

**Klassifizierung und Charakterisierung von
Stratum corneum Lipiden mit Hilfe chromatographischer und
massenspektrometrischer Analysemethoden**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

Der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von

Anke Wirth (geb. Hinder)

geboren am 30.06.1979 in Lutherstadt Wittenberg

Halle/Saale 2016

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard H. H. Neubert

Prof. Dr. rer. nat. habil. Andrea Sinz

Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard K. E. Scriba

Tag der Verteidigung: 13.10.2016

„Die Haut.

Das größte Organ des Menschen ist zugleich das am wenigsten beachtete. Dabei macht es ein Achtel der gesamten Körpermasse aus und bedeckt bei einem durchschnittlichen Erwachsenen eine Fläche von etwa zwei Quadratmetern. Strukturell ist die Haut ein kunstvolles Geflecht aus Kapillargefäßen, Drüsen und Nerven, das sowohl regulierende als auch schützende Funktionen hat. Sie ist unsere sensorische Schnittstelle zur Außenwelt, die Grenze, an der unsere Individualität – unser *Ich* – endet.“

Simon Beckett „Leichenblässe“, 2009

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Reinhard Neubert für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Ich danke ihm für die gewährten Freiräume bei der Durchführung und sein stetiges Interesse am Vorankommen dieser Arbeit. Ebenso bin ich dankbar für seine fortwährende Geduld.

Herrn Dr. Christian Schmelzer und Herrn Dipl.-Pharm. Michael Jung möchte ich besonders für ihre Unterstützung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen am QTOF danken. Genauso zeigten sie ständige Diskussionsbereitschaft bei offenen Fragestellungen und konnten somit zum Gelingen dieser Arbeit beitragen. Bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn Dr. Stephan Smesny und seinem Team der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena, durch die die Studie an den Schizophreniepatienten organisiert und die Lipidextrakte zur Verfügung gestellt wurden.

Auch meinen Kollegen der Arbeitsgruppen Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie möchte ich für die gute Zusammenarbeit in Forschung und Lehre danken, insbesondere Frau Anke Nies, Frau Manuela Woigk und Frau Dr. Sandra Klein. Herrn Dr. Simon Drescher danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Messungen an der HPLC-ELSD.

Herrn Dr. Raik Wolf danke ich für das kritische Lesen und sein großes Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Matthias Kutter für die finale Kontrolle der Rechtschreibung und Grammatik.

Außerdem möchte ich mich von ganzem Herzen bei all jenen bedanken, die mich im Laufe meiner Promotion unterstützten und somit zum Gelingen dieser Arbeit beitragen konnten. Diesen Dank möchte ich vor allem meinen Eltern und meinem Lebensgefährten zukommen lassen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Theoretischer Teil.....	4
2.1 Der Aufbau der Haut.....	4
2.2 Das Stratum corneum.....	7
2.3 Die Stratum corneum-Lipide	8
2.3.1 Die Stratum corneum-Ceramide	9
2.3.1.1 Synthese der Ceramide.....	12
2.3.1.2 Bedeutung der Ceramide.....	13
2.3.2 Die freien Fettsäuren des Stratum corneum	14
2.4 Hautmodelle	15
2.5 Gewinnung der Stratum corneum Lipide	18
2.6 Die Schizophrenie und ihr Bezug zur Lipidzusammensetzung der Haut.....	20
2.6.1 Die Schizophrenie.....	20
2.6.2 Die Membran-Phospholipid-Hypothese	22
2.7 Analytische Methoden	24
2.7.1 Chromatographische Methoden.....	24
2.7.1.1 Dünnschichtchromatographie	24
2.7.1.2 Automatische Mehrfachentwicklung.....	25
2.7.1.3 Gaschromatographie	28
2.7.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie	30
2.7.2 Evaporative Lichtstredetektion	31
2.7.3 Massenspektrometrische Methoden.....	32
2.7.3.1 Ionisationstechniken.....	33
2.7.3.2 Massenanalysatoren	37
2.7.3.3 Detektoren	42
3 Experimenteller Teil	43
3.1 Chemikalien	43
3.2 Gewinnung der SC-Lipide	43
3.3 Trennung der SC-Lipide mittels HPTLC.....	44
3.3.1 Probenauftragung	44
3.3.2 Automatische Mehrfachentwicklung.....	44
3.3.3 Visualisierung und Detektion	45
3.4 Trennung der Ceramide mittels RP-HPLC-APCI-MS	47
3.5 Trennung der Ceramide mittels NP-HPLC-ELSD	48
3.6 Trennung der freien Fettsäuren mittels GC-MS.....	49
3.7 Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen der Ceramide	50
4 Ergebnisse und Diskussion	51
4.1 Analytik der Hautlipide	51
4.1.1 Charakterisierung der SC-Ceramide mittels RP-HPLC-APCI-MS.....	51
4.1.2 Trennung der Ceramidklassen für die Tandemmassenspektrometrie	60
4.1.3 Tandemmassenspektrometrische Charakterisierung der Ceramidstandards ...	65
4.1.3.1 Ceramid [EOS] – negativer und positiver Ionenmodus	66

Inhaltsverzeichnis

4.1.3.2	Ceramid [NP] – negativer und positiver Ionenmodus	71
4.1.3.3	Ceramid [AP] – negativer und positiver Ionenmodus	75
4.1.3.4	Ceramid [NS] – negativer und positiver Ionenmodus	80
4.1.3.5	Ceramid [AS] – negativer und positiver Ionenmodus.....	83
4.1.3.6	Vergleich der Fragmentmuster.....	87
4.1.4	Tandemmassenspektrometrische Untersuchung der nativen SC-Ceramide.....	87
4.1.4.1	Ceramid [EOS]	87
4.1.4.2	Ceramid [NP]	89
4.1.4.3	Ceramid [AP]	91
4.1.4.4	Ceramid [NS] und Ceramid [AS].....	93
4.1.4.5	Zusammenfassung der MS/MS-Untersuchungen an den nativen CER	93
4.2	Untersuchung der Lipidverteilung im SC von Schizophrenieerkrankten	95
4.2.1	Die Profile der Lipid- und Ceramidverteilung.....	95
4.2.2	Die Profile der ungesättigten freien Fettsäuren	98
5	Zusammenfassung und Ausblick	100
6	Literaturverzeichnis.....	103

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure (engl.: Arachidonic acid)
AMD	Automatische Mehrfachentwicklung (engl.: Automated multiple Development)
APCI	Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (engl.: Atmospheric pressure chemical ionisation)
ATS	Automatic TLC sampler
Cxx	Anzahl der Kohlenstoffatome im Molekül (xx = Zahl)
CER	Ceramid
CERS	Ceramidsynthase
Chol	Cholesterol
CholE	Cholesterolester
CI	Chemische Ionisation
CID	Stoßinduzierte Fragmentierung (engl.: Collision induced dissociation)
CLE	Kovalent gebundene Lipide an der Hornhülle (engl.: Cornified lipid envelope)
DC	Dünnschichtchromatographie
EI	Elektronenstoßionisation (engl.: Electron impact)
ELSD	Evaporative Lichtstredetektion (engl.: Evaporated light scattering detection)
EPA	Eicosapentaensäure (engl.: Eicosapentaenoic acid)
ESI	Elektrospray-Ionisation
ETA	Eicosatriensäure (engl.: Eicosatrienoic acid)
eV	Elektronenvolt
FA	Fettsäure (engl.: fatty acid)
FAB	Fast atom bombardement
FAME	Fettsäuremethylester
FFA	Freie Fettsäuren (engl.: free fatty acids)
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: High performance liquid chromatography)

Abkürzungsverzeichnis

HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (engl.: High performance thin-layer chromatography)
ID	Innendurchmesser (engl.: inner diameter)
LC	Flüssigchromatographie (engl.: Liquid Chromatography)
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorptionsionisation
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS ⁿ	Mehrfach-Massenspektrometrie
Nano-ESI	Nano-Elektrosprayionisation
NP	Normalphase (engl.: Normal phase)
OB	Odland bodies
PG	Prostaglandin
PGD2	Prostaglandin D2
PLA2	Phospholipase A2
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (engl.: polyunsaturated fatty acids)
QTOF	Quadrupole time of flight
R _f	Retentionsfaktor (engl.: Retention factor)
RP	Umkehrphase (engl.: Reversed phase)
RT	Retentionszeit (engl.: Retention time)
SIM	Selected ion monitoring
SC	Stratum corneum
TEWL	Transepidermaler Wasserverlust (engl.: transepidermal waterloss)
TG	Triglyceride
TIC	Totaler Ionenstrom (engl.: Total ion current)
TLC	Thin layer chromatographie
TOF	Flugzeit (engl.: Time of Flight)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Zielsetzung

Das humane Stratum corneum (SC) besteht, vereinfacht betrachtet, aus zwei wichtigen Komponenten: den Korneozyten und den interzellulären Lipiden, die in einer Membrandoppelschicht (Bilayer) angeordnet sind. Die interzellulären Lipide sind hauptsächlich aus Ceramiden, freien Fettsäuren, Triglyceriden und Cholesterol sowie dessen Derivaten zusammengesetzt [32]. Der Hauptbestandteil Ceramide, die zu der Gruppe der Sphingolipide gehören, sind im gesamten Körper anzutreffen, deren Hauptaufgabe in der Signaltransduktion und der Apoptose besteht. Ganz anders im Stratum corneum, die Struktur der Ceramide ist hier einzigartig und ihre Aufgabe besteht darin, die wichtigste Permeabilitätsbarriere zur Umwelt aufzubauen [49,102,195].

Die SC-Ceramide bilden dabei eine sehr heterogene Gruppe, sie bestehen, grob betrachtet, aus einer Sphingosinbasis an die amidartig eine Fettsäure gebunden ist. Sie sind seit mehreren Jahrzehnten ein Schwerpunkt der pharmazeutischen Forschung. So waren noch vor 15 Jahren gerade einmal 8 Ceramidklassen bekannt [153], heute kennt man dagegen bereits 12 [185]. Dies deckt jedoch nicht die gesamten Strukturvariationen dieser SC-Lipidgruppe ab. Innerhalb dieser 12 Ceramidklassen existieren jeweils eigene Subspezies, welche sich als wichtigstes Merkmal in ihrer Gesamtkohlenstoffanzahl unterscheiden [62]. Innerhalb dieser Subspezies gibt es wiederum isobare Subspezies, welche eine gleiche Summenformel besitzen, aber unterschiedliche Strukturen aufweisen. Man geht davon aus, dass mehrere hundert verschiedene Ceramide im SC existieren, deren Zusammensetzung interindividuell variieren kann. Bis heute sind noch nicht alle von ihnen identifiziert und ihre einzelnen Funktionen sind nur teilweise bekannt. Bekannt ist allerdings, dass die molekulare Struktur der Ceramide, deren Zusammensetzung, sowie die Zusammensetzung der Lipide allgemein die Barrierefunktion der Haut erheblich beeinflusst. So werden viele Krankheiten, wie Psoriasis, atopische Dermatitis oder die trockene (Winter)Haut mit einer Veränderung der Lipidzusammensetzung assoziiert [32,36,43].

Für die Analytik der Hautlipide und speziell der Ceramide stehen eine Reihe an Analysemethoden zur Verfügung. Die Dünnschichtchromatographie (DC) bzw. die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) ermöglicht die Bestimmung der vollständigen Lipidzusammensetzung im Stratum corneum. Die Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie wird genutzt, um die

Subspezies der Ceramidklassen genauer zu identifizieren und zu quantifizieren. Mittels tandemmassenspektrometrischer Fragmentierungsexperimente lassen sich schließlich die isobaren Subspezies der Ceramide identifizieren. Die Gaschromatographie wird für eine genaue Analyse der freien Fettsäuren herangezogen. Diese vielfältigen Analysemöglichkeiten und die einzigartige Zusammenstellung der Stratum corneum Lipide gestalten deren Analytik sehr herausfordernd. Ziel dieser Untersuchungen ist es, u.a. durch den Einsatz von definierten Lipiden (Ceramiden) die Therapien von Hauterkrankungen zu optimieren.

Von Interesse ist außerdem, ob andere Krankheiten, die nicht direkt mit Veränderungen der Haut in Verbindung gebracht werden, einen Einfluß auf die Lipidzusammensetzung des SC besitzen. So kommt unter anderem die Schizophrenie ins nähere Blickfeld. Vor allem, da die Haut, das Gehirn und die Hirnhaut in der Embryonalentwicklung aus dem gleichen Keimblatt, dem Ektoderm, entstehen. Veränderungen in der Lipidstruktur wurden bereits in der Hirnhaut und der weißen Materie des Gehirns entdeckt [172,181]. Zum Beispiel ist eine verringerte Hautreaktion auf Niacin bei den Schizophreniepatienten ein direkter Hinweis auf eine verminderte Prostaglandinsynthese. Daraus lässt sich schlußfolgern, dass bei Schizophreniepatienten eine geringere Menge an Arachidonsäure, einem wichtigen Ausgangsstoff für die Prostaglandine, vorhanden ist [170,191], was sich unter Anderem in einem verminderten Schmerzempfinden äußert. Daraus kann man eventuell ableiten, dass der gesamte Fettsäurestoffwechsel von Schizophreniekranken verändert ist, was in einer veränderten Lipidzusammensetzung im Stratum corneum resultiert.

In dieser Arbeit sollen daher die Stratum corneum Lipide unter verschiedenen Fragestellungen mit unterschiedlichen Analysemethoden genauer untersucht werden. Im Einzelnen ergeben sich folgende Ziele:

- Umfassende Identifizierung der Subspezies der einzelnen Ceramidklassen.
- Entwicklung einer optimalen Trennmethode für die Ceramidklassen mit anschließender tandemmassenspektrometrischer Untersuchung.
- Durchführung von Fragmentierungsexperimenten an Ceramidstandards mit nachfolgender Strukturaufklärung der gefundenen Fragmente.

Einleitung und Zielsetzung

- Durchführung von Fragmentierungsexperimenten an nativen SC-Ceramiden zur genaueren Identifizierung der Kettenlängen der isobaren Subspezies als Einflussmöglichkeit auf die Hautbarriere.
- Untersuchung der Lipidverteilung im Stratum corneum von Schizophreniepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden mittels HPTLC.
- Untersuchung des Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren im SC, die für den Prostaglandinstoffwechsel von großer Bedeutung sind. Verglichen werden soll hierbei der Anteil im Stratum corneum von Schizophreniepatienten mit dem Anteil im Stratum corneum von gesunden Probanden.

2 Theoretischer Teil

2.1 Der Aufbau der Haut

Mit einer Oberfläche von 2 m^2 ist die Haut das größte Organ des Menschen. Sie ist die äußere Begrenzung des Menschen zur Umwelt und hat eine ausgeprägte Schutzfunktion gegenüber chemischen, biologischen und physikalischen Noxen. Des Weiteren verhindert sie eine zu starke Austrocknung und Überhitzung des Körpers über die Regulierung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) [54]. Mit 7-10% des Körpergewichts ist sie ein wichtiges Sinnes-, Immun- und Sekretionsorgan [142].

Histologisch lässt sich die Haut in 3 funktionelle Schichten unterteilen: die Subcutis (Unterhaut), die Dermis (Korium, Lederhaut) und die Epidermis (Oberhaut) (Abb. 1) [142,181].

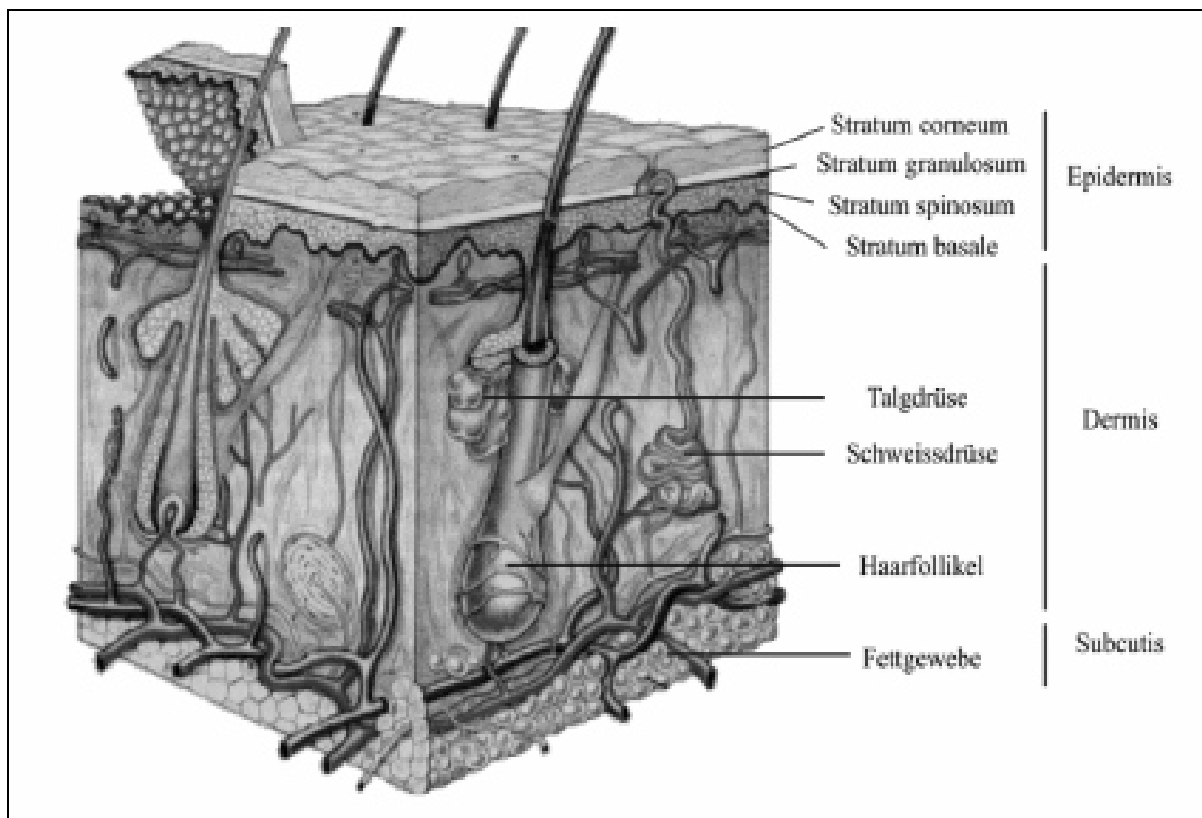


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der menschlichen Haut

Die Subcutis, die Unterhaut, besteht aus lockerem Bindegewebe, in das Agglomerate von Fettzellen eingelagert sind. Ihre Funktionen sind die Speicherung von Nährstoffen und der Schutz des Körpers vor Kälte. Das Bindegewebe der Subcutis ist durchzogen von Nerven,

die die Sinnesorgane für Berührung, Druck, Temperatur und Schmerz bilden, und von Blutgefäßen, wodurch die Ernährung der gesamten Haut gewährleistet wird. Hier findet sich der Ursprung der Schweißdrüsen, Talgdrüsen und Haarfollikel [142].

Ohne scharfe Abgrenzung erfolgt der Übergang zur mit Blutgefäßen, Nervenbahnen und Lymphgefäßen durchdrungenen Dermis [174], welche sich nochmals unterteilt in das Stratum papillare und das Stratum reticulare. Das Stratum papillare ist dünn, zell- und gefäßreich und gewährleistet die Nährstoffversorgung der epidermalen Zellen. Das Stratum reticulare besteht hauptsächlich aus verflochtenen kaum dehnbaren Kollagenfasern, in die netzartig verknüpfte dehnbare Elastinfasern eingelagert sind. Diese sorgen für die hohe Elastizität und Zugfestigkeit der Haut. Weitere Bestandteile dieses Bindegewebes sind nicht keratinisierte Zellen, die Fibroblasten, Histiocyten und Mastzellen, die in eine gelartige Grundsubstanz eingebettet sind [142,181].

Die oberste Schicht der Haut bildet die gefäßlose Epidermis, welche von innen nach außen in das Stratum basale (Basalschicht), Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht), Stratum lucidum (Glanzschicht) und das Stratum corneum (Hornschrift) gegliedert ist (Abb. 2).

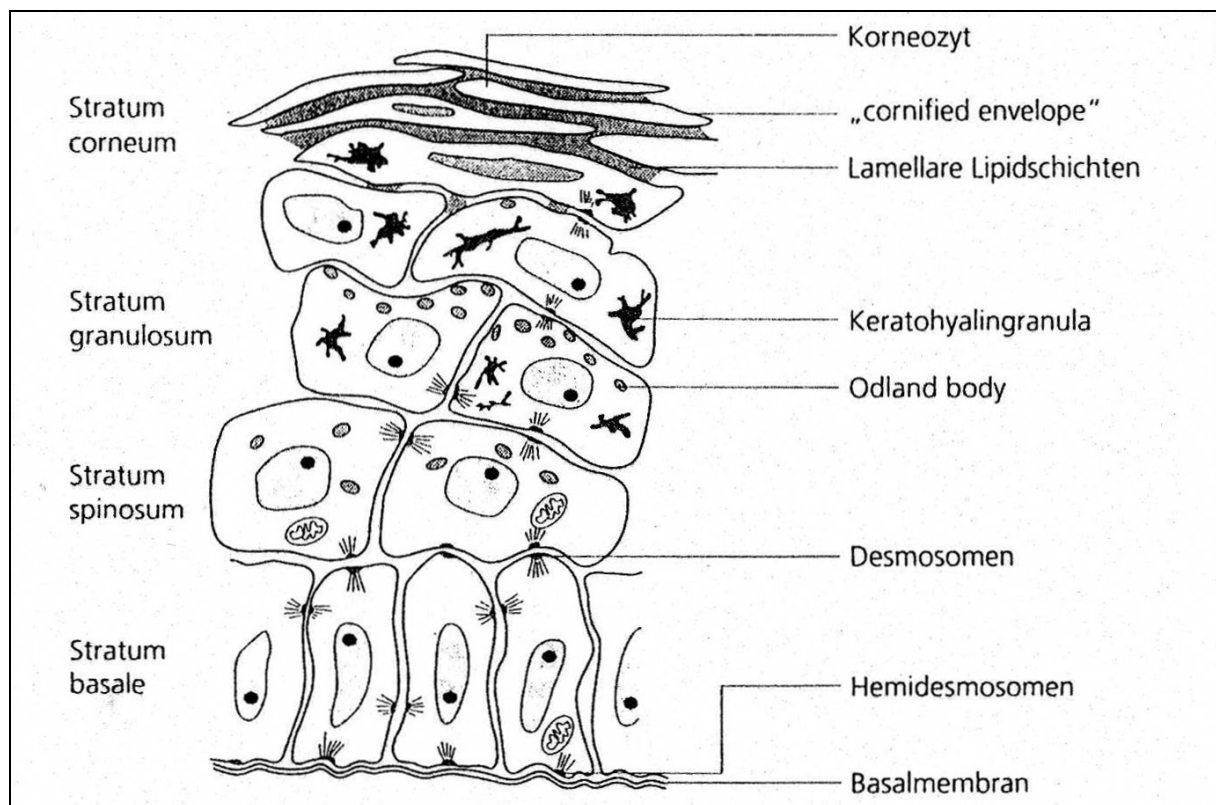


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Epidermis (modifiziert nach [71])

Mit einer Dicke von 30 µm bis 1,6 mm ist die Epidermis aus einem mehrschichtigen ziegelsteinartigen keratinisierendem Plattenepithel aufgebaut. Die eigentlichen Epidermiszellen sind die Keratinozyten, die durch komplex aufgebaute Proteinausstülpungen an den Zellmembranen, den sogenannten Desmosomen, zusammengehalten werden. Neben den verhornten Zellen sind Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen in der Epidermis vorzufinden.

Es findet mit der epidermalen Differenzierung in der gesamten Epidermis ein wichtiger Vorgang statt. Die betroffenen Zellen erfahren in morphologischer, histologischer, metabolischer und funktioneller Hinsicht eine drastische Veränderung.

Die zylindrischen Zellen des Stratum basale zeichnen sich durch eine hohe mitotische Aktivität aus, wodurch immer neue Zellen entstehen, die in obere Zellschichten verschoben werden. Daraus gehen die Stachelzellen hervor, die das Stratum spinosum bilden. Sie erfahren dabei eine deutliche Volumenvergrößerung und eine Abflachung während der Differenzierung. In den Stachelzellen werden Keratinosomen, die sogenannten Odland bodies (OB), sichtbar. Diese enthalten die hydrolytische Enzyme und Vorstufen der epidermalen Lipide [57,70,120,127,187].

Im Stratum granulosum beginnt die Verhornung (Keratinisierung) der Zellen, außerdem geben die OB ihren Inhalt in den Interzellularraum ab [45,119].

In der Glanzschicht, dem Stratum lucidum sind die Zellen bereits so stark abgeflacht, dass keine Zellgrenzen mehr erkennbar sind.

Das Stratum corneum stellt das Endprodukt der Zelldifferenzierung dar [48,51]. Aus den lebenden Keratinozyten sind mittlerweile kernlose, sehr große, abgeflachte, dehydrierte Korneozyten entstanden. Die sie verbindenden Desmosomen werden hier enzymatisch durch Proteasen abgebaut und es erfolgt die Desquamation, die Abschuppung der Korneozyten [23,68,83,121,168]. Die Proteasen benötigen einen pH-Wert von 4 - 5,5 für eine optimale Funktion. Dieser wird einerseits gewährleistet durch die Fettsäuren im Stratum corneum (SC), die sowohl endogen synthetisiert, als auch durch bakterielle Lipasen freigesetzt werden. Andererseits hilft eine Milchsäuresekretion aus ekkrinen Drüsen bei der pH-Einstellung der Haut. Ein saurer Oberflächen-pH-Wert von 4 - 5,5 ist allerdings nicht nur wichtig für die Enzymaktivität sondern hilft bei der Abwehr gegen pathogene Keime [67,123]. Eine Verschiebung des pH-Wertes in einen alkalischeren Bereich kann die Aktivität der Proteasen beeinflussen und somit in einer abnormalen Desquamation gipfeln [67,123].

Von der Zellneubildung bis zur Abschuppung vergeht eine Zeit von 28 - 30 Tagen. Somit präsentiert sich die Epidermis als dynamisches Gewebe, das fortlaufend durch Zellneubildung, Keratinisierung und Abschuppung erneuert wird [121,123].

2.2 Das Stratum corneum

Das SC weist je nach Körperregion eine Dicke von $0,3\text{--}1\text{ mm}$ auf. Sie ist als äußere Schicht der Haut die eigentliche Barriere gegen externe Noxen und wichtig für das Überleben eines Lebewesens [56,69,142]. Es lässt sich nochmals unterteilen in das äußere locker gepackte Stratum disjunctum und das innere, dichter geordnete Stratum compactum [142].

Vereinfacht lässt sich der Aufbau des SC mit dem Ziegelstein-Mörtel-Modell nach Elias beschreiben, wobei lange ($35 - 45 \mu\text{m}$), abgeflachte ($0,5 - 1,5 \mu\text{m}$ dick) kernlose, abgestorbene, dehydrierte Korneozyten die Ziegelsteine bilden, welche in eine hoch geordnete Lipidmatrix, den Mörtel, eingebettet sind [32,51]. Die Korneozyten sind im Innern mit Keratinfilamenten gefüllt und nach außen durch eine verhornte Hülle aus quervernetzten Proteinen, dem Cornified envelope, begrenzt [45,108]. An die äußere Schicht dieser Proteine sind ω -Hydroxyceramide kovalent gebunden und bilden somit den Cornified lipid envelope (CLE). Dadurch wird eine Verbindung zwischen den eher hydrophilen Korneozyten und der hydrophoben Lipidmatrix aufgebaut [84,108,200]. Die Lipide des CLE bilden eine Vorlage, welche die Orientierung des Lipidbilayers vorgibt [204], und können erst nach alkalischer Hydrolyse, d.h. der Aufspaltung der Esterbindung, aus dem SC extrahiert werden [176,200]. Sowohl das CLE als auch die interzelluläre Lipidmatrix, welche hauptsächlich aus Ceramiden (CER), freien Fettsäuren (FFA) und Cholesterol (Chol) besteht, tragen zur Barrierefunktion bei [7,44,126,149]. Die Lipide werden in den lamellaren Körperchen, den OB der Epidermis (Stratum spinosum, Stratum granulosum) synthetisiert, extrahiert und bereits dort zu komplexen bilamellaren Systemen geordnet [69,121,203]. Nach ihrer Exozytose aus den OB füllen die Lipide den gesamten Interzellularraum zwischen den Korneozyten aus. Wie elektronenmikroskopische Untersuchungen mittels Gefrierbruch zeigten, sind die Lipidlamellen parallel zur Korneozytenoberfläche angeordnet [19,24,48,54,56].

Für die Ausbildung der Bilayerstruktur ist hauptsächlich das ω -Acyl-Glycosylceramid verantwortlich, welches eine ausgestreckte Konformation bevorzugt und somit als Verbindung zwischen zwei aufeinanderliegenden Doppelschichten zu sehen ist. Experimente

zeigten, dass sich nach Zugabe von ω -Acyl-Glycosylceramid zu einer Mischung aus SC-Lipiden die zuvor gebildeten Liposomen aggregieren und sich abflachen [120,121].

Das SC erweist sich als aktives Gewebe, das biochemische und biosensorische Vorgänge anregt und somit in Interaktionen mit dem darunter liegenden Gewebe tritt, obwohl das SC ausschließlich kernlose, also biologisch tote Zellen enthält [80,90,184]. So löst eine Schädigung des SC eine Antwortkaskade in den darunter liegenden Geweben zur Wiederherstellung der Barrierefunktion aus [50,207].

2.3 Die Stratum corneum-Lipide

Die SC-Lipide werden unterschieden in die frei extrahierbaren und die kovalent gebundenen Lipide, die erst nach alkalischer Verseifung herausgelöst werden können. Die frei extrahierbaren Lipide sind bilamellar angeordnet und bestehen zu 50 - 60% aus CER, zu 18 - 25 % aus Chol und zu 10 - 22 % aus FFA [32,45,69,127,192,195,204], wobei sich jeweils die polaren und unpolaren Molekülteile innerhalb des Bilayers gegenüberstehen [46,103]. Die Lipidzusammensetzung im SC ist einzigartig und kann je nach Körperregion variieren [32,75,117,174,204]. Die Zusammensetzung und der Gehalt der Lipide können außerdem beeinflusst werden durch die Jahreszeiten, das Alter, das Geschlecht, die Rasse, die Ernährung, Krankheiten und Umwelteinflüsse auf die jeweilige Person und sie unterliegt einer interindividuellen Variabilität [32,36,38,39,72,84,107,148,161,209]. Es ist erwiesen, dass im Alter und im Winter der Gehalt an Lipiden im SC sinkt, wodurch eine trockene Haut verursacht wird. Das Verhältnis der Lipide zueinander bleibt dabei unverändert. Im Alter ist eine verringerte Biosyntheseaktivität die Ursache dafür. Im Winter wird auf Grund der niedrigen Temperatur eine verringerte Biosyntheseaktivität vermutet [161]. Allerdings folgt dieser Veränderung keine Änderung im TEWL, in der Hydratation und bei der Abschuppung der Haut [10,161].

Eine Besonderheit der Lipide im SC besteht unter anderem darin, dass mehr als ein Drittel eine Kettenlänge von über 22 Kohlenstoffatomen haben, die die Funktionen des SC immens beeinflusst [45]. In den lebenden Zellmembranen kommen hauptsächlich kürzere Lipide mit 15 - 18 Kohlenstoffatomen vor [69]. Der TEWL bei normaler Oberflächentemperatur der Haut wird verhindert durch ein close-packing der Lipide, welches unterstützt wird, durch die van der Waals-Kräfte zwischen den lipophilen Enden der Lipidketten im SC. Die Struktur der Lipide bewirkt, dass sich bei Kontakt mit Wasser eine Doppelmembran ausbildet, wobei der

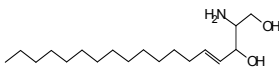
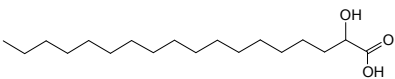
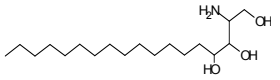
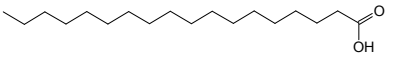
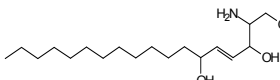
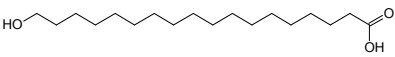
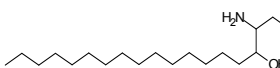
hydrophile „Kopfteil“ dem Wasser zugewandt und der lipophile „Schwanz“ dem Wasser abgewandt ist. Zu starke Bewegungen der Ketten werden durch die van der Waals-Kräfte verhindert. Diese sich ausbildende Bilayer-Struktur stellt einen äußerst guten Schutz gegenüber vielen vor allem schädigenden Substanzen dar. Gerade sehr polare oder sehr unpolare Stoffe müssen während der Penetration durch Regionen in denen sie sich nicht lösen [69].

Bereits kleinste Veränderungen in der Lipidzusammensetzung im SC haben einen drastischen Einfluß auf das Phasenverhalten des Lipidsystems und somit auf die Barrierefunktion [147]. So werden Hautkrankheiten wie atopische Dermatitis, Psoriasis und Ichtyose mit veränderten Lipidzusammensetzungen im SC in Zusammenhang gebracht [38,43,100,149,208].

2.3.1 Die Stratum corneum-Ceramide

Die mengenmäßig größten Vertreter der SC-Lipide sind die Ceramide, die zu der Klasse der Sphingolipide gehören. Bisher sind vier Sphingoidbasen bekannt, die amidartig an eine Fettsäure (FA) gebunden sein können: Sphingosin (S), Phytosphingosin (P), 6-Hydroxysphingosin (H) und Dihydrosphingosin (dS). Die Fettsäuren können α -hydroxyliert (A), nicht-hydroxyliert (N) oder ω -hydroxyliert (O) sein, wobei letztere wiederum mit einer Fettsäure, meist Linolsäure, verestert (E) sind (Tab. 1) [139,160].

Tab. 1: Strukturelemente der Ceramide

Basis	Chemische Struktur	Fettsäure	Chemische Struktur
Sphingosin (S)		α -hydroxyliert (A)	
Phytosphingosin (P)		nicht-hydroxyliert (N)	
6-Hydroxy-sphingosin (H)		ω -hydroxyliert (O)	
Dihydrosphingosin (dS)			

Die Kettenlänge der Sphingoidbasis kann hierbei zwischen 12 und 22 Kohlenstoffatomen variieren, die am häufigsten vorkommende Kettenlänge ist C18 [32,74,188,201]. Die Fettsäurekettenlänge variiert zwischen C16 und C40 [32,74,188,201,203]. Sowohl die Fettsäure als auch die Sphingoidbasis können dabei aus einer geraden oder ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen bestehen [88]. Aus der Kombination der vier Basen und der drei FA resultieren zwölf verschiedene, frei extrahierbare Ceramidklassen, wobei alle zwölf bereits für das humane SC nachgewiesen werden konnten (Abb. 3) [132,136,185].

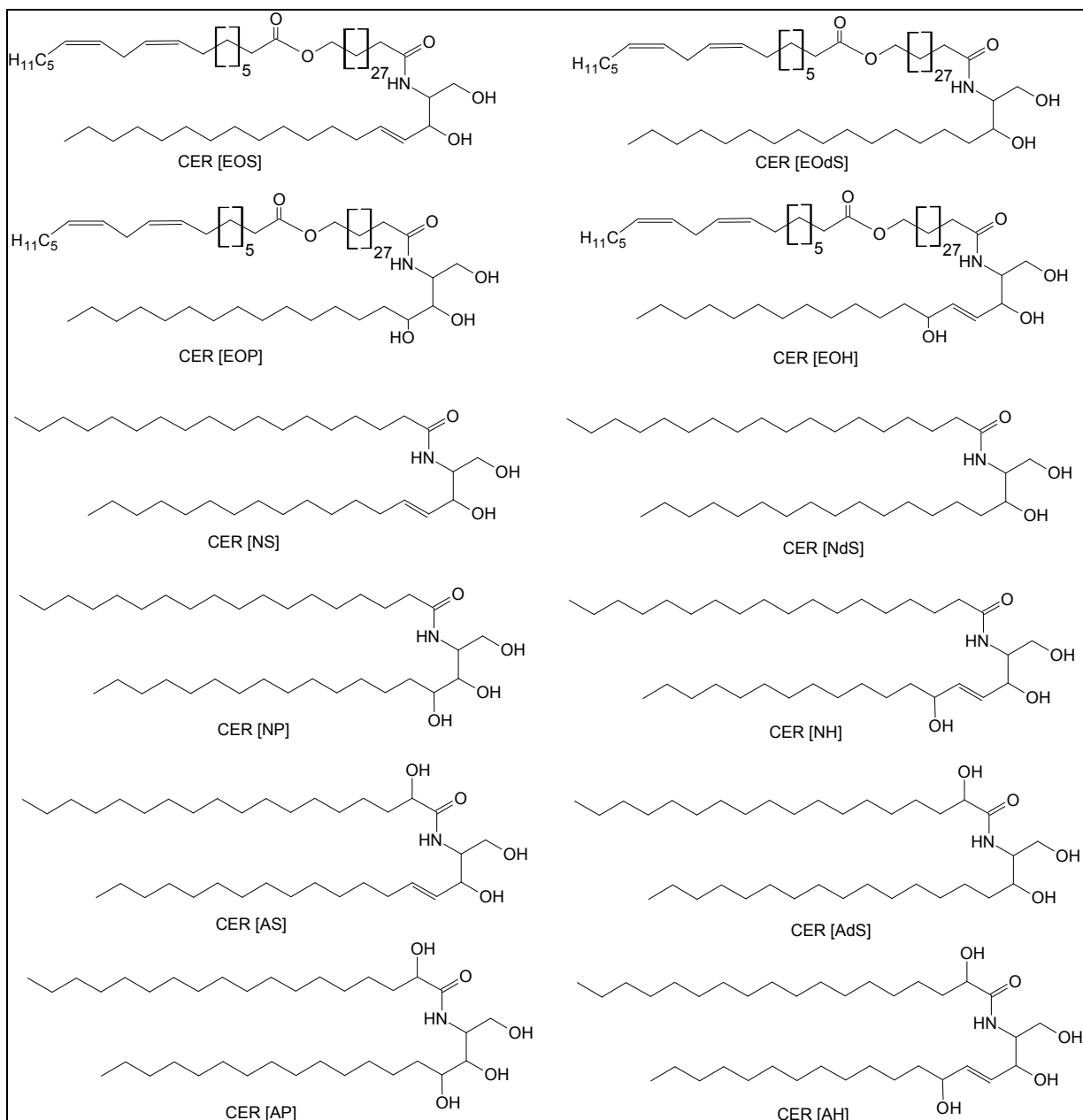


Abb. 3: Darstellung der derzeit bekannten CER-Klassen

Daneben existieren die Ceramide, die kovalent an die Proteinhülle des Cornified envelope der Keratonozyten gebunden sind. Nach dem CER[OH] wurden außerdem CER[OS] und CER[OP] entdeckt [87,176,202].

Das ursprünglich verwendete Nummerierungssystem für die Nomenklatur der CER wurde deren dünn-schichtchromatographischem Laufverhalten entnommen (CER (1-6)): je höher die Polarität des Ceramids, desto kürzer war die Laufstrecke auf der Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte und desto höher die Nummer [197]. Da aber immer mehr Ceramide entdeckt wurden, ließen sie sich nicht mehr ohne Probleme in das Konzept der Nummerierung einordnen. Somit wurde der oben beschriebene Buchstabencode eingeführt, der die strukturellen Elemente der Ceramide benennt [139,160].

Mit Hilfe der DC ist es gelungen 7 CER-Klassen zu trennen und zu identifizieren, CER[EOS], CER[NS], CER[NP], CER[EOH], CER[AS], CER[AP] und CER[AH] [160]. 1999 fanden Stewart et al. heraus, dass die Fraktionen von CER[AS] und CER[NH] auf der DC überlappen. Diese ließen sich erst nach einer Acetylierung trennen, wobei sich herausstellte, dass CER[NH] den größeren Anteil einnimmt [173]. Vietzke et al. entdeckten 2001 CER[NdS] [188], was später von Farwanah et al. [61] und von Ponec et al. bestätigt wurde, wobei Ponec et al. zusätzlich das CER[EOP] nachwies [151]. Masukawa et al. beschrieben 2008 das CER[AdS] im SC [132], nachdem sie es 2006 bereits im menschlichen Haar gefunden hatten [133]. Zuletzt konnte 2011 das CER[EODs] im humanen SC nachgewiesen werden [185].

Die prozentuale Zusammensetzung der SC-Ceramidklassen ist in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung der SC-Ceramidklassen [25]

Bezeichnung des Ceramids	Massenanteil [%]
CER[EOS]	6,5
CER[EODS]	0,4
CER[EOP]	1,1
CER[EOH]	4,3
CER[NS]	7,4
CER[NdS]	9,8
CER[NP]	22,1
CER[NH]	14,5
CER[AS]	9,6
CER[AdS]	1,6
CER[AP]	8,8
CER[AH]	10,8
CER[OS]	0,7
CER[OP]	0,2
CER[OH]	0,4

2.3.1.1 Synthese der Ceramide

Die Ceramidneubildung findet in den Keratinocyten des Stratum granulosum statt. Diese gelangen dann mit Hilfe der OB zum SC und werden dort über Exocytose freigegeben [45,105,106,119]. Die Grundbestandteile der Basis werden aus Palmitoyl-CoA und Serin durch die Serin-Palmitoyl-CoA-Transferase gebildet, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt [6,32]. Über verschiedene Zwischenstufen entsteht somit ein Sphingamin, welches im nachfolgenden Schritt durch die Ceramidsynthasen (CERS) mit einer FFA n-acetyliert wird [6,32,80,106]. Die CERS sind in 6 Gruppen unterteilbar und zeigen eine deutliche Spezifität in Bezug auf Länge und den Sättigungsgrad der zu bindenden Fettsäure. So zeigt die CERS 1 eine Präferenz gegenüber C18-FA, CERS 5 und CERS 6 bevorzugen C16-FA und CERS 2 und CERS 3 binden die längerkettigen FA an die Sphinganine [6,135,136]. Nach der Synthese der CER werden diese sofort umgewandelt in Glycosylceramide und Sphingomyeline, um so als Vorstufe in den OB „gelagert“ zu werden [63,105,136]. Die OB, welche reine Sekretionsorganellen darstellen, sind eiförmig, von einem Membran-Bilayer umgeben und enthalten neben den Lipidvorstufen die für die Aufspaltung wichtigen Enzyme. Für die Aufspaltung der CER-Vorstufen sind die β -Glycosyl-Cerebrosidase und die

Sphingomyelinase wichtig, des Weiteren sind Phospholipasen enthalten, die die Phospholipide in FFA und Glycerol aufspalten [63,80,105,136,184]. Für eine optimale Funktion benötigen diese Enzyme einen pH-Wert von 5 [63]. Die OB verbinden sich mit der Zellmembran am Übergang zwischen dem Stratum granulosum und dem SC, um die Lipide freizugeben [32]. Nachdem die Lipide ausgeschüttet wurden, breiten sie sich zwischen den Korneozyten aus und koaleszieren, bis sie schließlich den gesamten Interzellularraum ausfüllen [26]. Wird die Barriere der Haut, also das SC verletzt, kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung und Synthese der OB, um die Barriere wieder zu schließen. Der Grund hierfür ist ein Calcium-Gradient in der Epidermis. Nach der Verletzung des SC kommt es zu einem erhöhten TEWL, wodurch die Calciumionenkonzentration in Stratum granulosum steigt. Diese Konzentrationsänderung gibt das Signal zur Steigerung der Lipidsynthese und zur Ausschüttung des Inhalts der OB [25,63], wobei eine zeitlich sehr begrenzte Reaktion stattfindet [32,50,84]. Diese Reparaturmechanismen sind abhängig von verschiedenen Faktoren, wie Alter und Stress [40,72].

Das Fehlen der β -Glycosyl-Cerebrosidase und Sphingomyelinase führt zu einer gestörten Barriere. In Folge davon steigt der TEWL, da sowohl die proteingebundenen als auch die freien CER fehlen, die für die Ausbildung einer ausreichenden Barriere wichtig sind [105]. Das führt wiederum zu Hautkrankheiten mit veränderter Barrierefunktion, wie Psoriasis, atopische Dermatitis und Altershaut [22,25,91,126,136].

2.3.1.2 Bedeutung der Ceramide

Die wichtigste Aufgabe der CER liegt in der epidermalen Barrierefunktion gegenüber exogenen Noxen [49,102,195]. Sie bilden gemeinsam mit Chol und den FFA Bilayer aus und tragen somit zur Hydratation des SC und zum Schutz gegen TEWL bei [32,56,196,199].

Die Kohlenstoffketten der CER sind unverzweigt, lang, hydrophob und vorwiegend gesättigt. In den hydrophoben Regionen der Bilayer liegen die CER in orthorhombischer oder hexagonaler Packung vor, wodurch sich die Wasserdurchlässigkeit verringert [21,53,69].

Bisher hat kaum eine der CER-Klassen eine spezifische Funktion zugewiesen bekommen. Die Strukturen der ω -hydroxylierten CER (CER[EOH], CER[EOP], CER[EOS]) kommen nur im SC vor. Diese, vor allem das CER[EOS], haben hierbei eine wichtige Funktion in der Organisation der Lipiddoppelschicht [16,20,136], da es bei einem Mangel an essentiellen Fettsäuren zu einem Einbau von Ölsäure anstatt der Linolsäure im Molekül kommt, was eine veränderte

Fluidität, wie einen gesteigerten TEWL und ein gestörtes epidermalen Gleichgewicht nach sich zieht [36,202]. Im Winter kommt es ebenfalls zu einem erhöhten Einbau von Ölsäure anstatt Linolsäure, wodurch die so genannte Winterxerose verursacht wird [36]. Linolsäure nimmt in gesundem SC einen Anteil von 72 % der veresterten FA im CER[EOS] ein [88]. Obwohl die Ceramide eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Bilayer einnehmen, sind sie allein nicht in der Lage sich in dieser Form anzuordnen [32]. Die Heterogenität der CER-Klassen und der FFA ist wiederum wichtig für die Struktur und Fluidität des „Mörtels“ bei normaler Körpertemperatur, um eine aktive Barriere aufrecht zu erhalten [147].

2.3.2 Die freien Fettsäuren des Stratum corneum

Neben Cholesterolsulfat gehören die freien Fettsäuren zu den Lipiden im SC, die ionisch vorliegen können und notwendig sind zur Ausbildung einer Lipiddoppelschicht [106,193,204]. Sie sind unter anderem verantwortlich für den leicht sauren pH-Wert von 4 - 5,5 auf der Hautoberfläche und beeinflussen das Phasenverhalten der anderen Lipide [67,106]. Die neutralen Lipide hingegen sind einerseits wichtig für die Ausbildung der Barriere, andererseits für die ablaufende Desquamation aufgrund ihrer Beeinflussung der temperaturbedingten Phasenänderung. Diese Phasenänderung verringert sich mit steigender Sättigung und steigender Kettenlänge der FFA [51,144].

Im SC sind FFA verschiedener Kettenlängen (C14 - C28) vorzufinden, wobei die Anzahl an Kohlenstoffatomen gerade und ungerade sein kann und die Fettsäuren gesättigt und einfach oder mehrfach ungesättigt vorkommen [26,32,143,144,202,204]. In Studien wurde herausgefunden, dass ca. 40 - 50 % der FFA unverzweigt und gesättigt sind und ebenfalls ca. 40 - 50 % unverzweigt und ein- oder mehrfach ungesättigt sind. Der Rest der FFA hat eine Verzweigung innerhalb der Kohlenstoffkette, die wiederum gesättigt oder ungesättigt sein kann. Etwa 10% der gesamten FFA haben dabei eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen [117,143]. Die häufigsten gesättigten FFA sind hierbei C18, C22 und C24, unter den ungesättigten FFA kommt die Linolsäure (C18:2) am häufigsten vor [15,26,32,143,144,147,180,202,204]. Prinzipiell sind in den Lipiden des SC im Gegensatz zu den Membranen in anderen Körperregionen ungewöhnlich lange Kohlenstoffketten zu finden [45,63].

Die Fettsäuresynthese findet zu großen Teilen in der Epidermis statt [63,86]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist hierbei die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu

Malonoyl-CoA, katalysiert durch das Enzym Acetyl-CoA-Carboxylase. Aus Acetyl-CoA, welches als Startermolekül dient, und Malonoyl-CoA werden wiederum durch den Fettsäuresynthasekomplex Fettsäuren hergestellt [85,106,194]. Bei Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen kommt Propionyl-CoA anstatt Acetyl-CoA zum Einsatz [25,143,147]. Nach Verletzung des SC und somit der Barriere werden die entsprechenden Enzyme aktiviert, was eine erhöhte Synthese der FFA nach sich zieht [63,85,106,194].

Die gebildeten FFA werden in Phospholipide umgewandelt und zusammen mit den anderen Lipiden bzw. deren Vorstufen in den OB gespeichert. Nach der Exozytose werden die Phospholipide durch Phospholipasen wieder in FFA und Glycerol aufgespalten [63,86].

Wie bereits erwähnt, sind neben den gesättigten FFA auch ungesättigte, also essentielle FFA im SC vertreten. Da diese vom Körper nicht selbst synthetisiert werden können, müssen sie aus der Nahrung stammen, wobei unbekannt ist, wie sie vorrangig als Phospholipide in das SC gelangen [63,67]. Diese essentiellen FFA bzw. das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten FFA haben einen großen Einfluß auf die Bilayerstruktur und somit auf die Barrierefunktion des SC und den TEWL [26,178]. Vor allem Linolsäure (C18:2) spielt hierbei eine große Rolle. Wenn diese ersetzt wird durch Ölsäure oder Arachidonsäure, welche eine Vorstufe der Prostaglandine (PG) darstellt, steigt der TEWL an. Durch topische Applikation von Linolsäure kann dieser Vorgang korrigiert werden [26,52].

Der Einfluß der FFA auf den sauren pH-Wert der Haut, also der Ausbildung eines Säuremantels, ist neben der Bilayerausbildung deren Hauptfunktion. Dieser Säuremantel, der neben den FFA zusätzlich durch Milchsäure aus ekkrinen Drüsen verursacht ist, beeinflusst nicht nur die Enzymaktivität, sondern hat daneben die Aufgabe pathogene Keime abzutöten. Durch eine Inhibition der Phospholipasen und Ceramidasen, wodurch weniger FFA freigesetzt werden, wird der pH-Wert der Haut heraufgesetzt und dadurch die Barriere und die Integrität des SC gestört [67,96,123]. Des Weiteren erhöht der größere Anteil an FFA in den äußeren Schichten des SC die Fluidität des Bilayers [15].

2.4 Hautmodelle

Verschiedene Modelle versuchen den Aufbau des SC und die damit verbundenen Permeabilitätseigenschaften zu beschreiben.

Das klassische Modell stellt hierbei das Backstein-Mörtel-Modell nach Elias [51,114] dar (Abb. 4). Die „Backsteine“ sind die kernlosen Korneozyten, die mit Keratin angereichert sind und den „Mörtel“ stellt die extrazelluläre, bilamellar angeordnete Lipidmatrix dar [106]. Die Keratinfilamente der „Backsteine“ sind hierbei verbunden über Desmosomen [29], wodurch eine festere Struktur entsteht. Die Penetration von Molekülen findet weitestgehend durch den „Mörtel“ statt.

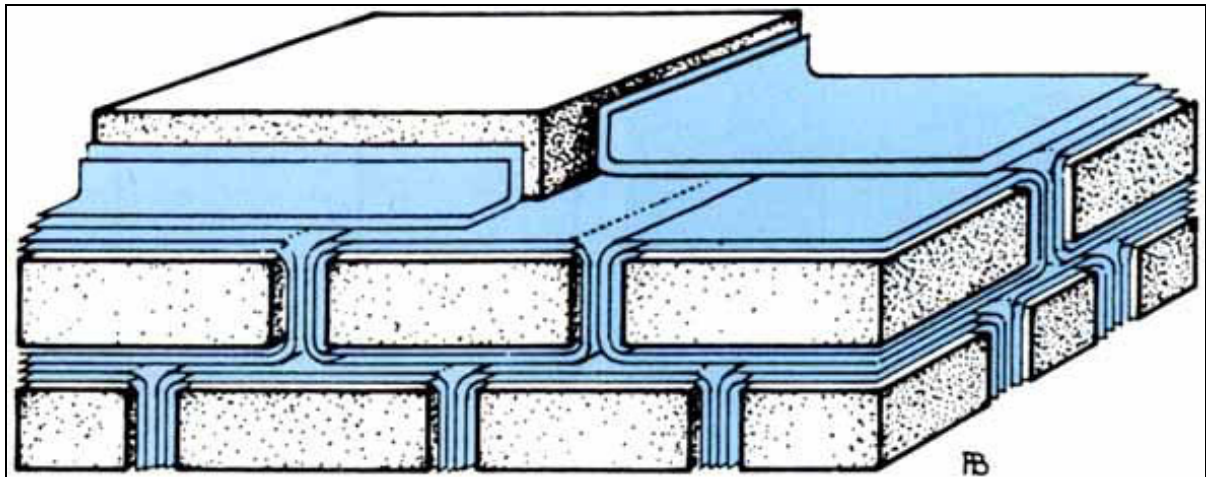


Abb. 4: Backstein-Mörtel-Modell nach Landmann [121]

Swartzendruber et al. haben 1989 das Stacked Monolayer Model postuliert [114,175]. Darin beschrieben sie, dass die interzellulären Lipide bilamellar angeordnet sind, sowie dass die Alkylketten der CER sich überlappen und Cholesterolemoleküle innerhalb der Schichten angeordnet sind. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die interzellulären Lipide nicht ausschließlich in Bilayern angeordnet sind, sondern auch hexagonal und orthorhombisch bzw. als flüssige Kristalle vorliegen [106]. In den Bilayern und den Flüssigkristallen sind die Lipide innerhalb der Schicht frei beweglich [69].

Eine Weiterentwicklung daraus ist das Domänen-Mosaik-Modell nach Forslind [69,114]. Die Lipidmatrix ist danach mosaikartig aufgebaut aus kristallin vorliegenden Lipiden, deren Zwischenräume mit flüssigen Lipiden ausgefüllt sind. Die kristallinen Regionen werden hierbei beherrscht durch länger-kettige Lipide und den van der Waals-Kräften zwischen den Ketten. In den Zwischenräumen befinden sich kurzkettige bzw. mehrfach ungesättigte Lipide, die bei normaler Hauttemperatur flüssig vorliegen. An der Grenze zwischen diesen Gebieten, den so genannten Grain borders, liegen die Lipide im flüssigkristallinen Zustand vor. Dadurch ergibt sich ein permeables System, das in den flüssigkristallinen Bereichen

Diffusionsvorgänge zulässt. Der Stofftransport erfolgt bei dieser Modellvorstellung durch kleine Kanäle, die sich im System zwischen den einzelnen Mosaikteilen ausbilden [69].

Bouwstra et al. entwickelten 2000 das Sandwich-Modell, in dem die Lipide in hochgeordneten Bilayern mit einem Abstand von 13 nm angeordnet sind [18,106,114]. In der Theorie ergibt sich eine trilamellare Struktur, in der kristalline und flüssige Bereiche in den einzelnen Schichten getrennt voneinander vorliegen [18]. Eine fluide Phase von 3 nm, die aus den ungesättigten Seitenketten des CER[EOS] und aus Cholesterol besteht, wird umgeben von geordneten Lipidstrukturen, die aus den gesättigten Lipidmolekülteilen bestehen. Daraus ergibt sich ein Breit-Schmal-Breit-Wiederholabstand von 13 nm in der Struktur, wobei die Linolsäure des CER[EOS] in die schmale Region hineinragt und somit das CER[EOS] die breite und die schmale Region miteinander verbindet [20,114,146]. Eine Stoffpermeation soll hierbei hauptsächlich durch den fluiden Teil erfolgen [18,51,69].

2001 wurde das Domänen-Mosaik-Modell durch Norlen et al. weiterentwickelt und es entstand das so genannte single gel phase model, in dem die Lipide als zusammenhängende lamellare Gelphase aufgebaut sind [106,114,145,146]. Es findet keine Phasenseparation statt und somit sind keine flüssigkristallinen, orthorhombischen oder hexagonalen Bereiche zu finden. Aufgrund der hierbei postulierten dichten Packung der Lipide sind diese kaum beweglich und die Lipidschicht ist nur wenig permeabel für Wasser, wobei zwischen den Lamellen nur wenig Wasser vorzufinden ist [146].

Schröter, Engelbrecht und Kiselev haben mit Hilfe von Neutronenstreuung an definiert zusammengesetzten Modellmembranen das Armature reinforcement model entwickelt. Sie haben herausgefunden, dass die CER teilweise in Haarnadelstruktur als auch in voll gestreckter Form vorliegen, wobei sich jeweils die lipophilen bzw. hydrophilen Molekülteile gegenüberliegen. Die lange Alkylkette des CER[EOS] penetriert dabei das nächste Bilayer. Die FFA ordnen sich hierbei zwischen den Fettsäureketten der CER ein und es bilden sich van der Waals-Bindungen aus. Chol wird zwischen den Sphingoidbasen der CER eingelagert. Beide Moleküle beeinflussen dabei die Dicke des Bilayers nicht [55,116,163,167].

Andere Strukturen konnten durch Untersuchungen von Iwai et al. mittels CEMOVIS (cryo-electron microscopy of vitreous sections) ermittelt werden. Daraus wurde das Asymmetry-model postuliert [103]. Hierbei liegen die CER in voll gestreckter Form vor, wobei sich die FFA zwischen die langen Ketten und Chol zwischen die kurzen Ketten der CER einreihen.

Zwar kann keines der Modelle alle Eigenschaften des SC zu 100 % erklären, jedoch versucht jede Modellvorstellung die Stabilität der Lipidmatrix und gleichzeitige Fluidität der Lipide zu erklären und mit den Permeabilitätseigenschaften des SC in Einklang zu bringen. Die Zusammensetzung der Lipide, speziell der Ceramide, spielt eine wichtige Rolle für die Phasenausbildung. Insbesondere CER[EOS], und dabei vor allem das CER[EOS]-Linolat, spielen eine wichtige Rolle [106,166], da eine Bindung von Ölsäure an das CER[EOS] mit verminderten Barriereigenschaften einher geht, was sich in einem erhöhten TEWL zeigt, der über das SC geregelt wird [17,120,159]. Neben der gesonderten Stellung des CER[EOS] macht vor allem die hochgeordnete Organisation der Lipide die geringe Durchlässigkeit des SC aus [56].

2.5 Gewinnung der Stratum corneum Lipide

Es stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, um die Lipide des SC zu gewinnen: Biopsien [38,151,192], in vivo Oberflächenextraktion [1,14,58,122,147,189], Tape stripping mit nachfolgender Extraktion der Tapes oder mit anschließender in vivo-Oberflächenextraktion [14,15,36,101,192], Cyanoacrylatabrisse [11,43,101,182,189], Rinsing [201,208] und Scraping [147]. Vor der Lipidanalytik sollte man sich genaue Gedanken über die Probengewinnung machen, denn sowohl die Wahl der Methode zur Lipidgewinnung als auch das dabei verwendete Lösungsmittel können das Studienergebnis deutlich beeinflussen [38,122,138,147,155].

Die Biopsie ist eine stark invasive Methode, bei der den Probanden kleine Epidermisstücke entnommen werden. Das Stratum corneum wird anschließend in einem enzymatischen Verdau mit Trypsin separiert und die Lipide mit einem geeigneten Lösungsmittel, meist einer Mischung aus Chloroform und Methanol ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$), extrahiert [13]. Diese Lösungsmittelmischung besitzt eine gute Kombination aus Hydrophilie und Lipophilie, um so viele SC-Lipide wie möglich zu extrahieren. Nachteile dieser Methode sind einerseits der große Zeitaufwand und andererseits handelt es sich bei den Biopsien für die Lipidanalytik um Hautreste chirurgischer Operationen, wodurch man auf die dabei anfallenden Hautstellen beschränkt ist. Dies ist nachteilig, da die Lipidzusammensetzung an unterschiedlichen Hautarealen variiert [38].

Wenn das SC mit Hilfe von Klebestreifen definierter Größe oder D-Squames[®] entfernt wird, dann spricht man vom Tape stripping. Die Klebestreifen werden mit einem definierten Druck

auf die entsprechenden Hautstellen gepresst und nach einer bestimmten Zeit wieder abgezogen. Dieser Vorgang kann mit weiteren Klebestreifen so oft wiederholt werden, bis das gesamte SC an der Stelle entfernt wurde, wodurch Tiefenprofile erstellt werden können. Allerdings sind nicht alle Klebestreifentypen geeignet, da oft neben den Lipiden auch die Klebstoffe durch die für die Extraktion verwendeten Lösungsmittel herausgelöst werden. Diese Klebstoffe können die weitere Analytik erheblich behindern [15,122,155,192].

Für die Cyanoacrylatabrisse wird ein Tropfen Cyanoacrylat (auch bekannt als Sekundenkleber) auf einen Glasobjektträger gegeben und dieser auf die gewünschte Hautstelle gedrückt. Bereits nach kurzer Zeit härtet der Kleber aus und der Objektträger wird von der Haut abgerissen. Hier werden anschließend die Lipide mit einer geeigneten Lösungsmittelmischung, meist n-Hexan/Ethanol 95:5 (V/V), herausgelöst. Bei dieser Methode werden unerwünschterweise Talgdrüsen mit herausgerissen, wodurch Sebumlipide die Probenlösung verunreinigen. Außerdem werden wie bei der Tape stripping-Methode während der Lipidextraktion Klebstoffbestandteile mit herausgelöst, welche sich auf die weitere Analytik störend auswirken [155].

Die in vivo-Oberflächenextraktion ist eine gute Methode, um störende Klebstoffanteile in der Probenlösung auszuschließen und eine einheitliche Körperstelle für die Lipidbestimmung zu haben. Eine Mischung aus CHCl_3 /MeOH eignet sich hierfür nicht, da topisch aufgebracht CHCl_3 eine Hautnekrose verursacht [122,155]. Daher musste nach einem anderen Lösungsmittel gesucht werden [1]. Bonte et al. nutzten eine Mischung aus n-Hexan/MeOH, allerdings verursacht Methanol Hautirritationen [14,15]. Farwanah et al. fanden heraus, dass sich eine Mischung aus n-Hexan und einem längerkettigen Alkohol am besten eignet und haben eine Methode zur in vivo-Oberflächenextraktion entwickelt [58]. Hierfür wird ein zylindrischer Glaskörper (ID: 4cm, Extraktionsfläche $12,56 \text{ cm}^2$) mit 10 ml der Extraktionsflüssigkeit, meist n-Hexan/Ethanol 2:1 (V/V), gefüllt und mit einem Spanngurt an der zu extrahierenden Hautstelle angebracht (Abb. 5). Der Arm wird anschließend umgedreht, so dass die Hautoberfläche mit dem Lösungsmittel in Berührung kommt. Während der Extraktionszeit von 5 min wird das Lösungsmittel durch kreisende Bewegungen des Unterarms durchmischt. Diese nichtinvasive Methode zeichnet sich vor allen Dingen durch die Abwesenheit störender Substanzen für die weiterführende Analytik aus.



Abb. 5: Extraktionsgerät für die in vivo-Oberflächenextraktion [57]

Die Lipidgewinnung erfolgt meist an der Innenseite der Unterarme, da diese Stelle leicht zugänglich ist und wenige Talgdrüsen enthält. Außerdem sind an der Innenseite der Arme nur wenige Haare vorhanden, die vor jeglicher Probengewinnung erst entfernt werden müssten.

Im Anschluß an die Lipidextraktion wurden die Lösungen evaporisiert, in einem definierten Volumen redispergiert und bis zur weiteren Analytik bei -80°C gelagert.

2.6 Die Schizophrenie und ihr Bezug zur Lipidzusammensetzung der Haut

2.6.1 Die Schizophrenie

Schizophrenie bezeichnet eine Erkrankung aus dem Kreis endogener Psychosen, die mit vielschichtigen Persönlichkeitsveränderungen einhergeht. Die Art und Stärke der Symptome der Schizophrenie können intra- und interindividuell sehr stark variieren. Man unterscheidet hierbei die Grundsymptome und die akzessorischen Symptome. Zu den Grundsymptomen, auch Negativsymptome genannt, gehören Störungen des Denkens und der Sprache, der Erregbarkeit und des „Ich-Erlebens“. Die akzessorischen Symptome, auch Positivsymptome

genannt, äußern sich in akustischen und optischen Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Antriebsstörungen und sozialem Rückzug [3,4,12].

Die Wahrscheinlichkeit an Schizophrenie zu erkranken ist unabhängig von der Rasse, der Kultur und soziokulturellen Einflüssen [137]. Eine genetische Disposition ist deshalb nicht auszuschließen. Diese Annahme konnte mit Hilfe von Familien- und Zwillingsstudien gestärkt werden [78]. So liegt das Risiko an Schizophrenie zu erkranken in der Allgemeinbevölkerung bei 1%, ist ein Verwandter zweiten Grades erkrankt, steigt das Risiko auf 5%, bei Verwandten ersten Grades auf ca. 10%. Als Kind eines erkrankten Elternteils liegt das Risiko einer Erkrankung bei 12-14%, bei zwei erkrankten Elternteilen bei ca. 40% [137]. Allerdings konnte bis heute noch kein „Schizophreniegen“ charakterisiert werden. Es liegt vielmehr eine hohe genetische Komplexität vor, wodurch die Diskussion aufgeworfen wurde, dass die Diagnose „Schizophrenie“ für verschiedene Krankheiten gilt, die sich zwar in den gleichen Symptomen äußern, aber in unterschiedlichen Gendefekten gründen [128].

Die Krankheit kann in jedem Lebensalter ausbrechen. 60% der Erkrankungen treten zwischen der Pubertät und dem 30. Lebensjahr auf, wobei für Frauen und Männer das selbe Risiko besteht [181]. Frauen erkranken jedoch bis zu 5 Jahre später als Männer, deren Erstmanifestation zwischen dem 20. und 25. Lebensjahr liegt. Des Weiteren bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede im Krankheitsverlauf und im Ansprechen auf Neuroleptika. Die weiblichen Patienten sind hierbei im Vorteil, wahrscheinlich aufgrund eines protektiven Einflusses weiblicher Geschlechtshormone wie Östrogen [79,141].

Eine genetische Disposition ist nicht ausreichend, um an Schizophrenie zu erkranken [137]. Es werden daneben weitere Stressauslöser benötigt, wie z.B. die Bewältigung anspruchsvoller Aufgaben oder intensive emotionale Beziehungen, welche die betroffenen Personen schlecht bewältigen können. Je nach genetischer Disposition und Stärke der Stressoren kann es zu Störungen mentaler Funktionen und somit zum Auftreten von Krankheitssymptomen kommen [77,95].

Ist man an Schizophrenie erkrankt, sind Gehirnfunktionen, das Denken und die Informationsverarbeitung beeinträchtigt sowie das Verhalten verändert. Es wurden nicht nur abnormale Gehirnstrukturen festgestellt, wie eine Verringerung des Gesamthirnvolumens und eine Vergrößerung des Liquorraums, sondern auch Veränderungen im Neurotransmittersystem [95]. So kommen nur selten entzündliche Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, unter den Schizophrenieerkrankten vor. Genauso entwickeln sie

seltener Fieber und haben eine gewisse Schmerzresistenz, einige Patienten empfinden gar keine Schmerzen [9,95]. All dies deutet auf eine abnormal verringerte Prostaglandinsynthese der Schizophrenieerkrankten hin, da sowohl bei Schmerzen als auch bei Rheuma bei gesunden Probanden die PG-Synthese erhöht ist [92].

2.6.2 Die Membran-Phospholipid-Hypothese

David Horrobin stellte 1994 die „Membran-Phospholipid-Hypothese“ auf, in der es heißt, dass Phospholipide für strukturelle und funktionelle Intaktheit membrangebundener Abläufe im zentralen Nervensystem (ZNS) von fundamentaler Bedeutung sind. Der regelrechten Funktion aller Transmitter- und Rezeptorsysteme geht ein intakter Auf- und Abbau von Membranphospholipiden voraus, [94,95]. Phospholipide bestehen zu 30 - 60% aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Bei Schizophrenieerkrankten sind die Membranen und speziell der Aufbau der Phospholipide verändert und diese modifizierten Strukturen ziehen sich durch den gesamten Körper [95].

Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) werden hauptsächlich über die Nahrung aufgenommen und sind wichtig für die neuronale und kognitive Entwicklung [165] sowie wichtige Bestandteile des Gehirns und der Regulation von Nervenfunktionen [9,92-94,152]. Die PUFA, frei vorliegend oder gebunden in Phospholipiden, sind darüber hinaus wichtige Bestandteile von neuronalen Membranen und beeinflussen deren Fluidität und die Funktion der membrangebundenen Proteine [9,92-95]. Arachidonsäure (AA) ist neben Docosahexansäure und Eicosapentaensäure ihr wichtigster Vertreter aus der Reihe der Omega-6-FA. Außerdem ist AA ein Precursor von Entzündungsmediatoren, wie Prostaglandinen, Prostacyclinen, Thromboxanen, Leukotrienen und somit direkt eingebunden in die Regulation nervaler Funktionen, sowie von Entzündungs- und Schmerzvorgängen [9,190].

Neuropathologische Studien an Schizophreniepatienten zeigten außerdem Veränderungen in der Myelinisierung der Oligodendrozyten, die genauer zurückzuführen waren auf spezielle Sphingolipide [172]. Des Weiteren wurden mittels bildgebender Verfahren Veränderungen der weißen Materie im Gehirn entdeckt, die Folge von dysregulierten Membranauf- und abbauvorgängen sein können [171,206]. Da das ZNS, die Hirnhaut und die menschliche Haut während der embryonalen Entwicklung aus dem gleichen Keimblatt, dem Ektoderm,

entstehen, wird davon ausgegangen, dass auch im Lipidsystem der Haut entsprechende Modifikationen zu finden sind [172,181].

Als möglicher Nachweis für diese modifizierte Membranlipidstruktur wurde der Niacin-Hauttest herangezogen, welcher als indirekter Nachweis für Schizophrenie dienen kann. Im Fall einer oralen oder dermalen Applikation von Niacin (= Vitamin B3) an einem gesunden Probanden werden die Niacinrezeptoren gereizt und es kommt zur Freisetzung von AA aus den Phospholipiden, gesteuert durch die Phospholipase A2 (PLA2). Nachfolgend kommt es zu einer Umwandlung der freien AA in PGD2 (Prostaglandin D2) über die Cyclooxygenasen 1 und 2. PGD2, welches aus den Hautmakrophagen freigesetzt wird, führt zu einem Anstieg von cAMP in den glatten Gefäßmuskelzellen, gefolgt von einer Vasodilatation, welche wiederum in der Haut eine Rötung, einen so genannten Flush, hervorruft [8,95,134,179]. In Abb. 6 ist die Synthese von PGD2 und anderen Entzündungsmediatoren dargestellt.

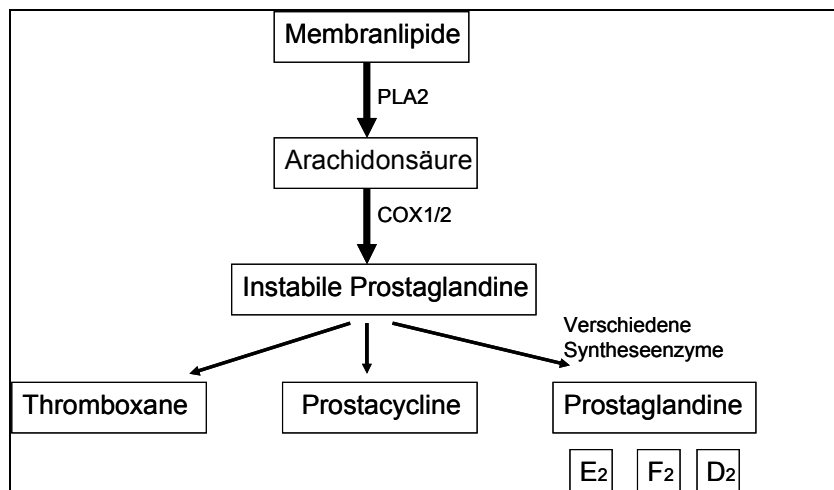


Abb. 6: Schematische Darstellung der Synthese von Entzündungsmediatoren

Da es bei Schizophreniepatienten zu einem verringerten Flush kommt [73,134], können durch den Niacin-Hauttest indirekt Rückschlüsse auf Phospholipidveränderungen und einen dadurch verringerten Gehalt an PUFA in der Haut Schizophrenieerkrankter gezogen werden [170,191]. Durch die Gabe von essentiellen Fettsäuren über 28 Wochen konnte bewiesen werden, dass diese Hautreaktion wirklich auf fehlende PUFAs bei den Schizophrenieerkrankten zurückzuführen ist. Dadurch konnte bei den Probanden bei einem erneutem Niacin-Haut-Test ein verstärkter Flush hervorgerufen werden [73].

Der Niacin-Haut-Test ist allerdings nicht spezifisch für schizophrene Erkrankungen, auch Patienten mit anderen psychischen Symptomen, wie bipolaren Störungen und Depressionen,

zeigen einen verminderten Flush [169,170,191]. Allerdings ist die Stärke der Reaktion hier umgekehrt proportional zu der Schwere der Symptome, wodurch dieser Test nur für eine kleine Gruppe von Patienten geeignet ist [169].

Im Blut von Schizophreniepatienten und im Gehirn von toten Schizophreniepatienten konnte bereits ein verringerter Anteil an AA nachgewiesen werden, allerdings macht die Art der Erkrankung aufgrund der vorher beschriebenen Symptome, wie Wahnvorstellungen, eine Blutabnahme sehr schwierig [9,73]. Daher wurde nach einer nichtinvasiven Methode gesucht, um die Veränderungen in der Lipidzusammensetzung nachzuweisen.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Chromatographische Methoden

Die Chromatographie fasst eine Reihe von Methoden zusammen, bei denen gelöste Stoffe analytisch oder präparativ getrennt werden können. Allen Verfahren ist gleich, dass das Substanzgemisch mit Hilfe einer mobilen Phase, die ein Gas oder eine Flüssigkeit sein kann, über eine stationäre Phase transportiert und dabei aufgetrennt wird. Der Auftrennung liegen unterschiedliche Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge zugrunde aufgrund von Wechselwirkungen der Substanzen mit der stationären und der mobilen Phase. Diese Wechselwirkungen können auf unterschiedlichen Polaritäten, Molekülgrößen oder Löslichkeiten in der mobilen Phase beruhen. Man unterscheidet hierbei hauptsächlich die Dünnschichtchromatographie (deutsch: DC, engl.: TLC), Flüssigchromatographie (LC) und Gaschromatographie (GC) [125].

2.7.1.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist ein Trennverfahren, das auf Adsorptions- und Verteilungsvorgängen beruht, ohne großen Geräteaufwand auskommt und nur wenig Zeit erfordert. Als stationäre Phase werden meist Feststoffe wie Kieselgel, Kieselgur oder Aluminiumoxid verwendet, die in einer dünnen Schicht auf einen geeigneten Träger, wie Glas- oder Aluminiumplatten, aufgebracht sind. Bei der Dünnschichtchromatographie wird vorrangig mit der Normalphasentrennung gearbeitet. Umkehrphasenplatten kommen nur selten zum Einsatz. Nach punkt- oder bandenförmigem Aufbringen der Untersuchungs- und Referenzlösungen erfolgt die Entwicklung in aufsteigender Richtung in einer Chromatographiekammer. Die mobile Phase wandert aufgrund von Kapillarkräften innerhalb

der Sorptionsschicht entgegen der Schwerkraft. Die Fortbewegung der Substanzen erfolgt nur dann, wenn sie in der mobilen Phase gelöst vorliegen. Bei der Verwendung von Kieselgel als Sorptionsmittel erfolgt die Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Polaritäten der Substanzen. Unpolare Substanzen legen dabei eine weitere Strecke auf der Platte zurück, sie haben somit einen höheren Retentionsfaktor (R_f).

Reproduzierbare Trennergebnisse können durch die Verwendung von Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)-Platten erzielt werden, welche sich durch eine besonders gleichmäßige Beschichtung und Korngrößenverteilung auszeichnen. Dadurch wird das Untergrundsignal gemindert und die Platten sind darüber hinaus für quantitative Bestimmungen geeignet. Die mobile Phase ist hierbei zusammengesetzt aus mehreren Lösungsmitteln, die vorerst in der Theorie zusammengestellt und dann in der Praxis angepaßt werden. Die chromatographische Entwicklung der Platte erfolgt durch Fortschreiten der mobilen Phase. Dabei kommt es zu Interaktionen der zu untersuchenden Substanzen mit der stationären und mobilen Phase, wodurch die Trennung vonstattengeht. Die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase nimmt dabei mit zunehmender Laufstrecke ab, wodurch es zu einer schlechteren Auflösung kommt, da sich die Laufzonen verbreitern. Weiteren Einfluss auf die Trennleistung haben Temperatur, Kammersättigung und die relative Luftfeuchte.

Die Vorteile der DC liegen darin, dass mehrere Proben gleichzeitig analysiert werden können und keine Vortrennung der Matrixbestandteile erfolgen muss. Bei vielen bioanalytischen Fragestellungen hat sich die DC zur Auftrennung von Substanzgemischen bewährt. In der Lipidanalytik ist sie noch immer die Methode erster Wahl.

Zur Detektion der Lipide stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. In der Analytik der SC-Lipide wird meist die Verkohlung mit Schwefelsäure und Kupfersulfat angewendet, da die Ergebnisse am besten reproduzierbar sind. Weiterhin stehen die reversible Jodfärbung und verschiedene Fluoreszenzindikatoren zur Verfügung [125].

2.7.1.2 Automatische Mehrfachentwicklung

Eine Weiterentwicklung der konventionellen DC ist eine automatische Mehrfachentwicklung (AMD) der Platten. Hier werden hohe Trennleistungen aufgrund einer Gradientenelution erzielt, da bei jedem Schritt die Substanzzonen verdichtet werden. Der Gradient umfasst verschiedene Entwicklungsschritte mit abnehmender Polarität bzw. geringerer Elutionskraft.

Die Entwicklung verläuft in eine Richtung und nimmt bei jedem Schritt wenige Millimeter zu. Der derzeit einzige Hersteller für diese Systeme ist CAMAG (Muttensz, Schweiz). Über einen Computer werden die entsprechenden Versuchsparameter eingespeist, der Entwicklungsverlauf verfolgt und die Daten ausgewertet. Die Entwicklungseinheit enthält eine Kammer mit Einlass und Auslass für die mobile Phase und das Konditioniergas sowie Flaschen für die verwendeten Lösungsmittel und deren Abfälle. Des Weiteren kommen ein Gradientenmischer, Spritzen zur Dosierung der Lösungsmittelvolumina und ein Lichtschrankensensor zur Messung der Laufmittelfront zum Einsatz. In Abb. 7 ist die HPTLC-Anlage von CAMAG dargestellt.



Abb. 7: HPTLC-Anlage von CAMAG (von links nach rechts: Automatic TLC sampler, automatische Entwicklungskammer, TLC Scanner)

Die wiederholte Entwicklung führt dazu, dass sowohl die einzelnen Probenbahnen als auch die Substanzbanden geschärft werden [125]. Durch diese Fokussierung entstehen präzise detektierbare und quantifizierbare Banden. Um eine gute Trennleistung zu erzielen, ist eine Vorkonditionierung nötig. So führen schwache Säuren zu einer Fokussierung von Substanzen mit schwachen basischen Eigenschaften. Es wird dazu ein Luftstrom durch eine Lösung geleitet, wodurch er gesättigt wird. Nach Einleiten in die Trennkammer verändert dieser Luftstrom den pH-Wert und die Selektivität der Platte. In der konventionellen DC wurde dies durch Zumischen der pH-aktiven Substanz zum Fließmittel erreicht. Dieser Konditionierungsschritt erfolgt vor jedem Entwicklungsschritt. Im Anschluß wird die mobile Phase gemischt, der Entwicklungskammer zugeführt und die Platte einige Millimeter entwickelt. Abschließend wird das restliche Fließmittel abgesaugt, die Platte im Vakuum getrocknet und nach erneuter Vorkonditionierung ist die Platte bereit für die nächste Fließmittelmischung.

Die Komponenten der mobilen Phase können nach ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen gibt es das Basisfließmittel und daneben noch Verstärker sowie Abschwächer. Das Basisfließmittel bestimmt weitgehend die Trennleistung, die beiden anderen Komponenten dienen zur Feinjustierung der Polarität.

Die qualitative Auswertung erfolgt anhand der R_f -Werte, wofür ungefärbte, nicht fluoreszierende Substanzen mittels Detektion mit geeigneten Nachweismitteln sichtbar gemacht werden müssen. Zur Quantifizierung werden die Substanzflecken mit Hilfe der Densitometrie, einem photometrischen Meßverfahren, ausgewertet. Hauptsächliche Meßmethoden sind hierbei die Fluoreszenz und die Remission.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt entweder über aktives Fluoreszieren der Substanz oder über Fluoreszenzlöschung auf einem Sorbens mit Fluoreszenzindikator. Wenn eine Substanz selbst nicht fluoresziert, kann sie mit bestimmten Reagenzien dieser Meßmethode zugänglich gemacht werden. Vor dem Detektor wird hierbei ein Filter eingesetzt, der das Anregungslicht nicht hindurchläßt [162].

Die Remissionsmessung, eine diffuse Reflektion, erfolgt mit Hilfe von TLC-Scannern. Diese sogenannten Densitometer bestehen aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einem Spiegel und einem Plattentisch. Die Platte wird hier mit monochromatischem Licht bestrahlt und die Reflektion des Lichtes von der Platte wird gemessen. Während der Messung wird die Platte entlang der Laufrichtung unter dem Lichtstrahl bewegt. Befindet sich unter dem Lichtstrahl der farbige Fleck einer Substanz, so wird ein Teil des Lichtes nicht mehr reflektiert sondern absorbiert. Die Absorption des Lichtes erfolgt proportional zur Konzentration der Substanz. Die so geminderte Lichtintensität des diffus reflektierten Lichts (sog. Remission) wird gemessen [162].

Als Lichtquellen kommen Deuterium-, Wolfram- oder Quecksilberlampen zum Einsatz. Die Deuterium- und Wolframlampen decken hierbei den UV/VIS-Bereich ab und die Quecksilberlampen kommen bei der Fluoreszenzdetektion zum Einsatz. Mit Hilfe eines Monochromators wird die gewünschte Wellenlänge herausgefiltert und der Lichtstrahl über einen Spiegel auf die Platte gelenkt. Der Spalt des Lichtstrahls ist in seiner Höhe und Breite individuell einstellbar. Allerdings wird bei der densitometrischen Messung nicht der Lichtstrahl über die Platte bewegt, sondern die Platte befindet sich auf einem beweglichen Tisch, wodurch Fehler minimiert werden, die durch die Bewegung eines Spiegels entstehen können. Das reflektierte Licht wird von einem Photomultiplier erfasst und die so

entstandenen Daten von einem Computer registriert und integriert. Die auf der Platte sichtbaren Banden werden nun als Peaks dargestellt, über deren Fläche oder Höhe der Gehalt der Substanz berechnet werden kann. Der Zusammenhang zwischen Konzentration und Licht kann über die Kubelka-Munk-Funktion beschrieben werden [57]:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{S} = c \frac{\epsilon k}{S}$$

R_{∞}	Remission einer unendlich dicken Schicht
K	Absorptionskoeffizient
S	Streukoeffizient (abhängig von der Korngröße)
c	Konzentration der Substanz
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient der farbig getrennten Bande
k	Proportionalitätsfaktor.

Über diese Funktion käme eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Remission des Lichts und der Konzentration der Substanz zustande, allerdings sind in der DC nicht alle Voraussetzungen dafür gegeben. Aus diesem Grund werden nichtlineare Sättigungsfunktionen zur Quantifizierung herangezogen [58,155]. Hierbei handelt es sich um eine vereinfachte Hill-Funktion, die aus der Michaelis-Menten-Funktion abgewandelt wurde [57]:

$$Y = A_{\max} \left(\frac{X}{K + X} \right)$$

Y	Densitometrische Intensität des Lipids
A_{\max}	Maximal erreichbare densitometr. Intensität des Lipids
X	Zu ermittelnde Menge des Lipids
K	Lipidmenge bei halbmaximaler Intensität

Für jede quantitative HPTLC-Analytik sollten auf der Platte die Standardsubstanzen für die Kalibrierung mit aufgetragen werden, um mögliche Variablen der Methode auszuschließen [155].

2.7.1.3 Gaschromatographie

Voraussetzung für die Gaschromatographie ist, dass die zu bestimmenden Substanzen flüchtig sind oder sich bis 350 °C vollständig verdampfen lassen, ohne sich dabei zu zersetzen. Oftmals können nichtflüchtige Substanzen durch Derivatisierungsreaktionen, z.B. Methylierung einer Hydroxylgruppe, in flüchtige Substanzen umgewandelt werden [125].

Die mobile Phase besteht hierbei aus einem inerten Trägergas (Stickstoff, Wasserstoff, Argon oder Helium), welches über eine feste oder flüssige stationäre Phase geleitet wird. Ist die stationäre Phase eine viskose schwerflüchtige Flüssigkeit, die ein festes Trägermaterial als dünner Film umkleidet, spricht man von der Gas Liquid Chromatography. Bei der Gas Solid Chromatography wird ein poröser Feststoff, z.B. Kieselgel oder Aluminiumoxid, verwendet. Die Trennung der Substanzen erfolgt aufgrund von Verteilung, Adsorption und Siedepunktunterschieden. Die Verteilungsgleichgewichte zwischen der stationären und der mobilen Phase stellen sich sehr schnell ein, weshalb sehr hohe Trägergasgeschwindigkeiten möglich sind. Dadurch verkürzen sich die Analysezeiten und es können gute Trennleistungen erzielt werden [47,125].

Die in der GC verwendeten Kapillarsäulen haben eine Länge von 30 – 100 m und eine Dicke von 0,1 – 1 mm. Je länger die Trennkapillare ist, umso besser deren Trennleistung, allerdings wird dadurch die Analysezeit verlängert. Die Trennkapillaren bestehen meist aus einem synthetischen Harz und sind innen mit einem 0,1 – 5 µm dünnen Trennphasenfilm beschichtet. Die Dicke dieses Trennphasenfilmes beeinflusst die Retentionszeit. In der Lipidanalytik sollte der Film so gering wie möglich gehalten werden, da die Lipidderivate zu den hochsiedenden Substanzen gehören und nur so deren Elution gesichert werden kann. Für die Lipidanalytik werden vor allem Polysiloxanderivate als stationäre Phase verwendet. Diese sind sehr unpolar und die Auftrennung erfolgt vor allem nach Anzahl der enthaltenen Kohlenstoffatome in den Lipiden [153,162].

Die Durchflußgeschwindigkeit des Trägergases kann die Trennleistung der Säule zusätzlich beeinflussen und muß gegebenenfalls optimiert werden [47,125].

Die Kapillare befindet sich in einem Säulenofen. Durch Veränderung der Temperatur während der Messung kann die Trennung optimiert werden, da die Wechselwirkungen zwischen der zu analysierenden Substanz und der stationären Phase temperaturabhängig sind. Ein Temperaturgradient spielt hierbei eine vergleichbare Rolle, wie der Fließmittelgradient in der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC). Je niedriger die Temperatur ist, umso länger verbleibt der Analyt auf der Trennsäule und umso besser ist die Auftrennung der Substanzen. Jedoch bedeutet eine niedrige Temperatur auch eine Verlängerung der Analysezeit. Deswegen muß ein optimaler Temperaturgradient gesucht werden, vergleichbar mit einem Fließmittelgradienten in der HPLC [125].

Zur Detektion im Gasstrom eignen sich verschiedene Methoden. Vor allem die Flammenionisationsdetektion, die Wärmeleitfähigkeitsdetektion und die massenspektrometrische (MS) Detektion sind gebräuchlich [125].

2.7.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie

Bei der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wird eine Substanzmischung über eine Säule aufgetrennt, in der sich die stationäre Phase befindet. Die mobile Phase durchströmt hierbei die Säule in einem kontinuierlichen Strom. Die HPLC gehört wie die DC somit zu den flüssigchromatographischen Methoden. Es werden die Wechselwirkungen des Stoffes in der Grenzschicht zwischen der mobilen und der stationären Phase ausgenutzt und es finden Adsorptions- und Verteilungsprozesse statt.

Die HPLC erzielt eine sehr hohe Trennleistung, weshalb sie sowohl für analytische, als auch für präparative Zwecke eingesetzt werden kann. Die Trennleistung der Säule ist stark beeinflusst durch die Partikelgröße der stationären Phase: je kleiner und je gleichmäßiger verteilt die Partikel sind, umso höher ist die Trennleistung. Die stationäre Phase befindet sich als homogen gepackte, feste und poröse Masse in einer Stahlsäule. Die Länge dieser Säule variiert zwischen 18 und 300 mm, die Partikel haben eine Größe von 1,5 – 10 µm mit einem Porendurchmesser von 6 – 400 nm. Die flüssige mobile Phase wird, unterstützt durch eine Pumpe, unter hohem Druck hindurchgeleitet [125].

Als stationäre Phase werden meist Kieselgel und seine Derivate eingesetzt. Man unterscheidet hierbei die Normalphasen (NP)-HPLC und die Umkehrphasen (reversed phase, RP)-HPLC. Die Verwendung einer polaren stationären Phase bei der NP-HPLC eignet sich vor allem zur Trennung unpolarer Substanzen. Für die in der Praxis häufiger eingesetzte RP-HPLC wird das Kieselgel modifiziert und somit durch kovalent an freie Silanolgruppen gebundene Alkylketten mit 4 – 18 Kohlenstoffatomen ihre Polarität gemindert. Die eingesetzten Fließmittel können nach ihrer Elutionskraft in einer so genannten elutropen Reihe angeordnet werden. Diese hängt wesentlich von der Polarität des jeweiligen Lösungsmittels ab und muss für jedes Säulenmaterial experimentell ermittelt werden. Bei der Verwendung einer RP-18-Säule nimmt die Elutionskraft in folgender Reihenfolge zu: Wasser < Methanol < Isopropanol < Acetonitril < Tetrahydrofuran < Chloroform < Hexan [125].

Um die Elution zu verbessern, kann neben der isokratischen Elution, bei der die Zusammensetzung der mobilen Phase konstant bleibt, eine Gradientenelution eingesetzt

werden. Hierbei nimmt durch die Veränderung der Fließmittelzusammensetzung die Elutionsstärke während einer Analyse kontinuierlich oder stufenweise zu, wodurch komplex zusammengesetzte Analyten aufgetrennt werden können.

Die Substanzen erreichen nach einer, unter den gewählten Bedingungen für sie typischen Retentionszeit (retention time, RT) den Detektor. Dieser kann nach unterschiedlichen Meßprinzipien arbeiten, die sich in ihrer Empfindlichkeit und Spezifität stark unterscheiden können. Für die Lipidanalytik kommen hauptsächlich die massenspektrometrische Detektion und die evaporative Lichtstredetektion zum Einsatz. Die sonst sehr gebräuchliche UV-Detektion ist in der Lipidanalytik eher ungeeignet, da meist keine charakteristischen Chromophore in den Molekülen vorhanden sind [125].

Die HPLC zeichnet sich durch eine hohe Trennleistung und gute Reproduzierbarkeit aus, weshalb sie in der Bioanalytik das wichtigste chromatographische Verfahren zur Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsbestimmung darstellt.

Während in der NP-HPLC die Auftrennung der Lipide aufgrund ihrer Hydrophilie erfolgt, eignet sich die RP-HPLC für die Auftrennung der Subspezies der CER-Klassen aufgrund ihrer Lipophilie. Mit anschließender massenspektrometrischer Detektion kann somit die molekulare Masse der Subspezies bestimmt werden [59,62,154,155,157,189].

2.7.2 Evaporative Lichtstredetektion

Bei der evaporativen Lichtstredetektion (ELSD) handelt es sich um ein robustes, aber sehr unspezifisches Verfahren, bei dem ein nicht flüchtiger Substanzpartikel nach Evaporieren (Verdampfen) des Laufmittels in der Meßzelle eine Streuung des Laserlichts verursacht [41,42,155]. Somit benötigt man keine vorherige Derivatisierung des Analyten [37].

Die Intensität des gestreuten Lichts verhält sich proportional zur Konzentration der Substanz. Diese Detektionsmethode ist unempfindlich gegenüber vielen Lösungsmitteln, sofern sie einen niedrigeren Siedepunkt als der Analyt besitzen. Mit einer Gradientenelution ist diese Messmethode kombinierbar, da das Signal dadurch nicht beeinflusst wird [41,42].

Das Eluat wird hierbei durch ein Gas, zumeist Stickstoff oder Luft, an einer Verneblungsdüse zerstäubt, wodurch sich kleine Tröpfchen bilden. Der Durchmesser der Tröpfchen ist hierbei abhängig von der Oberflächenspannung, der Dichte und der Viskosität der mobilen Phase [41,42]. Die Tröpfchen werden aufgrund der Evaporation des Lösungsmittels in der Verdampfungskammer immer kleiner, wodurch kleine Feststoffaggregate der zu

untersuchenden Substanz entstehen. Diese gelangen über den Gasstrom in die Detektionskammer, in der eine Laserlichtquelle angebracht ist. Der Lichtstrahl wird durch die ankommenden Partikel gestreut und dieses gestreute Licht von einem Photomultiplier aufgenommen, verstärkt und der Auswerteeinheit zugeführt. Da es sich nicht um eine spektroskopische Detektion handelt, kommt das Lambert-Beersche-Gesetz nicht zur Anwendung. Quantifizierungen sind über nichtlineare Gleichungen möglich [41].

Die Intensität des Signals ist abhängig von der Größe, der Form und der Oberflächenbeschaffenheit des Partikels, funktionelle Gruppen haben dabei keinen Einfluss [41,42]. Die Zugabe von Ameisensäure oder Triethylamin zum Laufmittel erhöht das Signal der ELSD, die diskutierte Theorie dahinter ist eine Veränderung der Partikelgröße durch Salzbildung [41].

2.7.3 Massenspektrometrische Methoden

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein Analyseverfahren im Hochvakuum, bei dem die Molekülmasse, genauer gesagt das Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z), freier Ionen bestimmt wird [125]. Die Moleküle werden nach Verdampfung ionisiert, d.h. es werden positiv oder negativ geladene Ionen gebildet. Diese Ionen sind meist instabil und fragmentieren innerhalb weniger Mikrosekunden in geladene und ungeladene Bruchstücke, wobei die geladenen Fragmente nach ihren Massen getrennt und ihre relativen Intensitäten in einem Massenspektrum aufgezeichnet werden [164]. MS hat ein weites Anwendungsspektrum in der Analytik und wird eingesetzt zur Identifizierung, Charakterisierung und Quantifizierung von Substanzen. Zur Quantifizierung findet sie Anwendung als Detektor bei HPLC- oder GC-Messungen. Die Bestimmung erfolgt hierbei mit Hilfe von Standardsubstanzen. Zur qualitativen Untersuchung von Substanzen erfolgt eine Massenbestimmung. Zusammen mit dem Isotopenmuster der Substanz können Rückschlüsse auf die Elementarzusammensetzung gezogen werden [125,164]. Nach einer Tandemmassenspektrometrie erhält man ein Fragmentmuster, wodurch man Informationen über die Struktur einer Substanz gewinnt [164]. Die MS hat eine hohe Empfindlichkeit, wodurch die Bestimmung von Substanzen in geringer Konzentration möglich wird.

Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, die einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt. Diese Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt, mit Hilfe einer Ionenoptikeinheit fokussiert und anschließend in einem Massenanalysator nach

ihren m/z aufgetrennt. Ein Detektor dient zur Erfassung der Ionen, indem die relativen Häufigkeiten der Ionen aufgezeichnet werden (Abb. 8). Die gemessenen Masseneinheiten haben viele Bezeichnungen (μ , amu, Da), sie alle sind Synonyme für 1/12 der Masse von ^{12}C [125,162].

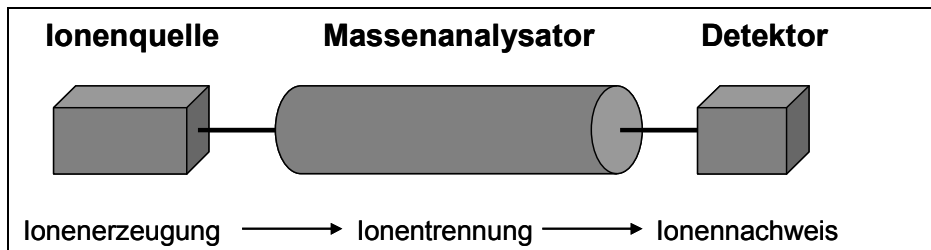


Abb. 8: Aufbau eines Massenspektrometers nach [125]

Die entstandenen Molekülionenpeaks sind meist kombiniert mit kleineren Peaks, deren Masse sich um +1 Da unterscheidet. Es handelt sich hierbei um Isotopenpeaks des eigentlichen Molekül-Ions aufgrund des natürlichen Vorkommens von ^{13}C und Deuterium [164].

2.7.3.1 Ionisationstechniken

Um dem Analyten eine Ladung zu verleihen existieren verschiedene Ionisationstechniken. Die wichtigsten sind in Tab. 3 dargestellt. Keine der beschriebenen Ionenquellen ist universell einsetzbar. Die jeweilige Ionisationstechnik muss anhand der Eigenschaften des Analyten und dem Analyseziel ausgewählt werden [109].

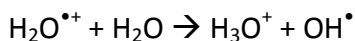
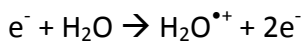
Tab. 3: Ionisationsverfahren in der Massenspektrometrie

Ionisierungstechnik	Art der Ionisation	Wichtige Informationen
Elektronenstoß-ionisation (EI) [65,125]	Beschuß mit Elektronen 70eV	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: M^{+} - Hochvakuum - Starke Fragmentierung, Umlagerungsreaktionen (retro-Diels-Alder-Reaktion, McLafferty-Umlagerung) - Strukturinformationen aufgrund der Fragmentierung - Substanzidentifikation durch Vergleich mit Spektrenbibliotheken
Chemische Ionisation (CI) [125]	Ionisation des Analytmoleküls durch ein ionisiertes Hilfsgases (z.B. Ammoniak, Methan)	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M-H]^-$ - Hochvakuum - Geringe Fragmentierung, daher weniger Strukturinformationen - Keine sehr polaren Verbindungen
Fast-Atom-Bombardement (FAB) [125]	Beschuß mit Atomen (z.B. Ar, Xe), dadurch Übertragung hoher kinetischer Energie	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M-H]^-$ - Hochvakuum - Analyt muß in schwer flüchtiger Matrix (z.B. Glycerin) lösbar sein - Polare Verbindungen - Heute nicht mehr eingesetzt, da geringe Empfindlichkeit und geringe Ionenausbeuten
Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) (siehe Text)	Durch Coronaentladungen kommt es zur Übertragung eines elektrostatischen Potentials auf ein Reaktandengas (z.B. N_2)	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M+Alkali]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, Cluster - Atmosphärendruck - Keine mehrfach geladenen Ionen - Fragment-Ionen möglich - Sehr hohe Flußraten möglich, daher Kopplung an HPLC möglich - Unempfindlicher gegenüber apolaren Lösungsmitteln (vgl. ESI) - Lipophilere Verbindungen messbar im Vergleich zu ESI
Elektrospray-ionisation (ESI) (siehe Text)	Übertragung eines elektrostatischen Potentials	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M+Alkali]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, Cluster - Atmosphärendruck oder Vakuum - Mehrfach geladene Ionen möglich, daher Messungen von hochmolekularen Substanzen - Sehr polare Verbindungen (Vorhandensein funktioneller Gruppen) - Lösungsmittelbeschränkung
Nano-Elektrospray-ionisation (Nano-ESI) (siehe Text)	Übertragung eines elektrostatischen Potentials	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M+Alkali]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, Cluster - Atmosphärendruck oder Vakuum - Geringste Substanzmengen messbar - Besser aufgelöste Spektren von hochmolekularen Verbindungen
Matrix unterstützte Laser-Desorptions-ionisation (MALDI) [65,125]	Impulsartige Übertragung der UV- oder IR-Laserenergie durch eine geeignete Matrix auf den Analyten	<ul style="list-style-type: none"> - Ionentypen: $[M+H]^+$, $[M+Alkali]^+$, Cluster - Hochvakuum - Sehr schonendes Verfahren - Anwendung in der Protein- und Polymeranalytik

Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck

Bei der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck wird die Probenlösung zunächst am Ausgang einer Kapillare mit Hilfe eines Sprühgases (meist Stickstoff) zerstäubt. In einem Evaporationsrohr wird bei 400 - 500 °C mit Unterstützung eines Trocknungsgases das Lösungsmittel verdampft [27,125]. Über eine Coronanadel, eine nadelartige Elektrode, wird die Probe unter Hochspannung (5 kV) ionisiert, wobei der genaue Prozess noch nicht geklärt ist. Man geht davon aus, dass zunächst die erzeugten Ladungen von Stickstoffmolekülen aufgenommen werden, die sie an die Lösungsmittelmoleküle weitergeben, die wiederum den Analyten ionisieren. Somit liegt hier eine indirekte Ionisation vor [27,30].

Die wichtigsten Reaktionen hierbei sind:



Diese Methode wird hauptsächlich bei weniger polaren Substanzen angewandt. Verdampfen und Ionisation sind bei der APCI zwei separate Schritte, wodurch auch lipophile Lösungsmittel (z.B. Chloroform, Hexan) zum Einsatz kommen können.

Elektrosprayionisation

In den letzten Jahren hat die Elektrosprayionisation (ESI) sprunghaft an Bedeutung gewonnen. Bereits Anfang der 1970er Jahre wurde das Elektrosprayphänomen entdeckt, allerdings erst nach den Arbeiten von Fenn und Dole et al. in der Massenspektrometrie eingesetzt [65,82,205].

Die Probenlösung wird hierbei unter Hochspannung (1 - 5 kV) und einem Stickstoffstrom unter Atmosphärendruck versprüht, wodurch kleine hochgeladene Tröpfchen gebildet werden [82]. Während das Lösungsmittel verdampft, werden die Tröpfchen immer kleiner und es kommt zu einer Akkumulation der Ladung an deren Oberfläche. Durch die Abstoßung der gleichartigen Ladung werden die Tröpfchen aufgesprengt (Coulomb-Explosion) [34,82,109-112]. Dieser Prozess wiederholt sich bis das gesamte Lösungsmittel aus dem Tropfen entfernt ist, dann ist der Analyt effektiv ionisiert [82].

Es kommt so zur Entstehung freier gasförmiger Ionen, deren Bildung zwei Modellvorstellungen unterliegen. Einerseits wird von dem Modell des geladenen Rückstands von

Dole (charged residue model) ausgegangen, wobei winzige Tröpfchen von 1nm Radius nur noch ein Analytmolekül enthalten, welches durch den Stickstoff vollständig desolvatisiert wird [34,64,65,125]. Andererseits wird das Ionenemissionsmodell (ion evaporation model) diskutiert, wobei bereits aus größeren hoch geladenen Tröpfchen (10 nm) freie Ionen in die Gasphase freigesetzt werden [34,125]. Manche experimentelle Vorgänge sind besser mit der ersten Modellvorstellung, andere besser mit der zweiten zu erklären [125]. Abb. 9 beschreibt die Entstehung der freien Molekül-Ionen.

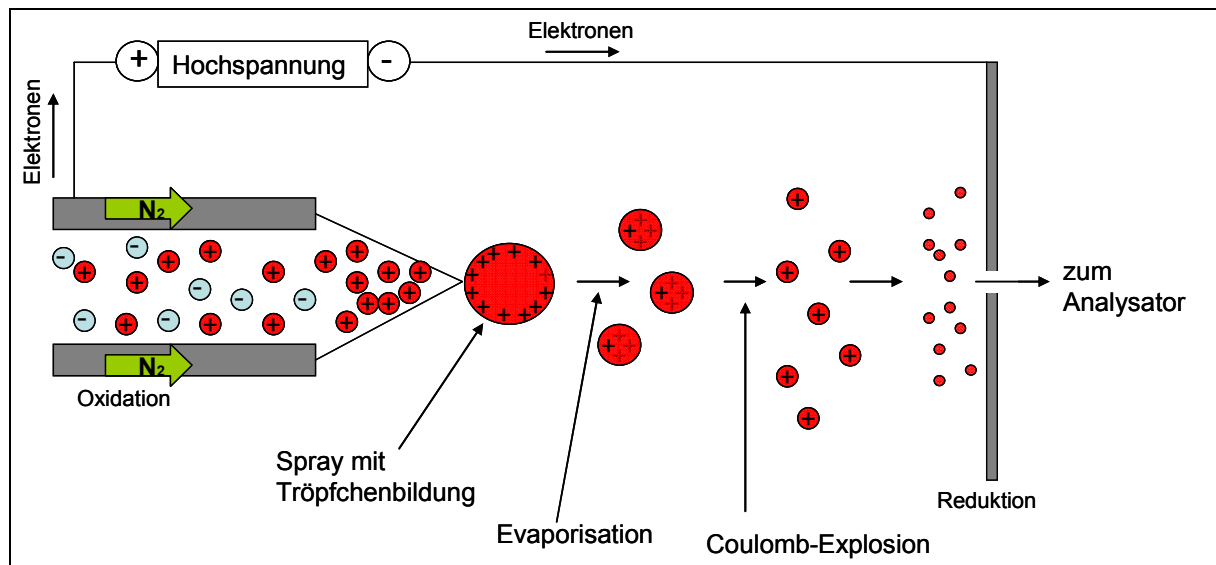


Abb. 9: Schematische Darstellung der Elektrosprayionisation im positiven Ionenmodus

Die detektierten Molekül-Ionen sind je nach Polarität der angelegten Spannung $[M+H]^+$ und $[M-H]^-$. Charakteristikum dieser Methode ist die Bildung von Addukten. So werden im positiven Ionenmodus häufig Natriumaddukte und im negativen Ionenmodus Chloridaddukte gebildet. Auch mit anderen Bestandteilen, z.B. Tensiden oder Teilchen der gleichen Art, ist eine solche Anlagerung möglich. Diese Addukte zeigen oft eine höhere Intensität als die protonierten oder deprotonierten Molekül-Ionen. Die Bildung von Anlagerungsprodukten ist vor allem von der Lösungsmittelzusammensetzung und den Geräteeinstellungen abhängig und ist somit in gewissem Maße steuerbar [34,109-112].

Bei der ESI handelt es sich um eine sanfte Ionisierungstechnik im Vergleich zu anderen Ionisierungsmethoden (Laserdesorption, fast atom bombardement). Selbst empfindliche Moleküle gelangen aufgrund des geringeren Energieaufwandes und der geringeren Hitzeentwicklung unzersetzt in den Massenspektrometer [109-112].

Ein großer Vorteil der ESI besteht darin, dass die Ionisation aus dem gleichen Lösungsmittel stattfindet, welches vorher für die Naßchemie verwendet wurde. Das typische Lösungsmittel (meist Methanol) ist dipolar und der Analyt sollte in geringem Maße darin löslich sein, eine Konzentration von 10^{-5} - 10^{-3} Mol ist ausreichend [109-112]. Weitere wichtige Lösungsmiteleigenschaften sind Leitfähigkeit, Viskosität, Oberflächenspannung und Dielektrizitätskonstante [33]. Die einzig wichtige Eigenschaft des Analyten ist seine Ionisierbarkeit [82].

Neben der konventionellen ESI wurde das Nanoelektrospray (Nano-ESI) von Wilm und Mann 1994 entwickelt. Einer der Vorteile besteht hierbei darin, dass eine viel geringere Probenmenge nötig ist. Im Nano-ESI ist die Spitze der Kapillare viel enger, die produzierten Tropfen somit kleiner und schneller in der Gasphase als beim konventionellen ESI [109-112].

Da die Ionisation unter Atmosphärendruck stattfindet, die Analyse allerdings im Hochvakuum, muß ein Übergang, ein so genanntes Interface, geschaffen werden. Die Einlassöffnung des Interfaces muß dabei groß genug sein, um die Analytmoleküle in ausreichender Zahl hindurchzulassen. Sie darf aber nicht zu groß sein, damit das nötige Vakuum aufrechterhalten wird. Danach werden mit Hilfe der Ionenoptik, z.B. Skimmer, Linsen, Hexa- oder Octapole fokussiert und zum Analysator weitergeleitet, wo sie nach Masse/Ladungsverhältnis sortiert werden [64,65,125].

2.7.3.2 Massenanalysatoren

In den Massenanalysatoren werden die Molekül-Ionen nach ihren Masse/Ladungsverhältnissen aufgetrennt unter Nutzung elektrischer, kinetischer oder magnetischer Kräfte [64,65,125]. In Tab. 4 ist eine Übersicht der verschiedenen Massenanalysatoren dargestellt.

Tab. 4: Trennprinzipien verschiedener Massenspektrometer

Massenfilter	Trennprinzip	wichtige Informationen
Single Quadrupol (siehe Text)	Verhalten von Ionen in einem zweidimensionalen elektrischen Gleich- und Wechselfeld	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, SIM - hohe Empfindlichkeit - häufigste und günstigste Variante - schneller Scan - keine Massenfeinbestimmung
Triple Quadrupol (siehe Text)	Verhalten von Ionen in einem zweidimensionalen elektrischen Gleich- und Wechselfeld	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, SIM, MS/MS, precursor-ion scan, neutral loss scan, MRM, SRM - MS/MS möglich, dadurch Strukturaussagen - Sehr hohe Empfindlichkeit - Keine Massenfeinbestimmung
Ionenfalle (siehe Text)	Verhalten von Ionen in einem dreidimensionalen elektrischen Gleich- und Wechselfeld	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, SIM, MS/MS, MSⁿ (n=3-10) - sehr gute Strukturaussagen durch MSⁿ - keine Massenfeinbestimmung - hohe Empfindlichkeit, da „Speicherung“ der Ionen - Füllgrad der Ionenfalle muß beachtet werden
Flugzeit (Time of flight) (siehe Text)	Flugzeitunterschiede von Ionen unterschiedlicher m/z im Hochvakuum bei gleicher kinetischer Energie	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, MS/MS bei Kopplung mit einem Quadrupol - theoretisch unbegrenzter Massenbereich - sehr hohe Empfindlichkeit - alle Ionen simultan gemessen - Massenfeinbestimmung
Fourier-Transform-Ion-Cyclotron-Resonanz [130]	Verhalten von Ionen in einem starken dreidimensionalen Magnetfeld	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, SIM, MS/MS, MSⁿ (n=3-10) - Höchstes Auflösungsverhalten - Massenfeinbestimmung - Anfällig gegen externe Magnetfelder
Orbitrap [99]	Verhalten von Ionen in einem elektrostatischen Feld (Induktion eines Stromes bei gleichzeitiger Rotation um eine zentrale Elektrode und axialer Oszillation)	<ul style="list-style-type: none"> - full scan, MS/MS, MSⁿ - hohe Massenauflösung - akkurate Massenbestimmung - gepulster Ioneneinlaß nötig

Quadrupol

Das einfachste Prinzip der Massenanalyse erfolgt über den Quadrupol, wobei die Ionen hier über elektrische Felder getrennt werden. Der Quadrupol besteht aus 4 parallel angeordneten zylindrischen Metallstäben, die auf einem Kreis um die Flugachse der Ionen angeordnet sind. An den zwei jeweils gegenüberliegenden Stäben wird die gleiche Polarität der Gleichspannung bzw. die gleiche Phase der Wechselfeld angelegt, wodurch für die Teilchen auf der Flugachse ein elektrisches Potential resultiert. Nach Anlegen einer geringen Beschleunigungsspannung von 10 - 20 V bewegen sich die Molekül-Ionen weiter auf der Flugachse. Es wird nun der gesamte Massenbereich abgetastet, wofür die Spannung und die Energie so erhöht werden, dass ihr Verhältnis zueinander konstant bleibt. Es werden nacheinander verschiedene Massen in den Stabilitätsbereich des Quadrupolfeldes gebracht und zum Detektor durchgelassen. Der Quadrupol besitzt hierbei Massenfiltereigenschaften,

indem nur bestimmte Ionen zum Analysator durchgelassen werden, die anderen Ionen, die nicht die richtige Masse besitzen, werden so stark beschleunigt, dass sie mit den Metallstäben kollidieren, somit gestoppt werden und nicht mehr in den Detektor gelangen [125].

Zwei Arten der Massenanalyse stehen hierbei zur Verfügung. Einerseits besteht die Möglichkeit eines full scans zum Abtasten größerer Massenbereiche und andererseits existiert das Selected ion monitoring (SIM) zum Aufnehmen einzelner m/z . Das SIM hat dabei eine 10fach höhere Empfindlichkeit. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit zur stoßinduzierten Fragmentierung (engl. collision-induced dissociation, CID), einer Fragmentierung durch Kollision. Hierfür wird eine Beschleunigungsspannung angelegt, die die Ionen mit Stickstoffmolekülen zusammenstoßen lässt, wodurch instabile Ionen, z.B. Lösungsmitteladdukte, zerstört werden. Eine gezielte Fragmentierung zur Strukturaufklärung der Moleküle ist nur begrenzt möglich. Hierfür wird der **Triple Quadrupol**, also eine Anordnung von drei Quadrupolen, eingesetzt. Der erste Quadrupol dient dabei zur Massenanalyse, der zweite zum Hindurchleiten durch eine Kollisionskammer mit Hilfe von inertem Gas (Stickstoff, Helium, Argon) und im dritten Quadrupol erfolgt die Massenanalyse der Fragmente. Neben einfacher Massenspektrometrie ist hier außerdem Tandem-MS möglich. Nach Anlegen einer Beschleunigungsspannung erfolgt hier durch Zusammenstöße der Moleküle mit Gasteilchen eine Fragmentierung. Einzelne Ionen können nach einer Massenanalyse spezifisch fragmentiert werden [125].

Flugzeitmassenspektrometer

Ein Quadrupol Flugzeitmassenspektrometer kann man sich vorstellen als Triple Quadrupol, wobei der letzte Quadrupol durch ein Flugzeitmassenspektrometer (time of flight, TOF) ersetzt ist (Abb. 10).

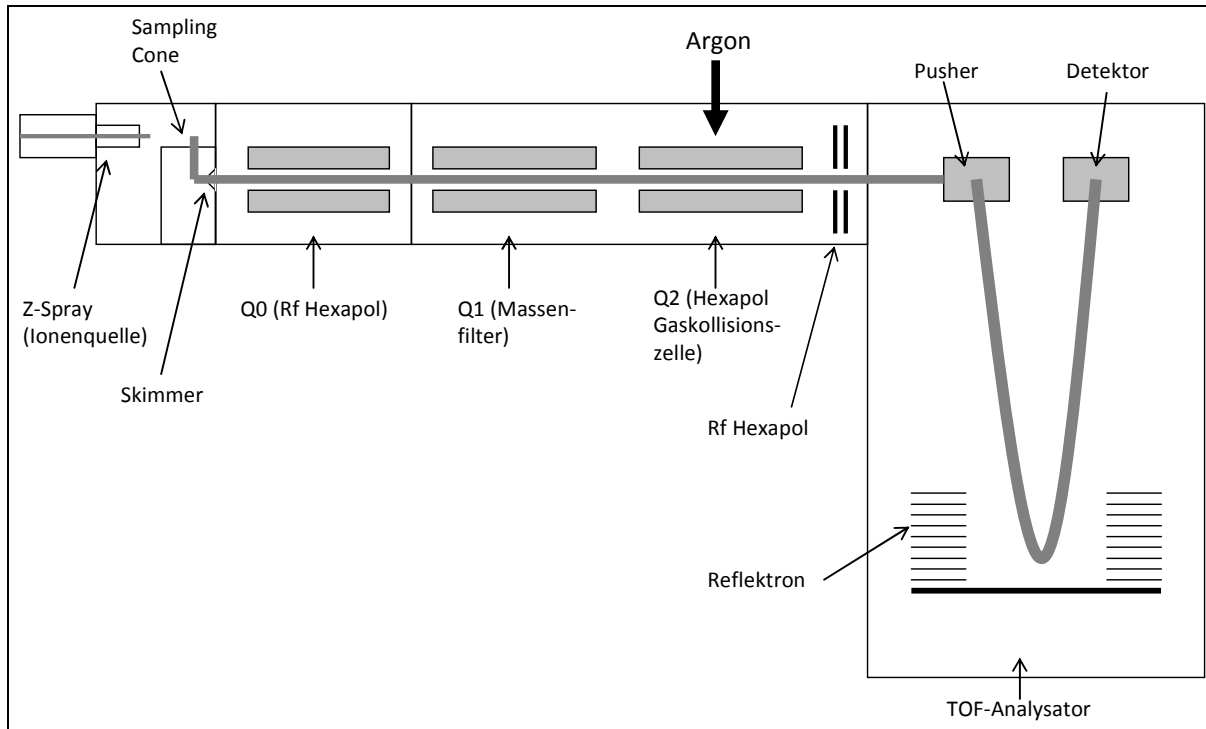


Abb. 10: Aufbau eines QTOF-Massenspektrometers nach [31]

Für die Tandemmassenspektrometrie wird der erste Quadrupol als Massenfilter genutzt, der nur das Ion hindurchläßt, das näher untersucht werden soll. Dieses wird nun auf eine Energie von 20 - 200 eV beschleunigt und in den zweiten Quadrupol geleitet. Dieser zweite Quadrupol dient als Kollisionszelle, in der das zu untersuchende Ion mittels CID durch Aufeinanderstoßen mit einem unter diesen Bedingungen inerten Gas (Stickstoff, Argon, Helium) fragmentiert wird. Anschließend findet die massenspektrometrische Analyse der entstandenen kleineren Fragment-Ionen in dem TOF-Massenspektrometer statt. Hierfür wird eine elektrische Spannung angelegt, welche den Ionen die gleiche kinetische Energie verleiht und sie somit beschleunigt. Bei gleicher kinetischer Energie hängt die Geschwindigkeit der Ionen von deren Masse ab, daher wird die Zeit gemessen, die die Ionen benötigen, um eine gewisse Strecke in einem Flugrohr zurückzulegen. Alle Ionen werden hierbei parallel gemessen, d.h. es muss nicht durch den Massenbereich gescannt werden. Am Ende der Flugstrecke befindet sich ein Reflektoren. Hier wird ein konstantes elektrisches Feld angelegt, welches der Beschleunigungsspannung entgegengesetzt ist. Durch die Kraft des elektrischen Feldes werden die Ionen ausgebremst, fokussiert und in die entgegengesetzte Richtung zum Detektor beschleunigt. Je nach Eindringtiefe in das Bremsfeld, durchlaufen die Fragment-Ionen unterschiedliche Flugbahnen. Leichte Ionen sind schneller und dringen tiefer in das Bremsfeld ein als schwere Ionen. Das TOF zeichnet sich

aus durch eine hohe Scangeschwindigkeit, eine hohe Massengenauigkeit und eine bessere Auflösung als das Quadrupol oder die Ionenfalle [31]. Da bei dieser Methode die Selektion des Precursors und die Analyse der Fragment-Ionen in zwei verschiedenen Massenanalysatoren stattfinden, spricht man auch von tandem in space.

Aus dem entstehenden Fragmentmuster können Informationen über die Struktur des Ursprungs-Ions gewonnen werden, denn zwei unterschiedliche Moleküle gleicher Masse liefern ein unterschiedliches Fragmentmuster [164].

Das QTOF kann außerdem für den Precursor ion scan genutzt werden. Hierbei werden einfache Massenspektren ohne Fragmentierung aufgenommen. Die Energie in der Kollisionszelle muß dabei auf 10 eV gesetzt werden, um Fragmentierungsprozesse zu verhindern [31,125].

Ionenfalle

Ein weiteres Analyseprinzip bietet die Ionenfalle (ion trap). Sie besteht aus einer Ringelektrode, die ein in sich gebogener an den Enden verbundener Quadrupolstab ist, und zwei Endklappenelektroden mit zentrischer Öffnung [125].

Eine Wechselspannung wird an der Ringelektrode angelegt, wodurch ein dreidimensionales rotationssymmetrisches Quadrupolfeld entsteht. Ionen mit entsprechendem Masse/Ladungsverhältnis werden innerhalb dieses Feldes auf stabilen Umlaufbahnen gespeichert und mittels Heliumgas, das sich im Inneren der Ionenfalle befindet, gedämpft bzw. fokussiert. Wird die Spannung an der Ringelektrode dann erhöht, werden die Ionenbahnen in Reihenfolge steigender m/z instabil und die Ionen in Richtung Detektor aus der Falle ausgeworfen. Die Ionen werden aber auch dann ausgeworfen, wenn durch zusätzlich angelegte dipolare Wechselspannung zwischen den Endklappenelektroden Multipolfelder erzeugt werden [125].

Die Ionenfalle arbeitet diskontinuierlich, aber eine hohe Geschwindigkeit macht sie auch online-Messungen zugänglich. Für eine exakte Messung ist eine optimale Füllung der Falle nötig, denn zu viele Ionen behindern sich gegenseitig und zu wenige senken die Empfindlichkeit des Analysators [153].

2.7.3.3 Detektoren

Zur Detektion der Ionen in der Massenspektrometrie werden meist Sekundärionenvervielfacher verwendet. Treffen hierbei die Molekül-Ionen auf die Konversionsdynode, werden Elektronen herausgeschlagen. Diese Elektronen prallen auf mehrere mit immer höheren Spannungen versehene Dynoden, aus denen kaskadenartig immer mehr Elektronen (Sekundärionen) herausgeschlagen werden. Dadurch wird die Messempfindlichkeit enorm gesteigert. Am Ende wird ein Signal erzeugt, das proportional zu dem Ionenstrom ist, der aus dem Analysator austritt. Dieser wird als totaler Ionenstrom (engl.: total ion current, TIC) bezeichnet. Über den Ionenstrom kann somit ein Massenspektrum erstellt werden, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen gegen deren Masse-Ladungs-Verhältnisse (m/z) aufgetragen sind.

3 Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien

Die Ceramide (CER[AP], CER[AS], CER[EOS], CER[NP], CER[NS]) wurden durch Evonik (Essen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die CER[AP], CER[NP] und CER[NS] hatten für die Sphingoidbasis und für die amidgebundene FA eine Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen. CER[AS] war aufgebaut aus einem C18 Sphingosin amidgebunden an eine C22 FA. Die Sphingosinbasis des CER[EOS] hatte ebenfalls eine Kettenlänge von 18 Kohlenstoffatomen, die amidgebundene C30 ω -hydroxylierte FA war wiederum mit Linolsäure verestert.

Die weiteren Lipide wurden von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Das Derivatisierungsreagenz für die Gaschromatographie, Trimethylsulfoniumhydroxid, wurde ebenfalls von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Die für die Analytik eingesetzten Lösungsmittel (Aceton, Acetonitril, Chloroform, Essigsäure, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, n-Hexan, n-Propanol) waren HPLC-rein und stammten von verschiedenen Lieferanten (Merck, Darmstadt, Deutschland; Riedel de Häen, Seelze, Deutschland; Fischer Scientific, Niederau, Deutschland). Vor allem für die MS-Untersuchungen wurde darauf geachtet, dass keine Lagerung in Kunststoffgefäßen erfolgte, um eine Verunreinigung mit Weichmachern zu vermeiden.

Das eingesetzte Kupfersulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) und die Phosphorsäure für die HPTLC-Tauchlösung wurden produziert von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland).

3.2 Gewinnung der SC-Lipide

Die SC-Lipide wurden mittels in vivo-Oberflächenextraktion gewonnen. Der Einsatz wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt. Es erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Probanden über den Zweck und die Durchführung der Studie. Sowohl Schizophrenieerkrankte als auch gesunde Probanden nahmen an der Studie teil.

Die Teilnehmer wurden von mehreren Fachärzten untersucht und nach strengen Kriterien ausgewählt. Die Schizophreniepatienten wurden von 2 psychiatrischen Fachärzten untersucht und nachfolgend psychiatrisch begleitet. Alle Patienten hatten vor der Probennahme keine antipsychotischen Medikamente bekommen.

Die Kontrollprobanden wurden ebenfalls psychiatrisch untersucht, um eine psychische Erkrankung auszuschließen. Außerdem wurden aus beiden Gruppen jene Patienten ausgeschlossen, die eine dermatologische Grunderkrankung hatten bzw. zur Zeit der Probennahme mit topischen Steroiden behandelt wurden.

Die Extraktion erfolgte mittels eines zylindrischen Glasbehälters (ID: 4 cm, Extraktionsfläche 12,56 cm²). Dieser wurde mit 10 ml einer Mischung aus n-Hexan/Ethanol (2:1; V/V) gefüllt, an die entsprechende Stelle am Unterarm angebracht und befestigt. Der Arm wurde umgedreht, so dass das Lösungsmittel die Hautoberfläche berührte und während der Extraktionszeit von 5 min kreisend bewegt. Dadurch wurde das Lösungsmittel ständig durchmischt. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Es nahmen 28 Patienten (19 männlich, 9 weiblich), bei denen eine Schizophrenie erstmalig auftrat, sowie 49 gesunde Probanden (31 männlich, 18 weiblich) als Kontrollgruppe an der Studie teil. Von allen Teilnehmern liegt eine unterschriebene Einverständniserklärung vor.

3.3 Trennung der SC-Lipide mittels HPTLC

3.3.1 Probenauftragung

Die verwendeten HPTLC-Platten (Kieselgel 60 F₂₄₅, 20x10 cm) von Merck (Darmstadt, Deutschland) wurden vor der Probenauftragung in Isopropanol gewaschen, um eine höhere Trennleistung erzielen zu können. Auf jede Platte wurden 20 Proben in 8 mm breiten Banden mit einer Applikationsgeschwindigkeit von 100 µl/s durch einen automatischen TLC-Sampler 4 (ATS 4, CAMAG, Muttenz, Schweiz) aufgetragen.

Der Abstand zum unteren Plattenrand betrug 8 mm und zu den seitlichen Rändern 16 mm, mit einer Distanz von 10,6 mm zwischen den einzelnen Banden. Jeder Lipidextrakt wurde doppelt appliziert. Darüber hinaus wurde eine Referenzmischung aus Standardlipiden in 8 verschiedenen Konzentrationen zu Quantifizierungszwecken aufgetragen. Gesteuert wurde der ATS 4 von der Software winCATS 1.4.2.

3.3.2 Automatische Mehrfachentwicklung

Zur Entwicklung der Platten wurde die vollautomatische Entwicklungskammer AMD2 (CAMAG, Muttenz, Schweiz) verwendet. Es wurde ein Gradient aus 17 Entwicklungsschritten mit steigender Polarität und zunehmender Laufstrecke eingesetzt. Die hierfür verwendeten Lösungsmittel waren Ethanol, Chloroform, n-Hexan, Aceton und Ethylacetat. Die einzelnen

Lösungsmittelmischungen und Laufstrecken sind in Abb. 11 dargestellt. Die gesamte Laufstrecke auf der Platte war 65 mm. Vor jedem Entwicklungsschritt wurde die Kammer mit Essigsäure vorkonditioniert. Hierzu wurde Luft durch eine 4M-Essigsäurelösung geleitet und dadurch gesättigt. Durch diese dann vorliegende saure Umgebung wurden die Fettsäuren in ihre vollständig protonierte Form überführt und konnten besser fokussiert werden. Die mobile Phase wurde nach jedem Entwicklungsschritt abgesaugt und die Platte für 90 sec unter Vakuum getrocknet. Die gesamte Entwicklungszeit betrug 2,5 h.

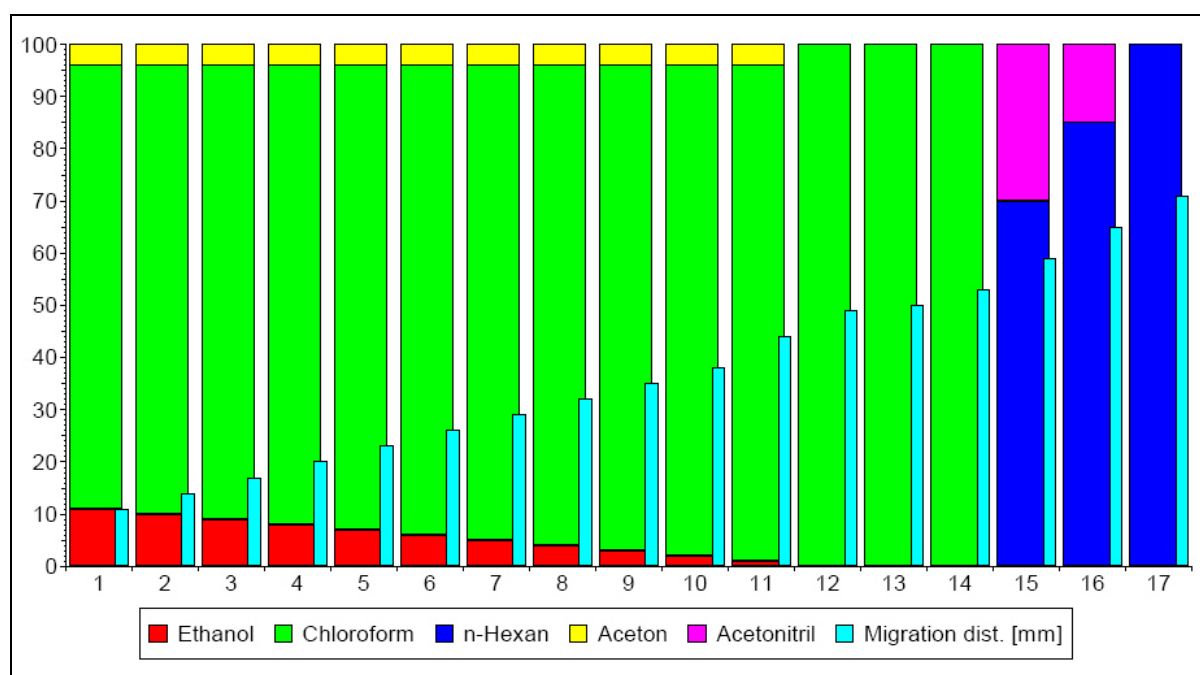


Abb. 11: Gradient der AMD-HPTLC-Methode nach [58]

3.3.3 Visualisierung und Detektion

Nach erfolgter Entwicklung wurde die trockene Platte 2 mal für 10 sec in eine Kupfersulfatlösung getaucht (10 % Kupfersulfat, 8 % Phosphorsäure, 5 % Methanol in gereinigtem Wasser) und anschließend für 30 min in einem auf 160 °C vorgeheizten Trockenschrank verascht. Dadurch wurden die vorher getrennten Lipide als braune Bande sichtbar, was eine densitometrische Auswertung ermöglichte. Die Detektion der Banden erfolgte mittels eines TLC-Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Schweiz). Dieses Densitometer arbeitet im Reflektionsmodus bei einer Wellenlänge von 546 nm. Die Banden wurden auf der Strecke zwischen 7 mm vom unteren Plattenrand bis zur Laufmittelfront mit einer Geschwindigkeit von 20 mm/s gescannt. Der Lichtstrahl hatte eine Breite von 4 mm und eine Höhe von 0,2 mm.

Nach Vollendung des Scanvorgangs lagen die Bahnen als Densitogramme vor, wobei die getrennten Banden in Form von Peaks dargestellt wurden. Zur Quantifizierung wurden die Peaks mittels der Software winCATS integriert. Die Quantifizierung der Lipide aus den Extraktionsproben wurde mit einzelnen Referenzkurven der Standardlipide durchgeführt. Die quantitative Bestimmung der Ceramide erfolgte nach Abgleich mit der Literatur [192] mit Hilfe der Standardkurve der Referenz CER[NP] (Abb. 12).

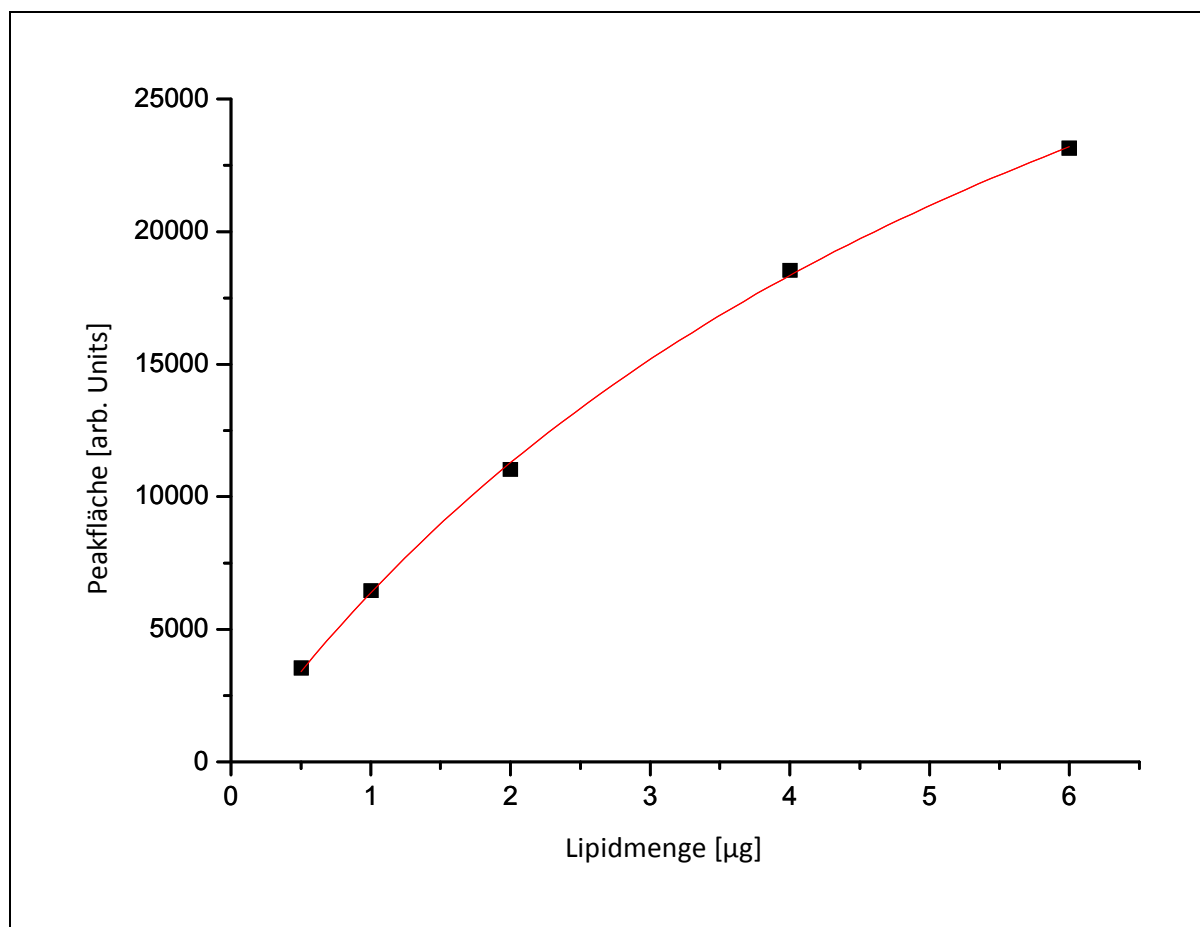


Abb. 12: Standardkurve von CER[NP] nach densitometrischer Auswertung (basierend auf der nichtlinearen Hill-Funktion)

Die Intensitäten der einzelnen CER-Banden im densitometrischen Profil unterscheiden sich, jedoch können über die mittlere Intensität des CER[NP] auch die CER quantifiziert werden, für die es keine Referenzsubstanzen im Handel gibt [192]. Da durch die experimentellen Bedingungen auch Schwankungen in den Intensitäten der Banden auftreten, wurde für jede Platte eine Standardkurve erzeugt. Schwankungen können hierbei unter anderem durch die Zusammensetzung der Kupfersulfatlösung, die Veraschungstemperatur und die Veraschungszeit verursacht werden.

3.4 Trennung der Ceramide mittels RP-HPLC-APCI-MS

Prinzipiell sind alle geladenen und ungeladenen Lipide mittels RP-HPLC-APCI-MS analysierbar, vorausgesetzt sie sind ionisierbar.

Das bei den RP-HPLC-APCI-MS-Experimenten genutzte HPLC-System bestand aus einer Pumpe Spectra System HP 1000, einem Probensammler AS 3000 und einem Ionenfallenspektrometer Finnigan LCQ, ausgestattet mit einer APCI-Quelle (Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland). Die verwendete Säule war eine Nucleosil 120 RP-8-Säule (125 x 2 mm ID, 3 µm Teilchengröße, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Es wurde ein binärer Gradient (Abb. 13) bestehend aus Methanol/Wasser 93:7 (V/V) (A) und Methanol (B) für die Elution genutzt [28].

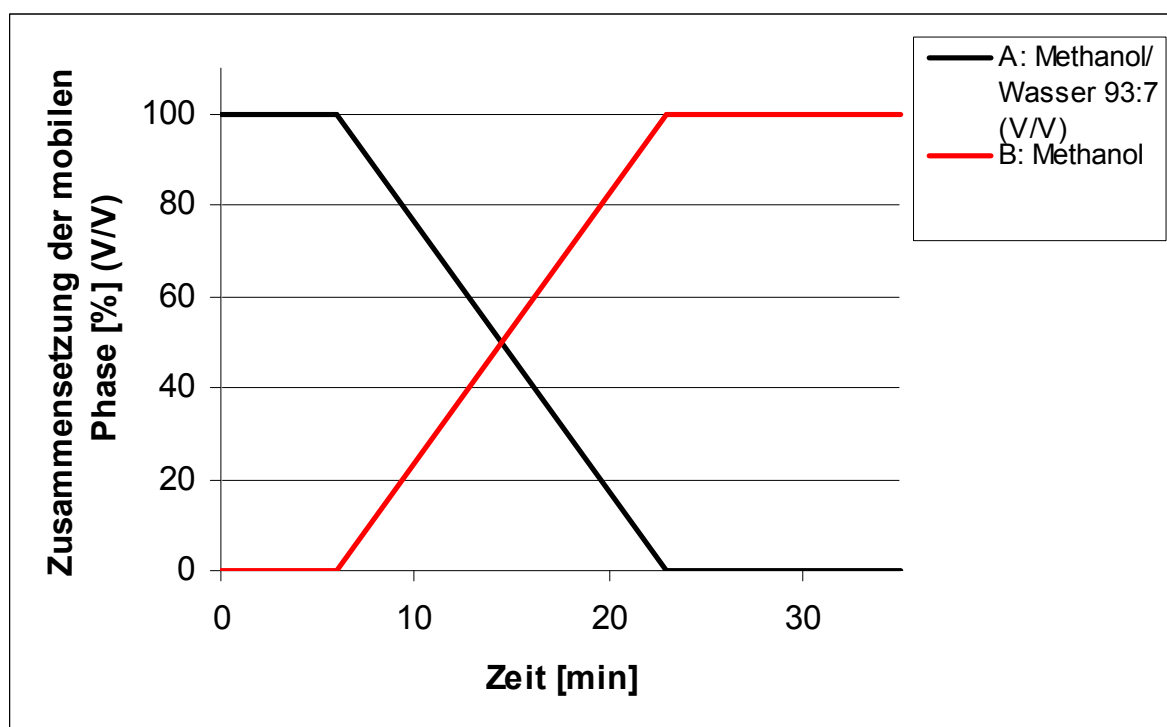


Abb. 13: Gradient der RP-HPLC-APCI-MS-Methode

Die Säule wurde auf 30 °C temperiert, die Kapillare auf 200 °C und das Evaporationsrohr hatte eine Temperatur von 500 °C. Stickstoff wurde als Sprüh- und Evaporationsgas eingesetzt, dessen Flußrate bei 9 und 12 l/min lag. Durch die Software Xcalibur Version 1.0.0.1 wurde sowohl die chromatographische und massenspektrometrische Trennung gesteuert, als auch die entsprechenden Spektren aufgenommen. Um eine Kontamination des Spektrometers mit irrelevanten Lipiden zu verhindern, wurde die Messung so programmiert, dass der Fluß nur in der Zeit in den APCI-Kopf geleitet wurde, in der die CER

eluierten. Die injizierte Menge an Lipidlösung betrug 10 µl. Die APCI-MS wurde im positiven Ionenmodus betrieben, die Kapillartemperatur betrug 200 °C, die Spannung 4,5 kV.

3.5 Trennung der Ceramide mittels NP-HPLC-ELSD

Für die Normalphasen-HPLC-Trennung der SC-Ceramide wurde eine LichroCart-Säule 125-4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die stationäre Phase in der Säule waren Lichrospher-Partikel (5 µm) aus Kieselgel (Si 60). Eluiert wurden die Lipide mittels eines von Farwanah et al. [59] entwickelten Gradienten (Abb. 14). Zwei Elutionsmittel formten den Gradienten, Elutionsmittel A bestand aus Chloroform, Elutionsmittel B war eine Mischung aus Chloroform, n-Propanol und Essigsäure (80:20:2, V/V/V). Es wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min gearbeitet. CHCl₃ ist hierbei die lipophile, n-Propanol die hydrophile Komponente, welche in ihrer veränderten Zusammensetzung zur Auftrennung der Lipide beitragen. Die Essigsäure wird als „Modifizier“ eingesetzt, damit es nicht zu einer unerwünschten Peakverbreiterung kommt.

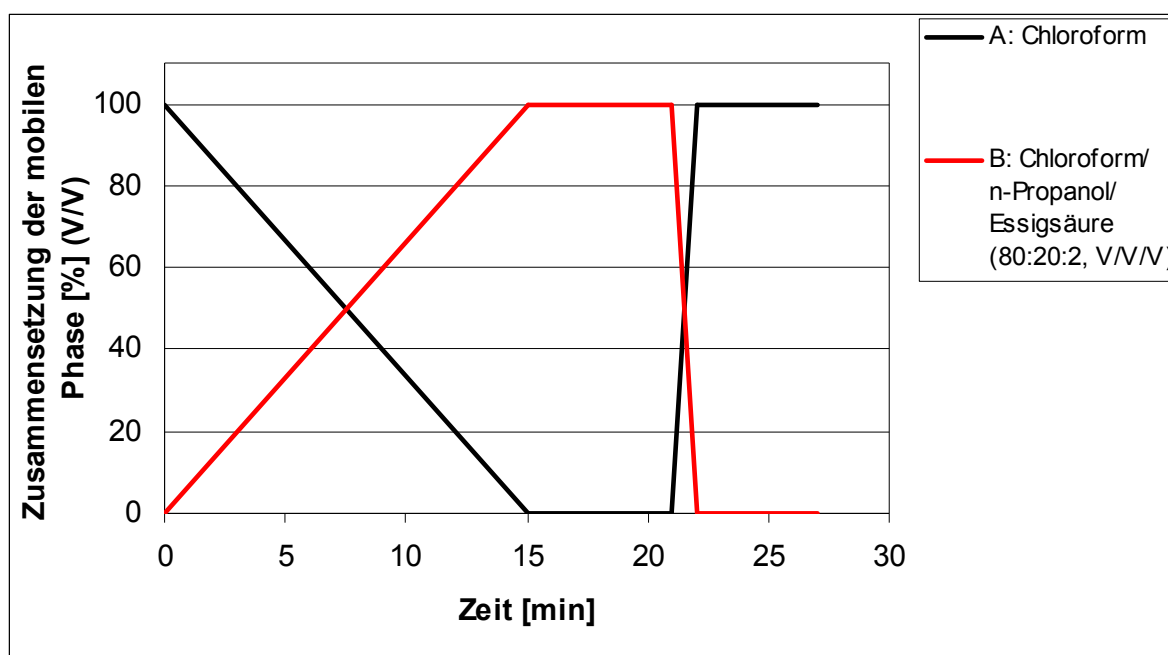


Abb. 14: Gradient der NP-HPLC-ELSD-Methode

Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe PU 980 mit einer quartären Gradienteneinheit LG 1580-02 (Jasco, Tokio, Japan). Der genutzte ELSD-Detektor war vom Typ Sedex 55 (SEDERE, Alfortville, Frankreich). Die Applikation der Proben erfolgte manuell über ein Rheodyne-Ventil (Bensheim, Deutschland). Die Verdampfungstemperatur betrug 80 °C, das

Verneblungsgas (Stickstoff) hatte einen Druck von 1,9 bar. Der Signalverstärker (gain) wurde auf Stufe 8 eingestellt.

Dieser Versuchsaufbau wurde zur präparativen Trennung der Ceramidfraktionen entsprechend ihrer Retentionszeiten genutzt. Hierfür wurde an das Ende der Säule über ein T-Stück eine entsprechende Peakkapillare angeschlossen, die die gleiche Länge hatte wie der Zufluss zum ELSD-Detektor damit die Fraktionssammelzeiten identisch zu den Retentionszeiten der Ceramide sind.

3.6 Trennung der freien Fettsäuren mittels GC-MS

Die Kapillargaschromatografie in Kopplung mit der Massenspektrometrie ist die Methode der Wahl in der Fettsäureanalytik. Wichtigste Ionisationsart ist die Elektronenstoßionisation, deren Vorteil es ist, bibliothekssuchbare Massenspektren zu erzeugen, die allerdings sinnvollerweise auf einen Massenbereich bis 750 Da begrenzt sind. Voraussetzung für die Gaschromatographie ist, daß der Analyt unzersetzt verdampfbar ist, wodurch polare Verbindungen häufig derivatisiert werden müssen.

Die Probenvorbereitung für die GC-MS-Analytik ist aufwendig, da die FFA von den anderen SC-Lipiden separiert werden müssen, da diese einer direkten Gaschromatographie nicht zugänglich sind. Ein genau definiertes Volumen der in vivo Oberflächenextrakte wurde entnommen und mit Sterinsäure-D31 als internem Standard versetzt. Diese Mischung wurde unter Stickstoffbegasung bei 50 °C evaporisiert und der Rückstand in 1 ml CHCl₃/MeOH 2:1 (V/V) aufgenommen. Die Auftrennung der Lipide fand mittels AMD-HPTLC, wie unter Abschnitt 3.3 beschrieben, statt. Eine postchromatographische Derivatisierung wurde nicht vorgenommen, stattdessen wurde die Bande mit den FFA entsprechend ihres R_f-Wertes mittels Skalpell von der HPTLC-Platte abgekratzt. Um die FFA vom Plattenmaterial zu lösen, wurde eine Lösung von n-Hexan/MeOH 95:5 (V/V) zugegeben und im Ultraschallbad die Lipide gelöst, im Anschluß zentrifugiert, der Überstand abgenommen und unter Stickstoffbegasung evaporisiert. Für die anschließenden GC-Messungen wurde der Rückstand in 100 µl Ethylacetat gelöst, und zu dieser Lösung 50 µl Trimethylsulfoniumhydroxid hinzugegeben und für 1 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um die Fettsäuren in ihre Methylester zu derivatisieren und somit deren Polarität herabzusetzen.

Die GC-MS-Experimente wurden an einer Varian GC-Anlage (Agilent, Waldbronn, Deutschland), die an ein Magnum Massenspektrometer (Thermo-Fischer, Dreieich, Deutschland) gekoppelt war, durchgeführt. Die verwendete GC-Säule war eine Optima-5 (30 m x 0,32 mm ID, Filmdicke 0,1 µm) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Um die FFA zu eluieren wurde ein Temperaturprogramm verwendet, in dem die Temperatur innerhalb von 30 min von 80 °C auf 280 °C gleichmäßig erhöht wurde. Für die Injektion wurde ein Splitt/Splittless-Injektor genutzt, der auf 260 °C beheizt wurde. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl, das Trägergas war Helium. Die einzelnen Fettsäureester wurden per MS mit Hilfe des Magnum Ionenfallenmassenspektrometers identifiziert, das mit Elektronenstoßionisation arbeitet. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte über Spektrenbibliotheken.

3.7 Tandemmassenspektrometrische Untersuchungen der Ceramide

Die unter Kapitel 3.2 gewonnenen Proben wurden für tandemmassenspektrometrische Experimente herangezogen.

Statische Nano-ESI-MS und Nano-ESI-MS/MS Experimente wurden an einem Quadrupol-time of flight (QTOF) Massenspektrometer (Q-TOF-2) von Waters (Waters/Micromass, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit einer Nano-ESI Z-Spray Quelle. Das Gerät wurde sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus unter folgenden Bedingungen betrieben: Spannung der Kapillare 900 V, Cone-Spannung 35 V und Source-Temperatur 80 °C. Für die tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen wurde das entsprechende Ausgangs-Ion manuell ausgewählt und einer stoßinduzierten Fragmentierung ausgesetzt. Die Kollisionsenergie variierte dabei zwischen 10 und 35 eV, je nach zu untersuchendem Molekül.

Für die Messungen wurde eine ausgezogene Glaskapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von 0,7 – 5 µm mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt und in die Nano-ESI Z-Spray Quelle eingespannt. Die Lösung versprüht sich dabei durch das angelegte elektrische Feld von selbst.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analytik der Hautlipide

4.1.1 Charakterisierung der SC-Ceramide mittels RP-HPLC-APCI-MS

Ein wichtiger Teil dieser Arbeit war die tandemmassenspektrometrische Untersuchung der Ceramide in Bezug auf die Zusammensetzung der Kettenlängen der Sphingoidbasis und der amidgebundenen FA. Es mussten dafür zunächst die Spezies der einzelnen Ceramidklassen hinsichtlich ihrer Gesamtkohlenstoffzahl bestimmt werden. Zu diesem Zweck bietet sich die chromatographische Trennung an einer Umkehrphase an, da hierbei nicht die einzelnen Ceramidklassen aufgetrennt werden, sondern eine Elution aufgrund der Lipophilie in Abhängigkeit von der Kohlenstoffanzahl im Molekül der Ceramidspezies erfolgt. Dabei muß beachtet werden, dass Spezies, die aus verschiedenen Ceramidklassen stammen, aber ähnliche Lipophilie und gleiche m/z -Werte aufweisen, nicht voneinander unterschieden werden können. Mittels der massenspektrometrischen Detektion konnten so charakteristische Profile der einzelnen Ceramidklassen erzeugt werden [57,158].

Die Parameter wurden so eingestellt, dass während der massenspektrometrischen Detektion ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht wurde und außerdem eine unerwünschte Zersetzung der Moleküle im Ionisationsprozess so gering wie möglich gehalten wurde. Das Sprüh- und Trocknungsgas war Stickstoff, dessen Strömungsgeschwindigkeit an die Flußrate der HPLC von 1 ml/min angepasst wurde. Die Temperaturen für die Kapillare und für die Evaporisierung wurden so gewählt, dass ein Zerfall der Moleküle im positiven Ionenmodus definiert bzw. so gering wie möglich ablief. So wurde bei den CER, deren Basis Sphingosin bzw. Hydroxysphingosin waren (CER[AH], CER[AS], CER[EOH], CER[EOS], CER[NH], CER[NS]), ein Wassermolekül abgespalten. Begünstigt wird diese Wasserabspaltung durch die Ausbildung einer zusätzlichen Doppelbindung, die in Konjugation der ursprünglichen Doppelbindung entsteht, wodurch die positive Ladung mesomeriestabilisiert ist. Diese Moleküle wurden als Molekül-Ion $[M-H_2O+H]^+$ detektiert. Die CER auf Phytosphingosinbasis (CER[AP], CER[NP], CER[EOP]) werden lediglich protoniert und erscheinen als $[M+H]^+$. Die Messungen wurden dabei an der bisher größten Probandenzahl vorgenommen ($n = 75$). Die erhaltenen Ergebnisse geben somit ein umfassendes Bild von der Verteilung der CER-Subspezies im humanen SC. Es wurde davon ausgegangen, dass unter den gewählten Bedingungen alle CER-Subspezies gleichermaßen ionisiert werden.

Ergebnisse und Diskussion

Im Vorfeld der Messungen wurden die möglicherweise vorkommenden monoisotopischen Massen der SC-CER berechnet (vgl. Tab. 5 und Tab. 6). Um nach Möglichkeit alle Subspezies abzubilden, wurde ein breiter Detektionsbereich von 400 - 1500 Da gewählt. So konnten sowohl die eher kürzerkettigen Moleküle des CER[AS] als auch die längerkettigen Moleküle wie CER[EOH], CER[EOP] und CER[EOS] in einer Messung detektiert werden. Zur Verfügung standen Ceramidstandards für CER[AS], CER[AP], CER[EOS], CER[NP] und CER[NS]. Somit konnten nur für diese nachfolgend die tandemmassenspektrometrischen Experimente durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden bei den RP-HPLC-APCI-MS-Experimenten nur die Daten für diese CER ausgewertet.

Tab. 5: Molekülmassen der ungeladenen Ceramide (CER[AS], CER[AP], CER[NS], CER[NP]) bezogen auf deren Gesamtkohlenstoffanzahl im Molekül

Gesamtkohlenstoffanzahl	Massen CER[AS] (Da)	Massen CER[AP] (Da)	Massen CER[NS] (Da)	Massen CER[NP] (Da)
C38		627.58		
C39		641.60		
C40	637.61	655.61	621.60	639.62
C41	651.62	669.63	635.62	653.63
C42	665.64	683.65	649.64	667.65
C43	679.66	697.66	663.65	681.66
C44	693.67	711.68	677.67	695.68
C45	707.69	725.70	691.68	709.70
C46	721.71	739.71	705.70	723.71
C47	735.72	753.73	719.72	737.73
C48	749.74	767.75	733.73	751.74
C49	763.76		747.75	765.76
C50	777.77		761.76	779.77
C51			775.78	793.79
C52			789.79	807.81
C53			803.81	

Tab. 6: Molekülmassen des ungeladenen CER[EOS], bezogen auf dessen Gesamtkohlenstoffanzahl im Molekül

Gesamtkohlenstoffanzahl	Massen CER[EOS] (Da)
C64	983.92
C65	997.94
C66	1011.96
C67	1025.97
C68	1039.99
C69	1054.00
C70	1068.02
C71	1082.03
C72	1096.05

Tandemmassenspektrometrische Messungen wurden mit dieser Methode nicht durchgeführt, da wenig Analysematerial für Wiederholungen vorhanden war. Außerdem ist die HPLC zu schnell für die MS/MS-Messungen an der Ionenfalle, um wirklich alle Subspezies zu detektieren.

Die detektierten Subspezies des nativen **CER[EOS]** sind in Abb. 15 dargestellt. Die dazugehörigen monoisotopischen Massen sind in Tab. 6 zu finden.

Für das CER[EOS] wurden Subspezies zwischen C64-72 gefunden, die höchste Intensität hatte das CER[EOS] mit 68 Kohlenstoffatomen. In früheren Untersuchungen mit der gleichen Methode wurden für das CER[EOS] Subspezies zwischen C64 - 72 detektiert, hier hatte das CER[EOS] mit C68 bzw. C70 die höchste Intensität [57,62,187,188]. Masukawa et al. konnten mittels NP-HPLC-APCI-MS Subspezies zwischen C66-72 identifizieren, das CER[EOS] mit 68 Kohlenstoffatomen hatte auch hier die höchste Intensität [131]. Ebenfalls mittels NP-HPLC-APCI-MS fanden van Smeden et al. und Thakoersing et al. Subspezies, die sich über den Bereich von C64-76 erstrecken, die höchste Intensität hatte hierbei das CER[EOS] mit C66 [180,185]. Die geringen Variationen in den Ergebnissen beruhen u.a. auf der interindividuellen Variabilität und anderen Einflußfaktoren (vgl. Kapitel 2.3).

Ergebnisse und Diskussion

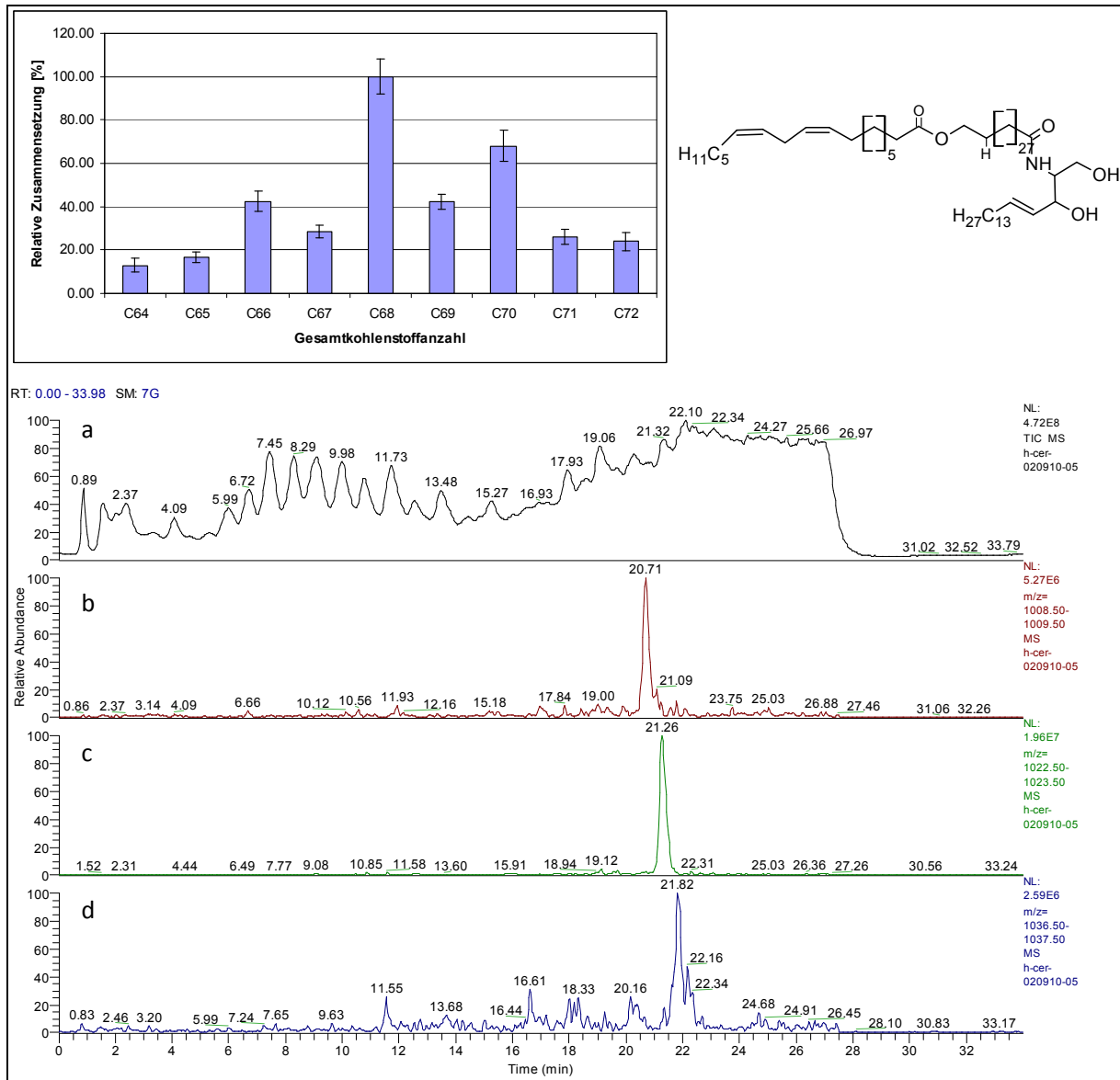


Abb. 15: oben: Relative Zusammensetzung der detektierten Subspezies des nativen CER[EOS]; die häufigste Subspezies wurde auf 100 % gesetzt (Mittelwert \pm SD, n = 75); unten: Ausschnitt der CER[EOS]-Trennung mittels RP-HPLC-APCI-MS (a: Chromatogramm des Totalionenstroms, b: CER[EOS] mit C67, c: CER[EOS] mit C68, d: CER[EOS] mit C69)

Die detektierten Subspezies des nativen **CER[NP]** sind in Abb. 16 dargestellt. Die dazugehörigen monoisotopischen Massen sind in Tab. 5 zu finden.

Für das CER[NP] wurden Subspezies zwischen C40 - 52 gefunden, die höchste Intensität hatte das CER[NP] mit 46 Kohlenstoffatomen. In früheren Untersuchungen mit der gleichen Methode wurden für das CER[NP] Subspezies zwischen C38 - 54 bzw. C42 - 50 detektiert, hier hatte das CER[NP] mit C46 die höchste Intensität [57,62,187,188]. Masukawa et al. konnten mittels NP-HPLC-APCI-MS Subspezies zwischen C38 - 52 identifizieren, die CER[NP] mit 44 und 46 Kohlenstoffatomen hatten bei diesen Messungen die höchsten Intensitäten

Ergebnisse und Diskussion

den Ergebnissen beruhen u.a. auf der interindividuellen Variabilität und anderen Einflußfaktoren (vgl. Kapitel 2.3).

Die detektierten Subspezies des nativen CER[AP] sind in Abb. 18 dargestellt. Die dazugehörigen monoisotopischen Massen sind in Tab. 5 zu finden.

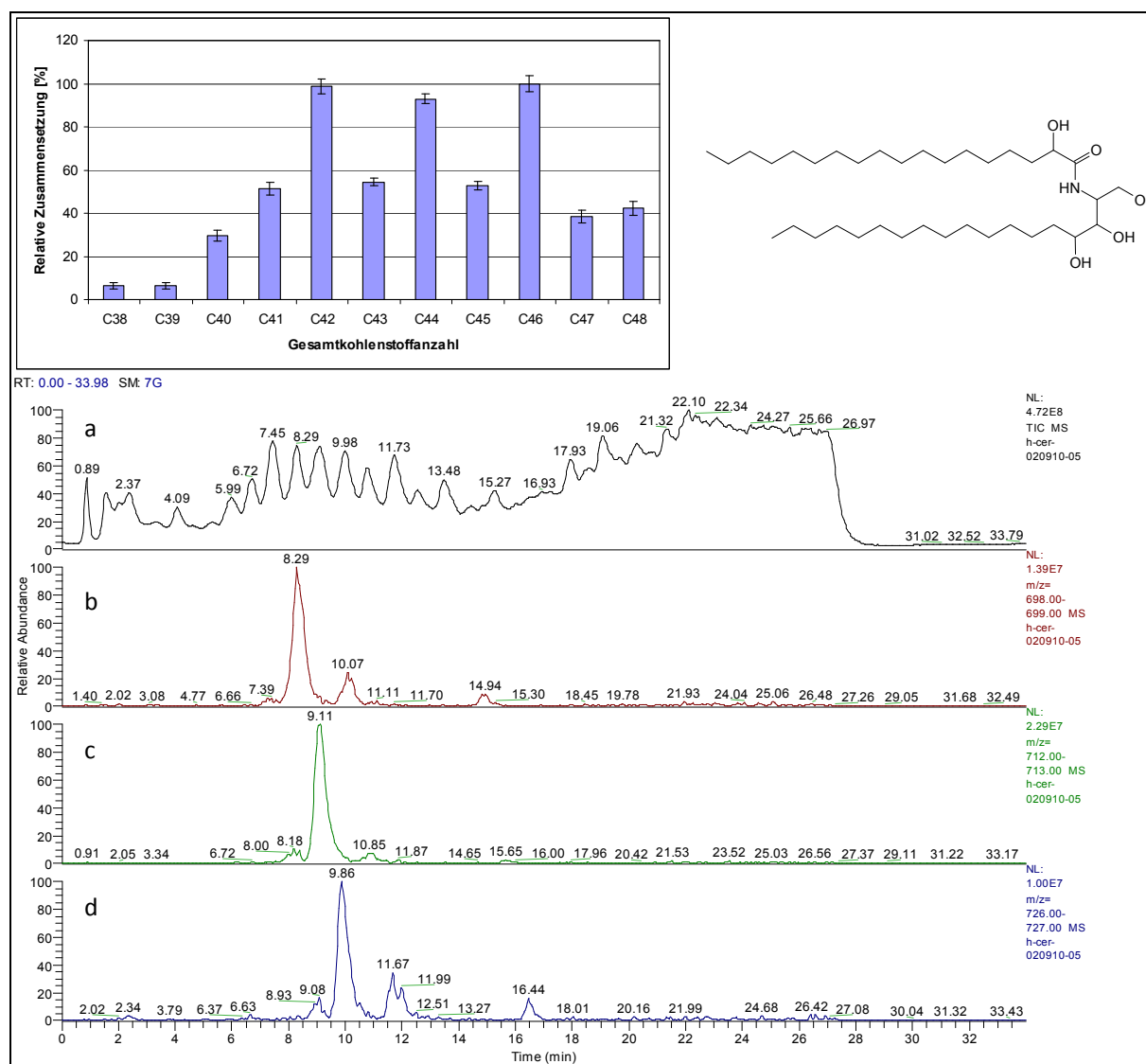


Abb. 18: oben: Relative Zusammensetzung der detektierten Subspezies des nativen CER[AP]; die häufigste Subspezies wurde auf 100 % gesetzt (Mittelwert \pm SD, n = 75); unten: Ausschnitt der CER[AP]-Trennung mittels RP-HPLC-APCI-MS (a: Chromatogramm des Totalionenstroms, b: CER[AP] mit C43, c: CER[AP] mit C44, d: CER[AP] mit C45)

Für das CER[AP] wurden Subspezies zwischen C38 - 48 gefunden, die höchste Intensität hatten die CER[AP] mit 42, 44 und 46 Kohlenstoffatomen. In früheren Untersuchungen mit der gleichen Methode wurden für das CER[AP] Subspezies zwischen C38 - 50 bzw. C42 - 48 detektiert, hier hatten die CER[AP] mit C42, C44 und C46 die höchsten Intensitäten

Ergebnisse und Diskussion

[57,62,187,188]. Masukawa et al. konnten mittels NP-HPLC-APCI-MS Subspezies zwischen C37 - 50 identifizieren, die CER[AP] mit 44 und 46 Kohlenstoffatomen hatten bei diesen Messungen die höchsten Intensitäten [131]. Ebenfalls mittels NP-HPLC-APCI-MS fanden van Smeden et al. und Thakoersing et al. Subspezies, die sich über den Bereich von C40 - 48 erstrecken, die höchste Intensität hatte hierbei wiederum die CER[AP] mit C42, C44 und C46 [180,185]. Die geringen Variationen in den Ergebnissen beruhen u.a. auf der interindividuellen Variabilität und anderen Einflußfaktoren (vgl. Kapitel 2.3).

Die detektierten Subspezies des nativen CER[AS] sind in Abb. 19 dargestellt. Die dazugehörigen monoisotopischen Massen sind in Tab. 5 zu finden.

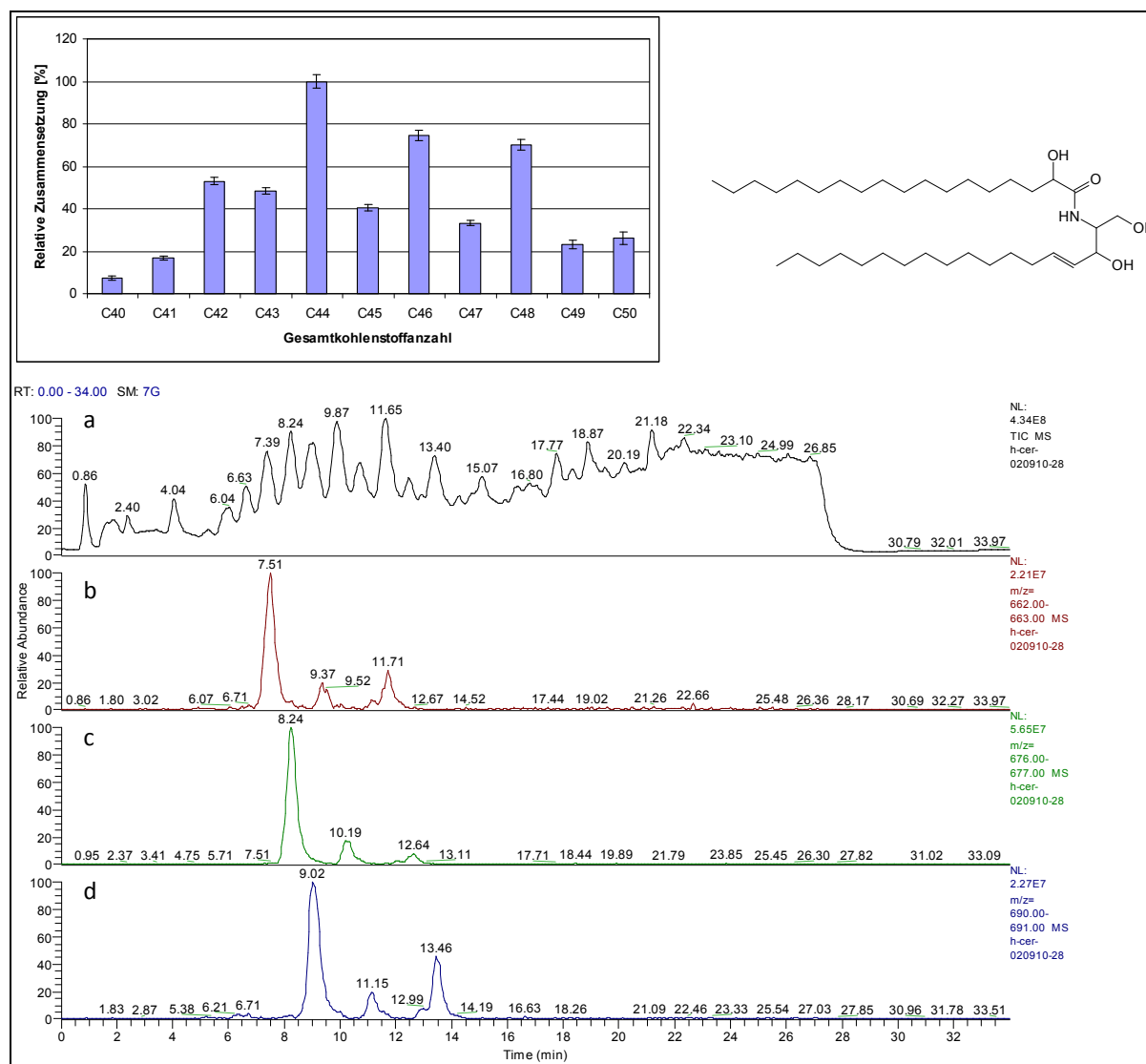


Abb. 19: oben: Relative Zusammensetzung der detektierten Subspezies des nativen CER[AS]; die häufigste Subspezies wurde auf 100 % gesetzt (Mittelwert \pm SD, n = 75); unten: Ausschnitt der CER[AS]-Trennung mittels RP-HPLC-APCI-MS (a: Chromatogramm des Totalionenstroms, b: CER[AS] mit C43, c: CER[AS] mit C44, d: CER[AS] mit C45)

CER[AS] ist bisher häufig als sehr kleines Molekül im Vergleich zu den anderen SC-CER beschrieben worden, mit Subspezies zwischen C31 - 36, wobei die Subspezies mit C32 bzw. C34 am häufigsten vorkommen [62,80,151,184,195]. In dieser Arbeit wurden CER[AS]-Subspezies mit C40 - 50 gefunden mit dem stärksten Vertreter C44. Vietzke et al. konnten mit der gleichen Methode CER[AS]-Subspezies im Bereich C40 - 54 detektieren, wiederum hatte die Subspezies mit C44 die höchste Intensität. Masukawa et al. konnten für das CER[AS] die größte Anzahl an Subspezies identifizieren, sie erstreckten sich über einen Bereich von C34 - 50, die Subspezies mit C44 hatte die höchste Intensität [131]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das CER[AS] der höchsten Variabilität unterliegt. Es sollte noch genauer untersucht werden, welche Faktoren hierbei die Zusammensetzung der Subspezies vorrangig beeinflussen.

In allen Ceramidklassen nahmen die Ceramide mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen im Gesamtmolekül einen Anteil von 30 – 36 % in der jeweiligen CER-Klasse ein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ein Verhältnis von gerader zu ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen im Ceramidmolekül von 65/35 vorgefunden haben [177].

Gerade die längerkettigen CER ($C \geq 43$) sind wichtig für die Integrität und Funktionalität des Bilayers [104,186].

Die Subspezies der CERs können hierbei sowohl aus Variationen der Kettenlängen der Sphingoidbasis als auch der amidartig gebundenen FFA resultieren. Im Falle der CER[EOS] kann auch die Kettenlänge der veresterten FFA zu einer veränderten Gesamtkohlenstoffanzahl beitragen. Um diese Kettenlängenvariationen näher zu prüfen, wurden weitergehende Untersuchungen mittels QTOF-MS/MS (Kapitel 4.1.4.5) durchgeführt.

Eine ESI-MS-Bestimmung nach vorheriger HPTLC-Auftrennung ist bereits von Raith et al. durchgeführt worden, um die Profile der SC-CER näher zu untersuchen [156-158], wobei zum ersten Mal CER mit ungeraden Kettenlängen entdeckt worden sind [158]. Die entsprechenden CER-Banden wurden hierfür von der HPTLC-Platte abgekratzt, die CER aus dem Plattenmaterial herausgelöst und anschließend vermessen. Diese Methode war bereits weniger aufwändig als die zuvor angewandte massenspektrometrische Analytik mittels GC-MS. Hierfür musste die Amidbindung der CER noch hydrolysiert und derivatisiert werden, jedoch konnten dabei Fehler auftreten, da die Derivatisierung nicht vollständig abläuft

[118,197,201]. Die Untersuchungen von Raith et al. haben ergeben, dass die häufigste Kettenlänge für die Sphingosinbasis C18 ist [201,203]. Doch sowohl die Kettenlänge der Sphingoidbasis als auch die Kettenlänge der amidgebundenen FA können innerhalb der homologen Reihe um eine Methylgruppe variieren. Aus diesem Grund wurden die Ceramidsubspezies in dieser Arbeit nach ihrer Gesamtkohlenstoffanzahl bezeichnet. Innerhalb der homologen Reihe hat es Intensitätsunterschiede in der Signalstärke gegeben. Moleküle mit ungerader Gesamtkohlenstoffanzahl kommen in der Natur seltener vor, da geradzahlige Moleküle in der Biosynthese begünstigt werden [187].

4.1.2 Trennung der Ceramidklassen für die Tandemmassenspektrometrie

Als Vorbereitung für die MS/MS-Experimente mußten die einzelnen Ceramidklassen aufgetrennt werden, da die Mischungen ansonsten zu komplex gewesen wären [158]. Die Massen unterschiedlicher Subspezies der einzelnen Ceramidklassen liegen teilweise nur wenige Da auseinander, wodurch die Auswertung erheblich erschwert werden kann. Durch vorherige Auftrennung der Ceramidklassen kann dieser Störfaktor eliminiert werden.

Um die absolute Menge an Ceramiden zu erhöhen, wurden die unter Kapitel 3.2 gewonnenen Proben der Kontrollgruppe gepoolt.

Zunächst wurde versucht, die CER über eine HPTLC-Platte zu trennen. Hierfür wurde die 10-fache Menge an Probe, die normalerweise für eine Quantifizierung der Lipide benötigt wird, auf die Platte aufgetragen und die unter Kapitel 3.3.2 beschriebene Entwicklung der Platte mittels AMD durchgeführt. Im Anschluß wurden die Lipide auf der Platte nicht verascht. Die Bande des CER[EOS] wurde über den R_f -Wert bestimmt und von der Platte mit Hilfe eines Skalpell gekratzt. Im Anschluß wurde versucht, das CER[EOS] mit einem geeigneten Lösungsmittel unter Ultraschall vom Kieselgel zu reextrahieren. Der erste Versuch erfolgte hierbei mit einer Mischung aus Hexan/Ethanol 95/5 (V/V). Doch dieses Lösungsmittelgemisch stellte sich als zu lipophil für CER[EOS] heraus, da bei anschließender Überprüfung der Lösung mittels HPTLC kein CER[EOS] detektiert werden konnte. Ein weiterer Extraktionsversuch erfolgte mit einer Mischung aus CHCl_3 /MeOH 1:3 (V/V), welches sich als geeigneter herausstellte, da bei anschließender HPTLC-Überprüfung CER[EOS] detektiert werden konnte. Nach vollständiger Trocknung der Lösung wurde der Rückstand in einer Mischung aus CHCl_3 /MeOH 1:9 (V/V) aufgenommen und für die tandemmassenspektrometrische Bestimmung herangezogen. Bei der Messung konnte

allerdings kein CER[EOS] detektiert werden, da in der Lösung eine störende Substanz enthalten war (vgl. Abb. 20).

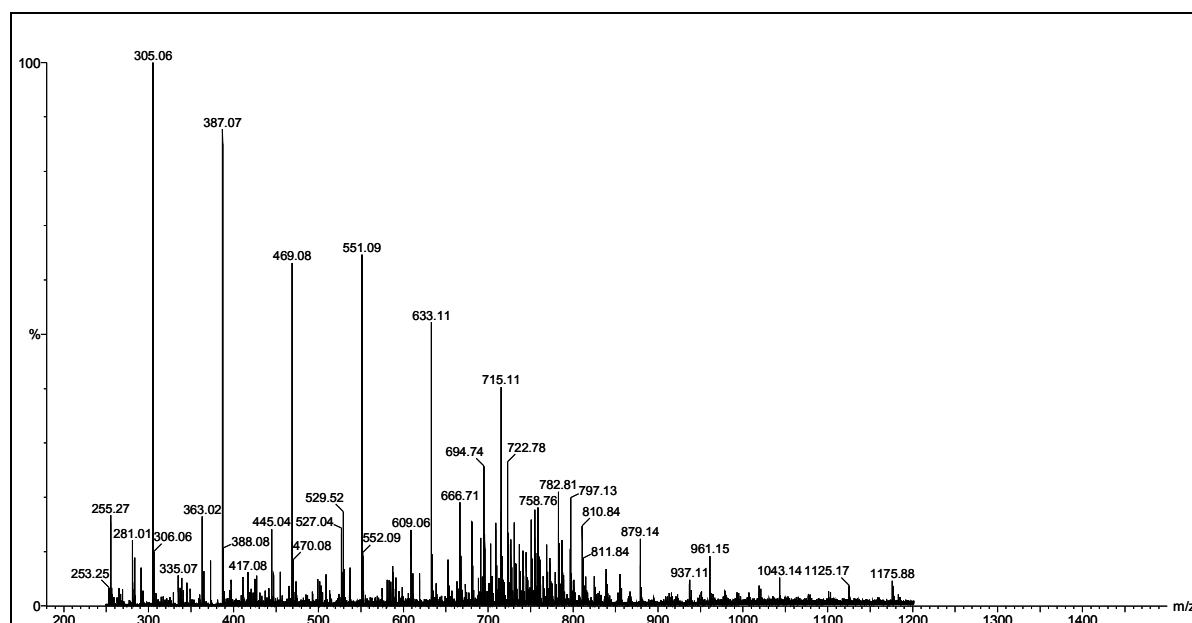


Abb. 20: MS-Spektrum des CER[EOS] (extrahiert aus der HPTLC-Platte)

Nach einer Nachfrage bei dem Hersteller hat sich herausgestellt, dass als Bindemittel in dem Kieselgel ein organischer Gelbildner verwendet wird, welcher in geringen Mengen ebenfalls extrahiert wurde. Aufgrund der hydrophilen Strukturen in dem Gelbildner ist dieses gerade im herangezogenen negativen Ionenmodus sehr viel leichter zu ionisieren und beeinträchtigt die Messung dadurch erheblich, auch wenn es nur in Spuren enthalten ist.

Der nächste Versuch erfolgte unter Verwendung von semipräparativen Dickschichtplatten (20 x 20 cm) der Firma Merck, da diese laut Firmenauskunft kein Bindemittel enthalten sollten. Da für die Dickschichtplatten eine erheblich höhere Menge an Lipidmischung benötigt wurde, wurde diese mit Hilfe eines so genannten Auftragekamms auf die Platte aufgebracht. Da die Platten zu groß für die AMD-Entwicklungskammer waren, wurde die Gradientenentwicklung der Platte manuell in einer DC-Glaskammer durchgeführt. Die einzelnen Lösungsmittelgemische wurden hierfür hergestellt und anstatt einer Vorkonditionierung der Platte wurde die Essigsäure direkt dem Lösungsmittel zugesetzt. Aufgrund der doppelten Höhe der Platte wurde auch die Laufstrecke der einzelnen Gradientenschritte verdoppelt. Somit konnte das Ende des jeweiligen Schrittes leichter visuell bestimmt werden. Nach jedem Gradientenschritt wurden die Platten für 30 min bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Lage der Lipidbanden wurde im Anschluss mittels

Anfärbung mit Bromthymolblau bestimmt. Hierfür wurde ein schmaler Streifen auf einer Seite der Platte vom restlichen Kieselgel getrennt und dieser Streifen in eine Lösung aus Bromthymolblau getaucht. An den Stellen, an denen Ceramidfraktionen zu finden sind, entfärbt sich dabei das Detektionsmittel, wobei der exakte Reaktionsmechanismus für diese Reaktion noch nicht genau geklärt ist [2]. Nach Bedampfen mit Ammoniak bildeten sich blaue Flecken an den Stellen, an denen die CER zu finden waren. Es ist zu vermuten, dass eine Bildung von Charge-Transfer-Komplexen erfolgt [113]. Aus dem Rest der Platte wurden die Fraktionen der Ceramide abgekratzt und wiederum mittels $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:3 extrahiert. Auch hier wurde der Erfolg der Extraktion wiederum mittels HPTLC überprüft. Die nachfolgenden tandemmassenspektrometrischen Messungen führten zu keinem Erfolg, da in den Untersuchungen wiederum eine Störsubstanz auftauchte, die ein Muster lieferte, das an den gleichen organischen Gelbildner wie in den HPTLC-Platten erinnerte.

Für einen weiteren Versuch wurde aus diesem Grund die Dickschichtplatte selbst hergestellt, da hierbei sichergestellt werden konnte, dass kein organischer Gelbildner als Bindemittel im Kieselgel enthalten ist. Allerdings musste ein Bindemittel beigemischt werden, in diesem Fall Gips. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bei der industriell von Merck hergestellten Platte. Es musste jedoch festgestellt werden, dass selbst der Gips in geringen Mengen durch das Extraktionsmittel herausgelöst wurde und somit auch diese Vorgehensweise zu keinem verwertbaren Ergebnis führte, da der Gips an der Spitze der Nadel auskristallisierte. Dadurch verstopfte die Düse und es wurde kein kontinuierliches Spray erzeugt.

Als erfolgreicher Versuch konnte schließlich die Auftrennung mittels Normalphasen-HPLC gewertet werden. Das verwendete System und die Methode wurden im Kapitel 3.5 beschrieben.

Zunächst wurde die Methode mittels ELSD-Detektion überprüft. Hierzu wurde eine Standardlösung verschiedener Lipide eingesetzt. Die Mischung bestand aus CER[NP], CER[AS], CER[AP], CER[EOS], freien Fettsäuren, Cholesterol und Triglyceriden. Nach Auftrennung der Standardlipide wurde eine Lösung mit Lipiden vermessen, die aus den SC gewonnen wurde (Abb. 21).

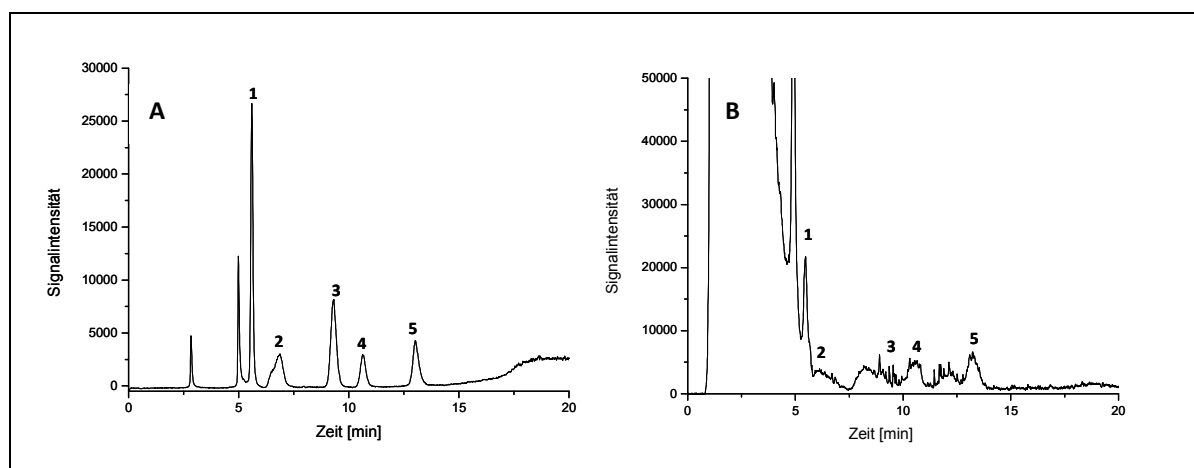


Abb. 21: HPLC-ELSD Chromatogramm, A: CER-Standards, B: Hautprobe; 1: CER[AP], 2: CER[AS], 3: CER[NP], 4: CER[NS], 5: CER[EOS]

Für die Auftrennung der Fraktionen wurde an das Ende der Säule anstatt des Zuleitungsschlauchs zum ELSD-Detektor nun eine Peakkapillare angebracht, welche allerdings die gleiche Länge hatte wie der Verbindungsschlauch zwischen HPLC und Detektor. Somit konnten die gleichen Retentionszeiten herangezogen werden, um die Fraktionen zu sammeln. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt, indem der Schlauch je nach Retentionszeit von einem Reagenzglas zum nächsten weitergeführt wurde. Die Lösungen wurden unter Stickstoffatmosphäre bis zur Trockenheit eingedampft und der Rückstand in 1 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:3 (V/V) aufgenommen. Der Erfolg der Auftrennung wurde wiederum mittels HPTLC überprüft. In Abb. 22 sind die gesammelten Fraktionen zu sehen, die in ihren Laufverhalten den bisher bekannten Ceramidklassen entsprachen.

Die Reste der Lösungen wurden nochmals bis zur Trockenheit eingedampft und in 100 μl $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:9 (V/V) aufgenommen um sie anschließend direkt mittels QTOF-MS/MS zu vermessen.

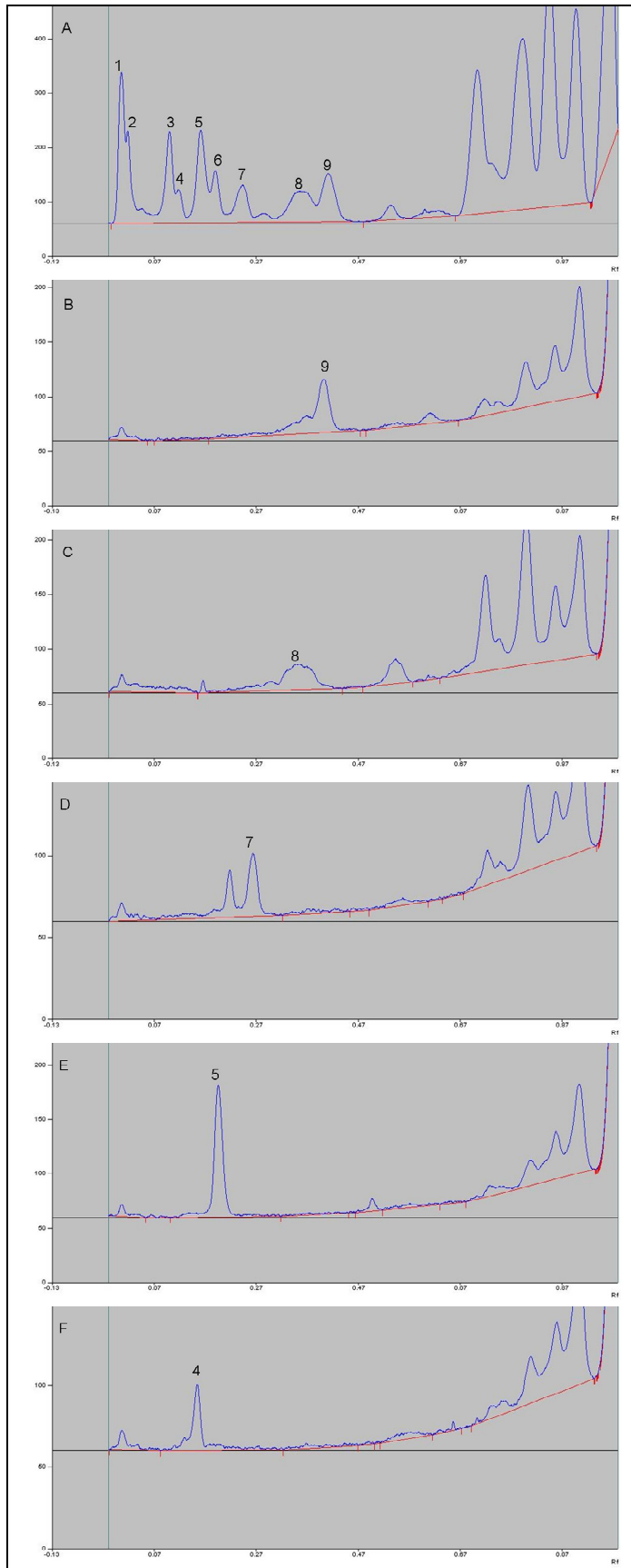


Abb. 22: Densitogramme; A: Lipide aus in vivo-Oberflächenextraktion; B-F: Fraktionen nach NP-HPLC-Auftrennung. 1: Start, 2: Cholesterolsulfat, 3: CER[AH], 4: CER[AP], 5: CER[NH/AS], 6: CER[EOH], 7: CER[NP], 8: CER[NS], 9: CER[EOS]

4.1.3 Tandemmassenspektrometrische Charakterisierung der Ceramidstandards

Für die Identifizierung der isobaren Subspezies der nativen SC-Ceramide mittels MS/MS ist es wichtig, vorher die Standards der CERs tandemmassenspektrometrisch zu untersuchen.

Die Standards der CERs mit definierten Kettenlängen wurden einzeln in einer Mischung aus Chloroform/Methanol 1:9 (V/V) gelöst und mittels Nano-ESI-QTOF-MS/MS im negativen und positiven Ionenmodus vermessen, um das Fragmentierungsverhalten der natürlich vorkommenden CERs nachvollziehen zu können. Hierfür wurde die eine ausgezogene Glaskapillare mit der zu untersuchenden Lösung gefüllt und in das QTOF eingespannt. Die Lösung versprüht im elektrischen Feld von selbst, man spricht hierbei von einem statischen Spray. Es wurde keine Säure oder Base zu der Lösung gegeben, um leichter zwischen dem positiven und negativen Ionenmodus wechseln zu können. Wenn Chloroform Teil des Lösungsmittels ist, werden gerade im negativen Ionenmodus leicht Chloridaddukte $[M+Cl]^-$ gebildet, da $CHCl_3$ eine hohe Dielektrizitätskonstante aufweist [35,36,59,131,210]. Vor allem dann kommt es zu einer Chloridaddition, wenn in den Molekülen saure funktionelle Gruppen fehlen oder wenn die Analyten nur eine geringe Azidität aufweisen [35,210]. Diese Chloridaddukte sind sehr stabil und benötigen für die Fragmentierung mehr Energie. Aus diesem Grund bilden sie weniger Bruchstücke als ihre deprotonierten Partner, die eigentlichen Molekül-Ionen $[M-H]^-$, somit ist weniger Strukturinformation aus ihren Fragmentspektren zu erhalten [35,59,131,210]. Bei tandemmassenspektrometrischen Experimenten von $[M+Cl]^-$ mit niedriger Kollisionsenergie kommt es vor allem zu einer Abspaltung von HCl, wodurch das eigentliche Molekül-Ion entsteht, das in dem Fall nicht weiter fragmentiert werden kann [183,210]. Aus diesem Grund wurde für die MS/MS-Untersuchungen das weniger abundante $[M-H]^-$ ausgewählt.

Im positiven Ionenmodus werden neben der Protonierung der Moleküle $[M+H]^+$ auch Natriumaddukte $[M+Na]^+$ beobachtet [97,156]. Für die weiteren Fragmentierungsreaktionen wurde das Molekül-Ion $[M+H]^+$ ausgewählt.

Während der Fragmentierung wird ein Teil des Moleküls als neutrales Fragment abgespalten, wodurch es nicht mehr detektierbar ist. Die Ladung verbleibt an dem anderen Teil des Moleküls.

Die Ceramide durchlaufen verschiedene Spaltungsreaktionen. Neben Neutralverlusten und der „einfachen“ Aufspaltung der Amidbindung (bzw. der zusätzlichen Esterbindung im CER[EOS]) finden Umlagerungsreaktionen statt. Heteroatome fördern zusätzlich die Spaltung

der C-C-Bindung, die sich in alpha-Position zu ihnen befindet, da durch den elektronegativen Effekt der Heteroatome diese Bindung geschwächt wird.

Die Ableitung der CER-Strukturen aus den vorliegenden Fragmentierungsmustern wurde bisher noch nie so ausführlich beschrieben wie in dieser Arbeit.

4.1.3.1 Ceramid [EOS] – negativer und positiver Ionenmodus

Das Fragmentierungsverhalten des CER[EOS] wurde anhand zweier verschiedener Standards untersucht. Ein Standard bestand aus einer C18 Sphingosinbasis amidgebunden an eine C30 ω -hydroxylierte FA, welche mit Linolsäure (C18:2) verestert war (E:18:2/O:30/S:18). Im zweiten Standard war das Sphingosin amidgebunden an eine C27 ω -hydroxylierte FA (E:18:2/O:27/S:18).

Abb. 23 zeigt das Tandemmassenspektrum des Standards (O:30) im negativen Ionenmodus. Alle diese Fragmente stammen von dem Molekül-Ion $[M-H]^-$ mit dem Masse-Ladungsverhältnis (m/z) 1010,95. Diese durchlaufen verschiedene Spaltungs- und Umlagerungsreaktionen, die in Abb. 24 dargestellt sind.

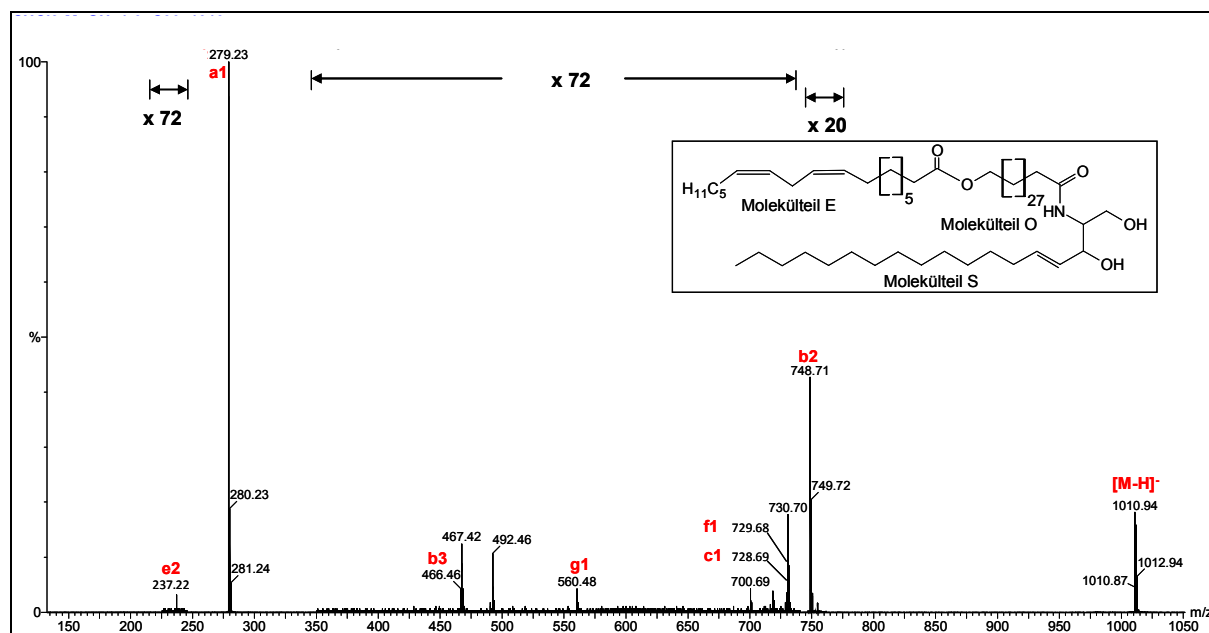


Abb. 23: Tandemmassenspektrum von CER[EOS]-Standard (E:18:2/O:30/S:18) im negativen Ionenmodus ($M = 1011,96$ Da)

Ergebnisse und Diskussion

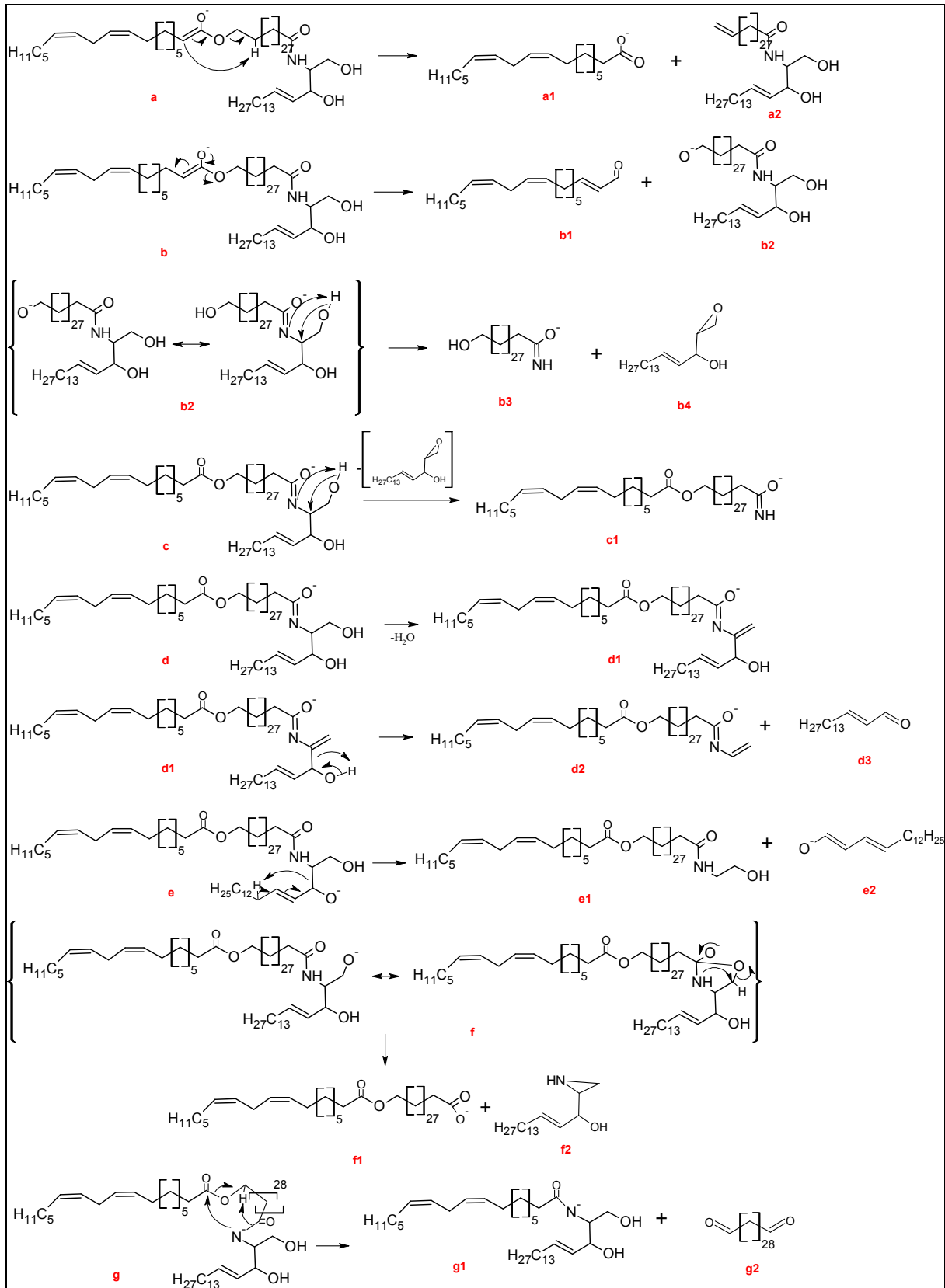


Abb. 24: Fragmentierungsschema von CER[EOS]-Standard (E:18:2/O:30/S:18) mittels CID im negativen Ionenmodus

Die wichtigste Aufspaltung findet an der Esterbindung statt. Dabei entsteht ein Fragment-Ion mit m/z 279,23 (**a1**), wenn die Ladung bei der Linolsäure verbleibt. Eine schon deutlich geringere Intensität weist das Fragment bei m/z 748,73 (**b2**) auf, wenn die Linolsäure als Neutralverlust abgespalten wird und somit die Ladung bei der ω -hydroxylierten FA bleibt, welche noch amidgebunden zur Sphingosinbasis ist. Findet zusätzlich ein neutraler Wasserverlust statt, entsteht ein Fragment bei m/z 730,71. Dies sind die Fragmente, die am häufigsten vertreten waren. Nach weiterer Aufspaltung der Amidbindung in **b2** entsteht ein Fragment mit m/z 466,46 (**b3**), das Fragment stellt die ω -hydroxylierte FA dar.

Deutlich geringere Intensitäten zeigen die weiteren Fragmente, sie sollen dennoch Erwähnung finden. Eine Aufspaltung der Amidbindung führt zu einem Fragment-Ion mit m/z 728,69 (**c1**), welches aus der ω -hydroxylierten FA mit der veresterten Linolsäure besteht. Wie unter **d** dargestellt, erfolgt ein neutraler Wasserverlust am [CER[EOS]-H]⁻ (m/z 992,94; **d1**). Mit nachfolgender Spaltreaktion zwischen C2 und C3 entsteht ein Ion mit m/z 754,71 (**d2**), welches die ω -hydroxylierten FA mit der veresterten Linolsäure darstellt. Bei einer Spaltung an der gleichen Stelle entsteht außerdem ein Fragment-Ion der Sphingosinbasis mit m/z 237,22 (**e2**).

Neben Spaltungsreaktionen finden während der Tandem-Massenspektrometrie Umlagerungsreaktionen statt. Ein Umlagerungsprozess resultiert in einem Fragment mit m/z 729,68 (**f1**), wobei die Ladung bei der ω -hydroxylierten FA verbleibt, die mit der Linolsäure verestert ist. Eine andere Umlagerungsreaktion bringt ein Fragment-Ion bei m/z 560,50 (**g1**) hervor, wobei hier die Linolsäure eine Amidbindung mit der Sphingosinbasis eingeht und die ω -hydroxylierte FA herausgeschnitten wird. Dieses Fragment weist die geringste Intensität im negativen Ionenmodus auf.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [60,81,89,98,157,188].

Das Fragmentspektrum des CER[EOS] Standards (O:30) im positiven Ionenmodus ist in Abb. 25 dargestellt. Die Fragmente stammen hierbei von dem molekularen Ion [M+H]⁺ und die möglichen Fragmentierungsprozesse sind in Abb. 26 gezeigt.

Im positiven Ionenmodus findet die häufigste Spaltung an der Amidbindung statt. Dabei entstehen zwei verschiedene Produkt-Ionen. Das erste so gebildete Produkt-Ion entsteht bei m/z 300,29 (**a2**), dabei verbleibt die Ladung bei der Sphingosinbasis. Findet nachfolgend noch ein neutraler Verlust von zwei Molekülen Wasser statt, bildet sich ein Fragment-Ion bei

m/z 264,27 (**a3**). Dieses Ion kommt im positiven Ionenmodus bei CER[EOS] am häufigsten vor. Findet dagegen ein neutraler Verlust von einem Molekül Wasser und einem Molekül Formaldehyd an **a2** statt, entsteht ein Ion bei m/z 252,27 (**a4**). Mit geringerer Intensität bildet sich ein Produkt-Ion bei m/z 730,71 (**b2**), die Ladung verbleibt an der ω -hydroxylierten FA, welche weiterhin mit der Linolsäure verestert ist. Nach einem neutralen Wasserverlust entsteht das Ion bei m/z 714,71 (**b3**).

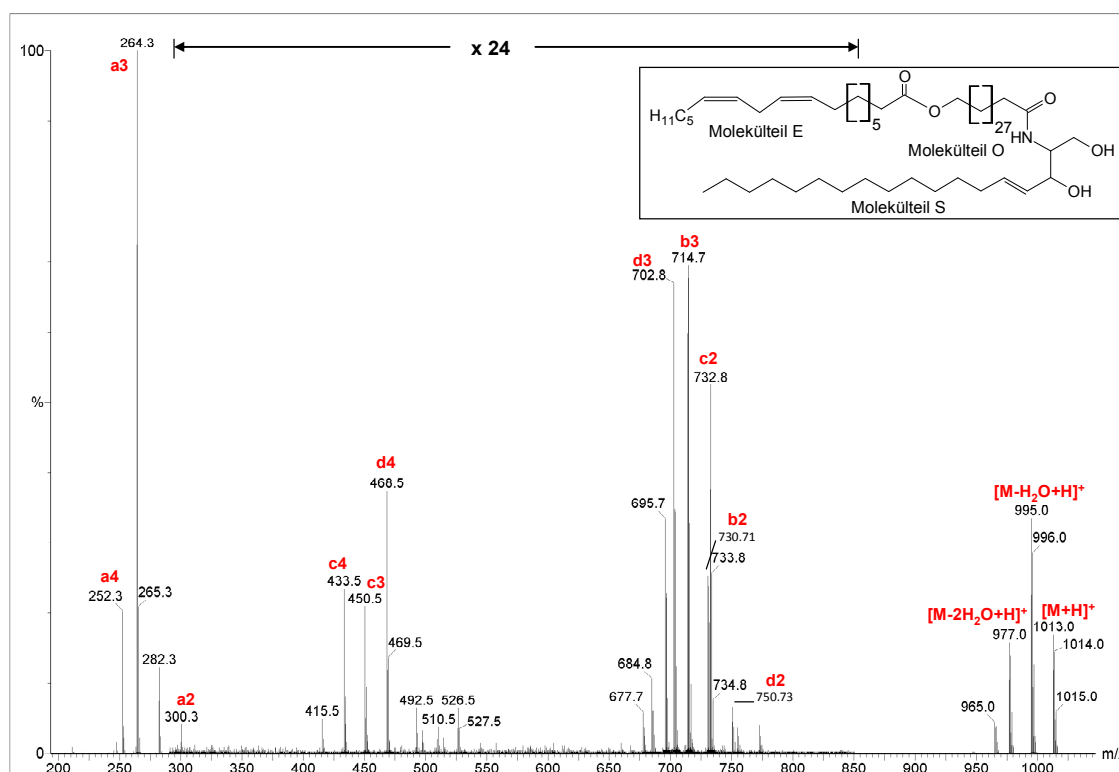


Abb. 25: Tandemmassenspektrum von CER[EOS]-Standard (E:18:2/O:30/S:18) im positiven Ionenmodus ($M = 1011,96$ Da)

Eine Abspaltung der Linolsäure (dargestellt unter **c**) bewirkt ein Ion bei m/z 732,72 (**c2**). Die nachfolgende Spaltung der N-C2-Bindung bringt ein Ion bei m/z 450,47 (**c3**) hervor, nach einem neutralen Verlust von Ammoniak entsteht ein Ion bei m/z 433,44 (**c4**). Das Fragment **c4** weist unter den gewählten Bedingungen die geringste Intensität auf.

Die Spaltung der Esterbindung führt zu einem charakteristischen Fragment-Ion bei m/z 750,73 (**d2**), welches aus der ω -hydroxylierten FA mit der amidgebundenen Sphingosinbasis besteht. Nach einem neutralen Verlust von Wasser und Formaldehyd

entsteht ein Ion bei m/z 702,71 (**d3**), woraus nach einer Spaltung der Amidbindung **d4** (m/z 468,47) entsteht.

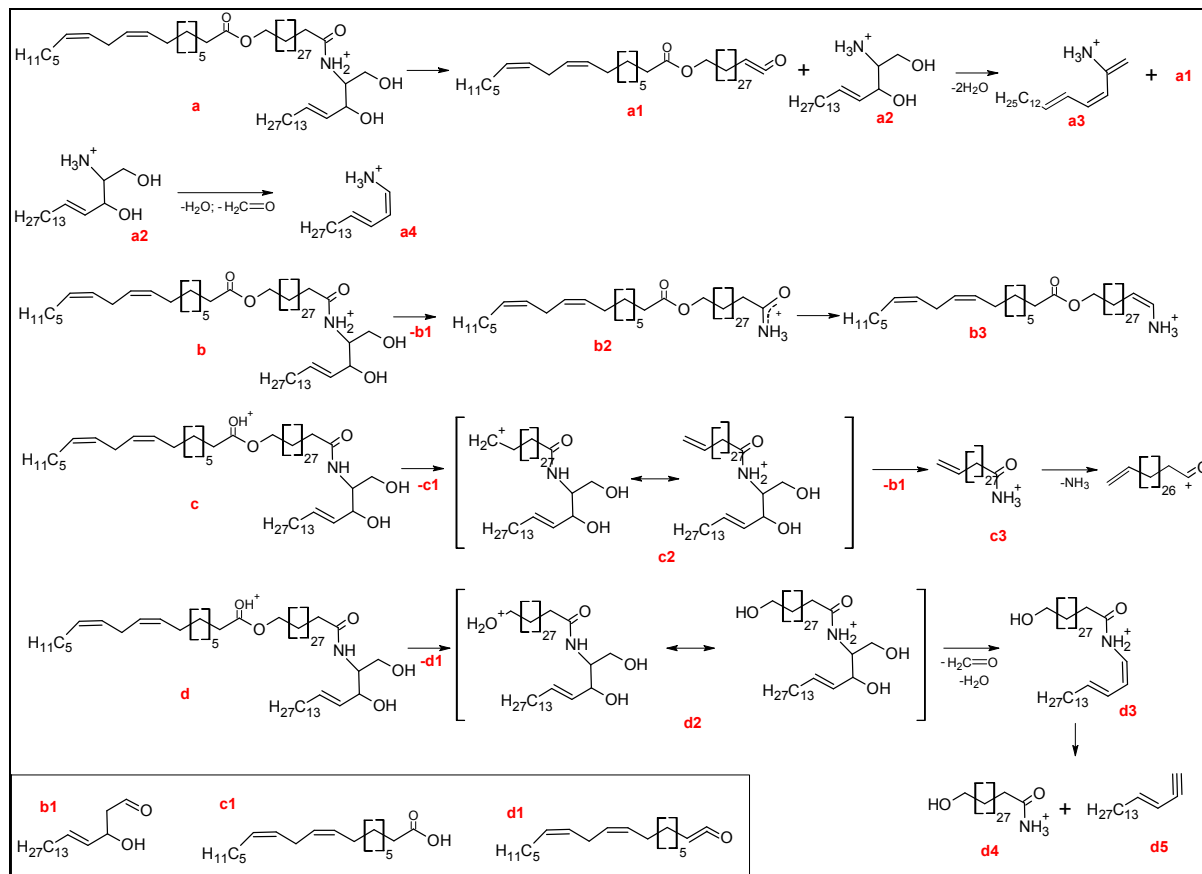


Abb. 26: Fragmentierungsschema von CER[EOS]-Standard (E:18:2/O:30/S:18) mittels CID im positiven Ionenmodus

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [5,76,89,97,115].

Das CER[EOS] mit der ω -hydroxylierten FA mit der Kettenlänge C27 (O:27) liefert die gleichen Fragment-Ionen, sowohl bei Messungen im negativen als auch im positiven Ionenmodus. Natürlich ist der Massenunterschied aufgrund der unterschiedlichen Kettenlänge des mittleren Molekülteils bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Dadurch wurde gezeigt, dass es möglich ist, CER[EOS] tandemmassenspektrometrisch im positiven und im negativen Ionenmodus zu identifizieren.

4.1.3.2 Ceramid [NP] – negativer und positiver Ionenmodus

Der CER[NP]-Standard ist aufgebaut aus einer C18 Phytosphingosinbasis amidgebunden zu Stearinsäure (N:18/P:18). Das Tandemmassenspektrum des Standards im negativen Ionenmodus ist in Abb. 27 in dargestellt. Alle Fragmente stammen vom Ausgangs-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 582,54, deren wahrscheinliche Spaltungs- und Umlagerungsprozesse in Abb. 28 gezeigt werden.

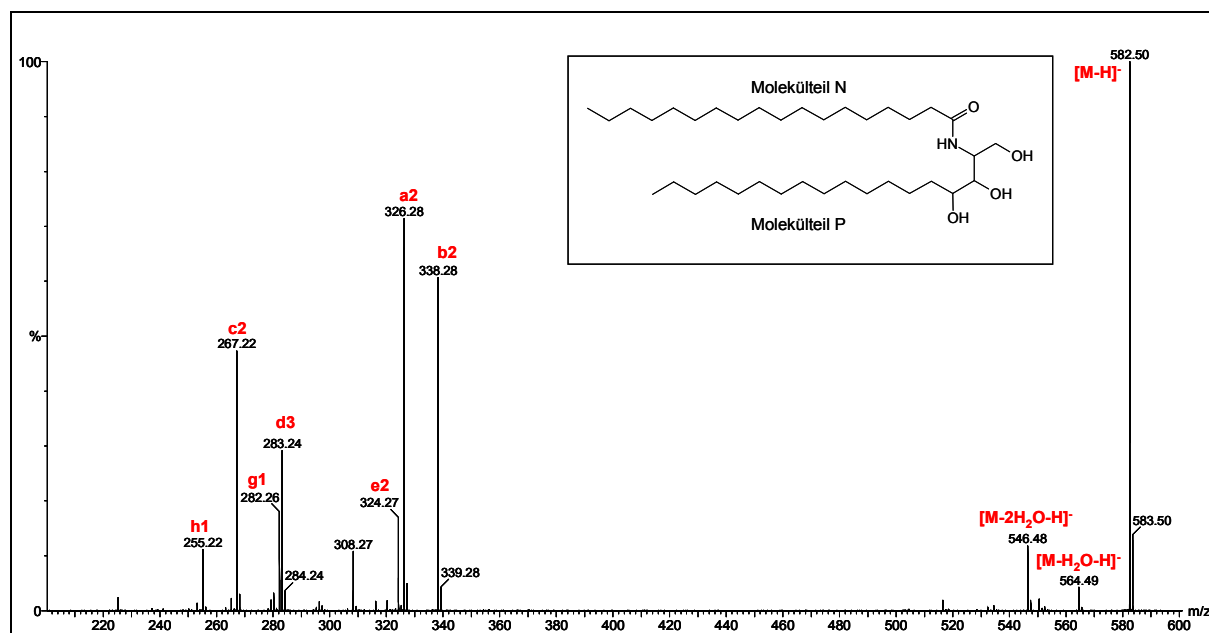


Abb. 27: Tandemmassenspektrum von CER[NP]-Standard (N:18/P:18) im negativen Ionenmodus ($M = 583,55$ Da)

Das Fragment-Ion mit der höchsten Intensität entsteht bei m/z 326,31 (**a2**), dabei wird die Verbindung zwischen C2 und C3 aufgespalten und die Ladung verbleibt am Fettsäureteil.

Am $[CER[NP]-H]^-$ ist ein neutraler Wasserverlust an drei verschiedenen Positionen möglich, wodurch eine Doppelbindung entsteht (m/z 564,48). Eine der Doppelbindungen wird zwischen C2 und C3 (**b1**) gebildet und eine anschließende Spaltungsreaktion erzeugt das Fragment-Ion bei m/z 338,31 (**b2**), wobei die negative Ladung am Fettsäureteil verbleibt. Dieses Ion hat eine leicht geringere Intensität als **a2**. Das Ion mit der dritthöchsten Intensität entsteht bei m/z 267,27 (**c2**), es ist ein Fragment-Ion des Phytosphingosins. Dieses Ion entsteht durch den neutralen Verlust von zwei Molekülen Wasser (m/z 548,54 (**c1**)) und einer anschließenden Spaltungsreaktion. Eine deutlich geringere Intensität hat das Fragment-Ion bei m/z 283,26 (**d3**), welches nach Entstehung einer Doppelbindung zwischen

C2 und C3 durch einen neutralen Wasserverlust und anschließender Umlagerungsreaktion gebildet wird. Dieses Fragment stellt die amidgebundene Stearinsäure dar.

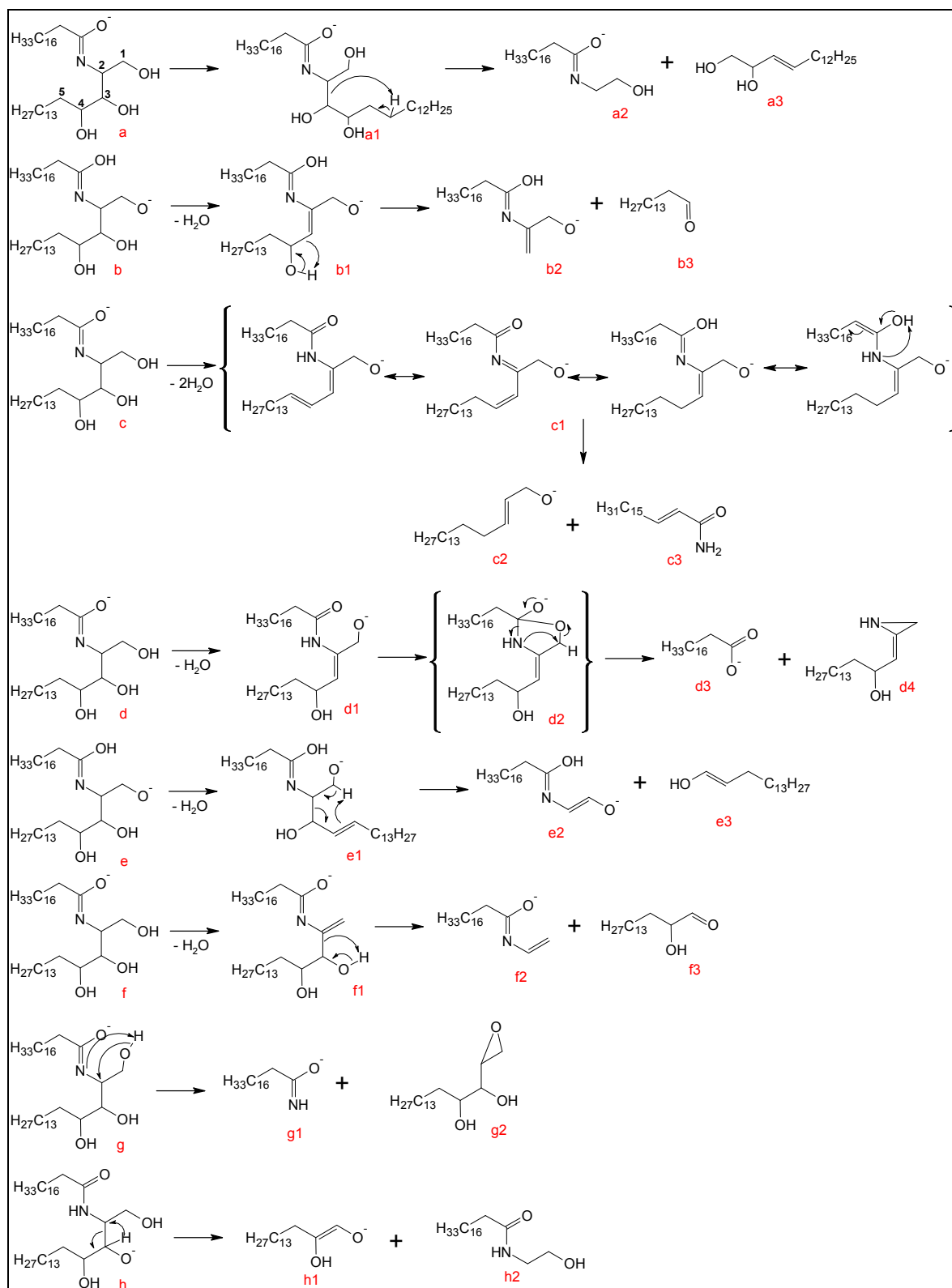


Abb. 28: Fragmentierungsschema von CER[NP]-Standard (N:18/P:18) mittels CID im negativen Ionenmodus

Die zweite Position für eine Doppelbindung durch den neutralen Verlust eines Wassermoleküls ist zwischen C4 und C5 (**e1**). Durch eine nachfolgende Spaltung wird ein Ion bei m/z 324,29 (**e2**) erzeugt.

Die dritte Position für die Doppelbindung nach einem neutralen Wasserverlust ist zwischen C1 und C2 (**f1**). Nach Spaltung im Molekül entsteht ein Ion bei m/z 308,30 (**f2**), die Ladung ist hier wiederum an der Stearinsäure.

Eine Aufspaltung der N-C2-Bindung führt zu einem FA-Fragment-Ion bei m/z 282,28 (**g1**). Die geringste Intensität hat das Fragment-Ion der Phytosphingosinbasis mit m/z 255,23 (**h1**), entstanden durch Spaltung der Bindung zwischen C2 und C3.

Es gibt einige geladenen Fragmente, die dem Fettsäureteil im Molekül zugeordnet werden können: a2, b2, d3, e2, f2 und g1. Die Fragmente, die aus der Phytosphingosinbasis entstehen, sind c2 und h1.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [60,81,89,98,156,157,188].

Auch im positiven Ionenmodus wurde das Fragmentierungsverhalten des CER[NP] überprüft. Das dazugehörige Fragmentspektrum ist in Abb. 29 und die Fragmentierungsvorgänge in Abb. 30 gezeigt. Alle Fragmente stammen hierbei von dem Molekül-Ion $[M+H]^+$ (m/z 584,56).

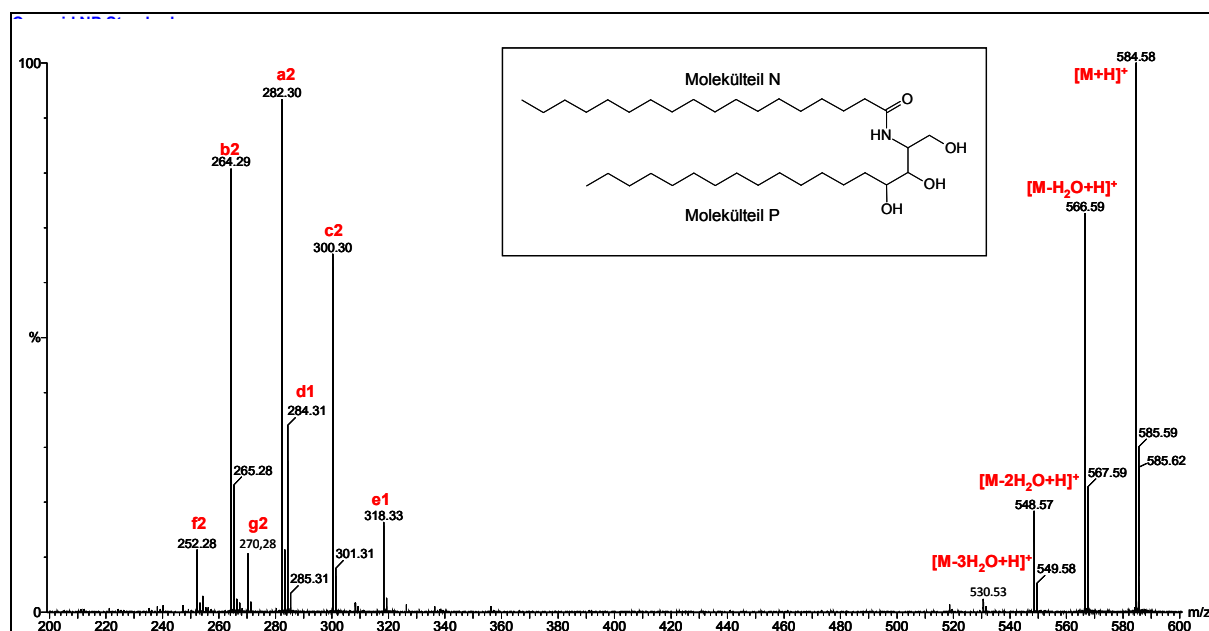


Abb. 29: Tandemmassenspektrum von CER[NP]-Standard (N:18/P:18) im positiven Ionenmodus ($M = 583,55$ Da)

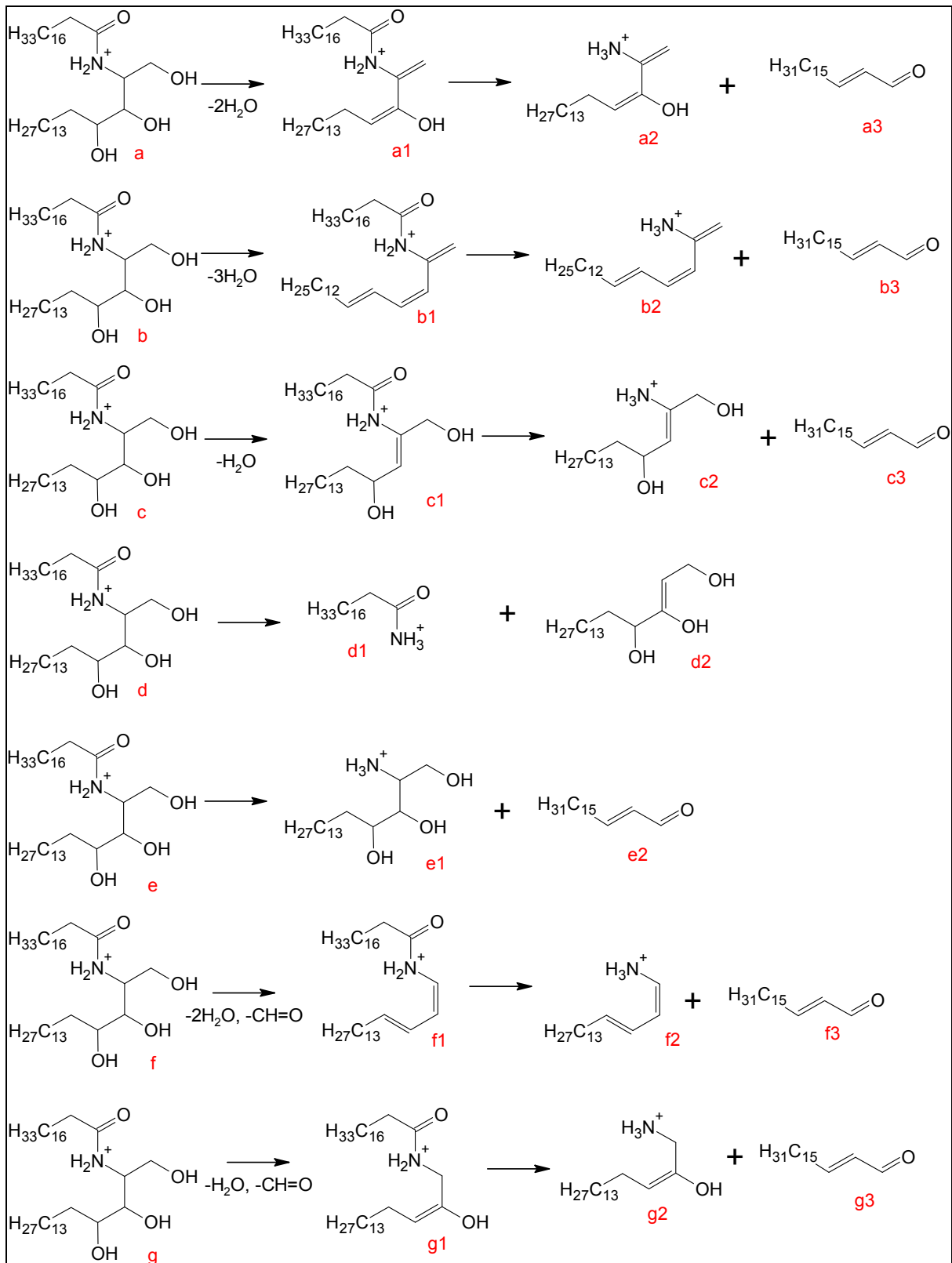


Abb. 30: Fragmentierungsschema von CER[NP]-Standard (N:18/P:18) mittels CID im positiven Ionenmodus

Im positiven Ionenmodus verliert das Molekül-Ion $[\text{CER}[\text{NP}]+\text{H}]^+$ bis zu drei Wassermoleküle, gefolgt von der Ausbildung verschiedener Doppelbindungen (**a1** (m/z 548,54), **b1** (m/z 530,53), **c1** (m/z 566,55)). Nach Aufspaltung der jeweiligen Amidbindung werden

Fragment-Ionen der Phytosphingosinbasis gebildet (**a2** (m/z 282,28), **b2** (m/z 264,27), **c2** (m/z 300,29)). Das Fragment **a2** hat die höchste, **b2** die zweithöchste und **c2** die dritthöchste Intensität im Fragmentspektrum.

Die vierthöchste Intensität hat das Stearinsäurefragment-Ion bei m/z 284,29 (**d1**). Dieses Ion entsteht nach Aufspaltung der Amidbindung. Ebenfalls durch Spaltung der Amidbindung entsteht ein Fragment-Ion der Phytosphingosinbasis mit m/z 318,30 (**e1**).

Neben dem neutralen Verlust von Wasser wird vom Ausgangsmolekül-Ion zusätzlich Formaldehyd abgespalten. Je nachdem, ob ein oder zwei Wassermoleküle abgespalten werden, entsteht hierbei **f1** (m/z 518,53) oder **g1** (m/z 536,54). Nach Aufspaltung der Amidbindung entstehen mit **f2** (m/z 252,27) und **g2** (m/z 270,28) wiederum Fragment-Ionen, die die Phytosphingosinbasis repräsentieren. Diese Fragment-Ionen haben die niedrigste Intensität im Spektrum.

Die Fragmente, die aus der Phytosphingosinbasis des Moleküls entstehen sind **a2**, **b2**, **c2**, **e2**, **f2** und **g2**. Einzig das Fragment **d1** repräsentiert den Fettsäureteil des Ceramids. Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [5,76,89,97,115].

4.1.3.3 Ceramid [AP] – negativer und positiver Ionenmodus

Der Standard von CER[AP] ist aufgebaut aus einer C18 Phytosphingosinbasis amidgebunden zu einer alpha-hydroxylierten Stearinsäure (A:18/P:18). Das Tandemmassenspektrum des Standards im negativen Ionenmodus ist in Abb. 31 dargestellt. Alle Fragmente stammen von dem Molekül-Ion $[M-H]^-$ mit m/z 598,54, deren Spaltungs- und Umlagerungsprozesse in Abb. 32 gezeigt werden.

Das Fragment-Ion mit der höchsten Intensität entsteht bei m/z 253,25 (**a1**). Durch die Existenz der α -Hydroxylgruppe in der amidgebundenen FA findet eine Umlagerungsreaktion innerhalb der FA statt (**a**).

Am $[CER[AP]-H]^-$ erfolgt ein neutraler Wasserverlust an drei verschiedenen Positionen, wodurch eine Doppelbindung entsteht (m/z 580,53 (**b1**, **e1**, **h1**, **i1**)). Nach der Bildung der Doppelbindung zwischen C2 und C3 (**b1**) findet eine Umlagerungsreaktion statt, wobei das Ion mit der zweithöchsten Intensität, welches die α -hydroxylierte Stearinsäure darstellt, bei m/z 299,26 (**b3**) entsteht. Nach einer Wasserabspaltung an der FA entsteht **b5** (m/z 281,25), welches nur eine sehr geringe Intensität im Fragmentspektrum hat.

Die dritthöchste Intensität hat das Fragment-Ion der Phytosphingosinbasis mit m/z 255,23 (**c1**). Nahezu gleiche Intensität hat das Fragment-Ion der α -hydroxylierten Stearinsäure mit m/z 342,30 (**d2**). Sowohl **c1** als auch **d1** entstehen durch die Spaltung der Bindung zwischen C2 und C3.

Das Fragment-Ion mit m/z 354,30 (**e2**) wird nach einem neutralen Verlust von Wasser und anschließender Spaltung im Molekül gebildet. Gleich stark ist die Intensität des Fragment-Ions des Phytosphingosins bei m/z 267,27 (**f2**). Dieses Ion entsteht durch den neutralen Verlust von zwei Molekülen Wasser (m/z 562,52 (**f1**)) und einer anschließenden Spaltungsreaktion. Eine Aufspaltung der N-C2-Bindung führt zu einem FA-Fragment-Ion bei m/z 298,28 (**g1**).

Die niedrigsten Intensitäten im Fragmentspektrum haben die Fragment-Ionen bei m/z 324,29 (**h2**) und m/z 340,29 (**i2**). Das FA-Fragment-Ion **h2** entsteht nach einem neutralen Wasserverlust mit Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C1 und C2 mit anschließender Spaltungsreaktion.

Die dritte Position für eine Doppelbindung durch den Verlust eines Wassermoleküls ist zwischen C4 und C5 (**i1**), wodurch nach Spaltung das Fragment-Ion **i2** entsteht, das aus der FA mit einem Teil der Basis besteht.

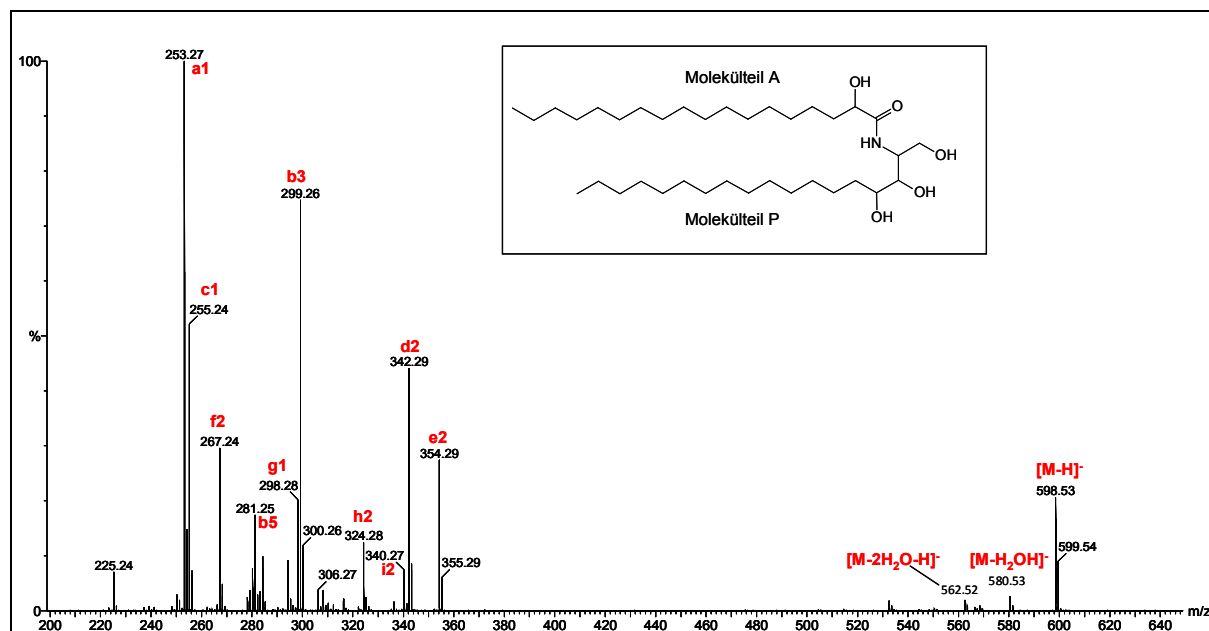


Abb. 31: Tandemmassenspektrum von CER[AP]-Standard (A:18/P:18) im negativen Ionenmodus ($M = 599,55$ Da)

Ergebnisse und Diskussion

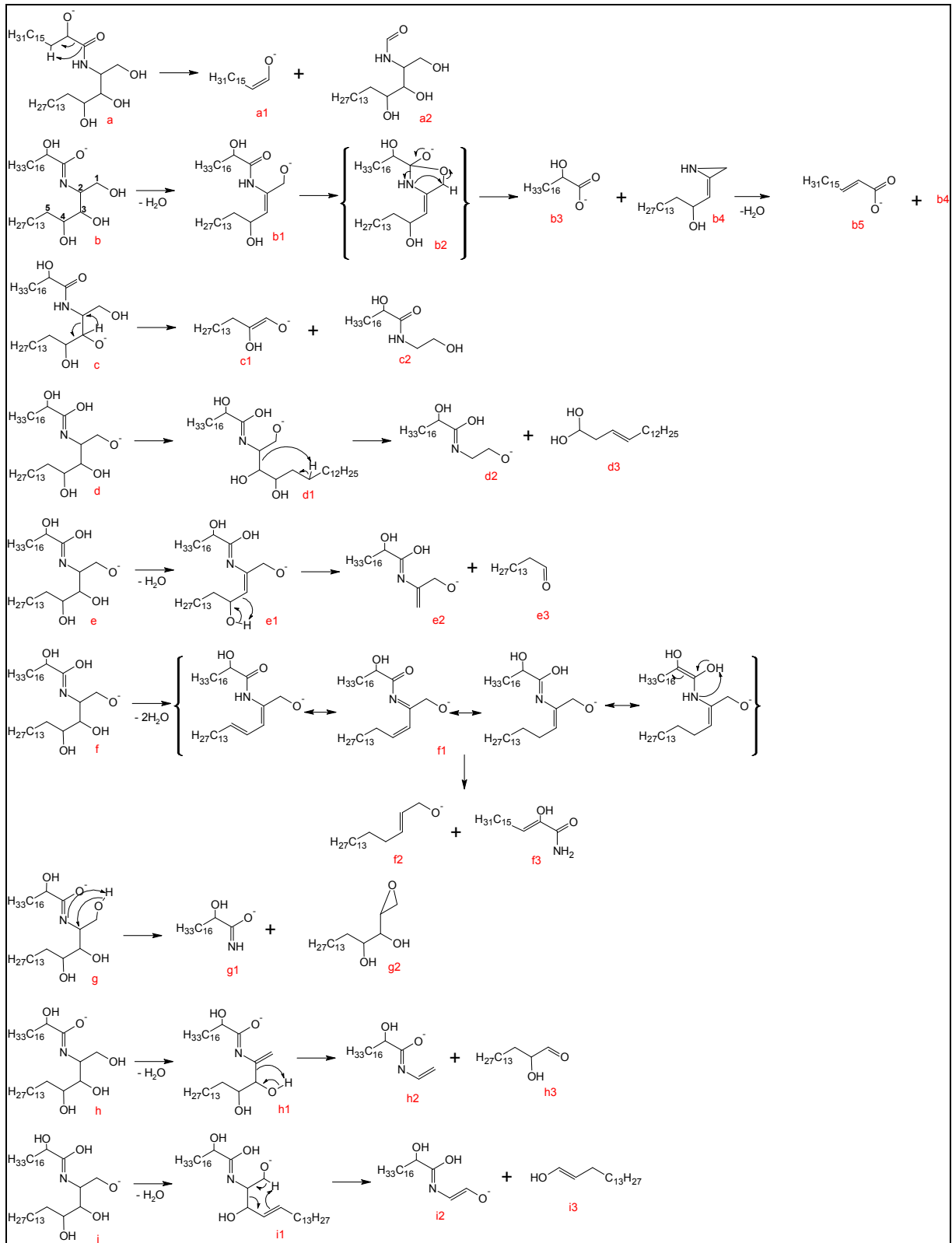


Abb. 32: Fragmentierungsschema von CER[AP]-Standard (A:18/P:18) mittels CID im negativen Ionenmodus

Es gibt einige Fragmente, die dem Fettsäureteil im Molekül zugeordnet werden können: **a1**, **b3**, **b5**, **d2**, **e2**, **g1**, **h2** und **i2**. Die Fragmente, die aus der Phytosphingosinbasis entstehen sind **c1** und **f2**.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [60,81,89,98,156,157,188].

Das Fragmentierungsverhalten des CER[AP] wurde außerdem im positiven Ionenmodus überprüft. Das dazugehörige Fragmentspektrum und die Fragmentierungsvorgänge werden in Abb. 33 und Abb. 34 gezeigt. Alle Fragmente stammen hierbei von dem Molekül-Ion $[M+H]^+$ (m/z 600,56).

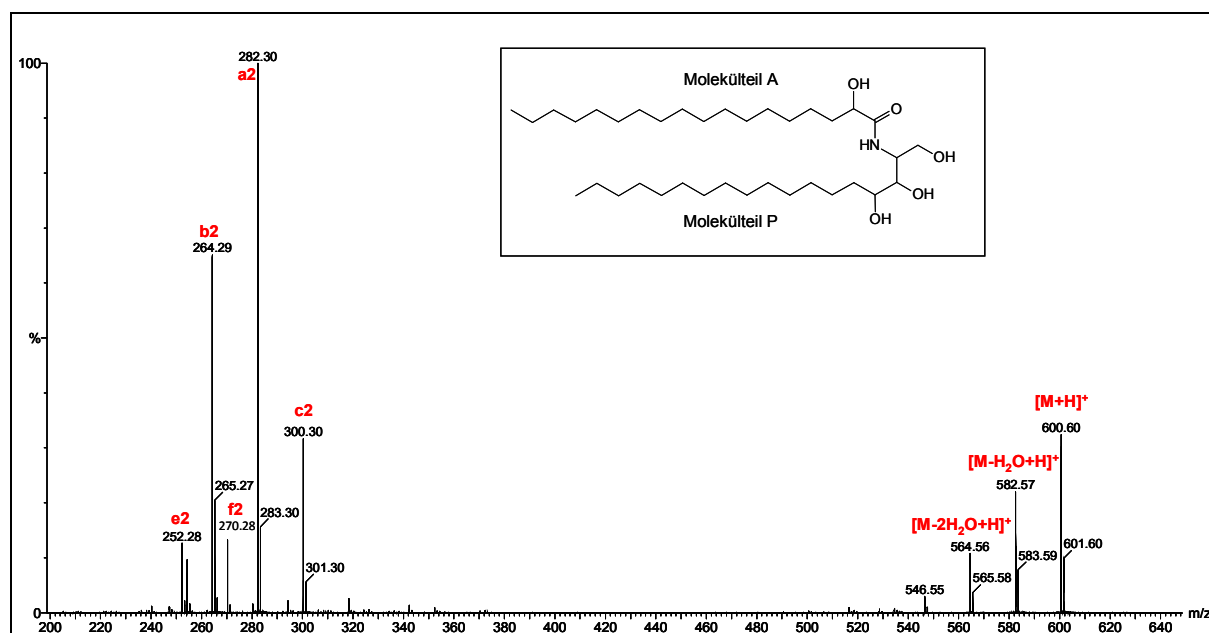


Abb. 33: Tandemmassenspektrum von CER[AP]-Standard (A:18/P:18) im positiven Ionenmodus ($M = 599,55$ Da)

Im positiven Ionenmodus verliert das Molekül-Ion $[CER[AP]+H]^+$ bis zu drei Wassermoleküle an der Phytosphingosinbasis, gefolgt von der Ausbildung verschiedener Doppelbindungen (**a1** (m/z 564,54), **b1** (m/z 582,55), **c1** (m/z 546,52)). Nach Aufspaltung der jeweiligen Amidbindung werden Fragment-Ionen der Phytosphingosinbasis gebildet (**a2** (m/z 282,28), **b2** (m/z 264,27), **c2** (m/z 300,29)). Das Fragment **a2** hat die höchste, **b2** die zweithöchste und **c2** die dritthöchste Intensität im Fragmentspektrum.

Neben dem neutralen Verlust von Wasser wird vom Ausgangsmolekül-Ion zusätzlich Formaldehyd abgespalten. Je nachdem, ob ein oder zwei Wassermoleküle abgespalten werden, entsteht hierbei **e1** (m/z 534,52) oder **d1** (m/z 552,54). Nach weiterer Aufspaltung

der Amidbindung werden **e2** (m/z 252,27) und **d2** (m/z 270,28) gebildet, wiederum Fragment-Ionen, die das Phytosphingosin repräsentieren. Diese Fragment-Ionen haben die niedrigste Intensität im Spektrum.

Alle detektierten Fragment-Ionen des CER[AP] im positiven Ionenmodus entstehen aus der Phytosphingosinbasis.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [5,76,89,97,115].

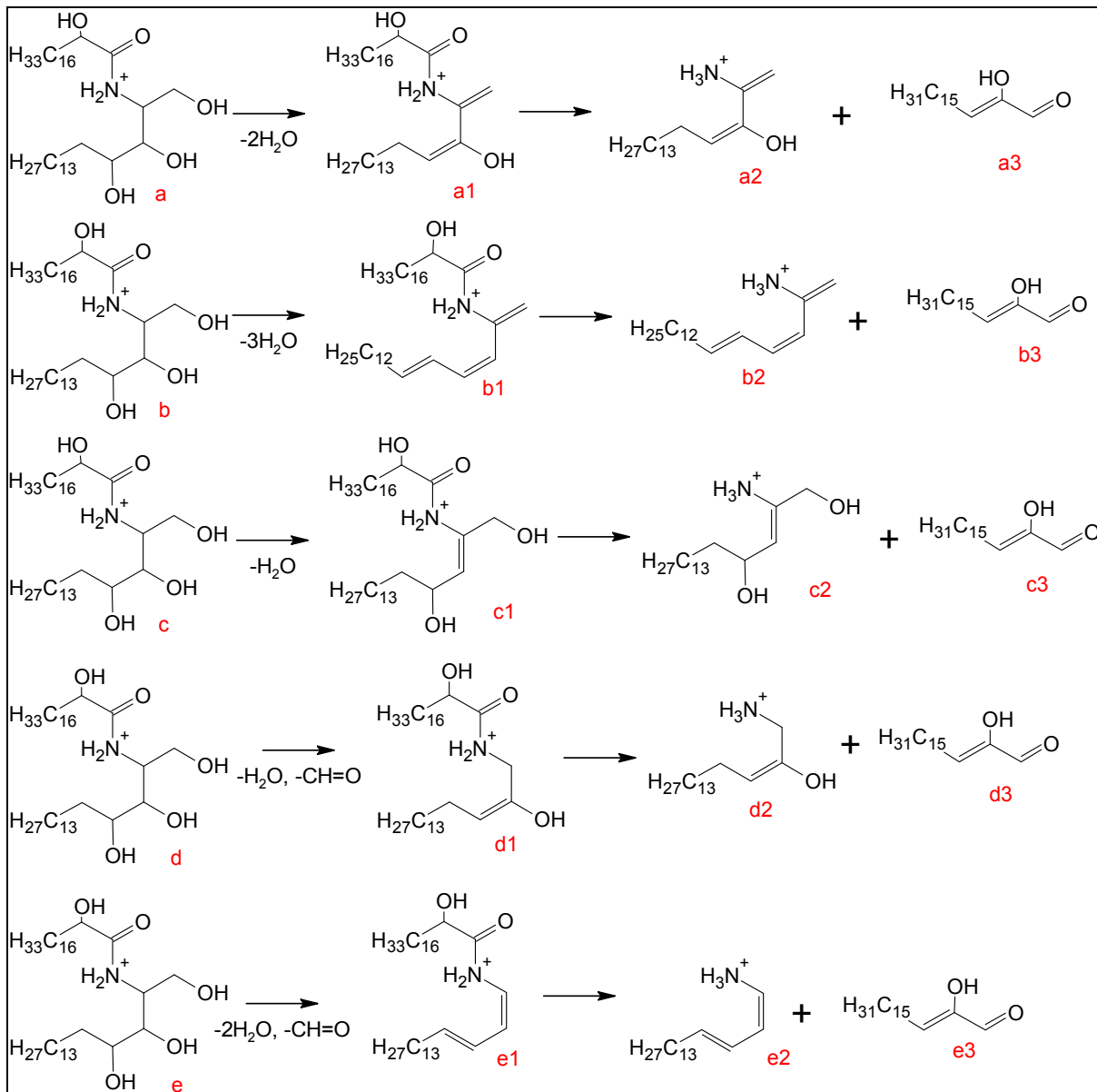


Abb. 34: Fragmentierungsschema von CER[AP]-Standard (A:18/P:18) mittels CID im positiven Ionenmodus

4.1.3.4 Ceramid [NS] – negativer und positiver Ionenmodus

Der Standard des CER[NS] ist aus einer C18 Sphingosinbasis amidgebunden an eine Stearinsäure (N:18/S:18) aufgebaut. Das Tandemmassenspektrum des Standards im negativen Ionenmodus ist in Abb. 35 dargestellt. Alle Fragmente stammen von dem Molekül-Ion $[M-H]^-$ (m/z 564,54). Die wahrscheinlichen Spaltungs- und Umlagerungsprozesse innerhalb des Moleküls sind in Abb. 36 dargestellt.

Am $[CER[NS]-H]^-$ erfolgt ein neutraler Wasserverlust an drei verschiedenen Positionen, wodurch eine Doppelbindung entsteht (m/z 546,53). Eine der Doppelbindungen wird zwischen C1 und C2 (**a1**) gebildet. Durch eine anschließende Spaltung entsteht das Fragment-Ion bei m/z 308,30 (**a2**), wobei die negative Ladung bei dem Stearinsäureteil verbleibt. Dieses Fragment-Ion hat die höchste Intensität im Fragmentspektrum.

Die zweite Position der Doppelbindung ist zwischen C2 und C3 (**b1**). Nach Spaltung im Molekül entsteht ein Ion bei m/z 265,25 (**b2**), wobei sich die Ladung auf der Seite des Sphingosins befindet. Die Intensität dieses Fragment-Ions ist deutlich geringer als die von **a2**. Etwas geringer ist die Intensität des Fragment-Ions der Sphingosinbasis bei m/z 237,22 (**c3**). Dieses entsteht durch die Spaltung der Bindung zwischen C2 und C3. Eine Aufspaltung der N-C2-Bindung des Ausgangsmolekül-Ions führt zu einem Stearinsäurefragment-Ion bei m/z 282,28 (**d1**).

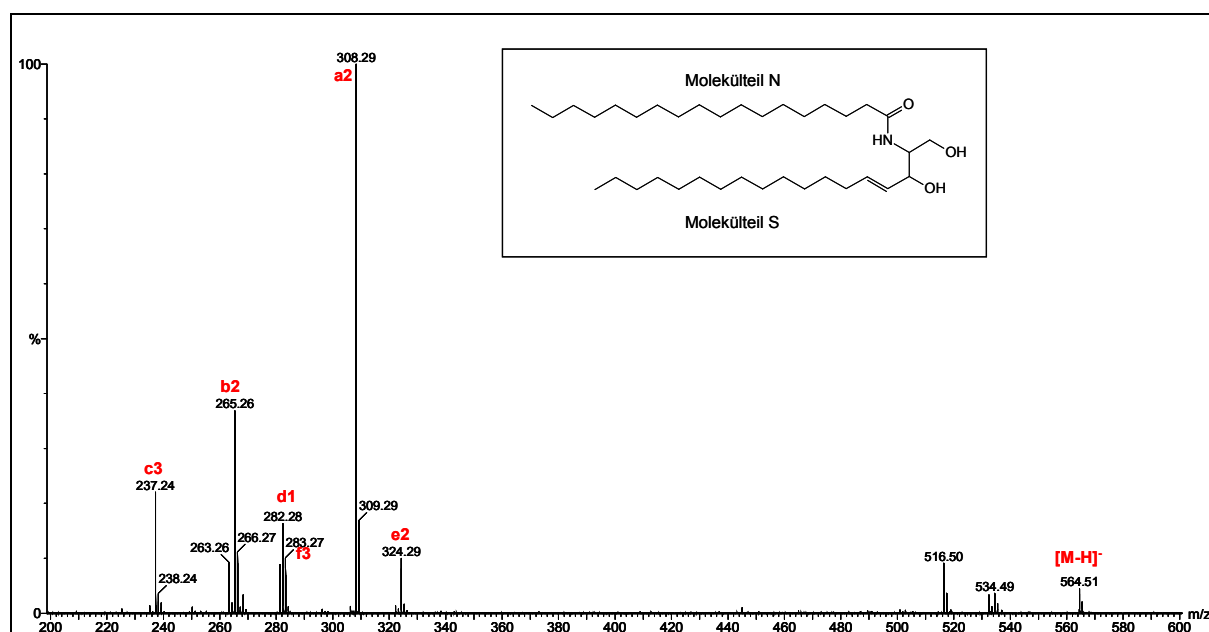


Abb. 35: Tandemmassenspektrum von CER[NS]-Standard (N:18/S:18) im negativen Ionenmodus ($M = 565,54$ Da)

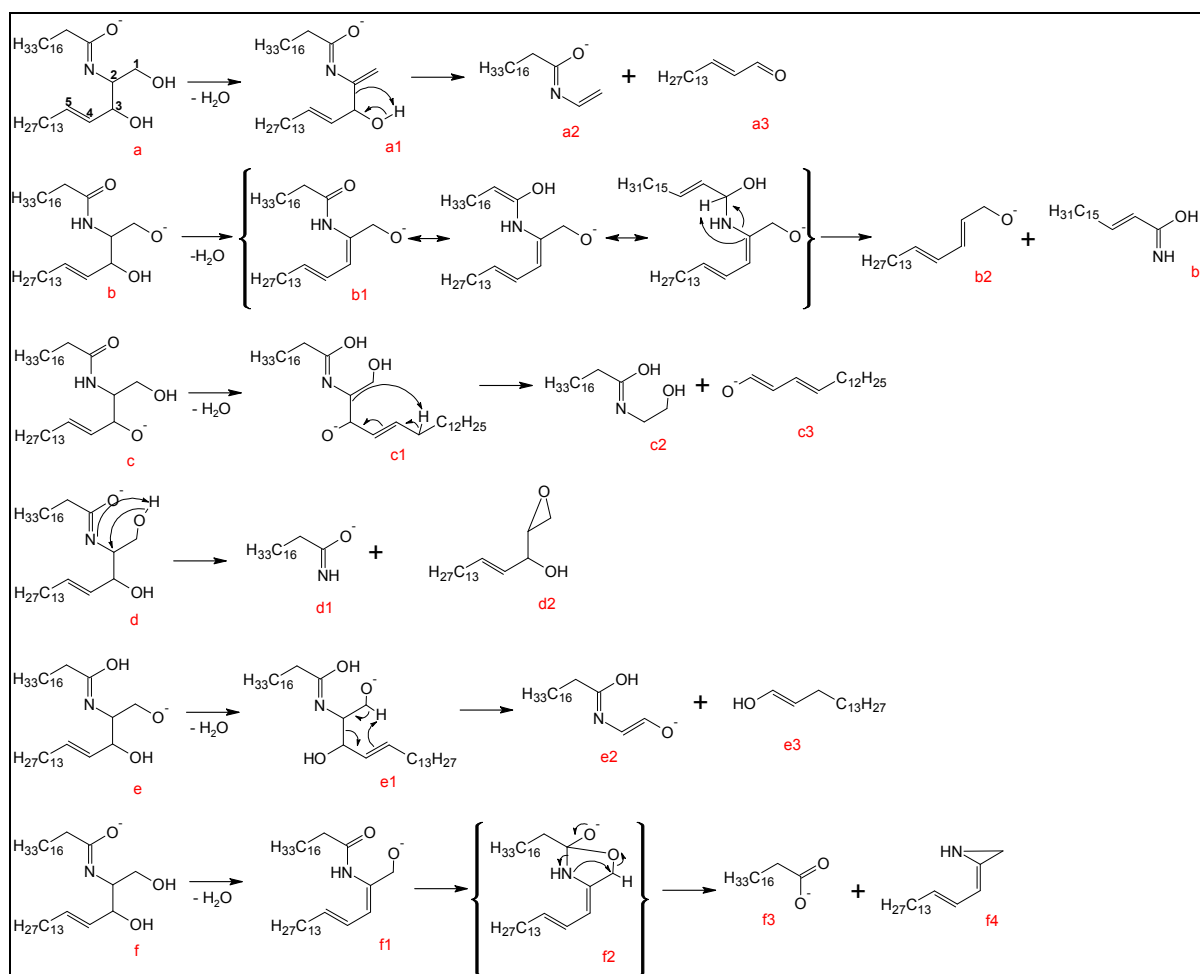


Abb. 36: Fragmentierungsschema von CER[NS]-Standard (N:18/S:18) mittels CID im negativen Ionenmodus

Die dritte Position für eine Doppelbindung durch den neutralen Verlust eines Wassermoleküls ist zwischen C4 und C5 (**e1**). Durch eine nachfolgende Spaltung wird ein Ion bei m/z 324,29 (**e2**) erzeugt. Nach einem neutralen Wasserverlust zwischen C1 und C2 (**f1**) und einer anschließenden Umlagerungsreaktion (**f2**) entsteht ein Ion bei m/z 283,26 (**f3**), welches die Sterinsäure an und für sich darstellt. Dieses Fragment-Ion hat eine der geringsten Intensitäten im Fragmentspektrum.

Es gibt einige Fragmente, die dem Fettsäureteil im Molekül zugeordnet werden können: **a2**, **c3**, **d1**, **e2** und **f3**. Einzig **b2** ist ein Fragment, das aus der Sphingosinbasis entsteht.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentenschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [60,81,89,98,156,157,188].

Im positiven Ionenmodus wurde das Fragmentierungsverhalten des CER[NS] ebenfalls überprüft. Das dazugehörige Fragmentenspektrum und die Fragmentierungsvorgänge sind in

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 37 und Abb. 38 dargestellt. Alle Fragmente stammen hierbei von dem Molekül-Ion $[M+H]^+$ (m/z 566,55).

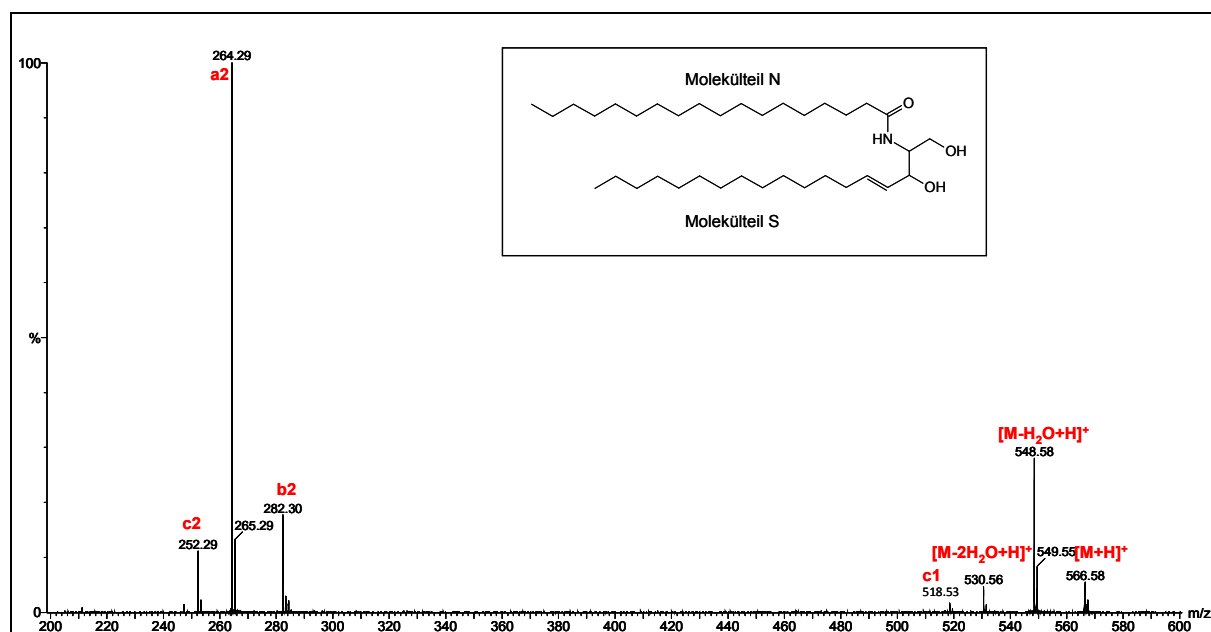


Abb. 37: Tandemmassenspektrum von CER[NS]-Standard (N:18/S:18) im positiven Ionenmodus ($M = 565,54$ Da)

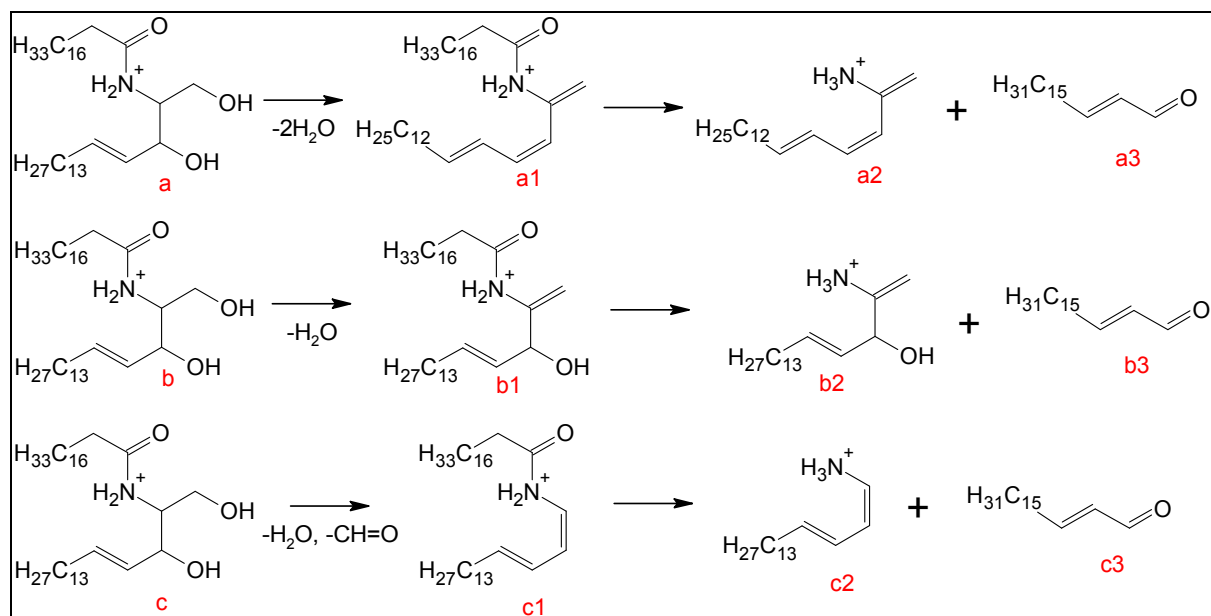


Abb. 38: Fragmentierungsschema von CER[NS]-Standard (N:18/S:18) mittels CID im positiven Ionenmodus

Im positiven Ionenmodus verliert das Molekül-Ion $[CER[NS]+H]^+$ bis zu zwei Wassermoleküle, gefolgt von der Ausbildung verschiedener Doppelbindungen (**a1** (m/z 548,54), **b1** (m/z 530,53)). Nach Aufspaltung der jeweiligen Amidbindung werden Fragment-Ionen der

Sphingosinbasis gebildet (**a2** (m/z 264,27), **b2** (m/z 282,28)). Das Fragment **a2** hat die höchste Intensität im Fragmentspektrum, deutlich geringer ist die Intensität von **b2**.

Neben dem neutralen Verlust von Wasser wird vom Ausgangsmolekül-Ion zusätzlich Formaldehyd abgespalten (**c1** (m/z 518,53)), nach Aufspaltung der Amidbindung entsteht **c2** (m/z 252,27), wiederum ein Fragment-Ion des Sphingosins. Das Fragment c2 hat die geringste Intensität im Spektrum.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [5,76,89,97,115].

4.1.3.5 Ceramid [AS] – negativer und positiver Ionenmodus

Der Standard von CER[AS] ist aufgebaut aus einer C18 Sphingosinbasis amidgebunden an eine α -hydroxylierte Behensäure (A:22/S:18). Das Tandemmassenspektrum des Standards im negativen Ionenmodus ist in Abb. 39 dargestellt. Alle Fragmente stammen von dem Precursor-Ion $[M-H]^-$ (m/z 636,59). Die wahrscheinlichen Spaltungs- und Umlagerungsprozesse sind Abb. 40 dargestellt.

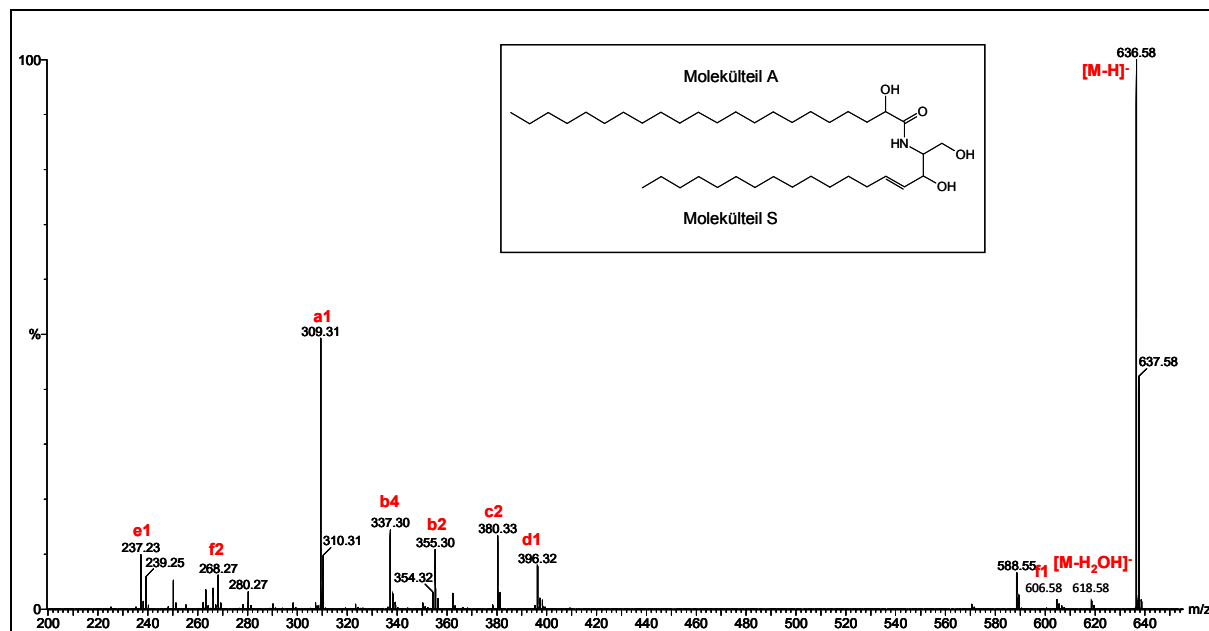


Abb. 39: Tandemmassenspektrum von CER[AS]-Standard (A:22/S:18) im negativen Ionenmodus ($M = 637,61$ Da)

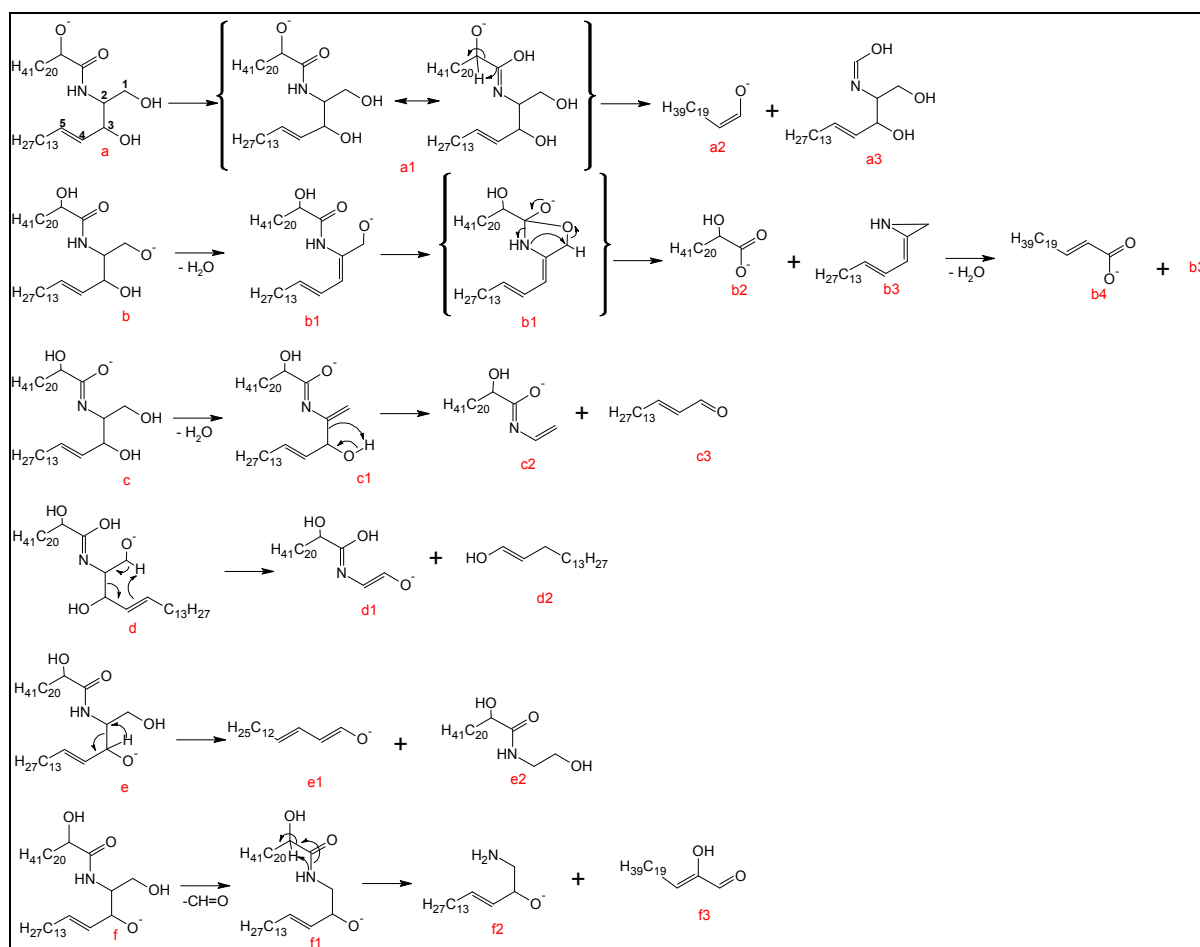


Abb. 40: Fragmentierungsschema von CER[AS]-Standard (A:22/S:18) mittels CID im negativen Ionenmodus

Das Fragment-Ion mit der höchsten Intensität entsteht bei m/z 309,32 (**a1**), dabei wird die N-C2-Bindung aufgespalten und die Ladung verbleibt am Fettsäureteil.

Am [CER[AS]-H]⁻ erfolgt ein neutraler Wasserverlust an zwei verschiedenen Positionen, wodurch eine Doppelbindung entsteht (m/z 618,58). Eine Doppelbindung wird in der Position zwischen C2 und C3 (**b1**) gebildet und eine anschließende Umlagerungsreaktion erzeugt ein Ion mit m/z 355,32 (**b2**), welches die α -hydroxylierte Behensäure an und für sich darstellt. Nach einer Wasserabspaltung an der FA entsteht **b4** (m/z 337,31). Die Fragmente **b2** und **b4** haben, wie alle weiteren Fragment-Ionen, eine deutlich geringere Intensität im Fragmentspektrum.

Die Doppelbindung nach einem neutralen Wasserverlust entsteht zwischen C1 und C2 (**c1**), durch eine anschließende Spaltungsreaktion wird das Behensäurefragment-Ion bei m/z 380,35 (**c2**) gebildet.

Die Spaltung zwischen C2 und C3 führt zu zwei verschiedenen Produkt-Ionen. Einerseits verbleibt die Ladung bei der Behensäure (m/z 396,34 (**d1**)), andererseits entsteht ein Ion bei m/z 237,22 (**e1**), wenn die Ladung bei der Phytosphingosinbasis verbleibt.

Eine Zerstörung der Amidbindung nach einem neutralen Verlust von Formaldehyd (**f1** mit m/z 606,58) führt zu **f2** (m/z 268,26), einem Fragment, das die Sphingosinbasis darstellt.

Es gibt einige Fragmente, die dem Fettsäureteil im Molekül zugeordnet werden können: **a2**, **b2**, **b4**, **c2** und **d2**. Die Fragmente, die aus der Sphingosinbasis entstehen sind **e1** und **f2**.

Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [60,81,89,98,156,157,188].

Im positiven Ionenmodus wurde das Fragmentierungsverhalten des CER[AS] ebenfalls überprüft. Das dazugehörige Fragmentspektrum und die Fragmentierungsvorgänge sind in Abb. 41 und Abb. 42 dargestellt. Alle Fragmente stammen hierbei von dem Molekül-Ion $[M+H]^+$ (m/z 638,61).

Im positiven Ionenmodus verliert das Molekül-Ion $[CER[AS]+H]^+$ bis zu zwei Wassermoleküle, gefolgt von der Ausbildung verschiedener Doppelbindungen (**a1** (m/z 602,59), **b1** (m/z 620,60)). Nach Aufspaltung der jeweiligen Amidbindung werden Fragment-Ionen der Sphingosinbasis gebildet (**a2** (m/z 264,27), **b2** (m/z 282,28)). Das Fragment **a2** hat die höchste Intensität im Fragmentspektrum, deutlich geringer ist die Intensität von **b2**.

Neben dem neutralen Verlust von Wasser wird vom Ausgangsmolekül-Ion zusätzlich Formaldehyd abgespalten (**c1** (m/z 590,59)), nach Aufspaltung der Amidbindung entsteht **c2** (m/z 252,27), wiederum ein Fragment-Ion des Sphingosins. Dieses Ion hat die dritthöchste Intensität im Fragmentspektrum.

In Folge einer Spaltung der Amidbindung verbleibt die Ladung am Behensäureteil, resultierend in **d1** (m/z 356,35). Das Fragment **d1** hat die geringste Intensität im Spektrum. Das in dieser Arbeit erstellte Fragmentschema wurde unter Berücksichtigung früherer Arbeiten angefertigt [5,76,89,97,115].

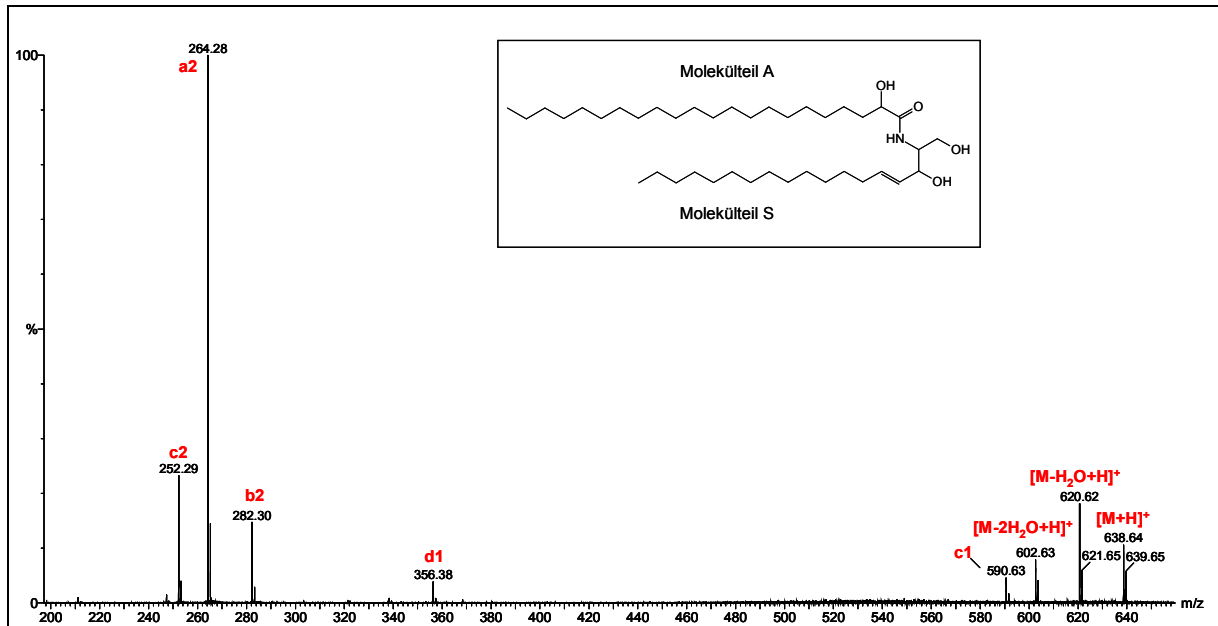


Abb. 41: Tandemmassenspektrum von CER[AS]-Standard (A:22/S:18) im positiven Ionenmodus ($M = 637,61$ Da)

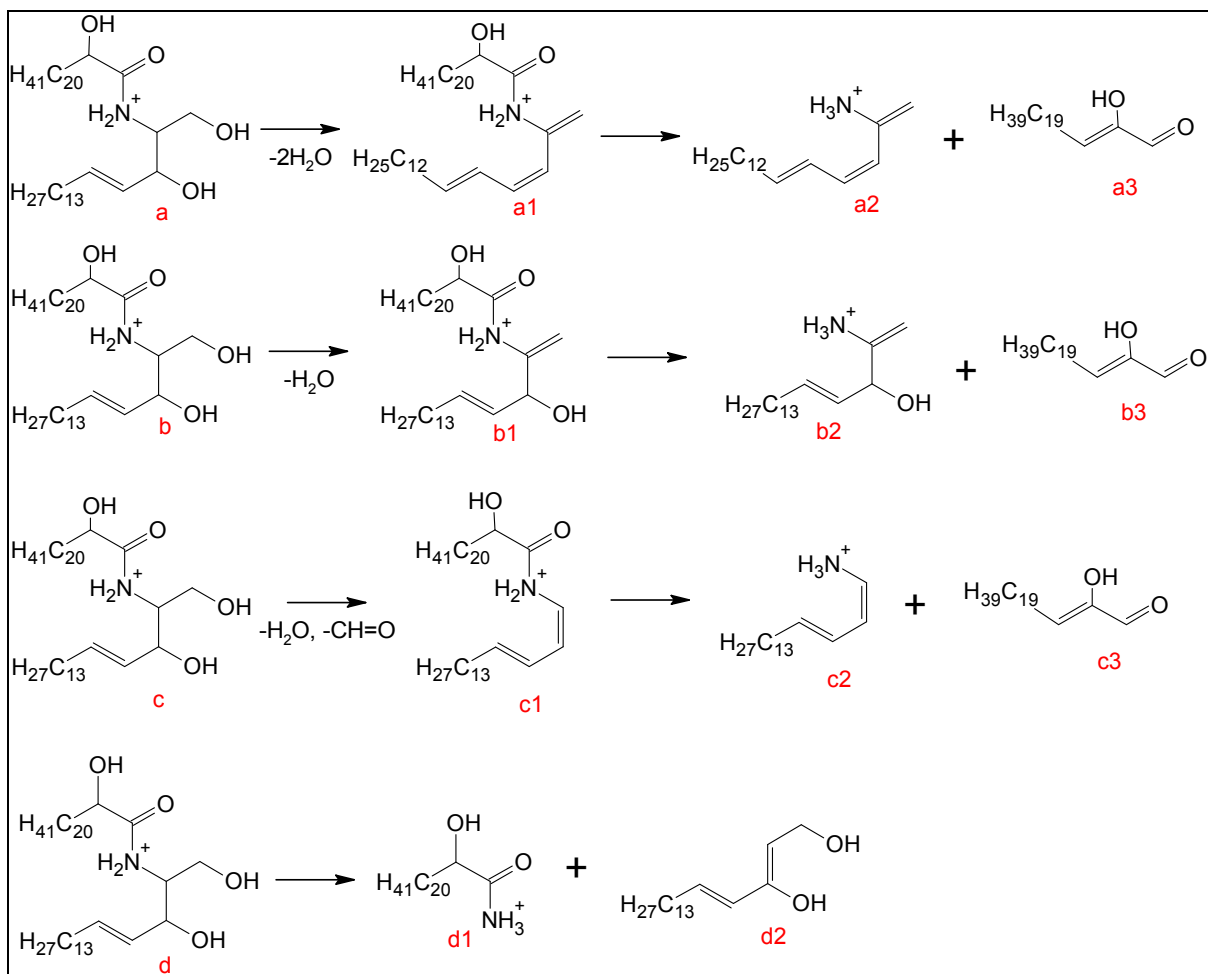


Abb. 42: Fragmentierungsschema von CER[AS]-Standard (A:22/S:18) mittels CID im positiven Ionenmodus

4.1.3.6 Vergleich der Fragmentmuster

Die Bildung der Fragmente ist hauptsächlich von der Art der Sphingosinbasis abhängig. Die amidgebundene FA spielt nur eine untergeordnete Rolle. So bilden CER[AS] und CER[NS] sowie CER[AP] und CER[NP] ähnliche Fragmente, die sich nur durch die Masse der zusätzlichen Hydroxylgruppe der FA unterscheiden.

Die Positionen der Spaltungspunkte werden durch den elektronegativen Effekt unterstützt, den sowohl Sauerstoff als auch Stickstoff ausüben. Spaltungen finden gerade dort statt, wo mehrere solcher Gruppen ihre elektronenziehende Wirkung ausüben, da dadurch die Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen schwächer wird. Dadurch sind vor allem die Amidbindung und an zweiter Stelle die Bindung zwischen C2 und C3 (siehe Abb. 24, 28, 32, 36) bei der Spaltung bevorzugte Angriffspunkte.

Im Falle der CER[EOS] sind sowohl die Amidbindung als auch die Esterbindung die Angriffspunkte für die Spaltungsreaktionen. Auch hier sind die elektronenziehenden Kräfte der Sauerstoffatome bzw. des Stickstoffatoms der Grund für die Instabilität der umliegenden Bindungen.

Die Untersuchungen in beiden Ionenmodi zeigten, dass die Fragment-Ionen im negativen Ionenmodus hauptsächlich aus der FA stammen, wobei die negative Ladung hauptsächlich am Sauerstoff lokalisiert und stabilisiert ist. Im positiven Ionenmodus stammen die Fragmente hauptsächlich aus der Sphingosinbasis, die positive Ladung wird am Stickstoff am ehesten stabilisiert.

Mit Hilfe dieser Fragmentschemata konnte das Fragmentierungsverhalten der nativen CER nachvollzogen werden.

4.1.4 Tandemmassenspektrometrische Untersuchung der nativen SC-Ceramide

4.1.4.1 Ceramid [EOS]

Die isobaren Strukturen des CER[EOS] können aufgrund von Kettenlängenvariationen in drei verschiedenen Strukturteilen entstehen: in der Sphingosinbasis, in der ω -hydroxylierten FA oder in der veresterten FA. Vom nativen CER[EOS] wurden zwei Precursor für die Fragmentierungsexperimente ausgewählt. Exemplarisch für ein Molekül mit einer geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen steht das CER[EOS] mit der monoisotopen Masse von 1039,99 Da, bestehend aus 68 Kohlenstoffatomen. 69 Kohlenstoffatome, demnach eine ungerade Anzahl, hatte das CER[EOS] mit der monoisotopen Masse von 1054,00 Da. Die

Tandemmassenspektren des CER[EOS] mit 68 Kohlenstoffatomen im positiven und negativen Ionenmodus sind in Abb. 43 dargestellt.

Durch die Messungen im negativen Ionenmodus konnte die Kettenlänge der veresterten FA identifiziert werden. Im positiven Ionenmodus entstammten die Fragment-Ionen der Basis. Der Mittelteil allein, also die ω -hydroxylierte FA konnte nicht in ausreichendem Maße in den nativen CER[EOS] detektiert werden, weder im positiven noch im negativen Ionenmodus. Somit ergaben sich die in Tab. 7 dargestellten Kombinationen und die dazugehörigen relativen Abundanzen für die ausgewählten Precursor.

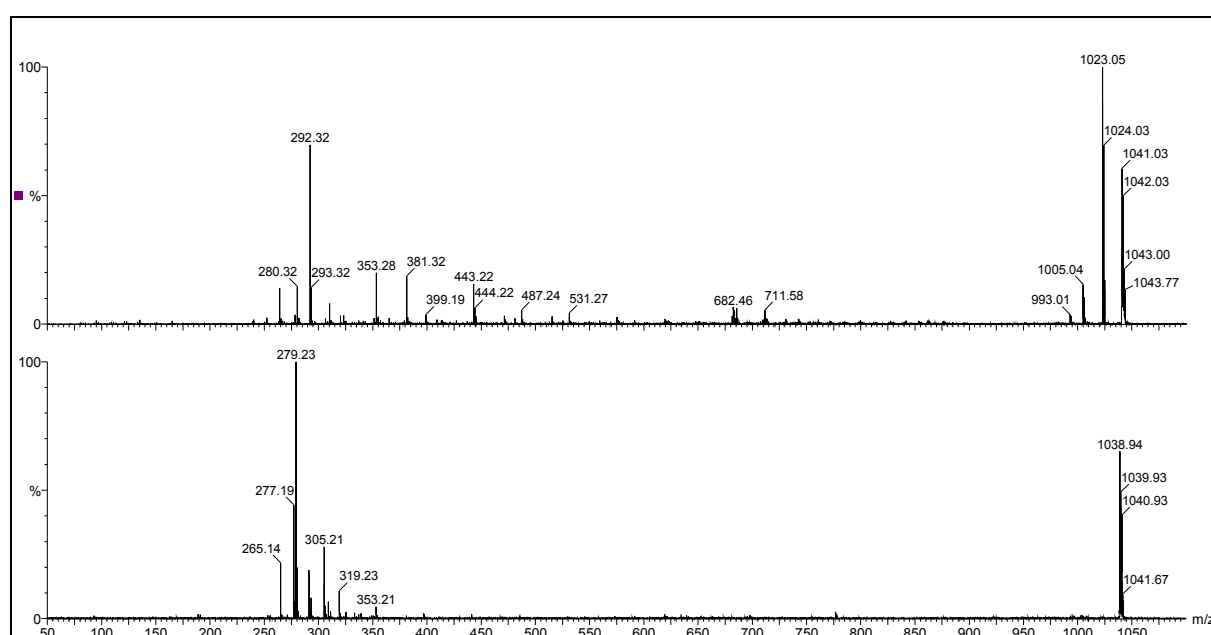


Abb. 43: Tandemmassenspektrum vom nativen CER[EOS] C68 ($m = 1039,99$ Da); oben: positiver Ionenmodus, unten: negativer Ionenmodus

Im negativen Ionenmodus zeigte sich, dass das CER[EOS] nicht nur Linolsäure (C18:2) als veresterte FA enthielt, woraus der Precursor E:18:2/OS:50 für das CER[EOS] mit C68 bzw. E:18:2/OS:51 für das CER[EOS] mit C69 resultiert. Daneben zeigten sich außerdem Fragmente der FA C17:2, C19:2 und C20:2, wobei der Anteil von C17:2 (Heptadecadiensäure) zwischen 16-20 % einnahm. Im positiven Ionenmodus zeigte sich, dass die Sphingosinbasis mit 20 Kohlenstoffatomen am häufigsten im CER[EOS] vorkommt. Die Kettenlänge des Sphingosins variierte dabei zwischen C17 und C22 [89]. Der hohe Anteil an C17:2 zeigt, dass die Kettenlänge der veresterten Fettsäure im CER[EOS] die Integrität der SC-Barriere nicht einschränkt. Es wurde bereits gezeigt, dass das SC verringerte Barriereigenschaften besitzt, sofern Ölsäure (C18:1) anstatt Linolsäure in CER[EOS] eingebaut ist [36,202]. Somit scheint

die konjugierte Doppelbindung in der veresterten FA eine essentielle Rolle für die Barriere zu spielen.

Tab. 7: Tandemmassenspektrometrisches Profil der Teile E und OS von CER[EOS] im negativen Ionenmodus und den Teilen EO und S im positiven Ionenmodus mit den Precursoren der monoisotopen Massen 1039,99 Da und 1054,00 Da, basierend auf der relativen Abundanz in % (Der häufigste Precursor wurde auf 100% gesetzt.)

Precursor (m=1039,99 Da, Gesamtkohlenstoffanzahl C68)		relative Abundanz [%]	Precursor (m=1054,00 Da, Gesamtkohlenstoffanzahl C69)		relative Abundanz [%]
<i>negativer Ionenmodus</i>			<i>negativer Ionenmodus</i>		
E:17:2/OS:51		21.63	E:17:2/OS:52		16.86
E:18:2/OS:50		100.00	E:18:2/OS:51		100.00
E:19:2/OS:49		8.15	E:19:2/OS:50		7.40
E:20:2/OS:48		1.83	E:20:2/OS:49		1.48
<i>positiver Ionenmodus</i>			<i>positiver Ionenmodus</i>		
EO:51/S:17		1.37	EO:52/S:17		15.79
EO:50/S:18		19.93	EO:51/S:18		21.05
EO:49/S:19		5.15	EO:50/S:19		31.58
EO:48/S:20		100.00	EO:49/S:20		100.00
EO:47/S:21		2.98	EO:48/S:21		73.68
EO:46/S:22		4.58	EO:47/S:22		26.32

Die Ergebnisse decken sich nur zum Teil mit denen von Masukawa et al., die mittels NP-HPLC-ESI-MS/MS im positiven und negativen Ionenmodus die SC-Ceramide untersuchten. Sie ermittelten für die Sphingosinbasis des CER[EOS] Kettenlängen zwischen C18 bis C22, allerdings detektierten sie als veresterte FA einzig Linolsäure (C18:2). Der größte Unterschied zu den in dieser Arbeit besprochenen Ergebnissen besteht darin, dass keine Subspezies mit ungeraden Kettenlängen in der veresterten FA des CER[EOS] detektiert worden sind, sowie kein gleichzeitiges Auftreten einer ungeraden Kohlenstoffanzahl in mehr als einer Struktureinheit [132]. Auch t`Kindt et al. konnten mittels RP-LC-QTOF-MS keine andere veresterte FA außer Linolsäure detektieren [177].

4.1.4.2 Ceramid [NP]

Die isobaren Strukturen des CER[NP] können aufgrund von Kettenlängenvariationen in den zwei Strukturteilen entstehen, der Phytosphingosinbasis und der amidgebundenen nichthydroxylierten FA.

Im negativen Ionenmodus wurden vier verschiedene Precursor für CER[NP] ausgewählt und bezüglich ihrer isobaren Strukturen untersucht: die einfach negativ geladenen Ionen mit den

Masse-Ladungsverhältnissen m/z 680,66, m/z 694,67, m/z 708,69 und m/z 722,70. Dies entspricht einer Gesamtkohlenstoffanzahl der CER von C43 bis C46. Die Massen der Produktionen wurden den Fragmenten des Standards mit Hilfe des Fragmentschemas zugeordnet. In Tab. 8 sind die entsprechenden isobaren Moleküle dargestellt. Es wurde die Anzahl der Kohlenstoffatome den jeweiligen Kettenteilen zugeordnet. Das Tandemmassenspektrum des CER[NP] mit 46 Kohlenstoffatomen im negativen Ionenmodus ist in Abb. 44 dargestellt.

So bestand der größte Anteil des CER[NP] mit der monoisotopen Masse von 681,66 Da und einer Gesamtkohlenstoffanzahl von 43 aus den Kombinationen N:26/P:17 und N:25/P:18. Das andere ungerade CER[NP] mit der Gesamtkohlenstoffanzahl C45 und der monoisotopen Masse von 709,69 Da bestand hauptsächlich aus N:25/P:20 und N:24/P:21. Beide Subspezies sind ungefähr gleich stark vertreten, daher konnte keines absolut auf 100 % gesetzt werden. Jedoch waren daneben noch weitere Kettenlängenkombinationen vorzufinden. Für das C43-CER[NP] wurden Fragment-Ionen detektiert, die zu den Precursoren N:27/P:16, N:24/P:19, N:23/P:20 und N:22/P:21 gehören, für das C45-CER[NP] wurden Fragment-Ionen der Precursor N:28/P:17, N:27/P:18, N:26/P:19 und N:23/P:22 detektiert.

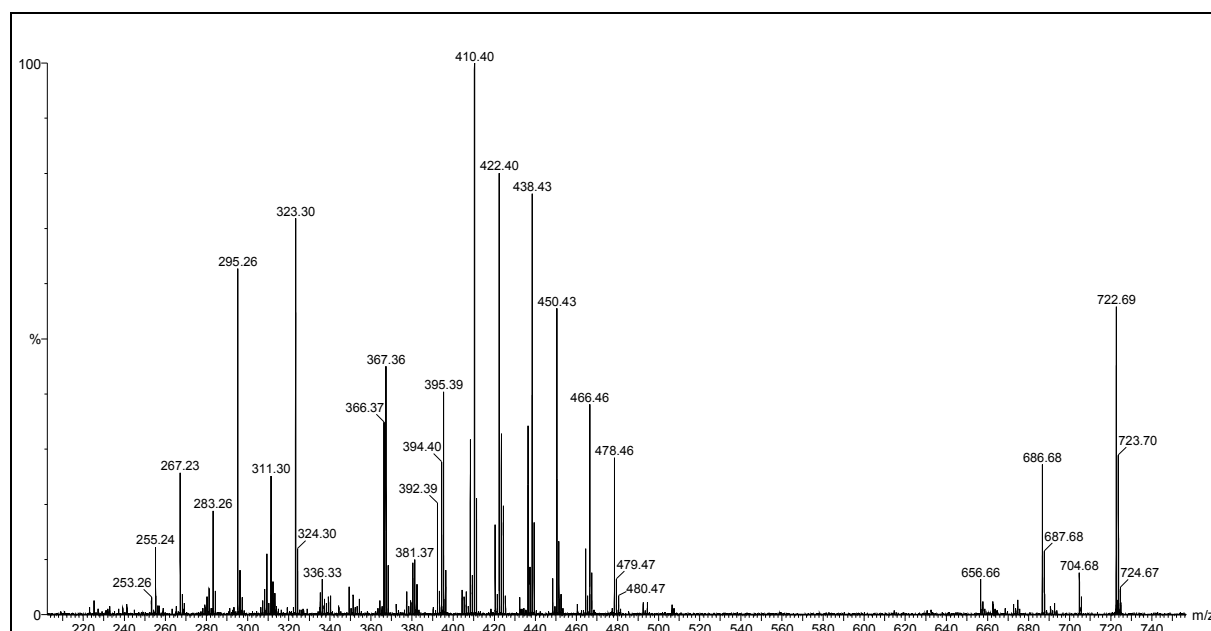


Abb. 44: Tandemmassenspektrum vom nativen CER[NP] C46 ($m = 723,71$ Da) im negativen Ionenmodus

Das CER[NP] mit der geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen von C44 bestand zum größten Teil aus N:26/P:18, daneben wurden noch Fragmente der isobaren Moleküle N:28/P:16, N:27/P:17, N:25/P:19, N:24/P:20, N:23/P:21 und N:22/P:22 detektiert. Die isobaren

Subspezies mit einer ungeraden Kohlenstoffanzahl in beiden Ketten nehmen hierbei einen Anteil von 13,00 % ein. Bei einer geraden Kohlenstoffanzahl von C46 bestand das CER[NP] hauptsächlich aus der Kombination N:24/P:22. Auch N:26/P:20 nahm einen großen Anteil ein. Des Weiteren wurden noch Fragmente gefunden, die zu den Molekülen N:29/P:17, N:28/P:18, N:27/P:19, N:25/P:21, N:23/P:23 und N:22/P:24 gehören, mit einem Anteil an isobaren Molekülen mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in beiden Molekülteilen von 11,22 %.

Tab. 8: Tandemmassenspektrometrisches Profil der Teile N und P von CER[NP] im negativen Ionenmodus mit den Precursoren der monoisotopen Massen 681,66 Da, 695,68 Da, 709,70 Da und 723,71 Da, basierend auf der relativen Abundanz in % (Der häufigste Precursor wurde auf 100% gesetzt.)

Precursor (m=681,66 Da, Gesamtkohlen- stoffanzahl C43)	relative Abundanz [%]	Precursor (m=695,68 Da, Gesamtkohlen- stoffanzahl C44)	relative Abundanz [%]	Precursor (m=709,70 Da, Gesamtkohlen- stoffanzahl C45)	Relative Abundanz [%]	Precursor (m=723,71 Da, Gesamtkohlen- stoffanzahl C46)	relative Abundanz [%]
N:27/P:16	11.98	N:28/P:16	13.87	N:28/P:17	53.94	N:28/P:18	39.53
N:26/P:17	100.00	N:27/P:17	10.76	N:27/P:18	54.55	N:27/P:19	6.60
N:25/P:18	92.36	N:26/P:18	100.00	N:26/P:19	68.04	N:26/P:20	84.05
N:24/P:19	47.79	N:25/P:19	10.19	N:25/P:20	92.55	N:25/P:21	17.49
N:23/P:20	17.48	N:24/P:20	58.33	N:24/P:21	92.04	N:24/P:22	100.00
N:22/P:21	7.42	N:23/P:21	6.16	N:23/P:22	32.05	N:23/P:23	5.60
		N:22/P:22	8.48			N:22/P:24	9.13

Die Kettenlänge des Phytosphingosins variiert dabei von C16 bis C24 und die Kettenlänge der amidgebundenen nichthydroxylierten FA von C22 bis C28, wobei sowohl gerade als auch ungerade Kettenlängen vorkommen [89].

Masukawa et al. haben für CER[NP] Kettenlängenvariationen von C40 bis C52, wobei die Kettenlängen für die phytosphingosinbasis Kettenlängen zwischen C16 bis C26 und für die nichthydroxylierte FA zwischen C23 bis C30 gefunden, allerdings auch hier ohne eine Detektion von Subspezies mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen parallel in beiden Strukturteilen [132].

4.1.4.3 Ceramid [AP]

Die isobaren Strukturen des CER[AP] können aufgrund von Kettenlängenvariationen in den zwei Strukturteilen entstehen, der Phytosphingosinbasis und der amidgebundenen α -hydroxylierten FA.

Im negativen Ionenmodus wurden zwei verschiedene Precursor für CER[AP] ausgewählt und bezüglich ihrer isobaren Strukturen untersucht, die einfach negativ geladenen Ionen mit den Masse-Ladungsverhältnissen m/z 696,66 und m/z 710,67. Dies entspricht einer

Gesamtkohlenstoffanzahl der CER von C43 bis C44. Das Tandemmassenspektrum des CER[AP] mit 68 Kohlenstoffatomen im negativen Ionenmodus ist in Abb. 45 dargestellt.

Die Massen der Produkt-Ionen wurden mit den Fragmenten des Standards mit Hilfe des Fragmentschemas zugeordnet. In Tab. 9 sind die entsprechenden isobaren Moleküle mit ihren relativen Häufigkeiten dargestellt. Es wurde die Anzahl der Kohlenstoffatome den jeweiligen Kettenteilen zugeordnet. So bestand der größte Anteil des CER[AP] mit der monoisotopen Masse von 696,66 Da und einer Gesamtkohlenstoffanzahl von 43 aus der Kombination A:26/P:19 und A:25/P:18. Jedoch waren daneben noch weitere Kettenlängenkombinationen vorzufinden, die zu den Precursorn A:27/P:16, A:24/P:19, A:23/P:20 und A:22/P:21 gehören.

Das CER[AP] mit der geraden Anzahl an Kohlenstoffatomen von C44 besteht zum größten Teil aus A:24/P:20, daneben wurden noch Fragmente der isobaren Moleküle A:28/P:16, A:27/P:17, A:26/P:18, A:25/P:19, A:23/P:21 und A:22/P:22 detektiert. Die isobaren Subspezies mit ungeraden Kettenlängen in beiden Molekülteilen nahmen hierbei einen Gesamtanteil von 14,40 % ein.

Die Kettenlänge des Phytosphingosins variiert dabei von C16 bis C22 und die Kettenlänge der amidgebundenen FA von C22 bis C28, wobei sowohl gerade als auch ungerade Kettenlängen vorkommen.

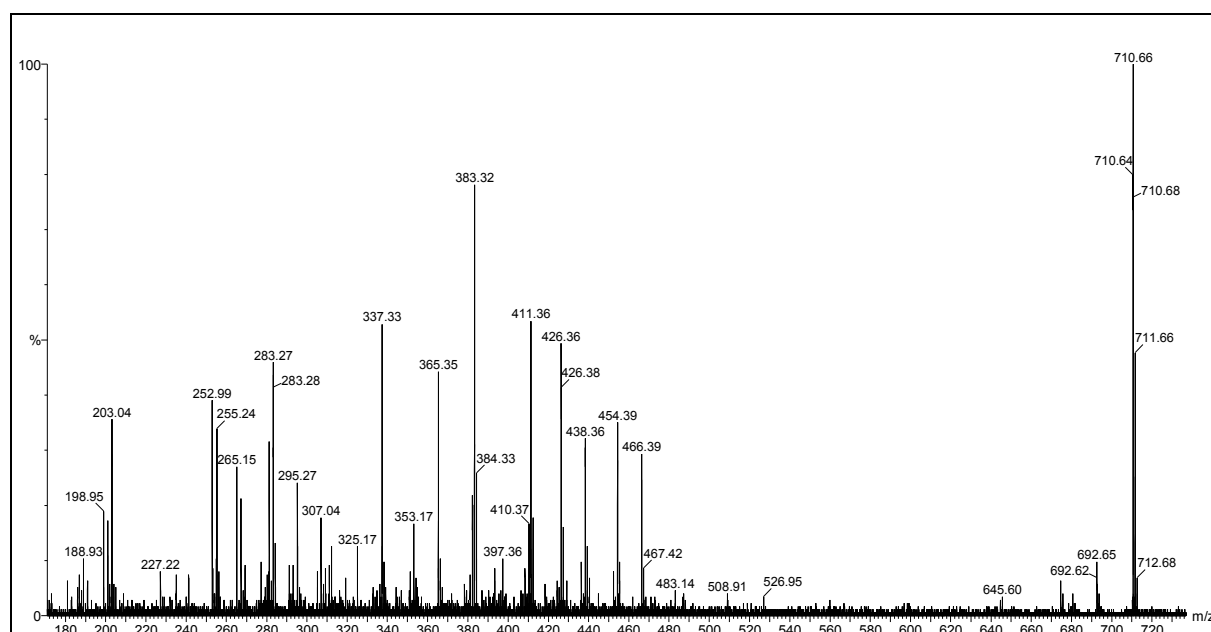


Abb. 45: Tandemmassenspektrum vom nativen CER[AP] C44 ($m = 711,68$ Da) im negativen Ionenmodus

Tab. 9: Tandemmassenspektrometrisches Profil der Teile A und P von CER[AP] im negativen Ionenmodus mit den Precursoren der monoisotopen Massen 697,66 Da und 711,68 Da, basierend auf der relativen Abundanz in % (Der häufigste Precursor wurde auf 100% gesetzt.)

Precursor (m=697,66 Da, Gesamtkohlenstoff- anzahl C43)		Precursor (m=711,68 Da, Gesamtkohlenstoff- anzahl C44)	
	relative Abundanz [%]		relative Abundance [%]
A:22/P:21	21.43	A:22/P:22	12.21
A:23/P:20	28.54	A:23/P:21	11.46
A:24/P:19	56.45	A:24/P:20	100.00
A:25/P:18	100.00	A:25/P:19	13.77
A:26/P:17	77.67	A:26/P:18	75.11
A:27/P:16	19.07	A:27/P:17	8.60
A:28/P:15	7.04	A:28/P:16	11.63

Die Gruppe um Masukawa hat für das CER[AP] Kettenlängenvariationen von C20 bis C26 für die α -hydroxylierte FA und C16 bis C22 für die Phytosphingosinbasis ermittelt [132]. Auch hier decken sich die Ergebnisse mit denen in dieser Arbeit, bis auf das Fehlen von Subspezies mit ungerader Anzahl an Kohlenstoffatomen gleichzeitig in beiden Strukturteilen.

4.1.4.4 Ceramid [NS] und Ceramid [AS]

Die isobaren Moleküle dieser Ceramide können hier wiederum durch Kettenlängenvariationen in beiden Strukturteilen entstehen. Die Messungen der nativen Proben waren nicht möglich, da sich durch die Lagerung in der MeOH/CHCl₃-Mischung ausschließlich Chloridaddukte gebildet haben, die nur schwer fragmentierbar sind [210]. Somit waren die Fragmentspektren nicht aussagekräftig und konnten nicht ausgewertet werden. Diese Ceramide sollten nochmal ausführlicher bearbeitet werden, indem diese Addukte unterdrückt werden.

4.1.4.5 Zusammenfassung der MS/MS-Untersuchungen an den nativen CER

Durch die erhaltenen Ergebnisse konnte die bestehende Heterogenität in der Beschaffenheit der Ceramide noch erweitert werden.

Auffällig ist, dass sich die Kettenlängen der Sphingoidbasis und der FA um mehrere Kohlenstoffatome unterscheiden, meist sind es mehr als vier Kohlenstoffatome. Dadurch können sich die Ketten innerhalb des Bilayers wahrscheinlich stärker überlappen, als im Armature reinforcement model und im Asymmetry-model vermutet [103,167]. Der Einfluß der unterschiedlichen Kettenlängen auf die Intaktheit der Barriere sollte jedoch noch genauer untersucht werden, genauso, wie die unterschiedlichen Kettenlängen der Ceramide die Penetration von Arzneistoffen durch die Haut beeinflussen.

Die isobaren Subspezies, in denen ungerade Kettenlängen in beiden Molekülteilen vorkommen, nahmen einen Anteil von 11 - 14 % der einzelnen CER-Spezies ein, wobei noch geklärt werden muss, wie diese genau entstehen [133]. Durch diese Meßmethode kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob die gebundenen FA auch verzweigte Ketten beinhalten können. Hierfür sollte eine MSⁿ durchgeführt werden.

Die Kettenlänge der Sphingoidbasis und der FA in den CER ist bisher vorrangig nach alkalischer Hydrolyse und anschließender Derivatisierung der Moleküle mittels GC-MS bestimmt worden [117,150,151,198,201]. Diese Methode hat gute Ergebnisse über die Anzahl der Kohlenstoffatome innerhalb der Ketten geliefert, allerdings konnte keinerlei Aussage darüber getroffen werden, inwiefern diese miteinander kombiniert sind, also welche isobaren Strukturen existieren [62,155]. Durch eine Kopplung von TLC MALDI QTOF-MS/MS konnten bereits unveränderte Glycosphingolipide bestimmt werden [140].

Eine Weiterentwicklung ist eine online-Kopplung der HPLC mit MS/MS-Detektion. 1997 haben Mano et al. eine HPLC-ESI-MS/MS-Methode entwickelt, die zur Bestimmung von Sphingolipiden dient, die zuvor aus Zelllinien extrahiert wurden [129]. Ähnliche Methoden sind auch von anderen Gruppen zur Qualifizierung und Quantifizierung der CER und deren natürlichen Derivaten aus verschiedenen Zelllinien herangezogen worden [66,124]. Auch CER aus dem Gehirn hat man durch eine LC-MS/MS-Methode näher untersuchen können [81]. Masukawa et al. haben erstmals ungerade Kettenlängen in den Fettsäureresten und in dem Sphingoidrest aus dem Gesamtmolekül in Haarceramiden mittels RP-HPLC-nanoESI-MS/MS bestimmen können. Allerdings ist deren Biosynthese noch ungeklärt [133]. Diese Kopplung ist allerdings für die tandemmassenspektrometrische Bestimmung der CER aus dem SC weniger geeignet, da die Zusammensetzung der CER-Klassen zu komplex ist, um alle möglichen Molekülkombinationen zu erfassen [155]. Masukawa et al. haben 2008 trotzdem einen Versuch gewagt. Der Zugang zu den Molekülen mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen in den einzelnen Ketten, auch wenn die Gesamtkohlenstoffanzahl gerade war, blieb ihnen jedoch verschlossen [132]. Von Farwanah et al. sind ungerade Kettenlängen in beiden Strukturteilen in den kovalent gebundenen Ceramiden mittels Nano-ESI-MS/MS gefunden worden [60].

2012 haben t'Kindt et al. mittels RP-LC-ESI-MS/MS über 1000 unterschiedliche SC-CER parallel bestimmt. Sie haben CER identifizieren können, die eine ungerade Kohlenstoffanzahl gleichzeitig in beiden Molekülteilen hatten. Ist diese Technik nicht verfügbar, kann die in

dieser Arbeit entwickelte Methode mit der vorherigen Separation der CER-Klassen als eine gute Alternative dienen, um wirklich alle isobaren Subspezies zu erfassen. Das zeigt sich vor allem darin, dass t`Kindt et al. für das CER[EOS] einzig Linolsäure als veresterte FA detektieren konnten [177]. Die in dieser Arbeit verwendete Methode ermöglicht durch die verlängerte Messzeit die Detektion isobarer CER-Subspezies, die nur in geringen Mengen vorkommen, jedoch für die Funktionen des SC-Lipidbilayers relevant sein können. Die Art und Länge der FA und Sphingoidbasis der CER beeinflussen Hautveränderungen genauso wie der Gesamtlipidzustand [158]. Daher ist es wichtig, deren genaue Struktur zu analysieren.

4.2 Untersuchung der Lipidverteilung im SC von Schizophrenieerkrankten

4.2.1 Die Profile der Lipid- und Ceramidverteilung

Die Lipide, die mittels Extraktionszelle von den beiden Probandengruppen gewonnen wurden, wurden mittels AMD-HPTLC wie unter Kapitel 3.3 beschrieben aufgetrennt.

Es lassen sich somit nicht nur die Ceramidklassen, sondern auch die weiteren Hautlipide auftrennen. Die Laufstrecken der Referenzlipide sind analog zu den Laufstrecken der Lipide, die aus dem SC extrahiert wurden. Im Gegensatz zu den scharf getrennten Banden bei den Standard-CER auf der HPTLC-Platte nach Erstellung der Densitogramme, zeigen die natürlich vorkommenden CER eine Peakverbreiterung, welche auf die Subspezies in den einzelnen CER-Klassen zurückzuführen ist. Diese Subspezies resultieren wie zuvor beschrieben aus Variationen in den Kettenlängen der Fettsäure- und Sphingoidbasenketten. Insgesamt sind 7 verschiedene CER-Banden auf den Platten sichtbar. CER[EOS] hat von ihnen die geringste Polarität und legt deshalb den weitesten Weg auf der Platte zurück, gefolgt von CER[NS], CER[NP], CER[EOH], CER[NH/AS], CER[AP] und CER[AH] (vergleiche Abb. 46). CER[NH] und CER[AS] lassen sich aufgrund ihrer ähnlichen Polarität ohne Acetylierung nicht auftrennen, wobei CER[NH] den größeren Anteil an der Fraktion hat [151,173]. Die weiteren CER, CER[EOP], CER[NdS], CER[AdS] und CER[EODS], sind aufgrund ihrer zu geringen Menge in den SC-Extrakten per HPTLC nicht nachweisbar.

Die Banden der SC-Lipide wurden nach Abgleich mit verschiedenen Literaturdaten mit Hilfe der R_f -Werte von Referenzsubstanzen identifiziert [57,201]. Danach wurden die Ceramidmengen in μg in Bezug auf die gesamte extrahierte Hautfläche sowie deren prozentuale Zusammensetzung bestimmt.

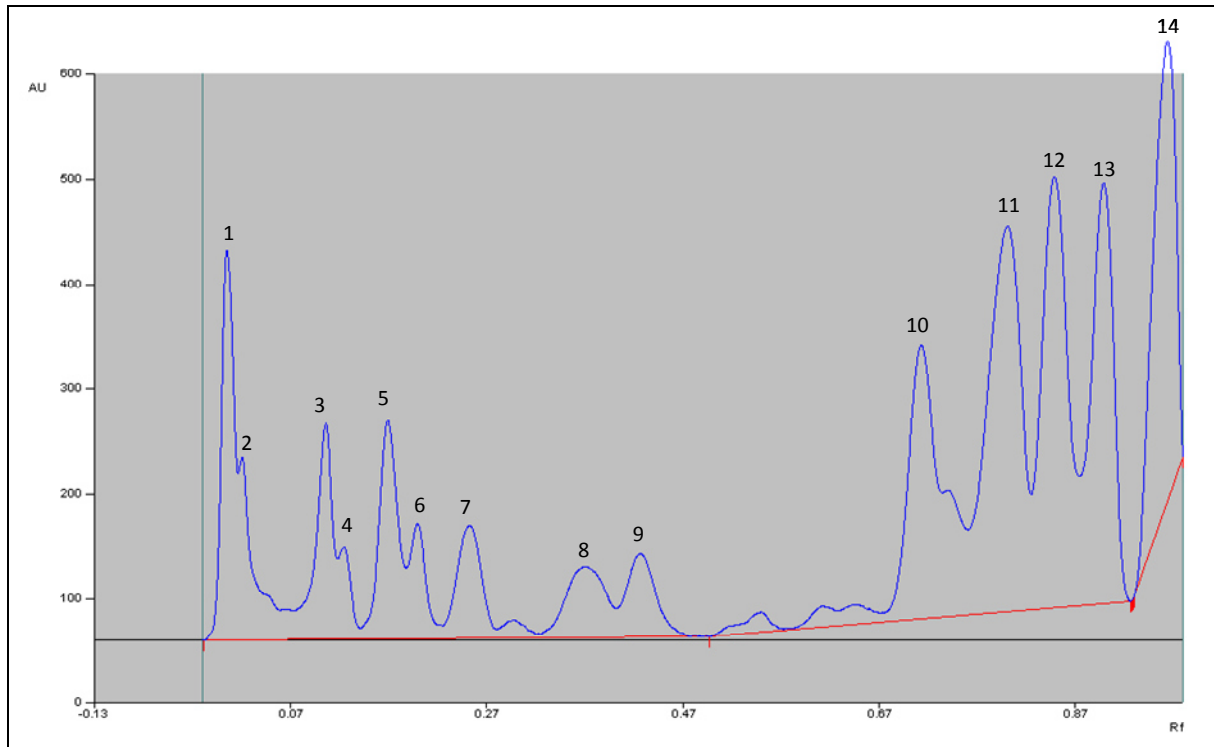


Abb. 46: Densitogramm der nativen SC-Lipide. 1: Start, 2: Cholesterolsulfat, 3: CER[AH], 4: CER[AP], 5: CER[NH/AS], 6: CER[EOH], 7: CER[NP], 8: CER[NS], 9: CER[EOS], 10: Cholesterol, 11: FFA, 12: Triacylglycerole, 13: Cholesterolester, 14: Squalen

In Abb. 47 sind die prozentualen Ceramidprofile gegenübergestellt. Ein Unterschied in der CER-Zusammensetzung ist zwischen den Schizophrenieerkrankten und der Kontrollgruppe erkennbar. So ist der Anteil an CER[AH] und CER[NH/AS] in der Gruppe der Schizophrenieerkrankten leicht erhöht, während der Anteil an CER[NP] und CER[EOS] leicht vermindert ist [172]. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Bei der Betrachtung der Zusammensetzung der weiteren SC-Lipide (Abb. 48) war auch kein signifikanter Unterschied erkennbar. Somit hat die vermutete veränderte Lipidbiochemie der Schizophrenieerkrankten keinen Einfluß auf die Intaktheit der Hautbarriere. Daher ist die Analytik der Zusammensetzung der Hautlipide als nichtinvasive Methode zum Nachweis der Schizophrenie nicht nutzbar [172].

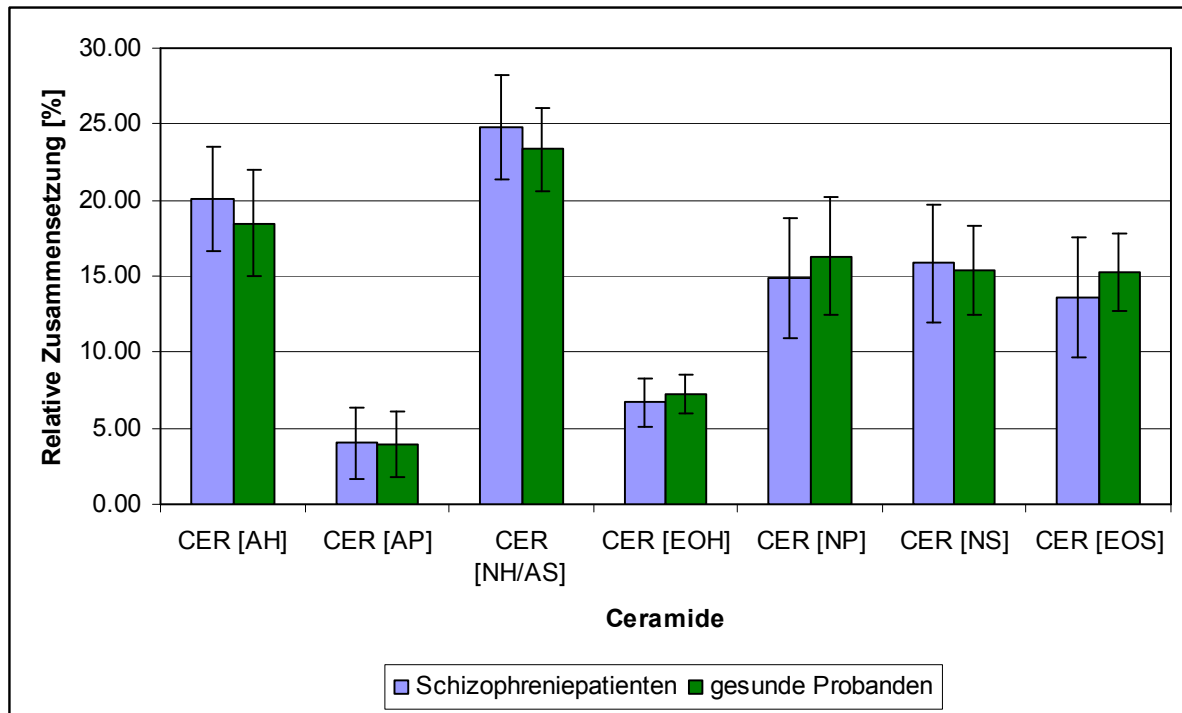


Abb. 47: Prozentuale Zusammensetzung der SC-CER nach densitometrischer Auswertung

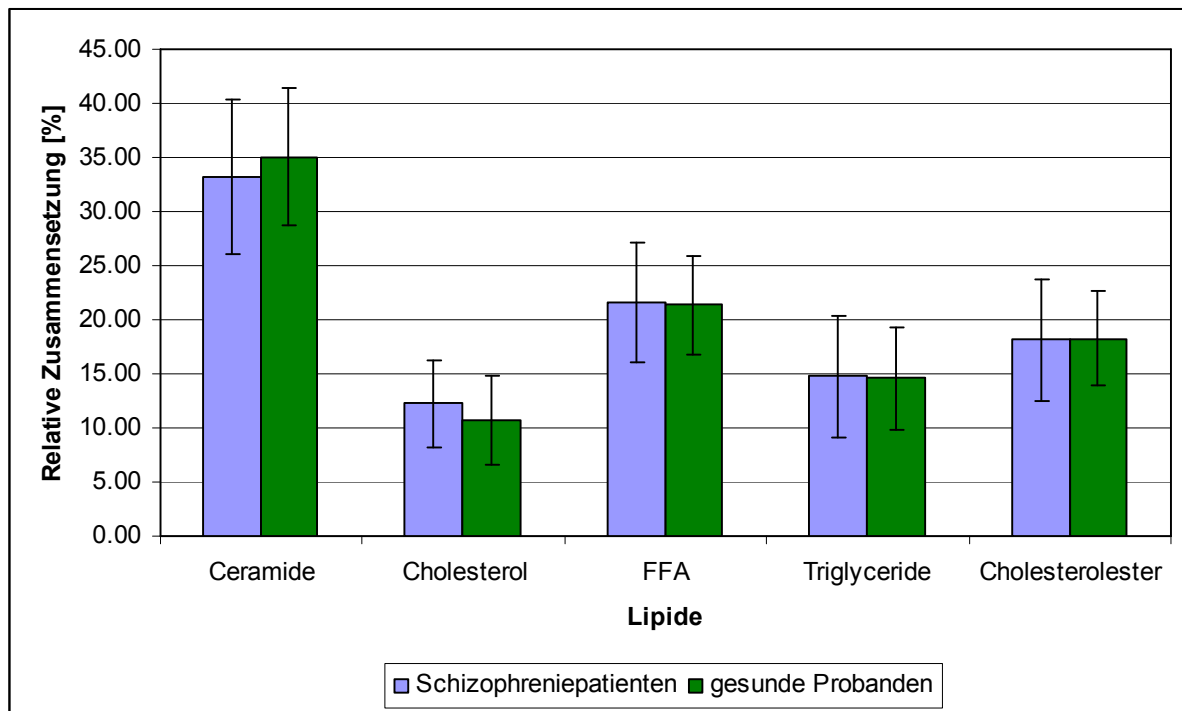


Abb. 48: Prozentuale Zusammensetzung der SC-Lipide nach densitometrischer Auswertung

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse stimmen mit den bisher gefundenen Ergebnissen der Lipidzusammensetzung in gesunder Haut überein [32,61,195].

Die Hirnhaut und die Haut entstehen aus der gleichen Keimzelle, dem Ektoderm. Die Hirnhaut Schizophrenieerkrankter zeigt Veränderungen, daher war es naheliegend, dass

auch in der Haut, speziell in der Lipidzusammensetzung des SC, Unterschiede zu gesunden Probanden vorliegen [171,172,181,206]. In dieser Untersuchung wurde darauf geachtet, dass alle ausgewählten Probanden keine Dermatosen hatten. Die vorher genannte Theorie sollte nochmal dahingehend untersucht werden, ob unter den Schizophrenieerkrankten eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Patienten mit Hautkrankheiten existiert.

Um die veränderte Lipidbiochemie näher zu untersuchen, wurden daher die freien Fettsäuren näher betrachtet (Kapitel 4.2.2).

4.2.2 Die Profile der ungesättigten freien Fettsäuren

Die Lipide, die mittels Extraktionszelle von den beiden Probandengruppen gewonnen wurden, wurden wie unter Kapitel 3.3.2 beschrieben aufgetrennt, die FFA extrahiert, derivatisiert und der Anteil an Arachidonsäure (AA), Eicosatriensäure (ETA) und Eicosapentensäure (EPA) mittels GC-MS bestimmt.

EPA konnte in keiner der Proben, ETA nur in einem geringen Anteil der Proben nachgewiesen werden. Daher beziehen sich alle Berechnungen auf den Anteil an AA.

In Abb. 49 ist der prozentuale Anteil an ungesättigten FFA innerhalb der FFA dargestellt, Abb. 50 stellt den absoluten Anteil an AA in den Proben dar.

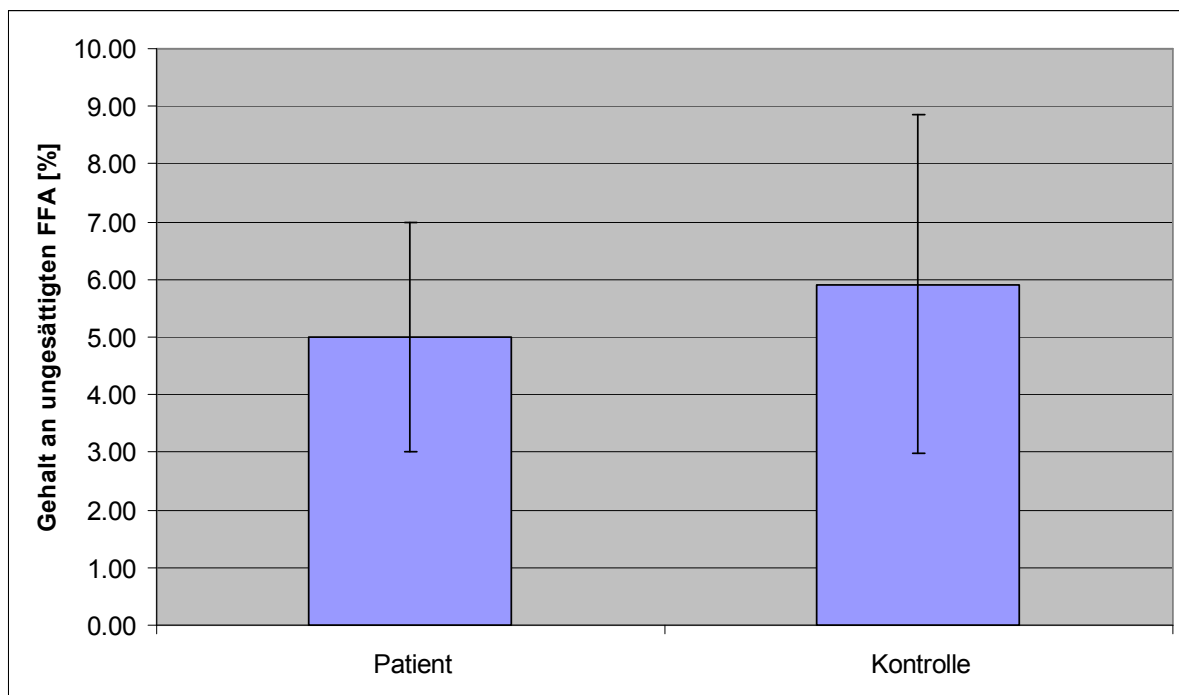


Abb. 49: prozentualer Anteil der ungesättigten Fettsäuren an den FFA

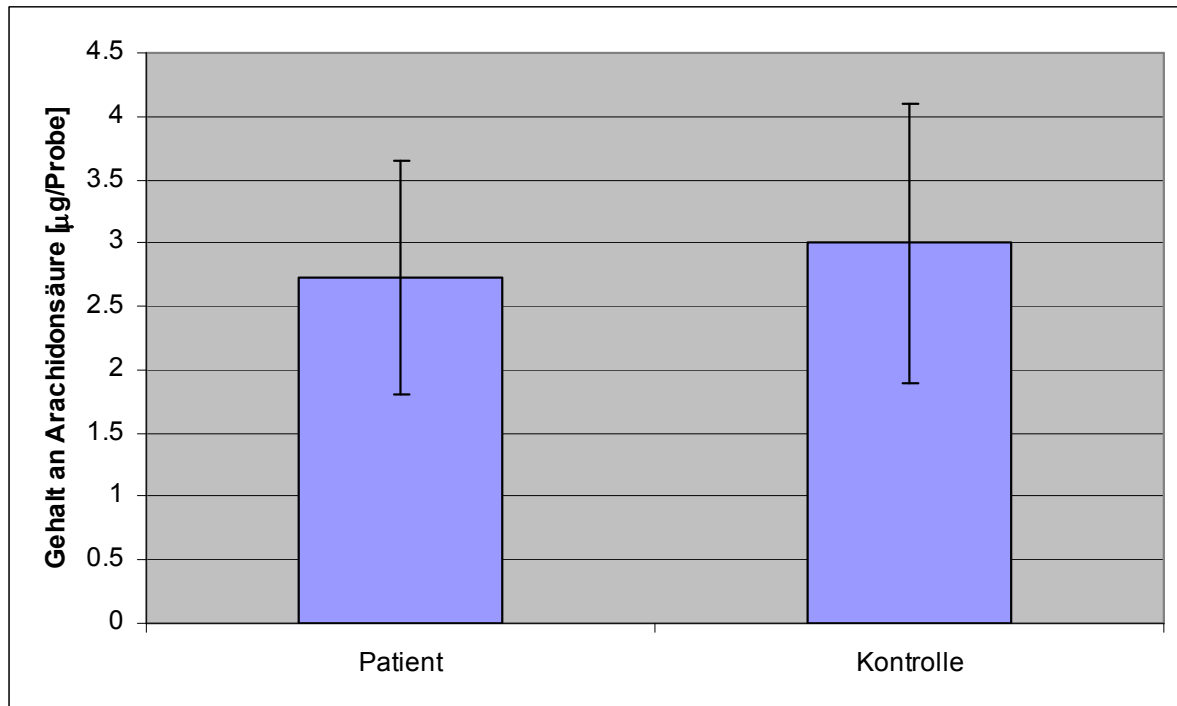


Abb. 50: Gehalt an Arachidonsäure

Ein signifikanter Unterschied war nicht erkennbar, allerdings ist der Anteil an ungesättigten FFA und im speziellen an Arachidonsäure im SC der Schizophreniepatienten leicht verringert. Dass sich AA und die anderen PUFA nicht mehr im SC nachweisen lassen, lässt sich vor allem dadurch erklären, dass die Synthese der PG in der Haut in den tieferen, lebenden Hautschichten stattfindet und somit der Großteil an PUFA schon verbraucht wurde, bevor sie in das SC gelangen. Dennoch sollten auch in den tieferen Hautschichten weniger PUFA zu finden sein, da ansonsten keine verringerte Reaktion auf Niacin im Hauttest auftreten würde [172].

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein tiefergehendes Bild über die Zusammensetzung der Stratum corneum Lipide, speziell der Stratum corneum Ceramide geliefert. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die molekulare Ebene der Ceramide gelegt.

Mit Hilfe der RP-HPLC-APCI-MS konnten die Subspezies der einzelnen Ceramidklassen identifiziert werden. Somit konnten Profile der einzelnen Ceramidklassen erstellt werden, wobei die Gesamtkohlenstoffzahl im Ceramidmolekül für die Darstellung der prozentualen Verteilung herangezogen wurde. Dabei wurde herausgefunden, dass der Anteil an Ceramiden mit einer ungeraden Anzahl an Kohlenstoffatomen im Gesamtmolekül 35 % beträgt.

Die so gefundenen Subspezies wurden nachfolgend tandemmassenspektrometrisch mittels QTOF-MS/MS untersucht, um die Kettenlängen der Sphingoidbasis und der amidgebundenen Fettsäure im Ceramidmolekül genau zu identifizieren. Hierfür musste zuvor eine Trennungsmethode für die einzelnen Ceramidklassen entwickelt werden. Um die gewünschten Untersuchungen durchführen zu können, muß die Ceramidklasse sehr rein und frei von störenden Substanzen sein, was einen hohen analytischen Aufwand bedeutet. Vor allem Moleküle, die leichter ionisierbar sind als die Ceramide sollten in der Probenlösung nicht mehr enthalten sein. Methode der Wahl ist eine Trennung mittels NP-HPLC. Anhand ELSD-Detektion konnte die Trennung der Ceramidklassen über die Normalphasensäule gezeigt werden und anhand ihrer Retentionszeit wurden die einzelnen Ceramidklassen in verschiedenen Fraktionen gesammelt.

Durch Fragmentierungsexperimente an Ceramidstandards wurden die Struktur der Fragmente und deren Entstehung aufgeklärt. Die tandemmassenspektrometrische Untersuchung mittels nano-ESI-QTOF-MS/MS fand sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus statt. Die Ableitung der CER-Strukturen aus den vorliegenden Fragmentierungsmustern war ein bedeutender Bestandteil dieser Arbeit und ist in dieser Form bisher noch nicht so ausführlich beschrieben worden.

In folgenden tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen der aus nativem Stratum corneum gewonnenen Ceramidfraktionen, war es möglich, isobare Subspezies zu identifizieren. Ziel war es, Profile für Subspezies verschiedener Vorläufer-Ionen der CER[EOS], CER[NP] und CER[AP] zu erstellen, wofür sowohl Subspezies mit gerader Kohlenstoffanzahl als auch mit

ungerader Kohlenstoffanzahl im Gesamtmolekül gefunden und ausgewählt wurden. Die isobaren Subspezies des CER[EOS] variieren in allen drei Molekülteilen in ihren Kettenlängen. Direkte Ergebnisse wurden nur für die Sphingosinbasis und die veresterte FA detektiert. Dabei wurde als veresterte FA erstmalig nicht nur Linolsäure gefunden, sondern auch Heptadecadiensäure (C17:2) mit einem Anteil von 16 – 20 %. Das zeigt, dass die konjugierte Doppelbindung in der veresterten Fettsäure eine essentielle Rolle für die Barriere spielt.

Für die isobaren Subspezies des CER[NP] und des CER[AP] war auffällig, dass sich die beiden Kettenlängen im Ceramidmolekül meist um mindestens vier Kohlenstoffatome unterscheiden. Das führt dazu, dass die Ketten der CER innerhalb des Bilayer überlappen und somit besser van der Waals-Bindungen eingehen können. Genauso wurden isobare Subspezies entdeckt, in denen beide Molekülteile des Ceramids eine ungerade Anzahl an Kohlenstoffatomen aufwiesen. Die dadurch entdeckte größere Heterogenität der Ceramide muß noch im Hinblick auf deren Einfluß auf die Eigenschaften des Stratum corneum Bilayers und die Wirkstoffpenetration durch die Haut näher untersucht werden. Die Fraktionen des CER[NS] und CER[AS] waren aufgrund einer suboptimalen Lagerung nicht mehr der tandemmassenspektrometrischen Messung zugänglich.

Mit Hilfe der tandemmassenspektrometrischen Untersuchungen der Ceramide konnten Beiträge zur Verbesserung der Modellvorstellungen und der Anordnung der humanen SC-Lipide geleistet werden.

Mit Genehmigung der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena konnten in vivo-Oberflächenextrakte der Stratum corneum Ceramide von insgesamt 77 Probanden (49 gesunde Probanden, 28 Schizophreniepatienten) gewonnen werden. Für die Auswahl der Studienteilnehmer wurden strenge Kriterien zu Grunde gelegt. Des Weiteren wurden die Lipidprofile von Schizophreniepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden mittels HPTLC untersucht. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, was womöglich auf die sowieso vorhandene interindividuelle Variabilität in der Lipidzusammensetzung im Stratum corneum zurückzuführen ist. Bei der Untersuchung des Gehalts an ungesättigten Fettsäuren, die für den Prostaglandinstoffwechsel von großer Bedeutung sind, wurde keine signifikante Abweichung im Stratum corneum der Schizophreniepatienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet.

Die in dieser Dissertationsschrift vorliegenden Ergebnisse können zukünftig erweitert werden, indem die noch nicht untersuchten Ceramidklassen ebenfalls einer tandemmassen-

spektrometrischen Analyse unterzogen werden. Außerdem wäre es wichtig herauszufinden, ob die Fettsäureketten der Ceramide alle unverzweigt sind oder ob außerdem verzweigte Ketten vorkommen können, was nochmals die Eigenschaften der Membrandoppelschicht im Stratum corneum beeinflusst.

Genauso ist es wichtig, die isobaren Subspezies der Ceramide bei diversen Hauterkrankungen, wie Psoriasis oder atopischer Dermatitis, zu identifizieren. Hier ist bereits bekannt, dass ein Unterschied in der Lipidzusammensetzung im Stratum corneum der erkrankten Hautstellen besteht und es wäre interessant zu wissen, ob sich der Unterschied auf molekularer Ebene fortsetzt. Die dann gewonnenen Erkenntnisse können dabei helfen, ein verbessertes Therapiekonzept für diese Hautkrankheiten zu entwickeln.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Abrams K, Harvell JD, Shriner D, Wertz P, Maibach H, Maibach HI, Rehfeld SJ: Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J Invest Dermatol* 1993;101:609-613.
- 2 Akanuma H, Kishimoto Y: Synthesis of Ceramides and Cerebrosides Conaining both alpha-Hydroxy and Nonhydroxy Fatty Acids from Lignoceryl-CoA by Rat Brain Microsomes. *The Journal of Biological Chemistry* 1979;254:1050-1056.
- 3 Andreasen N: Positive vs. negative schizophrenia: a critical evaluation. *Schizophr. Bull.* 1985;11:380-389.
- 4 Andreasen N, Olsen S: Negative v positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch. Gen. Psychiatry* 1982;39:789-794.
- 5 Ann QH, Adams J: Structure-Specific Collision-Induced Fragmentations of Ceramides Cationized with Alkali-Metal Ions. *Anal Chem* 1993;65:7-13.
- 6 Bartke N, Hannun Y: Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 2009;50:91-96.
- 7 Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM: Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* 2000;114:185-192.
- 8 Benyo Z, Gille A, Bennett CL, Clausen BE, Offermanns S: Nicotinic acid-induced flushing is mediated by activation of epidermal langerhans cells. *Mol. Pharmacol.* 2006;70:1844-1849.
- 9 Berger GE, Smesny S, Amminger GP: Bioactive lipids in schizophrenia. *Int. Rev. Psychiatry* 2006;18:85-98.
- 10 Black D, Del Pozo A, Lagarde JM, Gall Y: Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Res Technol* 2000;6:70-76.
- 11 Bleck O, Abeck D, Ring J, Hoppe U, Vietzke JP, Wolber R, Brandt O, Schreiner V: Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J. Investig. Dermatol.* 1999;113:894-900.
- 12 Bleuler E: *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias*. International Universities Press 1911;1950.

- 13 Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37:911-917.
- 14 Bonte F, Pinguet P, Chevalier JM, Meybeck A: Analysis of All Stratum-Corneum Lipids by Automated Multiple Development High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 1995;664:311-316.
- 15 Bonte F, Saunois A, Pinguet P, Meybeck A: Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch Dermatol Res* 1997;289:78-82.
- 16 Bouwstra JA, Cheng K, Gooris GS, Weerheim A, Ponec M: The role of ceramides 1 and 2 in the Stratum corneum lipid organisation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1996;1300:177-186.
- 17 Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijse J, Wiechers JW, van Aelst AC: Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J. Investig. Dermatol.* 2003;120:750-758.
- 18 Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Ponec M: The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2000;208:23-30.
- 19 Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Weerheim AM, Ponec M: The role of ceramide composition in the lipid organisation of the skin barrier. *Biochim Biophys Acta* 1999;1419:127-136.
- 20 Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FER, Weerheim AM, IJzerman AP, Ponec M: Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res* 1998;39:186-196.
- 21 Bouwstra JA, Gooris GS, Vanderspek JA, Lavrijzen S, Bras W: The Lipid and Protein-Structure of Mouse Stratum-Corneum - a Wide and Small-Angle Diffraction Study. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism* 1994;1212:183-192.
- 22 Bouwstra JA, Ponec M: The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 2006;1758:2080-2095.
- 23 Brattsand M, Egelrud T: Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J. Biol. Chem.* 1999;274:30033-30040.
- 24 Breathnach AS, Goodman T, Stolinski C, Gross M: Freeze-Fracture Replication of Cells of Stratum Corneum of Human Epidermis. *J. Anat.* 1973;114:65-81.

- 25 Breiden B, Sandhoff K: The role of sphingolipid Metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim Biophys Acta* 2013;1841:441-452.
- 26 Brod J: Characterization and Physiological-Role of Epidermal Lipids. *Int J Dermatol* 1991;30:84-90.
- 27 Byrdwell WC: Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 2001;36:327-346.
- 28 Camera E, Picardo M, Presutti C, Catarcini P, Fanali S: Separation and characterisation of sphingoceramides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Sep Sci* 2004;27:971-976.
- 29 Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Molecular Cell Biology* 2005;6:328-340.
- 30 Carroll D, Dzidic I, Stillwell R, Haegele K, Horning E: Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: corona discharge ion source for use in liquid chromatography-mass spectrometer-computer analytical system. *Anal Chem* 1975;47:2369-2373.
- 31 Chernushevich IV, Loboda AV, Thomson BA: An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2001;36:849-865.
- 32 Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL: Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:107-129.
- 33 Cole RB, Harrata AK: Charge-State Distribution and Electric-Discharge Suppression in Negative-Ion Electrospray Mass-Spectrometry Using Chlorinated Solvents. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1992;6:536-539.
- 34 Cole RB, Harrata AK: Solvent Effect on Analyte Charge-State, Signal Intensity, and Stability in Negative-Ion Electrospray Mass-Spectrometry - Implications for the Mechanism of Negative-Ion Formation. *J Am Soc Mass Spectrom* 1993;4:546-556.
- 35 Cole RB, Zhu JH: Chloride anion attachment in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1999;13:607-611.
- 36 Conti A, Rogers J, Verdejo P, Harding CR, Rawlings AV: Seasonal influences on stratum corneum ceramide 1 fatty acids and the influence of topical essential fatty acids. *Int J Cosmet Sci* 1996;18:1-12.
- 37 Cremesti AE, Fischl AS: Current methods for the identification and quantitation of ceramides: an overview. *Lipids* 2000;35:937-945.

- 38 De Paepe K, Weerheim A, Houben E, Roseeuw D, Ponec M, Rogiers V: Analysis of epidermal lipids of the healthy human skin: factors affecting the design of a control population. *Skin Pharmacol Physiol* 2004;17:23-30.
- 39 Denda M, Koyama J, Hori J, Horii I, Takahashi M, Hara M, Tagami H: Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch Dermatol Res* 1993;285:415-417.
- 40 Denda M, Sato J, Masuda Y, Tsuchiya T, Koyama J, Kuramoto M, Elias PM, Feingold KR: Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J. Investig. Dermatol.* 1998;111:858-863.
- 41 Deschamps FS, Baillet A, Chaminade P: Mechanism of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid. *Analyst* 2002;127:35-41.
- 42 Deschamps FS, Gaudin K, Lesellier E, Tchaplal A, Ferrier D, Baillet A, Chaminade P: Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species. *Chromatographia* 2001;54:607-611.
- 43 Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S: Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1998;78:27-30.
- 44 Doering T, Proia RL, Sandhoff K: Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* 1999;447:167-170.
- 45 Downing DT: Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res* 1992;33:301-313.
- 46 Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS: Essential fatty acids and acne. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:221-225.
- 47 Ehlers E. *Analytik II*, 9 edn. Stuttgart: Deutsche Apotheker Verlag, 1999.
- 48 Elias P, Friend, DS: The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.* 1975;65:180-191.
- 49 Elias P, Menon G: Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.* 1991;24:1-26.
- 50 Elias P, Wood, LC, Feingold, KR: Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am J Contact Dermat* 1999;10:119-126.

- 51 Elias PM: Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 1983;80 Suppl:44s-49s.
- 52 Elias PM, Brown BE, Ziboh VA: The Permeability Barrier in Essential Fatty-Acid Deficiency - Evidence for a Direct Role for Linoleic-Acid in Barrier Function. *J. Investig. Dermatol.* 1980;74:230-233.
- 53 Elias PM, Feingold KR: Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. *Semin Dermatol* 1992;11:176-182.
- 54 Elias PM, Goerke J, Friend DS: Mammalian Epidermal Barrier Layer Lipids - Composition and Influence on Structure. *J. Investig. Dermatol.* 1977;69:535-546.
- 55 Engelbrecht T, Schröter A, Hauß T, Demé B, Scheidt H, Huster D, Neubert R: The impact of ceramides NP and AP on the nanostructure of stratum corneum lipid bilayer. Part I: neutron diffraction and ²H NMR studies on multilamellar models based on ceramides with symmetric alkyl chain length distribution. *Soft Matter* 2012;8:2599-2607.
- 56 Fartasch M: The nature of the epidermal barrier: Structural aspects. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 1996;18:273-282.
- 57 Farwanah H: Untersuchung der Ceramide des Stratum Corneum in der nicht involvierten Haut bei Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten mit Hilfe der AMD-HPTLC und der HPLC/APCI-MS. Dissertation 2005;Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- 58 Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, Raith K: Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *J Chromatogr B* 2002;780:443-450.
- 59 Farwanah H, Nuhn P, Neubert R, Raith K: Normal-phase liquid chromatographic separation of stratum corneum ceramides with detection by evaporative light scattering and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2003;492:233-239.
- 60 Farwanah H, Pierstorff B, Schmelzer CEH, Raith K, Neubert RHH, Kolter T, Sandhoff K: Separation and mass spectrometric characterization of covalently bound skin ceramides using LC/APCI-MS and Nano-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;852:562-570.
- 61 Farwanah H, Raith K, Neubert RH, Wohlrab J: Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res* 2005;296:514-521.

- 62 Farwanah H, Wohlrab J, Neubert RHH, Raith K: Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Anal Bioanal Chem* 2005;383:632-637.
- 63 Feingold KR: The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin. *J Lipid Res* 2009;50 Suppl:S417-422.
- 64 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: Electrospray Ionization for Mass-Spectrometry of Large Biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
- 65 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM: Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrometry Reviews* 1990;9:37-70.
- 66 Fillet M, Van Heugen JC, Servais AC, De Graeve J, Crommen J: Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2002;949:225-233.
- 67 Fluhr J, Jain M, Feingold K, Kao J, Elias P: Generation of free fatty acids from epidermal phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity. *J. Investig. Dermatol.* 2001;117:416-416.
- 68 Forslind B: The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio)physical study program. *Thromb. Res.* 1995;80:1-22.
- 69 Forslind B, Engstrom S, Engblom J, Norlen L: A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J. Dermatol. Sci.* 1997;14:115-125.
- 70 Freinkel RK T, TN: Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epideris. *J Invest Dermatol* 1985;85:295-298.
- 71 Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie. Lehrbuch und Atlas.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1998.
- 72 Ghadially R, Brown BE, Sequeiramartin SM, Feingold KR, Elias PM: The Aged Epidermal Permeability Barrier - Structural, Functional, and Lipid Biochemical-Abnormalities in Humans and a Senescent Murine Model. *J. Clin. Investig.* 1995;95:2281-2290.
- 73 Glen AIM, Cooper SJ, Rybakowski J, Vaddadi K, Brayshaw N, Horrobin DF: Membrane fatty acids, niacin flushing and clinical parameters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996;55:9-15.
- 74 Gray GM, White RJ: Glycosphingolipids and Ceramides in Human and Pig Epidermis. *J. Investig. Dermatol.* 1978;70:336-341.

- 75 Grubauer G, Feingold KR, Harris RM, Elias PM: Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J Lipid Res* 1989;30:89-96.
- 76 Gu M, Kerwin JL, Watts JD, Aebersold R: Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 1997;244:347-356.
- 77 Häfner H. *Das Vulnerabilitäts-Stress-Bewältigungs-Modell*. München: Beck, 2000.
- 78 Häfner H. *Die familiäre (genetische) Übertragung der Krankheitsdisposition*. München: Beck, 2000.
- 79 Häfner H, An der Heiden W: Epidemiology of Schizophrenia. *Can J Psychiatry* 1997;42:139-151.
- 80 Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Suzuki A, Uchida Y: Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J. Investig. Dermatol.* 2002;119:416-423.
- 81 Han XL: Characterization and direct quantitation of ceramide molecular species from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2002;302:199-212.
- 82 Han XL, Gross RW: Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res* 2003;44:1071-1079.
- 83 Hannson L, Stromquist, M, Backmann, A, Wallbrandt, P, Carlstein, A, Egelrud, T: Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotrophic enzyme, a skin-specific human serine proteinase. *J. Biol. Chem.* 1994;269:19420-19426.
- 84 Harding CR: The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther* 2004;17 Suppl 1:6-15.
- 85 Harris IR, Farrell AM, Grunfeld C, Holleran WM, Elias PM, Feingold KR: Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis. *J Invest Dermatol* 1997;109:783-787.
- 86 Hedberg CL, Wertz PW, Downing DT: The time course of lipid biosynthesis in pig epidermis. *J Invest Dermatol* 1988;91:169-174.
- 87 Hill J, Paslin D, Wertz PW: A new covalently bound ceramide from human stratum corneum -omega-hydroxyacylphytosphingosine. *Int J Cosmet Sci* 2006;28:225-230.

- 88 Hill JR, Wertz PW: Structures of the ceramides from porcine palatal stratum corneum. *Lipids* 2009;44:291-295.
- 89 Hinder A, Schmelzer CEH, Rawlings AV, Neubert RHH: Investigation of the Molecular Structure of the Human Stratum Corneum Ceramides [NP] and [EOS] by Mass Spectrometry. *Skin Pharmacology and Physiology* 2011;24:127-135.
- 90 Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, Elias PM, Sidransky E: Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994;93:1756-1764.
- 91 Holleran WM, Takagi Y, Uchida Y: Epidermal sphingolipids: metabolism, function, and roles in skin disorders. *FEBS Lett* 2006;580:5456-5466.
- 92 Horrobin DF: The Relationship between Schizophrenia and Essential Fatty-Acid and Eicosanoid Metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1992;46:71-77.
- 93 Horrobin DF: Schizophrenia as a membrane lipid disorder which is expressed throughout the body. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1996;55:3-7.
- 94 Horrobin DF: The membrane phospholipid hypothesis as a biochemical basis for the neurodevelopmental concept of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1998;30:193-208.
- 95 Horrobin DF, Glen AIM, Vaddadi K: The Membrane Hypothesis of Schizophrenia. *Schizophr. Res.* 1994;13:195-207.
- 96 Houben E, Hachem JP, De Paepe K, Rogiers V: Epidermal ceramidase activity regulates epidermal desquamation via stratum corneum acidification. *Skin Pharmacology and Physiology* 2008;21:111-118.
- 97 Hsu FF, Turk J: Structural determination of glycosphingolipids as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisional-activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 2001;12:61-79.
- 98 Hsu FF, Turk J: Characterization of ceramides by low energy collisional-activated dissociation tandem mass spectrometry with negative-ion electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom* 2002;13:558-570.
- 99 Hu Q, Noll RJ, Li H, Makarov A, Hardman M, Cooks RG: The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom* 2005;40:430-443.
- 100 Imokawa G: Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:S29-S32.

- 101 Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A: Decreased Level of Ceramides in Stratum-Corneum of Atopic-Dermatitis - an Etiologic Factor in Atopic Dry Skin. *J. Investig. Dermatol.* 1991;96:523-526.
- 102 Imokawa G, Akasaki S, Kuno O, Zama M, Kawai M, Minematsu Y, Hattori M, Yoshizuka N, Kawamata A, Yano S, Takaishi N: Functions of Lipids on Human-Skin. *J. Dispers. Sci. Technol.* 1989;10:617-641.
- 103 Iwai I, Han H, Hollander L, Svensson S, Öfverstedt L-G, Anwar J, Brewer J, Bloksgaard M, Laloëuf A, Nosek D, Masich S, Bagatolli L, Skoglund U, Norlen L: The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety. *J. Investig. Dermatol.* 2012;132:2215-2225.
- 104 Janssens M, van Smeden J, Gooris G, Bras W, Portale G, Caspers P, Vreeken R, Hankemeier T, Kezic S, Wolterbeek R, Lavrijsen A, Bouwstra J: Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res* 2012;53:2755-2766.
- 105 Jennemann R, Sandhoff R, Langbein L, Kaden S, Rothermel U, Gallala H, Sandhoff K, Wiegandt H, Grone HJ: Integrity and barrier function of the epidermis critically depend on glucosylceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* 2007;282:3083-3094.
- 106 Jungersted JM, Hellgren LI, Jemec GBE, Agner T: Lipids and skin barrier function - a clinical perspective. *Contact Dermatitis* 2008;58:255-262.
- 107 Jungersted L, Helgren L, Høgh J, Drachman T, Jemec G, Agner T: Ceramides and Barrier Function in Healthy Skin. *Acta Derm Venereol* 2010;90:350-353.
- 108 Kalinin A, Kajava, AV, Steinert, PM: Epithelial barrier function: assembly and structural features of cornified cell envelope. *BioEssays* 2002;24:789-800.
- 109 Kebarle P: A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 2000;35:804-817.
- 110 Kebarle P, Peschke M: On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal Chim Acta* 2000;406:11-35.
- 111 Kebarle P, Tang L: From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Anal Chem* 1993;65:A972-A986.
- 112 Kebarle P, Verkerk UH: Electrospray: From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase, What We Know Now. *Mass Spectrometry Reviews* 2009;28:898-917.

- 113 Kessner D. Neutron scattering on biological subjects – Neue Einblicke in die Struktur der Lipidmatrix des Stratum corneum, basierend auf Modellmembranen. In: *Naturwissenschaftlichen Fakultät I. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2008.*
- 114 Kessner D, Ruettinger A, Kiselev MA, Wartewig S, Neubert RH: Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure. Part 2: stratum corneum lipid model systems. *Skin Pharmacol Physiol* 2008;21:58-74.
- 115 Kirsch S, Zarei M, Cindric M, Müthing J, Bindila L, Peter-Katalinic J: On-line nano-HPLC/ESI QTOF MS and tandem MS for separation, detection, and structural elucidation of human erythrocytes neutral glycosphingolipid mixture. *Anal Chem* 2008;80:4711-4722.
- 116 Kiselev MA: Conformation of Ceramide 6 Molecules and Chain-Flip Transitions in the Lipid Matrix of the outermost Layer of Mammalian Skin, the Stratum Corneum. *Crystallography Reports* 2007;52:525-528.
- 117 Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM: Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 1983;24:120-130.
- 118 Lampe MA, Williams ML, Elias PM: Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J Lipid Res* 1983;24:131-140.
- 119 Landmann L: Epidermal Permeability Barrier - Transformation of Lamellar Granule-Disks into Intercellular Sheets by a Membrane-Fusion Process, a Freeze-Fracture Study. *J. Investig. Dermatol.* 1986;87:202-209.
- 120 Landmann L: The Epidermal Permeability Barrier. *Anat. Embryol.* 1988;178:1-13.
- 121 Landmann L: Die Permeabilitätsbarriere der Haut. *Pharm Unserer Zeit* 1991;20:155-163.
- 122 Lavrijsen APM, Higounenc IM, Weerheim A, Oestmann E, Tuinenburg EE, Bodde HE, Ponc M: Validation of an in-Vivo Extraction Method for Human Stratum-Corneum Ceramides. *Arch Dermatol Res* 1994;286:495-503.
- 123 Lee SH, Jeong SK, Ahn SK: An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med. J.* 2006;47:293-306.
- 124 Liebisch G, Binder M, Schifferer R, Langmann T, Schulz B, Schmitz G: High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2006;1761:121-128.

- 125 Lottspeich F, Engels J. *Bioanalytik*. München: Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH, 2006.
- 126 Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K: Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J. Investig. Dermatol.* 2002;119:166-173.
- 127 Madison KC: Barrier function of the skin: "La Raison d'Être" of the epidermis. *J. Investig. Dermatol.* 2003;121:231-241.
- 128 Maier W, Lichtermann D, Rietschel M, Held T, Falkai P, Wagner M, Schwab S: Genetik schizophrener Störungen: Neuere Konzepte und Befunde. *Nervenarzt* 1999;70.
- 129 Mano N, Oda Y, Yamada K, Asakawa N, Katayama K: Simultaneous quantitative determination method for sphingolipid metabolites by liquid chromatography/ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 1997;244:291-300.
- 130 Marshall AG, Hendrickson CL, Jackson GS: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry: A Primer. *Mass Spectrometry Reviews* 1998;17:1-35.
- 131 Masukawa Y, Narita H, Sato H, Naoe A, Kondo N, Sugai Y, Oba T, Homma R, Ishikawa J, Takagi Y, Kitahara T: Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* 2009;50:1708-1719.
- 132 Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, Homma R, Ishikawa J, Takagi Y, Kitahara T, Takema Y, Kita K: Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *J Lipid Res* 2008;49:1466-1476.
- 133 Masukawa Y, Tsujimura H, Narita H: Liquid chromatography-mass spectrometry for comprehensive profiling of ceramide molecules in human hair. *J Lipid Res* 2006;47:1559-1571.
- 134 Messamore E: Relationship between the niacin skin flush response and essential fatty acids in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2003;69:413-419.
- 135 Mizutani Y, Kihara A, Chiba H, Tojo H, Igarashi Y: 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J Lipid Res* 2008;49:2356-2364.
- 136 Mizutani Y, Mitsutake S, Tsuji K, Kihara A, Igarashi Y: Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* 2009;91:784-790.
- 137 Möller H-J. *Schizophrenie*. Stuttgart: Hippokrates Verlag, 1995.

- 138 Monteiro-Riviere NA, Inman AO, Mak V, Wertz P, Riviere JE: Effect of selective lipid extraction from different body regions on epidermal barrier function. *Pharm Res* 2001;18:992-998.
- 139 Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R: Ceramide Composition of the Psoriatic Scale. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:147-151.
- 140 Nakamura K, Suzuki Y, Goto-Inoue N, Yoshida-Noro C, Suzuki A: Structural characterization of neutral glycosphingolipids by thin-layer chromatography coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight MS/MS. *Anal Chem* 2006;78:5736-5743.
- 141 Nasrallah H, Smeltzer D. *Contemporary Diagnosis and Management of The Patient with Schizophrenia*. Newton, Pennsylvania, 2003.
- 142 Neubert N, Wohlrab W, Marsch W. *Dermatopharmazie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001.
- 143 Nicolaid.N: Skin Lipids - Their Biochemical Uniqueness. *Science* 1974;186:19-26.
- 144 Nicollier M, Massengo T, Remymartin JP, Laurent R, Adessi GL: Free Fatty-Acids and Fatty-Acids of Triacylglycerols in Normal and Hyperkeratotic Human Stratum-Corneum. *J. Investig. Dermatol.* 1986;87:68-71.
- 145 Norlen L: Skin barrier structure and function: The single gel phase model. *J. Investig. Dermatol.* 2001;117:830-836.
- 146 Norlen L: Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2003;16:203-211.
- 147 Norlen L, Nicander I, Lundsjo A, Cronholm T, Forslind B: A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch Dermatol Res* 1998;290:508-516.
- 148 Norlen L, Nicander I, Rozell BL, Ollmar S, Forslind B: Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. *J. Investig. Dermatol.* 1999;112:72-77.
- 149 Paige DG, Morse-Fischer N, Harper JI: Quantification of stratum corneum Ceramides and lipid envelope in the hereditary ichthyosis. *Br. J. Dermatol.* 1994;131:23-27.
- 150 Perisho K, Wertz PW, Madison KC, Stewart ME, Downing DT: Fatty acids of acylceramides from comedones and from the skin surface of acne patients and control subjects. *J Invest Dermatol* 1988;90:350-353.

- 151 Ponec M, Weerheim A, Lankhorst P, Wertz P: New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 2003;120:581-588.
- 152 Puri BK, Hirsch SR, Easton T, Richardson AJ: A volumetric biochemical niacin flush-based index that noninvasively detects fatty acid deficiency in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26:49-52.
- 153 Raith K. Beiträge zur Anwendung der Massenspektrometrie in der Lipidanalytik. In: *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät*. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 1999.
- 154 Raith K, Darius J, Neubert RHH: Ceramide analysis utilizing gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2000;876:229-233.
- 155 Raith K, Farwanah H, Wartewig S, Neubert RHH: Progress in the analysis of Stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2004;106:561-571.
- 156 Raith K, Neubert RHH: Structural studies on ceramides by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1998;12:935-938.
- 157 Raith K, Neubert RHH: Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of ceramides. *Anal Chim Acta* 2000;403:295-303.
- 158 Raith K, Zellmer S, Lasch J, Neubert RHH: Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2000;418:167-173.
- 159 Rawlings A, Harding, CR: Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 2004;17:43-48.
- 160 Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT: 6-Hydroxy-4-Sphinganine in Human Epidermal Ceramides. *J Lipid Res* 1994;35:2060-2068.
- 161 Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A: Stratum corneum lipids: The effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res* 1996;288:765-770.
- 162 Rucker G, Neugebauer M, Willems G. *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*, Vol. 2. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1992.
- 163 Ruettinger A, Kiselev MA, Hauss T, Dante S, Balagurov AM, Neubert RH: Fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes: a neutron diffraction study. *Eur. Biophys. J.* 2008;37:759-771.
- 164 Ryhage R, Stenhagen E: Mass spectrometry in lipid research. *J. Lipid Research* 1960;1:361-390.

- 165 Salem N, Wegher B, Mena P, Uauy R: Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93:49-54.
- 166 Schreiner V, Gooris GS, Pfeiffer S, Lanzendorfer G, Wenck H, Diembeck W, Proksch E, Bouwstra J: Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J. Investig. Dermatol.* 2000;114:654-660.
- 167 Schroeter A, Kiselev M, Hauß T, Dante S, Neubert R: Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labelling. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:2194-2203.
- 168 Simon M, Jonca N, Guerrin M: Refined characterization of corneodesmosinproteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J. Biol. Chem.* 2001;276:20292-20299.
- 169 Smesny S, Baur K, Rudolph N, Nenadic I, Sauer H: Alterations of niacin skin sensitivity in recurrent unipolar depressive disorder. *J. Affect. Disord.* 2010;124:335-340.
- 170 Smesny S, Klemm S, Stockebrand M, Grunwald S, Gerhard UJ, Rosburg T, Sauer H, Blanz B: Endophenotype properties of niacin sensitivity as marker of impaired prostaglandin signalling in schizophrenia. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2007;77:79-85.
- 171 Smesny S, Milleit B, Nenadic I, Preul C, Kinder D, Lasch J, Willhardt I, Sauer H, Gaser C: Phospholipase A(2) activity is associated with structural brain changes in schizophrenia. *Neuroimage* 2011;52:1314-1327.
- 172 Smesny S, Schmelzer C, Hinder A, Köhler A, Schneider C, Rudzok M, Schmidt U, Milleit B, Milleit C, Nenadic I, Sauer H, Neubert R, Fluhr J: Skin Ceramide Alterations In First-Episode Schizophrenia Indicate Abnormal Sphingolipid Metabolism. *Schizophr. Bull.* 2012;39:933-941.
- 173 Stewart M, Downing D: A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* 1999;40:1434-1439.
- 174 Suhonen TM, Bouwstra JA, Urtti A: Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Control. Release* 1999;59:149-161.
- 175 Swartzendruber D, Wertz P, Kitko D, Madison K, Downing D: Molecular models of the intercellular lipid lamellae in mammalian stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1989;92:251-257.

- 176 Swartzendruber DC, Wertz PW, Madison KC, Downing DT: Evidence That the Corneocyte Has a Chemically Bound Lipid Envelope. *J. Investig. Dermatol.* 1987;88:709-713.
- 177 t'Kindt R, Jorge L, Dumont E, Couturon P, David F, Sandra P, Sandra K: Profiling and Characterizing Skin Ceramides Using Reversed-Phase Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2012;84:403-411.
- 178 Tanojo H, Boelsma E, Junginger HE, Ponc M, Bodde HE: In vivo human skin barrier modulation by topical application of fatty acids. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 1998;11:87-97.
- 179 Tavares H, Yacubian J, Talib LL, Barbosa NR, Gattaz WF: Increased phospholipase A2 activity in schizophrenia with absent response to niacin. *Schizophr. Res.* 2003;61:1-6.
- 180 Thakoersing V, van Smeden J, Mulder A, Vreeken R, El Ghalbzouri A, Bouwstra J: Increased Presence of Monounsaturated Fatty Acids in the Stratum Corneum of Human Skin Equivalents. *J. Investig. Dermatol.* 2013;133:59-67.
- 181 Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Vol. 5. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999.
- 182 Thielitz A, Helmdach M, Ropke EM, Gollnick H: Lipid analysis of follicular casts from cyanoacrylate strips as a new method for studying therapeutic effects of antiacne agents. *Br. J. Dermatol.* 2001;145:19-27.
- 183 Thomas RL, Matsko JCM, Lotze MT, Amoscato AA: Mass Spectrometric Identification of Increased C16 Ceramide Levels During Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;174:30580-30588.
- 184 Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, Suzuki A, Elias PM, Holleran WM, Hamanaka S: Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* 2000;41:2071-2082.
- 185 van Smeden J, Hoppel L, van der Heijden R, Hankemeier T, Vreeken R, Bouwstra J: LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.* 2011;52:1211-1221.
- 186 van Smeden J, Janssens M, Kaye E, Caspers P, Lavrijsen A, Vreeken R, Bouwstra J: The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp Dermatol* 2014;23:45-52.
- 187 Vietzke J: Hautlipidanalytik mit der Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS): Untersuchung von endogenen und topisch applizierten Lipiden. Dissertation 2000;Universität Hamburg, Hamburg.

- 188 Vietzke JP, Brandt O, Abeck D, Rapp C, Strassner M, Schreiner V, Hintze U: Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* 2001;36:299-304.
- 189 Vietzke JP, Strassner M, Hintze U: Separation and identification of ceramides in the human stratum corneum by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry and electrospray multiple-stage mass spectrometry profiling. *Chromatographia* 1999;50:15-20.
- 190 Wang X, Yao J, Yu Z: GC-MS determination of fatty acids in arachidonic acid high-yield strain induced by low-energy ion implantation. *Chemical Papers-Chemicke Zvesti* 2005;59:240-243.
- 191 Ward PE: Potential diagnostic aids for abnormal fatty acid metabolism in a range of neurodevelopmental disorders. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2000;63:65-68.
- 192 Weerheim A, Ponc M: Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res* 2001;293:191-199.
- 193 Wertz PW: Epidermal lipids. *Semin Dermatol* 1992;11:106-113.
- 194 Wertz PW: The nature of the epidermal barrier: Biochemical aspects. *Adv. Drug Delivery. Rev.* 1996;18:283-294.
- 195 Wertz PW: Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 2000;208:7-11.
- 196 Wertz PW, Cox PS, Squier CA, Downing DT: Lipids of epidermis and keratinized and non-keratinized oral epithelia. *Comp Biochem Physiol B* 1986;83:529-531.
- 197 Wertz PW, Downing DT: Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* 1983;24:759-765.
- 198 Wertz PW, Downing DT: Glucosylceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* 1983;24:1135-1139.
- 199 Wertz PW, Kremer M, Squier CA: Comparison of lipids from epidermal and palatal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1992;98:375-378.
- 200 Wertz PW, Madison KC, Downing DT: Covalently bound lipids of human stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1989;92:109-111.

- 201 Wertz PW, Miethke MC, Long SA, Strauss JS, Downing DT: The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* 1985;84:410-412.
- 202 Wertz PW, Swartzendruber DC, Abraham W, Madison KC, Downing DT: Essential fatty acids and epidermal integrity. *Arch Dermatol* 1987;123:1381-1384.
- 203 Wertz PW, Swartzendruber DC, Madison KC, Downing DT: Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol* 1987;89:419-425.
- 204 Wertz PW, van den Bergh B: The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids* 1998;91:85-96.
- 205 Whitehouse C, Dreyer R, Yamashita M, Fenn J: Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal Chem* 1985;57:675-679.
- 206 Whitford T, Grieve S, Farrow T, Gomes L, Brennan J, Harris A, Gordon E, Williams L: Volumetric white matter abnormalities in first-episode schizophrenia: a longitudinal, tensor-based morphometry study. *Am. J. Psychiatry* 2007;164:1082-1089.
- 207 Wood L, Elias, PM, Calhoun, C, Tsai, JC, Grunfeld, C, Feingold, KR: Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 1996;106:397-403.
- 208 Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y: Stratum-Corneum Lipid Abnormalities in Atopic-Dermatitis. *Arch Dermatol Res* 1991;283:219-223.
- 209 Zellmer S, Lasch J: Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J Chromatogr B* 1997;691:321-329.
- 210 Zhu JH, Cole RB: Formation and decompositions of chloride adduct ions, $[M+Cl](-)$, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:932-941.

Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

2009	Smesny S, Schmelzer C, Hinder A, Kohler A, Schneider C, Rudzok M, Cyriax U, Neubert R, Sauer H, Fluhr JW: Disturbed Skin Barrier Function in Schizophrenia: Reconsidering the Link between Mental Illness and Skin Physiology. <i>Schizophr. Bull.</i> 2009;35:152-152
2011	Hinder A, Schmelzer CEH, Rawlings AV, Neubert RHH: Investigation of the Molecular Structure of the Human Stratum Corneum Ceramides [NP] and [EOS] by Mass Spectrometry. <i>Skin Pharmacology and Physiology</i> 2011;24:127-135
2011	Angelova-Fischer I, Mannheimer A-C, Hinder A, Ruether A, Franke A, Neubert RHH, Fischer TW, Zillikens D: Distinct barrier integrity phenotypes in filaggrin-related atopic eczema following sequential tape stripping and lipid profiling. <i>Exp Dermatol</i> 2011;20:351-356

Vorträge:

2008	Hinder A. Analysis on human stratum corneum lipids (particularly ceramides). In: <i>Mitteldeutsches Doktorandentreffen</i> . Leipzig, 2008
2008	Smesny S, Fluhr JW, Sand P, Schmelzer C, Hinder A, Köhler A, Schneider C, Rudzok M, Cyriax U, Neubert RHH, Sauer H. The niacin skin flush test: Is deficient response evidence of a phospholipid disorder? In: <i>The Brain Lipids Conference</i> . Oslo (Norwegen), 2008
2009	Hinder A, Schmelzer CEH, Neubert RHH. Structure investigation of native CER[NP] and its possible influence on drug penetration. In: <i>CRS Meeting</i> . Halle (Saale), 2009

Poster:

2009	Hinder A, Schmelzer CEH, Neubert RHH. Mass spectrometric characterization of CER[NP] extracted from human stratum corneum. In: <i>5th German-Polish Symposium</i> . Poznan (Poland), 2009
2010	Hinder A, Schmelzer CEH, Neubert RHH. Mass spectrometric characterization of CER[EOS] extracted from human stratum corneum. In: <i>APV World-Meeting</i> . Valetta (Malta), 2010

Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

Geburtsdatum: 30. Juni 1979
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg
Familienstand: ledig, keine Kinder

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1986 – 1989 Polytechnische Oberschule Hans Lorbeer Luth. Wittenberg
1989 - 1998 Martin-Luther-Gymnasium Luth. Wittenberg
Juli 1998 Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

BERUFLICHE AUSBILDUNG UND STUDIUM

Mai 1999 – Juni 2004 Ludwig-Maximilians-Universität München
Studium der Pharmazie
Universitätsabschluss: 2. Staatsexamen Pharmazie Juli 2004

Juli – Dez. 2004 Pharmaziepraktikum bei der Hexal Pharmaforschung GmbH Holzkirchen

Januar – Juni 2005 Pharmaziepraktikum in der St. Johannis-Apotheke München

Sept. 2005 Drittes Staatsexamen zur Erlangung der Approbation als Apothekerin in München

Okt. 2005 Erteilung der Approbation als Apothekerin

Nov. 2005 – März 2006 Arbeit als Apothekerin in der St. Johannis-Apotheke München

Juni – Nov. 2006 Bearbeitung eines Diplomarbeitthemas am Institut „Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Dez. 2006 – 14. Okt. 2010 Doktorarbeit am Institut „Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert

15. Okt. 2010 – 31. Okt 2012 Arbeit als Apothekerin in der Linden-Apotheke Gräfenhainichen, davon:

15. Okt. 2010 – 30. Juni 2011 Elternzeitvertretung der Filialleitung in der Glückauf-Apotheke Zschornowitz

Nov. 2012 – 15. März 2013 Arbeit als Apothekerin in der Albanus-Apotheke Schkeuditz

seit 16. März 2013 Filialleitung der Aurora-Apotheke Halle, eine Filiale der Steintor-Apotheke Halle

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner weiteren Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle/Saale, Februar 2016

Anke Hinder