

Zellbiologische Methoden

Massenspektrometrische Analyse von Phospholipiden aus Liposomen

MELISSA FRICK, CARLA SCHMIDT

INTERDISZIPLINÄRE WISSENSCHAFTLICHE EINRICHTUNG ZIK HALOMEM,
CHARLES-TANFORD-PROTEINZENTRUM, UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

Mass spectrometry-based lipidomics gained importance and nowadays allows the identification of complete lipidomes. Challenging are, however, the differing properties of the diverse lipid classes. Phospholipids are the main constituents of biological membranes and, in aqueous solutions, spontaneously form lipid bilayers. They are therefore often used to prepare membrane mimics. Here, we report on a recent strategy identifying and quantifying phospholipids from the lipid bilayer of liposomes.

DOI: 10.1007/s12268-019-1017-y
© Die Autoren 2019

Open Access

■ Lipide sind Biomoleküle, die an einer Reihe von biologischen Prozessen, wie z. B. der Energiespeicherung oder Signalweiterleitung, beteiligt sind. Darüber hinaus sind sie wichtige Komponenten von Biomembranen. Glycerophospholipide (auch Phospholipide genannt) bestehen aus Glycerin, welches an zwei der drei Hydroxylgruppen mit zwei Fettsäuren verestert ist. An der dritten, endständigen Hydroxylgruppe ist eine Phosphatgruppe gebunden, die mit verschiedenen Alkoholen verestert sein kann. Entsprechend dieser Kopfgruppe werden Phospholipide in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Beispiele sind Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI) [1, 2].

Aufgrund ihrer amphipathischen Struktur bilden Phospholipide in wässrigen Lösungen Mizellen oder Lipiddoppelschichten (z. B. Liposomen) aus. So bilden sie auch das Grundgerüst von Biomembranen und bestimmen ihre physikochemischen Eigenschaften wie Dicke, Krümmung, Fluidität oder die Ausbildung von Mikrodomänen [3]. Die Identifizierung der Lipidbestandteile von Biomembranen ist somit essenziell, um ihren Aufbau und ihre Organisation zu verstehen.

Lipidomik

Das Lipidom ist die Gesamtheit aller Lipide einer Zelle oder eines Organismus zu einem

bestimmten Zeitpunkt unter definierten Bedingungen. Die Lipidomik befasst sich folglich mit der Analyse des Lipidoms. Durch die Verwendung neuester hochauflösender und sensitiver Massenspektrometer können heutzutage komplette Lipidomanalysen durchgeführt werden [4]. Dafür werden für gewöhnlich Lipide aus zellulärem Gewebe extrahiert [5, 6]. Anschließend werden sie direkt in *shotgun*-Experimenten oder nach Auftrennung mittels Flüssigkeitschromatographie massenspektrometrisch analysiert. Die Identifizierung der Lipide erfolgt anhand ihrer charakteristischen Fragmentspektren [7]. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen sowie der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Lipidklassen ist die Probenvorbereitung allerdings noch immer eine Her-

ausforderung. Kürzlich wurde deshalb ein speziell für die Massenspektrometrie optimiertes Protokoll etabliert [8].

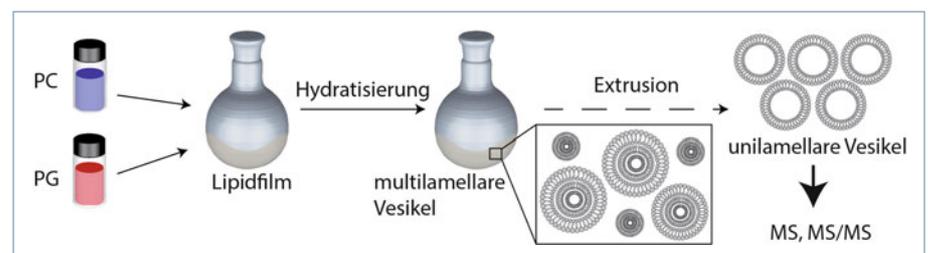
Wir haben eine neue und innovative Strategie entwickelt, welche die massenspektrometrische Lipidanalyse direkt aus der Lipiddoppelschicht ermöglicht [9]. Die Verifizierung dieser Methode erfolgte anhand von Modellliposomen.

Liposomenpräparation

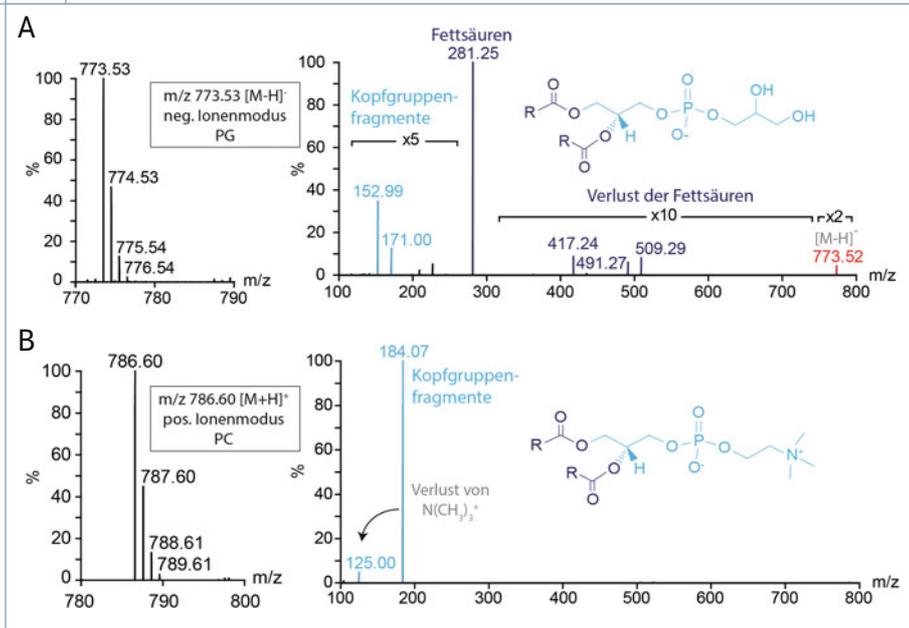
Im ersten Schritt der Liposomenpräparation (**Abb. 1**) werden die in organischen Lösungsmitteln gelösten Lipide im gewünschten Verhältnis gemischt und das Lösungsmittel verdampft, sodass ein trockener Lipidfilm entsteht. Dieser Lipidfilm wird dann in flüchtigem Ammoniumacetat hydratisiert, wobei sich multilamellare Vesikel (MLVs) bilden. Diese bestehen aus mehreren zwiebelförmig angeordneten Lipiddoppelschichten. Mittels Extrusion durch eine Polycarbonatmembran definierter Porengröße werden dann MLVs in unilamellare Vesikel (ULVs, das heißt Liposomen) überführt. Die durchschnittliche Größe der gebildeten Liposomen kann dann durch dynamische Lichtstreuung bestimmt werden.

Identifizierung der Lipide

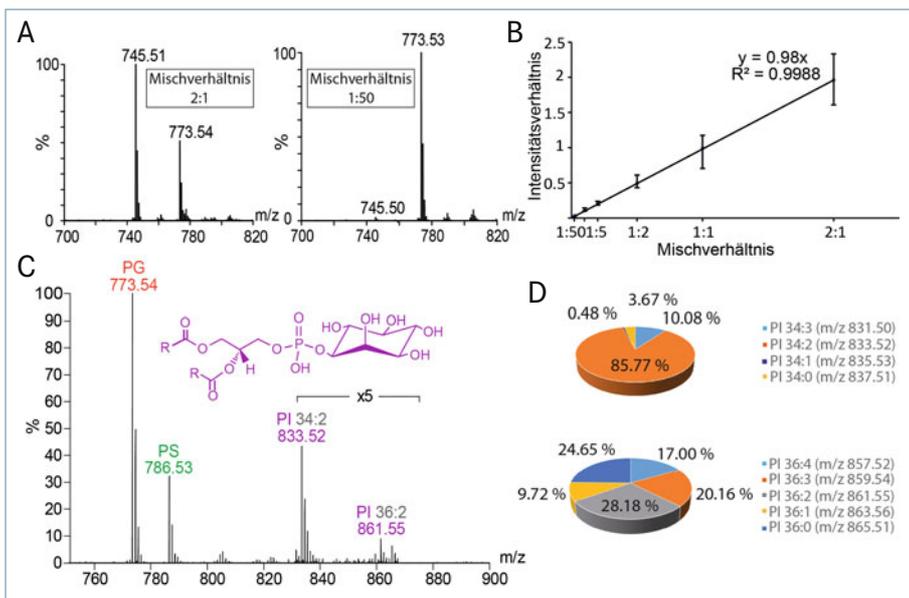
Zur Analyse der Lipide wurden diese direkt in das Massenspektrometer eingebracht. Es wird angenommen, dass die Liposomen während der Ionisierung vollständig dissoziieren und so die direkte Lipidanalyse aus Lipiddoppel-



▲ **Abb. 1:** Liposomenpräparation. Lipide verschiedener Klassen werden in den gewünschten Verhältnissen gemischt und das organische Lösungsmittel verdampft. Der trockene Lipidfilm wird in Ammoniumacetat hydratisiert. Die gebildeten multilamellaren Vesikel (MLVs) werden mittels Extrusion in unilamellare Vesikel (ULVs) einer bestimmten Größe überführt. Lipide können anschließend mithilfe der Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. PC: Phosphatidylcholin; PG: Phosphatidylglycerol.



▲ **Abb. 2:** Lipididentifizierung. Im negativen und positiven Ionenmodus wurden Lipidspezies beobachtet. Anhand der Fragmentspektren (rechts) können die Lipide eindeutig identifiziert werden. **A,** Phosphatidylglycerol (PG)-Spezies, negativer Ionenmodus. **B,** Phosphatidylcholin (PC)-Spezies, positiver Ionenmodus.



▲ **Abb. 3:** Quantifizierung von Lipiden aus Liposomenmembranen. **A,** zwei PG-Spezies, gemischt in variierenden Verhältnissen (2:1 und 1:50). **B,** Die relativen Intensitäten beider PG-Spezies sind linear. **C,** Liposomen, präpariert aus PG:PS:PI (1:1:0,3). Mehrere PI-Spezies wurden identifiziert (m/z 831–837 und 857–865). **D,** Anhand der theoretischen Isotopenverteilung wurden die Anteile der PI-Spezies bestimmt. PG: Phosphatidylglycerol; PC: Phosphatidylcholin; PS: Phosphatidylserin; PI: Phosphatidylinositol.

schichten möglich ist (**Abb. 1**). In der Tat können im negativen und positiven Ionenmodus Lipidspezies mit entsprechenden Masse-zu-Ladung-Verhältnissen (m/z) beobachtet werden. Eine anschließende Isolierung und Fragmentierung ermöglicht die Identifizierung der Lipidspezies. In **Abbildung 2** wurden eine PG-Spezies (m/z 773, negativer Ionenmodus) und eine PC-Spezies (m/z 786, positiver Ionenmodus) aus Liposomen identifiziert.

Relative Intensitäten der Lipide

Um zu testen, ob die hier vorgestellte Strategie auch eine Quantifizierung der Lipide ermöglicht, wurden zwei PG-Spezies in variierenden Mengenverhältnissen von 2:1 bis 1:50 gemischt und Liposomen wie beschrieben präpariert. Die im negativen Ionenmodus aufgenommenen Massenspektren zeigen zwei Lipidspezies (m/z 745 und 773). Die Intensitäten dieser Lipidspezies spiegeln die

Mischungsverhältnisse der Lipide während der Liposomenpräparation wider (**Abb. 3A**). Die Linearität dieser Messungen ist über den gesamten Bereich der Lipidmischungen gegeben (**Abb. 3B**).

Quantifizierung niedrig abundanter Lipide

Anschließend sollten niedrig abundante Lipide identifiziert und quantifiziert werden. Hierfür wurden Liposomen verwendet, welche zum Großteil aus PG und PS und zu einem geringen Anteil aus einem PI-Extrakt aus Soja präpariert wurden. Das aufgenommene Massenspektrum zeigt die PG- und PS-Spezies mit vergleichsweise hohen Intensitäten. Außerdem wurden zwei Signalverteilungen im Bereich m/z 831–837 und 857–865 beobachtet (**Abb. 3C**). Diese Signale wurden als PI-Spezies mit verschiedener Fettsäurezusammensetzung identifiziert. Ihr Anteil konnte durch Simulation der theoretischen Isotopenverteilungen bestimmt werden (**Abb. 3D**).

Fazit

Unsere Experimente zeigen, dass Phospholipide verschiedener Klassen und in unterschiedlichen Anteilen mittels Massenspektrometrie direkt aus den Lipiddoppelschichten von Liposomen identifiziert und quantifiziert werden können. Dies ermöglicht drei zukünftige Anwendungen der hier vorgestellten Strategie: (1) Die Präparation von Liposomen im Sinne der Probenvorbereitung. Da die Lipide in einem wässrigen Puffer in Form von Vesikeln vorliegen, können hier unlösliche Bestandteile abgetrennt werden. (2) Die Analyse von Lipiden direkt aus Lipiddoppelschichten, z. B. nativen Vesikeln und Membranen. (3) Durch die vollständige Dissoziation der Liposomen können eingebettete Membranproteine freigesetzt werden.

Danksagung

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, ZIK-Programm, 03Z22HN22), dem Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (EFRE, ZS/2016/04/78115) und der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für finanzielle Unterstützung sowie Ulla Niesbach-Klösgen für hilfreiche Kommentare zu diesem Artikel. ■

Literatur

[1] Fahy E, Subramaniam S, Brown HA et al. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 46:839–862

- [2] Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC et al. (2009) Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res* 50:9–14
- [3] Klose C, Surma MA, Simons K (2013) Organellar lipidomics – background and perspectives. *Curr Opin Cell Biol* 25:406–413
- [4] Schwudke D, Schuhmann K, Herzog R et al. (2011) Shotgun lipidomics on high resolution mass spectrometers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a004614
- [5] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- [6] Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917
- [7] Yang K, Han X (2016) Lipidomics: techniques, applications, and outcomes related to biomedical sciences. *Trends Biochem Sci* 41:954–969
- [8] Matyash V, Liebisch G, Kurzchalia TV et al. (2008) Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *J Lipid Res* 49:1137–1146
- [9] Frick M, Hofmann T, Haupt C et al. (2018) A novel sample preparation strategy for shotgun lipidomics of phospholipids employing multilamellar vesicles. *Anal Bioanal Chem* 410:4253–4258

Open Access:

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

Open access funding provided by a grant of the Federal Ministry of Education and Research FKZ 03Z22HN22.

Korrespondenzadresse:

Jun.-Prof. Dr. Carla Schmidt
IWE ZIK HALOmem
Charles-Tanford-Proteinzentrum
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Kurt-Mothes-Straße 3a
D-06120 Halle/Saale
Tel.: 0345-5524875
carla.schmidt@biochemtech.uni-halle.de

AUTORINNEN**Melissa Frick**

2011–2018 Biochemiestudium (Bachelor und Master) an der Universität Halle-Wittenberg. 2013–2014 Auslandsjahr an der Trent University, Kanada. Seit 2018 Promotionsstudentin am ZIK HALOmem, Universität Halle-Wittenberg.

**Carla Schmidt**

2001–2006 Chemiestudium (Diplom) an der Universität Leipzig. 2005 Auslandssemester an der Universität Uppsala, Schweden. 2006–2011 Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen. 2010 Promotion an der Universität Göttingen. 2011–2015 Postdotorandin an der University of Oxford, UK. Seit 2016 Gruppenleiterin und Juniorprofessorin am ZIK HALOmem, Universität Halle-Wittenberg.