



Untersuchung von isomeren Lipiden mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie

Bachelorarbeit

vorgelegt von: Carla Kirschbaum

Matrikelnummer: 4867501

Bearbeitungszeitraum: 29.05. - 24.07.2017

1. Prüfer: Prof. Dr. Kevin Pagel

2. Prüfer: Prof. Dr. Christoph Schalley

Zusammenfassung

Lipide bilden eine große Klasse von Biomolekülen, deren vielfältige biologische Funktionen von der Energiespeicherung über den Aufbau von Zellmembranen bis zur hormonellen Signaltransduktion reichen. Die chemische Struktur von Lipiden ist nicht einheitlich definiert und durch das zusätzliche Vorhandensein zahlreicher Isomere ist das menschliche Lipidom hochkomplex. Ein Beispiel für die Komplexität von Lipiden sind isomere Phosphatidylcholine. Sie bilden das Grundgerüst von Biomembranen und beeinflussen durch ihre Struktur maßgeblich die Membraneigenschaften. Selbst kleine Unterschiede wie Konnektivitäts- oder Doppelbindungsisomerien können dabei erhebliche Unterschiede bewirken. Deshalb ist es wichtig, Lipidstrukturen im Detail zu untersuchen. Bisher wurden Lipide in erster Linie mittels Massenspektrometrie analysiert, aber detaillierte Informationen über Isomerien können auch mit aufwändigen chromatographischen Methoden und Tandem-Massenspektrometrie nicht gewonnen werden. Eine aussichtsreiche Alternative stellt deshalb die Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie dar. Die ionisierten Lipide durchqueren dabei unter Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes eine mit Inertgas gefüllte Zelle. Je nach Größe und Form der Lipide kommt es zu unterschiedlich großer Abbremsung durch Kollisionen mit den Gasteilchen. Aus den daraus resultierenden Driftzeiten ergeben sich unterschiedlich große Kollisionsquerschnitte, die eine Unterscheidung der Isomere ermöglichen. Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie ist bisher vor allem für Proteine gut erforscht und wird derzeit für Kohlenhydrate charakterisiert. Für Lipide liegen noch vergleichsweise wenige Daten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden isomere Phosphatidylcholine aus vier verschiedenen biologischen Proben mit Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurden Lipidextrakte aus Tumorgewebe zweier verschiedener Arten von Lungenkrebs sowie Referenzproben aus gesundem Lungengewebe verglichen. Das Ziel der Untersuchungen bestand in der Analyse von Unterschieden in der Isomerenzusammensetzung der Phosphatidylcholine aus gesundem Lungengewebe und Tumorgewebe sowie zwischen den beiden Tumorarten. Im positiven Ionenmodus wurden protonierte Phosphatidylcholine und verschiedene Metallionen-Addukte untersucht, im negativen Modus Chlorid- und Acetat-Addukte. Die größten Unterschiede zwischen den Proben wurden im positiven Ionenmodus bei den Silber-Addukten beobachtet. Im negativen Ionenmodus wurden außerdem Hinweise über die Zusammensetzung der Phosphatidylcholine mit Tandem-Massenspektrometrie erhalten.



Summary

Lipids constitute a broad class of biological molecules with a variety of biological functions, for example in energy storage and cell-cell communication. As the chemical structure of lipids is diverse and also isomeric species exist, the human lipidome is highly complex. The complexity can be perceived using the example of isomeric phosphatidylcholines, which constitute a major component of biological membranes and significantly influence the membrane functions by their chemical structures. Even small differences in connectivity or double bond configuration can have a big impact, so that it is important to analyze lipid structures in full detail. To date, mainly mass spectrometry is applied for lipid analysis. However, it is not possible to get detailed information about stereoisomers, even when using chromatographic methods or tandem mass spectrometry. Recently, ion mobility-mass spectrometry appeared as a promising alternative for the elucidation of isomeric species. Ionized lipids traverse a cell filled with an inert gas under the influence of a weak electric field. Depending on the size and shape of the lipids, they undergo more or less collisions with the neutral gas. The resulting drift times can then be converted into rotationally averaged collision cross sections that allow the distinction of isomers. Ion mobility-mass spectrometry has been investigated extensively for proteins and is now being explored for carbohydrates. For lipids however, only few data are available.

In this Bachelor thesis, isomeric phosphatidylcholines extracted from four different biological samples were investigated via ion mobility-mass spectrometry. The lipid extracts derived from tumor tissues of two different types of lung cancer as well as normal lung tissues for reference. The aim of this investigation was to detect differences concerning the composition of isomers in tumor tissue compared to normal lung tissue and also to analyze differences between the different types of cancer. In the positive ion mode, protonated phosphatidylcholines and different metal-adducts were investigated, whereas chlorine- and acetate-adducts were analyzed in the negative ion mode. Silver-adducts yielded the greatest distinction between the collision cross sections in the positive ion mode. In the negative ion mode, information about the composition of the phosphatidylcholines was obtained by tandem mass spectrometry experiments.



Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchung von isomeren Lipiden mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie“ im Zeitraum vom 29.05.–24.07.2017 selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 24.07.2017

Carla Kirschbaum



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich insbesondere Herrn Prof. Kevin Pagel für das interessante Thema und für die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit in seiner Arbeitsgruppe schreiben zu können, danken. Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Christoph Schalley für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu lesen und zu bewerten. Außerdem möchte ich mich bei meinem Betreuer Christian Manz und bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mich sehr herzlich empfangen haben und mir bei allen Fragen und Problemen hilfsbereit zur Seite standen. Nicht zuletzt geht mein Dank auch an Herrn Dr. Dominik Schwudke und an Lars Florian Eggers vom Forschungszentrum Borstel für die Bereitstellung der Proben und Erreichbarkeit bei Fragen.



Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Summary.....	V
Selbstständigkeitserklärung.....	VII
Danksagung.....	IX
Abkürzungen.....	XIII
1. Einleitung.....	1
2. Allgemeiner Teil.....	2
2.1 Lipide.....	2
2.1.1 Phosphatidylcholine.....	3
2.2 Lipidomics.....	5
2.3 Massenspektrometrie.....	6
2.3.1 Ionisationsmethoden.....	6
2.3.2 Elektrospray-Ionisation.....	7
2.3.3 Bauweisen von Massenspektrometern.....	8
2.3.4 Tandem-Massenspektrometrie.....	9
2.4 Ionenmobilitätsspektrometrie.....	10
2.5 Synapt G2-S HDMS.....	12
2.6 Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie in der Lipidanalyse.....	14
3. Aufgabenstellung.....	15
4. Experimenteller Teil.....	16
4.1 Probenvorbereitung.....	16
4.2 Geräte.....	17
4.3 Durchführung.....	17
4.3.1 Geräteeinstellungen.....	18
4.3.2 Bestimmung von Kollisionsquerschnitten.....	18
5. Ergebnisse.....	21
5.1 MS- und MSMS-Spektren $[M+H]^+$	21
5.2 MS- und MSMS-Spektren der Metallionen-Addukte.....	24
5.3 Messung mit Helium.....	34
5.4 Negativer Ionenmodus.....	36
6. Diskussion.....	41
7. Literaturverzeichnis.....	43
8. Anhang.....	45



Abkürzungen

ADC	Adenokarzinom
CCS	Kollisionsquerschnitt (<i>Collision Cross Section</i>)
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>Collision Induced Dissociation</i>)
DT-IMS	<i>Drift Tube</i> Ionenmobilitätsspektrometrie
ESI	Elektrospray-Ionisation
FAIMS	<i>Field-Asymmetric</i> Ionenmobilitätsspektrometrie
HDMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>High Definition Mass Spectrometry</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IMS	Ionenmobilitätsspektrometrie
ISTD	Interner Standard
MS	Massenspektrometrie
MSMS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
OzID	Ozon-induzierte Dissoziation
PC	Phosphatidylcholin
SCC	Plattenepithelkarzinom
<i>sn</i>	Stereospezifische Nummerierung
TIMS	<i>Trapped</i> Ionenmobilitätsspektrometrie
TOF	Flugzeit (<i>Time of Flight</i>)
TW-IMS	<i>Travelling Wave</i> Ionenmobilitätsspektrometrie



1. Einleitung

In der Stoffklasse der Lipide werden Moleküle mit sehr unterschiedlichen Strukturen und Funktionen zusammengefasst. Umgangssprachlich sind Lipide auch als Fette bekannt, die aber tatsächlich nur eine Unterklasse darstellen. Dementsprechend kann die biologische Funktion von Lipiden nicht allein auf die Speicherung von Energie reduziert werden. Lipide bilden den Hauptbestandteil von Zellmembranen, sind als Hormone an der Signalübertragung beteiligt und essentiell für viele Stoffwechselprozesse.^[1] Veränderungen im Lipidstoffwechsel wirken sich deshalb auf zahlreiche zelluläre Prozesse wie zum Beispiel das Zellwachstum aus und ein veränderter Lipidstoffwechsel kann ein Indikator für Fehlfunktionen und Krankheiten sein.^[2] In mehreren Studien wurde beispielsweise bereits gezeigt, dass sich der Lipidstoffwechsel von Krebszellen von dem gesunder Zellen unterscheidet.^[3] Lipide, die in Folge einer Krankheit im Vergleich zum gesunden Zustand deutlich häufiger oder seltener vorkommen, könnten in Zukunft als Biomarker genutzt werden, um zuverlässig auf bestimmte Krankheiten hinzuweisen.^[4] Die systematische Untersuchung des Lipidoms sowie die Entschlüsselung von Lipidstoffwechselwegen sind deshalb medizinisch von großem Interesse, sodass sich im Laufe des vergangenen Jahrzehnts Lipidomics als eigenständige Forschungsdisziplin etabliert hat.^[2]

Das eukaryotische Lipidom wird auf bis zu 10^5 verschiedene Moleküle, darunter zahlreiche Isomere, geschätzt.^[5] Dies stellt eine große Herausforderung für die hauptsächlich auf massenspektrometrischen Techniken basierende Analyse von Lipiden dar. Isomere können mit konventioneller Massenspektrometrie (MS) nicht, oder durch Kombination mit chromatographischen Methoden nur sehr begrenzt, unterschieden werden. Da sich aber die Hinweise häufen, dass Isomere eine wichtige Rolle bei der Entstehung einiger Krankheiten, darunter auch Krebs, spielen, ist deren Identifizierung von großer Relevanz.^[6] Innerhalb der letzten Jahre hat sich deshalb die Ionenmobilitätsspektrometrie (IMS) als vielversprechender Ansatz zur Ergänzung etablierter massenspektrometrischer Methoden hervorgetan. Bei der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS) werden Ionen nicht nur nach Masse und Ladung, sondern auch nach ihrer Größe und Form getrennt. Dazu werden die Ionen zunächst unter dem Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes durch eine Ionenmobilitätszelle geleitet und anschließend massenspektrometrisch detektiert. Die Ionenmobilitätszelle ist mit einem inerten Gas, beispielsweise Stickstoff oder Helium, gefüllt. Je nach Größe und Form der Ionen kommt es zu unterschiedlich häufigen Kollisionen mit den neutralen Gasteilchen und somit zu unterschiedlichen Driftgeschwindigkeiten; kompakte Ionen durchqueren die Ionenmobilitätszelle schneller als gestreckte. Anhand der Driftzeitunterschiede können Regio- und Stereoisomere unterschieden werden.^[7]

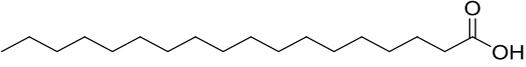
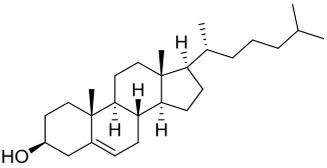
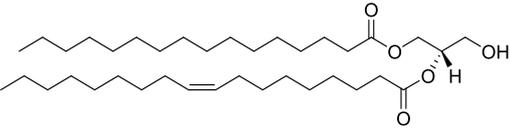
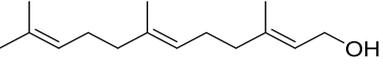
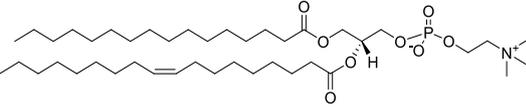
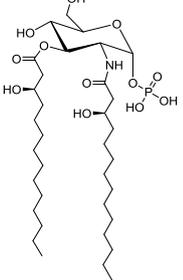
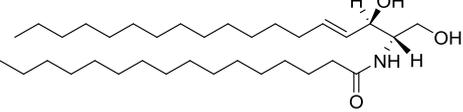
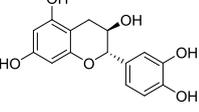
2. Allgemeiner Teil

2.1 Lipide

Lipide bilden eine der vier großen Klassen von Biomolekülen neben Nucleinsäuren, Proteinen und Kohlenhydraten. Anders als diese sind Lipide allerdings nicht durch eine bestimmte, aus Biopolymer-Einheiten zusammengesetzte Struktur definiert. Es handelt sich vielmehr um strukturell sehr diverse, hydrophobe oder amphiphile Moleküle, die in organischen Lösungsmitteln gut löslich sind. Lipide erfüllen unterschiedlichste biologische Funktionen, die unter anderem den Aufbau von Zellmembranen sowie die Speicherung von Energie umfassen. Sie spielen aber auch eine Rolle bei der Signalübertragung, Entzündungen und dem programmierten Zelltod.^[1]

Um eine international einheitliche Klassifizierung und Bezeichnung zu ermöglichen, wurden Lipide nach ihrer chemischen Zusammensetzung in acht Kategorien eingeteilt: Fettacyl, Glycerolipide, Glycerophospholipide, Sphingolipide, Sterollipide, Prenollipide, Saccharolipide und Polyketide (Tabelle 1).^[8]

Tabelle 1: Einteilung von Lipiden in acht Kategorien mit jeweils einem Beispiel.

<p>Fettacyl: Stearinsäure</p> 	<p>Sterollipide: Cholesterin</p> 
<p>Glycerolipide: 1-Palmitoyl-2-oleoylglycerol</p> 	<p>Prenollipide: Farnesol</p> 
<p>Glycerophospholipide: 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholin</p> 	<p>Saccharolipide: Lipid X</p> 
<p>Sphingolipide: N-Palmitoylceramid</p> 	<p>Polyketide: Catechin</p> 

Die Kategorien sind wiederum in Klassen und Unterklassen unterteilt. Einen Überblick bietet die Datenbank der *LIPID Metabolites And Pathways Strategy* (LIPID MAPS)^[9].

Fettacycle umfassen hauptsächlich Fettsäuren und davon abgeleitete Verbindungen wie beispielsweise Wachse. Fettsäuren sind langkettige, unverzweigte, gesättigte oder ungesättigte Carbonsäuren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Energiespeicherung und sind wesentliche Komponenten der Glycerolipide, Glycerophospholipide und Sphingolipide. Außerdem leiten sich einige Hormone wie beispielsweise Prostaglandine von Fettsäuren ab.

Glycerolipide setzen sich aus Glycerol und Fettsäuren zusammen und dienen im Wesentlichen der Speicherung von Energie. Triacylglycerole sind umgangssprachlich als Fette und Öle bekannt. In Glycerophospholipiden ist Phosphat an eine Hydroxylgruppe des Glycerols gebunden, sodass die Moleküle amphiphile Eigenschaften besitzen. Sie sind Hauptbestandteil von Biomembranen. Den größten Anteil der Glycerophospholipide bilden in den Zellen von Säugetieren die Phosphatidylcholine (PC). Dort machen sie über 30% der Gesamtheit aller Lipide aus.^[10] Aufgrund der großen Abundanz in menschlichen Zellen sind Phosphatidylcholine experimentell gut zugänglich und darüber hinaus sehr interessant bei der Untersuchung von Isomeren, da die Struktur der Phosphatidylcholine in großem Maße die Membraneigenschaften beeinflusst.^[11]

2.1.1 Phosphatidylcholine

In Phosphatidylcholinen ist an eine endständige Hydroxylgruppe des Glycerols Phosphocholin gebunden. Die übrigen beiden Hydroxylfunktionen sind mit Fettsäuren verestert (Abb. 1). Zur Angabe der Positionen der Fettsäuren werden die stereospezifischen Nummerierungen (*sn*) *sn*-1 und *sn*-2 für das Kohlenstoffgerüst des Glycerols verwendet. Die Position *sn*-1 steht in der Fischer-Projektion immer oben und die Fettsäure an der *sn*-2 Position weist nach links, sodass die Stereochemie eindeutig festgelegt ist.

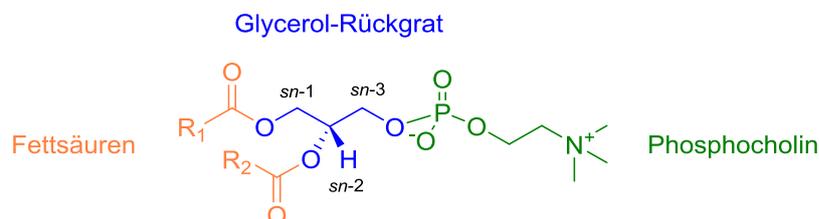


Abb. 1: Allgemeine Struktur von Phosphatidylcholinen. R₁ und R₂ sind gesättigte/ungesättigte Fettsäurereste. Die Fettsäuren sind an der mittleren (*sn*-2) oder endständigen (*sn*-1) Hydroxylgruppe des Glycerols gebunden. An der *sn*-3 Position befindet sich Phosphocholin.

Phosphatidylcholine mit Fettsäuren, die aus insgesamt 34 Kohlenstoffatomen bestehen und eine Doppelbindung aufweisen, werden mit PC 34:1 abgekürzt. Es handelt sich um häufige, natürlich in menschlichen Zellen vorkommende Phospholipide.^[9] Für die Phosphatidylcholine PC 34:1 existieren mehrere Strukturisomere sowie Doppelbindungsisomere. Die Angabe der Fettsäurezusammensetzung erfolgt jeweils durch Angabe der Kohlenstoffatomanzahl, die durch einen Doppelpunkt von der Doppelbindungsanzahl getrennt ist. Die Fettsäure an der *sn*-1 Position wird jeweils zuerst genannt. Die Bezeichnung kann außerdem durch die Angabe der Doppelbindungsposition und deren Konfiguration (*Z* oder *E*) ergänzt werden. Dazu wird jeweils ausgehend vom letzten Kohlenstoffatom gezählt.^[12] Wird als Referenz die Zusammensetzung 16:0/18:1(*Z*₉) verwendet, so gibt es Strukturisomere mit anderen Fettsäuren, mit umgekehrter Verknüpfung oder mit einer anderen Doppelbindungsposition sowie Doppelbindungsisomere (Tabelle 2). Außerdem sind Kombinationen der Isomeren denkbar.

Tabelle 2: Übersicht über Struktur- und Doppelbindungsisomere der Phosphatidylcholine PC 34:1 (Referenz: 16:0/18:1(*Z*₉)).

Isomerie	Struktur	Bezeichnung
		16:0/18:1(<i>Z</i> ₉)
Fettsäure-zusammensetzung		16:1/18:0(<i>Z</i> ₇)
Fettsäureverknüpfung (<i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2)		18:1/16:0(<i>Z</i> ₉)
Doppelbindungsposition		16:0/18:1(<i>Z</i> ₁₁)
Doppelbindungs-konfiguration		16:0/18:1(<i>E</i> ₉)

2.2 Lipidomics

Die strukturelle Diversität von Lipiden stellt eine große Herausforderung für die chemische Analyse und Charakterisierung des Lipidoms, der Gesamtheit der zellulären Lipide, dar. Um Struktur und Funktion aller in einer Zelle oder einem Organismus vorhandenen Lipide sowie Interaktionen von Lipiden mit anderen zellulären Komponenten zu erforschen, wurde im Jahr 2003 Lipidomics als Bestandteil von Metabolomics und als jüngste der *omics*-Teilgebiete implementiert. Seitdem wurden große Fortschritte gemacht, die vor allem auf technologische Verbesserungen in der Massenspektrometrie sowie auf Fortschritte auf dem Gebiet der Bioinformatik und in der Datenverarbeitung zurückzuführen sind.^[2]

Das Ziel von Lipidomics besteht nicht nur in der Charakterisierung des Lipidoms sondern auch in der Entschlüsselung von Lipidstoffwechselwegen sowie damit verbundenen Krankheitsmechanismen auf molekularer Ebene. Die Struktur und Funktion von Lipiden hängen, ebenso wie bei anderen Biomolekülen, eng zusammen, sodass Veränderungen im Stoffwechsel in einer veränderten Lipidzusammensetzung resultieren können. Krebszellen weisen beispielsweise aufgrund ihrer erhöhten Wachstumsrate einen anderen Lipidstoffwechsel als gesunde Zellen auf.^[3] In dieser Hinsicht ist insbesondere auch die Untersuchung isomerer Lipide von entscheidender Bedeutung: Die Doppelbindungsposition in Phosphatidylcholinen beeinflusst die Fluidität und Funktion von Biomembranen sowie zelluläre Signalkaskaden.^[11] Die Membraneigenschaften werden auch durch *trans*-Fettsäuren verändert, die durch radikalische Isomerisierung von *cis*-Fettsäuren entstehen können.^[13] Die Position der Fettsäuren (*sn*-1 oder *sn*-2) ist entscheidend für die Eigenschaften von sekundären Botenstoffen, die durch enzymatische Abspaltung der Fettsäure in *sn*-2 Position aus Phosphatidylcholinen entstehen.^[14]

Das Ziel von strukturaufklärenden Methoden muss deshalb darin bestehen, Veränderungen des Lipidoms in Folge von Krankheiten zu beobachten und nachzuvollziehen. Dazu werden heutzutage größtenteils massenspektrometrische Methoden angewendet.

2.3 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Methoden basieren auf der Trennung und Detektion von Moleküllionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z). Der allgemeine Aufbau eines Massenspektrometers umfasst eine Ionenquelle und einen Analysator mit Detektor. In der Ionenquelle wird die Probe ionisiert, sodass die geladenen Teilchen anschließend unter Hochvakuum durch den Massenanalysator geleitet werden können. Am Detektor werden die Moleküle nach ihrem m/z -Verhältnis detektiert und anschließend ein Massenspektrum generiert.

2.3.1 Ionisationsmethoden

In den Anfängen der Massenspektrometrie konnten lediglich kleine, wenig polare, ausreichend flüchtige und thermisch stabile Substanzen untersucht werden, da die Probe für die Überführung in die Gasphase verdampft werden musste. Außerdem waren nur energiereiche Ionisationstechniken wie die Elektronenstoß-Ionisation und chemische Ionisation verfügbar, sodass größere und hoch funktionalisierte Moleküle bereits bei der Probenzuführung und Ionisation zersetzt wurden.

Die Analyse von Biomolekülen mittels Massenspektrometrie wurde erst durch die Entwicklung milder Ionisationstechniken in den 1980er Jahren möglich. Diese können generell in Zerstäubungsmethoden und Desorptionsmethoden unterteilt werden. Letztere ermöglichen die Ionisation von Proben aus der kondensierten Phase, die dazu gegebenenfalls in eine Matrix eingebettet werden. Im Gegensatz dazu werden bei den Zerstäubungsmethoden Ionen direkt aus einer Lösung desorbiert, die dazu fein versprüht wird. Eine Übersicht über geläufige Ionisationsmethoden bietet Tabelle 3.^[15]

Tabelle 3: Überblick über die wichtigsten Ionisationsmethoden in der Massenspektrometrie.

<p>Verdampfungsmethoden: Verdampfung der Probe durch Erhitzen im Vakuum mit anschließender Ionisation in der Gasphase</p>	<p>Elektronenstoß-Ionisation (EI) Chemische Ionisation (CI)</p>
<p>Desorptionsmethoden: Überführung von Ionen von der Oberfläche einer festen Probe in die Gasphase durch Desorption</p>	<p><i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (MALDI) Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) <i>Fast-Atom Bombardment</i> (FAB)</p>
<p>Zerstäubungsmethoden: Erzeugung von Ionen durch Versprühen einer Lösung bei atmosphärischem Druck</p>	<p>Elektrospray-Ionisation (ESI) <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> (APCI) <i>Atmospheric Pressure Photo Ionization</i> (APPI)</p>

2.3.2 Elektrospray-Ionisation

Elektrospray-Ionisation (ESI) ist eine weit verbreitete Methode zur Ionisation von gelösten Substanzen. J. Fenn war maßgeblich an der Entwicklung der Technik beteiligt und beschrieb diese im Jahr 1988 erstmals umfassend.^[16] ESI wurde zwar ursprünglich für biologische Makromoleküle entwickelt, hat aber mittlerweile eine viel breitere Anwendung. Da es sich um eine sehr sanfte Ionisationsmethode handelt, können mit ESI auch nicht-kovalent gebundene Komplexe untersucht werden.

Die gelöste Probe wird aus beschichteten Quarzglas- oder Stahlkapillaren mit einem Innendurchmesser von etwa 100 μm versprüht (Abb. 2). Zwischen der Kapillare und der Gegenelektrode wird eine Hochspannung von wenigen Kilovolt angelegt. Die Potentialdifferenz führt zu einer Ladungstrennung in der Kapillare, sodass sich gleiche Ladungen auf der Oberfläche der Lösung befinden und sich am Ende der Kapillare ein Taylor-Cone bildet. An dessen Spitze übersteigt die elektrostatische Abstoßung gleicher Ladungen die Oberflächenspannung, sodass Tröpfchen freigesetzt werden. Durch Verdampfen des Lösemittels nimmt der Radius dieser Tröpfchen ab und demzufolge nimmt die Dichte gleicher Ladungen auf der Tröpfchenoberfläche zu. Sobald das sogenannte Rayleigh-Limit überschritten wird, kommt es zu einer Coulomb-Explosion, bei der viele kleinere Tröpfchen entstehen. Die Gesamtoberfläche dieser Tröpfchen ist größer als die des ursprünglichen Tröpfchens, sodass das Rayleigh-Limit wieder unterschritten wird. Da das Lösemittel weiter verdampft, wiederholt sich dieser Vorgang mehrmals bis die Tröpfchen so klein sind, dass die Ionen daraus freigesetzt werden.^[15]

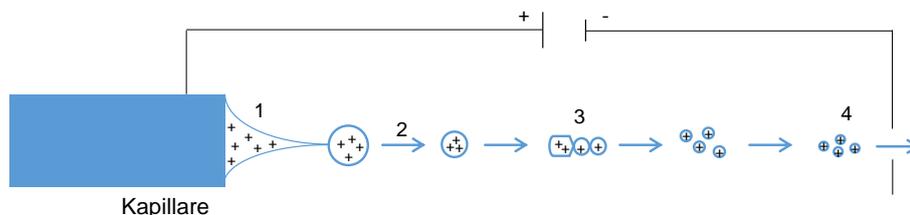


Abb. 2: Schematische Darstellung von ESI im positiven Ionenmodus.

1. Bildung eines Taylor-Cones an der Spitze der Kapillare und Freisetzung von Tröpfchen; 2. Verdampfung des Lösemittels; 3. Coulomb-Explosion; 4. Wiederholung des Vorgangs bis zur Bildung freier Ionen, die die Ionenquelle verlassen.

Für die Freisetzung der Ionen existieren zwei verschiedene Theorien. Nach dem Modell des geladenen Rückstands (*Charge Residue Model*, CRM) von M. Dole befindet sich letztendlich in jedem Tröpfchen nur ein einzelnes Ion, das durch Verdampfen des übrigen Lösemittels freigesetzt wird.^[17] Dieses Modell wird in erster Linie für große Moleküle angenommen.^[18] Demgegenüber steht das Ionenemissionsmodell (*Ion Evaporation Model*, IEM) nach J. Iribarne und B. Thomson, das eher für kleinere Moleküle zutrifft. Es besagt, dass bereits ab einer bestimmten Größe des Tröpfchens

Ionen aus dem geladenen Tröpfchen austreten, während das Lösemittel weiter verdampft.^[19] Nach der Freisetzung gasförmiger Ionen werden diese durch ein Loch in der Gegenelektrode in das Massenspektrometer geleitet. Für kleinste Probenmengen und –konzentrationen eignet sich eine modifizierte Technik, die nano-Elektrospray-Ionisation (nano-ESI). Diese basiert auf dem gleichen Prinzip wie ESI. Allerdings ist die Flussrate viel geringer und der Durchmesser der Kapillare liegt in der Größenordnung von etwa einem Mikrometer. Dadurch sind geringere Probenmengen für die Analyse nötig. Darüber hinaus ist die Ionisierung im Vergleich zu konventioneller ESI effizienter und die Messung deutlich empfindlicher.^[20]

2.3.3 Bauweisen von Massenspektrometern

Massenspektrometer sind kommerziell in verschiedenen Bauweisen verfügbar. Diese werden nach der jeweiligen Methode der Ionentrennung benannt (Tabelle 4). Die ältesten Geräte sind Sektorfeld-Analysatoren, in denen die zu analysierenden Ionen mit einem elektrischen Feld beschleunigt werden und im Analysator durch elektrische und/oder magnetische Felder abgelenkt werden. Je nach m/z -Verhältnis der Ionen ergeben sich unterschiedlich große Ablenkradien. Wesentlich kompakter sind Quadrupol-Analysatoren, die aufgrund ihrer einfachen Handhabung die am häufigsten eingesetzten Analysatoren sind. Ein Quadrupol besteht aus vier hyperbolischen Metallstäben, in deren Innern durch Anlegen einer Gleichspannung und Überlagerung mit einer Wechselspannung ein elektrisches Feld entsteht. Je nach Spannung stabilisiert dieses Feld nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis auf ihrer Flugbahn.

Eine andere Art von Analysatoren sind Ionenfallen, die Ionen akkumulieren und anschließend getrennt detektieren. Durch ein elektrisches Feld werden Ionen auf ihrem m/z -Verhältnis entsprechenden zyklischen Bahnen gehalten und dann durch Änderung der Spannung nacheinander dem Detektor zugeführt. Flugzeit-Analysatoren (*Time of Flight*, TOF) trennen Ionen nach ihrer Flugzeit auf einer vorgegebenen Strecke. Die Ionen werden zunächst durch Anlegen einer Spannung beschleunigt. Beim Eintritt in das Flugrohr ist die kinetische Energie aller Ionen gleich groß, sodass leichtere Ionen schneller fliegen als schwerere. Je nach m/z -Verhältnis werden demzufolge unterschiedliche Flugzeiten erreicht. In den TOF-Analysator kann zusätzlich ein Reflektron eingebaut werden. Beim Eintritt in das Flugrohr starten nicht alle Ionen auf der gleichen Höhe, weil die Ionenwolke eine gewisse Ausdehnung besitzt. Da die Ionen unterschiedlich tief in das Feld des Reflektrons eindringen und dadurch unterschiedlich lange Strecken zurücklegen, wird die Breite der Verteilung schmaler. Dies erhöht die Auflösung des TOF-Analysators um ein bis zwei Größenordnungen^[15]

Tabelle 4: Beispiele für verschiedene Analysatoren von Massenspektrometern.

Ionenstrahl-Analysatoren: Ablenkung eines Ionenstrahls in elektrischen/magnetischen Feldern	Sektorfeld-Analysatoren Quadrupol-Analysatoren
Ionenfallen-Analysatoren: Gepulste Akkumulation von Ionen mit anschließender Trennung	Quadrupol-Ionenfallen (QIT) Fouriertransformations-Ionencyclotronresonanz-Analysatoren (FT-ICR) Orbitrap-Analysatoren
Flugzeit-Analysatoren: Messung der Flugzeiten von Ionen auf einer vorgegebenen Strecke	Flugzeit-Analysator (TOF)

2.3.4 Tandem-Massenspektrometrie

Tandem-Massenspektrometrie (MSMS) ist eine wichtige Methode zur Strukturaufklärung durch Fragmentierung der zu analysierenden Substanz. Durch die Kombination von mindestens zwei massenspektrometrischen Experimenten können sowohl die intakten Vorläuferionen als auch deren Produktionen nach der Fragmentierung analysiert werden. Die Ionen können dazu entweder in räumlich getrennten Analysatoren (*tandem-in-space*) oder zeitlich getrennt (*tandem-in-time*) detektiert werden. Letzteres ist beispielsweise in Ionenfallen möglich. Das prominenteste Beispiel für einen räumlich getrennten Analysator ist der Tripel-Quadrupol. Dieser besteht aus zwei Quadrupol-Analysatoren und einem zwischengeschalteten dritten Quadrupol, der als Kollisionszelle dient. Dort finden Fragmentierungen statt.^[15]

Die Anregung erfolgt beispielsweise durch Beschuss mit Elektronen niedriger Energie (*Electron Capture Dissociation*, ECD), durch elektromagnetische Strahlung (*Photodissociation*, PD) oder durch Elektronentransfer zwischen Ionen (*Electron Transfer Dissociation*, ETD). Sehr häufig werden die Vorläuferionen durch die Kollision mit den Molekülen eines inerten Gases angeregt. Dies wird als kollisionsinduzierte Dissoziation (*Collision-Induced Dissociation*, CID) bezeichnet. Die bei der Kollision übertragene Energie führt zu Bindungsbrüchen und Bildung von Fragmentionen. Während die Mechanismen der CID für kleine Moleküle gut untersucht sind, sind sie für Makromoleküle noch unvollständig geklärt. Die Fragmentierung hängt von verschiedenen Parametern wie der Dauer der Anregung sowie dem Energiebetrag ab.^[21] Durch Tandem-Massenspektrometrie gelingt die Detektion von Strukturisomeren, wenn diese spezifische Fragmente bilden.

Isomere Lipide mit unterschiedlichen Fettsäuren können beispielsweise durch die Masse der Fragmente nach Abspaltung einer Fettsäure identifiziert werden. Die einzige zur Zeit verfügbare massenspektrometrische Technik, um außerdem die Position von Doppelbindungen in Fettsäuren zu ermitteln, ist die Ozon-induzierte Dissoziation (OzID).^[22] Dabei werden durch Ozonolyse im Massenspektrometer Doppelbindungen in den Molekülonen gebrochen und die Massen der Fragmentionen analysiert. Diese Technik ist allerdings nicht kommerziell verfügbar und erfordert die Handhabung von Ozon. Hinzu kommt, dass mit OzID keine Aussage über die Doppelbindungsgeometrie gemacht werden kann. Wie vor wenigen Jahren gezeigt wurde, können diese Nachteile durch die Anwendung hochauflösender Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie anstelle von OzID umgangen werden.^[5]

2.4 Ionenmobilitätsspektrometrie

In den letzten Jahren wurden die klassischen massenspektrometrischen Methoden zur Lipidanalyse zunehmend durch eine weitere Technik, die Ionenmobilitätsspektrometrie ergänzt und dadurch in mehreren Hinsichten optimiert.^[7] Bei der Ionenmobilitätsspektrometrie werden Ionen in Abhängigkeit von ihrer Mobilität in einem Gas getrennt und anschließend detektiert. Die ionisierten Probenmoleküle durchqueren unter dem Einfluss eines schwachen elektrischen Feldes eine mit Inertgas gefüllte Driftzelle. Dabei kommt es je nach Größe und Form der Ionen zu unterschiedlich häufigen Kollisionen mit den Gasmolekülen und demzufolge zu unterschiedlich großer Abbremsung. Jedes Ion erreicht so eine bestimmte Driftgeschwindigkeit v , die der Quotient aus der Länge der Driftzelle L und der Driftzeit t_d des betrachteten Ions ist. Bei einer linearen Spannung ist die Driftgeschwindigkeit proportional zur elektrischen Feldstärke E . Die Proportionalitätskonstante ist gemäß Gleichung 1 die Ionenmobilität K , die ein Maß für die Beweglichkeit eines Ions in einem bestimmten Gas darstellt.^[23]

$$v = \frac{L}{t_d} = K \cdot E \quad (1)$$

K ist abhängig von der Masse, Ladung, Größe und Form des Ions. Allgemein gilt, dass kompakte Ionen mobiler als entfaltete Ionen sind. Mit IMS können demzufolge Isomere unterschieden werden, die mit klassischer Massenspektrometrie nicht separierbar wären. Außerdem kann aus der Driftzeit ein rotationsgemittelter Kollisionsquerschnitt (*Collision Cross Section*, CCS) errechnet werden, der ein Maß für die effektive Fläche des Ions für die Interaktion mit den neutralen Gasteilchen ist. Die Driftzeit der Ionen kann bei bekannter Länge der Driftzelle in die Driftgeschwindigkeit umgerechnet werden, die wiederum bei einer homogenen elektrischen Feldstärke nach Einsetzen in Gleichung 1 die Ionenmobilität ergibt.

Diese wird auf Normalbedingungen ($T_0 = 273.15 \text{ K}$, $P_0 = 101325 \text{ Pa}$) normiert, sodass die reduzierte Mobilität K_0 erhalten wird.^[23] Dazu werden gemäß Gleichung 2 der experimentelle Druck P und die Temperatur T benötigt.

$$K_0 = \frac{P}{P_0} \frac{T_0}{T} \quad (2)$$

Der Kollisionsquerschnitt Ω kann anschließend durch Einsetzen der reduzierten Mobilität in die Mason-Schamp Gleichung (3) berechnet werden. Dabei ist z die Ladungszahl des Ions, e die Elementarladung, N die Teilchendichte des Gases, k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und μ die reduzierte Masse des Ions und des Driftgases.

$$\Omega = \frac{3ze}{16N} \sqrt{\frac{2\pi}{\mu k_B T}} \cdot \frac{1}{K_0} \quad (3)$$

Die Ermittlung des Kollisionsquerschnitts als zusätzliche physikochemische Größe, die unabhängig von den Geräteparametern ist, erleichtert die Identifizierung von Ionen. Aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit der CCS lassen sich daraus Datenbanken aufbauen.

Obwohl IMS keine neuartige Technik ist - bereits in den 1970er Jahren waren erste Geräte kommerziell erhältlich - hat sie erst in den 1990er Jahren Einzug in die analytische Chemie erhalten.^[23] Heutzutage sind IMS-Geräte kommerziell in verschiedenen Ausführungen verfügbar, wobei alle Techniken unterschiedliche Vor- und Nachteile bieten. In Kombination mit Massenspektrometrie werden vor allem *Drift Tube IMS* (DT-IMS), *Travelling Wave IMS* (TW-IMS), *Field-Asymmetric IMS* (FAIMS) und *Trapped IMS* (TIMS) genutzt.^[24]

Eine direkte Berechnung des Kollisionsquerschnitts aus der Driftzeit von Ionen ist nur mit DT-IMS möglich, weil die Bedingung eines homogenen elektrischen Feldes erfüllt ist. Bei Messungen mit TW-IMS Geräten werden stattdessen wandernde Gleichstromimpulse verwendet, wodurch ein inhomogenes elektrisches Feld innerhalb der Driftzelle entsteht. Infolgedessen können Kollisionsquerschnitte nicht mit Gleichung 1 berechnet werden. Um dennoch Kollisionsquerschnitte ermitteln zu können, müssen TW-IMS Geräte deshalb vorher mit Substanzen kalibriert werden, deren CCSs aus Messungen mit DT-IMS genau bekannt sind. Mit FAIMS ist die Bestimmung der CCS nicht möglich. Es werden starke elektrische Felder mit asymmetrischen Wellenformen genutzt, sodass die Ionenmobilität feldabhängig ist. Dennoch wird FAIMS wegen seiner hohen Sensitivität und Auflösung genutzt. TIMS bietet ebenfalls eine sehr hohe Auflösung und ist die neueste der genannten Techniken, die ähnlich wie TW-IMS die Berechnung der CCS nach einer Kalibrierung ermöglicht. Die Ionen werden bei TIMS durch Anlegen einer Spannung stationär gegen einen Driftgasstrom gehalten.^[25]

2.5 Synapt G2-S HDMS

Für die Untersuchung isomerer Lipide wurde das Gerät Synapt G2-S HDMS (Waters Corporation, Manchester, UK) verwendet. Es handelt sich um ein kommerziell erhältliches TW-Ionenmobilitäts-Massenspektrometer. Die Abkürzung HDMS steht für hochaufgelöste (*High Definition*) Massenspektrometrie. Für diese Arbeit wurden sowohl das kommerziell erhältliche TW-IM-MS Gerät als auch ein umgebautes DT-IM-MS Gerät benutzt. Der Aufbau des herkömmlichen Gerätes ist in Abb. 3 dargestellt.

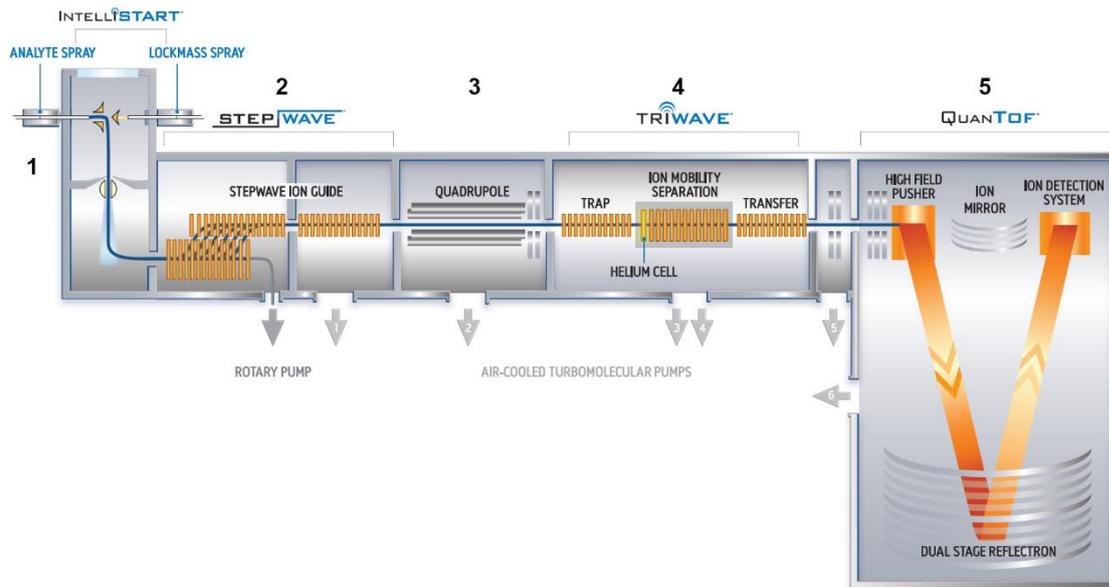


Abb. 3: Schematischer Aufbau des TW-IM-MS Geräts Synapt G2-S HDMS. Das Gerät umfasst folgende Bereiche: 1. Ionenquelle, 2. *Stepwave*-Zelle, 3. Quadrupol, 4. *Triwave*-Zelle, 5. Massenanalysator (TOF).

Das Gerät besitzt eine nano-ESI Ionenquelle zur Erzeugung gasförmiger Molekülionen (vgl. Kap. 2.3.1). Die Ionen werden durch die *Stepwave*-Zelle in den Quadrupol überführt, wobei neutrale Moleküle ausgesondert werden. Dies dient der Verminderung des Hintergrundrauschens bzw. der Erhöhung der Empfindlichkeit. Im Quadrupol können Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis selektiert werden (vgl. Kap. 2.3.3). Die Ionen gelangen anschließend in die *Triwave*-Zelle, die in die *Trap*-Zelle, Ionenmobilitätszelle und *Transfer*-Zelle unterteilt ist. In der *Trap*-Zelle werden die Ionen gesammelt und gepulst in die Ionenmobilitätszelle entlassen. Die *Trap*-Zelle kann außerdem als Kollisionszelle genutzt werden. Durch CID (vgl. Kap. 2.3.4) können dort Molekülionen vor dem Eintritt in die Ionenmobilitätszelle fragmentiert werden, sodass die Driftzeiten einzelner Fragmentationen ermittelt werden können. In der Ionenmobilitätszelle herrscht ein größerer Druck als in der *Trap*- und *Transfer*-Zelle. Damit die Ionen beim Übergang von niedrigerem zu höherem Druck durch Erwärmung nicht fragmentiert werden, befindet sich zwischen der *Trap*-Zelle und der Ionenmobilitätszelle eine Helium-Zelle zur Abkühlung.

Die Ionen werden durch die mit einem inerten Gas gefüllte Ionenmobilitätszelle geleitet und Driftzeiten ermittelt (vgl. Kap. 2.4). Anschließend werden die Ionen über die *Transfer-Zelle* in den Massenanalysator geleitet. In der *Transfer-Zelle* können die Ionen zudem wie in der *Trap-Zelle* fragmentiert werden. Da die Fragmentierung nach dem Durchqueren der Ionenmobilitätszelle stattfindet, werden für die Fragmentionen Massenspektren, aber keine Driftzeiten erhalten. Die Ionen werden am Ende durch einen Flugzeit-Analysator mit Reflektron getrennt und detektiert (vgl. Kap. 2.3.3). Jedem Peak im Massenspektrum wird eine Driftzeit zugeordnet. Je nach Anwendung kann zwischen dem *Sensitivity*-, *Resolution*- und *High Resolution*-Modus gewählt werden. Das Auflösungsvermögen der drei Modi nimmt in der genannten Reihenfolge zu. Der wesentliche Vorteil des *Sensitivity*-Modus ist die Empfindlichkeit auch bei geringen Ionenkonzentrationen.

Das für diese Arbeit hauptsächlich verwendete Gerät wurde zu einer *Drift-Tube* (DT-IMS) umgebaut. Dies ermöglicht die direkte Berechnung der CCS aus der Driftzeit ohne vorherige Kalibrierung. Die Helium-Zelle kann durch den Umbau jedoch nicht mehr genutzt werden. Als weitere Folge des Umbaus ist die Wahl des Driftgases im Gegensatz zum herkömmlichen Gerät nicht auf Stickstoff beschränkt.

2.5 Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie in der Lipidanalyse

Die Integration von IMS in bestehende Lipidomics Workflows ist ohne Zeitverluste möglich.^[24] Die Zeitskala von IMS beträgt Millisekunden, die von MS Mikrosekunden, sodass bei IM-MS jeder Peak im Mobilitätsspektrum anschließend massenspektrometrisch analysiert werden kann. Da Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) einen Zeitraum von mehreren Minuten benötigt, ist die Kombination HPLC-IM-MS ebenfalls möglich.^[7]

Die Nutzung von IMS bringt mehrere Vorteile mit sich. Zum einen führt die Minimierung von chemischem Hintergrundrauschen zu einem besseren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis im Vergleich zu MS.^[24] Im Fall von HPLC-IM-MS ermöglicht IMS die Trennung von koelutierenden Substanzen, sodass die resultierenden Massenspektren besser zuzuordnen und eindeutiger zu interpretieren sind.^[7] Ein weiterer Vorteil von IMS ist die Möglichkeit, Kollisionsquerschnitte für verschiedene Lipide zu ermitteln. Das Massenspektrum mit Informationen über m/z -Verhältnisse wird durch Kombination mit IMS um eine zusätzliche Dimension, die CCS, zu einem zweidimensionalen Spektrum erweitert. Dies ist insbesondere für die Identifizierung unbekannter und komplexer Lipidproben hilfreich. Darüber hinaus ist durch die Ermittlung von Kollisionsquerschnitten die Unterscheidung von Struktur- und Stereoisomeren möglich. Auch der Sättigungsgrad von Alkylketten in Lipiden hat einen großen Einfluss auf die CCS. Für Phosphatidylcholine wurde für eine Doppelbindung in den Fettsäureketten eine Abweichung von 5% und für jede weitere Doppelbindung zusätzlich 1% Abweichung in der Driftzeit gefunden.^[26] Eine Vertauschung der Positionen der Fettsäuren in Phosphatidylcholinen bewirkt ebenfalls eine geringfügige Änderung der Driftzeit. Bei Isomeren, die sich nur in der Position einer Doppelbindung oder deren Geometrie unterscheiden, ist in der Regel ein Unterschied von unter 2% der CCS zu beobachten.^[5] Um eine bessere Trennleistung zu erreichen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Beispielsweise kann die Trennung von Isomeren mit IM-MS häufig durch Adduktbildung mit Metall-Kationen oder verschiedenen Anionen verbessert werden.^[5]

3. Aufgabenstellung

Im Rahmen eines Lungenlipidom-Projekts wird derzeit am Forschungszentrum Borstel untersucht, inwiefern sich der Lipidstoffwechsel von Krebszellen von dem gesunder Zellen unterscheidet und ob darüber hinaus Unterschiede in der Isomerenzusammensetzung häufig vorkommender Lipide zwischen verschiedenen Arten von Lungenkrebs festzustellen sind.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der isomeren Phosphatidylcholine PC 34:1 in Lipidextrakten aus zwei verschiedenen Tumorgeweben, einem Adenokarzinom (ADC) und einem Plattenepithelkarzinom (SCC), und normalem Lungengewebe mit Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie. Dabei liegt das Interesse insbesondere auf Positons- und Doppelbindungsisomeren. Es soll zunächst untersucht werden, ob Lungen- und Tumorgewebe anhand der Driftzeiten der Phosphatidylcholine und deren Fragmente zu unterscheiden sind. Darüber hinaus werden Unterschiede in der Isomerenzusammensetzung zwischen den beiden verschiedenen Tumoren analysiert.

4. Experimenteller Teil

4.1 Probenvorbereitung

Die zu analysierenden Lipidextrakte und eine zugehörige Blank-Probe mit internen Standards (ISTDs) wurden vom Forschungszentrum Borstel zur Verfügung gestellt. Jeweils ein Extrakt aus normalem Lungengewebe und Tumorgewebe stammen vom gleichen Patienten (Proben Nr. 28349 und 28350 sowie 28365 und 28366). Tabelle 5 bietet einen Überblick über die vier Proben von zwei verschiedenen Patienten und eine Blank-Probe. Anstelle von Lungengewebe enthält die Blank-Probe eine Kaliumchlorid-Lösung mit ISTDs. Sie wurde genauso aufgearbeitet wie die biologischen Proben.

Tabelle 5: Übersicht über die untersuchten Proben.

Probe Nr.	Beschreibung	Anteil metabolisch aktiver Krebszellen
28349	Normales Lungengewebe (alveolär)	
28350	Tumorgewebe: Adenokarzinom (ADC)	80%
28365	Normales Lungengewebe (alveolär)	
28366	Tumorgewebe: Plattenepithelkarzinom (SCC)	80%
29009	Blank-Probe mit ISTDs*	

Die getrockneten Probenextrakte wurden jeweils in 100 µL einer Mischung von Chloroform/Methanol/Wasser (60:30:4.5) gelöst und bei –32°C gelagert. Für Messungen wurden die Lösungen im Verhältnis 1:10 mit einer Lösung von Chloroform/Methanol/Isopropanol (1:2:4, 3.7 mM Ammoniumacetat) verdünnt. Für die Untersuchung von Metallionen-Addukten, ausgenommen Natrium-Addukte, wurde anstelle von Ammoniumacetat jeweils eine 1 mM Metallsalzlösung hinzugefügt. Die Metallsalzlösungen wurden aus Lithiumchlorid, Silberhexafluorophosphat und Kupfer(II)nitrat-hemi(pentahydrat) in Chloroform/Methanol/Isopropanol (1:2:4) hergestellt. Zum Messen wurde jeweils 1 µL des Probenextrakts mit 1-2 µL der Metallsalzlösung und 8 µL der Chloroform/Methanol/Isopropanol-Mischung verdünnt. Sämtliche Chemikalien wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

* Eine Liste der ISTDs befindet sich im Anhang (Tabelle A).

4.2 Geräte

Die verwendeten Geräte mit Herstellerangaben sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben und Verwendungszweck.

Gerät	Hersteller	Verwendung	Bemerkung
P-1000 Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instrument, Novato (USA)	Nadelziehen	-
Cressington Sputter Coater 108auto	Cressington, Dortmund (Deutschland)	Nadelbeschichtung	Beschichtung: Pt/Pd (80/20)
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)	Pipettieren	0,1 - 10 µL 1 – 100 µL 100 – 1000 µL
Cubis MSU225P	Sartorius, Göttingen (Deutschland)	Waage	Ablesbarkeit ab 0.01 mg
Vortexmischer	VWR, Darmstadt (Deutschland)	Probendurchmischung	-
Synapt G2-S HDMS	Waters Corporation, Manchester (UK)	Spektrenaufnahme	nano-ESI Ionenquelle Umgebautes Gerät: Drift Tube
Synapt G2-S HDMS	Waters Corporation, Manchester (UK)	Spektrenaufnahme	nano-ESI Ionenquelle Trawelling-Wave

4.3 Durchführung

Die Messungen wurden an einem Synapt G2-S HDMS Gerät mit nachträglich eingebauter Drift Tube und einem kommerziell erhältlichen Synapt G2-S HDMS Gerät mit TW-IMS durchgeführt. Die Ionisation erfolgte an beiden Geräten durch nano-ESI. Die Nadeln wurden aus Quarzglas Kapillaren hergestellt, die mit Platin/Palladium (80/20) beschichtet wurden. Es wurde ausschließlich im Sensitivity-Modus gemessen. Als Driftgas wurde Stickstoff verwendet und außerdem wurden zwei Testmessungen mit Helium durchgeführt. Es wurde mit beiden Geräten im positiven Ionenmodus und mit dem TW-IM-MS Gerät zusätzlich im negativen Ionenmodus gemessen. Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, betrug der Druck in der Ionenmobilitätszelle standardmäßig 2.20 Torr (entspricht 2.93 mbar).

4.3.1 Geräteeinstellungen

Die Messungen wurden auf den beiden Synapt G2-S HDMS Geräten mit den in Tabelle 7 aufgeführten Einstellungen durchgeführt. Bei der Aufnahme von MSMS-Spektren wurde die *Trap Collision Energy* um etwa 20 V im Vergleich zu den MS-Spektren erhöht.

Tabelle 7: Einstellungen der DT-/TW-IM-MS Geräte (Synapt G2-S HDMS).

Parameter	DT-IM-MS (pos. Modus)	TW-IM-MS (pos. Modus)	TW-IM-MS (neg. Modus)
Source Temperature [°C]	20	30	30
Capillary [kV]	0.5	0.7-1.0	1.0
Sampling Cone [V]	30.0	30.0	40.0
Source Offset [V]	30.0	30.0	80.0
Trap Collision Energy [V]	2.0 (bzw. 22.0)	2.0 (bzw. 22.0)	2.0 (bzw. 25.0)
Transfer Collision Energy [V]	2.0	2.0	2.0
Trap Gas Flow [mL/min]	1.4	2.0	2.0
Helium Cell Gas Flow [mL/min]	90.0	180.0	180.0
IMS Gas Flow [mL/min]	20.0	90.0	90.0
Helium Cell DC [V]	140-180	35.0	35.0
Helium Exit [V]	-40.0	-5.0	-5.0
IMS Bias [V]	140-170	3.0	3.0
Transfer DC Entrance [V]	5.0	4.0	4.0
IMS Wave Velocity [m/s]	1000	300-800	500-800
IMS Wave Height [V]	0.0	40.0	40.0
Transfer Wave Velocity [m/s]	300	380	380
Transfer Wave Height [V]	10.0	4.0	4.0

4.3.2 Bestimmung von Kollisionsquerschnitten

Zur Bestimmung von Kollisionsquerschnitten aus DT-IM-MS Messungen wurden jeweils acht Spektren bei unterschiedlichen Spannungen aufgenommen. Die Driftzeiten wurden mit dem Programm MassLynx V4.1 extrahiert und mit OriginPro 9.0 mit einer Gauss-Funktion gefittet. Die theoretischen Grundlagen zur Berechnung der CCS aus der Mobilität K von Ionen wurden in Kapitel 2.4 vorgestellt. Durch Auflösen von Gleichung 1 nach der Driftzeit t_d wird Gleichung 4 erhalten, wobei t_0 der Y-Achsenabschnitt ist.

$$t_d = \frac{L}{K \cdot E} + t_0 \quad (4)$$

Das elektrische Feld E muss homogen sein, um die CCS direkt aus der Driftzeit ermitteln zu können. Für E kann deshalb auch geschrieben werden:

$$E = \frac{V_d}{L} . \quad (5)$$

V_d ist dabei die Driftspannung und L die Länge der Driftzelle. Durch Einsetzen von Gleichung 5 in Gleichung 4 wird schließlich Gleichung 6 erhalten.

$$t_d = \frac{L^2}{K} \cdot \frac{1}{V_d} + t_0 \quad (6)$$

Bei der Auftragung der gefitteten Driftzeiten gegen die inverse Spannung wird demzufolge eine Gerade erhalten, deren Steigung die Mobilität K enthält. Um reproduzierbare Werte zu erhalten, reichen Driftzeitmessungen bei acht verschiedenen Spannungen aus. Die Driftspannung V_d ergibt sich gemäß Gleichung 7 aus vier Spannungen, von denen jeweils zwei variiert werden (*He Cell DC* und *IMS Bias*).

$$V_d = (\text{He Cell DC} + \text{He Exit} + \text{IMS Bias} - \text{Transfer DC Entrance}) \cdot (1 - 2760) \quad (7)$$

Die Zusammensetzung der Gesamtspannung ist in Abb. 4 veranschaulicht.

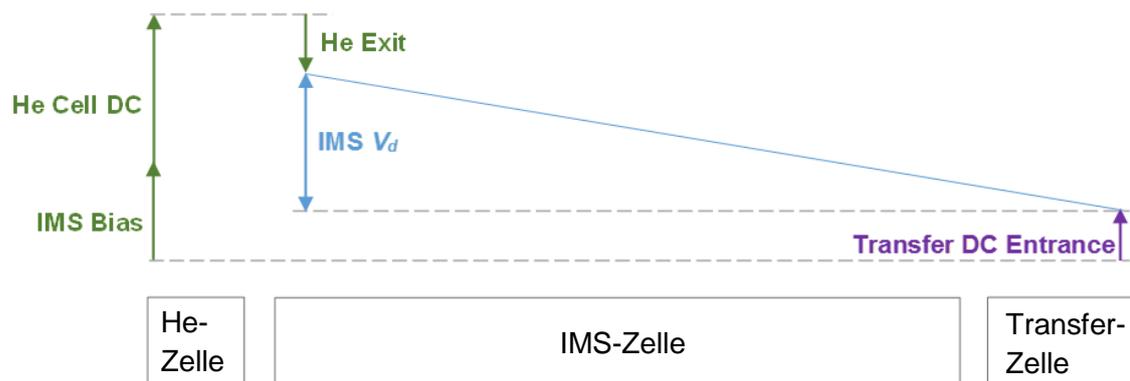


Abb. 4: Zusammensetzung der Gesamtspannung V_d aus Teilspannungen in der Triwave-Zelle des Instruments Synapt G2-S HDMS.

Bei den TW-IM-MS Messungen können die Kollisionsquerschnitte nicht direkt aus den Driftzeiten berechnet werden (vgl. Kap. 2.4). Die Messungen wurden für verschiedene Werte der *Wave Velocity* durchgeführt und für jede *Wave Velocity* wurde zusätzlich ein Spektrum einer Kalibriersubstanz aufgenommen. Für die Kalibration sind aus DT-IMS Messungen genau bekannte CCS-Werte erforderlich. Die experimentellen Driftzeiten der Kalibriersubstanz werden mit einer Gausskurve gefittet und anschließend der natürliche Logarithmus der tabellierten CCS-Werte gegen den natürlichen Logarithmus der gefitteten Driftzeiten aufgetragen. Dabei wird eine Kalibriergerade erhalten, aus der die CCSs unbekannter Substanzen ermittelt werden können. Die experimentell ermittelten

und gefitteten Driftzeiten werden dabei mit Hilfe der Kalibriergeraden einem bestimmten CCS-Wert zugeordnet.

Für Phosphatidylcholine eignen sich zur Kalibrierung am besten Phosphatidylcholine.^[27] Wichtiger als die Molekülklasse ist jedoch, dass mit Ionen der gleichen Ladung kalibriert wird. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde mit einfach geladenen Molekülionen von Polyalanin kalibriert. Aus den ermittelten CCS-Werten bei mindestens vier verschiedenen *Wave Velocities* wurde schließlich der Mittelwert gebildet. Die CCS-Werte für Polyalanin wurden der Literatur^[27] entnommen.

5. Ergebnisse

5.1 MS- und MSMS-Spektren $[M+H]^+$

Zur Bestimmung der Driftzeiten der Phosphatidylcholine PC 34:1 in den verschiedenen Proben wurden MS-Spektren im positiven Ionenmodus im Bereich von $m/z = 50 - 2000$ aufgenommen. Ein Beispielspektrum ist in Abb. 5 dargestellt.

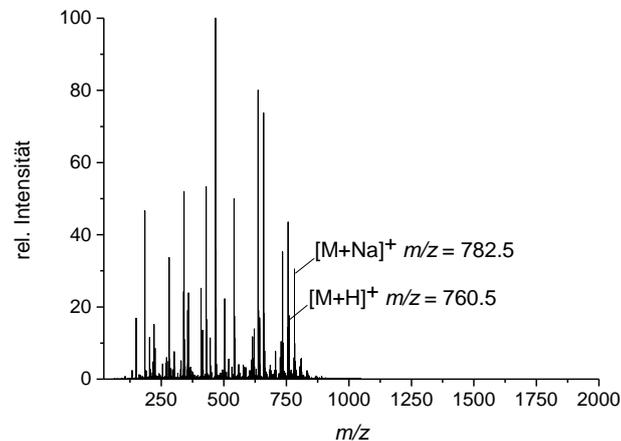


Abb. 5: Beispiel für ein MS-Spektrum im positiven Ionenmodus mit markierten Peaks der protonierten Phosphatidylcholine und der Natrium-Addukte.

Für die protonierten Phosphatidylcholine wurden die Driftzeiten zwischen den Proben verglichen. Es wurden keine oder minimale Unterschiede festgestellt (Abb. 6).

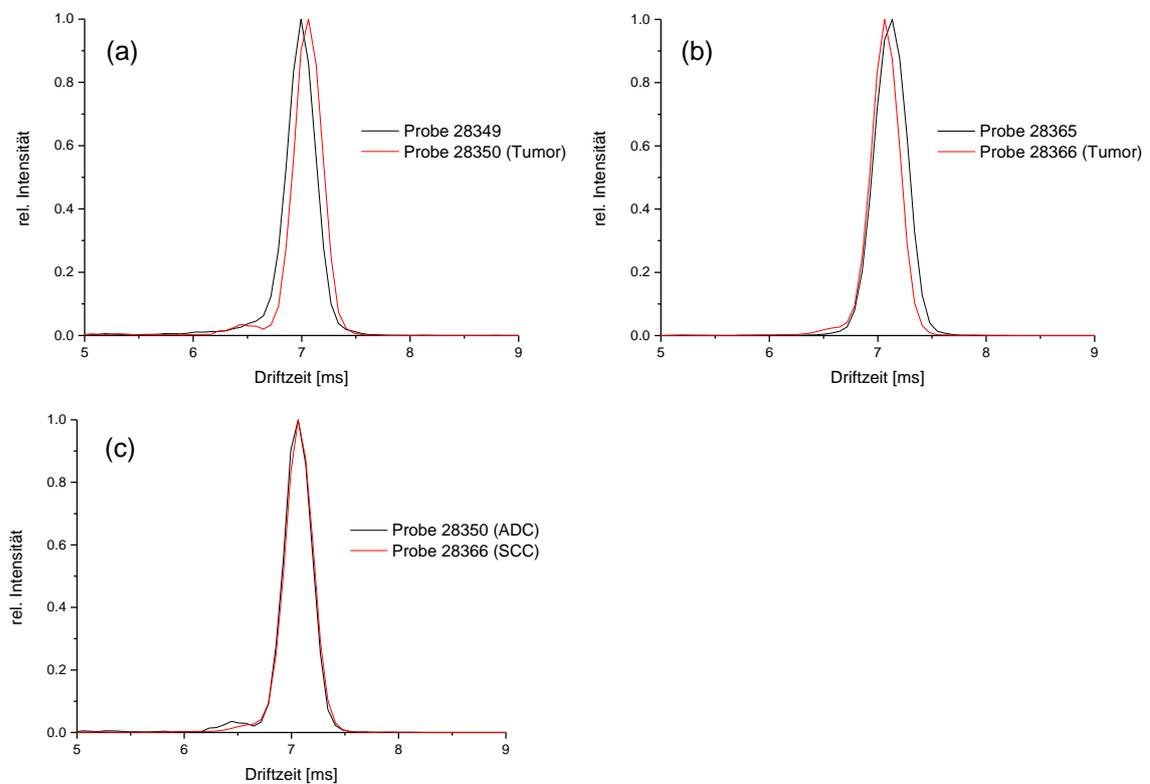


Abb. 6: Vergleich der Driftzeiten der protonierten Molekülonen (TW-IMS Messung mit *Wave Velocity* = 500 m/s): (a) Vergleich der Probe 28349 und der zugehörigen Tumorprobe 28350; (b) Vergleich der Probe 28365 und der zugehörigen Tumorprobe 28366; (c) Vergleich der Probe 28350 (Adenokarzinom, ADC) und der Probe 28366 (Plattenepithelkarzinom, SCC).

Sowohl die Messungen mit DT-IMS als auch mit TW-IMS ergaben minimal kürzere Driftzeiten der Phosphatidylcholone in Probe 23849 im Vergleich mit der zugehörigen Tumorprobe 28350 (Abb. 6a). Im Gegensatz dazu wiesen die Phosphatidylcholone in der Tumorprobe 28366 eine geringfügig kürzere Driftzeit als die zugehörige Vergleichsprobe 28365 auf (Abb. 6b). Die Unterschiede betragen bis zu etwa 0.7%. Driftzeitunterschiede zwischen den Phosphatidylcholinen aus unterschiedlichen Tumorgeweben wurden nicht festgestellt (Abb. 6c). Die Kollisionsquerschnitte der protonierten Phosphatidylcholone sind in Tabelle 8 für die DT-IMS und TW-IMS Messungen aufgeführt.

Tabelle 8: Berechnete Kollisionsquerschnitte in \AA^2 der protonierten Phosphatidylcholone ($m/z = 760.5$). Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$^{DT}CCS_{N_2}$	$^{TW}CCS_{N_2}$
28349	292	301
28350	293	302
28365	293	303
28366	291	302

Die mit DT-IMS und TW-IMS ermittelten Kollisionsquerschnitte können nicht direkt verglichen werden. Die mit DT-IMS ermittelten CCS-Werte sind verlässlicher, weil die Berechnung direkt aus den Driftzeiten erfolgt. Bei der Messung mit TW-IMS wurde mit Polyalanin kalibriert, sodass die Berechnung der CCS-Werte fehlerbehaftet ist.^[27] Die relativen Unterschiede zwischen den Kollisionsquerschnitten der Phosphatidylcholone aus den verschiedenen Proben sind jedoch bei beiden Methoden vergleichbar.

In den MSMS-Spektren des protonierten Moleküliions ($m/z = 760.5$) ist ein Fragmention bei $m/z = 184.1$ mit hoher Intensität zu finden. In Abb. 7 ist ein Beispielspektrum dargestellt. Die MSMS-Spektren der verschiedenen Proben sehen nahezu identisch aus.

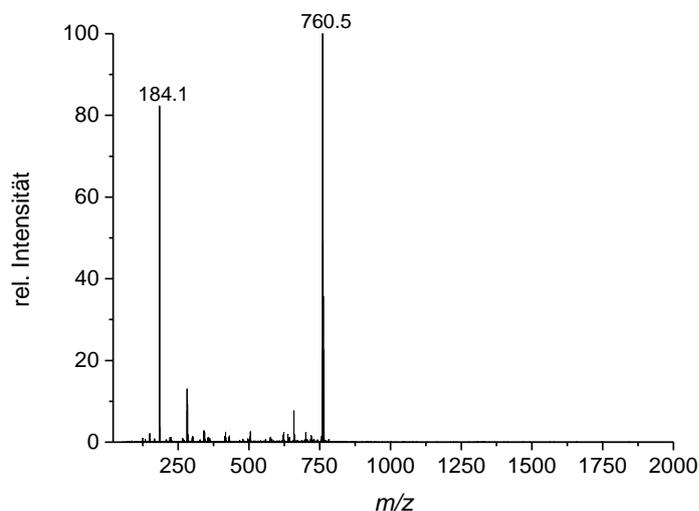
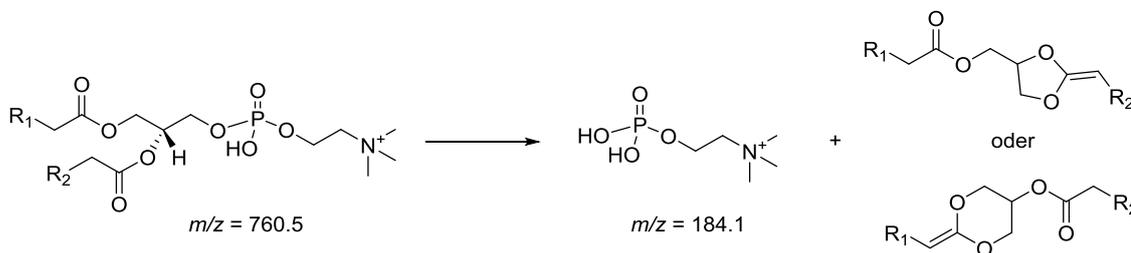


Abb. 7: MSMS-Spektrum des protonierten Moleküliions $[M+H]^+$ ($m/z = 760.5$).

Bei dem intensivsten Fragmentationenpeak handelt es sich um Phosphocholin, die Kopfgruppe des Moleküls, die gemäß Schema 3 aus dem protonierten Molekülion abgespalten wird.



Schema 3: Hauptsächlich zu beobachtende Fragmentierung von $[M+H]^+$ -Molekülionen der Phosphatidylcholine PC 34:1. R_1 und R_2 sind je nach Isomer verschiedene Fettsäurereste.

Bei der Bildung von Phosphocholin wird von einer der beiden Fettsäuren ein Proton in der α -Carbonyl Position abgespalten. Dies geschieht bevorzugt an der Fettsäure in *sn*-2 Position, sodass hauptsächlich das in Schema 3 gezeigte obere neutrale Produkt entsteht.^[28] Dieses kann aber aufgrund der fehlenden Ladung nicht detektiert werden und Phosphocholin enthält keine stereo- oder regiochemischen Informationen über das Molekülion. Die MSMS-Spektren des protonierten Molekülions sind demzufolge wenig aussagekräftig in Bezug auf die Unterscheidung von Isomeren.

Die beiden anderen Peaks im MSMS-Spektrum sind bereits im MS-Spektrum vorhanden und konnten keinem Fragmentation zugeordnet werden ($m/z = 659.3$ und 281.1). Es handelt sich wahrscheinlich um andere Spezies, zumal mit dem Quadrupol nicht ausschließlich der gewünschte Peak bei $m/z = 760.5$ isoliert werden konnte. Darauf deutet auch hin, dass sich die Intensität der genannten Peaks bei höherer Kollisionsenergie (30 V) nicht verändert und dass beide Peaks auch in der Blank-Probe mit relativ großer Intensität vorkommen (Abb. 8).

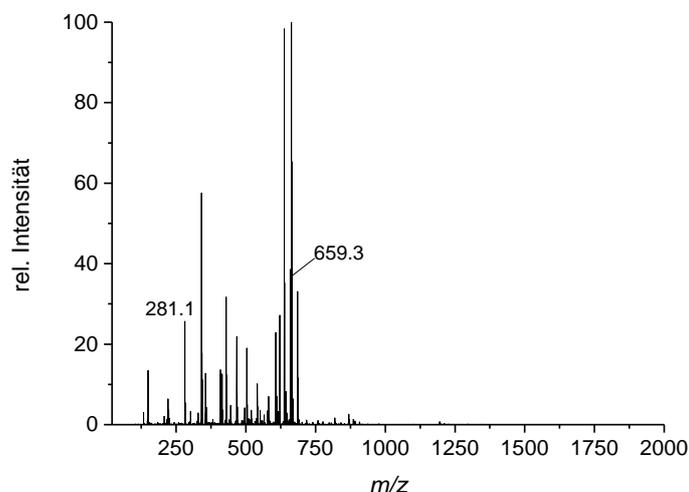


Abb. 8: MS-Spektrum der Blank-Probe im positiven Ionenmodus mit markierten Peaks bei $m/z = 281.1$ und 659.3 .

Zusammenfassend wurden bei der Untersuchung der protonierten Phosphatidylcholone keine signifikanten Unterschiede in den Driftzeiten und Kollisionsquerschnitten zwischen den verschiedenen Proben festgestellt. Es wurde aber der Trend beobachtet, dass die protonierten Phosphatidylcholone aus der Tumorprobe 28350 eine geringfügig größere CCS und die Phosphatidylcholone aus der Tumorprobe 28366 eine geringfügig kleinere CCS als die jeweiligen Vergleichsproben aufweisen. Diese Beobachtung wurde in mehreren Wiederholungsmessungen bestätigt. Der Unterschied der CCS beträgt jedoch nur etwa 0.3%. Zwischen den beiden Tumorarten wurde kein Unterschied festgestellt. In Bezug auf die Isomerenzusammensetzung wurden keine Informationen aus den MSMS-Spektren gewonnen, da außer Phosphocholin keine Fragmente wie beispielsweise die freien Fettsäuren auftraten. Diese Beobachtung wird auch in der Literatur beschrieben.^[29]

5.2 MS- und MSMS-Spektren der Metallionen-Addukte

Metallionen-Addukte von Phosphatidylcholinen können eine Veränderung der Mobilitätseigenschaften im Vergleich zu den protonierten Spezies bewirken.^[30] Mit dem Ziel, größere Unterschiede in den Driftzeiten verschiedener Isomere feststellen zu können, wurden Addukte von PC 34:1 mit Natrium(I)-, Lithium(I)-, Silber(I)- und Kupfer(II)-Ionen untersucht. Es wurden jeweils MS- und MSMS-Spektren aufgenommen, um die Kollisionsquerschnitte der intakten Addukte sowie der Fragmentationen zu ermitteln.

[M+Na]⁺

Der Peak des Natrium-Addukts wies in allen MS-Spektren eine höhere Intensität als der Peak des protonierten Phosphatidylcholins auf (vgl. Abb. 5b). Für die Natrium-Addukte wurden Driftzeiten und Kollisionsquerschnitte ermittelt und der gleiche Trend wie bei den protonierten Phosphatidylcholinen festgestellt: Die Driftzeiten der Natrium-Addukte aus der Tumorprobe 28350 sind jeweils minimal größer, die aus der Tumorprobe 28366 minimal kleiner als die der zugehörigen Vergleichsproben (Abb. 9a/b). Die Driftzeitunterschiede betragen bis zu 0.7% und sind demzufolge vergleichbar groß wie die Unterschiede der protonierten Spezies. Die beiden Tumorproben sind anhand der Driftzeiten der Natrium-Addukte nicht unterscheidbar (Abb. 9c).

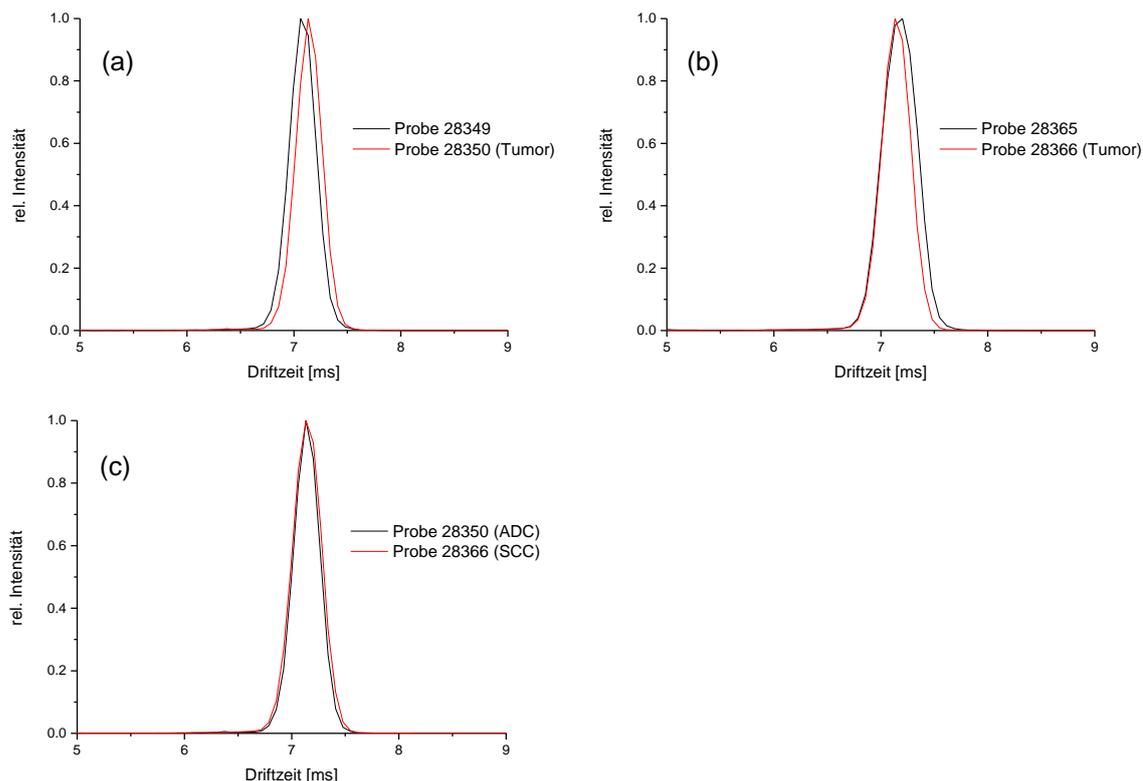


Abb. 9: Vergleich der Driftzeiten der Natrium-Addukte (TW-IMS Messung mit *Wave Velocity* = 500 m/s): (a) Vergleich der Probe 28349 und der zugehörigen Tumorprobe 28350; (b) Vergleich der Probe 28365 und der zugehörigen Tumorprobe 28366; (c) Vergleich der Probe 28350 (Adenokarzinom, ADC) und der Probe 28366 (Plattenepithelkarzinom, SCC).

Aus den Driftzeiten wurden für alle Proben die Kollisionsquerschnitte der Natrium-Addukte ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Berechnete Kollisionsquerschnitte in \AA^2 des Natrium-Addukts ($m/z = 782.5$). Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$^{DT}CCS_{N2}$	$^{TW}CCS_{N2}$
28349	294	303
28350	295	304
28365	296	304
28366	294	304

Durch die Rundung der Werte ist in Tabelle 9 der Unterschied der Kollisionsquerschnitte der Proben 28365 und 28366 bei der TW-IMS Messung nicht erkenntlich. Er beträgt etwa 0.6 \AA^2 . Die Unterschiede der berechneten CCS-Werte sind für die Natrium-Addukte generell etwas kleiner als für die protonierten Spezies.

Im MSMS-Spektrum des einfach geladenen Natrium-Addukts ($m/z = 782.5$) sind außer Phosphocholin ($m/z = 184.1$) drei Peaks mit guter Intensität zu erkennen. Es handelt sich um die Fragmentationen mit $m/z = 723.5$, 599.5 und 577.5 , wobei letzteres die geringste Intensität aufweist. Ein Beispielspektrum ist in Abb. 10 dargestellt.

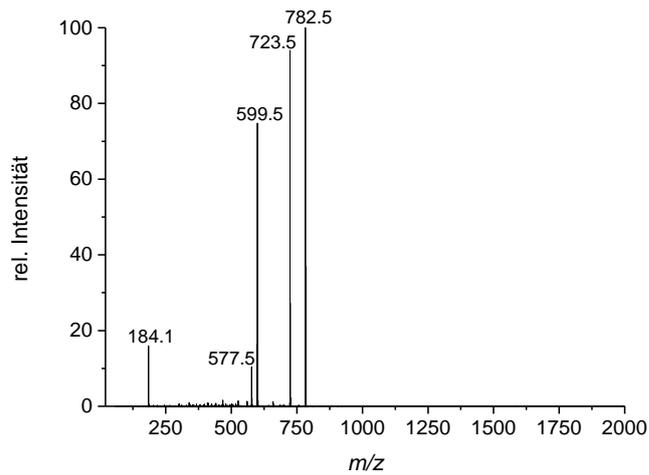
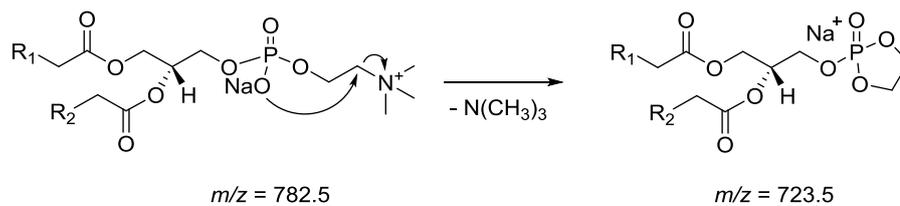
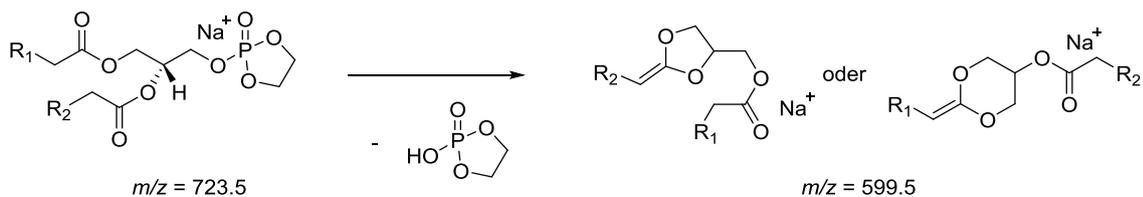


Abb. 10: MSMS-Spektrum des Natrium-Addukts $[M+Na]^+$ ($m/z = 782.5$).

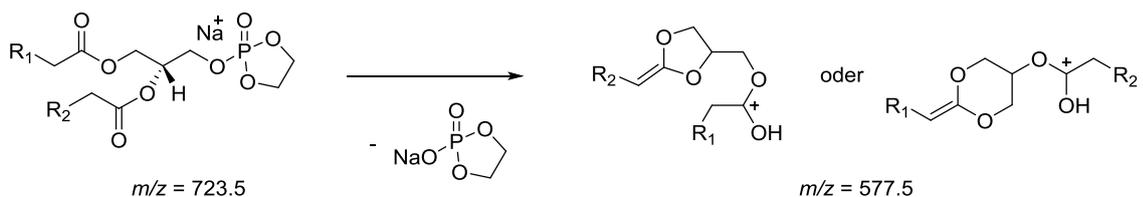
Die zugehörigen Fragmentierungswege sind in den Schemata 4-6 dargestellt. Durch Abspaltung von Trimethylamin entsteht das Fragment mit $m/z = 723.5$, aus dem durch weitere Fragmentierung die beiden anderen Fragmentationen generiert werden.^[28]



Schema 4: Bildung des Fragmentations mit $m/z = 723.5$ durch Abspaltung von Trimethylamin aus dem Natrium-Addukt $[M-Na]^+$ der Phosphatidylcholine PC 34:1.



Schema 5: Bildung des Fragmentations mit $m/z = 599.5$ aus dem Fragmentation mit $m/z = 723.5$.



Schema 6: Bildung des Fragmentations mit $m/z = 577.5$ aus dem Fragmentation mit $m/z = 723.5$.

Aus den relativen Intensitätsverhältnissen der Peaks in Abb. 10 lässt sich ableiten, dass die in Schema 5 dargestellte Fragmentierung unter Bildung des Fragmentions mit einem angelagerten Natriumion ($m/z = 599.5$) bevorzugt gegenüber der Fragmentierung in Schema 6 stattfindet.

Die Kollisionsquerschnitte der drei Fragmente wurden mit DT-IMS und TW-IMS ermittelt und waren über mehrere Messungen hinweg sehr reproduzierbar. Zwischen den Proben wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å^2 des Natrium-Addukts und der Hauptfragmente im MSMS-Spektrum. Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$m/z = 782.5$		$m/z = 723.5$		$m/z = 599.5$		$m/z = 577.5$	
	$^{DT}CCS_{N2}$	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$	$^{TW}CCS_{N2}$	$^{DT}CCS_{N2}$	$^{TW}CCS_{N2}$
28349	294	302	280	288	259	266	260	270
28350	295	302	281	288	261	267	262	270
28365	294	302	282	288	261	266	263	270
28366	293	302	282	288	261	266	261	270

Mit TW-IMS wurden konstantere Werte erhalten als mit DT-IMS. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es sich bei den mit TW-IMS ermittelten Kollisionsquerschnitten um berechnete Werte handelt, die auf die Kalibration mit Polyalanin bezogen werden. Kleine Unterschiede der Driftzeiten gehen dabei verloren. Die mit DT-IMS direkt aus der Driftzeit berechneten Werte sind daher vorzuziehen. Durch die Aktivierung in der *Trap*-Zelle weisen die Ionen geringfügig kürzere Driftzeiten auf als ohne Aktivierung, sodass die Kollisionsquerschnitte des Natrium-Addukts kleiner sind als die aus den MS-Spektren ermittelten Werte (s. Tabelle 9).

Die Untersuchung der Natrium-Addukte erbrachte keine Erkenntnisse über die Isomerenzusammensetzung, da in den MSMS-Experimenten nur Fragmente generiert wurden, die beide Fettsäuren enthielten. Als Natrium-Addukte weisen sowohl die Molekülionen als auch die Fragmentionen nur kleine Unterschiede der CCS von bis zu 0.3% auf und sind damit vergleichbar mit den protonierten Phosphatidylcholinen. Da die Strukturen der Fragmentionen aber auch von der Größe des Metallkations abhängen, wurde die Messreihe mit verschiedenen anderen Metallen wiederholt.

[M+Li]⁺

Für die Untersuchung von Lithium-Addukten wurden die Proben mit einer Lithiumchlorid-Lösung versetzt. In den MS-Spektren aller Proben war infolgedessen der Peak des protonierten Molekülions nicht mehr zu erkennen, während der Peak des Natrium-Addukts mit unveränderter Intensität auftrat und ein wenig intensiver Peak des Lithium-Addukts bei $m/z = 766.5$ erschien (Abb. 11).

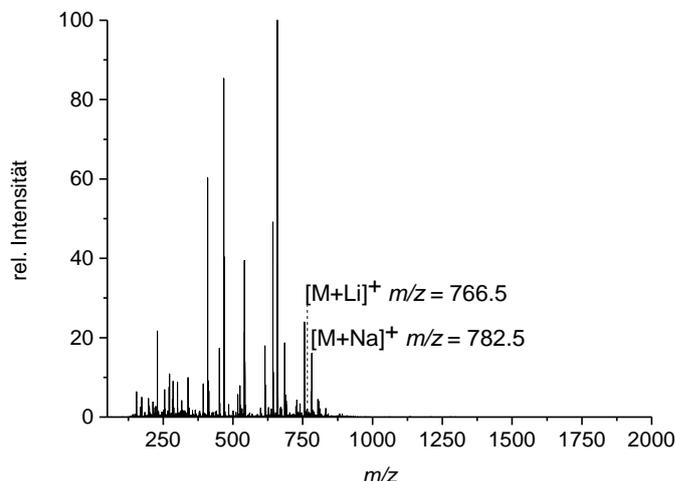


Abb. 11: Beispiel für ein MS-Spektrum nach Zugabe von Lithiumchlorid über den gesamten aufgenommenen m/z -Bereich mit markierten Peaks der Lithium- und Natrium-Addukte.

Die Driftzeitunterschiede der Lithium-Addukte waren kleiner als die der Natrium-Addukte und der protonierten Spezies oder nicht vorhanden. Die Unterschiede betragen maximal 0.3%. Für das Lithium-Addukt wurden mit DT-IMS und TW-IMS Kollisionsquerschnitte berechnet, die in Tabelle 11 zusammengefasst sind. Die Werte für die DT-IMS Messungen wurden als Durchschnitt von drei Messungen ermittelt, weil die Werte geschwankt haben. Als mögliche Ursache wird vermutet, dass eine in den Proben enthaltene unbekannte Verbindung mit einer sehr ähnlichen Masse und Driftzeit wie die Lithium-Addukte der Phosphatidylcholine zur Verschiebung der Driftzeiten geführt hat. Die Driftzeitpeaks der Lithium-Addukte wiesen deshalb in den verschiedenen Proben eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Schulter auf. Bei der Auswertung wurden die Peaks mit zwei Gausskurven gefittet und der Mittelpunkt des größeren Peaks als Driftzeit gewertet, sodass der durch die Schulter verursachte Fehler minimiert wurde.

Tabelle 11: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å^2 des Lithium-Addukts ($m/z = 766.5$). Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	^{DT} CCS _{N2}	^{TW} CCS _{N2}
28349	299	307
28350	299	307
28365	301	306
28366	293	307

Die mit TW-IMS ermittelten Unterschiede der Kollisionsquerschnitte betragen jeweils nur etwa 0.3 \AA^2 . Mit DT-IMS wurde hingegen bei allen drei Messungen ein signifikanter Unterschied von mindestens 2% (6 \AA^2) zwischen der Probe 28365 und der Tumorprobe 28366 festgestellt. Es ist unklar, warum nur bei der Messung mit DT-IMS ein großer Unterschied zwischen den Kollisionsquerschnitten der Lithium-Addukte aus Probe 28365 und 28366 festgestellt wurde, wohingegen nur ein minimaler und sogar inverser Unterschied durch TW-IMS Messungen ermittelt wurde.

Das MSMS-Spektrum des Lithium-Addukts ist mit dem MSMS-Spektrum des Natrium-Addukts vergleichbar. In Abb. 12 ist ein Beispielspektrum gezeigt.

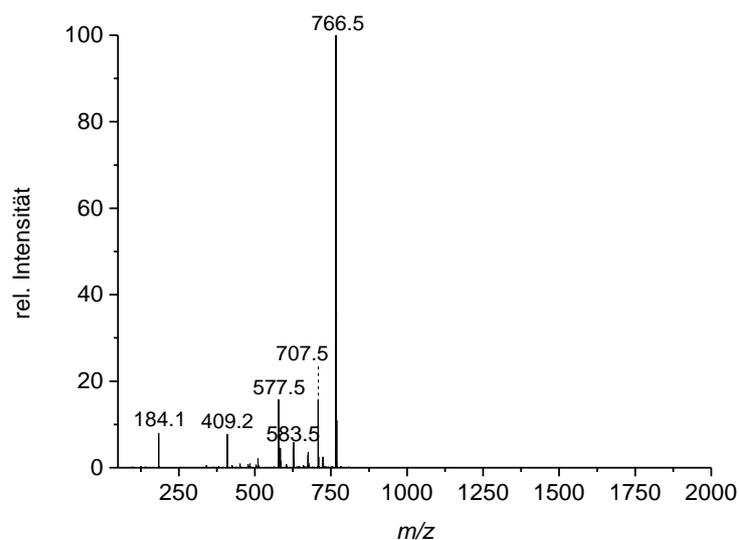


Abb. 12: MSMS-Spektrum des Lithium-Addukts $[M+Li]^+$ ($m/z = 766.5$).

Außer der Kopfgruppe bei $m/z = 184.1$ wurden die Fragmente mit $m/z = 707.5$, 583.5 und 577.5 identifiziert, die in Analogie zu den Fragmenten des Natrium-Addukts gebildet werden (vgl. Schemata 4-6). Im Gegensatz zu der Fragmentierung des Natrium-Addukts wird bevorzugt das protonierte Fragment ($m/z = 577.5$) gebildet, das eine höhere Intensität im MSMS-Spektrum aufweist als das Fragment mit dem angelagerten Lithiumion ($m/z = 583.5$). Der Peak bei $m/z = 409.2$ ist im MS- und MSMS-Spektrum vorhanden, konnte aber keinem Fragment zugeordnet werden.

Für die Fragmentationen wurden Kollisionsquerschnitte aus DT-IMS und TW-IMS Messungen berechnet. Die CCS-Werte aus der DT-IMS Messung für das Lithium-Addukt sind als nicht verlässlich anzusehen, da die Werte aus nur einer Messung stammen und vermutlich wie im MS-Spektrum die Driftzeiten durch eine darunterliegende Substanz verschoben wurden. Die Messung konnte aufgrund eines Gerätedefekts nicht wiederholt werden. In Tabelle 12 sind die Werte deshalb in Klammern gesetzt. Die CCS-Werte der Fragmente weisen kaum Unterschiede zwischen den Proben auf.

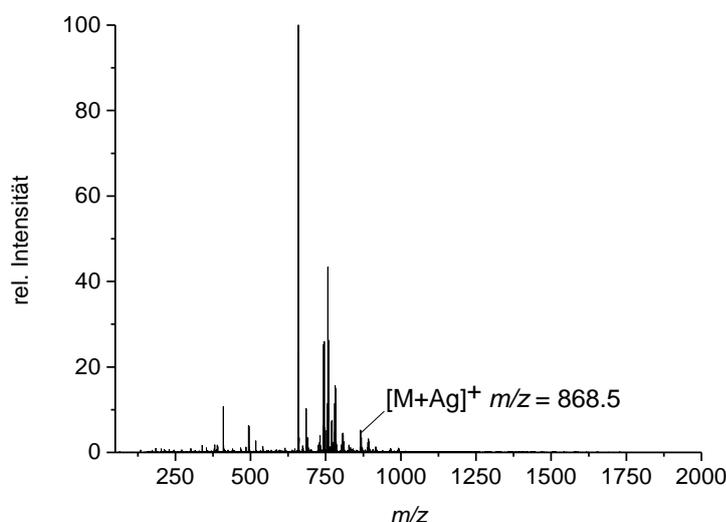
Tabelle 12: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å² des Lithium-Addukts und der Hauptfragmente im MSMS-Spektrum. Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$m/z = 766.5$		$m/z = 707.5$		$m/z = 583.5$		$m/z = 577.5$	
	DTCCS _{N2}	TWCCS _{N2}						
28349	(296)	303	281	286	263	267	261	270
28350	(291)	305	278	288	261	268	261	270
28365	(294)	304	279	287	260	267	261	270
28366	(290)	304	280	287	261	267	261	270

Die Untersuchung der Lithium-Addukte führte zu einem unklaren Ergebnis. Für die Lithium-Addukte aus den Proben 28365 und 28366 wurden mit DT-IMS signifikant unterschiedliche Kollisionsquerschnitte ermittelt, obwohl die Driftzeiten sich jeweils kaum unterschieden. Diese Beobachtung wurde bei den TW-IMS Messungen nicht bestätigt. Es wurden die gleichen Fragmentstrukturen beobachtet wie zuvor bei den Natrium-Addukten. Die Unterschiede der CCS-Werte waren jedoch zumindest in den TW-IMS Messungen kleiner als bei den Natrium-Addukten. Weil die Zugabe des sehr kleinen Lithium-Kations nicht zu einer größeren Unterscheidbarkeit der Proben führte, wurde die Messreihe mit deutlich größeren Silber-Kationen wiederholt. In mehreren vorhergehenden Studien wurde bereits erwiesen, dass durch Zugabe von Silberionen die beste Trennung von regioisomeren Phosphatidylcholinen erfolgt.^[5, 30]

[M+Ag]⁺

Um die Silber-Addukte der Phosphatidylcholine zu untersuchen, wurden die Proben mit einer Lösung von Silberhexafluorophosphat versetzt. In den MS-Spektren wurde daraufhin ein relativ intensiver Peak bei $m/z = 868.5$ beobachtet (Abb. 13).

**Abb. 13:** Beispiel für ein MS-Spektrum nach Zugabe von Silberhexafluorophosphat über den gesamten aufgenommenen m/z -Bereich.

Die Driftzeiten der Silber-Addukte wurden zwischen den verschiedenen Proben verglichen. Die mit DT-IMS ermittelten Driftzeiten der Silber-Addukte sind in allen Proben nahezu identisch. Ein maximaler Driftzeitunterschied von 0.3% wurde zwischen den Proben 28365 und der zugehörigen Tumorprobe 28366 festgestellt.

Bei den TW-IMS Messungen wurde ein Driftzeitunterschied von bis zu 2% zwischen den Proben 28365 und 28366 ermittelt (Abb. 14b). Dies bestätigt die DT-IMS Messungen der Lithium-Addukte. Auch zwischen den beiden Tumorproben wurde ein Unterschied von etwa 1.5% festgestellt (Abb. 14c). Der Unterschied zwischen den Proben 28349 und 28350 war im Vergleich dazu nur etwa halb so groß (Abb. 14a).

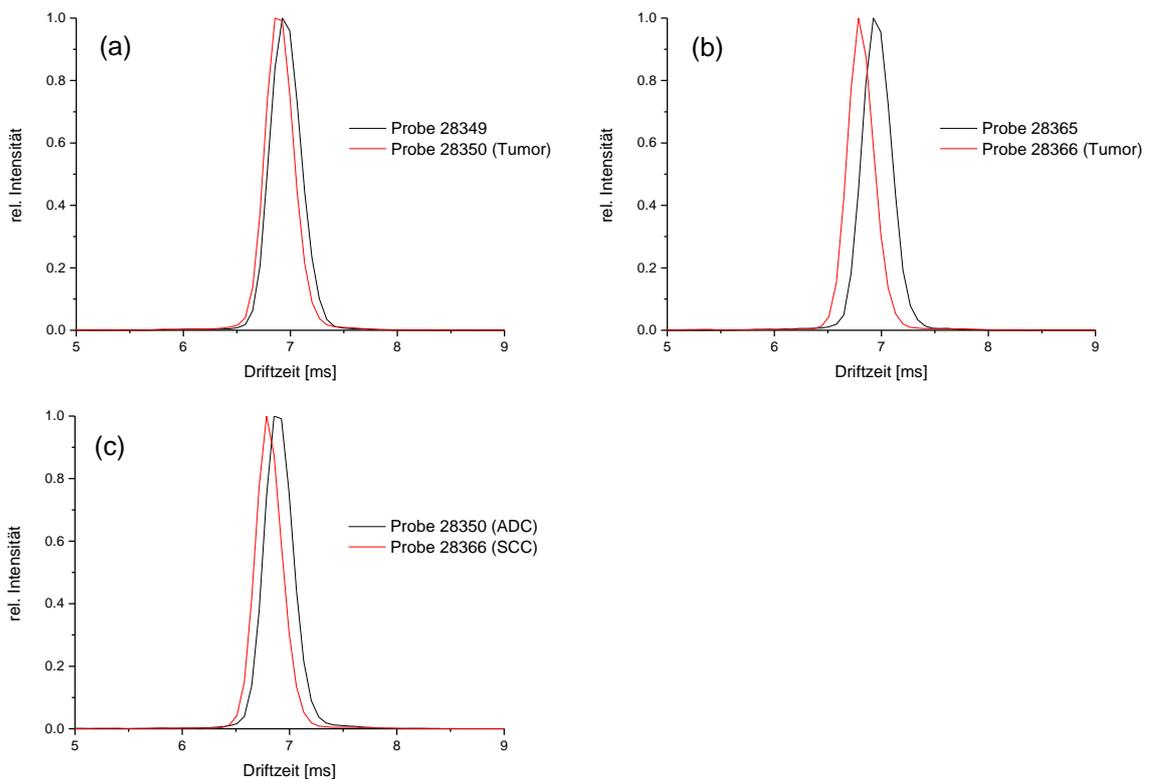


Abb. 14: Vergleich der Driftzeiten der Silber-Addukte (TW-IMS Messung mit *Wave Velocity* = 500 m/s): (a) Vergleich der Probe 28349 und der zugehörigen Tumorprobe 28350; (b) Vergleich der Probe 28365 und der zugehörigen Tumorprobe 28366; (c) Vergleich der Probe 28350 (Adenokarzinom, ADC) und der Probe 28366 (Plattenepithelkarzinom, SCC).

Mit DT-IMS wurde ein Unterschied der Kollisionsquerschnitte von etwa 1% zwischen den Proben 28365 und 28366 ermittelt. Die CCS der Silber-Addukte aus der Tumorprobe 28366 ist um etwa 3 \AA^2 kleiner als bei der Kontrollprobe 28365. Zwischen den Proben 28349 und 28350 wurde mit beiden Messmethoden kein signifikanter Unterschied festgestellt. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der Untersuchung der Lithium-Addukte.

Außerdem wurde ein Unterschied zwischen den Silber-Addukten aus den beiden Tumorproben festgestellt. Die Silber-Addukte aus der Tumorprobe 28350 (ADC) weisen einen um etwa 1% größeren Kollisionsquerschnitt als die Silber-Addukte aus der Tumorprobe 28366 (SCC) auf. Die Ergebnisse sind nachfolgend zusammengefasst.

Tabelle 13: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å² des Silber-Addukts ($m/z = 868.5$). Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	^{DT} CCS _{N₂}	^{TW} CCS _{N₂}
28349	290	299
28350	291	298
28365	291	299
28366	288	296

Bei der Fragmentierung des Silber-Addukts ($m/z = 868.5$) entstehen hauptsächlich zwei Fragmente mit $m/z = 809.5$ und 685.5 . Ein Beispielspektrum ist in Abb. 15 dargestellt.

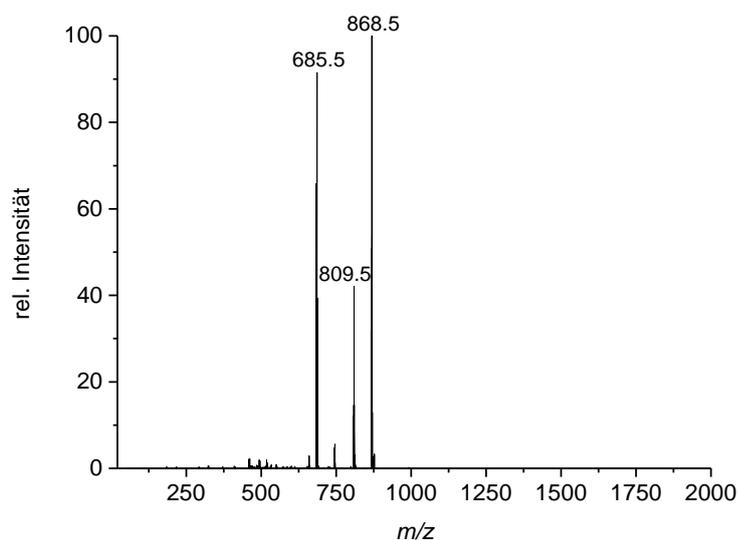


Abb. 15: MSMS-Spektrum des Silber-Addukts $[M+Ag]^+$ ($m/z = 868.5$).

Im MSMS-Spektrum des Silber-Addukts ist weder Phosphocholin ($m/z = 184.1$) noch das protonierte Fragmentation mit $m/z = 577.5$ zu finden, das durch den Verlust des Metallkations bei der Fragmentierung der Lithium- und Natrium-Addukte entsteht. Abgesehen davon sind die beiden Hauptfragmentierungswege analog zu den Fragmentierungen der Lithium- und Natrium-Addukte (vgl. Schemata 4 und 5). Die Kollisionsquerschnitte des Silber-Addukts und der beiden Hauptfragmente sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å² des Silber-Addukts und der Hauptfragmente im MSMS-Spektrum. Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$m/z = 868.5$		$m/z = 809.5$		$m/z = 685.5$	
	^{DT} CCS _{N2}	^{TW} CCS _{N2}	^{DT} CCS _{N2}	^{TW} CCS _{N2}	^{DT} CCS _{N2}	^{TW} CCS _{N2}
28349	290	297	278	284	261	267
28350	289	296	279	283	263	266
28365	288	296	276	284	260	266
28366	288	296	278	284	262	266

Die Kollisionsquerschnitte der Fragmente unterscheiden sich nur geringfügig. Der Unterschied zwischen den Silber-Addukten der Molekülonen aus den Proben 28365 und 28366 ist in den MSMS-Spektren nicht erkenntlich.

Zusammengefasst ergab die Untersuchung der Silber-Addukte einen signifikanten Unterschied zwischen den Kollisionsquerschnitten beim Vergleich von Probe 28365 und der zugehörigen Tumorprobe 28366. Sowohl mit DT- als auch TW-IMS wurde ein Unterschied von etwa 3 Å² festgestellt. Die Messungen bestätigen die allgemeine Beobachtung, dass die Phosphatidylcholine aus der Probe 28366 eine kleinere CCS als die Phosphatidylcholine aus der Probe 28365 aufweisen. Für die Proben 28349 und 28350 wurde hingegen kein eindeutiger Trend festgestellt. Allerdings wiesen die Silber-Addukte aus den beiden Tumorproben 28350 und 28366 unterschiedliche Kollisionsquerschnitte auf. Dies wurde beim Vergleich der Natrium- und Lithium-Addukte nicht beobachtet. Die Fragmente in den MSMS-Spektren entstehen bei allen drei untersuchten einfach geladenen Metallionen-Addukten nach dem gleichen Fragmentierungsmuster. Es wurden jedoch bei keinem der untersuchten Metallionen-Addukte signifikante Unterschiede zwischen den Kollisionsquerschnitten der Hauptfragmente gefunden.

[M+Cu]²⁺

Bei der Zugabe von Kupfer(II)nitrat-hemi(pentahydrat) wurde kein Peak bei $m/z = 411.5$ beobachtet. Die Intensitäten des protonierten Molekülonen und des Natrium-Addukts blieben im Spektrum auch bei Erhöhung der Kupfer(II)-Ionenkonzentration unverändert hoch. Es kann deshalb geschlossen werden, dass die untersuchten Phosphatidylcholine keine Addukte mit den Kupfer(II)-Ionen bildeten. Möglicherweise ist Kupfer(II)nitrat-hemi(pentahydrat) stabiler als die Kupfer(II)-Addukte mit Phosphatidylcholinen. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass bei Verwendung eines anderen Kupfer(II)-Salzes Addukte beobachtet werden können.

Zusammenfassend betrachtet führte die Untersuchung verschiedener Metallionen-Addukte nicht zu einer signifikant größeren Unterscheidbarkeit der Phosphatidylcholine aus den unterschiedlichen Proben. Teilweise wurden etwas größere Unterschiede der Kollisionsquerschnitte insbesondere zwischen den Proben 28365 und 28366 festgestellt. Dieser Unterschied war bei den Silber-Addukten am größten. Die Untersuchung der Silber-Addukte führte außerdem als einzige zu einem Unterschied zwischen den Driftzeiten der beiden Tumorproben. Über die Lithium-Addukte kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, da der mit DT-IMS beobachtete signifikante Unterschied der Kollisionsquerschnitte von Probe 28365 und 28366 nicht durch TW-IMS Messungen bestätigt wurde. Die Natrium-Addukte wiesen ähnlich große Unterschiede wie die protonierten Phosphatidylcholine auf und führten demzufolge zu keiner verbesserten Trennung.

Außer der Zugabe bestimmter Metallionen bestehen andere Möglichkeiten, eine bessere Trennung von Isomeren zu erreichen. Die Auflösung des IM-MS Geräts kann beispielsweise verbessert werden, indem der Druck in der Ionenmobilitätszelle erhöht wird. Dies ist allerdings technisch nur realisierbar, wenn Helium anstelle von Stickstoff als Driftgas verwendet wird.

5.3 Messung mit Helium

In Helium weisen Ionen deutlich kürzere Driftzeiten auf als in Stickstoff, weil die effektive Kollisionsfläche des einatomigen Gases kleiner ist und die Ionen die Driftzelle deshalb schneller durchqueren. Infolgedessen erreichen die Ionen schon bei geringeren Spannungen den Detektor. Der Druck in der Zelle kann bei niedrigeren Spannungen erhöht werden, da die Gefahr von Entladungen zwischen den Ringelektroden der Driftzelle erniedrigt ist. Um herauszufinden, ob bei einem höheren Druck in der Driftzelle eine bessere Trennung von Isomeren beobachtet werden kann, wurden zwei DT-IMS Testmessungen durchgeführt.

Die erste Messung wurde auf einem nicht kommerziell erhältlichen IM-MS Gerät bei einem Druck von 3.99 mbar (entspricht 2.99 Torr) durchgeführt. Es handelt sich um ein Drift Tube Ionenmobilitäts-Massenspektrometer, das in der Literatur ausführlicher beschrieben wird.^[31] Es wurden die protonierten Phosphatidylcholine und die Natrium-Addukte der Proben 28349 und 28350 verglichen. Die Driftzeiten unterschieden sich jeweils geringfügig. Der Messung mit Stickstoff entsprechend wiesen die Phosphatidylcholine aus Probe 28349 eine geringfügig kürzere Driftzeit als jene aus Probe 28350 auf (Abb. 16). Die Driftzeiten sind länger als bei den Messungen am Snapt G2-S HDMS, da die Driftzelle des selbstgebaute Geräts deutlich länger ist.

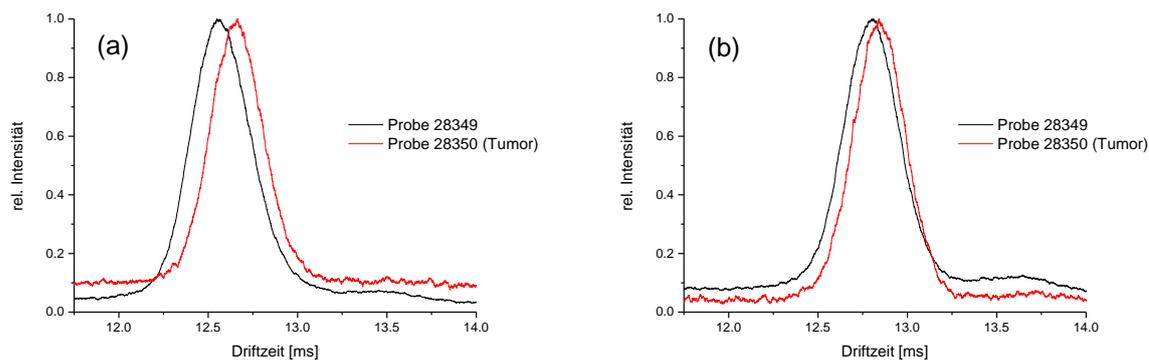


Abb. 16: Vergleich der Driftzeiten der Probe 28349 und der zugehörigen Tumorprobe 28350 in Helium: (a) Vergleich der Driftzeiten der protonierten Phosphatidylcholine; (b) Vergleich der Driftzeiten der Natrium-Addukte.

Die berechneten Kollisionsquerschnitte sind in Tabelle 15 aufgeführt. Der absolute Unterschied ist vergleichbar groß wie bei den Messungen am DT-Synapt G2-S HDMS Gerät bei geringerem Druck und mit Stickstoff als Driftgas (vgl. Tabellen 8 und 9). Der relative Unterschied der CCS ist allerdings aufgrund der kleineren absoluten Werte etwas größer und beträgt etwa 0.6 %.

Tabelle 15: Berechnete Kollisionsquerschnitte in \AA^2 der protonierten Phosphatidylcholine ($m/z = 760.5$) und der Natrium-Addukte ($m/z = 782.5$) aus den Proben 28349 und 28350. Die Werte wurden gerundet.

Druck [Torr]	Probe Nr.	$m/z = 760.5$ ${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{He}}$	$m/z = 782.5$ ${}^{\text{DT}}\text{CCS}_{\text{He}}$
2.99	28349	227	230
2.99	28350	228	232

In einer zweiten Testmessung mit Helium wurden am DT-Synapt G2-S HDMS Gerät die Proben 28365 und 28366 untersucht. Es wurden MSMS-Spektren der Lithium-Addukte ($m/z = 766.5$) bei dem normalen Gasdruck von 2.20 Torr in der IMS-Zelle und bei einem erhöhtem Druck von 2.80 Torr aufgenommen. Beim Vergleich der Driftzeitpeaks wurde kein Unterschied durch die Druckerhöhung festgestellt. Die Peaks wiesen bei beiden Drücken die gleiche Breite auf, sodass trotz des erhöhten Drucks in der Ionenmobilitätszelle keine Verbesserung der Trennung beobachtet wurde.

5.4 Negativer Ionenmodus

Im negativen Ionenmodus wurden die Chlorid- und Acetat-Addukte der Phosphatidylcholine untersucht. Die Spektren wiesen im Allgemeinen ein kleineres Signal-zu-Rauschen Verhältnis als im positiven Ionenmodus auf. Die Intensitäten des Chlorid-Addukts ($m/z = 794.5$) und des Acetat-Addukts ($m/z = 818.5$) waren in allen Proben sehr gering. Deprotonierte Phosphatidylcholine $[M-H]^-$ ($m/z = 758.5$) wurden in den MS-Spektren nicht beobachtet. Dies liegt vermutlich an der sehr geringen Azidität aller Wasserstoff-Atome im Molekül. Ein Beispielspektrum ist in Abb. 17 dargestellt.

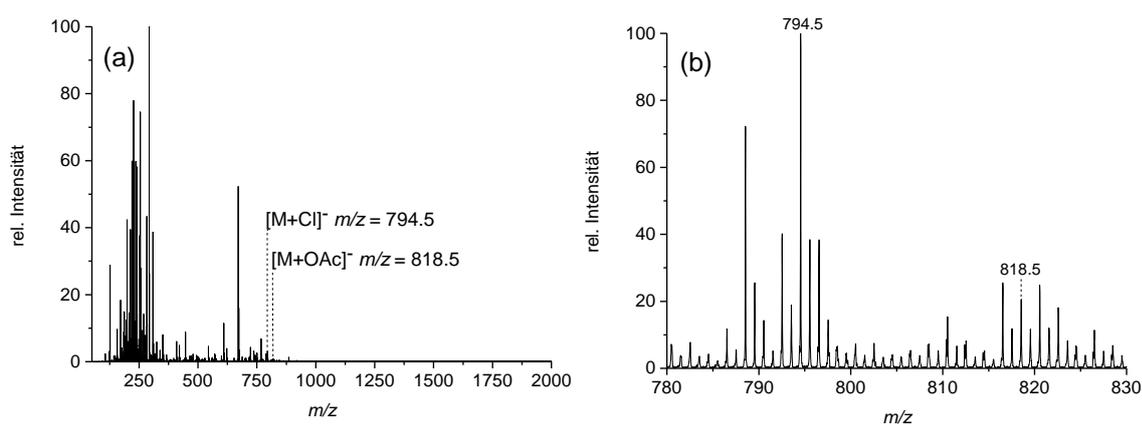


Abb. 17: Beispiel für ein MS-Spektrum im negativen Ionenmodus mit markierten Peaks der Chlorid- und Acetat-Addukte: (a) MS-Spektrum über den gesamten aufgenommenen m/z -Bereich; (b) Ausschnitt des MS-Spektrums ($m/z = 780-830$).

Die Bestimmung der Kollisionsquerschnitte erfolgte nur durch TW-IMS Messungen (Tabelle 16). Für die Chlorid-Addukte wurden keine Unterschiede zwischen den Proben festgestellt. Die Driftzeitunterschiede betragen höchstens 0.3%. Als Durchschnittswert von jeweils vier Messungen bei unterschiedlichen *Wave Velocities* ergaben sich für die Phosphatidylcholine aus allen Proben nahezu identische Kollisionsquerschnitte. Der größte Unterschied betrug etwa 0.5 \AA^2 zwischen den Proben 28365 und 28366.

Die Kollisionsquerschnitte der Acetat-Addukte wiesen einen ähnlich geringen Unterschied auf. Der maximale Unterschied betrug etwa 0.7 \AA^2 zwischen den Proben 28365 und 28366.

Tabelle 16: Berechnete Kollisionsquerschnitte in \AA^2 des Chlorid-Addukts ($m/z = 794.5$) und des Acetat-Addukts ($m/z = 818.5$). Die Werte wurden gerundet.

Probe Nr.	$m/z = 794.5$ $^{TW}CCS_{N_2}$	$m/z = 818.5$ $^{TW}CCS_{N_2}$
28349	295	299
28350	295	299
28365	295	298
28366	295	299

Von den Chlorid- und Acetat-Addukten wurden MSMS-Spektren bei einer Kollisionsenergie von 25 V und zusätzlich zum Vergleich bei 35 V aufgenommen. Die MSMS-Spektren der beiden Addukte sehen einander sehr ähnlich. In Abb. 18 ist für beide Addukte jeweils ein Beispielspektrum bei 25 V und 35 V Kollisionsenergie dargestellt. In allen Spektren sind die Fragmente mit $m/z = 744.5$, 281.2 und 255.2 mit hoher Intensität vorhanden. Im MSMS-Spektrum des Chlorid-Addukts sind zusätzlich Peaks bei $m/z = 157.1$ und 718.5 zu sehen.

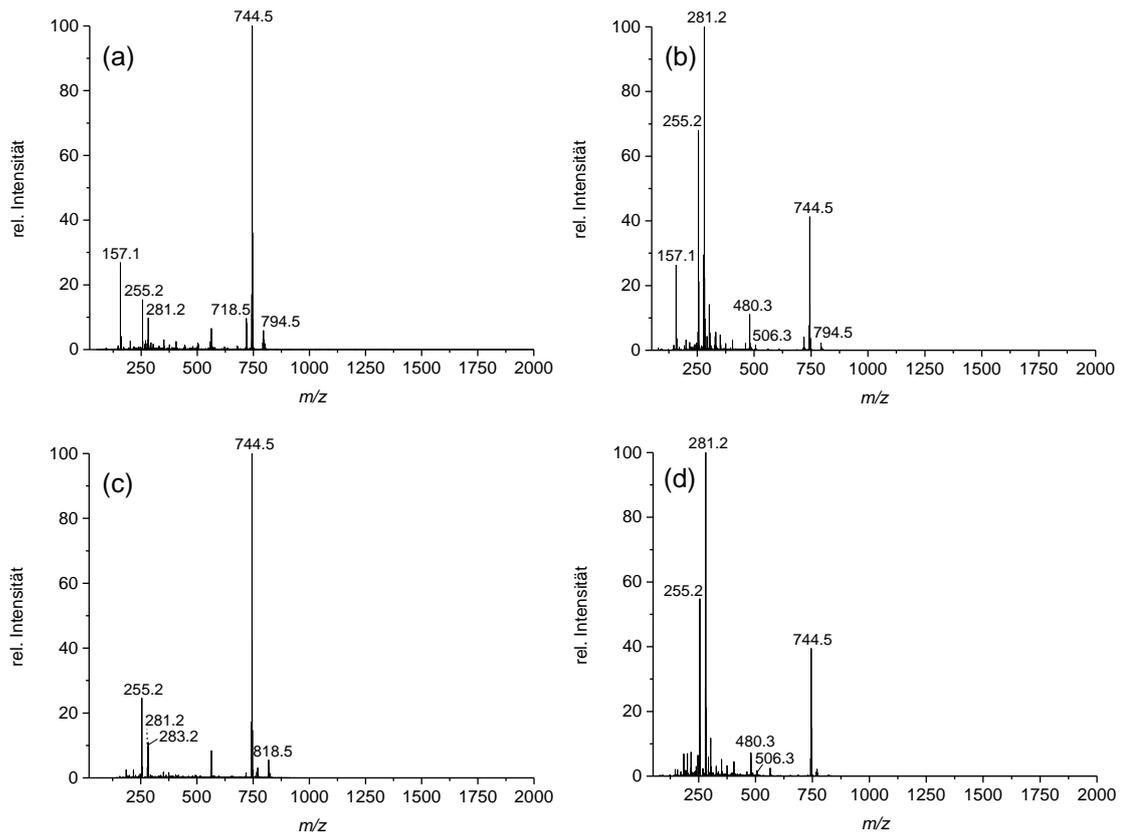


Abb. 18: MSMS-Spektrum des Chlorid-Addukts (oben, $m/z = 794.5$) und des Acetat-Addukts (unten, $m/z = 818.5$): (a) und (c) *Trap CE* = 25 V; (b) und (d) *Trap CE* = 35 V.

Die Bildung der drei Hauptfragmente wird anhand der Formiat-Addukte in der Literatur^[29] beschrieben und lässt sich auf die Acetat-Addukte übertragen. In Abb. 19 sind die möglichen Fragmentierungen anschaulich dargestellt.

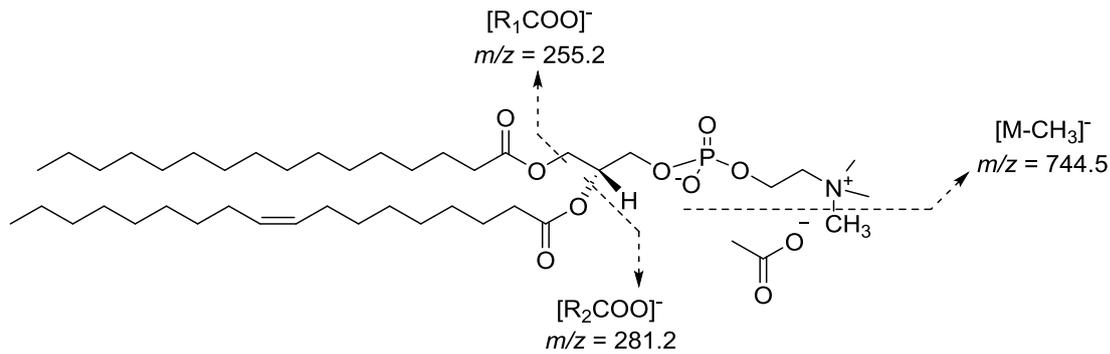


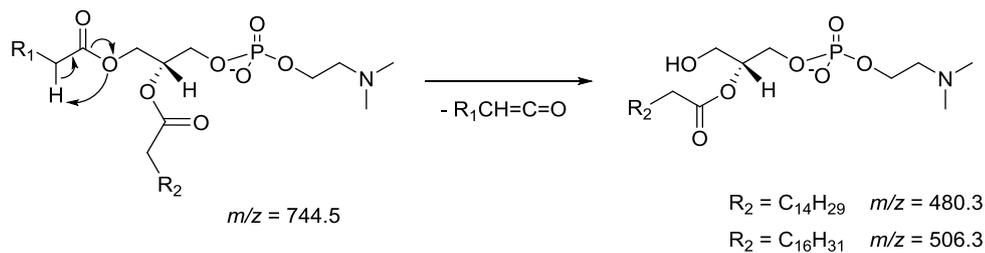
Abb. 19: Fragmentierung des Acetat-Addukts eines Phosphatidylcholins ($m/z = 818.5$) am Beispiel von PC (16:0/18:1). Die gestrichelten Linien markieren die Bruchstellen zur Bildung der Fragmente mit $m/z = 255.2$, 281.2 und 744.5 . Zur Vereinfachung wurde der Fettsäurerest $C_{15}H_{31}$ mit R_1 abgekürzt und der Rest $C_{17}H_{33}$ mit R_2 .

Bei niedrigen Kollisionsenergien (25 V) entsteht hauptsächlich das Fragment $[M-CH_3]^-$ ($m/z = 744.5$) unter Verlust des Acetat-Ions und einer Methylgruppe, wobei die Bindungselektronen am Stickstoff verbleiben. Wird die Kollisionsenergie auf 35 V erhöht, weisen die Peaks der freien Fettsäuren die größten Intensitäten auf. Die MSMS-Spektren im negativen Ionenmodus geben demzufolge Aufschluss über die Komposition der Phosphatidylcholone. Das Fragment mit $m/z = 255.2$ ist dem einfach geladenen Anion der Fettsäure 16:0 (Palmitinsäure) zuzuordnen. Das Fragment mit $m/z = 281.2$ entspricht dem Anion der Fettsäure 18:1. Die Fettsäuren 16:1 und 18:0 weisen ein Verhältnis von $m/z = 253.2$ bzw. 283.5 auf.^[32] Die gleichen Fragmente treten auch im MSMS-Spektrum des Chlorid-Addukts auf.

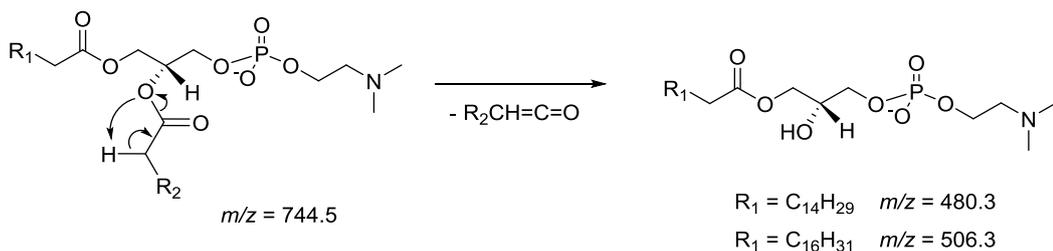
Beim Vergleich der Spektren fallen folgende Beobachtungen auf: Die Intensitätsverhältnisse der Fragmente mit $m/z = 255.2$ und 281.2 werden bei Erhöhung der Kollisionsenergie umgekehrt. Bei 25 V weist das Fragment mit $m/z = 255.2$ eine höhere Intensität auf, bei 35 V hingegen das Fragment mit $m/z = 281.5$. Auffällig ist außerdem, dass in den MSMS-Spektren der Acetat-Addukte bei 25 V Kollisionsenergie das Fragment mit $m/z = 283.2$ in allen Proben eine höhere Intensität aufweist als der Peak bei $m/z = 281.2$ (vgl. Abb. 18c). Die relativen Intensitäten der Fettsäuren hängen von der Kollisionsenergie ab und die Intensität der Fettsäure mit $m/z = 281.2$ steigt im Vergleich zu der Fettsäure mit $m/z = 283.2$ mit steigender Kollisionsenergie bis etwa 50 V.^[33] Der Peak der Fettsäure 16:1 ($m/z = 253.2$) weist in allen Spektren die geringste Intensität auf.

Aus den relativen Intensitäten der Peaks der beiden Fettsäuren lässt sich theoretisch eine Aussage über die Positionen der Fettsäuren machen, weil die Fettsäure an der *sn*-2 Position leichter abgespalten wird als an der *sn*-1 Position.^[33] Dies ist in der Praxis allerdings schwierig, wenn mehrere Isomere vorliegen und weil die Intensitätsverhältnisse außerdem von der Kollisionsenergie abhängen.

Jedoch konnten anhand der Fragmente mit $m/z = 480.3$ und 506.3 Informationen über die Positionen der Fettsäuren gewonnen werden. Diese Fragmente wurden nur bei einer erhöhten Kollisionsenergie von 35 V beobachtet. Die Bildung der beiden Fragmente lässt sich durch den Neutralverlust eines Ketens aus dem Fragment $[M-CH_3]^+$ erklären. Diese Fragmentierung wird in der Literatur^[33] beschrieben und ist in den Schemata 7 und 8 entsprechend für Phosphatidylcholine mit den Fettsäuren 18:1 und 16:0 dargestellt. Die Abspaltung kann sowohl an der *sn*-1 Position (Schema 7) als auch an der *sn*-2 Position (Schema 8) erfolgen.



Schema 7: Bildung der Fragmentionen mit $m/z = 480.3$ und 506.3 aus dem Fragmention mit $m/z = 744.5$ durch Abspaltung des Fettsäurerests an der *sn*-1 Position.



Schema 8: Bildung der Fragmentionen mit $m/z = 480.3$ und 506.3 aus dem Fragmention mit $m/z = 744.5$ durch Abspaltung des Fettsäurerests an der *sn*-2 Position.

Je nachdem, welches Keten abgespalten wird, entstehen Fragmente unterschiedlicher Massen. Bei der Abspaltung der Fettsäure 18:1 wird ein Fragment mit $m/z = 480.3$ beobachtet, bei der Abspaltung der Fettsäure 16:0 ein Fragment mit $m/z = 506.3$. Letzteres weist in den MSMS-Spektren eine wesentlich kleinere Intensität auf.

Der Verlust des Ketens erfolgt hauptsächlich an der *sn*-2 Position.^[33] Aufgrund der Beobachtung, dass hauptsächlich Fragmente mit $m/z = 480.3$ durch Abspaltung der Fettsäure 18:1 gebildet werden, folgt, dass die meisten Phosphatidylcholine die Zusammensetzung 16:0/18:1 aufweisen. Bei der Zusammensetzung 18:1/16:0 wäre ein umgekehrtes Verhältnis der Intensitäten zu beobachten.^[33]

Für die Fragmente aus den MSMS-Spektren wurden Kollisionsquerschnitte berechnet, die in Tabelle 17 zusammengefasst sind. Zwischen den verschiedenen Proben wurden in Bezug auf die Kollisionsquerschnitte keine Unterschiede beobachtet.

Tabelle 17: Berechnete Kollisionsquerschnitte in Å² der relevanten Fragmente aus den MSMS-Spektren der Chlorid- und Acetat-Addukte. Die Werte wurden gerundet. Die jeweils enthaltenen Fettsäuren sind in der untersten Zeile angegeben.

<i>m/z</i>	744.5	506.3	480.3	283.2	281.2	255.2	253.2
^{TW} CCS _{N₂}	276	225	221	182	179	173	172
Fettsäure	alle	18:1	16:0	18:0	18:1	16:0	16:1

Bezüglich der Intensitätsverhältnisse wurden zwischen den Proben nur geringfügige Unterschiede festgestellt. In den Proben aus normalem Lungengewebe (Proben 28349 und 28365) wies in den MSMS-Spektren der Acetat-Addukte das Fragment mit $m/z = 281.2$ eine deutlich geringere Intensität als das Fragment mit $m/z = 283.2$ auf. In den Tumorproben (Proben 28350 und 28366) waren ähnliche Intensitäten der beiden Peaks festzustellen (s. Anhang, Abb. A). Es könnte deshalb vermutet werden, dass in den Tumorproben die Fettsäure 18:1 einen etwas größeren Anteil ausmacht als in den Proben aus gesundem Gewebe. Allerdings sind die Intensitätsunterschiede nicht groß genug, um eine eindeutige Aussage machen zu können.

Zusammengefasst wurden bei den Messungen im negativen Ionenmodus keine Unterschiede der Kollisionsquerschnitte der Chlorid- und Acetat-Addukte zwischen den Proben festgestellt. Im Gegensatz zu den im positiven Ionenmodus aufgenommenen MSMS-Spektrum sind in den negativen MSMS-Spektren allerdings die Fettsäuren sowie Fragmente mit nur einer gebundenen Fettsäure zu erkennen, sodass die Zusammensetzung der Phosphatidylcholine qualitativ beschrieben werden kann: Der Großteil der Phosphatidylcholine PC 34:1 ist aus den Fettsäuren 18:1 und 16:0 zusammengesetzt. Die Fettsäuren 18:0 und 16:1 wurden mit geringerer Intensität beobachtet. Bei unterschiedlichen Kollisionsenergien unterschieden sich die Intensitätsverteilungen der Fettsäuren, aber zwischen den Proben wurden kaum Unterschiede festgestellt. Die Kollisionsquerschnitte der Fettsäuren waren in allen Proben konstant. Aus den relativen Intensitäten der Fragmente, die durch die Abspaltung eines Ketens entstehen, wurde die Hauptzusammensetzung 16:0/18:1 ermittelt. Über Doppelbindungsisomere kann keine Aussage getroffen werden. Weil der Unterschied der Kollisionsquerschnitte von Doppelbindungsisomeren allerdings sehr klein ist^[5], kann nicht ausgeschlossen werden, dass Isomere vorhanden sind, die mit der zur Verfügung stehenden Auflösung nicht getrennt beobachtet werden konnten. Es könnten also *Z/E*-Isomere und unterschiedliche Doppelbindungspositionen vorliegen.

6. Diskussion

Bei der Untersuchung der protonierten Phosphatidylcholine PC 34:1 wurden geringfügige Unterschiede der CCS zwischen den verschiedenen Proben gefunden, die in mehreren Wiederholungsmessungen bestätigt wurden. Der Unterschied betrug höchstens etwa 0.7%. Es wurde allgemein beobachtet, dass die Phosphatidylcholine aus der ADC-Tumorprobe eine größere CCS als die Vergleichsprobe aufweisen und dass die SCC-Tumorprobe den umgekehrten Trend zeigt. Diese beiden Trends wurden in den meisten Untersuchungen der Metallionen-Addukte bestätigt.

Für die Untersuchung von Metallionen-Addukten wurden gezielt Metallionen sehr verschiedener Größen gewählt. Neben den im positiven MS-Spektrum vorhandenen Natrium-Addukten wurden Addukte mit deutlich kleineren und stark polarisierenden Lithiumionen sowie mit größeren Übergangsmetallionen (Silber(I)- und Kupfer(II)-Ionen) untersucht. Der größte Unterschied der CCS wurde mit Silberionen erreicht. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass Silberionen nicht nur an freie Elektronenpaare der Sauerstoffatome der Phosphatgruppe gebunden werden sondern auch an die Doppelbindungen in den Fettsäureresten koordinieren können.^[30] Dadurch wird die Struktur der Phosphatidylcholine in Abhängigkeit von der Position und Konfiguration der Doppelbindung verändert, sodass größere Unterschiede in den Driftzeiten der Isomere beobachtet werden. Den Literaturwerten (s. Anhang, Tabelle B) ist auch zu entnehmen, dass die Unterschiede der CCS zwischen Positionsisomeren bei protonierten Phosphatidylcholinen lediglich etwa 0.1% beträgt, bei Silber-Addukten hingegen 0.7%. Ein ähnlicher Effekt wäre auch für die Kupfer-Addukte zu erwarten gewesen, die allerdings mit dem verwendeten Kupfer(II)-Salz nicht gebildet wurden. Allgemein wurden nur einfach geladene Addukte beobachtet.

Bei der Untersuchung der Lithium-Addukte trat das Problem auf, dass mit DT-IMS große Unterschiede der CCS von etwa 2% beobachtet wurden, mit TW-IMS hingegen nicht. Ein allgemeines Problem bei der Berechnung von Kollisionsquerschnitten aus TW-IMS Messungen liegt in der vorhergehende Kalibration. Durch die Kalibration mit Polyalanin werden die CCS-Werte überschätzt^[27], sodass ein direkter Vergleich mit den CCS-Werten aus DT-IMS Messungen nicht möglich ist. Das zweite Problem besteht darin, dass die Berechnung der CCS aus einer einzigen Messung mit Hilfe der Kalibrationsgeraden erfolgt. Zwar wird für verschiedene *Wave Velocities* jeweils eine CCS berechnet und am Ende der Mittelwert der CCS Werte gebildet, aber bei der DT-IMS Messung wird die CCS aus acht einzelnen Messungen berechnet. Dieses Verfahren führt zu viel genaueren Werten. In Bezug auf die Lithium-Addukte bedeutet dies, dass der große Unterschied zwischen der SCC-Tumorprobe und der zugehörigen

Vergleichsprobe trotz der widersprüchlichen TW-IMS Messung als real angesehen werden sollte.

Aus den MSMS-Spektren der Chlorid- und Acetat-Addukte wurden im negativen Ionenmodus Informationen über die Zusammensetzung der untersuchten Phosphatidylcholine erhalten. Die hauptsächliche Zusammensetzung in allen Proben ist 16:0/18:1. Die Fettsäuren 16:1 und 18:0 waren ebenfalls mit geringerer Intensität in allen Spektren nachweisbar. Um anhand der Peaks der deprotonierten Fettsäuren genauere Daten über die Positionen der Fettsäuren zu erhalten, könnten zusätzlich Vorläuferionen-Scans der Peaks mit $m/z = 255.2$ und 281.2 durchgeführt werden. Für die Fettsäure an der *sn*-2 Position sollte der Vorläuferionen-Peak größer sein, weil dort die Abspaltung der Fettsäure leichter erfolgt.^[33]

Weil die verschiedenen Proben anhand der MS-Spektren hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung und der Positionen der Fettsäuren nicht unterscheidbar waren, können die im positiven Ionenmodus beobachteten geringfügigen Unterschiede der CCS möglicherweise auf Doppelbindungsisomere oder unterschiedliche Positionen der Doppelbindungen zurückgeführt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Unterschiede der Fettsäurezusammensetzung und -position zwischen den Proben so gering sind, dass sie in den MS-Spektren nicht auffallen, aber zu einer geringfügigen Verschiebung der Driftzeiten führen. Insgesamt wurden tendenziell größere Unterschiede zwischen Tumorgewebe und normalem Lungengewebe festgestellt als zwischen den beiden Tumorarten, die nur mit Silber-Addukten unterschieden werden konnten.

Unabhängig von dem verwendeten Metallkation können die unterschiedlichen Proben in Mischung nicht unterschieden werden, weil die Driftzeitunterschiede zu gering sind. Da bereits die Unterschiede der CCSs der reinen Isomere sehr klein sind und diese in allen Proben als Mischungen vorliegen, wird eine größere Auflösung des IM-MS Instruments benötigt, um die Proben möglicherweise trennen zu können. Aus diesem Grund wird ein Teil der Proben momentan mit TIMS-TOF untersucht. Eine weitere Möglichkeit wäre die Untersuchung der Proben mit FAIMS, wobei ebenfalls eine sehr hohe Auflösung erreicht wird. Der wesentliche Nachteil von FAIMS besteht allerdings darin, dass keine CCS-Werte berechnet werden können.

Um die Ergebnisse anschließend für die beiden Tumorarten verallgemeinern zu können, müsste eine repräsentative Anzahl an Proben untersucht werden, denn die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede anhand von jeweils zwei Proben könnten auch auf zufällige Schwankungen in der Lipidzusammensetzung zurückzuführen sein.

7. Literaturverzeichnis

- [1] F. M. Vaz, M. Pras-Raves, A. H. Bootsma, A. H. van Kampen, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 41-52.
- [2] K. Yang, X. Han, *Trends Biochem. Sci* **2016**, *41*, 954-969.
- [3] C. R. Santos, A. Schulze, *FEBS J.* **2012**, *279*, 2610-2623.
- [4] M. Li, L. Yang, Y. Bai, H. Liu, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 161-175.
- [5] M. Groessl, S. Graf, R. Knochenmuss, *Analyst* **2015**, *140*, 6904-6911.
- [6] T. W. Mitchell, H. Pham, M. C. Thomas, S. J. Blanksby, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2722-2735.
- [7] G. Paglia, M. Kliman, E. Claude, S. Geromanos, G. Astarita, *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4995-5007.
- [8] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. VanNieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, E. A. Dennis, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 839-861.
- [9] LIPID MAPS, <http://www.lipidmaps.org>, (12.07.2017)
- [10] K. Kawai, M. Fujita, M. Nakao, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *369*, 222-233.
- [11] K. Yang, B. G. Dilthey, R. W. Gross, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9742-9750.
- [12] E. Fahy, S. Subramaniam, R. C. Murphy, M. Nishijima, C. R. Raetz, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. J. Wakelam, E. A. Dennis, *J. Lipid Res.* **2009**, *50* Suppl, S9-14.
- [13] C. Ferreri, C. Chatgililoglu, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1722-1734.
- [14] G. van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112-124.
- [15] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, in *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, **2012**, S. 270-320.
- [16] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, C. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [17] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
- [18] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, S. Vahidi, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 2-9.
- [19] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287-2294.
- [20] A. El-Faramawy, K. W. Siu, B. A. Thomson, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2005**, *16*, 1702-1707.
- [21] J. M. Wells, S. A. McLuckey, *Methods Enzymol.* **2005**, *402*, 148-185.
- [22] M. C. Thomas, T. W. Mitchell, D. G. Harman, J. M. Deeley, J. R. Nealon, S. J. Blanksby, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 303-311.
- [23] G. A. Eiceman, Z. Karpas, H. H. Hill, in *Ion Mobility Spectrometry*, 3. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **2013**, S. 3-30.
- [24] G. Paglia, G. Astarita, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 797-813.
- [25] K. Michelmann, J. A. Silveira, M. E. Ridgeway, M. A. Park, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2015**, *26*, 14-24.
- [26] H. I. Kim, H. Kim, E. S. Pang, E. K. Ryu, L. W. Beegle, J. A. Loo, W. A. Goddard, I. Kanik, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 8289-8297.
- [27] K. M. Hines, J. C. May, J. A. McLean, L. Xu, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7329-7336.
- [28] F.-F. Hsu, J. Turk, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2003**, *14*, 352-363.
- [29] T. Houjou, K. Yamatani, H. Nakanishi, M. Imagawa, T. Shimizu, R. Taguchi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3123-3130.
- [30] A. T. Maccarone, J. Duldig, T. W. Mitchell, S. J. Blanksby, E. Duchoslav, J. L. Campbell, *J. Lipid Res.* **2014**, *55*, 1668-1677.
- [31] S. Warnke, G. von Helden, K. Pagel, *Proteomics* **2015**, *15*, 2804-2812.
- [32] B. Brügger, G. Erben, R. Sandhoff, F. T. Wieland, W. D. Lehmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2339-2344.

-
- [33] K. Ekroos, C. S. Ejsing, U. Bahr, M. Karas, K. Simons, A. Shevchenko, *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 2181-2192.

8. Anhang

Tabelle A: Übersicht über die ISTDs in der Blank-Probe mit Angabe der Konzentration und der Menge pro Milligramm Gewebe.

Lipid (ISTD)	Konzentration [pmol/mL]	Konzentration im Gewebe [pmol/mg]
SM d18:1/17:0	1045.9	146.4
PC-OO 4Me-16:0/4Me-16:0	916.5	128.3
PE-OO 4Me-16:0/4Me-16:0	966.2	135.3
LPC 17:0	1471.6	206.0
PG 12:0/12:0	1185.3	165.9
PS 12:0/12:0	1161.5	162.6
PA 12:0/12:0	1342.5	187.9
TAG 51:0	883.0	123.6
Cholesterol-D7	6350.1	889.0
Cholesterolester 17:0	1173.5	164.3

Tabelle B: Literaturwerte^[5] der Kollisionsquerschnitte der Phosphatidylcholine PC 16:0/18:1 und PC 18:1/16:0 in Å² für protonierte Spezies, Natrium- und Silber-Addukte.

Fettsäure-zusammensetzung	[M+H] ⁺ DTCCS _{N2}	[M+Na] ⁺ DTCCS _{N2}	[M+Ag] ⁺ DTCCS _{N2}
PC 16:0/18:1	296.6	299.2	292.5
PC 18:1/16:0	296.2	298.2	294.7

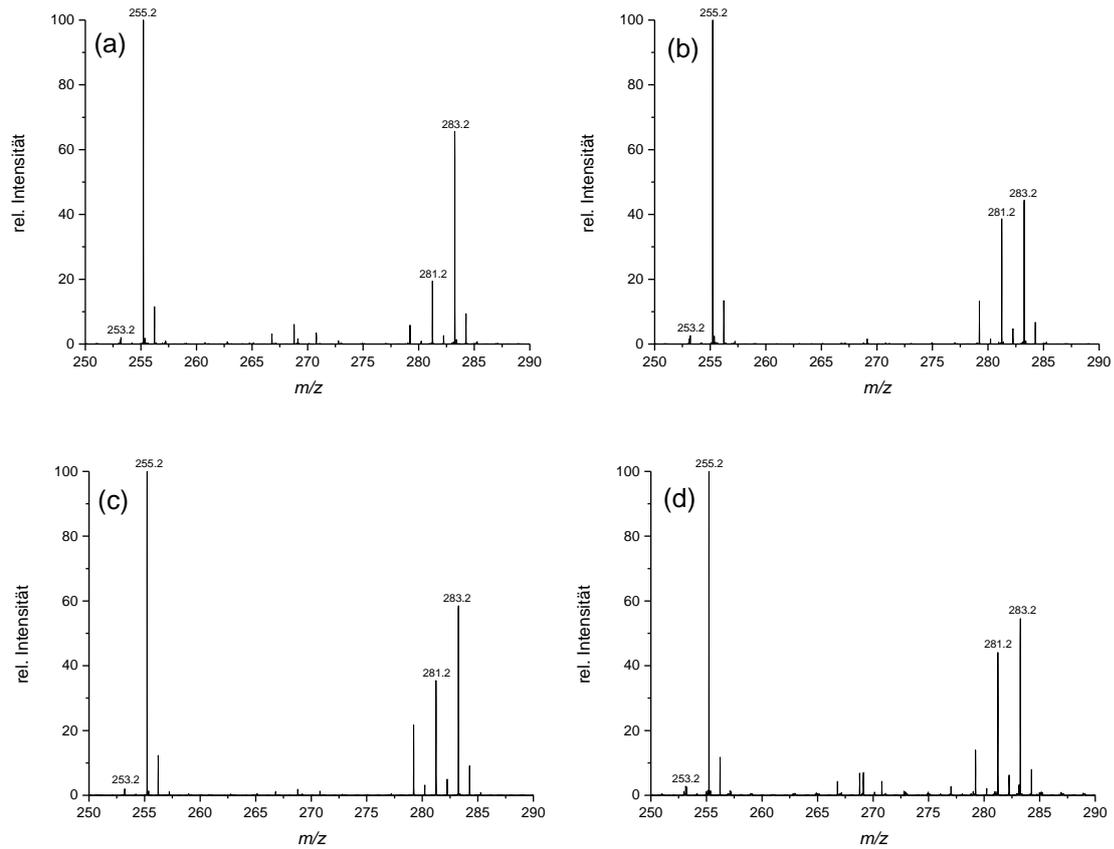


Abb. A: MSMS-Spektren der Acetat-Addukte ($m/z = 818.5$) im Bereich $m/z = 250-290$ ($Trap\ CE = 25\ V$): (a) Probe 28349; (b) Probe 28350 (ADC); (c) Probe 28365; (d) Probe 28366 (SCC).