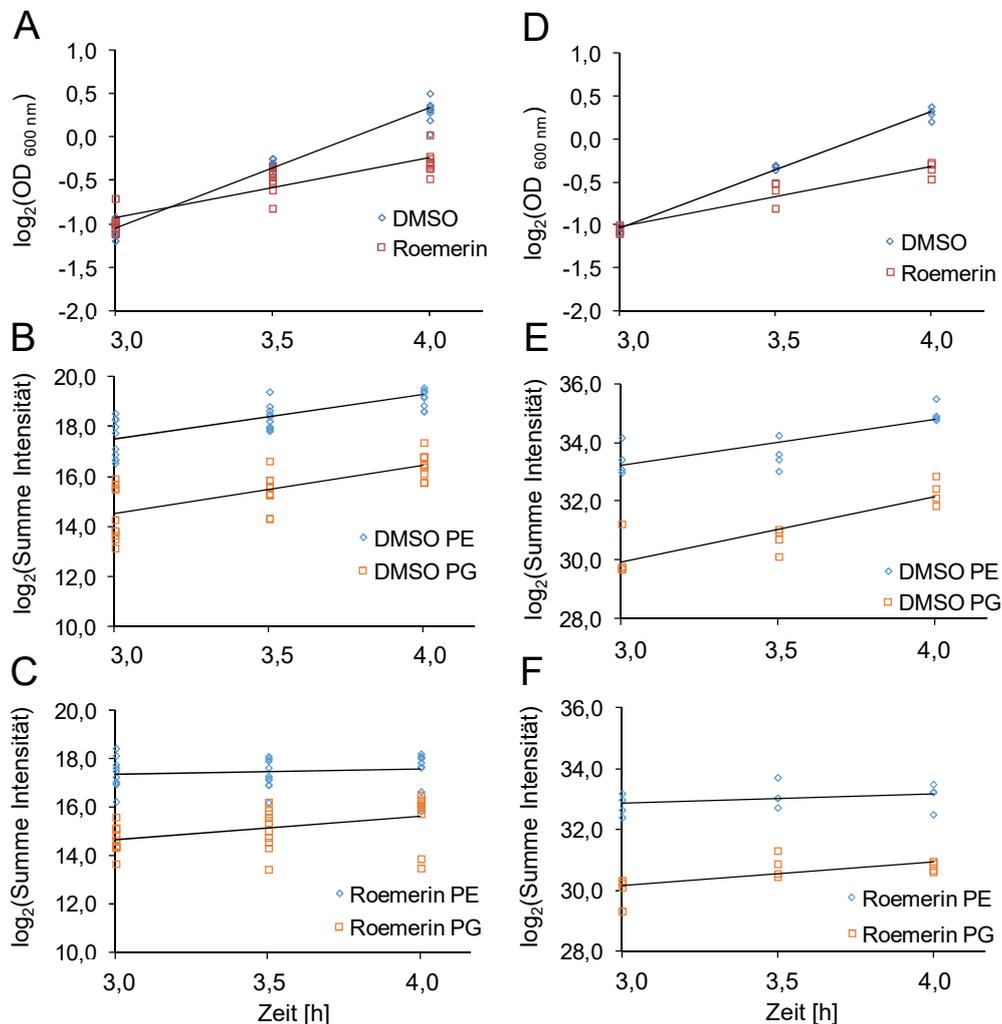


Abbildung 50

OD_{600 nm}-Werte und Summen der Intensitäten aller identifizierten Lipide für *E. coli* K12 TB1-Kontrollzellen (DMSO) und für mit Roemerin behandelte Zellen (Roemerin) in Abhängigkeit der Wachstumszeit. Die Diagramme auf der linken Seite (A, B und C) sind das Ergebnis von Zehnfachbestimmungen von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen im Positivmodus, die Diagramme auf der rechten Seite sind das Ergebnis von Vierfachbestimmungen von RP-UPLC-MS-Messungen im Positivmodus. Bei den eingezeichneten Linien handelt es sich um lineare Trendlinien.

Die effektiven Wachstums-Ratenkonstanten, d.h. die mit den linearen Regressionsanalysen erhaltenen Steigungswerte, und die zugehörigen Standardfehler für die in Abbildung 50 gezeigten Daten sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Die Ratenkonstanten aus den OD_{600 nm}-Werten der beiden Experimente und den MS-Intensitätssummen waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Die Standardfehler der MS-Summen waren um einen Faktor von 2 bis 6 größer als die der OD-Werte. Aus der Tatsache, dass die Ratenkonstanten aus den OD_{600 nm}-Werten und den MS-Intensitätssummen keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwiesen, folgt, dass bei keinem der Experimente eine signifikante Änderung des Lipidgehalts pro Zelle gefunden wurde.

Tabelle 33

Effektive Ratenkonstanten wie sie mit linearen Regressionsanalysen für die OD_{600 nm}-Werte von *E. coli* K12 TB1 und die Summe der MS-Intensitäten der Klassen PE und PG erhalten wurden. Es handelt sich bei den Daten um die in Abbildung VI.II/2 gezeigten Experimente. Untersucht wurden die Zeitpunkte 3h (OD_{600 nm}: 0,5), 3h 30min (OD_{600 nm}: 0,9) und 4h (OD_{600 nm}: 1,2). Es handelt sich bei den Werten um die Ergebnisse aus Zehnfachbestimmungen im Fall von Chip-basierten Direktinfusionsmessungen (QTRAP) und Vierfachbestimmungen im Fall von RP-UPLC-MS-Analysen (QE). Bei den angegebenen Unsicherheiten handelt es sich um den Standardfehler der Steigungswerte der RGP-Funktion (Excel).

Experiment	QTRAP	QE
	Steigung ± Standardfehler	Steigung ± Standardfehler
OD _{600 nm} DMSO	0,023 ± 0,001	0,022 ± 0,001
OD _{600 nm} Roemerin	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,001
Summe Intensitäten PE DMSO	0,029 ± 0,004	0,026 ± 0,006
Summe Intensitäten PE Roemerin	0,004 ± 0,005	0,005 ± 0,005
Summe Intensitäten PG DMSO	0,033 ± 0,006	0,037 ± 0,007
Summe Intensitäten PG Roemerin	0,016 ± 0,006	0,013 ± 0,005

Im Folgenden wurden die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Direktinfusionsmessungen mit der QTRAP und zwei unterschiedlichen RP-UPLC-Messungen mit dem QExactive auf Konsistenz überprüft. Die Datensätze unterschieden sich in der Anzahl der biologischen Replikate (QTRAP-Messung: 10, QE: 4, QE Kinetik: 1). In Tabelle 34 sind die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse für PE und PG für die Kontrollzellen und die mit Roemerin behandelten Zellen zusammengefasst. Die Trends der Veränderungen der Speziesanteile (Zu- oder Abnahme) entsprachen sich in allen drei Experimenten im Wesentlichen. Die einzigen Spezies mit nicht übereinstimmendem Trend waren bei den Kontrollen PE 31:0, PE 33:0 und PG 28:0 und bei den mit Roemerin behandelten Zellen PE 35:1, PG 31:1 und PG 32:1.

Tabelle 34

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile von Spezies der Klassen PG und PE von *E. coli* K12 TB1-Kontrollzellen von Roemerin-Behandlungen (oben) und für die mit Roemerin behandelten Zellen (unten) für Direktinfusionsmessungen (QTRAP) und RP-UPLC-MS-Messungen (QE und QE Kinetik) im Positivmodus. Untersucht wurden bei „QTRAP“ und „QE“ die Zeitpunkte 3h, 3h 30min und 4h. Bei „QE Kinetik“ wurden die Zeitpunkte 2h, 2h 10min, 2h 20min, 2h 30min, 2h 40min, 2h 50min, 3h, 3h 10min, 3h 20min und 3h 50min untersucht. Für die lineare Regressionsanalyse wurden bei „QTRAP“ und „QE“ die Zeitpunkte 3h, 3h 30min und 4h verwendet, bei „QE Kinetik“ wurden die Zeitpunkte 2h 40min, 3h und 3h 20min verwendet. Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es sind diejenigen Spezies gezeigt, bei denen Score-Werte von $\geq 2,5$ bei einem der drei gezeigten Experimente gefunden wurden. Es handelt sich bei den Werten um Zehnfachbestimmungen bei „QTRAP“, Vierfachbestimmungen bei „QE“ und um Einfachbestimmungen bei „QE Kinetik“. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	QTRAP		QE		QE Kinetik		Spezies	QTRAP		QE		QE Kinetik	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 28:0	-0,49	-3,0	-0,98	-1,8	0,29	0,7	PG 28:0	-1,05	-3,0	0,53	1,4	-	-
PE 29:0	-	-	-0,98	-2,6	-0,84	-1,4	PG 30:0	-0,31	-3,0	0,13	0,0	-0,04	0,0
PE 31:0	-0,41	-3,5	-	-	0,50	1,4	PG 30:1	-0,32	-2,7	-0,35	-1,2	-0,31	-1,6
PE 31:2	-0,75	-2,5	-0,86	-1,9	-	-	PG 30:2	-1,57	-2,3	-	-	-1,46	-3,3
PE 32:1	-0,07	-3,4	-0,14	-3,0	-0,53	-1,8	PG 32:2	-0,30	-2,3	-0,21	-1,9	-0,48	-2,6
PE 33:0	-1,59	-2,2	-0,98	-3,1	0,87	1,6	PG 33:1	0,26	3,4	-0,03	0,0	0,50	3,2
PE 33:1	0,39	3,5	0,65	3,5	0,71	2,6	PG 33:2	-	-	0,81	2,3	0,95	2,9
PE 33:2	0,64	4,5	0,81	4,0	-0,17	-0,8	PG 34:1	0,18	3,1	0,38	0,8	0,07	1,5
PE 35:1	0,16	2,3	0,46	2,9	0,83	1,9	PG 34:2	-0,13	-2,1	-0,10	-0,8	-0,20	-2,5
PE 35:2	0,66	4,5	0,98	4,1	1,14	3,3	PG 35:1	0,28	2,6	1,28	2,8	0,39	0,1
							PG 35:2	0,27	2,2	0,22	1,8	0,75	3,4
PE 32:0	-0,34	-3,9	-0,35	-2,7	-0,30	-1,0	PG 30:2	-0,43	-1,8	-0,74	-2,6	-	-
PE 32:2	0,22	3,1	0,32	2,4	-0,09	0,0	PG 31:1	0,21	1,6	-0,35	-0,9	-0,28	-3,0
PE 33:1	-0,24	-2,7	-0,14	-2,1	-0,41	-1,6	PG 32:0	-0,60	-3,2	-0,27	-2,0	-0,69	-2,1
PE 34:1	-0,10	-2,6	-0,13	-2,0	0,25	0,9	PG 32:1	0,08	1,6	0,18	1,9	-0,21	-2,6
PE 34:2	0,20	3,4	0,25	2,1	0,43	2,6							
PE 35:1	-0,20	-2,5	-0,19	-2,2	0,85	1,8							

Neben der Analyse der Trends der Veränderungen der Speziesanteile wurde zusätzlich die in Kapitel 5.2. vorgestellte Methode zur Regioisomer-Analyse für die PE- und PG-Hauptspezies der *E. coli*-Kontrollzellen und der mit Roemerin behandelten Zellen angewandt. Dafür wurden die PE- und PG-Hauptspezies, jeweils vier Spezies pro Klasse, mit targeted-MS/MS fragmentiert. Für die Untersuchungen wurden MTBE-Lipidextrakte von

Zellen verwendet, die 60 min nach Start der Behandlung mit Roemerin (+DMSO als Kontrolle) aus der Kultur entnommen wurden. In Tabelle 35 sind die [FS]⁻-*sn-2/sn-1*-Verhältnisse und die Regioisomer-Reinheiten der Spezies zusammengefasst. Mit Ausnahme der Spezies PE 34:2 stimmen die gefundenen Regioisomer-Reinheiten der Kontrolle (DMSO) mit denen der mit Roemerin behandelten Zellen überein. Interessanterweise wiesen die Spezies PE 34:2 (DMSO) und PE 34:2 und PG 34:2 (Roemerin), bei denen sich die längerkettigere Fettsäure (FS 18:1) in *sn-1*-Position befindet, eine Regioisomer-Reinheit von ca. 85% auf, während die übrigen Spezies Regioisomer-Reinheiten von über 90% aufwiesen. Unterschiede bei der Regioisomer-Reinheit zwischen Roemerin und DMSO wurden somit nur für die Spezies PE 34:2 gefunden. Unterschiede in den Fettsäurezusammensetzungen der untersuchten PE- und PG-Spezies wurden nicht gefunden.

Tabelle 35

[FS]⁻-*sn-2/sn-1*-Verhältnisse und Regioisomer-Reinheiten für ausgewählte PE- und PG-Spezies aus *E. coli* K12 TB1-MTBE-Extrakten für Kontrollzellen (DMSO) und alkaloidbehandelte Zellen (Roemerin). Die analysierten Spezies stammen aus Zellen, die den Kulturen 60 min nach dem Start der Behandlung mit 100 µg/mL Roemerin entnommen wurden. Die *sn-2/sn-1*-Quotientenwerte und Regioisomer-Reinheitswerte wurden mit der Fit-Auswertung von MassMap bestimmt. Alle Werte sind das Ergebnis von Einfachbestimmungen von targeted-MS/MS-Analysen im Negativmodus. [FS]⁻: Fettsäureanion.

Spezies (<i>sn-1/sn-2</i>)	DMSO		Roemerin	
	[FS] ⁻ <i>sn-2/sn-1</i>	Regioisomer-Reinheit [%]	[FS] ⁻ <i>sn-2/sn-1</i>	Regioisomer-Reinheit [%]
PE 32:1 (16:0/16:1)	2,87	96,2	2,90	96,6
PE 33:1 (16:0/17:1)	2,92	96,2	3,00	97,8
PE 34:1 (16:0/18:1)	2,84	95,8	2,83	95,7
PE 34:2 (18:1/16:1)	2,94	97,1	2,25	86,8
PG 32:1 (16:0/16:1)	2,85	96,0	2,86	96,1
PG 33:1 (16:0/17:1)	2,82	95,5	2,83	95,8
PG 34:1 (16:0/18:1)	2,77	94,9	2,81	95,4
PG 34:2 (18:1/16:1)	2,12	84,3	2,21	86,0

Neben Lipidomics-Untersuchungen wurden auch Proteomics-Experimente von Kontrollzellen und von mit Roemerin behandelten Zellen durchgeführt. Die Durchführung dieser Untersuchungen erfolgte durch den Partner des BMBF-Projekts in der Gruppe um Prof. Dr. Akbulut. Es wurden hierfür 2D-Proteingel-Spots potentieller Kandidaten tryptisch verdaut und anschließend mit nano-LC-MS analysiert. Eine Auswahl von Proteinen, für die signifikante Änderungen der Expression in alkaloidbehandelten Zellen gefunden wurden, ist in Tabelle 36 gezeigt. Untersucht wurden die Proteome von *E. coli* K12 TB1-Zellen, die 60 min mit 100 µg/mL Roemerin behandelt wurden. Es ist auffällig, dass Proteine, die im Aminosäure- und Kohlenhydrat-Metabolismus involviert sind, teilweise stark herunterreguliert waren.

Tabelle 36

Auszug der Ergebnisse von Proteomics-Untersuchungen von *E. coli* K12 TB1-Zellen behandelt mit 100 µg/mL Roemerin für 60 min. Die Werte sind der Dissertation von Nilay Büdeyri Gökgöz entnommen.

Proteinname	Funktion	Regulation	Faktor Änderung Expression
Maltosebindendes Protein	Kohlenhydrat-Transport	↓	8.61
L-Asparaginase II	Asparagin-Stoffwechsel	↓	4.11
Protein in malK-Operon	Kohlenhydrat-Transport	↓	4.06
Gal/Glc-Bindeprotein	Kohlenhydrat-Transport	↓	6.72
Enamin/Imin-Deaminase	Aminosäure-Biosynthese	↓	4.41
Typ 1-Fimbrien-Protein, A Kette	Zelladhäsion	↑	3.78
TolB periplasm. Protein	Bakteriosin-Transport	↑	4.06

Zu den Proteomics-Untersuchungen zugehörige Transcriptomics-Ergebnisse sind in Tabelle 37 gezeigt (aus Ayyildiz et al. 2017). Die Superskripte hinter den Faktoren der Änderungen der Expressionen geben an, ob es sich um die Ergebnisse von qPCR- (a) oder Microarray-Untersuchungen (b) handelt. Es ist auffällig, dass durch die Roemerin-Behandlung besonders die Expression von Proteinen bzw. von Bestandteilen der äußeren Membran erhöht war, die mit dem Zell-Efflux und Antibiotika-Resistenz in Verbindung stehen. Die Herunterregulation des maltosebindenden Proteins ist ein Hinweis für einen verminderten Kohlenhydrat-Transport in alkaloidbehandelten Zellen (vgl. Proteomics-Ergebnisse). Zusätzlich liefert die Herunterregulation von Genen, die für flagellare Proteine kodieren, Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Zellmotilität.

Tabelle 37

Auszug aus den Ergebnissen der Transcriptomics-Untersuchungen mit qPCR und Microarrays von *E. coli* K12 TB1 behandelt mit 100 µg/mL Roemerin (modifiziert nach Tabelle 3 aus Ayyildiz et al. 2017). a: qPCR, b: Microarray.

Genname	Funktion	Regulation	Faktor Änderung Expression
<i>acrB</i>	Multidrug Efflux-Pumpe	↑	1.60 ^a
<i>tolC</i>	Außenmembran-Protein	↑	1.88 ^a 5.42 ^b
<i>ptsH</i>	Phosphocarrier-Protein HPr	↑	3.46 ^a
<i>lamB/malE</i>	Maltosebindendes periplasmatisches Protein	↓	>100 ^{a,b}
<i>marA</i>	Multipl. Antibiotika-Resistenz-Protein	↑	8.88 ^a 46.5 ^b
<i>flhC</i>	Flagellarer Transkriptionsregulator	↓	20.4 ^a 7.76 ^b
<i>flgK</i>	Flagellares Filament-Protein	↓	66.3 ^a 16.7 ^b
<i>fliT</i>	Flagellares Chaperon	↓	>100 ^a 17.2 ^b

Da die Transcriptomics-Ergebnisse Hinweise für eine Beeinträchtigung der Zellmotilität lieferten, wurde wie in Kapitel 2.2.10. beschrieben die Zellmorphologie von alkaloidbehandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen mit Transmissionselektronen-Mikroskopie (TEM) untersucht. Zunächst wurden unbehandelte *E.coli*-Zellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 gezeigt. In A wurden die Zellen nur in Wasser untersucht. Aufgrund ihrer hohen Elektronendichte wiesen die Zellen auch ohne Kontrastierungsmittel ausreichend Kontrast auf. Es war allerdings nicht möglich, auf diese Art Flagellen zu sehen. In B ist das Ergebnis einer Negativkontrastierung mit Wolframatophosphorsäure gezeigt und in C das Ergebnis eines Harzschnittes mit anschließender Negativkontrastierung mit Uranylacetat. Bei allen TEM-Aufnahmen war auffällig, dass keine Flagellen sichtbar waren. *E. coli*-Zellen weisen normalerweise so genannte peritriche Flagellen auf. Aus diesem Grund wurden TEM-Analysen mit anderen *E. coli*-Laborstämmen als Positivkontrollen durchgeführt. Die Zellen wurden identisch zu *E. coli* K12 TB1 behandelt. Hierbei wurden Flagellen gefunden (Daten nicht gezeigt). Die mögliche Ursache dafür, dass bei *E. coli* K12 TB1 keine Flagellen gefunden werden konnten, ist mit großer Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen die Flagellen sehr leicht bei der Probenpräparation (Pipettieren, Vortexen, Zentrifugation) verlieren. Aus diesem Grund war eine Untersuchung des Effekts von Roemerin auf die Flagellen und deren Morphologie nicht möglich.

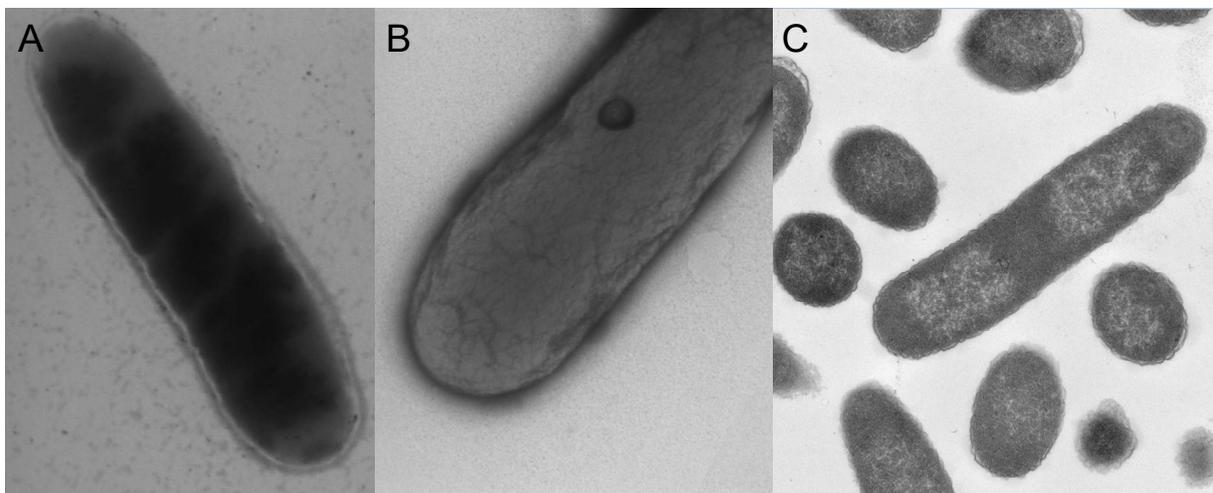


Abbildung 51

Transmissionselektronen-Mikroskopie-(TEM)-Aufnahmen von *E. coli* K12 TB1-Zellen in der stationären Wachstumsphase. A: TEM-Aufnahmen in Wasser, B: Negativkontrastierung mit Wolframatophosphorsäure, C: Harzschnitte und Negativkontrastierung mit Uranylacetat.

6.3. Untersuchung der Wirkung von drei Alkaloiden auf *B. subtilis*

Die Untersuchung der Wirkung von Alkaloiden wurde auch für einen grampositiven Vertreter, *B. subtilis*, durchgeführt. Es wurden drei Alkaloid-Vertreter nach Voruntersuchungen durch den BMBF-Projektpartner (Gruppe um Prof. Dr. Akbulut) ausgewählt, Roemerin, Berberin und Boldin. Die Wachstumskurven von *B. subtilis* für die Alkaloid-Behandlung mit 75 µg/mL der drei Alkaloide sind in Abbildung 52 gezeigt, von links nach rechts: Berberin, Boldin und Roemerin (Experimente von G. Avci durchgeführt). Im Vergleich der drei Alkaloide war bei Roemerin (C) der größte Einfluss auf das bakterielle Wachstum feststellbar, d.h. ein deutlich gehemmtes Wachstum. Bei Berberin und Boldin waren diese Effekte deutlich geringer.

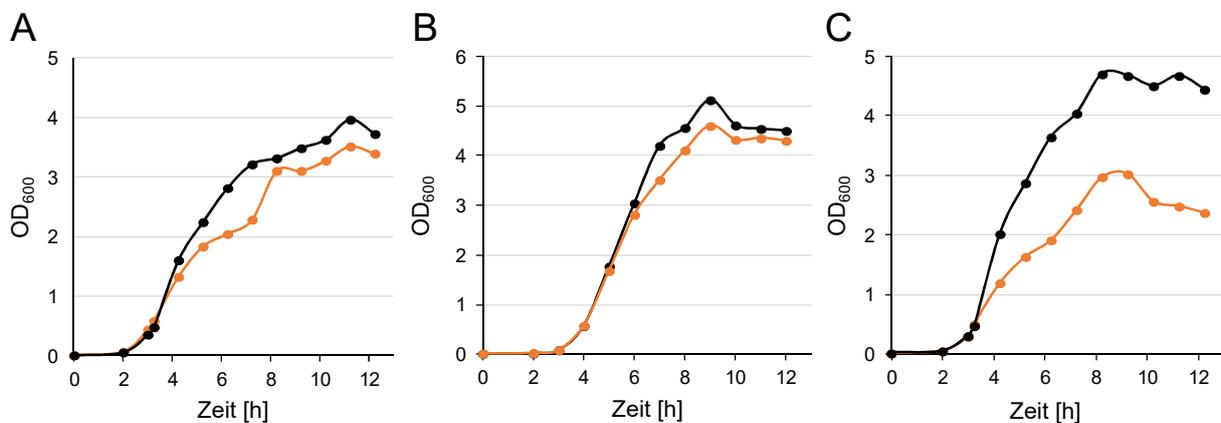


Abbildung 52

Wachstumskurven von *B. subtilis* 168 bei Alkaloid-Behandlung. Die Kontrollkurven, in der die Zellen mit DMSO anstelle des Alkaloids inkubiert wurden, sind in schwarz gezeigt. Die Wachstumskurven unter dem Einfluss von 75 µg/mL Alkaloid sind in orange gezeigt für die Behandlung mit Berberin (A), Boldin (B) und Roemerin (C). Die Experimente wurden von G. Avci aus der Gruppe des BMBF-Projektpartners um Prof. Dr. Akbulut (Marmara-Universität, Istanbul) durchgeführt.

In Abbildung 53 sind die Wachstumskurven für die Behandlung mit den beiden Alkaloiden Roemerin (A) und Boldin (B) für weitere Konzentrationen gezeigt. Bei Roemerin war eine deutliche Beeinträchtigung des normalen Bakterienwachstums bei Konzentrationen ab 75 µg/mL zu beobachten, bei Boldin waren die Effekte um ein Vielfaches geringer als bei Roemerin. Es waren kaum Unterschiede im Konzentrationsbereich von 75 bis 400 µg/mL festzustellen.

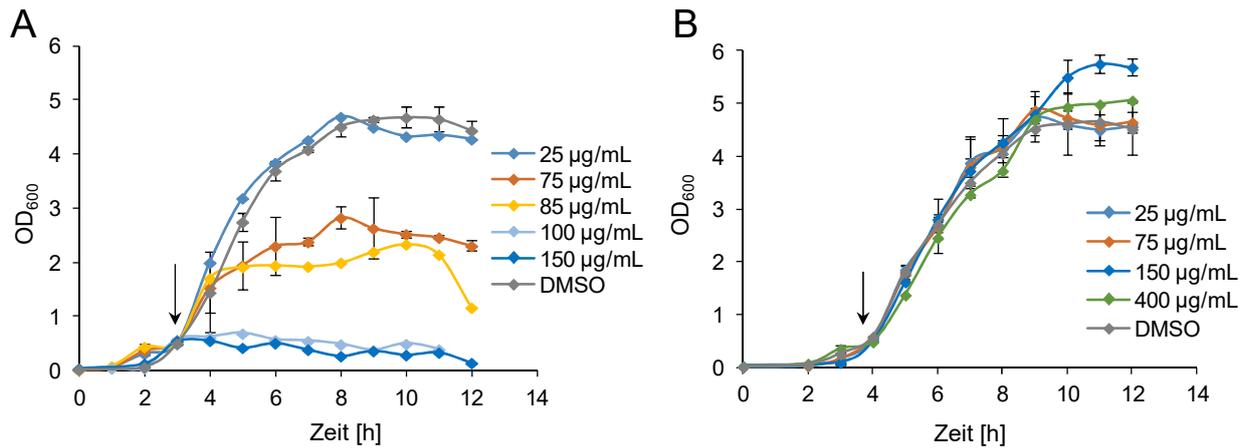


Abbildung 53

Wachstumskurven von *B. subtilis* 168 mit Roemerin-Behandlung (A) und Boldin-Behandlung (B). Die Kontrollkurven, in denen die Zellen mit DMSO inkubiert wurden, sind in grau gezeigt. Die Alkaloid-Konzentrationen, mit denen die Zellen behandelt wurden, sind in der Legende angegeben. Die Experimente wurden von G. Avci aus der Gruppe des BMBF-Projektpartners um Prof. Dr. Akbulut (Marmara-Universität, Istanbul) durchgeführt.

Für die Untersuchungen des Effekts der drei Alkaloide Berberin, Boldin und Roemerin auf das Lipidom wurde eine Konzentration von 75 µg/mL verwendet. Wie bei den mit Roemerin behandelten *E. coli*-Zellen in Kapitel 6.2. wurden für die statistische Bewertung der Veränderungen der Speziesanteile lineare Regressionsanalysen verwendet. Verglichen wurden die Speziesanteile zwischen Kontrollzellen und Zellen, die 60 min mit dem jeweiligen Alkaloid behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 für Lipidspezies der Klassen PE und PG gezeigt. Die meisten Speziesanteil-Änderungen waren nur sehr schwach (grau unterlegt). Es wurden Trends zur Zunahme bei PE 29:0, PE 30:0 und PE 31:0 und Trends zur Abnahme bei PE 32:1, PE 33:0 und PE 34:1 bei Roemerin gefunden. Deutlich signifikante Änderungen des Speziesanteils, d.h. Spezies mit einem Score-Wert $\geq 2,5$, wurden nur für die Spezies PE 32:1 und PG 31:0 bei den mit Roemerin behandelten Zellen gefunden.

Tabelle 38

Ergebnisse von linearen Regressionsanalysen der Speziesanteile für Lipide der Klassen PE und PG von *B. subtilis* 168-Zellen, die mit den Alkaloiden Berberin, Boldin und Roemerin behandelt wurden. Untersucht wurden die Veränderungen der Speziesanteile der für 60 min mit 75 µg/mL des jeweiligen Alkaloids behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Angegeben sind jeweils der Quotient aus der Steigung und dem Mittelwert der Speziesanteile sowie die Score-Werte. Die Berechnung der Score-Werte erfolgte wie in Kapitel 6.1. beschrieben. Es handelt sich bei den Werten um Dreifachbestimmungen von RP-UPLC-MS-Analysen im Positivmodus. Ein negatives bzw. positives Vorzeichen der Werte in der Spalte „Steigung/Mittelwert“ gibt an, ob es sich um eine Abnahme bzw. eine Zunahme der Speziesanteile handelt. Der Farbcode in den Spalten „Steigung/Mittelwert“ und „Score“ ist ein Maß für die Signifikanz der Änderung der Speziesanteile (rot/blau: Zunahme/Abnahme; heller/dunkler: höhere/geringere Signifikanz für echte Änderung). Details zur Wahl des Farbcodes sind dem Text in Kapitel 6.1. zu entnehmen.

Spezies	Berberin		Boldin		Roemerin		Spezies	Berberin		Boldin		Roemerin	
	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score		Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score	Steigung/Mittelwert [h]	Score
PE 26:0	-0,17	-0,6	-0,02	0,0	0,09	0,1	PG 28:0	-0,14	-0,6	-0,06	0,0	0,02	0,0
PE 28:0	-0,06	-0,2	0,01	0,0	0,27	1,6	PG 29:0	-0,23	-1,3	-0,36	-1,7	0,39	1,8
PE 28:1	-0,41	-1,3	-0,02	0,0	0,47	1,2	PG 30:0	-0,10	-0,1	-0,13	-0,4	-0,05	0,0
PE 29:0	0,18	0,9	0,23	1,3	0,44	2,1	PG 30:1	-0,65	-1,3	-0,91	-1,6	-1,14	-1,9
PE 29:1	-0,31	-1,4	0,03	0,0	-0,07	0,0	PG 30:2	-0,09	0,0	-0,10	0,0	0,73	1,3
PE 29:2	-0,17	-1,1	0,13	0,0	0,35	1,4	PG 31:0	0,14	1,6	0,02	0,0	0,30	3,0
PE 30:0	0,01	0,0	0,06	0,2	0,17	2,3	PG 31:1	-0,56	-1,5	-0,62	-1,5	0,51	2,0
PE 30:1	-0,22	-0,7	-0,12	0,0	0,15	0,4	PG 32:0	0,02	0,0	0,05	1,0	-0,06	-1,0
PE 31:0	0,11	1,1	0,06	1,6	0,13	2,4	PG 32:1	-0,82	-1,4	-0,78	-1,3	-1,68	-2,0
PE 31:1	0,00	0,0	0,00	0,0	-0,06	-0,4	PG 33:0	0,13	1,0	0,10	0,5	0,04	0,0
PE 32:0	-0,13	0,0	0,08	0,0	0,00	0,0	PG 33:1	-0,43	-1,0	-0,49	-1,2	-0,86	-1,6
PE 32:1	-0,05	-1,2	-0,05	-0,7	-0,20	-2,6	PG 33:2	0,30	0,3	0,00	0,0	0,99	1,7
PE 33:0	-0,64	-1,5	-0,62	-1,4	-1,30	-2,2	PG 34:0	-0,03	0,0	-0,07	0,0	0,03	0,0
PE 33:1	-0,41	-1,1	-0,18	-1,6	0,56	1,5	PG 34:1	-0,07	0,0	-0,15	0,0	0,74	1,6
PE 33:2	-0,13	-0,9	-0,04	0,0	-0,26	-1,0	PG 36:1	0,07	0,0	0,08	0,0	1,16	1,7
PE 34:0	-0,61	-1,5	0,01	0,0	0,31	0,7	PG 38:1	0,16	0,0	0,17	0,0	1,17	1,6
PE 34:1	-0,19	-1,5	0,01	0,0	-0,61	-2,4	PG 39:2	-0,03	0,0	-0,641	-0,6	0,17	0,0
PE 35:1	-0,29	-0,2	-0,49	-0,9	0,20	0,0							
PE 35:2	-0,32	-0,6	-0,39	-0,9	0,47	0,8							
PE 36:2	-0,18	-0,6	-0,01	0,0	0,07	0,0							
PE 37:1	0,01	0,0	-0,04	0,0	0,46	0,6							
PE 37:2	0,96	0,6	0,01	0,0	0,66	1,2							
PE 38:1	1,72	0,8	-0,22	-0,1	0,11	0,0							
PE 39:1	-0,07	0,0	0,01	0,0	0,56	0,9							
PE 39:2	0,78	0,5	-0,46	-0,8	0,03	0,0							

Zusätzlich zu den Lipidom-Untersuchungen wurden auch Transkriptomics- und Proteomics-Untersuchungen zur Behandlung von *B. subtilis*-Zellen mit den Alkaloiden Berberin, Boldin und Roemerin durchgeführt (Avci et al. 2018, Manuskript eingereicht). Die Untersuchungen zeigten, dass von den drei untersuchten Alkaloiden nur Roemerin eine antibakterielle Aktivität besitzt. Bei den Proteomics-Ergebnissen wurde eine Hochregulierung der Expression von MDR-Pumpen als Folge der Roemerin- und Berberin-Behandlung gefunden.

Im Gegensatz zu Berberin, das verstärkt durch Efflux-Pumpen aus den Zellen ausgeschleust wird, akkumuliert Roemerin in den Zellen. Dies führt zu vermehrtem oxidativen Stress, zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Induktion von Veränderungen in der Aufnahme von Eisen. Die Transcriptomics-Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit Roemerin signifikante Änderungen des Metabolismus induziert. Hierzu gehörten Veränderungen der Eisen-Aufnahme, des Eisen-Metabolismus, der anaeroben Atmung, der Synthese von aromatischen Aminosäuren und der Expression von MDR-Pumpen. Wie bei den *E. coli*-Zellen in Kapitel 6.2. wurden auch bei den *B. subtilis*-Zellen TEM-Untersuchungen mit Negativkontrastierung durchgeführt, um Morphologie der alkaloidbehandelten Zellen genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 gezeigt. In A ist die Kontrolle gezeigt, in B, C und D die mit Berberin, Boldin und Roemerin behandelten Zellen. In den Kontrollzellen waren deutlich die peritrichen lange Flagellen zu erkennen. Die Flagellen der alkaloidbehandelten Zellen die Flagellen schienen verkürzt zu sein.

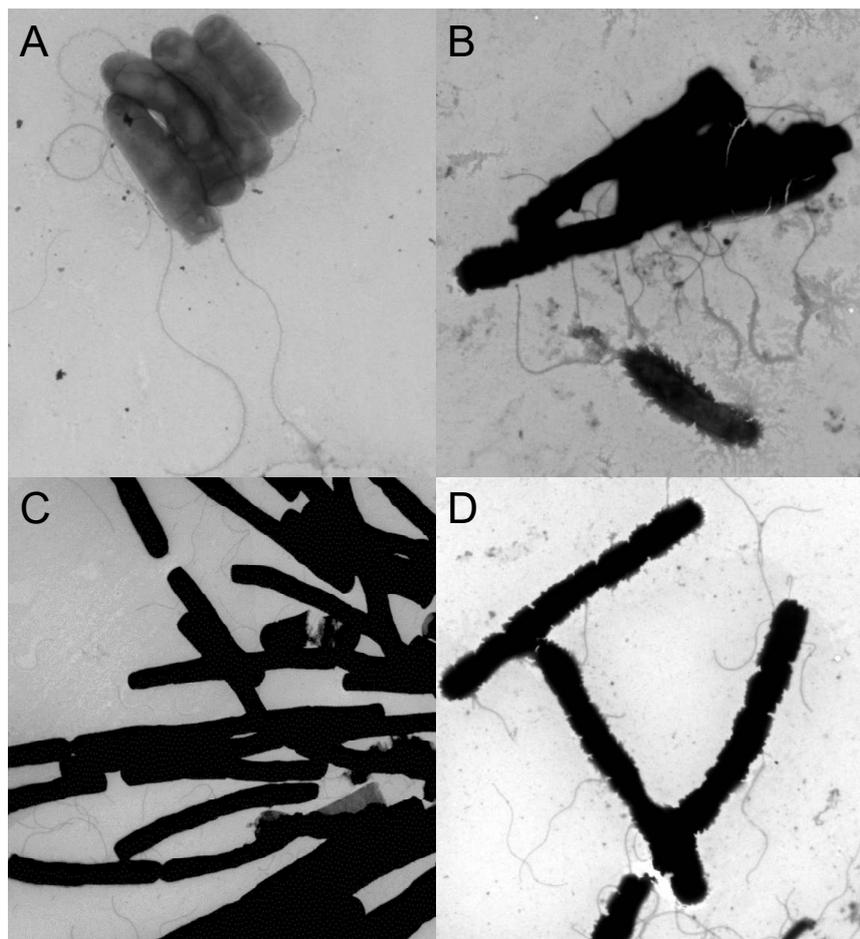


Abbildung 54

TEM-Aufnahmen von *B. subtilis* 168-Zellen zum Zeitpunkt $t=60$ min nach Alkaloid-Behandlung. Es wurde eine Alkaloid-Konzentration von $75 \mu\text{g/mL}$ pro Alkaloid verwendet. Es handelt es sich um TEM-Aufnahmen nach Negativkontrastierung mit Wolframatophosphorsäure. A: DMSO als Kontrolle, B: Berberin, C: Boldin, D: Roemerin.

Bei Berberin und Boldin waren Zellansammlungen und verkürzte Flagellen zu erkennen. Bei den mit Roemerin behandelten Zellen war auffällig, dass die Zellen Abschnürungen vergleichbar mit derjenigen auftretend bei Zellteilungen aufwiesen. Es ist ein Aneinanderkleben der Zellen als Stapel zu beobachten. Die fransige äußere Schicht der Zellen hängt vermutlich mit dem Platzen der Zellen im Hochvakuum des TEM zusammen.

6.4. Zusammenfassende Diskussion

Es wurden zunächst Lipidom-Veränderungen von *E. coli* K12 TB1-Zellen in Abhängigkeit der Wachstumszeit untersucht. Dabei wurden zusätzlich zu Unterschieden zwischen den Speziesanteilen auch Änderungen der Anteile einzelner Lipide in Abhängigkeit von der Wachstumszeit beobachtet. PE-Spezies und PG-Spezies mit gleichen Fettsäuren wiesen eine parallele Zu- oder Abnahme mit zunehmender Wachstumszeit auf. Dies entsprach der Erwartung, dass Anpassungen des Lipidoms in Abhängigkeit von der Wachstumszeit über eine Variation der in die GPL eingebauten Fettsäuren stattfinden, während die Kopfgruppen-Zusammensetzung der konstant bleibt ([57], [58], [16], [65]). Es wurde gefunden, dass für die Beurteilung von Lipidom-Veränderungen die klassenbezogenen Speziesanteile am besten geeignet sind. Bei dieser Normierung spielten die Intensitäten der Hauptspezies innerhalb einer Klasse, d.h. diejenigen Spezies, mit denen ca. 70% der Gesamtintensität erfasst werden, eine wesentliche Rolle. Die relativen Schwankungen der Speziesanteil-Werte betragen üblicherweise 2 bis 5%. Bei Aussagen über gefundene Speziesanteil-Veränderungen handelt es sich nicht um absolute Aussagen zu Zu- oder Abnahmen von Spezies, sondern um Aussagen zur relativen Veränderung. Die Normierung auf die Summe von MS-Intensitäten, z.B. von Standards, und auf die Zellzahl, d.h. die gemessenen OD_{600 nm}-Werte, erwies sich als nicht geeignet. Die Ursache hierfür sind Unterschiede der Lipid-Extraktionseffizienzen, die offenbar eine zusätzliche Quelle der Variabilität darstellen, die durch die vorgenommene Normierung nicht erfasst wird. Für die Bewertung der Signifikanz der beobachteten Trends von Speziesanteil-Änderungen wurden lineare Regressionsanalysen verwendet (RGP-Funktion von Excel). Dafür wurde ein Score für die Bewertung der Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse etabliert, der dafür verwendet wurde, einen Farbcode zur Visualisierung der Richtung und der Signifikanz der Trends zu etablieren.

Bei den Untersuchungen der Lipidom-Veränderungen in Abhängigkeit der Wachstumszeit wurden innerhalb einer Wachstumsphase, in diesem Fall der exponentiellen Phase, bis auf wenige Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede der Speziesanteile gefunden, während signifikante Unterschiede beim Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase zur

stationären Phase gefunden wurden. Da ein wesentlicher Teil dieser Arbeit die Untersuchung des Effekts von Alkaloiden auf bakterielle Zellen war und die Alkaloide in DMSO gelöst wurden, wurde zusätzlich untersucht, ob Veränderungen der Hauptspezies-Anteile der Klassen PE und PG in Abhängigkeit von der Wachstumszeit für Zellen in Kulturen mit 1% DMSO und Zellen in Kulturen ohne Zusatz von 1% DMSO auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass durch DMSO keine signifikanten Änderungen des Lipidoms verursacht werden. In Kapitel 6.2. wurde der Effekt des Alkaloids Roemerin auf *E. coli* K12 TB1 im Detail untersucht. Es wurden mehr hochsignifikante Änderungen der Speziesanteile bei der Kontrolle gefunden als in den mit Roemerin behandelten Zellen. Dies wäre für den Fall zu erwarten, falls die bakteriostatische Wirkung von Roemerin die wesentliche Wirkung darstellt. Allerdings handelte es sich bei den Spezies, die in Roemerin signifikante Veränderungen der Speziesanteile zeigten, nicht um die Spezies, die in der Kontrolle Veränderungen zeigten. Zusätzlich wurde in den mit Roemerin behandelten Zellen kein paralleles Verhalten von PE und PG gefunden. Der Effekt von Roemerin ist somit eindeutig nicht ausschließlich bakteriostatisch. Es wurde ein um einen Faktor 2 verlangsamtes Wachstum für Zellen gefunden, die mit Roemerin behandelt wurden, d.h. Roemerin besitzt eine bakteriostatische Wirkung. Eine zusätzliche bakteriozide Wirkung von Roemerin konnte von den Projektpartnern der Marmara-Universität gezeigt werden, d.h. nach 60 min Behandlungszeit mit dem Alkaloid wurde ein erhöhter Zelltod festgestellt ([77], [78]). Zusätzlich zu den Lipidom-Untersuchungen wurden auch die Ergebnisse von Transcriptomics- und Proteomics-Experimenten verwendet. Es wurde eine Beeinträchtigung der Zellmotilität in Roemerin behandelten Zellen und eine Herunterregulierung der Expression von Proteinen, die im Aminosäure- und Kohlenhydrat-Metabolismus involviert sind, gefunden. Die Zellen zeigten eine starke Verlangsamung des Energiestoffwechsels aufgrund der verringerten Kohlenstoffaufnahme [78]. Aufgrund der Labilität der Flagellen konnte der Effekt von Roemerin auf Flagellen mit TEM nicht untersucht werden.

Die Wirkung von Alkaloiden wurde auch für grampositive Bakterien, in diesem Fall *B. subtilis*, untersucht. Es wurden die drei Alkaloide Berberin, Boldin und Roemerin untersucht. Die Lipidom-Untersuchungen von Zellen, die 60 min nach Start der Alkaloid-Behandlung entnommen wurden, zeigten nur bei Roemerin (wenige) signifikante Veränderungen der Speziesanteile. Ergebnisse von Transcriptomics- und Proteomics-Untersuchungen durch den BMBF-Projektpartner zeigten, dass die Roemerin-Behandlung Änderungen des Metabolismus induzierte, u.a. eine veränderte Eisen-Aufnahme, Veränderungen bei anaerober Atmung, der Synthese von aromatischen Aminosäuren und in der Expression von MDR-Pumpen. Zusätzlich wurde gefunden, dass eine Akkumulation von Roemerin in den Zellen auftrat (Avci et al. 2018, Manuskript eingereicht). Zusammenfassend wurde nur für

Roemerin eine antibakterielle Aktivität gefunden. Die Wirkung von Roemerin konnte auch morphologisch durch TEM-Untersuchungen gezeigt werden. Im Vergleich zu Kontrollzellen waren die Zellen durch die Roemerin-Behandlung auffällig verkürzt, es wurden verkürzte Flagellen gefunden und es wurden Zellaggregate beobachtet.

Referenzen

1. Gorter, E. and F. Grendel, ON BIMOLECULAR LAYERS OF LIPOIDS ON THE CHROMOCYTES OF THE BLOOD. *The Journal of Experimental Medicine*, 1925. 41(4): p. 439.
2. Singer, S.J. and G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, 1972. 175(4023): p. 720-731.
3. Edidin, M., Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003. 4: p. 414.
4. Brown, D.A. and E. London, FUNCTIONS OF LIPID RAFTS IN BIOLOGICAL MEMBRANES. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1998. 14(1): p. 111-136.
5. Simons, K. and D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2000. 1: p. 31.
6. Fahy, E., et al., A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 2005. 46(5): p. 839-862.
7. Watson, A.D., Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 2006. 47(10): p. 2101-2111.
8. Smith, W.L. and R.C. Murphy, CHAPTER 12 - The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways A2 - Vance, Dennis E, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Fifth Edition)*, J.E. Vance, Editor. 2008, Elsevier: San Diego. p. 331-362.
9. Tsai, M. and B.W. O'Malley, Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*, 1994. 63(1): p. 451-486.
10. Dennis, E.A. and E.P. Kennedy, Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *Journal of Lipid Research*, 1972. 13(2): p. 263-267.
11. Wenk, M.R., The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2005. 4: p. 594.
12. Jackson, Catherine L., L. Walch, and J.-M. Verbavatz, Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization. *Developmental Cell*, 2016. 39(2): p. 139-153.
13. Gibellini, F. and T.K. Smith, The Kennedy pathway—De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*, 2010. 62(6): p. 414-428.
14. Vance, J.E., Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic*, 2015. 16(1): p. 1-18.
15. Law, J.H., H. Zalkin, and T. Kaneshiro, Transmethylation reactions in bacterial lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects*, 1963. 70(Supplement C): p. 143-151.
16. Dowhan, W., Molecular Basis for Membrane Phospholipid Diversity: Why Are There So Many Lipids? *Annual Review of Biochemistry*, 1997. 66(1): p. 199-232.
17. Cronan, J.E., Bacterial Membrane Lipids: Where Do We Stand? *Annual Review of Microbiology*, 2003. 57(1): p. 203-224.

18. van Meer, G., D.R. Voelker, and G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2008. 9(2): p. 112-124.
19. Dowhan, W. and M. Bogdanov, Chapter 1 Functional roles of lipids in membranes, in *New Comprehensive Biochemistry*. 2002, Elsevier. p. 1-35.
20. Bigay, J. and B. Antonny, Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. *Developmental Cell*, 2012. 23(5): p. 886-895.
21. van Meer, G., Cellular lipidomics. *The EMBO Journal*, 2005. 24(18): p. 3159-3165.
22. Yeagle, P.L., Cholesterol and the cell membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1985. 822(3): p. 267-287.
23. Bishop, W.R. and R.M. Bell, Assembly of Phospholipids into Cellular Membranes: Biosynthesis, Transmembrane Movement and Intracellular Translocation. *Annual Review of Cell Biology*, 1988. 4(1): p. 579-606.
24. Kennedy, E.P. and S.B. Weiss, THE FUNCTION OF CYTIDINE COENZYMES IN THE BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDES. *Journal of Biological Chemistry*, 1956. 222(1): p. 193-214.
25. Hoch, F.L., Cardiolipins and biomembrane function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1992. 1113(1): p. 71-133.
26. Shevchenko, A. and K. Simons, Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. 11: p. 593.
27. Rietveld, A. and K. Simons, The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1998. 1376(3): p. 467-479.
28. Navas-Iglesias, N., A. Carrasco-Pancorbo, and L. Cuadros-Rodríguez, From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: Analytical lipidomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2009. 28(4): p. 393-403.
29. Han, X. and R.W. Gross, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 2003. 44(6): p. 1071-1079.
30. Fenn, J.B., et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989. 246(4926): p. 64.
31. Cech, N.B. and C.G. Enke, Relating Electrospray Ionization Response to Nonpolar Character of Small Peptides. *Analytical Chemistry*, 2000. 72(13): p. 2717-2723.
32. Pulfer, M. and R.C. Murphy, Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 2003. 22(5): p. 332-364.
33. Karas, M., U. Bahr, and T. Dülcks, Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000. 366(6): p. 669-676.
34. Brügger, B., et al., Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997. 94(6): p. 2339-2344.
35. Liebisch, G., et al., Shorthand notation for lipid structures derived from mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 2013. 54(6): p. 1523-1530.

36. Schneiter, R., et al., Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (Esi-Ms/Ms) Analysis of the Lipid Molecular Species Composition of Yeast Subcellular Membranes Reveals Acyl Chain-Based Sorting/Remodeling of Distinct Molecular Species En Route to the Plasma Membrane. *The Journal of Cell Biology*, 1999. 146(4): p. 741-754.
37. Sampaio, J.L., et al., Membrane lipidome of an epithelial cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. 108(5): p. 1903-1907.
38. Wörmer, L., J. Lipp, and K.-U. Hinrichs, *Comprehensive Analysis of Microbial Lipids in Environmental Samples Through HPLC-MS Protocols*. 2015.
39. Bird, S.S., et al., Lipidomics Profiling by High Resolution LC-MS and HCD Fragmentation: Focus on Characterization of Mitochondrial Cardiolipins and Monolysocardiolipins. *Analytical chemistry*, 2011. 83(3): p. 940-949.
40. Narváez-Rivas, M. and Q. Zhang, Comprehensive untargeted lipidomic analysis using core-shell C30 particle column and high field orbitrap mass spectrometer. *Journal of chromatography. A*, 2016. 1440: p. 123-134.
41. Makarov, A., Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, 2000. 72(6): p. 1156-1162.
42. Eliuk, S. and A. Makarov, Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2015. 8(1): p. 61-80.
43. Blanksby, S.J. and T.W. Mitchell, Advances in Mass Spectrometry for Lipidomics. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2010. 3(1): p. 433-465.
44. Swartz, M.E., UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005. 28(7-8): p. 1253-1263.
45. Granafei, S., et al., Hydrophilic interaction and reversed phase mixed-mode liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry for polar lipids analysis. *Journal of Chromatography A*, 2016. 1477(Supplement C): p. 47-55.
46. Castillo, S., et al., Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2011. 108(1): p. 23-32.
47. Silhavy, T.J., D. Kahne, and S. Walker, *The Bacterial Cell Envelope*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2010. 2(5): p. a000414.
48. Chatterjee, S.N. and K. Chaudhuri, Gram-Negative Bacteria: The cell Membranes, in *Outer Membrane Vesicles of Bacteria*, S.N. Chatterjee and K. Chaudhuri, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 15-34.
49. Raetz, C.R. and W. Dowhan, Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(3): p. 1235-8.
50. Kamio, Y. and H. Nikaido, Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase C and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 1976. 15(12): p. 2561-2570.
51. Filgueiras, M.H. and J.A.F.O. den Kamp, Cardiolipin, a major phospholipid of gram-positive bacteria that is not readily extractable. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1980. 620(2): p. 332-337.
52. Goldfine, H., Bacterial membranes and lipid packing theory. *Journal of Lipid Research*, 1984. 25(13): p. 1501-1507.
53. Cronan, J., J and C. Rock, *Biosynthesis of Membrane Lipids*. EcoSal Plus, 2008.

54. Malanovic, N. and K. Lohner, Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2016. 1858(5): p. 936-946.
55. Grogan, D.W. and J.E. Cronan, Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1997. 61(4): p. 429-41.
56. Cronan, J.E., Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2002. 5(2): p. 202-205.
57. de Mendoza, D. and J.E. Cronan, Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends in Biochemical Sciences*, 1983. 8(2): p. 49-52.
58. Mansilla, M.C., et al., Control of Membrane Lipid Fluidity by Molecular Thermosensors. *Journal of Bacteriology*, 2004. 186(20): p. 6681-6688.
59. Zhang, Y.-M. and C.O. Rock, Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. 6: p. 222.
60. Kannenberg, E.L. and K. Poralla, Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. *Naturwissenschaften*, 1999. 86(4): p. 168-176.
61. Kanfer, J. and E.P. Kennedy, Metabolism and Function of Bacterial Lipids: II. BIOSYNTHESIS OF PHOSPHOLIPIDS IN ESCHERICHIA COLI. *Journal of Biological Chemistry*, 1964. 239(6): p. 1720-1726.
62. Ames, G.F., Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: Structure and Metabolism. *Journal of Bacteriology*, 1968. 95(3): p. 833-843.
63. Cronan, J.E., Phospholipid Alterations During Growth of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1968. 95(6): p. 2054-2061.
64. De Siervo, A.J., Alterations in the Phospholipid Composition of *Escherichia coli* B During Growth at Different Temperatures. *Journal of Bacteriology*, 1969. 100(3): p. 1342-1349.
65. Morein, S., et al., Wild-type *Escherichia coli* Cells Regulate the Membrane Lipid Composition in a Window between Gel and Non-lamellar Structures. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271(12): p. 6801-6809.
66. Oursel, D., et al., Lipid composition of membranes of *Escherichia coli* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. 21(11): p. 1721-1728.
67. Oursel, D., et al., Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. 21(20): p. 3229-3233.
68. Fleming, A., On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 1929. 10(3): p. 226-236.
69. Lewis, K., Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013. 12: p. 371.
70. Schatz, A., E. Bugle, and S.A. Waksman, Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria.*†. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1944. 55(1): p. 66-69.
71. Wright, G.D., Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014. 60(3): p. 147-154.

72. Gelband, H., et al., The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa*, 2015. 8(2): p. 30-34.
73. Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8: p. 423.
74. Cushnie, T.P.T., B. Cushnie, and A.J. Lamb, Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014. 44(5): p. 377-386.
75. Cowan, M.M., Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 1999. 12(4): p. 564-582.
76. Kutchan, T.M., Alkaloid Biosynthesis—The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell*, 1995. 7(7): p. 1059.
77. Gokgoz, N.B. and B.S. Akbulut, Proteomics Evidence for the Activity of the Putative Antibacterial Plant Alkaloid (-)-Roemerine: Mainstreaming Omics-Guided Drug Discovery. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2015. 19(8): p. 478-489.
78. Ayyildiz, D., et al., Transcriptomic analysis displays the effect of (-)-roemerine on the motility and nutrient uptake in *Escherichia coli*. *Current Genetics*, 2017. 63(4): p. 709-722.
79. Rouser, G., S. Fleischer, and A. Yamamoto, Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*, 1970. 5(5): p. 494-496.
80. Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley, A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 1957. 226(1): p. 497-509.
81. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959. 37(1): p. 911-917.
82. Matyash, V., et al., Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, 2008. 49(5): p. 1137-1146.
83. Löfgren, L., et al., The BUMER method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *Journal of Lipid Research*, 2012. 53(8): p. 1690-1700.
84. Chambers, M.C., et al., A Cross-platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. *Nature biotechnology*, 2012. 30(10): p. 918-920.
85. Zacarias, A., D. Bolanowski, and A. Bhatnagar, Comparative measurements of multicomponent phospholipid mixtures by electrospray mass spectroscopy: relating ion intensity to concentration. *Analytical Biochemistry*, 2002. 308(1): p. 152-159.
86. Wampler, F.M., A.T. Blades, and P. Kebarle, Negative ion electrospray mass spectrometry of nucleotides: ionization from water solution with SF₆ discharge suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1993. 4(4): p. 289-295.
87. Koivusalo, M., et al., Quantitative determination of phospholipid compositions by ESI-MS: effects of acyl chain length, unsaturation, and lipid concentration on instrument response. *Journal of Lipid Research*, 2001. 42(4): p. 663-672.
88. Khoury, S., et al., A study of inter-species ion suppression in electrospray ionization-mass spectrometry of some phospholipid classes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016. 408(5): p. 1453-1465.

89. Jenke, D., et al., Extractables Characterization for Five Materials of Construction Representative of Packaging Systems Used for Parenteral and Ophthalmic Drug Products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2013. 67(5): p. 448-511.
90. Beermann, C., et al., sn-Position determination of phospholipid-linked fatty acids derived from erythrocytes by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Lipids*, 2005. 40(2): p. 211-218.
91. Hou, W., et al., Lyso-form fragment ions facilitate the determination of stereospecificity of diacyl glycerophospholipids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011. 25(1): p. 205-217.
92. Maccarone, A.T., et al., Characterization of acyl chain position in unsaturated phosphatidylcholines using differential mobility-mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*, 2014. 55(8): p. 1668-1677.
93. Kozlowski, R.L., T.W. Mitchell, and S.J. Blanksby, Separation and Identification of Phosphatidylcholine Regioisomers by Combining Liquid Chromatography with a Fusion of Collision- and Ozone-Induced Dissociation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2015. 21(3): p. 191-200.
94. Williams, P.E., et al., Pinpointing Double Bond and sn-Positions in Glycerophospholipids via Hybrid 193 nm Ultraviolet Photodissociation (UVPD) Mass Spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 2017. 139(44): p. 15681-15690.
95. Huang, Z.-H., D.A. Gage, and C.C. Sweeley, Characterization of Diacylglycerolphosphocholine Molecular Species by FAB-CAD-MS/MS: A General Method Not Sensitive to the Nature of the Fatty Acyl Groups. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1992. 3(1): p. 71-78.
96. Dennis, E.A., et al., Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews*, 2011. 111(10): p. 6130-6185.
97. Vernooij Elisabeth, A.A.M., et al., RP-hPLC/ESI MS determination of acyl chain positions in phospholipids. *Journal of Separation Science*, 2002. 25(5-6): p. 285-289.
98. Schäfer, T., Unterschiede zwischen zwei Gruppen: der t-Test, in *Statistik II: Inferenzstatistik*, T. Schäfer, Editor. 2011, VS Verlag für Sozialwissenschaften: Wiesbaden. p. 103-114.