

## Zusammenfassung

### Verwendung hochauflösender Massenspektrometrie zur Suche neuer Lipid-Biomarker in biologischen Proben

Dissertation von Lisa Katharina Hahnefeld

Die Aufdeckung krankheitsbedingter Unterschiede und die Identifizierung neuer Biomarker sind essenziell für Diagnose und Behandlung verschiedener Erkrankungen. Unterschiede zwischen Erkrankungen können u.a. durch Analyse des Lipidprofils aufgedeckt werden, da dieses eng mit dem Phänotyp verknüpft ist. Ein unvoreingenommenes Screening gewährt einen umfassenderen Einblick in den metabolischen Zustand als eine gezielte Untersuchung weniger Analyten und kann neue Hypothesen generieren. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Screening-Methode zur untargeted Untersuchung des Lipidoms in biologischen Proben entwickelt. Durch die Kombination aus Umkehrphasenchromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie mit datenabhängiger Aufnahme von MS/MS-Spektren konnten in Humanplasma 440 Lipide aus mehr als 15 Lipidklassen identifiziert werden. Die mehrstufige Identifizierung der Analyten, basierend auf der exakten Masse  $\pm 5$  ppm, der Isotopenverteilung, der MS/MS-Fragmentierungsmuster in beiden Ionisationsmodi sowie der chromatographischen Auftrennung von Isomeren und Isobaren, erfolgte mit hoher Selektivität. Mit der vorgestellten Methode können sowohl Lipidklassen als auch einzelne Lipide relativ zu den internen Standards quantifiziert werden.

Der Probendurchsatz wurde erhöht, um den Einsatz der Methode im Rahmen größerer klinischer Studien zu ermöglichen und vorhandene Ressourcen effizient einzusetzen. Dabei wurden die Inkubationszeiten während der Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MTBE:Methanol deutlich reduziert und die Handhabung vereinfacht bei gleichbleibend hoher Wiederfindung. Der hohe Probendurchsatz wird weiter unterstützt durch die kurze chromatographische Laufzeit von 17 min pro Ionisationsmodus. Die Auswertung der Ergebnisse ist der heikelste und zeitintensivste Schritt bei der Entwicklung und Anwendung von Screening-Methoden, deshalb wurde der Arbeitsablauf zur univariaten Analyse durch Entwicklung von R Skripten vereinfacht und beschleunigt.

Die Qualität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind essenziell. Aus diesem Grund wurde die Qualität der entwickelten Methode, angelehnt an den strikten Vorgaben der FDA und EMA zur Validierung von quantitativen Methoden, sichergestellt, obwohl eine Methodenüberprüfung im Bereich von untargeted Methoden nicht verbreitet ist. Die Reproduzierbarkeit der relativen Lipidkonzentrationen konnte z.B. durch die Messung von Kontrollplasmaproben über einen Zeitraum von 10 Monaten gezeigt werden. Außerdem wurde die Linearität der Verdünnung von Plasmaproben bestätigt und eine Verschleppung in darauffolgende Proben ausgeschlossen. Die Stabilität der Proben muss in jeder Messphase inklusive der Präanalytik durch geeignete Untersuchungen und

Maßnahmen sichergestellt werden. Anhand einer Studie zur präanalytischen Stabilität humaner Blutproben konnte ein Protokoll zur Probennahme und -vorbereitung für weitere klinische Studien erarbeitet werden. Die Stabilität des Lipidoms in Vollblut und Plasma konnte durch den Einsatz von Natriumfluorid/Citrat als Antikoagulans verbessert werden. Auch die Stabilität der Proben während der Lipidextraktion und Messung konnte gezeigt werden. Es wurden 16 verschiedene Probenarten analysiert, darunter Plasmaproben, verschiedene Mausgewebe und Zellpellets.

Mit der entwickelten Methode wurden die Unterschiede im Lipidprofil im Plasma und Gewebe von Mäusen mit einer akuten Entzündung durch LPS bzw. Zymosan-Injektion aufgedeckt. Dabei wurden die Ether-Phosphatidylcholine als potenzielle Entzündungsmarker identifiziert. Die entwickelte Methode wurde außerdem erfolgreich im Rahmen anderer Arbeiten für die Untersuchung verschiedener Erkrankungen angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wird demnach eine schnelle, reproduzierbare und vor allem selektive LC-MS-Screening-Methode vorgestellt, die Veränderungen des Lipidstoffwechsels aufdecken und potenzielle Biomarker identifizieren kann.