elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

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

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

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Hany Farwanah

geb. am 01.02.1973 in Marburg/Lahn

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Reinhard Neubert
Prof. Dr. med. Dr.-Ing. Jürgen Lademann
PD. Dr. med. habil. Johannes Wohlrab

Halle / Saale, den 09.02.2005
Tag der Verteidigung: 23.03.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009419
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009419]

Dank

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. R. Neubert für die Bereitstellung der sehr interessanten Aufgabe sowie für das in mich gesetzte Vertrauen, diese Aufgabe zu bewältigen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. K. Raith, der den experimentellen Teil meiner Arbeit betreute und mich zu jeder Zeit in jeder Hinsicht unterstützte.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. habil. J. Wohlrab und dem Team der Klinik für Dermatologie und Venereologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, die die klinischen Studien mit den Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten organisiert und die Lipidextraktproben zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen des Instituts für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie in Halle, insbesondere Herrn Dipl.-Ing. C. Schmelzer und Herrn C. Brenner.

Herrn Reese und seinem Team möchte ich für den Bau des Extraktionsgerätes sowie für deren Hilfe bei der Bewältigung von technischen Problemen danken.

Dank sagen möchte ich auch Frau M. Woigk und Frau M. Lackner für die technische Assistenz.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau bedanken, ohne deren unbegrenzte Unterstützung und Geduld vieles nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG 5

2. ALLGEMEINER TEIL 8

2.1 DIE HAUT 8

2.1.1. Aufbau und Funktionen der Haut 8
2.1.2. Das Stratum corneum [SC] 11
2.1.3. Die SC-Lipide 12
2.1.4 Die SC-Ceramide 13
2.1.4.1 Aufbau, Nomenklatur und quantitative Zusammensetzung der SC-Ceramide 13
2.1.4.2 Stoffwechsel der SC-Ceramide 16
2.1.4.3 Bedeutung der SC-Ceramide 18
2.1.5 Hautkrankheiten mit verändertem Ceramidprofil 19
2.1.5.1 Neurodermitis 19
2.1.5.2 Psoriasis 21

2.2 DIE ANALYTISCHEN METHODEN 23

2.2.1 Dünnschichtchromatographie [TLC] 23
2.2.2.1. Automatische Mehrfachentwicklung [AMD] 24
2.2.2.2. Densitometrie 26
2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie [HPLC] 27
2.2.3 Massenspektrometrie [MS] 29
2.2.3.1 Ionisationstechniken 29
2.2.3.2 Analysatoren 33
2.2.3.3 Detektion 36
2.2.3.4 LC/MS-Kopplung 37
2.2.4 Evaporative Lichtstreudetektion [ELSD] 38

3. EXPERIMENTELLER TEIL 39

3.1 CHEMIKALIEN 39

3.2 GEWINNUNG DER SC-LIPIDE 40

3.3 TRENNUNG DER SC-LIPIDE MITTELS AMD-HPTLC UND DEREN DENSITOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG 42

3.3.1 Probenauftragung 42
3.3.2 Automatische Mehrfachentwicklung 42
3.3.3 Visualisierung und densitometrische Detektion 44

3.4 TRENNUNG DER SC-CERAMIDE MITTELS NORMALPHASEN-HPLC UND DEREN DETEKTION MIT HILFE DER APCI-MS UND HPLC-ELSD 44

3.4.1 HPLC 44
3.4.2 HPLC/APCI-MS 45
3.4.3 HPLC/ELSD 46
3.4.4 Statistische Auswertung 46

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 47

4.1 ANALYTIK DER HAUTLIPIDE 47

4.1.1 Extraktionsmethode der SC-Lipide 47
4.1.2 Trennung der SC-Ceramide mittels AMD-HPTLC 49

4.1.3 Trennung der SC-Ceramide mittels HPLC/APCI-MS und HPLC/ELSD *55*
4.1.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der SC-Ceramide *62*
4.2 UNTERSUCHUNG DER SC-CERAMIDVERTEILUNG IN NEURODERMITIS- UND PSORIASIS-PATIENTEN VERGLICHEN MIT GESUNDEN PROBANDEN 68
4.2.1 Die densitometrischen Profile *68*
4.2.2 Die massenspektrometrischen Profile *70*
4.3 EIGNUNG DER SC-CERAMIDE IN DEN NICHT INVOLVIERTEN STELLEN BEI NEURODERMITIS UND PSORIASIS FÜR DIAGNOSTISCHE ZWECKE 80

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK 83

6 LITERATURVERZEICHNIS 86

7 ANHANG (VERÖFFENTLICHUNGEN) 101

Abkürzungsverzeichnis

AMD	Automated Multiple Development (Automatische Mehrfachentwicklung)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (Chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
CE	Cornified Envelope (Hornhülle)
Cer	Ceramid
CID	Collision-Induced Dissociation
CLE	Cornified Lipid Envelope (Kovalent gebundene Lipide an der Hornhülle)
EASI	Eczema Area and Severity Index (Skala zur Beurteilung des Schweregrades von Neurodermitis)
ELSD	Evaporative light scattering detection (Evaporative Lichtstreudetektion)
ESI	Electrospray Ionization (Elektrospray-Ionisation)
FFA	Free fatty acids (Freie Fettsäuren)
GC/MS	Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
GlcCer	Glucosylceramid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssig-chromatographie)
HPTLC	High Performance Thin-layer Chromatography (Hochleistungsdünnschicht-chromatographie)
ID	Innendurchmesser von HPLC-Säulen
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation (Matrixunterstützte Laserdesorptions-Ionisation)
MS	Mass Spectrometry (Massenspektrometrie)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MS^n	Multiple Mass Spectrometry (Mehrfach-Massenspektrometrie)
NP	Normal Phase (Normalphasen-)
NMF	Natural Moisturizing Factor
RP	Reversed Phase (Umkehrphasen-)
PASI	Psoriasis Area and Severity Index (Skala zur Beurteilung des Schweregrades von Psoriasis)

SIM	Selected Ion Monitoring
SC	Stratum corneum
SCCE	Stratum corneum Chymotrypsin Enzym
SCTE	Stratum corneum Trypsin Enzym
TEWL	Transepidermal Water Loss (Transepidermaler Wasserverlust)
TLC	Thin-layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie, DC)
TOF	Time-of-Flight (Flugzeit)
UV/Vis	Ultraviolett/Visible (Die Lichtdetektion im ultravioletten oder sichtbaren Bereich)

1. Einleitung und Zielsetzung

Lipide stellen bedeutende Naturstoffe dar, die in jedem Organismus vorkommen und vielfältige Funktionen erfüllen. Sie rücken auf Grund dessen vermehrt in den Mittelpunkt der heutigen Forschung. In diesem Zusammenhang sind die weltweit entstehenden großen Lipidomics-Projekte zu erwähnen, deren Bedeutung darin liegt, die Lipide zu charakterisieren, deren Rollen besser zu erfassen und daraus zu ergründen, inwiefern neue therapeutische Einsatzmöglichkeiten bestehen.

Ceramide gehören zu der Gruppe der Sphingolipide und sind hauptsächlich dafür bekannt, dass sie der Signaltransduktion dienen und die „Apoptose“, den programmierten Zelltod, vermitteln. Im Stratum corneum (SC), der äußersten Schicht der menschlichen Haut, sind sie hingegen unerlässlich für die Aufrechterhaltung des Lebens. Sie tragen dort maßgeblich zum Schutz des Körpers vor äußeren Schädigungen und zur Verhinderung von unkontrolliertem Wasserverlust bei.

Die SC-Ceramide zeichnen sich durch ihre komplexe, einzigartige und nicht in anderen Körpergeweben anzutreffende Zusammensetzung aus, die auf vielfältigen Strukturelementen und deren Kombinationen beruht. Dadurch wird deren Analytik zu einer herausfordernden Aufgabe. Als Methode der ersten Wahl zur Untersuchung der SC-Lipide und damit auch der SC-Ceramide hat sich die klassische Dünnschichtchromatographie etabliert, was auf deren Robustheit und die i.d.R. nicht erforderliche Abtrennung unerwünschter Bestandteile zurückzuführen ist. Nachteilig sind allerdings die manuellen arbeitsintensiven Trennprozeduren sowie die auf Grund lateraler Diffusion breiten und schlecht zu quantifizierenden Banden der aufgetrennten Lipide. Solche Nachteile lassen sich mit dem Einsatz der AMD-Technik (s.u.) vermeiden.

Zur Erforschung der molekularen SC-Ceramidprofile wurde hauptsächlich die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC/MS) herangezogen. Die vor der eigentlichen Analytik notwendigen Vorgänge der hydrolytischen Spaltung und anschließenden Derivatisierung gelten als umständlich und können zusätzliche Fehlerquellen darstellen. Mit Hilfe moderner Methoden, bei denen die Hochdruckflüssigchromatographie mit der Elektrospray-Massenspektrometrie (HPLC/ESI-MS) gekoppelt ist, wurden Nachteile der GC/MS vermieden und beachtliche Informationen über die Ceramidprofile erzielt. Die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) erwies

sich allerdings im Allgemeinen als weniger geeignet zur Untersuchung einiger Klassen der lipophilen langkettigen Ceramide, die von besonderer Bedeutung sind.

Verschiedene Hautkrankheiten gehen mit Beeinträchtigungen des Ceramidmusters im Stratum corneum einher. Zu diesen Krankheiten zählen Neurodermitis und Psoriasis, bei denen davon berichtet wurde, dass nicht nur die involvierten, d.h. geschädigten (läsionierten), sondern auch die nicht involvierten, gesund erscheinenden Hautstellen von solchen Beeinträchtigungen betroffen sind. Wären die Veränderungen des Ceramidmusters in den nicht involvierten Hautstellen charakteristisch und signifikant, dann würde dies die Möglichkeit eröffnen, sie für diagnostische Zwecke, zur Früherkennung individueller Anfälligkeiten sowie zur rechtzeitigen Vorbeugung vor Ausbruch von Krankheitsschüben einzusetzen. Solche Veränderungen würden zudem Einblicke in einige Teilaspekte der noch nicht in allen Einzelheiten bekannten Entstehungsmechanismen beider Krankheiten ermöglichen. An dieser Stelle ist zu unterstreichen, dass die nicht involvierten Hautstellen deshalb von Interesse sind, weil sie im Gegensatz zu läsionierten Hautbereichen für eine In-vivo-Lipid-Extraktion geeignet sind und somit eine für den Patienten verträgliche Untersuchung ermöglichen.

Aufbauend auf den obigen Ausführungen wurde das Hauptziel der vorliegenden Arbeit darin definiert, die Ceramidprofile in den nicht läsionierten Hautstellen von mit Neurodermitis und Psoriasis erkrankten Patienten mittels neuen analytischen Methoden zu untersuchen und an Hand der erhaltenen Daten zu beurteilen, ob gegebenenfalls vorhandene Differenzen einen diagnostischen Wert aufweisen. Zur Verwirklichung dieses Zieles wurde eine Vorgehensweise aufgestellt, die folgende Schritte beinhaltete:

- Die Optimierung einer In-vivo-Lipidgewinnungsmethode, die effektiv ist, die Compliance der Patienten berücksichtigt und Nachteile anderer Methoden vermeidet.
- Die Entwicklung einer neuen automatisierten dünnschichtchromatographischen Methode (AMD-HPTLC), die nicht arbeitsintensiv ist und gleichzeitig alle extrahierten Lipide und insbesondere die SC-Ceramide mit einer hohen Auflösung auftrennt.
- Die Entwicklung einer innovativen, möglichst leicht handhabbaren HPLC/MS-Methode, mit deren Hilfe die molekulare Zusammensetzung aller bekannten SC-Ceramidklassen analysiert werden kann.

- Mit Blick auf eine diagnostische Anwendung sollte die Entwicklung in Methoden münden, die einerseits zuverlässige Ergebnisse und andererseits hohe Ausbeuten in kurzer Zeit liefern.

Diesem Kapitel folgend ist der allgemeine Teil, der die dieser Arbeit zu Grunde liegenden Theorien abhandelt. Im Anschluss daran in Kapitel 3 werden die verwendeten Materialien und Methoden vorgestellt. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Kapitel 4 vorgeführt und diskutiert. Auf Grund des interdisziplinären Charakters der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse in einen analytischen und einen dermatologisch relevanten Teil eingegliedert. Im Anschluss daran folgt ein Abschnitt mit einer Diskussion über die Eignung von Ceramidprofilen aus nicht läsionierten Hautstellen bei Neurodermitis und Psoriasis für diagnostische Zwecke. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse sowie ein Ausblick über weitere mögliche Aspekte liegen in Kapitel 5 vor, mit dem die Arbeit abgeschlossen wird.

2. Allgemeiner Teil

2.1 Die Haut

2.1.1. Aufbau und Funktionen der Haut

Mit einer Ausdehnung von 1,5 - 2 m^2 bei einem Erwachsenen und einem Anteil von 7-10 % des Körpergewichtes stellt die Haut das größte Organ des Menschen dar (107, 133). Ihr kommt mit den vielfältigen Funktionen, die sie erfüllt, eine entscheidende Bedeutung für den gesamten Körper zu. Vornehmlich ist die Haut ein Schutz- und Barriereorgan gegen äußere Einflüsse jeglicher Art sowie gegen exzessiven transepidermalen Wasserverlust (TEWL), der zur Austrocknung führen würde (38, 39, 133, 136). Darüber hinaus dient sie als Sinnes-, Immun- und Sekretionsorgan.

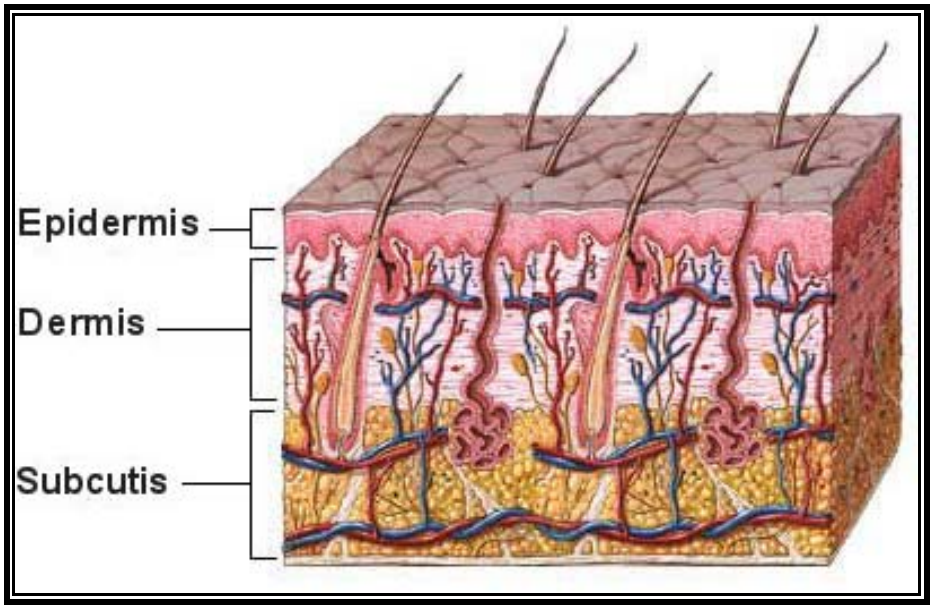

Abbildung 1: Schichten der menschlichen Haut nach (1)

Histologisch lässt sich die Haut in drei funktionelle Schichten **(Abbildung 1)** einteilen (107): die *Epidermis* (Oberhaut), die *Dermis* (Lederhaut) und die *Subcutis* (Unterhaut). Sie ist mit Nerven, Blutgefässen sowie mit Sinnesorganen versehen, wobei Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen als *Adnexen* (Hautanhangsgebilde) angesehen werden.

Bei der *Epidermis* handelt es sich um ein ziegelsteinartig dicht aufeinander gepacktes, mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, dessen Dicke zwischen 30 µm und 1,6 mm variieren kann (107). Die epidermalen Epithelschichten lassen sich von innen nach außen in das *Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum* **(Abbildung 2)** gliedern.

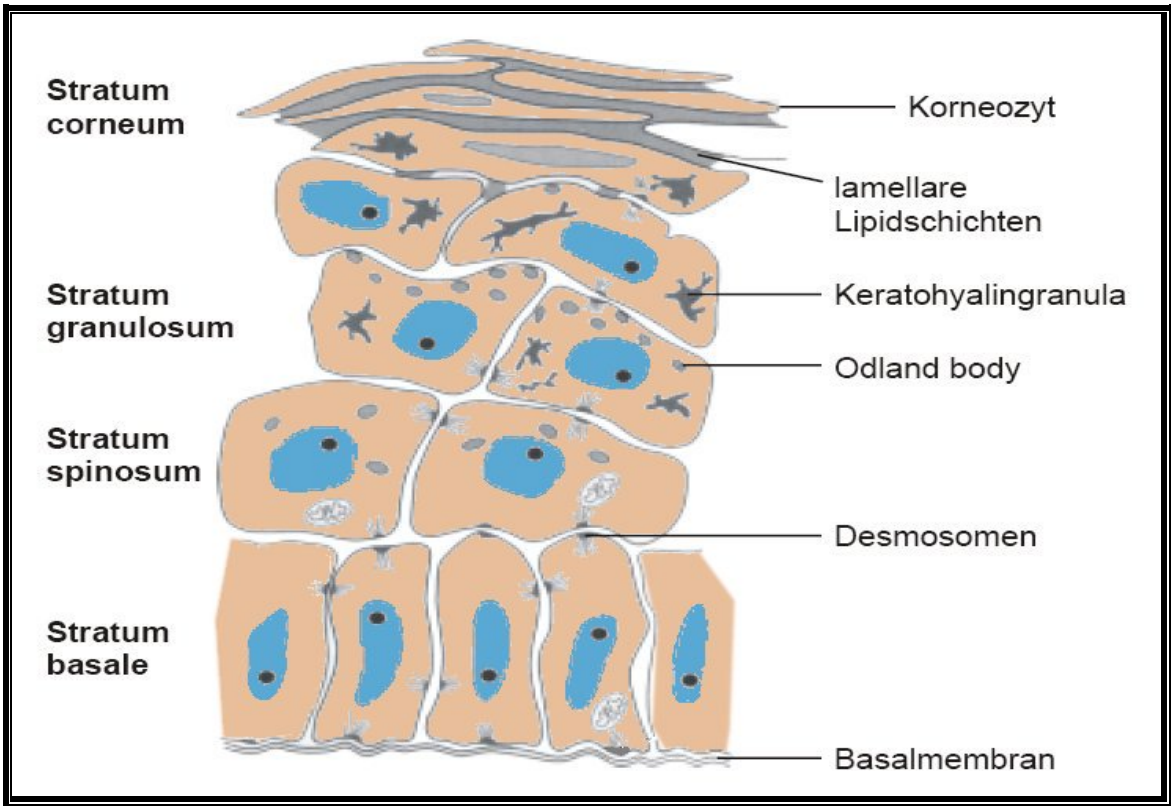

Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Epidermis; mod. nach (55)

Mit einem Anteil von 90% der Trockenmasse stellen die Keratinozyten den Hauptbestandteil der Epidermis dar und werden mit Hilfe von komplex aufgebauten Proteinen, den sog. *Desmosomen,* zusammengehalten (107). Nicht keratinisierte Zellen wie Melanozyten, Langerhans-Zellen sowie Merkel-Zellen kommen auch in der Epidermis vor.
Ein für die Haut wichtiger Vorgang ist die epidermale Differenzierung, die durch fortschreitende Zellteilung, Wanderung der Zellen in Richtung der Oberfläche und deren anschließenden Abschuppung gekennzeichnet ist. Dabei erfahren die betroffenen Zellen dramatische Veränderungen in morphologischer, histologischer, metabolischer sowie funktioneller Hinsicht. Dieser Prozess wird in den Zellen des *Stratum basale* veranlasst, die sich durch ihre hohe mitotische Aktivität auszeichnen. Durch ständige Zellteilung entstehen

immer neue Zellen, die in die oberen Zellschichten verschoben werden. Die daraus hervorgegangenen Stachelzellen des *Stratum spinosum* erlangen im Laufe der Differenzierung eine deutliche Volumenvergrößerung sowie eine zunehmende Abflachung. Des Weiteren werden hier erstmals die sog. „*Odland bodies“* sichtbar, die membranumgrenzte Vakuolen darstellen und Vorstufen der epidermalen Lipide (53, 85, 152) sowie hydrolytische Enzyme (53, 59, 95, 100, 101) enthalten. Im darüber liegenden Stratum granulosum, dessen Zellen durch das Vorhandensein der körnigen Gebilde (Granula) des Keratohyalins (die Vorstufe des Keratins) charakterisiert sind, beginnt die tatsächliche Verhornung. Ferner geben die „*Odland bodies“* Ihren Inhalt in den extrazellulären Raum an die Grenze zwischen *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* ab (31, 84). Das *Stratum corneum* stellt das Endprodukt der epidermalen Zelldifferenzierung dar (34, 38), wobei aus den lebenden Keratinozyten kernlose, rigide und vergleichsweise sehr große abgeflachte Zellen, die „*Korneozyten*“, entstehen.

Die Abschuppung (Desquamation) findet in den äußersten Schichten der Epidermis statt. Dabei werden die *Desmosomen* enzymatisch (14, 63, 141) abgebaut und die *Korneozyten* abgelöst und abgestoßen. Unter normalen Bedingungen dauert der gesamte Prozess bis zur Abschuppung 28 bis 30 Tage. Daraus wird ersichtlich, dass die Epidermis ein dynamisches Gewebe ist, das durch Zellneubildung, Keratinisierung, Differenzierung und Abschuppung in andauernder Erneuerung ist.

Die *Dermis* stellt ein Bindegewebe dar, das von Blutgefässen, Nerven und Lymphbahnen durchdrungen ist (107). Sie lässt sich in das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare* gliedern. Während das *Stratum papillare* ein dünner zell- und gefäßreicher Bereich ist, der die Nährstoffversorgung der epidermalen basalen Zellen gewährleistet, besteht das *Stratum reticulare* vorwiegend aus kaum dehnbaren Kollagen- sowie aus dehnbaren Elastin- und Retikulinfasern und ist für die hohe Zugfestigkeit und Elastizität verantwortlich. Sowohl die strukturbildenden Proteine als auch epidermale nicht keratinisierte Zellen wie Fibroblasten, Histiozyten und Mastzellen sind in eine gelartige, im Wesentlichen aus Proteoglycan-Hyaluronat-Komplexen bestehende Grundsubstanz eingebettet, die durch ihr hohes Wasserbindevermögen charakterisiert ist und damit der Regulation des Gewebeinnendrucks dient.

Die *Subcutis* ist ein lockeres Gewebe, das läppchenartig aufgebaut ist, von Bindegewebssepten unterteilt wird und hauptsächlich aus Fettzellen besteht, wobei die Gewebedicke hormonellen, nervalen und nutritiven Einflüsse unterliegt. Haarfollikel sowie

Schweißdrüsen haben ihren Ursprung in der Subcutis. Die Funktion der Subcutis liegt in der Speicherung von Wasser und Nährstoffen, der Körperisolation gegen thermische Veränderungen sowie dem Schutz vor mechanischen Einwirkungen.

2.1.2. Das Stratum corneum [SC]

Das je nach Körperregion zwischen 0,03 µm und 1 mm dicke SC stellt die äußerste Schicht der Haut dar, in der die eigentliche Barrierefunktion lokalisiert ist (44, 107). Histologisch gesehen lässt es sich in ein äußeres lockeres *Stratum disjunctum* und ein inneres dicht gefügtes *Stratum compactum* gliedern (107).

Nach dem stark vereinfachten, heute noch gültigen „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ ist das SC ein Zweikompartimentsystem, bestehend aus langen, abgeflachten, kernlosen und somit abgestorbenen Korneozyten, die in einer Lipidmatrix geordneter Struktur eingebettet sind. Dabei stellen die Korneozyten die "Ziegelsteine" und die interzellulären Lipide den "Mörtel" dar (34).

Die Korneozyten sind 35-45 µm lang, 0,5-1,5 µm dick und weisen eine hexagonale Struktur auf (94, 115). Während das Innere der Korneozyten mit einem Netzwerk aus Keratinfilamenten gefüllt ist, wird die äußere Abgrenzung von dem sog. „*Cornified Envelope (CE)*“ übernommen (31). Es handelt sich dabei um eine ca. 10 nm dicke verhornte Hülle aus verschiedenen quervernetzten Proteinen, vornehmlich Involucrin und Loricrin (73, 74). An der äußeren Seite der Hornhülle ist ein Lipidmonolayer kovalent gebunden. Die als „*Cornified Lipid Envelope* (*CLE*)“ bekannte Lipidhülle ist hauptsächlich aus langen ω-Hydroxyceramiden aufgebaut (149, 161). Verschiedenen Studien zufolge, tragen sowohl die Horn- als auch die daran kovalent gebundene Lipidhülle neben den interzellulären extrahierbaren Lipiden zu der Barrierefunktion des SC bei (4, 99, 142, 143). Die interzellulären extrahierbaren Lipide bestehen hauptsächlich aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren.

Von den Talgdrüsen wird das Sebum (Talg, Oberflächenlipide), das hauptsächlich aus Wachsestern, Triacylglycerolen und Squalen zusammengesetzt ist (30, 146), sezerniert und über Haarfolikeleinmündungen auf die Hautoberfläche transportiert (145). Im Gegensatz zu alten Vorstellungen, erfüllt das Sebum mehrere wichtige Funktionen (49, 114, 150, 166), von denen hier der Transport von Antioxidantien zur Hautoberfläche und die

antimikrobielle Aktivität exemplarisch genannt seien. Ein unmittelbarer Beitrag der Sebumlipide zur epidermalen Barrierefunktion besteht allerdings nicht (49, 95).

Im SC liegt ein Wassergehalt zwischen 30 und 50 % der trockenen Masse vor (10, 18, 126). Dabei herrscht ein Feuchtegradient vor (126, 155), der einen natürlichen transepidermalen Wasserverlust (TEWL) an die Umgebung von 0,4 mg h^{-1} cm^{-2} (85) zur Folge hat. Der TEWL gilt als wichtige physikalische Messgröße zur Charakterisierung der Hautpermeabilität. Liegen nämlich erhöhte Werte des TEWL vor, dann ist dies ein Indiz für eine beeinträchtigte Barrierefunktion. Über das SC erstreckt sich des Weiteren ein ausgeprägter *saurer* pH-Gradient (109, 110, 127). Im apikalen SC disjunctum beträgt der pH-Wert bei Männern 4,5 und bei Frauen 5,3 und steigt mit einem biphasischen Verlauf bis zu 6,9 zum oberen Stratum granulosum hin an (48, 110).

Obgleich kernlos und somit biologisch tot, stellt das SC laut den neuen Vorstellungen ein aktives Gewebe dar, das biochemische und biosensorische Vorgänge unterhält und in Interaktion mit den darunter liegenden Geweben zu treten scheint. Zu den biochemischen Vorgängen zählen die Ceramidgenerierung mit Hilfe der Enzyme β-Glucocerebrosidase (60, 67) und der sauren Sphingomyelinase (151) sowie Vorgänge der Abschuppung (Desquamation) mittels des SC-Trypsinenzyms (SCTE) und des SC-Chymotrypsinenzyms (SCCE) (33, 92, 148).

Die biosensorischen Eigenschaften äußern sich in der Reaktion auf Umweltreize. Beispielsweise führen Luftfeuchtigkeitsschwankungen zu Veränderungen in der Hydrolyse des Proteins Filaggrin in NMF-Aminosäuren, die für die Aufrechterhaltung der SC-Hydratation mitverantwortlich sind (76, 137). Antwortkaskaden auf externe Schädigungen oder Verletzungen, die eine Wiederherstellung der Barrierefunktion initialisieren, deuten außerdem auf eine Interaktion des SC mit den darunter liegenden Geweben hin (41, 168).

Aus den obigen Ausführungen lässt sich schlussfolgern, dass das SC ein heterogenes und komplexes System aus Korneozyten, Lipiden, Proteinen sowie anderen aktiven Substanzen darstellt, die in unterschiedlichem Ausmaß an der Aufrechterhaltung der epidermalen Barrierefunktion beteiligt sind.

2.1.3. Die SC-Lipide

Im SC wird zwischen den frei extrahierbaren interzellulären und den an die Hornhülle kovalent gebundenen Lipiden unterschieden, die erst nach alkalischer Verseifung

freigesetzt werden können. Anzumerken ist, dass die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf die interzellulären frei extrahierbaren SC-Lipide beschränkt waren. Diese zeichnen sich durch ihr außergewöhnliches, nirgends sonst im Körper bei anderen Membranen anzutreffendes Lipidmuster aus (95, 165). Sie sind in Form von gestapelten, bilamellären Schichten angeordnet und bestehen hauptsächlich aus Ceramiden (50-60 %, m/m), Cholesterol (18-25%, m/m) und freien Fettsäuren (10-22%, m/m) (156, 157, 165). Sowohl der Gesamtgehalt als auch die prozentuale Zusammensetzung der SC-Lipide sind abhängig von verschiedenen Faktoren wie Lebensalter (56, 131), Geschlecht (21), Jahreszeit (129, 171), Körperareal (82) sowie der interindividuellen Variabilität (108).

Zur Beschreibung der Lipidorganisation sowie der damit verbundenen Permeabilitätseigenschaften existieren zur Zeit verschiedene Modelle wie das „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ nach Elias (34), das „Domänen-Mosaik-Modell“ nach Forslind (50) und das „Sandwich-Modell“ nach Bouwstra (11).

Im folgenden Abschnitt wird auf die Ceramide näher eingegangen, da sie eine sehr wichtige Klasse unter den SC-Lipiden darstellen und im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehen.

2.1.4 Die SC-Ceramide

2.1.4.1 Aufbau, Nomenklatur und quantitative Zusammensetzung der SC-Ceramide

Die SC-Ceramide werden den Sphingolipiden zugeordnet. Sie bestehen aus Sphingoidbasen, die amidartig an Fettsäuren gebunden sind. Die Sphingoidbasen beinhalten Sphingosin, Phytosphingosin und 6-Hydroxysphingosin. Die Fettsäuren können in α-Stellung hydroxyliert oder nicht hydroxyliert sein. Die in α-Stellung nicht hydroxylierten Fettsäuren können über eine ω-Hydroxygruppe mit einer anderen Fettsäure, meist Linolsäure, verestert sein. Die häufigsten Varianten bei den Sphingoidbasen sind solche mit 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatomen, wobei die C18-Variante bei den meisten Sphingoidbasen am häufigsten auftritt (19, 163, 164). Die Kettenlänge der amidartig gebundenen Fettsäuren kann zwischen C16 und C40 variieren (19, 153, 163, 164). Die Vielfalt dieser strukturellen Gegebenheiten sowie die Kombination zwischen denen führen zu unterschiedlichen Ceramidklassen sowie zu verschiedenen Spezies innerhalb jeder

Klasse. In **Abbildung 3**. sind die Strukturen aller bisher bekannten Ceramidklassen dargestellt.

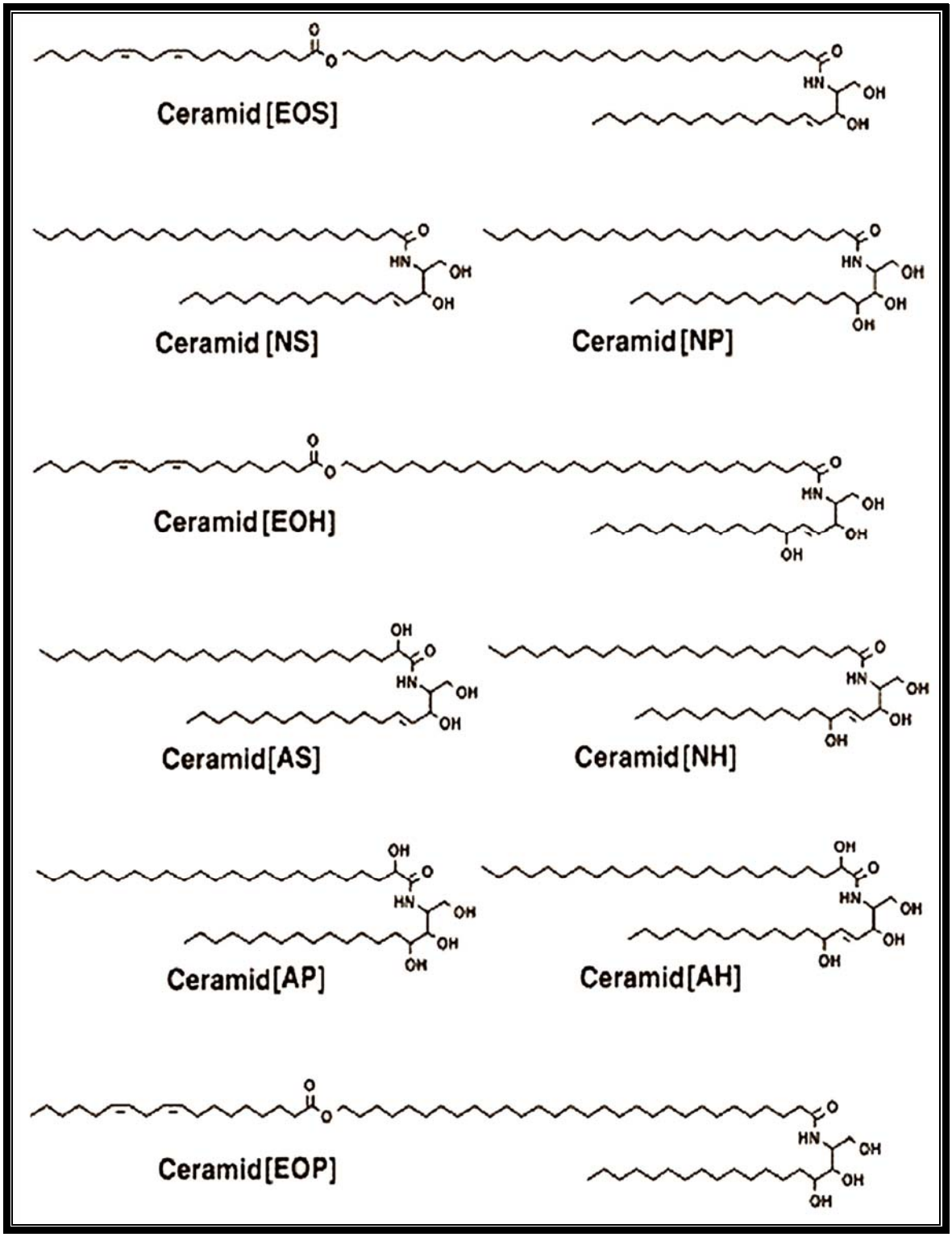

Abbildung 3: Die Strukturen der bisher bekannten Ceramidklassen des SC; mod. nach (95)

Die Nomenklatur der SC-Ceramide basierte anfangs auf einem Nummerierungssystem (160), das die nach dünnschichtchromatographischer Trennung separierten Ceramidbanden in der Reihenfolge steigender Polarität (je höher die Nummer desto polarer ist das Ceramid und desto kleiner ist sein Rf-Wert) mit Zahlen (1-6) kennzeichnete. Diese Nomenklatur erwies sich allerdings als wenig brauchbar, da immer neue Ceramide entdeckt wurden, die nicht in das Konzept des statischen Nummerierungssystems einordnen ließen. Motta et al. (103) und Robson et al. (128) haben eine neue Nomenklatur entwickelt, die aus auf die strukturellen Elemente der Ceramide bezogenen Abkürzungen besteht. Im Laufe dieser Arbeit wird diese systematische Nomenklatur ausschließlich angewandt. Erläuterungen zu den Abkürzungen sind in **Tabelle 1** angegeben.

Tabelle 1: Bezeichnung der Ceramide nach Motta et al. (103) und Robson et al. (128)

Abkürzung	Bedeutung
S	Die Sphingoidbase des Ceramids ist Sphingosin.
P	Die Sphingoidbase des Ceramids ist Phytosphingosin.
H	Die Sphingoidbase des Ceramids ist 6-Hydroxy-Sphingosin.
A	Die amidartig gebundene Fettsäure des Ceramids ist an α-Stellung hydroxyliert.
N	Die amidartig gebundene Fettsäure des Ceramids ist an α-Stellung nicht hydroxyliert.
O	Die amidartig gebundene Fettsäure des Ceramids ist an ω-Stellung hydroxyliert.
E	Die amidartig gebundene Fettsäure des Ceramids ist an ω-Stellung mit einer anderen Fettsäure esterartig verbunden.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurden 7 Ceramidklassen, Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOH], Cer [AS], Cer [AP] und Cer [AH] getrennt und identifiziert (128). Stewart und Downing fanden, dass die Bande von Cer [AS] mit der Bande von Cer [NH] überlappt, wobei Cer [NH] und nicht Cer [AS], die größere Fraktion darstellt (147). Auf Grund gleicher Polarität beider Ceramidklassen lassen sie sich erst nach Acetylierung trennen (147). Von Ponec et al. wurde eine neue Ceramidklasse, Cer [EOP], entdeckt (118). Untersuchungen von Weerheim und Ponec zufolge ist die prozentuale Zusammensetzung der Ceramidklassen über die gesamte Tiefe des SC weitgehend konstant (156). Nur die

obersten SC-Schichten weisen in dieser Hinsicht eine geringe Abweichung davon auf. Eine Übersicht zur prozentualen Zusammensetzung der SC-Ceramidklassen ist in **Tabelle 2** dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der SC-Ceramidklassen; mod. nach Coderch et al. (19)

Bezeichnung des Ceramids	Massenanteil %
Cer [EOS]	8
Cer [NS]	21
Cer [NP]	13
Cer [EOH]	4
Cer [NH] / Cer [AS]	27
Cer [AP]	4
Cer [NH]	22

2.1.4.2 Stoffwechsel der SC-Ceramide

Wie aus Abschnitt 2.1.4.1 hervorgeht, besteht ein Ceramid aus einer Sphingoidbase, die amidartig mit einer Fettsäure verbunden ist. Die Grundbestandteile einer Sphingoidbase bilden Palmitoyl-CoA und Serin, aus denen über Zwischenstufen Sphinganin entsteht (19, 60, 102). Daraufhin findet eine N-Acylierung mit einem Fettsäurerest statt. An dieser Stelle ist es von Bedeutung zu erwähnen, dass die Verknüpfung von Palmitoyl-CoA und Serin mittels des Enzyms Palmitoyl-CoA-Serin-Transferase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der gesamten Ceramidgenerierung ist.

In **Abbildung 4** sind die Schritte des Stoffwechsels der SC-Ceramide schematisch dargestellt. Durch die mit Hilfe des Enzyms Sphingomyelin-Synthase katalysierte Reaktion mit Phosphatidylcholin werden aus den entstehenden Ceramiden Sphingomyeline gebildet. Glycosylceramide entstehen durch die Kopplung von Glucose an der primären Hydroxylgruppe der Ceramide mittels des Enzyms Glucosylceramid-Synthase. In Form von gestapelten Doppelmembranen werden die meisten Vorstufen (Glycosylceramide und Sphingomyeline) der späteren SC-Ceramide in den „*Odland bodies*“ gelagert, in denen auch die zur Gewinnung dieser Ceramide benötigten hydrolytischen Enzyme anzutreffen

sind (95). Erst an der Grenze zwischen dem Stratum granulosum und dem SC geben die „*Odland bodies*“ ihren Inhalt durch Exozytose frei (31, 84). Laut der neusten Befunde verzweigt sich nun die Bildung der epidermalen Ceramide in zwei Wege. Katalysiert durch die β-Glucocerebrosidase kommt es zur Deglucosylierung der Glucosylceramide (GlcCer 1-6 sowie Epidermosid I und Epidermosid II), wobei daraus die Ceramide Cer [NS], Cer [NP], Cer [NH], Cer [AS], Cer [AP], Cer [AH] sowie die ω-veresterten Ceramide Cer [EOS] und Cer [EOH] gebildet werden (60). Der zweite Weg ist die Hydrolyse der Sphingomyeline SM-1 und SM-3 mittels der sauren Sphingomyelinase, wodurch jeweils Cer [NS] und Cer [AS] anteilig entstehen (60, 151). Zu erwähnen ist, dass SM-3 sehr wahrscheinlich den „*Odland bodies*“, SM-1 hingegen den Plasmamembranen der Keratinozyten entspringt (151).

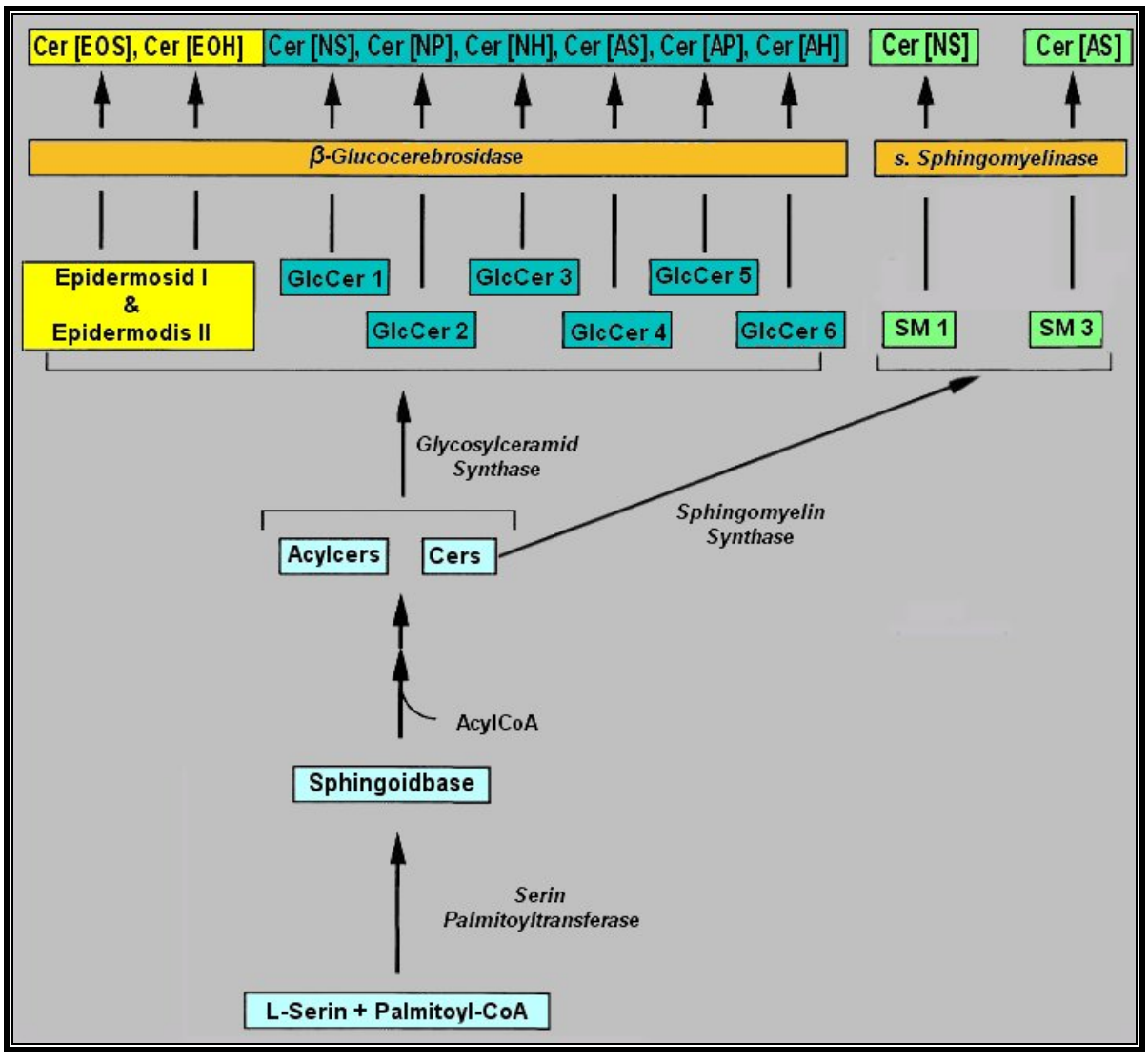

Abbildung 4: Stoffwechsel der SC-Ceramide; mod. nach (60)

2.1.4.3 Bedeutung der SC-Ceramide

Die Bedeutung der SC-Ceramide resultiert aus ihrem entscheidenden Beitrag zur epidermalen Barrierefunktion (40, 66, 70). Sie stellen darüber hinaus die größte Fraktion der SC-Lipide dar (157).

Gemeinsam mit Cholesterol und den freien Fettsäuren bilden die Ceramide geordnete bilamelläre Membranen mit dicht gepackten Zwischenräumen (19, 44, 79). Außerdem tragen die unverzweigten, langen, vorwiegend gesättigten, und somit hydrophoben und einen hohen Schmelzpunkt aufweisenden Kohlenwasserstoffketten der Ceramide dazu bei, dass die nicht polaren Regionen innerhalb der Membranen hauptsächlich einen festkristallinen (orthorhombische Packung) oder einen Gelzustand (hexagonale Packung) zeigen (13, 37, 50, 51). Diese physikochemischen Gegebenheiten haben eine massive Reduktion der Wasserpermeabilität zur Folge. Sie steuern darüber hinaus zur Aufrechterhaltung der Hydratation des SC und zum Schutz gegen exzessiven Wasserverlust bei.

Die Relevanz der Ceramide für die epidermale Barrierefunktion lässt sich auch dadurch belegen, dass der TEWL an der nicht keratinisierten oralen Mucosa höher ist als an den anderen keratinisierten Hautregionen (159, 162). Dies wird damit in Zusammenhang gebracht, dass dort Ceramide durch Glucosylceramide und freie Fettsäuren durch Phospholipide ersetzt sind. Einen wichtigen, für die Bedeutung der Ceramide ausschlaggebenden Beweis bieten die Gaucher-Typ-2- und die Niemann-Pick-Krankheit (29, 66, 134). In beiden Fällen handelt es sich um eine Dysfunktion der epidermalen Barriere, die auf Beeinträchtigungen von ceramid-generierenden Enzymen basiert. Die betroffenen Enzyme sind die β-Glucocerebrosidase bei der Gaucher Typ-2- und die saure Sphingomyelinase bei der Niemann-Pick-Krankheit.

Auf Grund der vielfältigen und komplexen Zusammensetzung der SC-Ceramide ist es trotz intensiver Untersuchungen bisher nicht gelungen, jeder Ceramidklasse eine eindeutige Funktion zuzuweisen. Dies bleibt daher ein aktiver und zugleich attraktiver Forschungsbereich. Verschiedene Publikationen weisen allerdings auf die wichtige Bedeutung der ω-veresterten Ceramide und insbesondere des Cer [EOS] hin, das für die Organisation der SC-Lipide von besonderem Wert ist. (9, 12). Laut der „Molecular Rivet"-Hypothese verbinden die Moleküle von Cer [EOS] die verschiedenen bilamellären Lipidschichten miteinander (135).

2.1.5 Hautkrankheiten mit verändertem Ceramidprofil

Viele bekannte Hautkrankheiten wie Neurodermitis, Psoriasis, Akne, einige Formen der Ichthyosis sowie Xerosis gehen mit Beeinträchtigungen im Ceramidprofil des SC einher (45, 61, 104, 132, 169). Auf Grund unterschiedlicher Einflussfaktoren wie interindividuelle Variabilität, Lebensalter, unterschiedliche analytische Bedingungen, etc. ist es allerdings bisher nicht gelungen, solche Veränderungen als eindeutige, spezifische und somit für diagnostische Zwecke geeignete Manifestationen auszunutzen (19). Im Folgenden wird auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Krankheiten näher eingegangen.

2.1.5.1 Neurodermitis

Die Neurodermitis (atopische Dermatitis) ist eine chronisch-rezidivierende entzündliche Hauterkrankung, bei der die Betroffenen (genetisch Disponierte) ein weites Symptomenspektrum ausprägen können. (91, 121, 130). Im Rahmen des sog. Atopie-Syndroms können diese Patienten auch Symptomenkomplexe, die als allergisches Asthma bronchiale bzw. als allergische Rhinokonjunktivitis bezeichnet werden, entwickeln. Darüber hinaus sind häufig Symptome aller drei Symptomenkomplexe vergesellschaftet.
Die Krankheit wird auch als endogenes Ekzem, atopisches Ekzem oder atopische Dermatitis bezeichnet, setzt gehäuft im Kindesalter ein und weist eine weltweite Prävalenz von 10-20 % bei Kindern sowie 2-3 % bei Erwachsenen auf (91, 121).
Charakteristische Symptome sind spröde, chronisch trockene und rissige Haut, die stark zu Entzündungen neigt. Man unterscheidet allerdings zwischen der involvierten (läsionierten) und der nicht involvierten (nicht läsionierten und gesund erscheinenden) Haut. Zu den Symptomen gehört auch ein z.T. quälender Juckreiz (121). In Abhängigkeit vom Alter und vom Krankheitszustand sind die Hautveränderungen in unterschiedlichen Arealen lokalisiert (91). Während bei Säuglingen die Hautausschläge im Gesicht und am Kopf anzutreffen sind, treten sie in der Kindheit hauptsächlich an den Gelenkbeugen auf. Bei Erwachsenen kann sich die Krankheit in Form von Handekzemen manifestieren. Diese sowie andere morphologischen Veränderungen in Zusammenhang mit deren Ausbreitung bilden die diagnostische Grundlage, mit deren Hilfe das Ausmaß sowie das Schweregrad der Krankheit beschrieben werden kann. Dabei werden Werte verschiedener Skalen

herangezogen, zu denen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte EASI (Eczema Area and Severity Index) gehört, der maximal 72 Punkte annehmen kann (62).

Heutzutage ist es bekannt, dass einige Nahrungsmittel, Pollen, Tierhaare, Hausstaubpartikel sowie klimatische Veränderungen Einflussfaktoren darstellen, die dazu führen können, dass ein atopisches Ekzem ausgelöst, aufrechterhalten oder gar akut verschlimmert wird (91, 120). Beiträge genetischer, immunologischer sowie barrierebezogener Aspekte zur Pathogenese von Neurodermitis wurden untersucht und in Betracht gezogen (91, 120). Die Ursachen sowie die detaillierten Entstehungs- und Verlaufsmechanismen der Krankheit sind allerdings in weiten Zügen bisher ungeklärt. Bekannt ist jedoch, dass eine immun-vegetative Dysregulation vorliegt, die zu verschiedenen immunologischen Fehlfunktionen auf T- und B-zellulärer Ebene führt und vegetative Dysfunktionen einbezieht. Hinsichtlich des T-zellulären Systems handelt es sich um eine Th2-vermittelte Erkrankung (91), die durch eine postnatale T-Zell-Reifungsschwäche bedingt wird. Hier kommt es durch eine fehlerhafte Immunantwort zu einer verstärkten Aktivierung Th2-vermittelter Entzündungsszenarien. Hinsichtlich der B-zellulären Aktivierung wäre anzumerken, dass zwar in adäquater Weise IgE (spezifisches IgE) produziert wird, allerdings quantitativ in deutlich übersteigerten Mengen. So findet man bei ca. 70-80% der Neurodermitis-Patienten (extrinsische Form) erhöhte IgE-Titer. Auf der anderen Seite zeigen 20-30% der Patienten keine diesbezüglichen Veränderungen (intrinsische Form).

Die Symptome von Neurodermitis werden von einer beeinträchtigten Barrierefunktion begleitet, die sich durch einen erhöhten TEWL und verminderte Hydratationswerte manifestiert (5, 138). Damit verbunden ist außerdem ein verändertes Profil der SC-Lipide und insbesondere der SC-Ceramide (19). Einer Arbeit von Imokawa et al. zu Folge, weisen sowohl die involvierten als auch die nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitis-Patienten verminderte Ceramidmengen auf, verglichen mit gesunden Probanden (69). Am meisten davon betroffen ist Cer [EOS]. Di Nardo et al. demonstrierten, dass Neurodermitis-Patienten sowohl einen verminderten Anteil an Cer [EOS] und an Cer [NP] als auch einen erhöhten Cholesterolanteil zeigen (27). Diese Ergebnisse waren allerdings in erster Linie bei Patienten mit aktiven Leitsymptomen ausgeprägt. Eine Studie von Matsumoto et al. wies darauf hin, dass die Veränderungen bei den SC-Ceramiden auf die involvierten Hautarealen beschränkt sind (97). Hingegen haben Bleck et al. berichtet, dass bei HPTLC-Trennung der Ceramide Cer [AS] sich in zwei Subfraktionen spaltet, die für die nicht

involvierten Hautstellen in Neurodermitis-Patienten charakteristisch sind und eventuell als diagnostische Marker herangezogen werden können (6).
Den veränderten SC-Ceramidprofilen bei Neurodermitis-Patienten wurden Beeinträchtigungen im Sphingolipidstoffwechsel zu Grunde gelegt. In diesem Zusammenhang wurden z.B. die Aktivitäten der endogenen neu entdeckter Sphingomyelin- bzw. Glucosylceramid-Deacylase sowie einer bakteriellen Ceramidase als mögliche Ursachen diskutiert (64, 71, 81, 111).

2.1.5.2 Psoriasis

Bei Psoriasis (Schuppenflechte) handelt es sich um eine chronische, oft lebenslang rezidivierende entzündliche Erkrankung die das Organ Haut, aber auch Gelenke und gelenknahen Knochen betrifft und in Schüben verläuft. (65, 87). Sie tritt in der Regel im zweiten bzw. dritten Lebensjahrzehnt zum ersten Mal auf, wobei eine familiäre Häufung beobachtet wird (65, 87). Die weltweite Prävalenz variiert in Abhängigkeit von den Rassen und Ländern zwischen 0,5 % und 4,6 % (87). Die Krankheit weist verschiedene Ausprägungen auf, von denen Psoriasis vulgaris oder Plaque-Psoriasis am meisten vorkommt. Das Hauptmerkmal dieser Ausprägung, auf deren Untersuchung die vorliegende Arbeit beschränkt war, ist die übermäßige Produktion von Hautschuppen. Dabei werden die Keratinozyten extrem schnell gebildet und an die Oberfläche transportiert, wo sie nicht entsprechend schnell abgestoßen werden können. Dadurch kommt es zum typischen Erscheinungsbild mit dem silbrig-weißen Schorf bzw. Plaque. Kniescheiben, Ellenbögen, Kopfhaut, Fingernägel, sowie Hände und Füße sind Körperregionen, die am meisten von der Erkrankung betroffen sind. Zu beachten ist, dass wie bei Neurodermitis auch hier zwischen den involvierten und nicht involvierten Hautstellen unterschieden wird. Das Ausmaß der Verteilung sowie das Schweregrad der Krankheit wird anhand des PASI (Psoriasis Area and Severity Index) charakterisiert, in Punkten ausgedrückt (Maximale Punktzahl: 72 Punkte) und zur Diagnose herangezogen (52).
Die Ursachen der Krankheit sowie die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bisher nicht umfassend bekannt. Nach neuen Erkenntnissen wird die Psoriasis allerdings als Autoimmunkrankheit angesehen, bei der es über unbekannte Antigene zur Aktivierung von dendritischen Zellen (Langerhans-Zellen) in der Haut kommt, die dann wiederum über die

Interaktion mit Lymphozyten (T-Zellen) im Lymphknoten zur Auslösung einer Th1-vermittelten Entzündung führen (65, 87).

Faktoren wie Infektionen, Reaktionen auf bestimmte Medikamente, Hautverletzungen oder -reizungen sowie emotionaler Stress können zum erstmaligen Ausbruch oder zur Auslösung von Krankheitsschüben führen. Die psoriatischen Plaques (involvierte Haut) weisen eine beeinträchtigte Barrierefunktion mit erhöhtem TEWL und verminderten Hydratationswerten auf (19, 45, 80, 104). Diese Befunde sind von verändertem Ceramidprofil begleitet (19, 103). Während der prozentuale Anteil an Cer [NP], Cer [AP], Cer [EOS], Cer [AS] und Cer [EOH] abnimmt, ist er bei Cer [NS] und Cer [NH] erhöht. Ergebnisse von Alessandrini et al. wiesen auf Störungen im Stoffwechsel der SC-Ceramide hin (2). Dabei handelt es sich um reduzierte Mengen des SC-Proteins Prosaposin, eine Vorstufe vom Saposin, dem Sphingolipid-Aktivator-Protein, das sowohl zur Stimulation der β-Glucocerebrosidase als auch der sauren Sphingomyelinase dient. Auf der anderen Seite scheinen die nicht involvierten Hautstellen eine intakte Barrierefunktion aufzuweisen. Sie zeigen TEWL- und Hydratationswerte, die mit denen von gesunder Haut vergleichbar sind (5).

2.2 Die analytischen Methoden

2.2.1 Dünnschichtchromatographie [TLC]

Die Dünnschichtchromatographie (deutsch: DC, englisch: TLC) ist ein analytisches Trennverfahren, das sich dadurch auszeichnet, dass es ohne hohen apparativen Aufwand durchgeführt werden kann (139). Von Vorteil ist bei der TLC des Weiteren, dass mehrere Proben gleichzeitig analysiert werden können und dass i.d.R. keine Vortrennungen von Matrixbestandteilen notwendig sind. Aus diesen Gründen hat sich die TLC zur Bewältigung zahlreicher bioanalytischer Fragestellungen bewährt. Bei der Analytik der Hautlipide und insbesondere der SC-Lipide stellt die TLC die Methode der ersten Wahl dar. Die Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Hautlipide von Gray et al., die Entdeckung, die Isolierung und die Klassifizierung der Ceramide von Wertz et al., Robson et al., Motta et al., und Ponec et al. sowie die meisten Veröffentlichungen über die Haut- oder SC-Lipide wären ohne die TLC nicht möglich gewesen (58, 103, 118, 128, 160).

Bei der TLC handelt es sich um eine Planarflüssigchromatographie, bei der die stationäre Phase auf einem ebenen Träger fixiert ist (139). Der Träger ist eine Platte, die aus Glas, Aluminium oder Kunststoff bestehen kann. Obwohl zur Zeit viele Derivatisierungs- und Imprägnierungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen, werden 90% aller TLC- Trennungen an Kieselgel als stationäre Phase ausgeführt (Normalphasenchromatographie)(54).

Die mobile Phase besteht normalerweise aus mehreren Lösungsmittelkomponenten, deren Zusammensetzung nach theoretischen Gesichtspunkten konzipiert und anschließend experimentell optimiert wird (139).

Die Trennung mittels TLC stellt ein Verfahren dar, das verschiedene voneinander unabhängige Schritte enthält. Zunächst wird ein bestimmtes Volumen der Probenlösung auf die TLC-Platte banden- oder punktförmig aufgebracht. Das Auftragen findet manuell mit Hilfe einer speziellen Spritze oder automatisch mittels eines Applikationsgerätes statt. Nachdem die Lösungsmittelmoleküle verdampft sind, wird die Platte sodann in eine mit der mobilen Phase gefüllte Kammer gestellt, wobei die Flüssigkeit unterhalb der Auftragebene liegen muss. Anderenfalls werden die Substanzen von der Platte herausgelöst. Das Strömen der mobilen Phase durch die Sorbensschichten der stationären Phase wird durch die darin vorherrschenden Kapillarkräfte bewerkstelligt. Mit zunehmender Zeit schreitet die mobile

Phase fort, wobei man hier von einer chromatographischen Entwicklung spricht. Durch die verschiedenen Interaktionen (Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge) zwischen den unterschiedlichen Substanzen in der mobilen Phase und der stationären Phase kommt es zum Trennvorgang, der dann zum Ende kommt, wenn die Platte aus der Kammer entfernt wird. Varianten zur konventionellen Entwicklung in einer senkrechten Kammer sind Entwicklungen in horizontalen oder S-förmigen Kammern sowie die Entwicklung unter Druck oder die automatische Mehrfachentwicklung, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird. Nach Trocknung der restlichen Lösungsmittel werden die getrennten Banden oder Zonen visualisiert und detektiert. Zur Charakterisierung oder Identifizierung der getrennten Substanzen werden die Laufstrecken der Substanzen relativ zur Laufmittelfront (Rf-Werte) herangezogen (125).

Mit zunehmender Laufstrecke nimmt die Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase ab. Dadurch treten Diffusionsvorgänge verstärkt in den Vordergrund und es kommt zu Banden- bzw. Zonenverbreiterungen und somit zu schlechteren Auflösungen (119). Unter diesem Gesichtspunkt sind Parameter wie Temperatur, relative Luftfeuchte, Kammersättigung, Kammertyp sowie Zusammensetzung der mobilen Phase so auszuwählen, dass ein optimales Separationsergebnis erhalten werden kann. Es ist außerdem zu beachten, dass die Trennleistung maßgeblich von den Eigenschaften des Sorptionsmaterials und dessen Porensystems (Korngröße, Korngrößenverteilung, Packungsdichte, spezifische Oberfläche, Porendurchmesser und Porenvolumen) bestimmt wird. Aus diesem Grund wurden konventionelle TLC-Platten durch HPTLC-Platten weitgehend ersetzt. Die HPTLC-Platten weisen stationäre Phasen auf, deren Material sich durch kleinere Korngrößen (5 µm statt 15 µm bei konventionellen Platten) sowie homogenere Korngrößenverteilung auszeichnet (125, 139). Dadurch lassen sich reproduzierbare Trennergebnisse mit relativ hoher Auflösung erzielen.

2.2.2.1. Automatische Mehrfachentwicklung [AMD]

Die automatische Mehrfachentwicklung von Hochleistungsdünnschichtplatten (AMD-HPTLC) stellt eine bedeutende Entwicklung der klassischen Dünnschichtchromatographie dar. Sie zeichnet sich durch ihre hohe Trennleistung aus, die auf einer reproduzierbaren Gradientenelution beruht. Ein AMD-Gradient wird so konzipiert, dass 10 bis 30

Entwicklungsschritte abnehmender Polarität resultieren, wobei der Entwicklungsverlauf nur in eine Richtung erfolgt und bei jedem Schritt um 1-5 mm zunimmt.

Der zurzeit einzige Hersteller für AMD-Geräte ist die Firma CAMAG (Muttenz, Schweiz). Das AMD-2-Gerät, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist in **Abbildung 8** dargestellt. Es besteht im Wesentlichern aus zwei Einheiten. Mit Hilfe einer computergesteuerten Kontrolleinheit werden die Versuchsparameter eingespeist, der Entwicklungsverlauf verfolgt und die resultierenden Daten ausgewertet. Die Entwicklungseinheit enthält eine Kammer mit Einlass- und Auslassverbindungen für die mobile Phase und das Konditionierungsgas, Flaschen für Lösungsmittel und Lösungsmittelabfälle, einen Gradientenmixer, Spritzen zur Dosierung der benötigten Lösungsmittelvolumina sowie einen Lichtschrankensensor zur Messung und Kontrolle der fortschreitenden Laufstrecken.

Die praktische Durchführung des vollautomatischen Entwicklungsprozesses wird mit der Evakuierung der Entwicklungskammer gestartet. Anschließend wird die Platte konditioniert (siehe unten). Die Entwicklungskammer wird sodann mit einer mobilen Phase befüllt und einige Millimeter entwickelt. Nach Beendigung eines Entwicklungsschrittes wird die mobile Phase abgesaugt und die Platte für eine zuvor bestimmte Zeit im Vakuum getrocknet. Diese Vorgänge werden solange wiederholt, bis die gewünschte Anzahl an Entwicklungsschritten erreicht ist.

Die mobile Phase eines AMD-Gradienten beinhaltet typischerweise mindestens 3 Komponenten, die nach ihrer Funktion als Basisfließmittel (Dichlormethan, Diisopropylether oder tert-Butylmethylether), Verstärker (Methanol, Acetonitril), und Abschwächer (Hexan, Octan) eingestuft werden. Während das Basisfließmittel die Selektivität des Gradienten und somit auch die Trennungsauflösung weitgehend bestimmt, dienen der Verstärker und der Abschwächer zur Feinregulierung durch Polaritätsänderung.

Die wiederholten Entwicklungen bei der AMD-HPTLC führen dazu, dass sowohl die aufgetragenen Probenbanden als auch jede der getrennten Substanzbanden mehrfach geschärft werden (15, 119). Dies verursacht einen starken Fokussierungseffekt, der zu gut aufgelösten (Peakkapazität bis zu 50 Peaks in 80mm) und präzise zu detektierenden und zu quantifizierenden Banden führt. Auch die Konditionierung spielt bei der Verbesserung der Trennleistung eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Dabei wird ein Luftstrom durch eine Lösung geleitet, mit ihr gesättigt und sodann in die Kammer geleitet, wo er in Kontakt mit der Platte gebracht wird. Dadurch kann der pH-Wert, die Aktivität und die Selektivität der

Trennschicht beeinflusst werden. Wird der Luftstrom z.B. mit einer schwachen Säure (Essig- oder Ameisensäure) gesättigt und zur Konditionierung angewandt, dann führt dies zur Fokussierung von Banden, die Substanzen mit basischen Eigenschaften enthalten.

2.2.2.2. Densitometrie

Unter Densitometrie versteht man ein photometrisches Verfahren, das zur Detektion, Identifikation und Quantifizierung von auf dünnschichtchromatographischen Platten getrennten Substanzen eingesetzt wird. Dabei bedient man sich eines sog. TLC-Scanners.
Der densitometrischen Detektion liegen verschiedene Messprinzipien zu Grunde, von denen allerdings nur die Remission und die Fluoreszenz breite Anwendung finden.
Wird ein Lichtstrahl des TLC-Scanners auf eine Bande einer lichtabsorbierenden Substanz gerichtet, so wird das Licht teils absorbiert und teils diffus reflektiert. Bei der diffusen Reflexion spricht man von einer Remission. Gemessen wird der Anteil des Lichtes, der von der Platte zurückgestrahlt wird (Remission). Zur Beschreibung des quantitativen Zusammenhangs zwischen der Substanzkonzentration auf der TLC-Platte und der Lichtwirkung wird üblicherweise die Kubelka-Munk-Funktion herangezogen, die im Folgenden aufgeführt ist:

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

Die in der Gleichung aufgeführten Parameter sind:

$F(R_\infty)$	Remission einer unendlich dicken Schicht
K	Absorptionskoeffizient
S	Streukoeffizient (von der Korngröße abhängig)
k	Proportionalitätsfaktor
c	Konzentration der Substanz in der getrennten Bande
ε	Molarer Absorptionskoeffizient der farbigen getrennten Substanzbande

Eine lineare oder annähernd lineare Beziehung zwischen der Substanzkonzentration und der Intensität der Remission setzt eine unendliche Schichtdicke (2-3 mm) und eine

einheitliche Korngrößenverteilung voraus (43). Auf Grund der Tatsache, dass in der Dünnschichtchromatographie die Voraussetzungen für die Kubelka-Munk-Funktion jedoch nicht oder nur teilweise erfüllt sind, werden bei Kalibrierkurven häufig nichtlineare Funktionen (z.B. Sättigungsfunktionen) benutzt.

Die Fluoreszenzmessung erfolgt nach dem selben Prinzip wie bei der Remission, mit dem Unterschied, dass zwischen der Platte und dem Detektor ein Filter eingebaut ist, der nur das emittierte Fluoreszenz-, nicht aber das Anregungslicht durchlässt. Dadurch wird eine hohe Empfindlichkeit und für manche Stoffe eine hohe Spezifität erzielt.

Der prinzipielle Aufbau eines Densitometers besteht aus einer Lichtquelle, einem Monochromator, einem Spiegel sowie einem Plattentisch (139). Als Lichtquelle dienen drei Lampen: eine Deuterium-, eine Wolfram- und eine Quecksilberlampe. Während die Deuterium- und die Wolframlampe als Kontinuumstrahler gelten und den UV/Vis-Bereich abdecken, zeigt die Quecksilberlampe charakteristische Linien bei 254, 311 und 365 nm und wird auf Grund der hohen Lichtintensität bei Fluoreszenzmessungen eingesetzt. Der Monochromator dient dazu, die gewünschte Wellenlänge herauszufiltern. Der auf den Spiegel gelangende Lichtstrahl wird in Form eines in seiner Höhe und Breite einstellbaren Spaltes auf die Platte gelenkt, die auf einem in allen Richtungen beweglichen Tablett liegt. Beim Scannen wird nicht der Lichtstrahl, sondern das Tablett bewegt, wobei die Bewegung in die Entwicklungsrichtung erfolgt. Das von der Platte reflektierte Licht wird von einem Photomultiplier erfasst, wobei eine computergesteuerte Kontrolleinheit die Registrierung und die Integration der Daten übernimmt. Die detektierten Substanzbanden oder Flecken werden in Form von Peaks gespeichert. Die Quantifizierung kann auf der Basis der Peakflächen oder der Peakhöhen erfolgen.

2.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie [HPLC]

Unter dem Begriff HPLC versteht man die hochauflösende Flüssigchromatographie mit einer hohen Trennleistung (bis ca. 15000 theoretische Böden). Dabei besteht die stationäre Phase aus porösem homogen verteiltem Material, das meist in einer druckfesten Stahlsäule untergebracht ist, durch die eine mobile Phase mit hohem und konstantem Druck gepumpt wird (78). Als Packungsmaterialien der stationären Phase dienen hauptsächlich Kieselgel und seine Derivatisierungsprodukte, wobei gleichmäßige sphärische Partikel

(typischerweise 1,5-10µm) mit Porendurchmessern zwischen 6 und 400 nm verwendet werden (144).

Unterschieden wird zwischen der Normalphasen-HPLC (engl. Normal Phase, NP) und der Umkehrphasen-HPLC (engl. Reversed Phase, RP). Bei der Umkehrphasen-HPLC werden eine unpolare stationäre Phase aus mit organischen Resten derivatisiertem Kieselgel (u.a. Dimethyl-, Butyl-, Octyl- (RP-8) oder Octadecyl- (RP-18)) und eine polare mobile Phase (meist Acetonitril, Methanol und Wasser) angewandt. Die Normalphasen-HPLC zeichnet sich hingegen durch eine polare stationäre Phase (Kieselgel, Amino- oder Diolphasen) sowie eine vorwiegend unpolare mobile Phase (z.B. Chloroform, Hexan) aus.

Obwohl die meisten Trennungen mit Hilfe der mittlerweile in der Bioanalytik eine zentrale Rolle spielende Umkehrphasen-HPLC bewältigt werden, gewinnt die Normalphasen-HPLC insbesondere bei der Lipidanalytik wieder an Bedeutung. Mit der Normalphasen-HPLC können nämlich mehrere Lipidklassen nebeneinander im selben Lauf getrennt werden (24).

Die Entwicklung von neuen HPLC-Methoden basiert in erster Linie auf der Wahl der geeigneten stationären Phase sowie auf der Zusammensetzung der mobilen Phase. Die Elutionskraft stellt den wichtigsten Faktor dar, der der Optimierung der mobilen Phase zu Grunde liegt. Die Lösungsmittel können in sog. eluotropen Reihen angeordnet werden, die für die unterschiedlichen Packungsmaterialien verschieden sind und in erster Linie von der Polarität abhängen (42, 78). Für Kieselgel nimmt die Elutionskraft in der Reihenfolge Octan < Hexan < Chloroform < Diethylether < Propanol < Ethanol < Methanol < Essigsäure < Wasser zu.

Bei analytischen Trennungen wird nach Möglichkeit versucht, dass die mobile Phase über die gesamte Trennzeit eine konstante Zusammensetzung aufweist, wobei hier von einer isokratischen Elution gesprochen wird. Stellen die Analyten hingegen ein komplexes Gemisch dar, dann ist in vielen Fällen eine Gradientenelution unerlässlich, bei der die Zusammensetzung der mobilen Phase sich in der Weise ändert, dass die Elutionskraft im Laufe der Trennzeit zunimmt. Da die meisten Lipide der konventionellen UV/Vis-Detektion nicht zugänglich sind, kommen als Alternativen ein ELS-Detektor oder die LC/MS in Frage.

2.2.3 Massenspektrometrie [MS]

Die Massenspektrometrie (MS) ist ein analytisches Verfahren, mit dem die molekularen Massen von freien Ionen im Hochvakuum (32), genauer gesagt die Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z), bestimmt werden. Es handelt sich zunächst also um eine qualitative Methode. Akkurate Massenbestimmung und das Isotopenmuster geben Aufschluss über die Elementarzusammensetzung. Durch die Erzeugung von Fragmentionen sind Strukturinformationen zugänglich. Quantitative Untersuchungen sind unter Bezug auf Standards möglich, insbesondere wenn die MS als Detektor in einem chromatographischen Verfahren eingesetzt wird. Das Aufgabengebiet der Massenspektrometrie in der Analytik ist somit sehr breit gefächert und beinhaltet die Identifizierung, die Charakterisierung sowie die Quantifizierung von Stoffen oder Stoffgemischen.
Der prinzipielle Aufbau jedes Massenspektrometers besteht aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, einem Detektor sowie Einheiten zur Ionenoptik. In der Ionenquelle werden neutrale Moleküle, die in gasförmiger, flüssiger oder fester Phase vorliegen können, in einen Strahl gasförmiger Ionen übergeführt. Die Auftrennung der erzeugten Ionen entsprechend ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen (m/z) erfolgt im Massenanalysator. Im Detektor findet sodann die Erfassung der Ionen statt, deren relativen Häufigkeiten von einer Registrierungsvorrichtung aufgezeichnet werden. Die Ionenoptikeinheiten dienen zur Fokussierung der gebildeten Ionen.

2.2.3.1 Ionisationstechniken

Historisch gesehen wurden zunächst die mittlerweile klassischen Ionisationstechniken Elektronenstoß (Electron Impact, EI) und Chemische Ionisation (CI) entwickelt, bei denen der Analyt in der Gasphase vorliegen muss, was technisch am ehesten kompatibel zu dem erforderlichen Vakuum im Massenanalysator ist. Diese Techniken werden v.a. in der GC/MS-Kopplung eingesetzt. Als anspruchsvoller erwies sich die Ionisation aus flüssiger Phase, da hier das Lösungsmittel entfernt werden muss, um das Vakuum aufrechtzuerhalten. Einige zu diesem Zwecke entwickelte Techniken werden heute kaum noch eingesetzt, etwa Thermospray, (Continuous Flow) Fast Atom Bombardment oder Particle Beam-EI. Der Durchbruch kam mit der Entwicklung der Elektrospray-Ionisation und der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI), die beide für die Analytik

mittels LC/MS von besonderer Bedeutung sind (16, 88). Eine schonende Ionisation aus fester Phase ist möglich mittels Matrixunterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI).
ESI und APCI zeichnen sich dadurch aus, dass die Ionisation unter Atmosphärendruck erfolgt. Auf Grund der daraus resultierenden einfachen Handhabung sowie der Möglichkeit zur Kopplung an die LC fanden sie eine breite Anwendung. Im Folgenden sollen nur die für die LC/MS bedeutenden Ionisationsverfahren ESI und APCI ausführlicher behandelt werden.
Beim Elektrospray (ESI) wird die Lösung mit Hilfe von Hochspannung (typischerweise ± 1-5 kV) versprüht. Meist wird zusätzlich ein koaxialer Stickstoffstrom als Trocknungsgas eingesetzt, insbesondere bei höheren Flussraten, wie sie bei LC/MS auftreten. Dabei handelt es sich streng genommen um pneumatisch unterstütztes Elektrospray. Es entstehen nun kleine geladene Tröpfchen, die im Fluge durch die Trocknung kleiner werden, bis es durch die Abstoßungskräfte der gleichnamigen Ladungen zu Coulomb-Explosionen kommt (77). Dieser Prozess wiederholt sich, bis schließlich freie Ionen vorliegen. Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Ladung der Tröpfchen, (Q) der Oberflächenspannung (σ), dem Radius (r) sowie der Dielektrizitätskonstante im Vakuum (ε_0) dient die Rayleigh-Gleichung:

$$Q^2 = 64\pi^2.\varepsilon_0.\sigma.r^3$$

Der genaue Mechanismus der Ionenbildung ist Gegenstand kontroverser Diskussionen (77). Während das Modell der Ionenemission (Ion Evaporation Model, IEM) die Freisetzung von Ionen schon aus größeren hochgradig geladenen Tröpfchen (∅ 10 nm) beschreibt, geht das Model des geladenen Rückstands (Charged Residue Model, CRM) von der Bildung minimaler Tröpfchen (∅ 1nm) aus, die jeweils ausschließlich ein Analytion enthalten. Ungeachtet des Bildungsmechanismus entstehen abschließend Pseudomolekülionen, die auch als Quasimolekülionen bekannt sind.
In Abhängigkeit von der Polarität der Spannung werden durch Anlagerung von Protonen positive $[M+H]^+$ und durch Abspaltung von Protonen negative Pseudomolekülionen $[M-H]^-$ gebildet. Für ESI ist des Weiteren die Bildung von Anlagerungsprodukten (Addukten), vorwiegend mit ubiquitär vorkommenden Ionen, charakteristisch. Im Positivmodus kommen Natriumaddukte am häufigsten vor und zeigen oft höhere Intensitäten als die

entsprechenden Protonenaddukte. Im Negativmodus stellen Chloridaddukte die häufigste Variante dar. Da die Adduktbildung nicht nur von der Konzentration der Analytlösung sondern auch von der Einstellung bestimmter Geräteparameter abhängt, lässt sie sich teilweise kontrollieren.

Bei der chemischen Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) besteht die Ionisationseinheit hauptsächlich aus einer Kapillare, einem beheizbaren Evaporationsrohr, das den Auslass der Kapillare konzentrisch umgibt, einer Sprühgas- und einer Trocknungsgaszufuhr sowie einer nadelartigen Elektrode (Coronanadel) (16). Gelangt die Analytlösung zur Kapillare, dann wird sie am Ausgang der Kapillare mit Hilfe des Sprühgases zerstäubt. Durch die 400-500°C hohe Temperatur sowie die Unterstützung des Trocknungsgases werden die Lösungsmittelmoleküle im Evaporationsrohr verdampft. Die Coronanadel liefert die für den Ionisationsprozess notwendige Spannung (1-5 kV). Der genaue Mechanismus mit Hilfe dessen die Ladungen auf die Analytmoleküle übertragen werden, ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Man geht allerdings davon aus, dass die durch die Coronanadel erzeugten Ladungen mit Hilfe von Stickstoffmolekülen erst auf Wassercluster übertragen und danach von den Analytmoleküle übernommen werden (16, 17, 68). Die entsprechenden Gleichungen, die zur Ionisation der Wassercluster führen sind im Folgenden aufgeführt:

$$N_2 + e \rightarrow N_2^+ + 2e \quad [1]$$

$$N_2^+ + 2N_2 \rightarrow N_4^+ + N_2 \quad [2]$$

$$N_4^+ + H_2O \rightarrow H_2O^+ + 2\,N_2 \quad [3]$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH\cdot \quad [4]$$

$$H_3O^+ + H_2O + N_2 \rightarrow H^+(H_2O_2) + N_2 \quad [5]$$

$$H^+(H_2O)_{n-1} + H_2O + N_2 \rightarrow H^+(H_2O)_n + N_2 \quad [6]$$

Es handelt sich also um eine indirekte Ionisation, wie aus **Abbildung 5** hervorgeht. Das Endresultat ist wie bei ESI die Entstehung von Pseudomolekülionen, wobei hier die Adduktbildung nicht ausgeprägt ist. Die gebildeten Ionen werden dann in ein sog. Interface überführt. Danach gelangen sie in die Ionenoptik, die z.B. Skimmer, Linsen, Hexa- oder Octapole umfassen kann, wo sie fokussiert und zum Analysator transportiert werden.

Das Interface stellt einen Übergang zwischen dem Atmosphärendruck- und dem Hochvakuumsystem dar. Als Interface dient bei dem im Rahmen dieser Arbeit

angewandten LCQ eine beheizbare Stahlkapillare. Dabei muss die Einlassöffnung einerseits groß genug sein, um ausreichend Analytmoleküle hineinzulassen, andererseits darf sie nicht zu groß sein, dass das erforderliche Vakuum aufrechterhalten werden kann. Durch die hohe Temperatur dieser Heizkapillare wird gewährleistet, dass eventuell vorhandene Lösungsmittelreste vollständig verdampft werden können.

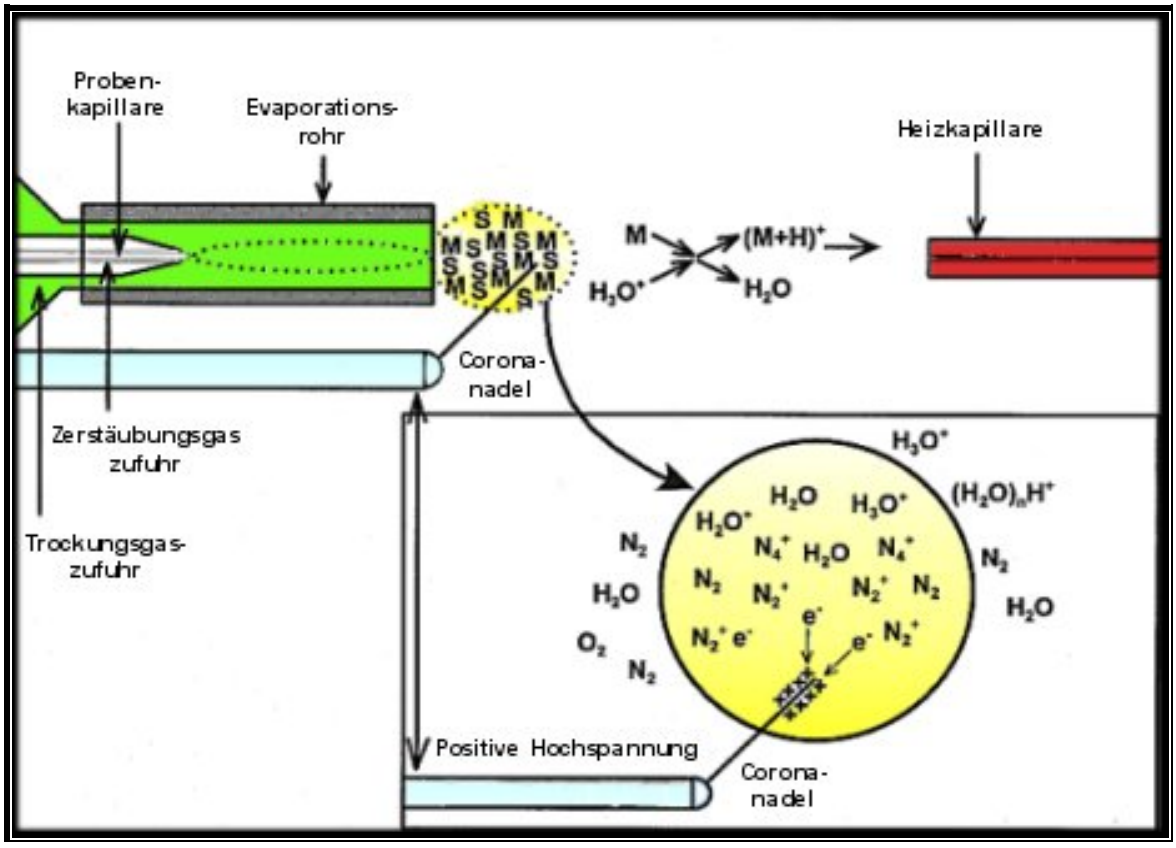

Abbildung 5: Die Ionisation bei APCI; S:Solvent; M: Molekül, mod. nach (16)

Sowohl APCI als auch ESI weisen die gemeinsame Eigenschaft auf, dass sie als sanfte Ionisationstechniken gelten, wobei die Bedingungen bei APCI etwas harscher sind (16). Es existieren zwischen den beiden Verfahren allerdings auch Unterschiede (88). Bei APCI sind Verdampfung des Lösungsmittels und Ionisation der Analytmoleküle zwei separate Schritte. Dies erlaubt bei APCI den Einsatz von lipophilen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform und Hexan), die üblicherweise in Normalphasentrennungen ihre Anwendung finden und bei ESI zu schlechter Ionisation führen. Zudem zeigt APCI im Falle einer LC/MS-Kopplung optimale Performance bei relativ hohen (1 ml/min), ESI hingegen bei niedrigen Flussraten. Unter Berücksichtigung der obigen Ausführungen können beide

Verfahren hinsichtlich der Analytik von Lipiden als komplementär zueinander betrachtet werden. Während sich ESI zur Untersuchung von relativ polaren Substanzen wie Phospholipiden und Glucosylceramiden eignet, stellt APCI die zweckmäßigere Variante bei wenig polaren Substanzen wie Triacylglycerolen, Cholesterylestern und langkettigen Ceramiden dar.

2.2.3.2 Analysatoren

Massenanalysatoren dienen dazu, die in der Ionisationsquelle erzeugten Pseudmolekülionen entsprechend ihrer Masse/Ladungs-Verhältnisse aufzutrennen. Dazu nutzen die verschiedenen Typen von Massenanalysatoren elektrische, magnetische und kinetische Kräfte oder eine Kombination daraus, wobei die Auftrennung im Hochvakuum verläuft.
Obgleich alle Analysatoren dieselbe Aufgabe erfüllen, unterscheiden sie sich in den technischen Ausführungen, die jeweils sowohl Vorteile als auch Limitationen aufweisen (3, 89). Kriterien wie Massengenauigkeit, einfache Handhabung und nicht zuletzt Kosten lassen für den Anwender bestimmen, welcher der Analysatoren einzusetzen ist.
Das Messprinzip von Flugzeit-Massenspektrometern (Time-of-Flight, TOF) beruht darauf, dass durch Anlegen einer Beschleunigungsspannung die gebildeten Pseudomolekülionen die gleiche kinetische Energie beim Eintreten in ein feldfreies Flugrohr aufweisen. Dem entsprechend hängt die Geschwindigkeit der Ionen von deren Massen ab, wobei als Messgröße die Zeit fungiert, die erforderlich ist, damit eine festgelegte Flugstrecke von den jeweiligen Ionen zurückgelegt wird. Zum Ausgleich von Unschärfeeffekten, die beim Start der Ionen auftreten, werden Reflektoren eingesetzt. Mit TOF-Massenspektrometern werden vergleichsweise hohe Auflösungen erzielt. MS/MS-Experimente lassen sich hier allerdings nicht durchführen, außer wenn eine Hybridkonfiguration vorliegt.
Bei Sektorfeld-Massenspektrometern und Fourier-Transformations-Ionenzyklotron-Resonanz-Massenspektrometern (magnetischen Ionenfallen) erfolgt die Massentrennung durch die Ablenkung der Ionen in Magnetfeldern. Die beiden Techniken zeichnen sich durch höchste Massengenauigkeit und Auflösung, sehr hohen Empfindlichkeiten sowie die Möglichkeit zu Tandem-MS aus. Nachteilig ist der hohe Platzbedarf, die teils umständliche Handhabung sowie v.a. der hohe Anschaffungspreis.
Im Quadrupol-Massenspektrometer erfolgt die Ionentrennung mittels elektrischer Felder. Dabei durchfliegen die gebildeten Ionen eine Anordnung von vier parallel verlaufenden

zylinderförmigen Metallstäben (Elektroden), an denen sowohl eine Gleich- als auch eine Wechselspannung angelegt sind. In dieser Anordnung weisen gegenüberliegende Elektroden die gleiche Polarität der Gleichspannung sowie die gleiche Phase der Wechselspannung auf. Bei konstanter Frequenz wird durch das Verhältnis zwischen der Gleich- und Wechselspannung bestimmt, welche Ionen das Stabsystem passieren können. Besitzen die Ionen nicht die richtige Masse, dann werden sie in der Weise beschleunigt, dass sie mit den Metallstäben kollidieren und somit nicht zum Detektor gelangen. Quadrupol-Massenspektrometer stellen somit Massenfilter dar und verfügen über den Vorteil, dass sie einfach bedienbar und relativ preiswert sind.

Das Prinzip der Ionenfallen-Massenspektrometer (Ion Trap) beruht darauf, die Ionen in einem geschlossenen elektrischen Quadrupolfeld zu akkumulieren, sie anschließend mittels Spannungsänderungen herauszuschleudern und somit entsprechend deren Masse/Ladungs-Verhältnissen aufzutrennen. In diesem Zusammenhang wird unter Ionenfalle diejenige nach Paul verstanden.

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Ionenfalle (Quadrupol Ion Trap nach Paul) **(Abbildung 6)** besteht aus einer Ringelektrode sowie zwei Endkappenelektroden, die mit zwei zentrischen Öffnungen zum Einlass und Auslass der Ionen versehen sind. Das Innere der Ionenfalle ist mit Helium gefüllt, das als Dämpfungsgas dazu dient, die Ionen im Zentrum der Falle zu fokussieren, gleichzeitig aber als Kollisionsgas für Fragmentierungsexperimente (s.u.) benutzt werden kann. An der Ringelektrode wird eine RF-Spannung (radio frequency), also eine Wechselspannung angelegt, mit der ein oszillierendes elektrisches Feld erzeugt wird. Dadurch werden die Ionen auf stabilen durch die sog. „Mathieuschen Stabilitätsdiagramme“ beschriebenen Umlaufbahnen gehalten (32) und nehmen dabei oszillierende Frequenzen an, die ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen entsprechen. Soll nun ein Massenbereich gescannt werden, dann werden die aus der Ionenquelle austretenden Ionen für eine gewisse Zeit (ca. 20 ms) akkumuliert. Die Amplitude der Spannung an der Ringelektrode wird sodann erhöht. Gleichzeitig wird an den Endkappenelektroden eine geringfügige RF-Spannung angelegt. Auf Grund der auftretenden Spannungsänderung wird die Frequenz der Ionenoszillation und somit deren Stabilität auf den Umlaufbahnen beeinflusst. Entspricht nun die Schwingungsfrequenz an den Endkappenelektroden der Resonanzfrequenz eines Molekülions, so wird dieses angeregt und in Abhängigkeit seines Masse/Ladungs-Verhältnisses aus der Ionenfalle ausgeworfen.

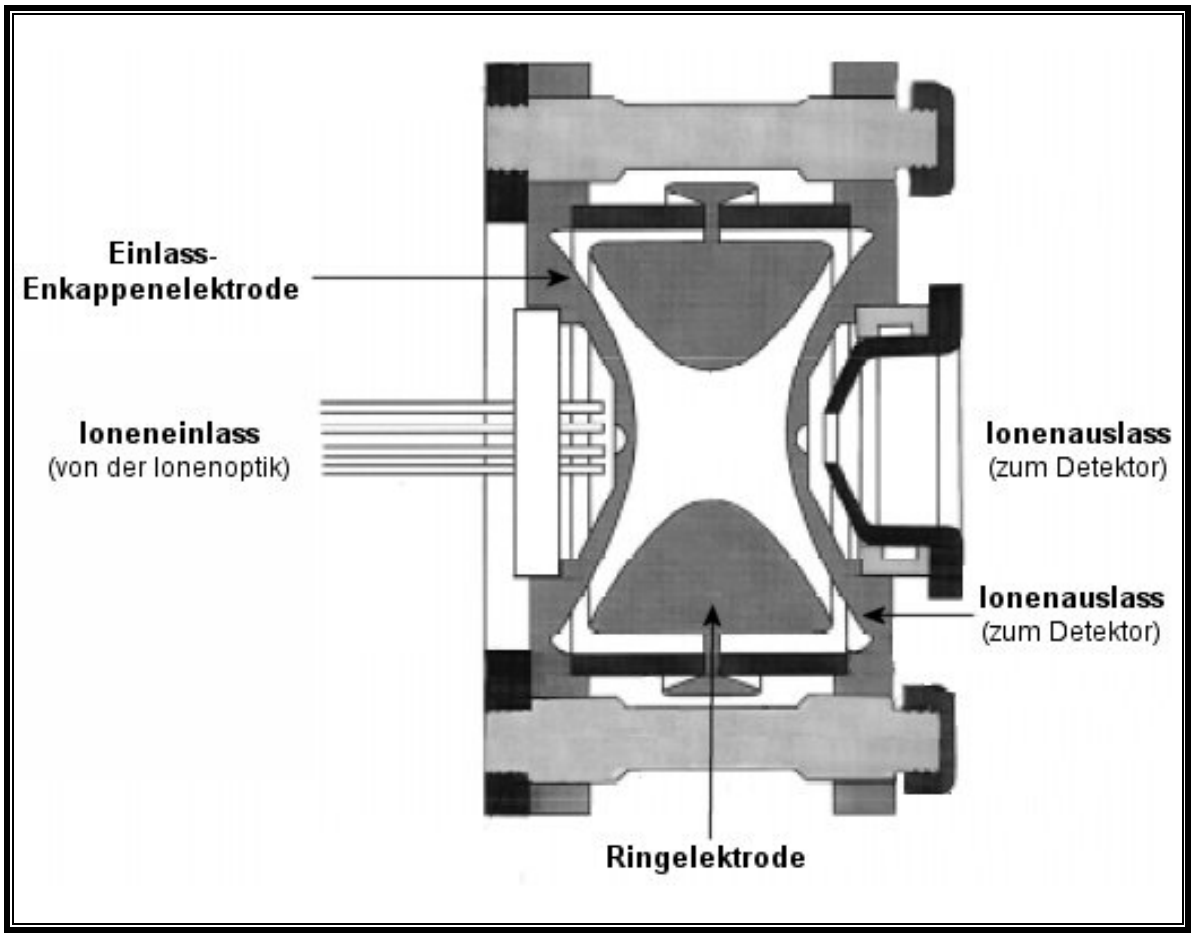

Abbildung 6: Die Ionenfalle

Das Eintreten der Ionen, deren Aufenthalt in der Ionenfalle sowie deren Austritt daraus ist ein pulsartiger Vorgang, der zwischen 50 und 100 ms andauert.

Zur Erfassung der Ionen existieren mehrere Modi. Im Full-Scan-Modus werden größere Massenbereiche abgetastet. Im sog. SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) wird hingegen nur ein bzw. wenige bestimmte Ionen selektiv in der Ionenfalle akkumuliert, während andere Ionen ausgeworfen werden. Dadurch wird das Signal/Rausch-Verhältnis enorm verbessert und somit eine bessere Sensitivität erzielt. Wird auf der anderen Seite eine bessere Auflösung angestrebt, dann wird das Scannen durch allmähliche Erhöhung der RF-Spannung an der Ringelektrode langsam vorgenommen, wobei hier von einem Zoom-Modus gesprochen wird. Im SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring) werden Ionen eines bestimmten Massen/Ladungs-Verhältnisses selektiert und akkumuliert. Durch Kollisionen der selektieren Ionen mit dem Dämpfungsgas kommt es zu Fragmentierungen, wobei man hier von „Source CID“ (Collision-Induced Dissociation) spricht. Anschließend werden nur bestimmte Produktionen, die von Interesse sind, gescannt und aufgezeichnet.

Dieser Modus zeichnet sich nicht nur durch seine Selektivität sondern auch durch seine hohe Empfindlichkeit aus und wird deshalb häufig bei der Spurenanalytik sowie bei Quantifizierungen eingesetzt. Zu erwähnen ist, dass mittels Ionenfallen-Massenspektrometer hohe Empfindlichkeiten (je nach Ionisierbarkeit bis ca. 1ng/ml) erreicht werden können.

Verbesserungen der Auflösung, der Massengenauigkeit oder des Massenbereiches lassen sich erzielen, indem mehrere Analysatoren kombiniert werden, wobei die Kombination zwischen einem Quadrupol- und einem Flugzeitanalysator (Q-Tof) in dieser Hinsicht immer mehr an Bedeutung gewinnt. Mit einem Tripelquadrupol können Fragmentierungen vorgenommen werden, aus denen häufig wertvolle qualitative oder quantitative Informationen erhältlich sind. Die Fragmentierungen finden hierbei in einer mit einem Inertgas gefüllten Kollisionszelle statt. Diese befindet sich zwischen zwei anderen Quadrupolen, die jeweils auf Scannen bzw. auf eine Masse fest eingestellt sein können. Von Vorteil bei dieser Anordnung ist die einfache Handhabung und die hohe Empfindlichkeit im SRM-Modus. Nachteilig ist hingegen die Beschränkung auf MS^2-Experimente.

Im Gegensatz zum Tripelquadrupol finden bei der Ionenfalle die Isolierung der Ionen, deren Fragmentierung sowie die anschließende Massenanalyse der Produktionen nicht räumlich sondern zeitlich nacheinander statt. Die Ionenfalle, die im Vergleich zum Tripelquadrupol die kostengünstigere Variante darstellt, zeichnet sich darüber hinaus durch die Fähigkeit zu mehrfachen Fragmentierungen (MS^n) aus (89).

2.2.3.3 Detektion

Wie bei vielen anderen Massenspektrometern beinhaltet das im Rahmen dieser Arbeit angewandte Massenspektrometer (LCQ, Thermo Electron, San Jose, CA, USA) einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) zur Detektion. Dabei treffen die aus dem Analysator (hier die Ionenfalle) austretenden Pseudomolekülionen auf eine Konversionsdynode und schlagen Elektronen aus ihr heraus. Durch den Aufprall dieser Elektronen auf mehrere mit höheren Spannungen versehene Dynoden resultiert ein lawinenartig wachsender Elektronenstrom, der die Messempfindlichkeit enorm steigert. Das am Ende erhaltene Signal ist proportional zu dem aus der Ionenfalle austretenden Ionenstrom und wird als TIC (Total Ion Current) bezeichnet.

2.2.3.4 LC/MS-Kopplung

Viele biologische Proben wie z.B. die Lipidextrakte des SC zeichnen sich dadurch aus, dass sie komplex zusammengesetzte Mischungen aus unterschiedlichen Stoffen oder Stoffklassen darstellen. Daraus resultiert, dass eine direkte massenspektrometrische Analyse von solchen Proben keine aufschlussreichen Resultate liefern kann. Eine vorherige Trennung oder Fraktionierung ist somit in den meisten Fällen erforderlich (88). Wird eine flüssigchromatographische Trenntechnik (z.B. HPLC) mit einem Massenspektrometer kombiniert, das hier als Detektor fungiert, dann spricht man von einer LC/MS-Kopplung (167).

Auf dem Entwicklungsweg der LC/MS zu einem Standardverfahren sowohl in der Forschung als auch in der Routineanalytik mussten mehrere technische Hindernisse bewältigt werden. Zum einen weisen die Massenspektrometer ein Hochvakuumsystem auf und zum anderen sind relativ hohe Flussraten zwischen 0,1 und 1 ml/min bei flüssigchromatographischen Trennungen und hauptsächlich bei der HPLC nicht unüblich. Eine direkte Kopplung würde naturgemäß das Hochvakuum beeinträchtigen. Zur Bewältigung dieser Problematik wurden viele Ansätze, von denen beispielhaft das Moving-Belt-, das Continuous Flow- und das Thermospray-Verfahren genannt seien, vorgenommen. Sie waren allerdings aufwendig und nicht einfach zu handhaben. Erst nach der Einführung der API-Technik (ESI und APCI) konnte der Durchbruch für die LC/MS als ein weit verbreitetes analytisches Verfahren errungen werden. Dabei werden die Lösungsmittelmoleküle durch unterstützende Stickstoffströme und/oder hohe Temperaturen verdampft und die Analytmoleküle ionisiert. Die Intensität der erhaltenen Signale ist in erster Linie von der Ionisierbarkeit des Analyten und von der Konzentration, weniger von der Flussrate abhängig.

Ein sehr beachtlicher Vorteil der LC/MS ist die hohe zweidimensionale Spezifität, die sich aus der Selektivität der chromatographischen Trennung und der Selektivität der massenspektrometrischen Detektion ergibt. Auch chromatographisch nicht getrennte Peaks können massenspektrometrisch unterschieden werden. Des Weiteren stellt die LC/MS-Kopplung eine bedeutende Möglichkeit dar, solche Substanzen online zu detektieren, die mit konventioneller UV-Detektion nicht erfasst werden können wie z.B. viele Lipide.

Neue Entwicklungen im Bereich der LC/MS verfolgen heutzutage das Ziel, die Massenspektrometer so zu optimieren, dass diese gegenüber Matrices in biologischen

Proben robuster werden. Diesbezüglich stellen Off-axis-Anordnungen wie das Orthogonal Spray oder Z-Spray weitere Entwicklungen gegenüber dem klassischen On-axis-Ansatz dar. Dadurch wird verhindert, dass nicht verdampfbare Substanzen wie z.B. Salze auskristallisieren und die Einlassöffnung verstopfen.

2.2.4 Evaporative Lichtstreudetektion [ELSD]

Bei der ELSD handelt es sich um ein nahezu universelles Detektionsverfahren für die Flüssigchromatographie (LC), das auf Grund dessen Kompatibilität mit vielen Lösungsmitteln sowie mit der Gradientenelution eine breite Anwendung bei der Lipidanalytik fand (25).

Das Prinzip der ELSD beruht auf der Lichtstreuung, die durch Analytpartikel nach Evaporisieren (Verdampfung) der Lösungsmittelbestandteile der mobilen Phase bewerkstelligt wird (172). Dabei hängt die Intensität des gestreuten Lichtes von der Menge des Analyten ab. Der Aufbau eines evaporativen Lichtstreudetektors wird im Folgenden am Beispiel des im Rahmen dieser Arbeit angewandten Sedex 55 **(Abbildung 10)** geschildert.

Der Detektor Sedex 55 besteht im Wesentlichen aus einer Verneblungsdüse, einer Verdampfungskammer, einer Detektionskammer sowie einer Auswertungseinheit. In der Verneblungsdüse wird das von der Säule kommende Eluat mit Hilfe eines Gases - meist Stickstoff - in ein Aerosol versprüht. Im Verdampfungsrohr werden die Aerosolteilchen immer kleiner, weil immer wieder Lösungsmittelmoleküle evaporisieren. Am Ende der Verdampfungskammer befindet sich eine regelbare Heizspirale zum Verdampfen restlicher Lösungsmittelmoleküle. Die dabei entstehenden kleinen Aggregate des Analyten gelangen mit Hilfe des Gasstroms zu der Detektionskammer, die eine Laserlichtquelle und einen Photomultiplier enthält. Das gestreute Licht wird von dem Photomultiplier aufgenommen, verstärkt und der Auswertungseinheit zugeführt. Zu beachten bei der ELSD ist, dass keine spektroskopische Detektion vorliegt. Dementsprechend kann das Lambert-Beer-Gesetz bei quantitativen Bestimmungen nicht herangezogen werden. Vielmehr werden nicht lineare Gleichungen angewandt (23). Zur Erzielung guter Detektionsergebnisse mit der ELSD müssen der Druck des Verneblungsgases, die Heizspiralentemperatur und die Zusammensetzung der mobilen Phase optimiert werden.

3. Experimenteller Teil

3.1 Chemikalien

Cholesterol, Cholesterol-3-sulfat, Cholesteryloleat, Palmitinsäure, Triolein, Squalen sowie Ceramid [AS] wurden bei Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Ceramid [AS], auch als Ceramid 5 bekannt, stellt ein Gemisch aus verschiedenen α-Hydroxyacylceramiden dar, die ausschließlich Sphingosin (C18:1) als langkettige Base aufweisen und aus Sphingomyelin aus Rinderhirn hergestellt werden. N-Stearoyl-phytosphingosin (Ceramid [NP] oder Ceramid 3) und N-α-Hydroxystearoyl-phytosphingosin (Ceramid [AP] oder Ceramid 6) waren Geschenke der Firma Goldschmidt (Essen, Deutschland), früher Cosmoferm (Deventer, NL). Beide Ceramide werden durch die Reaktion zwischen dem biotechnologisch hergestellten Phytosphingosin (C18:0) und C18-Fettsäurechlorid synthetisiert. Diese Herstellungsweise erklärt, weshalb Ceramid [AP] ein racemisches Gemisch ist. N-Stearoyl-sphinganin war ein Geschenk der Firma Sederma (Le Perray en Yvelines, Frankreich). Das totalsynthetisch hergestellte Produkt wird unter der Bezeichnung „Ceramid 2“ vertrieben. Nach der Nomenklatur von Motta et al. und Robson et al. würde die entsprechende Bezeichnung Cer [NS] sein. Da bei diesem Ceramid kein Sphingosin sondern ein **Di**hydrosphingosin als Sphingoidbase vorkommt, liegt hier keine genaue Bezeichnung vor. Auf Grund dessen wird es im Rahmen dieser Arbeit als Cer [N**d**S] bezeichnet. Zu beachten ist, dass dieses Ceramid ähnliche Rf-Werte wie das eigentliche Ceramid [NS] zeigt.

Kupfersulfat ($CuSO_4.5H_2O$), das zur Herstellung der Lösung eingesetzt wurde, mit deren Hilfe die auf den HPTLC-Platten getrennten Lipidbanden nach Veraschung visualisiert werden konnten, war ein Produkt der Firma VEB Laborchemie (Apolda, Deutschland).

Alle angewandten Lösungsmittel waren von HPLC-Grad und wurden von etablierten Lieferanten bezogen (Baker, Deventer, Niederlande; Merck, Darmstadt, Deutschland; Riedel de Häen, Seelze, Deutschland; Grüssing, Filsum, Deutschland; Fischer Scientific, Nidderau, Deutschland). Zu erwähnen ist, dass das eingesetzte Hexan 95%ig und Essigsäure 99,5%ig waren. Darüber hinaus war das verwendete Chloroform mit 0,75%ig Ethanol stabilisiert.

3.2 Gewinnung der SC-Lipide

Zur Gewinnung der SC–Lipide wurde eine neue Methode der In-vivo-Oberflächenextraktion entwickelt und deren Einsatz von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt.
Die an der Studie teilnehmenden Probanden wurden hinsichtlich des Zweckes und der Durchführung der Studie ausführlich aufgeklärt. Von jedem Probanden liegt eine unterschriebene Einverständniserklärung vor. Die Probanden (14 Frauen und 6 Männer: 7 gesunde Personen, 7 Neurodermitis- und 6 Psoriasis-Patienten, Durchschnittsalter: 40 ± 13 Jahre) wurden von einem erfahrenen Facharzt untersucht und nach strengen Kriterien ausgewählt. Die ausgesuchten Neurodermitis-Patienten wiesen Werte > 15 Punkte auf dem Eczema Area and Severity Index (EASI) (62) auf. Zur Beurteilung des Schweregrades bei den Psoriasis-Patienten galt der PASI (Psoriasis Area and Severity Index) (52). Nur Patienten mit Werten > 20 Punkten wurden in die Studie aufgenommen. 4 Wochen vor Studienbeginn wurde allen Teilnehmer untersagt, dass sie topische Präparate medizinischer oder kosmetischer Natur applizieren. Die Applikation von systematisch wirkenden Arzneimitteln wurde 8 Wochen vor Studienbeginn gestoppt.
Bei der Methode der In-vivo-Oberflächenextraktion wurde ein zylindrischer mit 10 ml einer Hexan/Ethanol-Mischung (2:1, V/V) gefüllter Glasbehälter (ID: 4 cm, Extraktionsfläche 12,56 cm^2) verwendet. Mit Hilfe der in **Abbildung 7** gezeigten eigens konstruierten Vorrichtung wurde der Behälter an die zu extrahierende Stelle am Unterarm angebracht und fixiert. Anschließend wurde der Arm umgedreht, sodass die Lösungsmittelmischung die Hautoberfläche berühren konnte. Die Extraktionszeit wurde auf 5 min festgelegt, wobei während der Extraktion die Mischung durch kreisende Bewegung des Arms gerührt wurde.
An dieser Stelle ist es ausdrücklich zu erwähnen, dass die Extraktionen bei den Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten ausschließlich an den nicht betroffenen in der Krankheit nicht involvierten und nicht läsionierten Arealen stattfand. Die Extraktion wurde 2-mal für jeden Arm an zwei benachbarten Stellen durchgeführt. Dies resultierte in 4 Extrakten für jeden Probanden. Die von einem Probanden erhaltenen Extrakte wurden gepoolt. Die Lösungsmittel wurden sodann unter Stickstoffbegasung bei 50°C evaporisiert und nach Trocknung bei -80 °C aufbewahrt. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Extrakte abgetaut und die Lipide von den Proteinen und den anderen hydrophilen Bestandteilen mittels einer Methanol-Chloroform-Fällung nach Signurelli und Hannun befreit (140).

Anderenfalls könnten diese unerwünschten Stoffe sich in der HPLC-Säule bei der Trennung der Ceramide akkumulieren und die Trennung beeinträchtigen.

Abbildung 7: Das Extraktionsgerät

Das Prinzip der Proteinfällung liegt in der Änderung des Hydrophilie-Lipophilie-Verhältnisses durch Variation der Lösungsmittelzusammensetzung. Werden die trockenen Lipidextrakte nämlich mit einer Mischung aus Chloroform, Methanol und Wasser in einem Verhältnis von 1:2:0,8 (V/VV) versetzt und im Vortexer gemischt, dann wird eine homogene einphasige Lösung erhalten. Durch Veränderung des Verhältnisses zu 2:2:1,8 (V/V/V) und anschließende Zentrifugation entsteht ein zweiphasiges System, wobei die Proteine an der Grenzschicht als dünner weißer Niederschlag ausfallen. Die obere wässrig-methanolische Phase mit den hydrophilen Substanzen wird verworfen. Die untere chloroformhaltige Phase enthält die Lipide und wird deshalb aufbewahrt und für die weitere Analytik angewandt.

3.3 Trennung der SC-Lipide mittels AMD-HPTLC und deren densitometrische Quantifizierung

3.3.1 Probenauftragung

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten TLC-Platten waren Silica-HPTLC-Platten (Kieselgel 60 F_{245}, 20x10 cm) und wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.
Vor Gebrauch wurden die HPTLC-Platten dreimal mit einer Mischung aus Chloroform/Methanol (65:35, V/V) gewaschen. Dadurch konnten die auf den Platten sich befindenden Kontaminationen beseitigt werden, was eine gute Trennung und eine bessere Detektion ermöglichte. Mit einer Applikationsgeschwindigkeit von 100 µl/s wurden auf jede Platte 16 Proben mittels automatischem TLC Sampler 4 (CAMAG, Muttenz, Schweiz) in Form von 8 mm breiten Banden aufgesprüht. Die Entfernung der Banden vom unteren Plattenrand betrug 8 mm und 16 mm vom linken Plattenrand. Die Distanz zwischen den benachbarten Banden war 10,6 mm.
Das Auftragegerät wurde von der Software winCats 1.2.5. gesteuert. Jede der Lipidextraktproben wurde zweifach appliziert. Zwecks Quantifizierung wurde auf jede Platte eine Standardlösung von den Referenzlipiden in 8 unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen.

3.3.2 Automatische Mehrfachentwicklung

Die Entwicklung der Platten erfolgte vollautomatisch mit Hilfe des in **Abbildung 8** dargestellten AMD-2-Gerätes (CAMAG, Muttenz, Schweiz).
Die verwendeten Lösungsmittel waren Ethanol, Chloroform, Aceton, Ethylacetat und n-Hexan, aus denen Mischungen hergestellt wurden, die in einen Gradienten mündeten. Der Gradient beinhaltete 17 Entwicklungsschritte und erstreckte sich über eine Laufstrecke von 65 mm. Die genaue Zusammensetzung der Mischungen sowie die entsprechenden Laufstrecken sind in **Tabelle 3** dargestellt. Vor Beginn eines neuen Entwicklungsschrittes wurde die mobile Phase vom vorherigen Entwicklungsschritt abgesaugt, die Platten für jeweils 1,5 min unter Vakuum getrocknet und anschließend konditioniert. Die Konditionierung erfolgte mit Hilfe eines mit 4 N Essigsäure gesättigten Luftstroms. Die Zeit der gesamten Entwicklung betrug jeweils 150 min.

Abbildung 8: Die HPTLC-Einheit; von links nach rechts: AMD 2, TLC-Sampler 4, TLC-Scanner 3, alle computergesteuert

Tabelle 3: Der AMD-Gradient

Schritt Nr.	Ethanol %	Chloroform %	Aceton %	Ethylacetat %	Hexan %	Laufstrecke mm
1	11	85	4	0	0	11
2	10	86	4	0	0	14
3	9	87	4	0	0	17
4	8	88	4	0	0	20
5	7	89	4	0	0	23
6	6	90	4	0	0	26
7	5	91	4	0	0	29
8	4	92	4	0	0	32
9	3	93	4	0	0	35
10	2	94	4	0	0	38
11	1	95	0	0	0	41
12	0	100	0	0	0	44
13	0	100	0	0	0	47
14	0	100	0	0	0	51
15	0	0	0	30	70	56
16	0	0	0	15	85	62
17	0	0	0	0	100	68

3.3.3 Visualisierung und densitometrische Detektion

Nach beendeter Entwicklung wurden die Platten zunächst getrocknet. Anschließend wurden sie in eine Kupfersulfatlösung (10% $CuSO_4$, 8% H_3PO_4, 5% Methanol) 2-mal für jeweils 10 Sekunden eingetaucht und in einen auf 160°C temperierten Trockenschrank für 30 min gestellt. Dadurch wurden die getrennten Lipide visualisiert und erschienen als scharfe braune Banden. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des Densitometers TLC-Scanner 3 (CAMAG, Muttenz, Schweiz). Gescannt wurden die Bahnen im Bereich zwischen der Lauffront und 7 mm vom unteren Plattenrand. Die Messungen wurden im Reflektionsmodus bei einer Wellenlänge von 546 nm, einer Scangeschwindigkeit von 20 mm/s, Lichtstrahldimensionen von 4 x 0,2 mm und einer Datenauflösung von 100 µm pro Scanschritt durchgeführt. Die Darstellung der Trennung erfolgte anhand eines Densitogramms, bei dem die getrennten Banden als Peaks in Abhängigkeit von den zurückgelegten Laufstrecken dargestellt erscheinen. Die Peakintegration und die darauf basierende Quantifizierung erfolgten mit Hilfe der winCATS-Software. Zur Bestimmung der Lipidmengen in den Hautproben wurden individuelle Standardkurven der einzelnen Referenzlipide herangezogen. Bei den Ceramiden wurden die quantitativen Bestimmungen auf Referenzceramid [NP] bezogen.

3.4 Trennung der SC-Ceramide mittels Normalphasen-HPLC und deren Detektion mit Hilfe der APCI-MS und HPLC-ELSD

3.4.1 HPLC

Bei allen Normalphasentrennungen der SC-Ceramide mittels HPLC wurde eine LichroCart-Säule 125-4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) angewandt. Die Säule war mit Lichrospher-Partikeln (5µm) aus Kieselgel (Si 60) als stationäre Phase gefüllt. Die Elution erfolgte nicht isokratisch sondern, nach dem in **Tabelle 4** dargestellten Gradienten. Die mobile Phase bestand aus den Komponenten A und B, wobei A: Chloroform und B: Chloroform, n-Propanol, Essigsäure (80:20:2, V/V/V) waren. Die Flussrate wurde auf 1ml/min festgesetzt.

Tabelle 4: Der Gradient der Normalphasen-HPLC-Methode

Zeit	A %	B %
0	100	0
15	0	100
20	0	100
22	100	0
27	100	0

3.4.2 HPLC/APCI-MS

Bei den HPLC/APCI-MS-Experimenten bestand das HPLC-System aus einer Pumpe Spectra System P4000, einem Probensammler AS 3000, einem Steuermodul SN 4000 (alle von der Firma Thermo Electron, San Jose, CA, USA) sowie der unter dem Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Säule. Das am HPLC-System gekoppelte Massenspektrometer war ein mit einem APCI-Kopf ausgestattetes Ionenfallen-Massenspektrometer LCQ Classic (Thermo Electron, San Jose, CA, USA) **(Abbildung 9)**. Die Temperaturen des Evaporationsrohrs (APCI-Heizer) und der beheizten Kapillare betrugen 500°C und 150°C. Als Sprüh- und Trocknungsgas wurde Stickstoff angewandt. Die Strömungsgeschwindigkeiten beider Gase waren 9 und 12 L/min. Die Steuerung der chromatographischen und der massenspektrometrischen Trennungen sowie die Aufnahme der Spektren wurden durch die Software Xcalibur der Version 1.0.0.1 vorgenommen. Bei den Hautproben wurde die Soft-

Abbildung 9: Das HPLC/APCI-MS-Gerät

-ware so programmiert, dass der Fluss in den APCI-Kopf nur während der Zeit gelangt, in der die Ceramide eluierten. Dadurch wurde die Kontamination des Spektrometers mit anderen irrelevanten Lipiden verhindert. Die Gesamtmenge der applizierten Ceramide bei den Probandenproben betrug in jedem MS-Experiment 5µg.

3.4.3 HPLC/ELSD

Das HPLC/ELSD-System wurde angewandt, um die Normalphasentrennung der SC-Ceramide mittels HPLC zu entwickeln. Das HPLC-System bestand hier aus einer Pumpe PU 980, einer quartären Gradienteneinheit LG 1580-02 (beide von Jasco, Tokio, Japan) sowie der unter 3.4.1 genannten Säule. Der am HPLC-System angeschossene ELS-Detektor war ein Detektor des Typs Sedex 55 (SEDERE, Alfortville, Frankreich). Die Probenapplikation erfolgte manuell mit Hilfe eines Rheodyne-Ventiles (Bensheim, Deutschland). Die Versuchsbedingungen waren 80°C für die Verdampfungstemperatur und 1,9 bar für das Verneblungsgas. Als Verneblungsgas wurde Stickstoff der Reinheitsstufe 4.0 eingesetzt. Der Verstärker (Gain) war auf Stufe 8 eingestellt.

Abbildung 10: Das HPLC/ELSD-Gerät

3.4.4 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der densitometrischen und der massenspektrometrischen Profile von den SC-Lipiden bzw. Ceramiden in gesunden und erkrankten Probanden wurde der t-Test nach Student mit dem Signifikantlevel $p < 0,01$ herangezogen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analytik der Hautlipide

4.1.1 Extraktionsmethode der SC-Lipide

Zur Gewinnung der SC-Lipide einschließlich der SC-Ceramide wurde eine neu entwickelte topische Extraktionsmethode eingesetzt (46), die auf der Verwendung einer verbesserten Lösungsmittelzusammensetzung basiert. Die Durchführung der Extraktion erfolgte, indem ein mit 10 ml einer n-Hexan/Ethanol-Mischung (2:1, V/V) gefüllter zylindrischer Glasbehälter für eine genau definierte Zeit gegen die zu extrahierende Hautstelle gepresst wurde (Details im Abschnitt 3.2), so dass durch den Querschnitt am Gefäßrand eine definierte Kontaktfläche gegeben war. Die Fixierung des Gefäßes erfolgte mittels einer speziellen Vorrichtung. Dadurch wurde ein fester Halt garantiert und ein laterales Entweichen der Extraktionsflüssigkeit verhindert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Innenseiten der Arme extrahiert. Zum einen weisen diese Areale relativ wenig Haare und wenig Talgdrüsen auf, was sich in geringen Kontaminationen mit Sebumlipiden and anderen Stoffen widerspiegelt. Zum anderen sind sie bei der praktischen Durchführung gut zugänglich. Bei der Auswahl der Lösungsmittel und deren Zusammensetzung wurden mehrere Kriterien herangezogen, von denen die Compliance der Probanden, insbesondere der Patienten, die Extraktionseffektivität sowie die einfache Handhabung im Vordergrund standen. Chloroform als vergleichsweise aggressives, Nekrose verursachendes Lösungsmittel wurde deshalb nicht angewandt, sondern durch n-Hexan ersetzt. Als lipophile Komponente bei Gemischen zur topischen Extraktion der SC-Lipide wurde n-Hexan von vielen Gruppen wie Bonté et al. (Hexan : Methanol, 2:3, V/V), Deffond et al. (Hexan : Methanol, 2:1, V/V), Norlén et al. (Hexan : Isopropanol, 3:2, V/V) und Bleck et al. (Hexan : Ethanol, 95:5, V/V), verwendet (6, 8, 22, 108). Literaturangaben zufolge ist die Mischung von Deffond et al. die effektivste hinsichtlich der Ausbeute der extrahierten SC-Ceramide (156). Nach eigenen Untersuchungen ist sie wegen der schlechten Mischbarkeit der beider Komponenten jedoch ungeeignet. Aus diesem Grund wurde im bei der vorliegenden Arbeit angewandten Extraktionsgemisch Methanol durch Ethanol ersetzt. Als völlig ungeeignet in der Handhabung erwies sich die Mischung (Aceton : Diethylether, 1:1,

V/V) von Lavrijsen et al. (86). Wegen der leichten Flüchtigkeit und des hohen Dampfdrucks des Diethylethers konnte das Entweichen von Extraktionsflüssigkeit selbst bei hoher Anpresskraft kaum verhindert werden, so dass das Volumen der Extraktionsflüssigkeit unkontrollierbar abnahm, was zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führte.

Neben der topischen Extraktion haben sich andere Techniken zur Gewinnung der SC-Lipide etabliert. Dazu zählen der Cyanoacrylat-Abriss (Sekundenkleber), die Klebestreifen-Abrisse (Tape-Stripping) und die Biopsien.

Beim Cynoacrylat-Abriss wird ein Tropfen der klebenden Flüssigkeit auf einen Glasobjektträger gegeben und gegen die zu untersuchende Hautstelle gedrückt. Nach kurzer Zeit kommt es auf Grund der Polymerisation zur Abhärtung der Flüssigkeit. Der Objektträger wird anschließend von der Haut abgerissen und zur Gewinnung der Lipide mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert. Nachteilig bei dieser Methode ist die Tatsache, dass Talgdrüsen mitgerissen werden, die einen hohen Anteil an Sebumlipiden enthalten (122).

Im Falle von „Tape-Stripping“ wird ein in seinen Maßen definierter Klebestreifen vorzugsweise unter definiertem Druck an die interessierende Hautstelle gelegt und nach einer bestimmten Zeit abgezogen. Dieser Vorgang wird mit weiteren Klebestreifen sequentiell wiederholt bis das gesamte SC entfernt ist. Die Lipide können durch Extraktion mit geeigneten Lösungsmitteln von den Klebestreifen gewonnen werden. Hier lässt sich ein von der SC-Tiefe abhängiges Lipidprofil erstellen (122, 156). Ein wesentlicher Nachteil dieser Methode liegt darin, dass beim Extrahieren der Lipide andere Stoffe des Klebestreifenmaterials mitextrahiert werden, die die weitere Analytik enorm erschweren können (156).

Die Biopsie ist eine invasive Methode, die darauf beruht, der Haut operativ kleine Epidermisstücke zu entnehmen. Erst im Nachhinein wird das SC enzymatisch abgetrennt und abschließend zur Lipidgewinnung extrahiert. Damit ist ein großer Aufwand verbunden. Man unterscheidet zwischen den *in vivo* und *ex vivo* Techniken. Auf Grund der Invasivität werden die *in vivo* Biopsien von den Probanden oder Patienten als unangenehm empfunden. Des Weiteren stehen sie im Verdacht, Pigmentationskrankheiten zu verursachen (21). Die *ex vivo* Biopsien werden an Hautresten durchgeführt, die bei chirurgischen Operationen anfallen. Da die meisten solcher Operationen an Brust-, Abdominal- oder Gesichtshaut vorgenommen werden, sind die *ex vivo* Biopsien i.d.R. auf solchen Stellen begrenzt (21). Zieht man in Betracht, dass das SC-Ceramidprofil in

Abhängigkeit von der SC-Tiefe sich kaum ändert (156), dann bietet sich die topische Extraktion als zweckmäßige Methode zur Gewinnung der SC-Ceramide an, insbesondere wenn es sich um gut zugängliche Areale wie die Arme handelt. Unter Verwendung milder Lösungsmittel, stellt sie darüber hinaus eine nicht invasive *in vivo* Lipidsammelmethode dar, mit der die oben aufgeführten Kriterien erfüllt und die genannten Nachteile anderer Methoden vermieden werden können.

4.1.2 Trennung der SC-Ceramide mittels AMD-HPTLC

Zur Trennung der extrahierten SC-Lipide wurde eine neue AMD-HPTLC-Methode entwickelt, die - wie aus **Abbildung 11** hervorgeht - auf einem Gradienten aus 17 Entwicklungsschritten basiert (46).

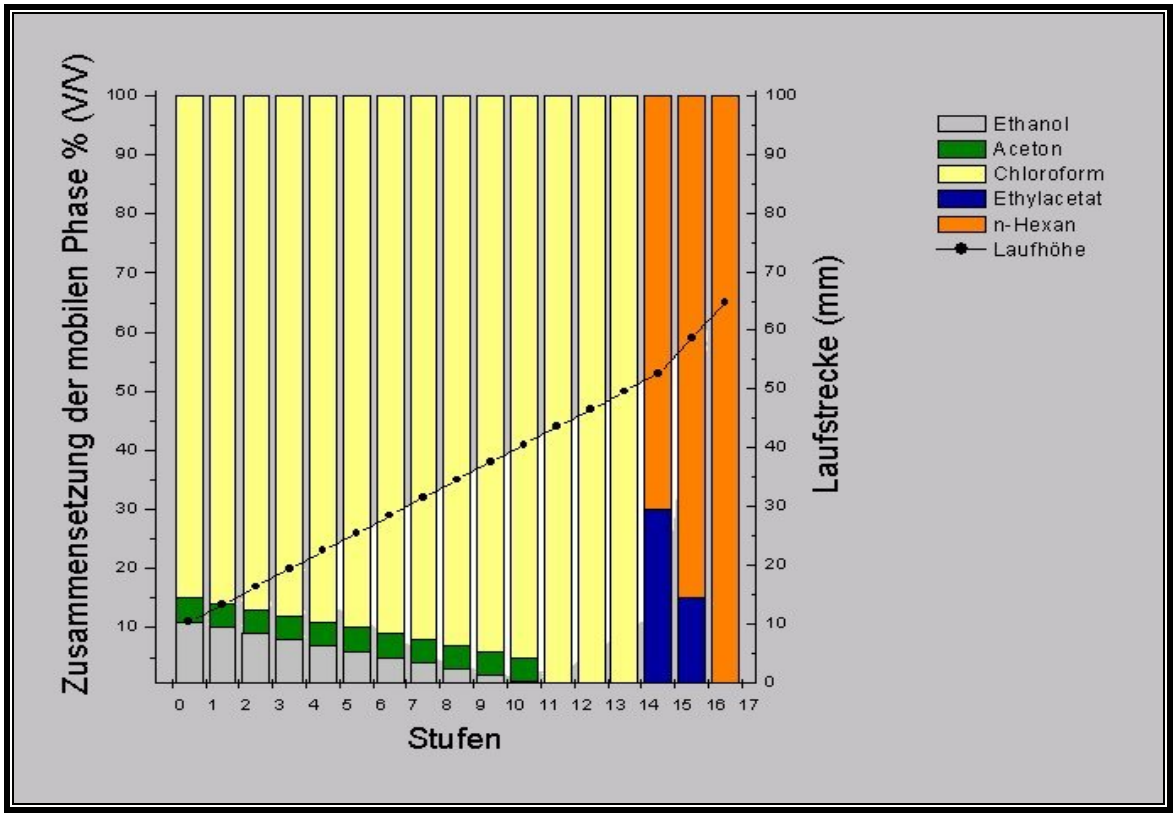

Abbildung 11: Der AMD-Gradient

Die ersten 11 Schritte des Gradienten umfassen Mischungen abnehmender Polarität aus Chloroform, Aceton und Ethanol. Darauf folgen 3 isokratische Schritte mit Chloroform als mobiler Phase. In diesem Teilbereich lassen sich Cholesterol, Cholesterol-3-sulfat sowie

die Ceramidklassen auftrennen. Zur Separation von Cholesterol, freien Fettsäuren, Triacylglycerolen, Cholesterylestern sowie Squalen dienen weitere 2 Schritte mit Mischungen aus n-Hexan und Ethylacetat sowie ein letzter isokratischer Schritt mit n-Hexan. Vor jedem Entwicklungsschritt erfolgt eine Konditionierung der Platten mit gesättigtem Dampf einer 4 molaren Essigsäurelösung. Dadurch werden die freien Fettsäuren in ihre protonierten Formen vollständig überführt und auf Grund dessen in ihren Banden fokussiert. Ferner lassen sich Cer [EOH] und Cer [NH] damit besser auflösen. Jeder Entwicklungslauf, bestehend aus den 17 Schritten und den dazu gehörenden Zwischenstufen von jeweils 1,5 min dauert 150 min, wobei der gesamte Lösungsmittelverbrauch 81 ml Chloroform, 19 ml n-Hexan, 8 ml Ethanol sowie jeweils 6 ml Ethylacetat und Aceton beträgt.

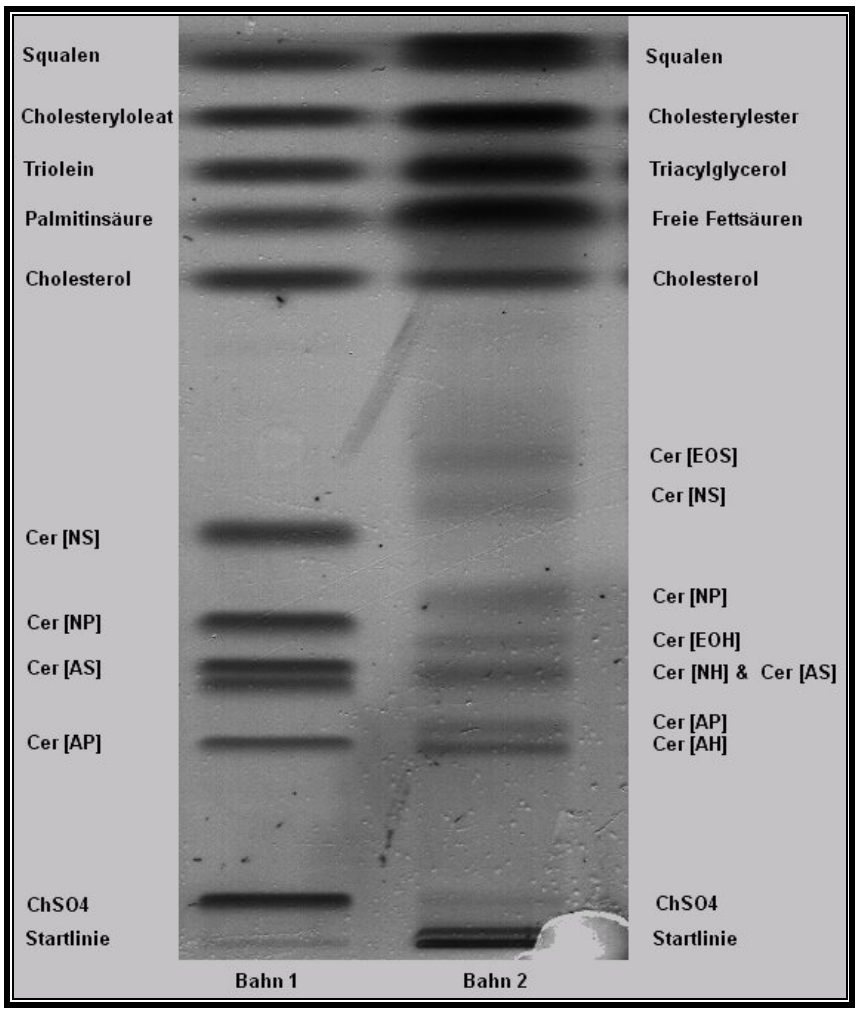

Abbildung 12: Chromatogramm einer AMD-HPTLC-Trennung von Lipiden; Bahn 1: Standardlipide; Bahn 2: Lipide aus einer In-vivo-Oberflächenextraktion

In **Abbildung 12** ist ein Chromatogramm dargestellt, das eine mittels der AMD-HPTLC-Methode bewerkstelligte Trennung einer Referenzlösung **(Bahn 1)** aus Cholesterol-3-sulfat, Cer [AP], Cer [AS], Cer [NP], Cer [NdS], Cholesterol, Palmitinsäure, Triolein, Cholesteryloleat und Squalen sowie eine Trennung eines SC-Lipidextrakts **(Bahn 2)** verdeutlicht.

Wie aus **Bahn 1** ersichtlich ist, sind alle Referenzlipide basisliniengetrennt. Da das synthetisch hergestellte Referenzceramid [AP] ein Gemisch aus zwei Enantiomeren ist (wegen der chiralen Natur des C2 der α-Hydroxyfettsäure), spaltet es sich bei der Trennung in zwei Banden, wobei eine davon sich mit der Bande von Cer [AS] überlappt. Bei der densitometrischen Auswertung **(Abbildung 13)** lässt sich die Überlappung anhand des Doppelpeaks Nr.4 erkennen.

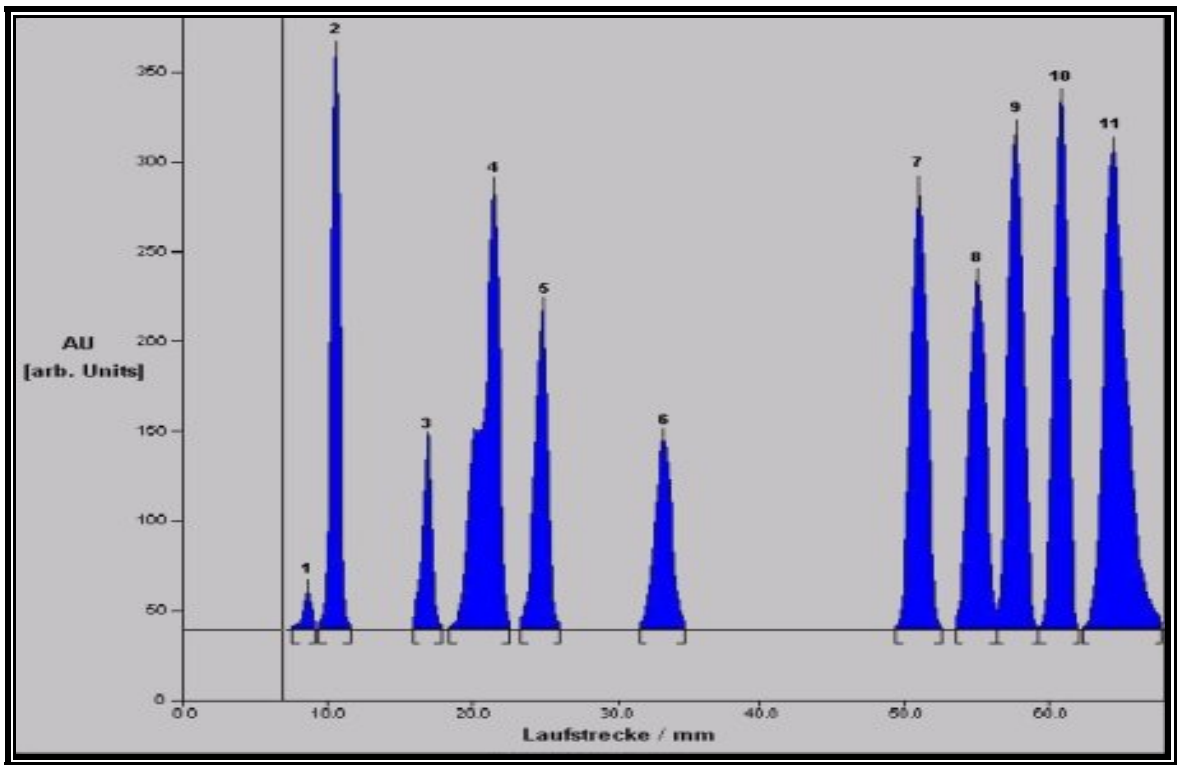

Abbildung 13: Densitogramm zu Bahn 1 in Abbildung 12. 1: Start, 2: Cholesterol-3-sulfat, 3: erster Peak von Cer [AP], 4: Cer [AS] mit zweitem Peak von Cer [AP], 5: Cer [NP], 6: Cer [NdS], 7: Cholesterol, 8: FFS, 9: Triolein, 10: Cholesteryloleat; 11: Squalen

Das Laufverhalten der *in vivo* extrahierten SC-Lipide ist mit demjenigen gleichartiger Referenzsubstanzen vergleichbar. Die SC-Ceramide lassen sich in 7 Klassen auftrennen **(Bahn 2 in Abbildung 12, Abbildung 14)**, die sich nach zunehmender Polarität wie folgt

einteilen lassen: Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOH] Cer [NH/AS], Cer [AP] und Cer [AH]. Die Bande, die in der Literatur Cer [AS] zugeschrieben wird, beinhaltet auch Cer [NH], wobei Cer [NH] mengenmäßig die größere Fraktion darstellt (147). Auf Grund gleicher Polarität bei beiden Ceramidklassen lassen sie sich erst nach Acetylierung auftrennen (118, 147). Infolgedessen wird die in der Literatur als Cer [AS] bekannte Ceramidbande im Rahmen dieser Arbeit als Cer [NH/AS] bezeichnet.

Das neu entdeckte Cer [EOP] sollte sich in der Position zwischen Cer [NS] und Cer [NP] befinden (118). Es konnte allerdings nicht erfasst werden, was auf dessen geringe Menge zurückzuführen ist.

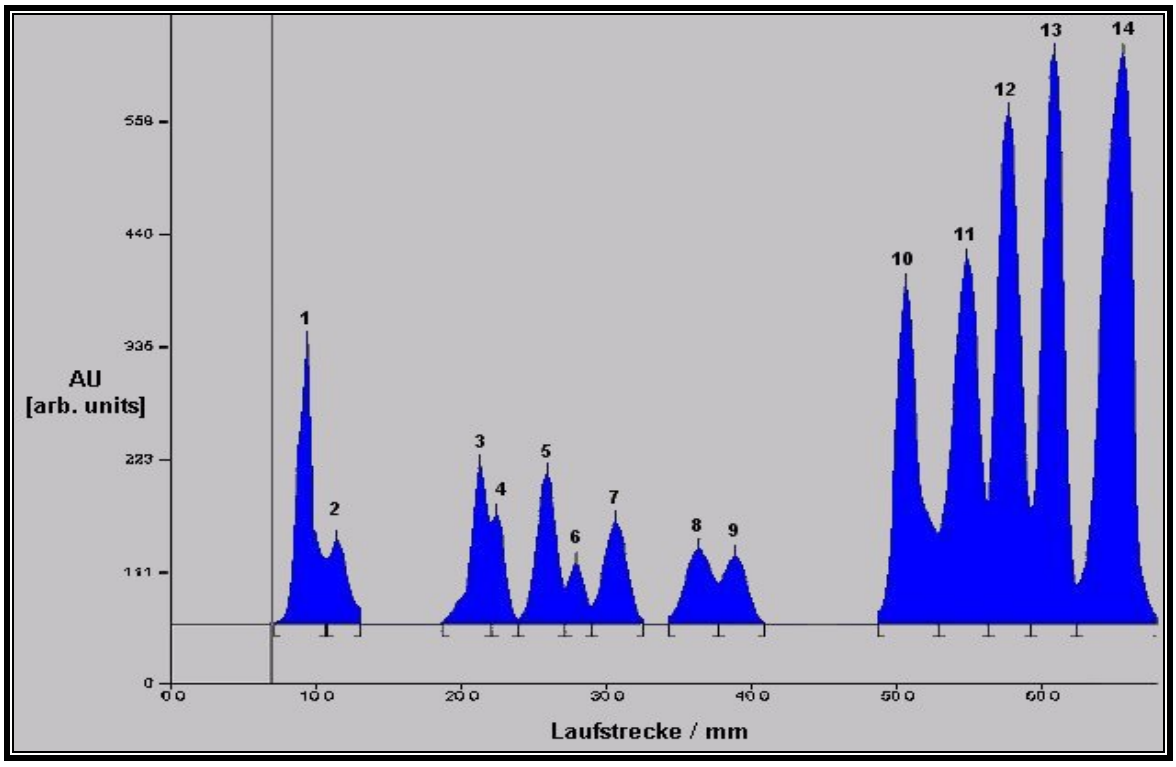

Abbildung 14: Densitogramm zu Bahn 2 in Abbildung 12. 1: Start, 2: Cholesterol-3-sulfat, 3: Cer[AH], 4: Cer [AP], 5: Cer [NH/AS], 6: Cer [EOH], 7:Cer [NP], 8: Cer [NS], 9: Cer [EOS], 10: Cholesterol, 11: FFS, 12: Triacylglycerole, 13: Cholesterylester, 14: Squalen

Aus den **Abbildungen 12 (Bahn 2) und 14** lässt sich beobachten, dass trotz scharf aufgetrennter SC-Ceramidbanden auf der HPTLC-Platte, die entsprechenden Peaks im Densitoramm z. T. unvermeidlich ineinander übergehen. Die Begründung dafür liegt in der breiten Variabilität der Kettenlängenverteilung der Fettsäuren- oder Sphingoidbasenreste, obgleich hier die eine Normalphasentrennung vorliegt.

Die Identifizierung und Zuordnung der aufgetrennten SC-Lipide erfolgte durch Vergleich des Laufverhaltens mit Refenzsubstanzen sowie Abgleich mit Literaturdaten (6, 116, 156, 163). Als Messgröße dienten dabei die Rf-Werte.

Zur Visualisierung der getrennten SC-Lipide wurde ein bekanntes Procedere angewandt. Dabei wurden die Platten in eine mit Phosphorsäure angesäuerte $CuSO_4$-Lösung eingetaucht und anschließend bei 160°C für 30 min temperiert. Die Lipide wurden dadurch zu braunen Banden verascht, wobei der genaue Reaktionsmechanismus unbekannt ist.

Die densitometrische Auswertung erfolgte, indem die Banden im Reflektionsmodus bei einer Wellenlänge von 564 nm gescannt wurden. Alle Parameter (siehe Experimenteller Teil) wurden mit Blick auf Schnelligkeit, Präzision und Robustheit optimiert. Beim Scanvorgang wurden die Banden in Peaks transformiert, deren Flächen zur Quantifizierung dienten. Es wurden dabei einzelne Standardkurven für jede Klasse der SC-Lipide erstellt. Die verschiedenen Lipide unterschieden sich durchaus in ihrem Responsefaktor. Zur quantitativen Bestimmung aller Ceramidklassen wurde allerdings nur eine Standardkurve herangezogen, namentlich die des Referenzlipides Cer [NP]. Da nicht für jede Ceramidklasse Referenzen kommerziell erhältlich waren, wurde eine Substanz mit mittlerer Intensität (Cer [NP]) (156) als Standard ausgewählt.

Um den eventuellen Einfluss experimenteller Variationen (z.B. Veraschungstemperatur) auf die Resultate zu minimieren, wurden die Standardkurven für jede einzelne Platte angefertigt. Da in der Dünnschichtchromatographie die Voraussetzungen für die Kubelka-Munk-Funktion (Siehe Abschnitt 2.2.2.2) nicht oder nur partiell gegeben sind, wurde bei den Standardkurven keine lineare, sondern eine Sättigungsfunktion angewandt. Es handelte sich dabei um eine vereinfachte Form der sog. Hill-Funktion, die eine Modifikation der Michaelis-Menten-Gleichung darstellt und im Folgenden aufgeführt ist:

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

Y: Die densitometrische Intensität des zu quantifizierenden Lipides

A_{max}: Die maximal erreichbare densitometrische Intensität des zu quantifizierenden Lipides

X: Die zu ermittelnde Menge des interessierenden Lipides

K: Lipidmenge bei halbmaximaler Intensität

In **Abbildung 15** ist eine Standardkurve für Cer [NP] gezeigt, aus der die Anpassungsgüte der gemessenen Werte an die für die Quantifizierung der Ceramide ausgewählte Hill-Funktion dargestellt ist.

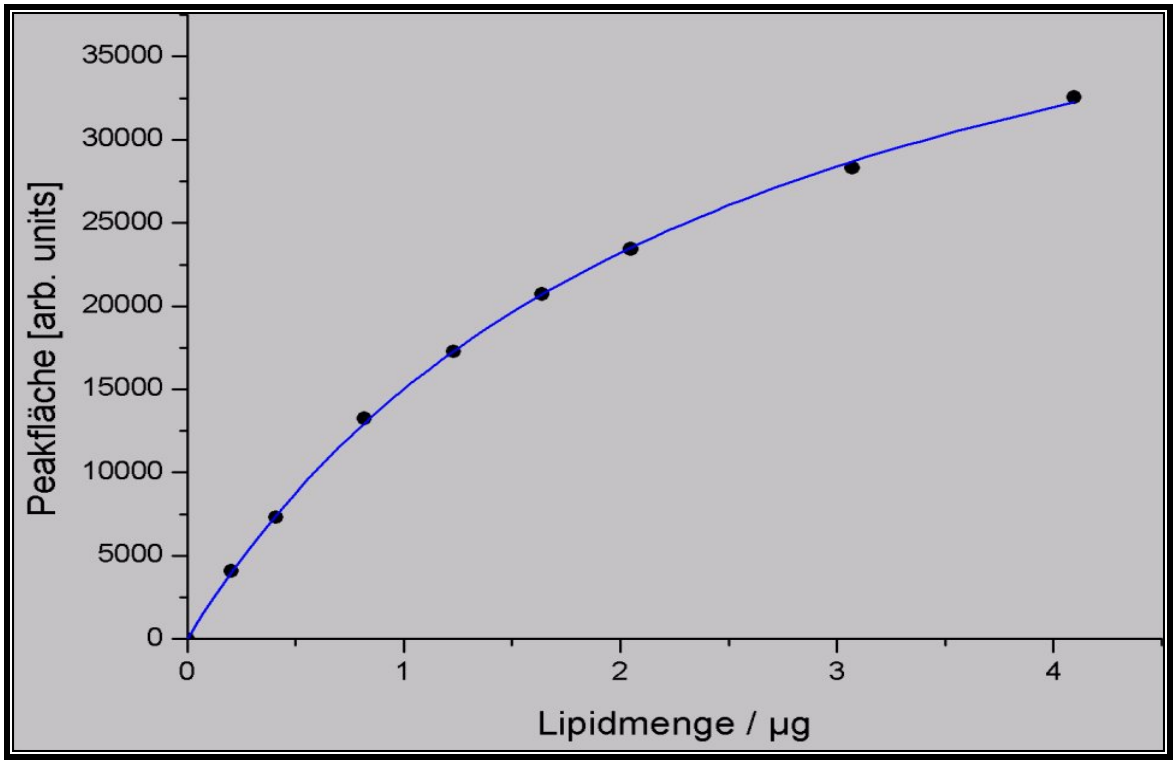

Abbildung 15: Standardkurve nach densitometrischer Evaluation von Cer [NP] basierend auf der nichtlinearen Hill-Funktion

Sowohl die Standardabweichung (0,2-10%) als auch die Nachweisgrenze (50-100 ng) entsprechen denen anderer AMD-HPTLC-Methoden (7, 173).

Die hier dargestellte AMD-HPTLC ist die erste Methode, mit der in einem Lauf sowohl die SC-Lipide voneinander getrennt als auch die einzelnen Ceramidklassen fraktioniert werden können. Sie verfügt zudem über mehrere Vorzüge gegenüber den klassischen und den anderen automatisierten Methoden.

Im Vergleich zu den klassischen TLC-Methoden der Hautlipidanalytik (83, 116-118, 163) weist die hier präsentierte Methode die Vorteile auf, dass sie automatisiert, hochreproduzierbar, lösungsmittel- sowie zeitsparend ist. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Trennung der Lipide innerhalb einer relativ kurzen Strecke von 65 mm stattfindet, damit der negative Einfluss der Diffusionsvorgänge limitiert und die Trennzeit reduziert werden können. Die mehrfache Entwicklung der HPTLC-Platten resultiert

darüber hinaus in schmaleren Banden, die besser aufgelöst sind und sich somit besser quantifizieren lassen.

Bonté et al. waren diejenigen, die die Technik der AMD-HPTLC zur Analytik der SC-Lipide eingeführt haben (7). Mit dem dort vorgestellten Gradienten konnten die verschiedenen Ceramidklassen allerdings nicht aufgetrennt werden. Außerdem ließen sich die freien Fettsäuren von den Cholesterylestern nicht separieren. Diese Separation wurde erst durch die AMD-HPTLC-Methode von Zellmer et al. ermöglicht, die andererseits auch keine eindeutige Auftrennung der SC-Ceramide erlaubte (173). In Vorexperimenten erwies sich der Gradient von Zellmer et al. mit Diethylether als Hauptkomponente - zumindest im AMD-2-Gerät - als nicht praktikabel. Diethylether verdampfte so schnell von den Platten, dass es zum automatischen Abbruch der chromatographischen Entwicklung kam. Mit dem Ersatz von Diethylether durch Butylmethylether ließ sich dieses Problem beheben. Die Auftrennung der Ceramide blieb allerdings unbefriedigend und konnte erst durch den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Gradienten verbessert und neu gestaltet werden. Das erfolgreiche Trennergebnis wurde dadurch erzielt, dass im Gradienten Chloroform als Hauptbestandteil, Ethanol als Verstärker und Aceton als Mischungsvermittler dienten.

4.1.3 Trennung der SC-Ceramide mittels HPLC/APCI-MS und HPLC/ELSD

Ein elementarerer Aspekt der vorliegenden Arbeit bestand darin, die SC-Ceramide bei gesunden sowie bei an Neurdermitis und Psoriasis erkrankten Probanden mittels MS näher zu untersuchen, mit dem Ziel, eventuell vorhandene spezifische Unterschiede der molekularen Zusammensetzung jeder Ceramidklasse zu ergründen und diese für diagnostische Zwecke sowie für Früherkennung und nähere Charakterisierung der beiden Krankheiten heranzuziehen. Die Voraussetzung dazu war, die jeweiligen massenspektrometrischen Profile zu den entsprechenden Ceramidklassen eindeutig zuzuordnen. Eine HPLC/MS war deshalb von besonderer Bedeutung. Unter chromatographischen Gesichtspunkten wäre eine Umkehrphasentrennung auf Grund unzureichender Selektivität nicht zweckmäßig gewesen. Dabei hätte die Elution der Ceramidspezies entsprechend der von der Kettenlänge der Fettsäuren oder Sphingoidbasen abhängigen Lipophilie stattgefunden. Spezies der verschiedenen Ceramidklassen, die aber gleiche Lipophilie-Eigenschaften und zudem gleiche m/z-Werte aufweisen, hätten somit chromatographisch voneinander nicht aufgetrennt werden können. In diesem Fall wäre eine

Unterscheidung nur mittels LC/MS/MS möglich gewesen. Im Anbetracht der komplexen Ceramidzusammensetzung des SC hätten die vielen notwendigen Fragmentierungs-experimente und die damit verbundene Interpretation der resultierenden Fragmente den Rahmen der vorliegenden Arbeit weitgehend überschritten. Alternativ bestand die Möglichkeit dazu, eine Vortrennung der verschiedenen Ceramidklassen mittels HPTLC durchzuführen, die interessieren Banden sodann manuell abzukratzen, die entsprechenden Ceramide mittels geeigneter Lösungsmittel zu reextrahieren und erst dann die Analytik mittels MS durchzuführen. Nachteilig bei dieser Vorgehensweise waren der hohe manuelle Arbeitsaufwand und die mögliche unerwünschte Erfassung von Spezies aus benachbarten Banden. Aus diesen Gründen wurde von der in der Bioanalytik weit verbreiteten Umkehrphasenrennung abgesehen und eine Normalphasenseparation entwickelt und eingesetzt (47). Außerdem erwies sich die zuvor entwickelte AMD-HPTLC-Methode, die eine Normalphasen-Methode darstellt, als sehr geeignet, um die Ceramidklassen aufzutrennen (46). Dies gab den Anlass zu untersuchen, ob mobile Phasen, die gleiche oder ähnliche Lösungsmittelzusammensetzungen wie die der AMD-HPTLC-Methode aufweisen, in einer Normalphasen-HPLC-Methode mit Kieselgel als stationäre Phase ähnliche oder gar bessere Trennergebnisse liefern können.

Während der Methodenentwicklung wurde zunächst die chromatographische Trennung optimiert. Zur Detektion wurde dabei die evaporative Lichtstreuung (ELSD) angewandt. Als Testgemisch diente eine Lösung der Referenzceramide Cer [NdS], Cer [NP], Cer [AS] und Cer [AP]. Da im Vordergrund stand, dass APCI-MS als Detektionsmethode herangezogen wird, wurde ausschließlich mit relativ hohen Flussraten zwischen 0,25-1,5 ml/min gearbeitet. Es wurden dabei Kieselgelsäulen verschiedener Dimensionen sowie mehrere mobile Phasen unterschiedlicher Lösungsmittelmischungen erprobt. Basislinien-Trennungen **(Abbildung 17 und 18)** konnten allerdings nur mit einer Kieselgelsäule 4 mm x 125 mm, einer Gradientenelution und einer Flussrate von 1ml/min erreicht werden. Der angewandte Gradient ist in **Abbildung 16** dargestellt und besteht aus den Komponenten A (Chloroform, 100 %) und B (Chloroform: n-Propanol: Essigsäure; 80: 20: 2, V/V/V). Dabei gilt Chloroform als die lipophile Hauptkomponente, die die Spezifität der Trennung weitgehend bestimmt. n-Propanol hingegen stellt den hydrophilen Anteil dar, der zur Verstärkung der Elutionskraft des Gradienten beiträgt. Die Essigsäure, ohne die es zu Peakverbreiterungen kommt, wird als „Modifier“ bezeichnet und dient zur Feinregulation der Elutionskraft des Gradienten.

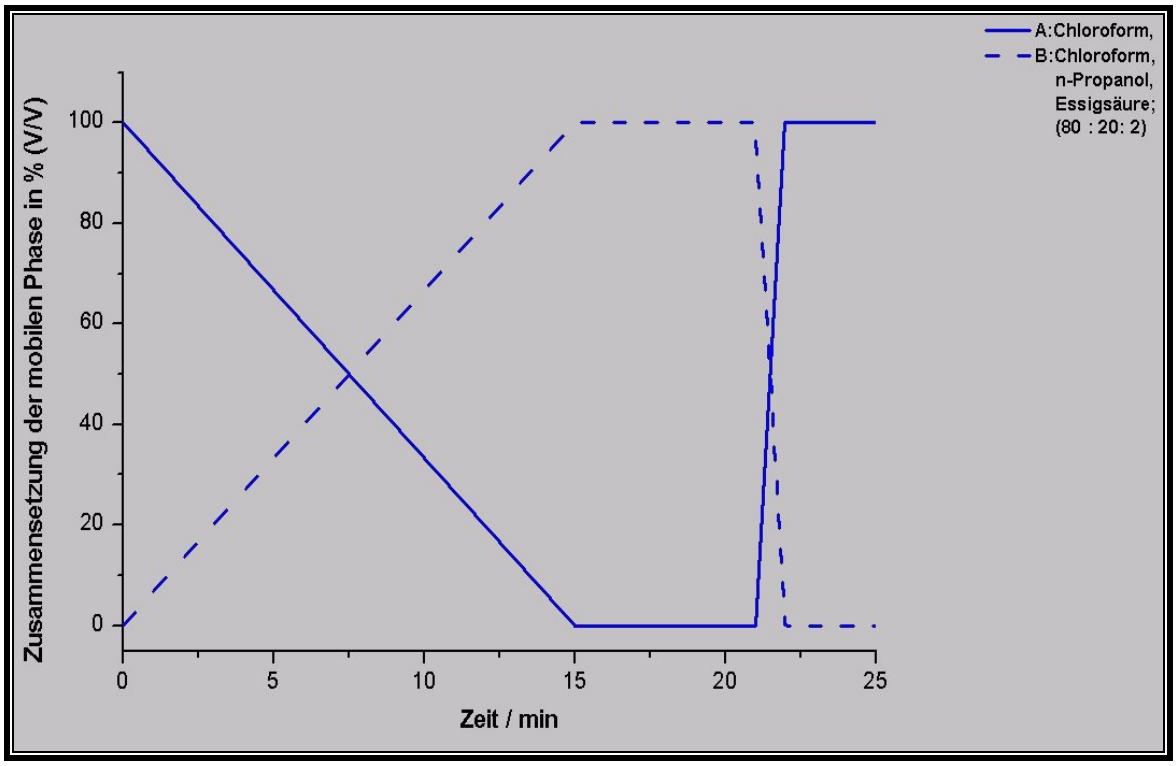

Abbildung 16: Gradient der HPLC/APCI-MS-Methode

An dieser Stelle ist es zu erwähnen, dass bei der Erstellung des Elutionsgradienten die Komplexität der SC-Ceramide in Betracht gezogen wurde. Isokratische Elutionen erwiesen sich als völlig ungeeignet und führten zu keinem befriedigenden Resultat. Die mittels HPLC/ELSD optimierten Bedingungen der chromatographischen Trennung wurden bei allen weiteren Experimenten der HPLC/APCI-MS eingesetzt. Dabei wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt, wie anhand des Vergleiches zwischen den **Abbildungen 17 und 18** erkennbar ist.

Die Analytik der SC-Ceramide aus den *in vivo* Extraktionen (Probandenversuche) wurde ausschließlich mit Hilfe der HPLC/APCI-MS durchgeführt. Die Wahl von APCI-MS als Detektionsmethode bei der eingesetzten HPLC/MS wurde durch die Art der chromatographischen Trennung (Normalphasen-HPLC) bestimmt. ESI-MS wäre mit den bei der Normalphasentrennung einzusetzenden lipophilen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform) nicht kompatibel gewesen, weil deren geringe Polarität keine effektive Ionisation ermöglicht hätte. Außerdem lassen sich die Ceramidmoleküle der Klassen Cer [EOS], Cer [EOP] und Cer [EOH] auf Grund der geringen Polarität mit ESI-MS kaum ionisieren.

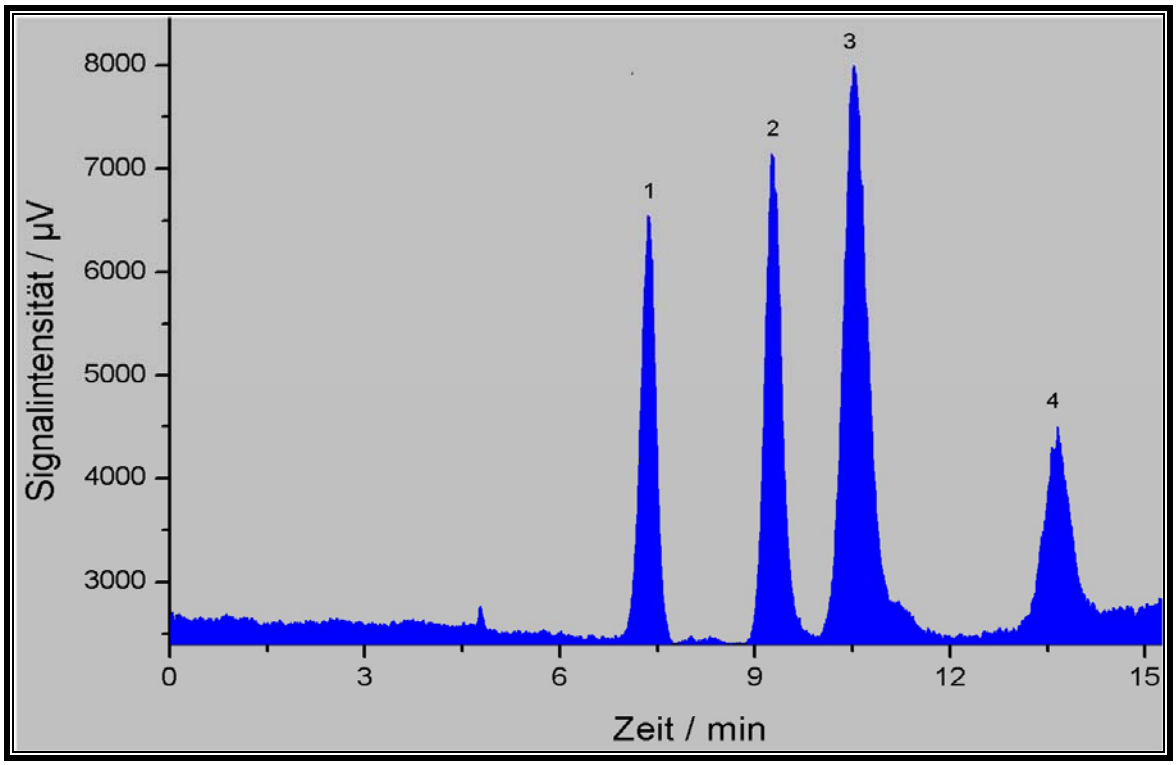

Abbildung 17: ELSD-Chromatogramm der Standardceramide. 1: Cer [NdS], 2 Cer [NP], 3: Cer [AS] und der erste Peak von Cer [AP], 4: Cer [AP]

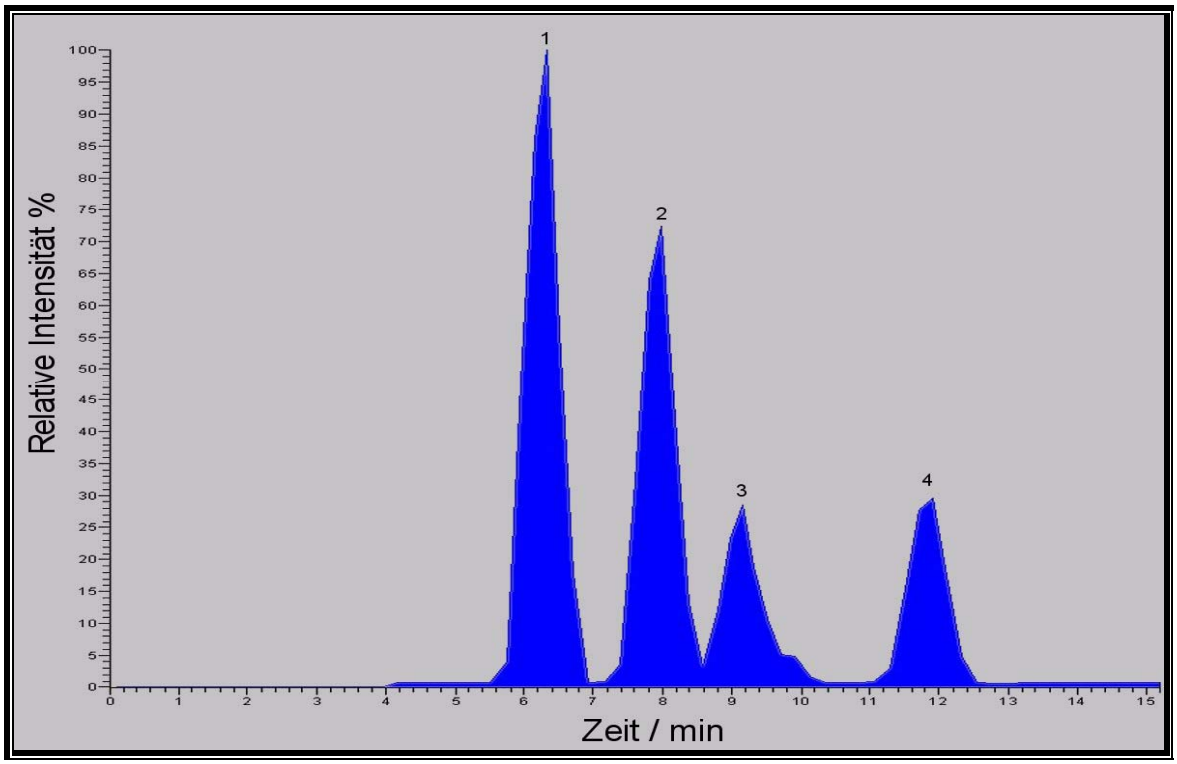

Abbildung 18: Massenspektrometrisches Chromatogramm der Standardceramide. 1: Cer [NdS], 2 Cer [NP], 3: Cer [AS] und der erste Peak von Cer [AP], 4: Cer [AP]

Wie aus **Abbildung 19** ersichtlich ist, können mittels der Methode der HPLC/APCI-MS die Ceramidklassen: Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOH], Cer [NH], Cer [AS] Cer [AP] und Cer [AH], aufgetrennt werden. Auch das neu entdeckte Cer [EOP] lässt sich detektieren. Derselben Abbildung kann ferner entnommen werden, dass die Peaks von Cer [NP] und Cer [EOH] sich überlappen und dass in diesem Fall eine begrenzte chromatographische Trennung vorliegt. Weiterhin weist der Peak von Cer [EOP] wegen dessen geringen Menge unter den SC-Ceramiden keine hohe Intensität auf und könnte deshalb im Chromatogramm leicht untergehen. Durch die massenspektrometrische Darstellung mittels der Einstellung eines engen m/z-Bereiches lassen sich diese Probleme mühelos bewältigen.

Anhand dieses Beispiels lässt sich ein besonderer Vorteil der Analytik mittels LC/MS deutlich erkennen. Es kann nämlich sowohl von der chromatographischen als auch von der massenspektrometrischen Darstellung profitiert werden.

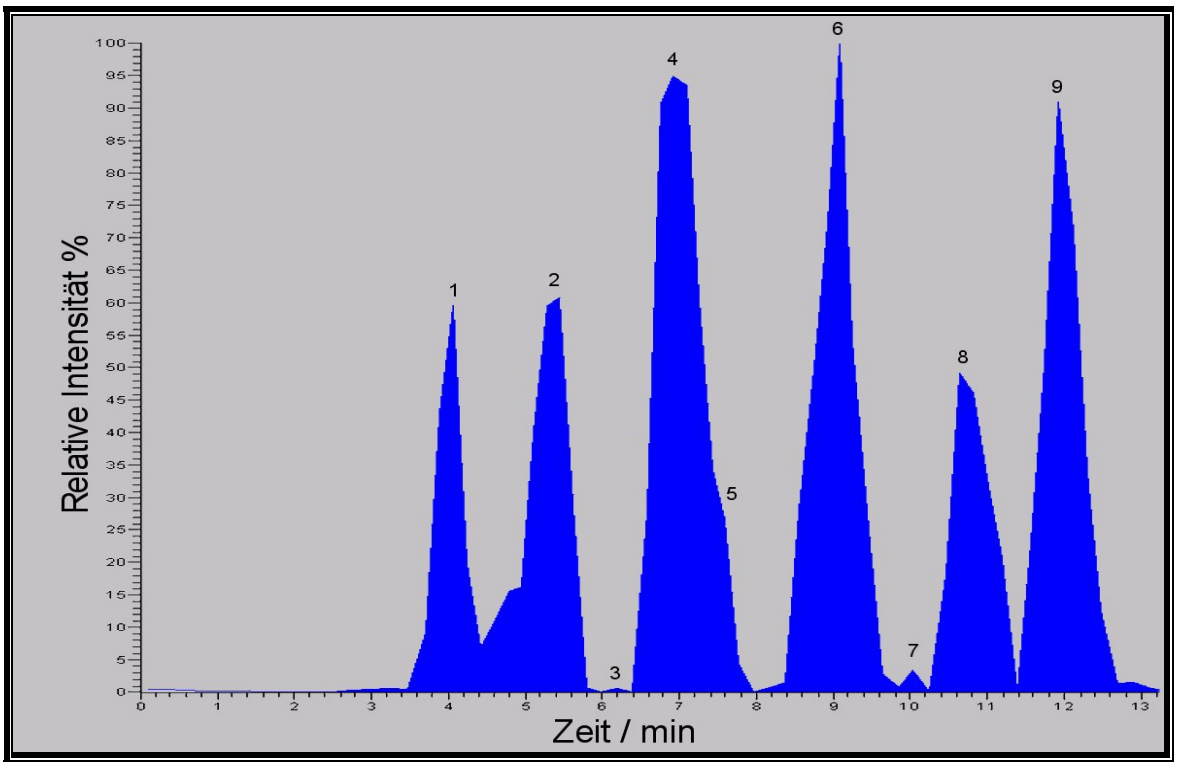

Abbildung 19: Massenspektrometrisches Chromatogramm der *in vivo* extrahierten Ceramide. 1: Cer [EOS], 2: Cer [NS], 3: Cer [EOP], 4: Cer [NP], 5: Cer [EOH], 6: Cer [NH], 7: Cer [AS], 8: Cer [AP], 9: Cer [AH]

Zur Identifizierung der Ceramidklassen wurden deren Retentionszeiten bestimmt, die entsprechenden Fraktionen sodann präparativ mittels Fraktionssammler gesammelt und danach mittels AMD-HPTLC analysiert. **Abbildung 20** zeigt die erhaltenen Fraktionen, die den bisher bekannten Ceramidklassen entsprechen. Auf Grund seiner beschränkten Menge im SC-Lipidgemisch ist Cer [EOP] hier (Bahn 5 zwischen Cer [NS] und Cer [NP]) nicht zu erkennen.

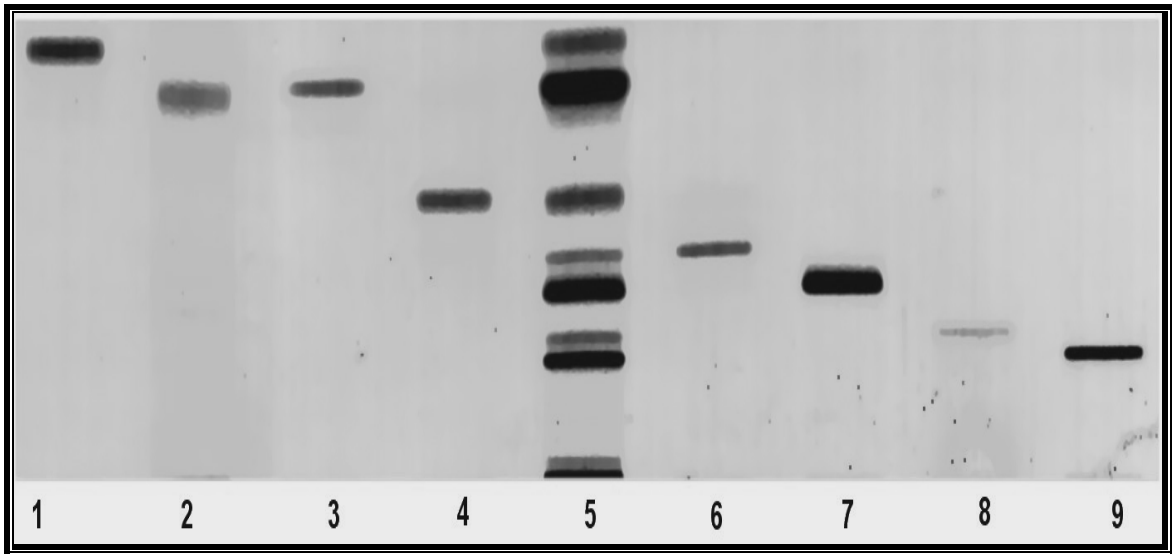

Abbildung 20: HPTLC-Fraktionen entsprechend der in Abbildung 19 eluierten Ceramide. 1: Cer [EOS], 2 und 3: Cer [NS], 4: Cer [NP], 5: *in vivo* SC-Extrakt als Standard, 6: Cer [EOH], 7: Cer [NH] und Cer [AS], 8: Cer [AP], 9: Cer [AH]

Bei näherer Betrachtung des Chromatogramms in **Abbildung 19** und des Densitogramms in **Abbildung 14** lassen sich Ähnlichkeiten zum Trennprofil der AMD-HPTLC-Methode feststellen, was auf den Einsatz von Kieselgel als stationäre Phase sowie von ähnlich zusammengesetzten mobilen Phasen zurückzuführen ist. Dadurch lässt sich zeigen, dass Trennmethoden prinzipiell übertragbar sind, wobei jedoch naturgemäß gewisse Anpassungen erforderlich sind. Demzufolge wurde Ethanol in der AMD-HPTLC-Methode durch das in seiner Elutionskraft schwächere n-Propanol in der HPLC/APCI-MS-Methode ersetzt, wobei Ethylacetat, n-Hexan und Aceton nicht notwendig waren.

Die Nachweisgrenze bezogen auf das Referenzlipid Cer [NP] beträgt bei der HPLC/APCI-MS-Methode 50 ng gegenüber 500 ng bei der HPLC/ELSD-Methode. Der Einsatz der HPLC/APCI-MS bei der Analytik der SC-Ceramide ist aus diesem Grund vorteilhaft. Ein weiterer elementarer Vorteil ist die Möglichkeit, die massenspektrometrischen Profile jeder

Ceramidklasse zu untersuchen. Der relativ hohe Wert der Nachweisgrenze bei der HPLC/ELSD-Methode ist auf die verhältnismäßig hohe Evaporationstemperatur von 80°C zurückzuführen, die dennoch notwendig war, um die Essigsäure als relativ schwer flüchtigen Bestandteil zu verdampfen.

Das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Trennsystem stellt die erste HPLC-Methode zur Normalphasenseparation und direkten massenspektrometrischen Detektion der SC-Ceramide dar (47). Kürzlich haben Lesellier et al. die subkritische Fluidchromatographie (SFC) mit ELSD kombiniert und damit die freien Fettsäuren, Cholesterol, und die Ceramide eines SC-Extrakts von einander getrennt (90). Eine eindeutige Separation der SC-Ceramidklassen konnten sie allerdings nicht erreichen. Ähnliche Resultate wurden bei Norlén et al. und Gildenast et al. erhalten, die ihrerseits die Normalphasen-HPLC mit Lichtstreudetektion eingesetzt haben (57, 108). McNabb et al. berichteten über eine Trennung der kommerziell erhältlichen Referenzlipide Cer [NS] und Cer [AS] mit Hilfe einer Kieselgelsäule (98). Die Elution dort war isokratisch und führte zu einem unbefriedigenden Trennergebnis. Eine wesentlich bessere Trennung derselben Ceramide wurde von Deschamps et al. erreicht, die Polyvinylalkohol als stationäre Phase und Gradientenelution einsetzten (24). In beiden Fällen erfolgte die Detektion mittels ELSD. Andere Arbeitsgruppen derivatisierten die zu analysierenden Ceramide (28, 170). Damit sind nicht nur ein hoher Arbeitsaufwand sondern auch zusätzliche Fehlerquellen verbunden, denn es kann u.a. dazu kommen, dass die Derivatisierung nicht vollständig erfolgt. Darüber hinaus wird das Laufverhalten der resultierenden Verbindungen gegenüber den ursprünglichen Substanzen verändert.

Raith et al. und Vietzke et al. waren die ersten, die Offline-Kopplung zwischen der HPTLC und der ESI-MS eingesetzt haben um die Profile der SC-Ceramide näher zu untersuchen (123, 124, 153, 154). Zuvor war die massenspektrometrische Analytik der Ceramide auf die GC-MS beschränkt (83, 160, 163). Dabei wurden die Hautproben mittels HPTLC getrennt, die Ceramide von den Platten abgekratzt und anschließend in Spingoidbasen und Fettsäuren hydrolysiert, diese dann derivatisiert und danach analysiert. Dieses Verfahren war umständlich und arbeitsaufwendig. Zu Trennungen von Ceramiden mittels HPLC/APCI-MS bestehen wenige Veröffentlichungen. Dazu gehören die Arbeiten von Couch et al. und Karlsson et al. (20, 75). Kürzlich haben auch Pettus et al. Normalphasen-HPLC/APCI-MS eingesetzt um Ceramide von Dihydroceramiden in Zelllinien zu trennen und näher zu untersuchen (112, 113).

4.1.4 Massenspektrometrische Charakterisierung der SC-Ceramide

Die entwickelte HPLC/APCI-MS-Methode vereinigte eine leistungsfähige chromatographische Trennung mit einer selektiven massenspektrometrischen Detektion (46). Während mittels HPLC die Separation der bekannten Ceramidklassen erreicht wurde, erlaubte die massenspektrometrische Detektion eine eindeutige Zuordnung der Spezies zu den bereits getrennten Ceramidklassen und somit die Erstellung charakteristischer Ceramidprofile.

Bei der Einstellung der Parameter für die massenspektrometrische Detektion wurde darauf geachtet, dass einerseits ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis erreicht und andererseits die unerwünschte Zersetzung bei der Ionisation minimiert wird. In diesem Zusammenhang wurden die Strömungsgeschwindigkeiten des Sprüh- und des Trocknungsgases (in beiden Fällen Stickstoff) an die hohe Flussrate der HPLC von 1 ml / min angepasst. Die Ionisation erfolgte immer im positiven Modus. Im negativen Modus konnte keine Ionisation erzielt werden. Die Evaporationstemperatur und die Kapillartemperatur wurden so eingestellt, dass die Fragmentierung der Ceramidmoleküle in einem definierten und limitierten Rahmen stattfand. Während die Phytosphingosinceramide Cer [EOP], Cer [NP] und Cer [AP] in Form von positiven Pseudomolekülionen $[M + H]^+$ detektiert werden konnten, spalteten die Ceramide auf Sphingosinbasis Cer [EOS], Cer [NS], Cer [EOH], Cer [NH], Cer [AS] und Cer [AH] jeweils ein Wassermolekül ab und wurden als $[M - H_2O + H]^+$ erfasst. Durch die Wasserabspaltung entsteht eine Doppelbindung, die mit der ursprünglichen Doppelbindung in Konjugation steht, so dass die positive Ladung mesomeriestabilisiert werden kann. Dies vermag der Grund für die begünstigte Wasserabspaltung sein.

Bei der Auswahl des breiten Detektionsbereiches von 400-1500 amu wurde berücksichtigt, dass die Massen der bekannten SC-Ceramide sich von den kleinen Spezies von Cer [AS] bis zu solchen der langkettigen ω-veresterten Ceramide wie Cer [EOS] erstrecken.

Die Identifizierung der Ceramidklassen erfolgte wie unter Abschnitt 4.1.3 beschrieben off-line mittels AMD-HPTLC. Außerdem wurden die einzelnen Massen, die in jeder Ceramidklasse vorkommen könnten, berechnet und mit den erhaltenen Ergebnissen verglichen. Den Berechnungen lagen Untersuchungen von Wertz et al. zu Grunde, bei denen die Sphingoidbasen und die Fettsäuren nach erfolgter Hydrolyse der entsprechenden Ceramide gaschromatographisch analysiert wurden (163, 164). Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass eine Kettenlänge von C18 bei den meisten Sphingoidbasen die meist

vorkommende Variante darstellt. Die verschiedenen Massen innerhalb jeder Ceramidklasse wurden deshalb homologen Reihen zugeordnet, die eine konstante Kettenlänge der Sphingoidbase von C18 voraussetzten und auf einer Verlängerung der amidgebundenen Fettsäure um jeweils eine Methylengrupp basierten. Die Bezeichnung der Ceramidspezies erfolgte infolgedessen in Bezug auf die Kettenlänge der jeweiligen amidgebundenen Fettsäure. Ein bedeutendes Unterscheidungskriterium, das zur Identifizierung und Differenzierung der Ceramidvarianten innerhalb einer homologen Reihe diente, war die Stärke der Signalintensität. Spezies mit gerader Anzahl an Kohlenstoffatomen werden nämlich bei den Biosynthesen begünstigt und kommen somit häufig vor. Aus diesem Grund zeigen sie höhere Signalintensitäten als solche mit ungerader Anzahl (152). Zu beachten ist, dass die hier erhaltenen Ergebnisse sich auf die extrahierten Ceramide menschlicher gesunder Haut bezogen sind. In den **Tabellen 5** und **6** sind die detektierten molekularen Massen aufgelistet. Bei den Ceramiden mit Sphingosin als Base wurden die Massen um das abgespaltene Wassermolekül korrigiert. Da die Auflösung im gewählten Scanbereich bei 1 amu liegt, wurde auf Dezimalstellen bei den angegeben Zahlen verzichtet.

Der Abgleich der theoretisch berechneten mit den detektierten molekularen Massen der langkettigen Ceramide: Cer [EOS], Cer [EOP] und Cer [EOH] weist darauf hin, dass als ω-veresterte Fettsäure nahezu ausschließlich Linolsäure vorkommt. Zur Absicherung dieses

Tabelle 5: Die detektierten Molekülmassen der ω-veresterten Ceramide: Cer [EOS], Cer [EOP] und Cer [EOH], Kettenlänge der Sphingoidbasen: C18

Kettenlänge der amidgebundenen Fettsäuren	Cer [EOS]	Cer [EOP]	Cer [EOH]
C30	1013	1031	1029
C31	1027	1045	1043
C32	1041	1059	1057
C33	1055	1073	1071
C34	1069	1087	1085
C35	1083	1101	
C36	1097	1115	

Tabelle 6: Die detektierten Molekülmassen der Ceramide: Cer [NS], Cer [NdS], Cer [NP], Cer [NH], Cer [AS], Cer [AP], Cer [AH], Kettenlänge der Sphingoidbase: C18

Kettenlänge der amidartig gebundenen Fettsäuren	Cer [NS]	Cer [NdS]	Cer [NP]	Cer [NH]	Cer [AS]	Cer [AP]	Cer [AH]
C15					541		
C16					555		
C17					569		
C18					583		
C24	651	653	669	667		685	683
C25	665	667	683	681		699	697
C26	679	681	697	695		713	711
C27	693	695	711	709		727	725
C28	707	709	725	723		741	739
C29	721	723	739	737		755	
C30	735	737	753	751		769	
C31	749	751	767				
C32	763	765	781				
C33	777						
C34	791						

Ergebnisses sind allerdings noch weitere Experimente (z.B. Fragmentierungsexperimente) erforderlich. Dieser Befund ist im Einklang mit Resultaten von Vietzke et al. (152) und Ponec et al. (118) nicht aber mit solchen von Wertz et al. (163, 164), bei denen davon berichtet wurde, dass nach Hydrolyse der Esterbindungen und erfolgter gaschromatographischer Analytik der Fettsäuremethylester die ω-veresterten Fettsäuren eine komplexe Verteilung (gesättigt, nicht gesättigt, langkettig, nicht langkettig usw.) aufweisen. Verglichen mit Cer [EOP] und Cer [EOH] zeigt Cer [EOS] ein verhältnismäßig komplexes Massenspektrum **(Abbildung 21)**. Zum einen ist dies darauf zurückzuführen, dass Spezies

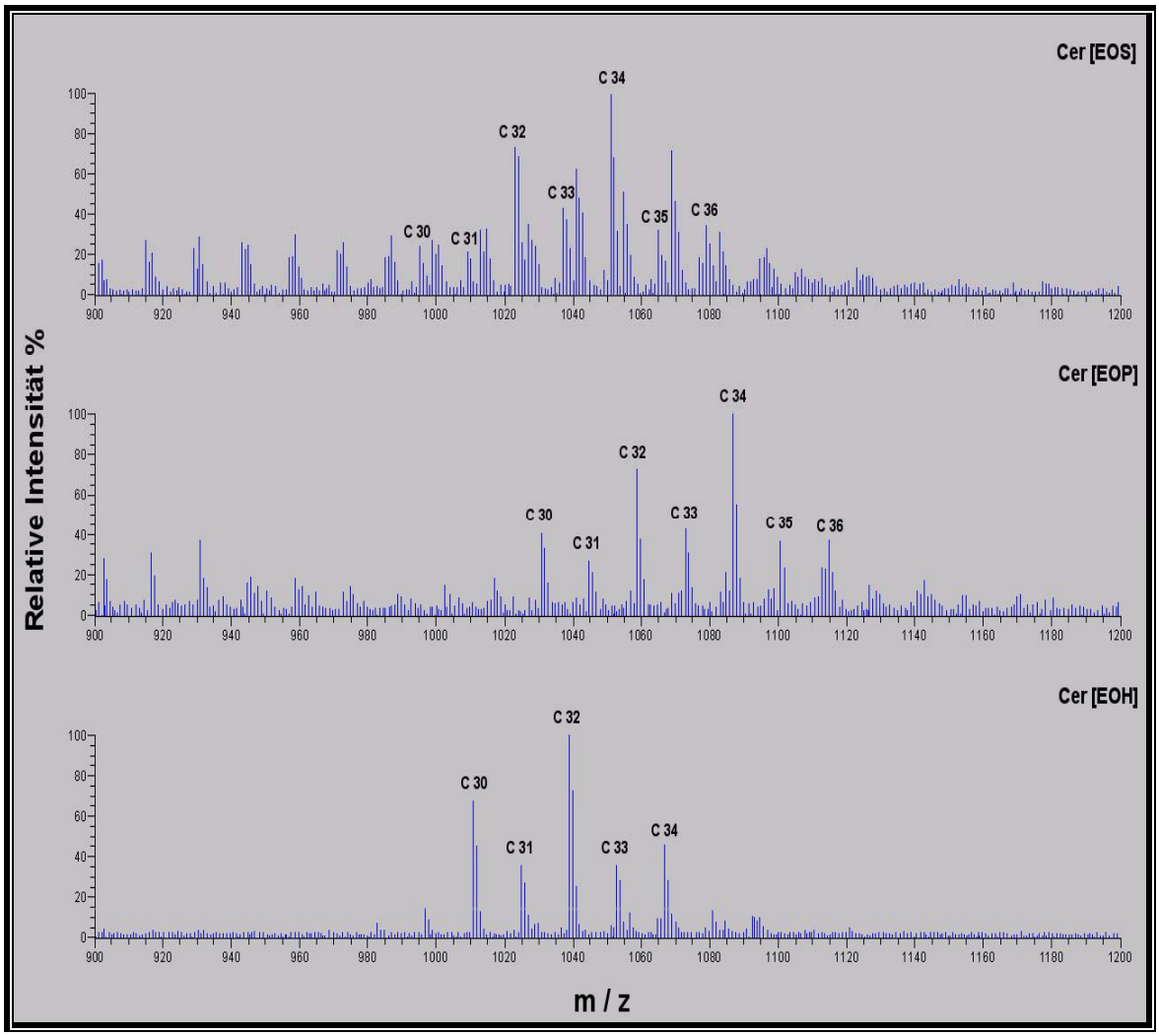

Abbildung 21: Massenspektrometrische Profile (Varianten der Kettenlängen der amidartig gebundenen Fettsäuren) der SC-Ceramide: Cer [EOS], Cer [EOP] und Cer [EOS], Kettenlänge der Sphingoidbasen: C18

mit ω-veresterter Stearinsäure in Spuren vorkommen. Auf der anderen Seite existiert eine noch zu untersuchende homologe Reihe, von der angenommen wird, dass sie neuartige Ceramidvarianten beinhaltet. In dieser Hinsicht ist eine nähere und genauere Untersuchung mittels MS/MS und NMR vorzunehmen. An dieser Stelle ist es von Bedeutung zu erwähnen, dass bei den langkettigen Ceramidklassen keine Spezies mit ω-veresterter Ölsäure detektiert wurden. Der Einbau von Ölsäure statt Linolsäure an ω-Stellung in Cer [EOS] würde, vorherigen Arbeiten zu Folge, auf defekte Barrierefunktionen hinweisen (35, 36, 158). Aus **Tabelle 5 und Abbildung 21** geht hervor, dass die Kettenlängen amidartig gebundener Fettsäuren in den langen ω-veresterten Ceramiden sich über einen Bereich von C30-C36 erstrecken, was mit zuvor publizierten Ergebnissen übereinstimmt (19, 153).

Dabei weisen Spezies mit Kettenlängen > C30 die höchsten Intensitäten auf. Hier liegt eine Abweichung von den Literaturangaben vor, bei denen davon berichtet wurde, dass die meist auftretenden Varianten solche mit Kettenlängen C30 sind (163, 164). Die Ursachen dieser Diskrepanz bleiben zu untersuchen. Ausgangspunkt dieser Untersuchung wäre die vorausgesetzte Kettenlänge der Sphingoidbasen von C18, die näher betrachtet werden soll.
Im Spektrum von Cer [NS] **(Abbildung 22 und Tabelle 6)** lassen sich zwei homologe Reihen von einander unterscheiden. Eine davon gehört zu Cer [NS], während die andere Cer [NdS] zugeschrieben wird, das Sphinganin (Dihydrosphingosin) als Sphingoidbase enthält und auf dessen Anwesenheit letztlich in einigen Publikationen hingewiesen wurde (118, 153, 154). Bei näherer Betrachtung lässt sich feststellen, dass die Intensitäten der Spezies von Cer [NdS] im Allgemeinen höher sind als diese von Cer [NS]. Ob dies mit einem häufigeren Vorkommen von Cer [NdS] zusammenhängt oder nur ein Resultat einer besseren Ionisation im Vergleich zu Cer [NS] darstellt, ist noch nicht bekannt. Aus **Abbildung 22** lassen sich bei Cer [NdS] Varianten mit Kettenlängen C24 bis C32 beobachten. Gleichermaßen erstrecken sich die detektierten Spezies von Cer [NS] über einen langen Bereich von 24-34 Kohlenstoffatomen der amidartig gebundenen Fettsäuren.
In den Spektren der Ceramidklassen Cer [NP], Cer [NH], Cer [AP] und Cer [AH] **(Abbildung 22)** wurden die höchsten Intensitäten bei den Spezies C26 und C28 beobachtet. Gewisse Übereinstimmung besteht hier zu Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die davon berichtet haben, dass bei den genannten Ceramidklassen die Varianten C24 und C26 vorherrschen (60, 118). Mit amidartig gebundenen Fettsäuren der Kettenlängen C15-C18 sind die Ceramidspezies von Cer [AS] relativ klein verglichen mit denjenigen aller anderen Ceramidklassen. Die größte Häufigkeit dabei weist die Variante auf, die α-Hydroxypalmitinsäure (C16) als amidgebundene Fettsäure enthält. Dieses Ergebnis deckt sich mit zuvor veröffentlichten Arbeiten von Wertz et al., Uchida et al. Hamanaka et al. und Ponec et al. (60, 118, 151, 157). Vietzke et al. berichteten hingegen, dass bei Cer [AS] Spezies längerer Kettenlänge (C22-C36) existieren; ein Befund, der nähere Untersuchungen verlangt. Abschließend ist zu erwähnen, dass weitere Untersuchungen mittels MS/MS und NMR erforderlich sind um die Kettenlängen der Sphingoidbasen und die ω-veresterten Fettsäuren zu untersuchen sowie um die Anwesenheit neuartiger Ceramidklassen zu erkunden.

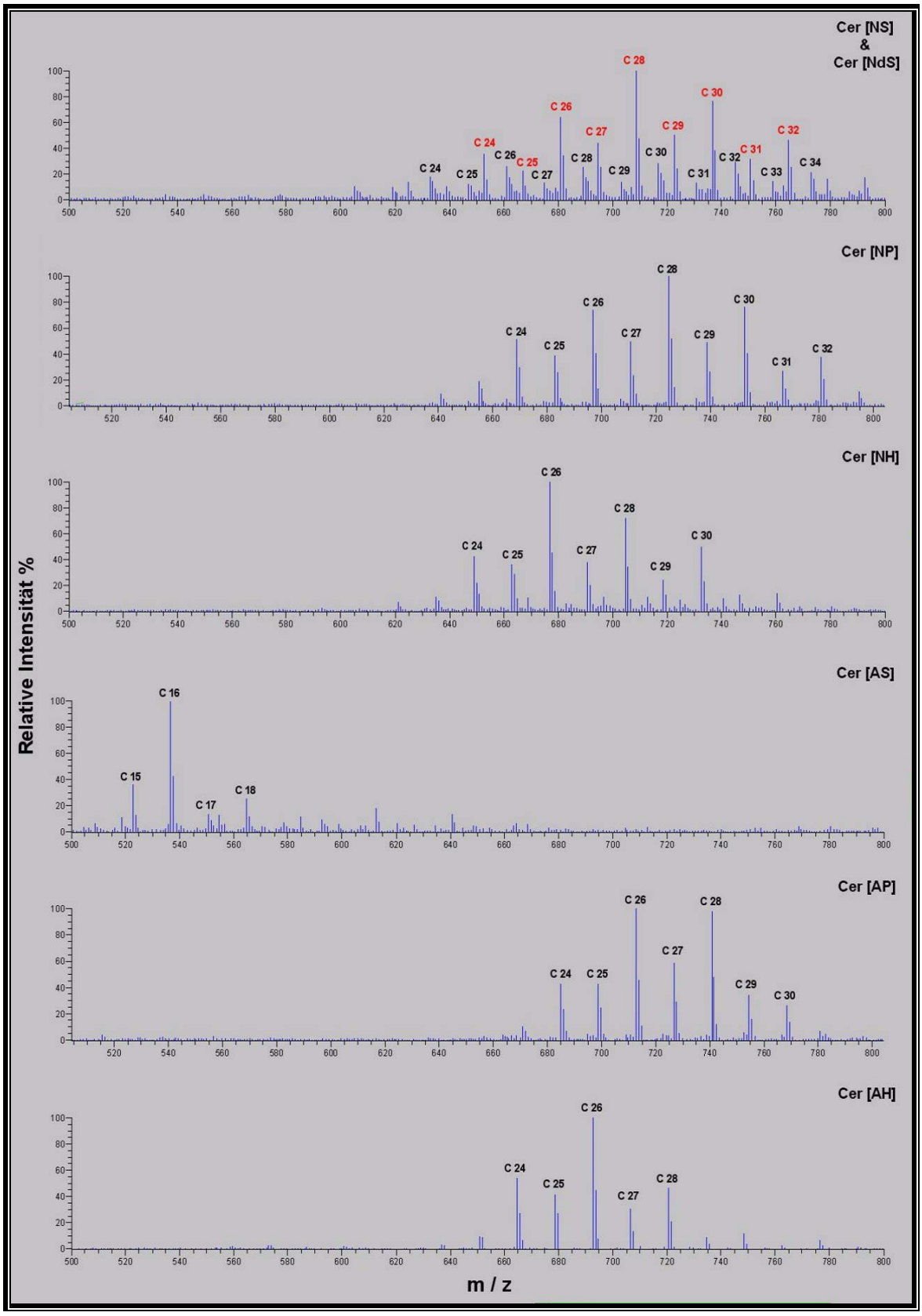

Abbildung 22: Massenspektrometrische Profile (Varianten der Kettenlängen amidartig gebundener Fettsäuren) der SC-Ceramide: Cer [NS] (schwarz) und Cer [NdS] (rot), Cer [NP]; Cer [NH], Cer [AS], Cer [AP] und Cer [AH] , Kettenlänge der Sphingoidbase: C18

4.2 Untersuchung der SC-Ceramidverteilung in Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten verglichen mit gesunden Probanden

4.2.1 Die densitometrischen Profile

Die von den Probanden extrahierten Lipide wurden mit Hilfe der AMD-HPTLC aufgetrennt. Die Ceramide ihrerseits wurden dabei in 7 Klassen fraktioniert: Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOH], Cer [NS/AS] Cer [AP] und Cer [AH]. Die gesamten Ceramidmengen in µg pro cm^2 extrahierter Hautfläche sowie die prozentualen Profile wurden nach densitometrischer Evaluation bestimmt.

Tabelle 7: Die gesamten Ceramidmengen in µg / cm^2; Mittelwert ± Standardabweichung

Hautzustand	Mengen / µg per cm^2
Gesund	16,2 ± 3,5
Neurodermitis	15,3 ± 4,0
Psoriasis	11,4 ± 3,5

Aus **Tabelle 7** scheint, dass die von den nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitikern und Psoriatikern extrahierten Ceramidmengen gegenüber solchen von gesunden Probanden reduziert sind, wobei die Reduktion ein größeres Ausmaß bei Psoriatikern zeigt. Diese Differenzen sind entsprechend des durchgeführten Studenten t-Tests bei $p < 0.01$ allerdings nicht statistisch signifikant.

In **Tabelle 8** und **Abbildung 23** sind die prozentualen Profile der Ceramidklassen dargestellt. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Zusammensetzung der ausgewerteten SC-Ceramide in den nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitis- und Psoriasis-Patienten mit jener von gesunder Haut vergleichbar ist. Unter Betracht der besonderen Bedeutung der SC-Ceramide ist deshalb eine weitgehend intakte Barrierefunktion insbesondere in Bezug auf die Wasserpermeabilität dieser Hautareale zu erwarten. In dieser Hinsicht gehen die publizierten Resultate verschiedener Arbeitsgruppen auseinander. Ein Teil der Arbeiten berichtet, dass die nicht involvierten Hautstellen von einer beeinträchtigten epidermalen

Barriere betroffen sind (2, 69). Andere Ergebnisse deuten allerdings auf das Gegenteil hin (5, 96, 97).

Tabelle 8: Prozentuale Zusammensetzung einzelner Ceramidklassen relativ zur gesamten Ceramidmenge (densitometrische Bestimmung)

Haut-Zustand	Cer [EOS]	Cer [NS]	Cer [NP]	Cer [EOH]	Cer [NH/AS]	Cer [AP]	Cer [AH]
Gesund	13,7 ± 1,2	19,9 ± 1,5	16,5 ± 1,4	7,6 ± 1,3	20,7 ± 1,3	7,5 ± 1,3	14,1 ± 1,7
Neuro-dermitis	13,3 ± 2,6	20,9 ± 1,4	14,8 ± 1,7	7,1 ± 1,4	20,5 ± 1,9	8,5 ± 1,0	15,0 ± 1,8
Psoriasis	14,7 ± 2,5	19,6 ± 1,2	13,1 ± 3,1	7,3 ± 1,9	20,4 ± 2,1	8,3 ± 1,2	16,7 ± 3,0

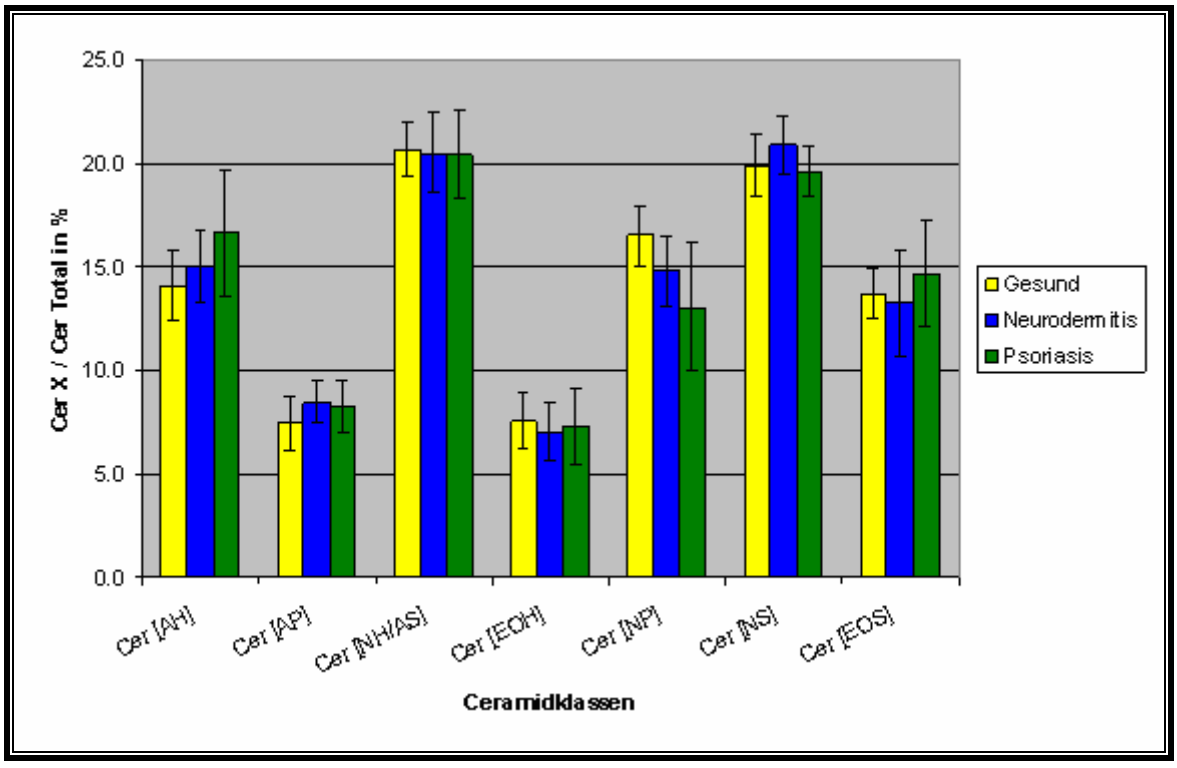

Abbildung 23: Prozentuale Zusammensetzung der SC-Ceramide nach densitometrischer Evaluation

Wie bereits vorher konstatiert, lag der Schwerpunkt der Arbeit auf den Ceramiden. Cholesterol und die freien Fettsäuren als weitere wichtige Komponenten wurden dennoch mitberücksichtigt. In **Tabelle 9** sind die entsprechenden Ergebnisse aufgeführt.

Tabelle 9: Prozentuale Zusammensetzung der Hauptlipide des SC relativ zur deren Gesamtlipidmenge (Ceramide + Cholesterol + FFS); Mittelwert ± Standardabweichung

Hautzustand	Ceramide	Cholesterol	FFS
Gesund	53,1 ± 6,3	17,0 ± 2,9	30,0 ± 5,1
Neurodermitis	48,7 ± 5,5	19,2 ± 2,4	32,1 ± 5,4.
Psoriasis	50,6 ± 10,0	18,4 ± 5,9	31,0 ± 11,7

Erneut wurden auch hier keine signifikanten Unterschiede gefunden. Vielmehr stimmen die Ergebnisse mit zuvor publizierten Daten über die prozentuale Zusammensetzung der SC-Lipide von gesunden Menschen überein (156). Eine Abweichung liegt jedoch bei den freien Fettsäuren vor, die etwas höhere Werte zeigen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass zwischen den Fettsäuren des SC und jenen aus dem Sebum mittels HPTLC-Trennung nicht unterschieden werden kann.

4.2.2 Die massenspektrometrischen Profile

Um die molekulare Zusammensetzung der Ceramidklassen in gesunden und in nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitis und Psoriasis zu durchleuchten, eventuell bestehende Differenzen festzustellen und für diagnostische Zwecke zu verwenden, wurde die entwickelte Methode der HPLC/APCI-MS herangezogen (47). Die mittels der unter Abschnitt 3.2 beschriebenen *in vivo* Extraktionsmethode gewonnen Hautlipide wurden vorab mit Hilfe der AMD-HPTLC und anschließender densitometrischer Auswertung analysiert. Dadurch ließen sich die Gesamtmengen der Ceramide in jeder Probe bestimmen. Auf der Basis dessen wurden bei der HPLC/APCI-MS immer die gleichen Mengen an Ceramiden (5µg Gesamtmenge / Probe) appliziert. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte nur während der Elution der Ceramide. Die anderen Lipide (z.B. Sebumlipide), die zuvor oder danach eluierten wurden über ein Schaltventil abgeleitet und deshalb nicht erfasst. Dadurch wurden störende Signalunterdrückungseffekte vermieden. Das optimale Zeitfenster, in dem die Ceramide eluierten, wurde durch Vorexperimente bestimmt. Die Erstellung der massenspektrometischen Profile innerhalb jeder Ceramidklasse erfolgte anhand der relativen Häufigkeit der sich in der Kettenlänge der amidartig gebundenen Fettsäuren unterscheidenden Spezies. Dazu wurden die Peakflächen aller detektierten

Ceramidmoleküle errechnet und ins Verhältnis zur größten Peakfläche gesetzt. Zu beachten ist, dass innerhalb einer Ceramidklasse ein Peak verschiedene Spezies mit gleichem Molekulargewicht repräsentieren könnte. Dies kommt bei solchen Spezies vor, die bei konstanter Anzahl der gesamten Kohlenstoffatome verschiedene Verteilungen in den Kettenlängen der Sphingoidbasen und der amidartig gebundenen Fettsäuren aufweisen. Eine Unterscheidungsmöglichkeit solcher Spezies ist anhand von Fragmentierungs-experimenten möglich, deren Durchführung bei der großen Anzahl der detektierten Moleküle jedoch weit über die Zielsetzung dieser Arbeit hinausgeht. Ferner stellt die vorausgesetzte Kettenlänge von C18 die häufigste Variante bei den meisten Sphingoidbasen dar, was die Wahrscheinlichkeit einer Verwechslung zwar nicht ausschließt aber gering hält.

Der Vergleich der Ceramidprofile wurde angefertigt, indem die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der relativen Häufigkeiten von jeder der detektierten Spezies innerhalb jeder der drei untersuchten Gruppen (Gesund, Neurodermitis, Psoriasis) vorab errechnet wurden. Die statistische Absicherung erfolgte sodann mittels des t-Tests nach Student zum Signifikanzniveau $p < 0{,}01$.

Tabelle 10: Die prozentuale Zusammensetzung der Spezies der ω-veresterten Ceramide: Cer [EOS], Cer [EOP] und Cer [EOH]

Kettenlänge der amidartig gebundenen Fettsäuren	Cer [EOS]	Cer [EOP]	Cer [EOH]
C 30	20 ± 9	44 ± 8	66 ± 8
C 31	17 ± 7	20 ± 5	35 ± 1
C 32	55 ± 17	61 ± 9	100 ± 0
C 33	33 ± 11	44 ± 10	31 ± 2
C 34	100 ± 0	100 ± 0	41 ± 2
C 35	32 ± 2	34 ± 5	
C 36	36 ± 5	34 ± 7	

In den **Tabellen 10 und 11** sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der relativen Häufigkeiten aller detektierten Ceramidmoleküle bei gesunden Probanden angegeben, auf die sich der Vergleich bezog. Bei den ω-veresterten Ceramiden Cer [EOS] und Cer [EOP] lässt sich feststellen, dass die Spezies der Kettenlänge C34 am häufigsten auftreten, während bei dem weniger lipophilen Cer [EOH] der Spezies C32 dominiert.
Im Falle der einfacher gebauten Ceramide lässt sich beobachten, dass die Varianten C26 und/oder C28 bei Cer [NdS], Cer [NP], Cer [NH], Cer [AP] und Cer [AH] überwiegen, wobei bei Cer [AS] die Variante C16 am häufigsten vorkommt. Indessen sind C30 und C32 die dominierenden Spezies bei Cer [NS]. Inwiefern dies mit den weitgehend unentschlüsselten Funktionen jeder Klasse in Verbindung steht, bleibt zu untersuchen.

Tabelle 11: Die prozentuale Zusammensetzung der Spezies von Cer [NS], Cer [NdS], Cer [NP], Cer [NH], Cer [AS], Cer [AP] und Cer [NH]

Kettenlänge der amidartig gebundenen Fettsäuren	Cer [NS]	Cer [NdS]	Cer [NP]	Cer [NH]	Cer [AS]	Cer [AP]	Cer [AH]
C15					33 ± 6		
C16					100 ± 0		
C17					22 ± 4		
C18					35 ± 10		
C24	59 ± 14	33 ± 7	49 ± 10	27 ± 6		90 ± 11	59 ± 15
C25	40± 13	24 ± 3	35 ± 5	38 ± 8		49 ± 3	41 ± 6
C26	71 ± 13	67 ± 5	66 ± 4	100 ± 0		85 ± 8	100 ± 0
C27	34 ± 5	42 ± 3	40 ± 4	39 ± 2		45 ± 6	30 ± 3
C28	79 ± 13	100 ± 0	100 ± 0	75 ± 7		93 ± 8	50 ± 7
C29	39 ± 4	49 ± 2	50 ± 4	28 ± 3		32 ± 2	
C30	83 ± 10	93 ± 7	89 ± 5	64 ± 10		33 ± 5	
C31	47 ± 6	38 ± 3	30 ± 1				
C32	98 ± 5	62 ± 7	42 ± 4				
C33	38 ± 9						
C34	71 ± 14						

In **Abbildung 24** ist der Vergleich der massenspektrometrischen Profile von Cer [EOS] dargestellt. Den Literaturangaben entsprechend gehört Cer [EOS] zu den Ceramidklassen, die sowohl bei Neurodermitis als auch bei Psoriasis eine starke Verringerung aufweisen (19, 103, 169). Zu erwarten wäre daher, dass eine solche Beeinträchtigung auf molekularer Ebene sich auch in den nicht involvierten Hautstellen widerspiegelt.

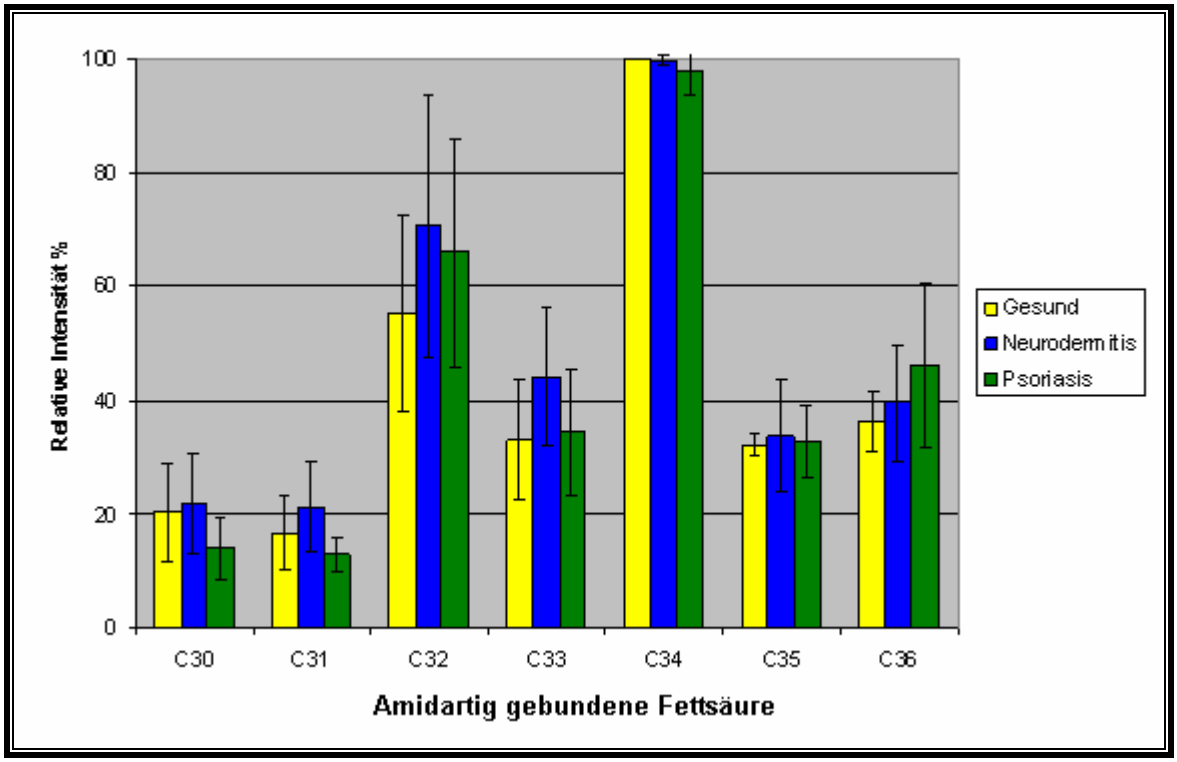

Abbildung 24: Vergleich der MS-Profile von Cer [EOS]

Weder bei Neurodermitis noch bei Psoriasis wurden allerdings signifikante Unterschiede gefunden.

Erwähnenswert an dieser Stelle ist, dass sowohl bei den Neurodermitis- als auch bei den Psoriasis-Patienten keine Spezies gefunden wurden, bei denen an ω-Stellung der amidartig gebundenen Fettsäuren Linolsäure durch Ölsäure ersetzt war. Dies galt nicht nur für Cer [EOS], sondern auch für die anderen langkettigen Ceramide: Cer [EOP] und Cer [EOH]. Dies lässt den Einbau von Ölsäure anstelle von Linolsäure als mögliche Ursache für die Beschädigung der epidermalen Barrierefunktion bei beiden Krankheiten fraglich erscheinen.

Signifikanten Unterschiede wurden bei Cer [EOP] und Cer [EOH] nicht gefunden, deren massenspektrometrische Profile in **Abbildung 25** und **26** gezeigt sind.

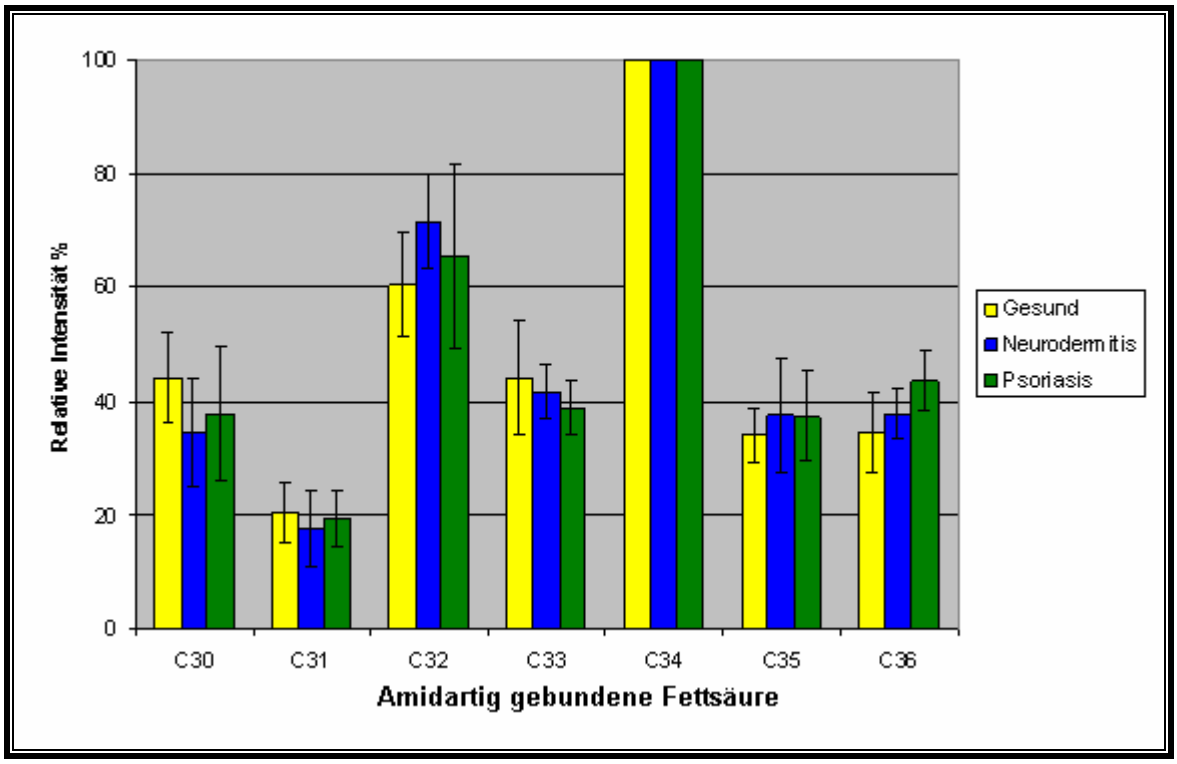

Abbildung 25: Vergleich der MS-Profile von Cer [EOP]

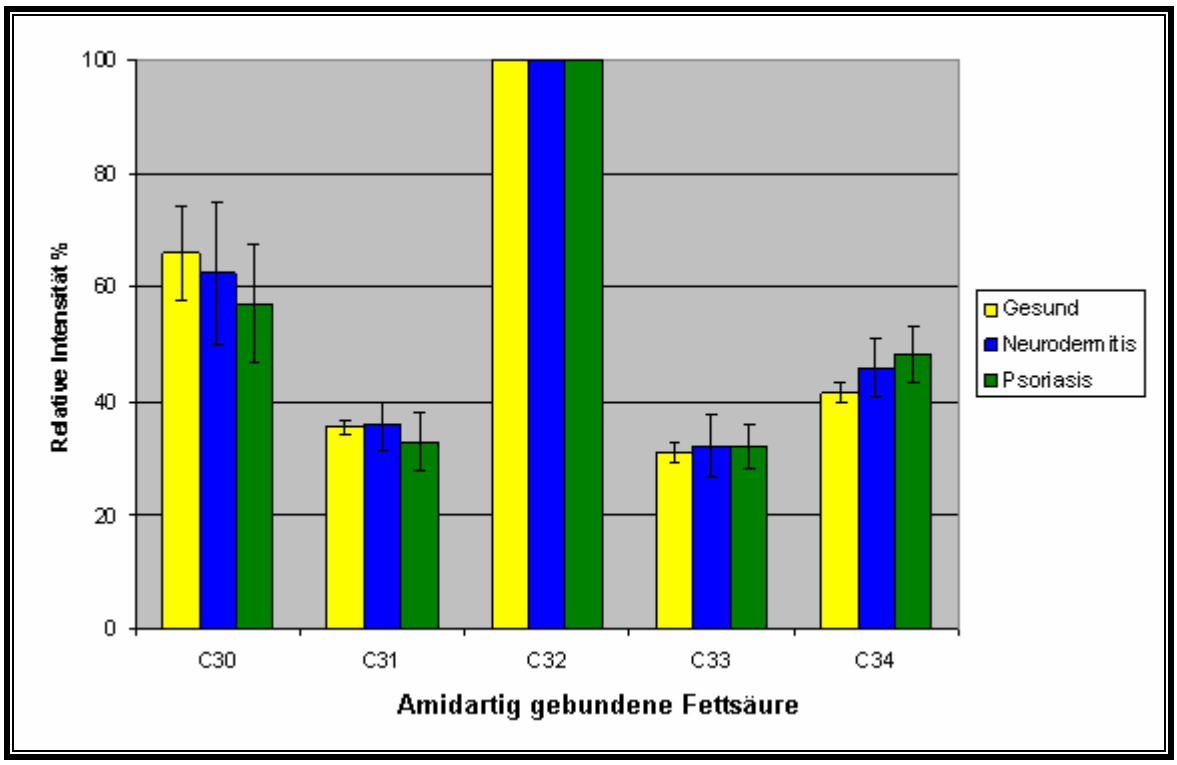

Abbildung 26: Vergleich der MS-Profile von Cer [EOH]

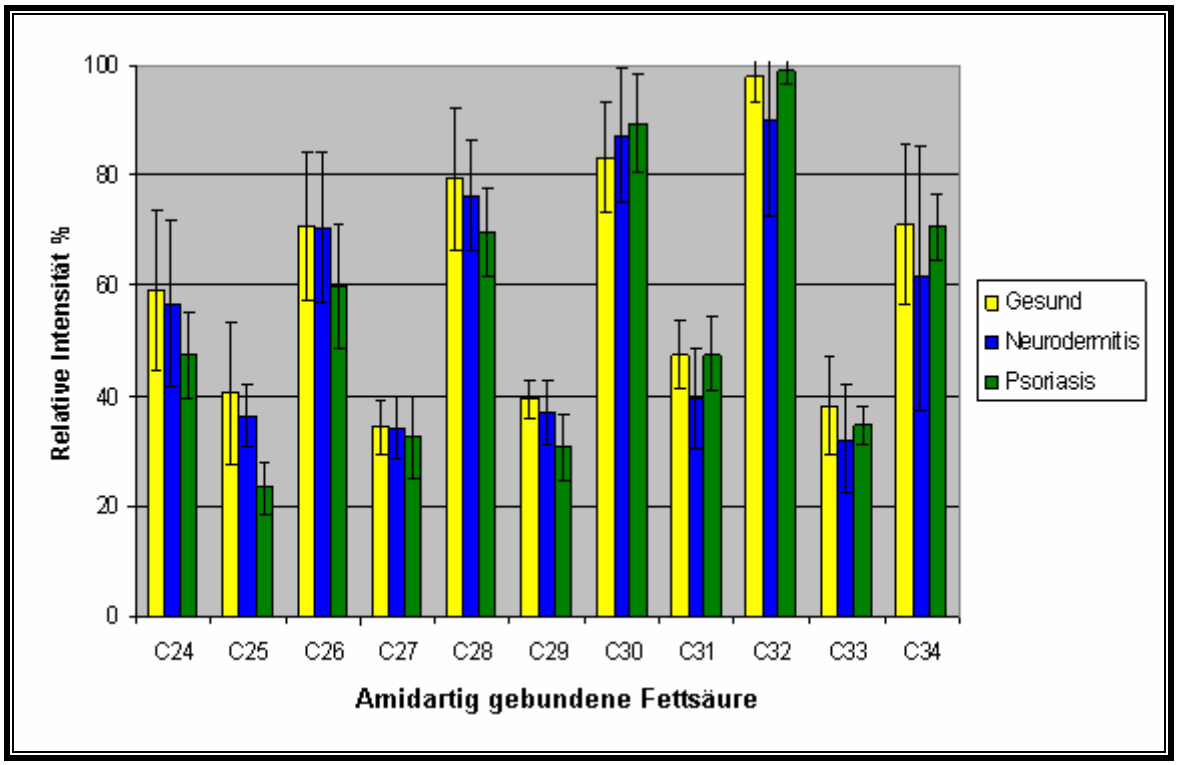

Abbildung 27: Vergleich der MS-Profile von Cer [NS]

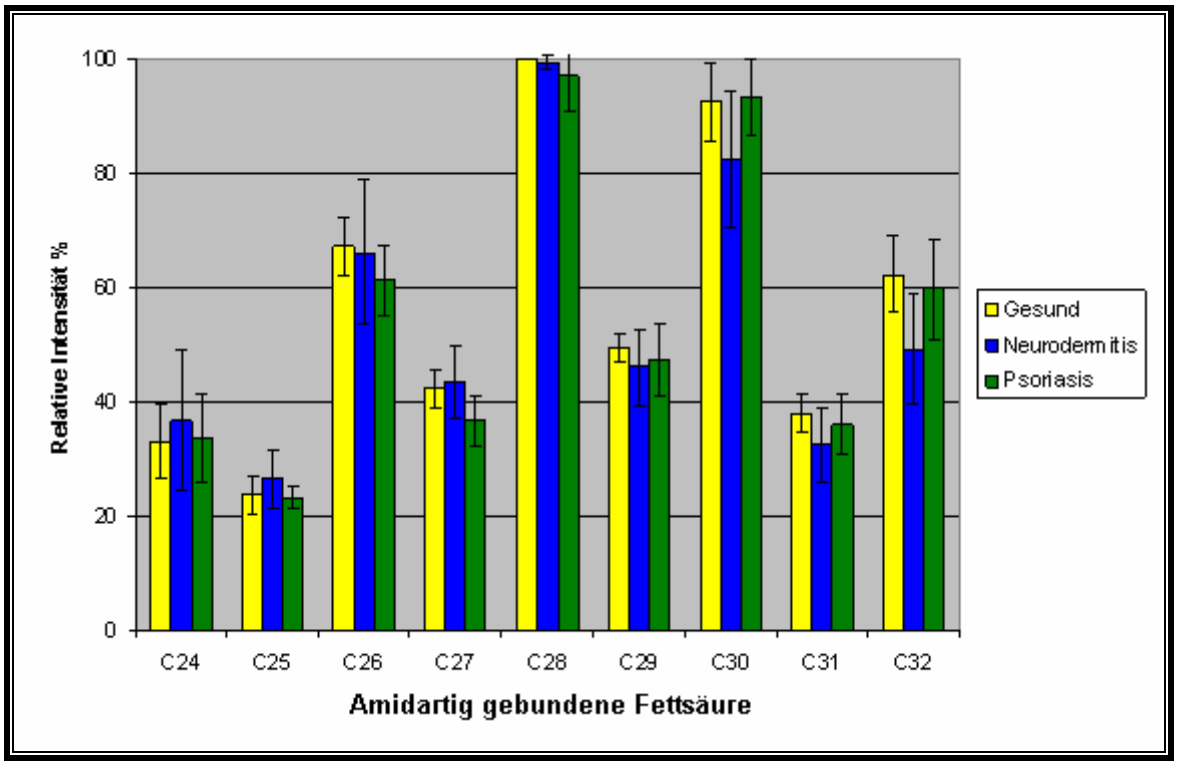

Abbildung 28: Vergleich der MS-Profile von Cer [NdS]

In **Abbildung 27 und 28** sind die Vergleiche der MS-Profile von Cer [NS] und Cer [NdS] dargestellt.

Vorherigen Arbeiten zufolge sollte die Menge an Cer [NS] bei Psoriasis zunehmen (19, 103). Differenzen wurden allerdings weder bei Psoriasis- noch bei Neurodermitis-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Cer [NdS] erhalten.

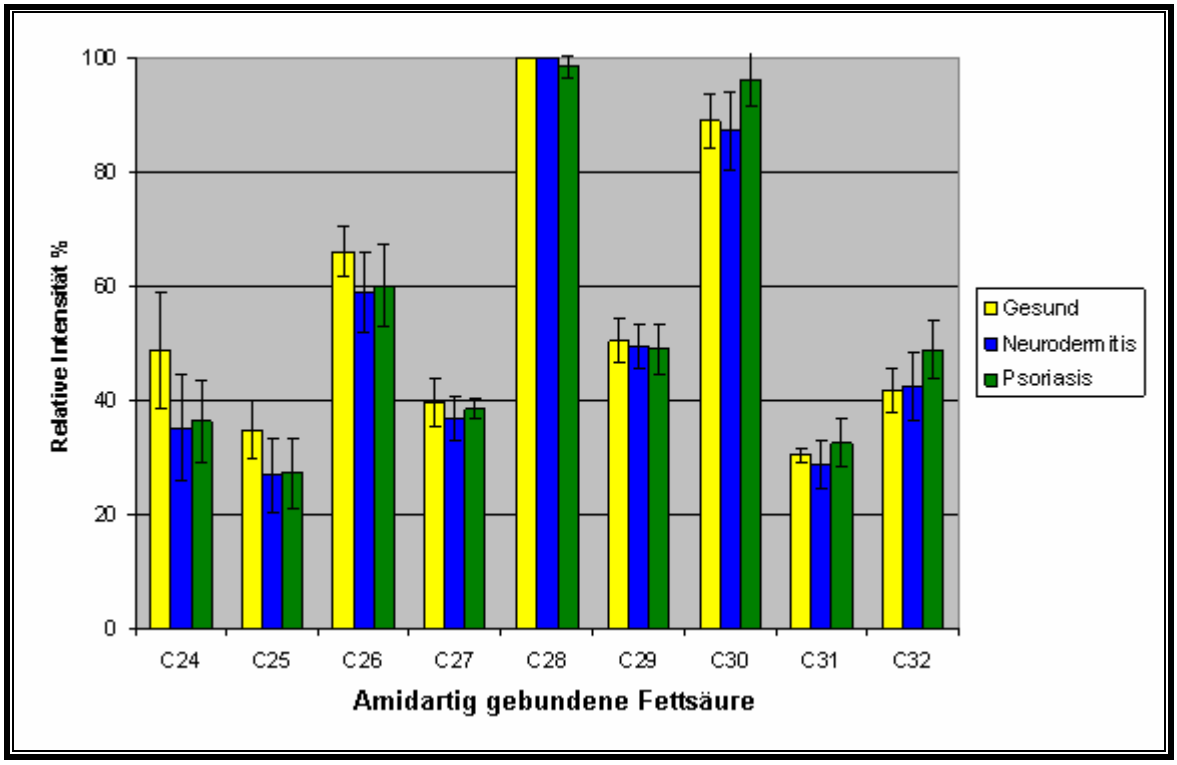

Abbildung 29: Vergleich der MS-Profile von Cer [NP]

Es wurde berichtet, dass sowohl Neurodermitis als auch Psoriasis mit einer Reduktion an Cer [NP] einhergehen und dass diese Reduktion bei Neurodermitis mit einem erhöhten TEWL korreliert (19, 27, 103). Beeinträchtigungen im massenspektrometrischen Verteilungsprofil dieser Ceramidklasse **(Abbildung 29)** wurden dennoch bei keiner der beiden Krankheiten in den nicht involvierten Stellen angetroffen.

Laut einer Arbeit von Bleck et al. spaltet sich Cer [AS] aus gesund erscheinender Haut bei dünnschichtchromatographischer Trennung in zwei Subfraktionen, die für Neurodermitis charakteristisch sein sollten (6). Die massenspektrometrischen Profile von Cer [NH] als auch vom benachbarten Cer [AS] **(Abbildung 30 und 31)** zeigen allerdings weder im Falle von Neurodermitis noch im Falle von Psoriasis charakteristische Unterschiede im Vergleich

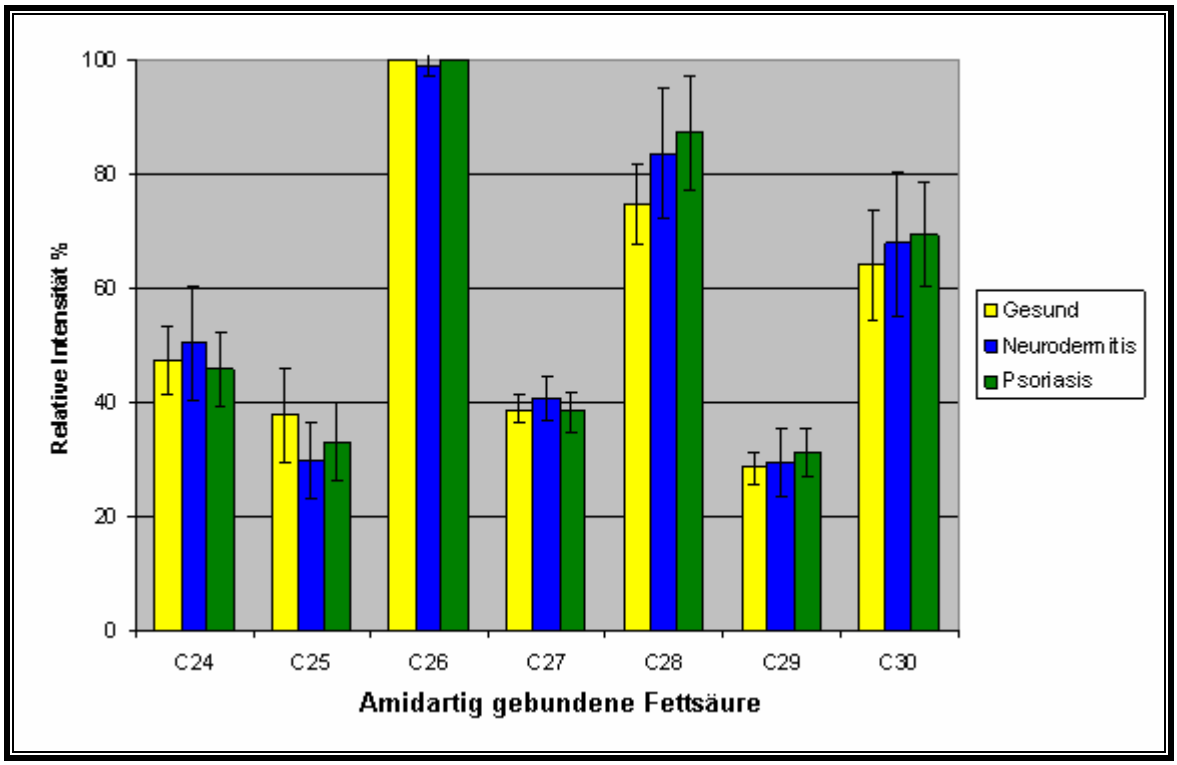

Abbildung 30: Vergleich der MS-Profile von Cer [NH]

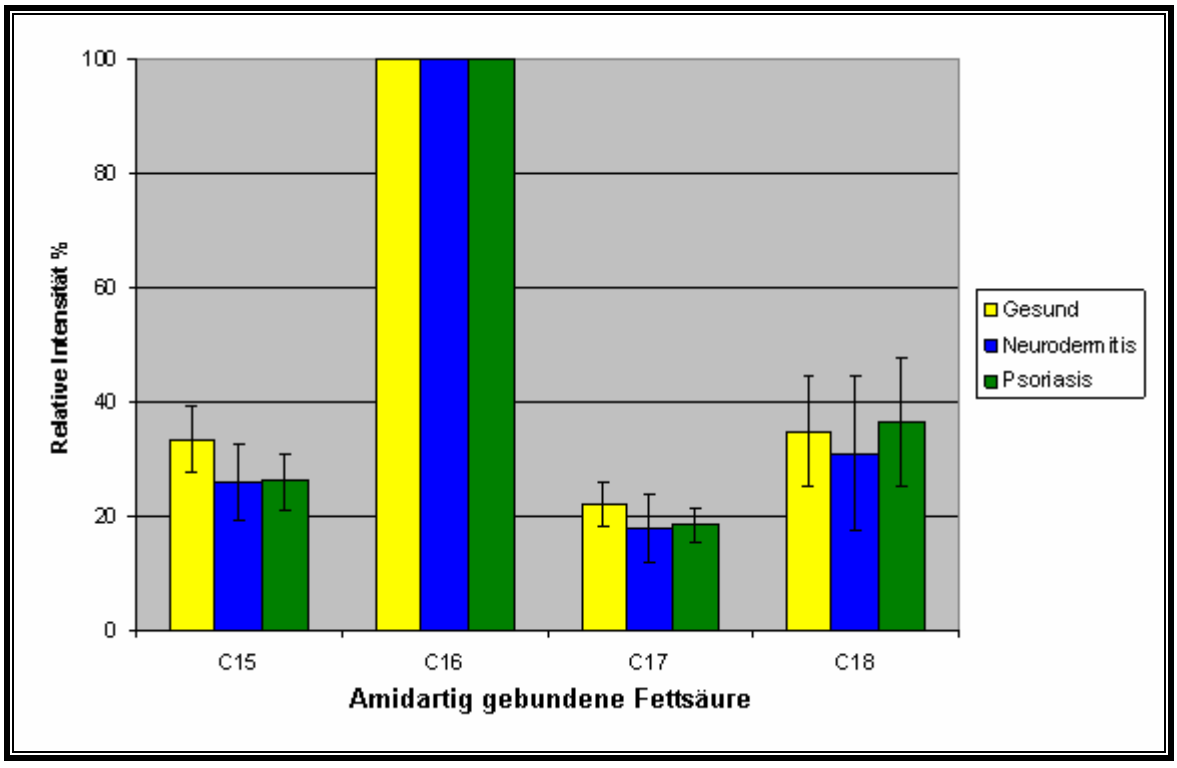

Abbildung 31: Vergleich der MS-Profile von Cer [AS]

zu den Kontrollen. Diese Daten weisen darauf hin, dass es sich bei den Subfraktionen um Cer [AS] und Cer [NH] handelt, die auf Grund gleicher Polaritätseigenschaften bei TLC-Trennung normalerweise überlappen und in Folge einer Aciditätserhöhung bei der verwendeten Lösungsmittelzusammensetzung eine partielle Auflösung erfahren.

Unter den bekannten Ceramidklassen stellen Cer [AP] und Cer [NH] die polarsten Fraktionen dar. Bei Psoriasis wurde berichtet, dass reduzierte Mengen an Cer [AP] vorliegen (19). Außerdem zeigen Individuen mit verringertem Level an Cer [AP] eine höhere Neigung Kontaktdermatitis oder Irritationen zu entwickeln, wenn ihnen Detergenzien oder Lösungsmittel auf die Haut appliziert werden (19, 26). Zu Cer [NH] liegen kaum Literaturangaben vor.

In den **Abbildungen 32 und 33** sind die Vergleiche der massenspektrometrischen Profile von Cer [AP] und Cer [AH] gezeigt. Bei keiner der beiden Krankheiten lagen bei den untersuchten Hautstellen signifikante Unterschiede zum Verteilungsmuster gesunder Probanden vor; ein Resultat, das in Übereinstimmung mit solchen aller anderen Ceramidklassen ist.

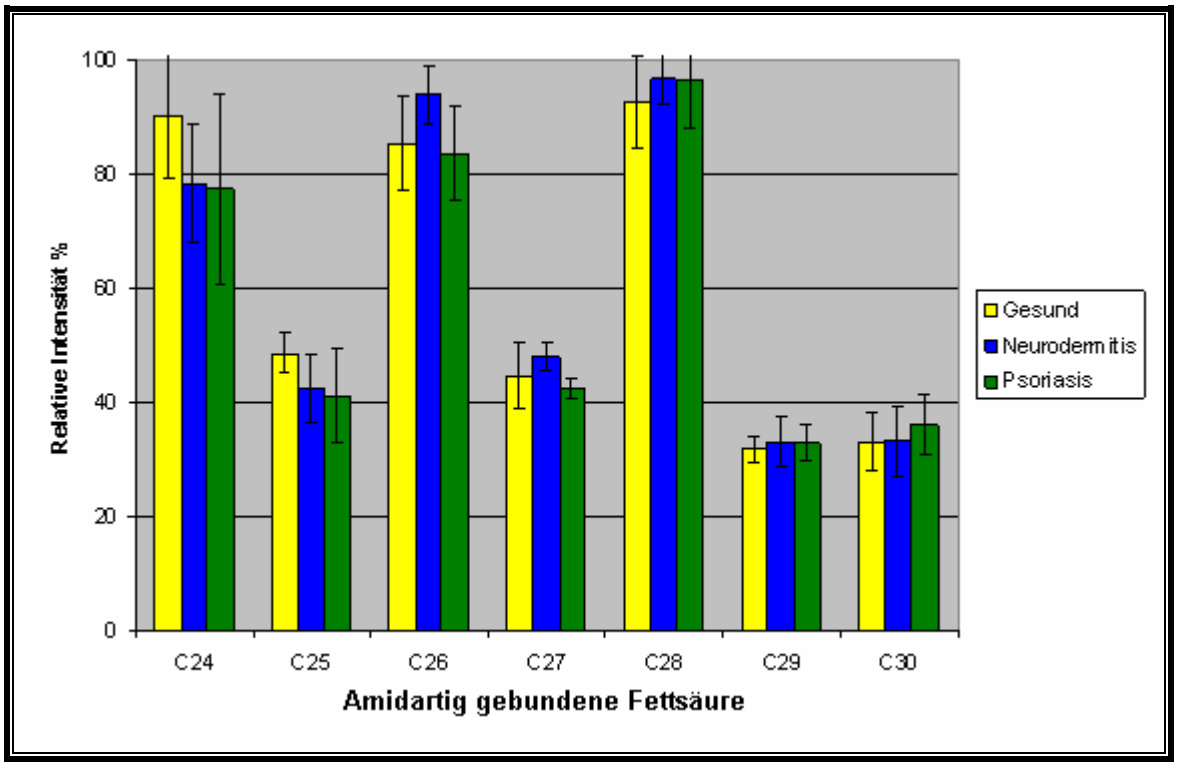

Abbildung 32: Vergleich der MS-Profile von Cer [AP]

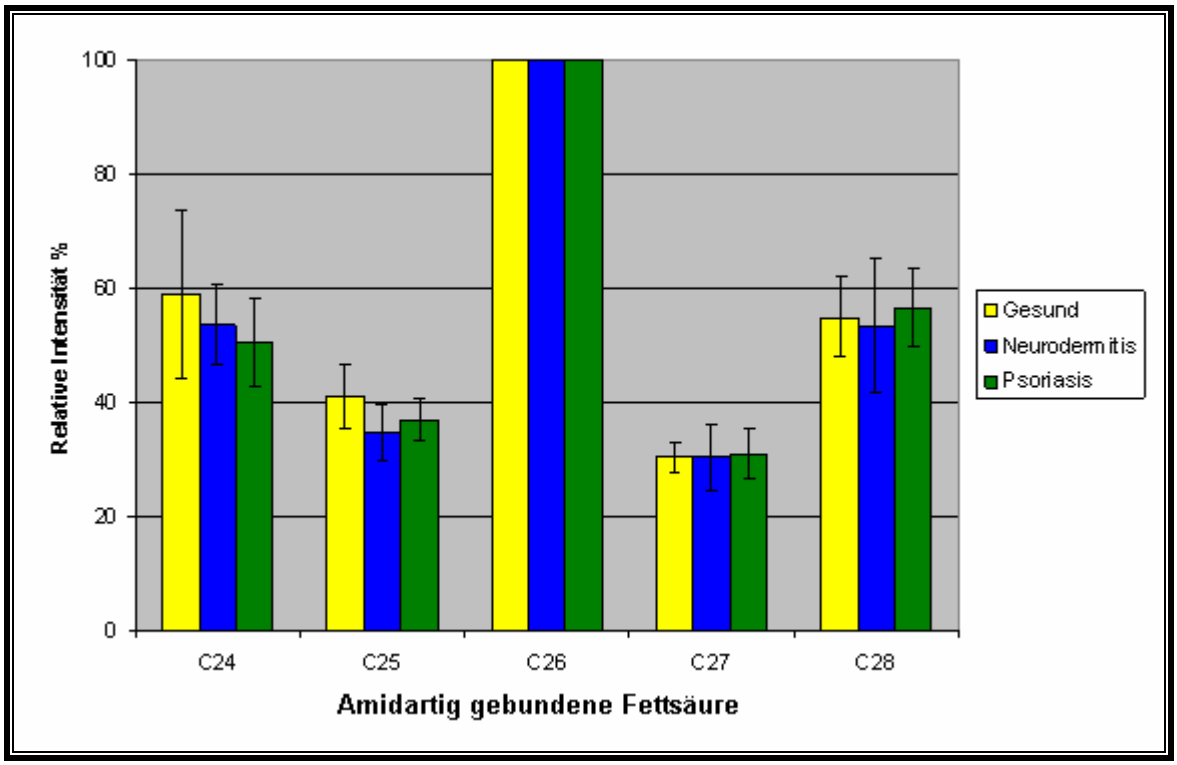

Abbildung 33: Vergleich der MS-Profile von Cer [AH]

Als Fazit der in diesem Kapitel aufgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen lässt sich folgern, dass die nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitis und Psoriasis im Hinblick auf die massenspektrometrischen Ceramidprofile von den gesunden Arealen nicht differenzierbar sind; ein Ergebnis, das in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der densitometrischen Profilen steht und die Frage aufwirft, ob die „gesund erscheinenden Hautareale“ bei den beiden Krankheiten hinsichtlich der Zusammensetzung der SC-Lipide und insbesondere der SC-Ceramide nicht tatsächlich gesund sind.

4.3 Eignung der SC-Ceramide in den nicht involvierten Stellen bei Neurodermitis und Psoriasis für diagnostische Zwecke

Zur Überprüfung der Eignung von Ceramidprofilen in den nicht involvierten Hautarealen bei Neurodermitis und Psoriasis für diagnostische Zwecke wurde eine klinische Studie durchgeführt. Dabei wurden nur Patienten einbezogen, die die Kriterien eines EASI > 15 Punkte oder eines PASI > 20 Punkte erfüllten. Neurodermitis- oder Psoriasis-Patienten mit solchen Kriterien sollten nämlich eventuell vorhandenen Beeinträchtigungen des Ceramidmusters in den nicht involvierten Haustellen zu einem signifikanten Ausmaß aufweisen. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Diagnose der Krankheiten, die Selektion der zu untersuchenden Hautstellen sowie die Lipidextraktionen von einem erfahrenen Dermatologen durchgeführt wurden.

Obgleich man davon ausgeht, dass verschiedene Extraktionsprotokolle unterschiedliche Ergebnisse liefern können, haben vorherige Ergebnisse belegt, dass das Extraktionsresultat von der Invasivität der eingesetzten Methoden und von der SC-Tiefe nicht abhängt (86, 156). Nach Arbeiten von Weerheim et al. (156) beläuft sich die durchschnittliche relative Zusammensetzug der SC-Lipide auf 60 % Ceramide, 18 % Cholesterol und 22 % freie Fettsäuren. Bei den Ceramidklassen beträgt sie 8,6 % Cer [EOS], 22,9 % Cer [NS], 18,4 % Cer [NP], 7,1 % Cer [EOH], 21,3 % Cer [NS/AS], 6,3 % Cer [AP] und 15,6 % Cer [AH]. Diese sich auf die Unterarme gesunder Probanden beziehenden Daten stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse aller Probandengruppen weitgehend überein **(Tabelle 8, 9)**.

Bei Neurodermitis wurde darüber berichtet, dass Beeinträchtigungen der Ceramidzusammensetzung im SC für die Krankheit einen etiologischen Faktor darstellen (69). Dabei sollte Cer [EOS] sowohl in den involvierten als auch in den nicht involvierten Stellen am meisten von allen Ceramidklassen betroffen sein. Bleck et al. zeigten, dass Cer [AS] aus den nicht läsionierten Hautarealen sich in auf HPTLC Platten in zwei diskrete vermeintlich für die Neurodermitis charakteristische Banden aufspaltet (6). Außerdem wurde gefunden, dass der geringere Gehalt an Cer [NP] mit einem vermehrten transepidermalen Wasserverlust sowohl in den involvierten als auch in den nicht involvierten Hautstellen korreliert (27). Einer aktuellen Arbeit zufolge (93) zeigen Neurodermitis-Patienten verminderte Mengen an Cer [EOH]. Unter biochemischen Gesichtspunkten wurden neuerdings die Enzyme Sphingomyelin-Deacylase,

Glucosylceramid-Deacylase sowie eine Ceramidase bakteriellen Ursprungs als mögliche Ursachen für Defizite an Ceramiden verantwortlich gemacht (64, 71, 81, 111). Untersuchungen zu den Aktivitäten der für den Sphingolipidstoffwechsel maßgeblichen Enzyme, namentlich der β-Glucocerebrosidase und der sauren Sphingomyelinase ergaben bei erkrankten Probanden nahezu normale Werte (64, 71, 72, 106). In einem anderen Kontext wurde bei den Neurodermitis-Patienten eine in klinischer und funktioneller Hinsicht „Zwischenpopulation" definiert (27), die hinsichtlich der Zusammensetzung der SC-Lipide eine mittlere Position zwischen eindeutig erkrankten und klar gesunden Menschen einnimmt. Eine von Matsumoto et al. durchgeführte Studie offenbarte, dass die Verminderung der Gesamtceramidmenge sowie der Menge an Cer [EOS] sich auf die involvierten Stellen beschränkt (97). Entsprechende Veränderungen bei nicht involvierten Arealen wurden nicht gefunden. Außerdem wurde von der selben Gruppe in einer anderen Arbeit berichtet, dass über 5 Jahre symptomfreie Patienten normale Werte des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL) sowie des Wassergehalts zeigen (96), was auf eine intakte Barriere hinweist. Angesichts der Tatsache, dass den Ceramiden bei der Aufrechterhaltung der epidermalen Wasserpermeabilitätsbarriere und allgemein der Barrierefunktion der Haut eine essentielle Rolle zukommt, stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit diesen Befunden im Einklang. Weder die absoluten und relativen Mengen **(Tabelle 7 und 8, Abbildung 23)** noch die massenspektrometrischen Profile **(Abbildungen 24-33)** der SC-Ceramide, in den nicht involvierten Hautstellen weisen signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollen auf.

In psoriatischer Haut wurde bei vorherigen Arbeiten gefunden, dass Cer [EOS], Cer [NP], Cer [EOH], Cer [AS] and Cer [AP] eine Abnahme erfahren, wogegen Cer [NS] zunimmt (19, 105). Es ist überdies vermutet worden, dass die Abnahme an Cer [EOS] und Cer [EOH] für die verminderte Barrierefunktion verantwortlich ist (19). Alessandrini et al. ihrerseits berichteten, dass die Menge an Prosaposin, einem Aktivatorprotein im Stoffwechsel der Sphingolipide, bei Patienten mit Psoriasis vulgaris im Vergleich zu gesunden Probanden reduziert ist (2). Sie vermerkten aber, dass die Reduktion in den involvierten (läsionierten) Hautstellen ausgeprägter als in den nicht involvierten ist. Versuchen von Berardesca et al. zufolge wurde gezeigt, dass sowohl der TEWL als auch der Wassergehalt in den nicht involvierten Hautstellen von Psoriasis-Patienten sich von solchen bei gesunder Haut nicht unterscheiden (5). Die im Laufe der vorliegenden Arbeit

erhaltenen Resultate **(Tabelle 7 und 8, Abbildung 23-33)** unterstützen die Ergebnisse von Berardesca et al.

Gemäß der hier dargelegten Argumentationen lässt sich schlussfolgern, dass die Zusammensetzung der SC-Ceramide und der anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SC-Lipide in den nicht involvierten Arealen bei Neurodermitis und Psoriasis mit solcher von gesunder Haut vergleichbar ist. Dementsprechend können die SC-Lipide und vor allem die Ceramide in diesen Arealen bei beiden Krankheiten nicht als diagnostische Marker eingesetzt werden. Zusätzlich weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Veränderungen in der Zusammensetzung der SC-Ceramide oder deren Biosynthesen in den involvierten Hautbereichen keine obligatorischen Ursachen weder für Neurodermitis noch für Psoriasis darstellen. Wäre dies der Fall gewesen, dann hätten sich signifikante Differenzen der Ceramidzusammensetzung zwischen gesunden und erkrankten Probanden manifestiert. Es ist jedoch einzuschränken, dass die epidermale Barrierefunktion nicht nur auf den interzellulären Lipiden beruht, sondern auch andere Komponenten wie die Protein- oder Lipidhülle, die Lipidorganisation, sowie die Korneozyten beinhaltet.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Fragestellung, ob die SC-Ceramidprofile in den nicht involvierten Hautstellen bei Neurodermitis und Psoriasis signifikante und spezifische Unterschiede gegenüber gesunder Haut aufweisen, die dazu genutzt werden können, um charakteristische diagnostische Merkmale für beide Krankheiten zu definieren. Es sollten dabei nicht nur die Veränderungen auf der Ebene der bekannten Ceramidklassen, sondern auch auf der molekularen Ebene jeder Klasse untersucht werden.

Dazu wurde nach erhaltener Genehmigung seitens der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Witteberg zur Durchführung einer *in vivo* Studie ein Probandenkollektiv aus insgesamt 20 Probanden (7 gesunde, 7 Neurodermitiker, 6 Psoriatiker) anhand strenger Kriterien ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren EASI-Werte > 15 Punkte für Neurodermitiker und PASI-Werte > 20 Punkte für Psoriatiker. Patienten mit solchen Werten weisen beschädigte epidermale Barrierefunktion auf, mit der erwartungsgemäß eine Beeinträchtigung im Ceramidmuster einhergeht.

Um die für die Realisierung der beabsichtigten Untersuchungen unerlässlichen analytischen Voraussetzungen zu erfüllen wurden zunächst eine Lipidgewinnungs-, eine AMD-HPTLC- und eine HPLC/APCI-MS-Methode entwickelt.

Die zur Gewinnung der SC-Lipide entwickelte Methode beruhte auf einer In-vivo-Oberflächenextraktion mit einer verbesserten Lösungsmittelzusammensetzung (Hexan: Ethanol, 2:1, V/V). Die Durchführung der Lipidgewinnung erfolgte, indem ein mit der Extraktionsmischung gefüllter Glasbehälter für eine genau definierte Zeit (5 min) gegen die zu extrahierende Hautfläche mittels einer eigens konstruierten Vorrichtung gepresst wurde. Die dabei herausgelösten Lipide waren in qualitativer und quantitativer Hinsicht mit solchen anderer Extraktionsmethoden vergleichbar. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die Compliance der Patienten, die Effizienz der Lipidgewinnung und die Praktikabilität in der Durchführung den Extraktionsbedingungen zu Grunde lagen.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten AMD-HPTLC-Methode handelte es sich um eine Dünnschichtchromatographie von SC-Lipiden auf der Basis einer automatisierten Mehrfachentwicklung. Mit Hilfe eines 17 stufigen Gradienten aus Mischungen der Lösungsmitteln: Chloroform, Aceton, Ethanol, Hexan und Ethylacetat konnte unter essigsauren Bedingungen eine gute Trennung der anderen SC-Lipide von den SC-

Ceramidklassen sowie der Ceramidklassen untereinander erstmalig in einem Lauf erzielt werden. Die aufgetrennten Ceramidklassen waren Cer [EOS], Cer [NS], Cer [NP], Cer [EOS], Cer [NH/AS], Cer [AP] und Cer [AH]. Cer [NH] und Cer [AS] waren auf Grund sehr ähnlicher Retention allerdings nicht voneinander zu trennen. Dazu wäre, wie in mehreren Arbeiten beschrieben, eine vorherige Acetylierung notwendig. Zur Quantifizierung der zuvor mittels Tauchen in eine $CuSO_4$-Reagenzlösung und anschließender Veraschung visualisierten Banden der aufgetrennten Lipide wurde die densitometrische Detektion im Reflektionsmodus herangezogen. Dabei betrug das durchschnittliche Detektionslimit 50 ng, während die Standardabweichung je nach Lipid im Bereich zwischen 0,2 und 10 % lag. Die automatische Entwicklung der Platten, die Möglichkeit zur Bearbeitung einer größeren Probenanzahl in relativ kurzer Zeit und mit vergleichsmäßig wenig Verbrauch an Lösungsmitteln sowie die verbesserte Quantifizierbarkeit auf Grund schärferer Banden der getrennten Lipide waren Vorteile, die dazu bewogen haben, nicht die klassischen dünnschichtchromatographischen Methoden anzuwenden, sondern eine neue AMD-HPTLC-Methode zu entwickeln.

Bei den Probandenuntersuchungen wurde die AMD-HPTLC mit anschließender densitometrischer Evaluation dazu verwendet, die prozentualen Anteile der Ceramidklassen in gesunden und erkrankten Probanden zu bestimmen und gegenüberzustellen. Quantifiziert und verglichen wurden auch die Mengen von Cholesterol und den freien Fettsäuren sowie die Gesamtceramidmengen.

Mit dem Ziel, die molekulare Zusammensetzung jeder Ceramidklasse bei gesunden und erkrankten Probanden zu untersuchen und im Detail zu vergleichen, wurde eine neue Methode der HPLC/APCI-MS entwickelt, die eine leistungsfähige Normalphasentrennung mit einer selektiven massenspektrometrischen Detektion vereinigte. Die dabei erzielte Nachweisgrenze betrug durchschnittlich 50 ng. Durch die entwickelte HPLC/APCI-MS-Methode ließen sich erstmalig sowohl die Trennung aller bekannten Ceramidklassen einschließlich des neu entdeckten Cer [EOP] als auch die gleichzeitige Online-Erfassung der molekularen Profile bewerkstelligen. Als molekulare Profile der Ceramidspezies wurde die Verteilung der amidartig gebundenen Fettsäuren bei vorausgesetzter Kettenlänge der Sphingoidbasen von C18 definiert. Hervorzuheben ist außerdem die mittels dieser Methode ermöglichte Analytik der bedeutenden langkettigen ω-veresterten Ceramide wie Cer [EOS] und Cer [EOH], die anderen massenspektrometrischen Detektionsmethoden nicht zugänglichen waren.

Die Evaluation der Probandenuntersuchungen mit den oben genannten analytischen Methoden ergaben, dass weder die Profile der Ceramidklassen (densitometrische Profile) noch die molekularen Zusammensetzungen der Ceramidspezies (massenspektrometrische Profile) in den nicht involvierten Hautarealen von Neurodermitis- oder Psoriasis-Patienten signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zu denjenigen in gesunden Probanden aufweisen. Demzufolge können die Ceramide in diesen Arealen nicht für diagnostische Zwecke herangezogen werden. Zudem lässt dieses Ergebnis davon ausgehen, dass es sich bei Neurodermitis und Psoriasis nicht um generalisierte Hautkrankheiten handelt, die alle Hautstellen in unterschiedlichen Ausprägungen betreffen. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die von anderen Gruppen berichteten Beeinträchtigungen der Ceramidprofile bei beiden Erkrankungen Folgen entzündlicher Reaktionen darstellen. In diesem Zusammenhang soll allerdings nicht übersehen werden, dass im Laufe dieser Arbeit nur ein Teilaspekt untersucht wurde. Andere Aspekte wie beispielsweise die Organisation der Ceramide oder die Profile der kovalent gebundenen Ceramide sollten deshalb ausführlicher untersucht werden. Zusätzlich sollten Fragmentierungsexperimente zur Aufklärung möglicher Veränderungen in den Kettenlängen der Sphingoidbasen durchgeführt werden. Der Vergleich der Ceramidprofile aus verschiedenen Lipidgewinnungsmethoden gleicher und unterschiedlicher anatomischer Stellen in einem größeren Probandenkollektiv könnte ebenfalls umfangreiche und sehr nützliche Informationen liefern. Solche Untersuchungen sollten des Weiteren nicht nur auf die Haut beschränkt sein, sondern auch die Hautanhangsgebilde und insbesondere die Fingernägel miterfassen, die sowohl bei Neurodermitis als auch bei Psoriasis Schädigungen zeigen können. Eine sehr interessante Zukunftsperspektive ist die Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten leistungsfähigen Analytikmethoden, um die Ceramidprofile in Abhängigkeit von wichtigen biochemischen Vorgängen, zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. A.D.A.M Inc. (2004) Skin layers. In *www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/8912.htm*

2. Alessandrini F, Stachowitz S, Ring J, Behrendt H (2001) The level of prosaposin is decreased in the skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Invest Dermatol* 116: 394-400

3. Balogh MP (2004) Debating resolution and mass accurancy. *LCGC Europe* 17: 152-159

4. Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM (2000) Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol* 114: 185-192

5. Berardesca E, Fideli D, Borroni G, Rabbiosi G, Maibach H (1990) In vivo hydration and water-retention capacity of stratum corneum in clinically uninvolved skin in atopic and psoriatic patients. *Acta Derm Venereol* 70: 400-404

6. Bleck O, Abeck D, Ring J, Hoppe U, Vietzke JP, Wolber R, Brandt O, Schreiner V (1999) Two ceramide subfractions detectable in Cer(AS) position by HPTLC in skin surface lipids of non-lesional skin of atopic eczema. *J Invest Dermatol* 113: 894-900

7. Bonté F, Pinguet P, Chevalier JM, Meybeck A (1995) Analysis of all stratum corneum lipids by automated multiple development high-performance thin-layer chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 664: 311-316

8. Bonté F, Saunois A, Pinguet P, Meybeck A (1997) Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance. *Arch Dermatol Res* 289: 78-82

9. Bouwstra JA, Cheng K, Gooris GS, Weerheim A, Ponec M (1996) The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. *Biochim Biophys Acta* 1300: 177-186

10. Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijsse J, Wiechers JW, van Aelst AC (2003) Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol* 120: 750-758

11. Bouwstra JA, Dubbelaar FE, Gooris GS, Ponec M (2000) The lipid organisation in the skin barrier. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 208: 23-30

12. Bouwstra JA, Gooris GS, Dubbelaar FE, Weerheim AM, Ijzerman AP, Ponec M (1998) Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J Lipid Res* 39: 186-196

13. Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Lavrijsen S, Bras W (1994) The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study. *Biochim Biophys Acta* 1212: 183-192

14. Brattsand M, Egelrud T (1999) Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. *J Biol Chem* 274: 30033-30040

15. Burger K (1984) PC-PMD, Dünnschichtchromatographie mit Gradienten-Eluation im Vergleich zur Säulenflüssigkeitschromatographie. *Fresenius Z Anal Chem* 318: 228-233

16. Byrdwell WC (2001) Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids* 36: 327-346

17. Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Haegele KD, Horning EC (1975) Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: corona discharge ion source for use in liquid chromatography-mass spectrometer-computer analytical system. *Anal Chem* 47: 2369–2373

18. Caspers P, Lucassen G, Carter E, Bruining A, Puppels G (2001) In vivo confocal Raman microspectroscopy of skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *J Invest Dermatol* 116: 434-442

19. Coderch L, Lopez O, de la Maza A, Parra JL (2003) Ceramides and skin function. *Am J Clin Dermatol* 4: 107-129

20. Couch LH, Churchwell MI, Doerge DR, Tolleson WH, Howard PC (1997) Identification of ceramides in human cells using liquid chromatography with detection by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11: 504-512

21. De Paepe K, Weerheim A, Houben E, Roseeuw D, Ponec M, Rogiers V (2004) Analysis of epidermal lipids of the healthy human skin: factors affecting the design of a control population. *Skin Pharmacol Physiol* 17: 23-30

22. Deffond D, Saint Leger D, Leveque JL, Agache P (1986) In vivo measurement of epidermal lipids in man. *Bioeng Skin* 2: 71–85

23. Deschamps FS, Baillet A, Chaminade P (2002) Mechanisms of response enhancement in evaporative light scattering detection with the addition of triethylamine and formic acid. *Analyst* 127: 35-41

24. Deschamps FS, Chaminade P, Ferrier D, Baillet A (2001) Assessment of the retention properties of poly(vinyl alcohol) stationary phase for lipid class profiling in liquid chromatography. *J Chromatogr A* 928: 127-137

25. Deschamps FS, Gaudin K, Lesellier E, Tchapla A, Ferrier D, Baillet A, Chaminade P (2001) Response enhancement for the evaporative light scattering detection for the analysis of lipid classes and molecular species. *Chromatographia* 54: 607-611

26. Di Nardo A, Sugino K, Wertz P, Ademola J, Maibach HI (1996) Sodium lauryl sulfate (SLS) induced irritant contact dermatitis: a correlation study between ceramides and in vivo parameters of irritation. *Contact Dermatitis* 35: 86-91

27. Di Nardo A, Wertz P, Giannetti A, Seidenari S (1998) Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 78: 27-30

28. Do UH, Pei PT, Minard RD (1981) Separation of molecular species of ceramides as benzoyl and p-nitrobenzoyl derivatives by high performance liquid chromatography. *Lipids* 16: 855-862

29. Doering T, Proia RL, Sandhoff K (1999) Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *FEBS Lett* 447: 167-170

30. Downing D, Wertz P, Stewart M (1986) The role of sebum and epidermal lipids in the cosmetic properties of skin. *Int J Cosm Sci* 8: 115-123

31. Downing DT (1992) Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J. Lipid Res* 33: 301-313

32. Eckerskorn C, Massenspektrometrie. In: *Bioanalytik*, ed. Lottspeich F, Zorbas H, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998) 323-368

33. Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T (2000) Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol* 114: 56-63

34. Elias PM (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80 Suppl: 44s-49s

35. Elias PM, Brown BE (1978) The mammalian cutaneous permeability barrier: defective barrier function in essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Lab Invest* 39: 574-583

36. Elias PM, Brown BE, Ziboh VA (1980) The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol* 74: 230-233

37. Elias PM, Feingold KR (1992) Lipids and the epidermal water barrier: metabolism, regulation, and pathophysiology. *Semin Dermatol* 11: 176-182

38. Elias PM, Friend DS (1975) The permeability barrier in mammalian epidermis. *J Cell Biol* 65: 180-191

39. Elias PM, Goerke J, Friend DS (1977) Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J Invest Dermatol* 69: 535-546

40. Elias PM, Menon GK (1991) Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res* 24: 1-26

41. Elias PM, Wood LC, Feingold KR (1999) Epidermal pathogenesis of inflammatory dermatoses. *Am J Contact Dermat* 10: 119-126

42. Eppert GJ, Flüssigchromatographie : HPLC - Theorie und Praxis, Vieweg-Verlag, Braunschweig, Wiesbaden (1997)

43. Essig S (2000) Möglichkeiten und Grenzen der Videodensitometrie in der Dünnschichtchromatographie: Ein Vergleich zur klassischen Densitometrie. *Dissertation*. Universität Tübingen, Tübingen

44. Fartasch M (1996) The nature of the epidermal barrier: structural aspects. *Adv Drug Deliv Rev* 18: 273-282

45. Fartasch M (1997) Epidermal barrier in disorders of the skin. *Microsc Res Tech* 38: 361-372

46. Farwanah H, Neubert R, Zellmer S, Raith K (2002) Improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780: 443-450

47. Farwanah H, Nuhn P, Neubert R, Raith K (2003) 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* 492: 233-239

48. Fluhr JW, Elias PM (2002) Stratum corneum pH: formation and function of the 'acid mantle'. *Exp Dermatol* 1: 163-175

49. Fluhr JW, Mao-Qiang M, Brown BE, Wertz PW, Crumrine D, Sundberg JP, Feingold KR, Elias PM (2003) Glycerol regulates stratum corneum hydration in sebaceous gland deficient (asebia) mice. *J Invest Dermatol* 120: 728-737

50. Forslind B (1994) A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* 74: 1-6

51. Forslind B, Engstrom S, Engblom J, Norlén L (1997) A novel approach to the understanding of human skin barrier function. *J Dermatol Sci* 14: 115-125

52. Fredriksson T, Petterson U (1978) Severe psoriasis - oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica* 157: 238-244

53. Freinkel RK, Traczyk TN (1985) Lipid composition and acid hydrolase content of lamellar granules of fetal rat epidermis. *J Invest Dermatol* 85: 295-298

54. Frey HP, Zieloff K, Qualitative und quantitative Dünnschichtchromatographie - Grundlagen und Praxis, VCH, Weinheim (1993)

55. Fritsch P, Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas., Springer Verlag, Berlin (1998)

56. Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM (1995) The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest* 95: 2281-2290

57. Gildenast T, Lasch J (1997) Isolation of ceramide fractions from human stratum corneum lipid extracts by high-performance liquid chromatography. *Biochim Biophys Acta* 1346: 69-74

58. Gray GM, Yardley HJ (1975) Different populations of pig epidermal cells: isolation and lipid composition. *J Lipid Res* 16: 441-447

59. Grayson S, Johnson-Winegar AG, Wintroub BU, Issero¡ RR, Epstein EH, Elias PM (1985) Lamellar body-enriched fractions from neonatal mice. preparative techniques and partial characterization. *J Invest Dermatol* 85: 289-294

60. Hamanaka S, Hara M, Nishio H, Otsuka F, Suzuki A, Uchida Y (2002) Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol* 119: 416-423

61. Hamanaka S, Ujihara M, Serizawa S, Nakazawa S, Otsuka F (1997) A case of recessive X-linked ichthyosis: scale-specific abnormalities of lipid composition may explain the pathogenesis of the skin manifestation. *J Dermatol* 24: 156-160

62. Hanifin JM, Thurston M, Omoto M, Cherill R, Tofte SJ, Graeber M, Group TEE (2001) The eczema area and severity index (EASI): assessment of reliability in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 10: 11-18

63. Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T (1994) Cloning,expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme,a skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* 269: 19420-19426

64. Hara J, Higuchi K, Okamoto R, Kawashima M, Imokawa G (2000) High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 115: 406-413

65. Haußmann W (2003) Schuppenflechte: Ursachen, Pathogenese, Topische Therapieformen. *PZ Prisma* 10: 49-64

66. Holleran WM, Ginns EI, Menon GK, Grundmann JU, Fartasch M, McKinney CE, Elias PM, Sidransky E (1994) Consequences of beta-glucocerebrosidase deficiency in epidermis. Ultrastructure and permeability barrier alterations in Gaucher disease. *J Clin Invest* 93: 1756-1764

67. Holleran WM, Takagi Y, Menon GK, Legler G, Feingold KR, Elias PM (1993) Processing of epidermal glucosylceramides is required for optimal mammalian cutaneous permeability barrier function. *J Clin Invest* 91: 1656-1664

68. Horning EC, Horning MG, Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN (1973) New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure. *Anal Chem* 45: 936–943

69. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A (1991) Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol* 96: 523-526

70. Imokawa G, Akasaki S, Minematsu Y, Kawai M (1989) Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch Dermatol Res* 281: 45-51

71. Ishibashi M, Arikawa J, Okamoto R, Kawashima M, Takagi Y, Ohguchi K, Imokawa G (2003) Abnormal expression of the novel epidermal enzyme, glucosylceramide deacylase, and the accumulation of its enzymatic reaction product, glucosylsphingosine, in the skin of patients with atopic dermatitis. *Lab Invest* 83: 397-408

72. Jin K, Higaki Y, Takagi Y, Higuchi K, Yada Y, Kawashima M, Imokawa G (1994) Analysis of beta-glucocerebrosidase and ceramidase activities in atopic and aged dry skin. *Acta Derm Venereol* 74: 337-340

73. Kalinin A, Marekov LN, Steinert PM (2001) Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *J Cell Sci* 114: 3069-3070

74. Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM (2002) Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24: 789-800

75. Karlsson AA, Michelsen P, Odham G (1998) Molecular species of sphingomyelin: determination by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with electrospray and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Mass Spectrom* 33: 1192-1198

76. Katagiri C, Sato J, Nomura J, Denda M (2003) Changes in environmental humidity affect the water-holding property of the stratum corneum and its free amino acid content, and the expression of filaggrin in the epidermis of hairless mice. *J Dermatol Sci* 31: 29–35

77. Kebarle P (2000) A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35: 804–817

78. Kellner R, Chromatographische Trennmethoden. In: *Bioanalytik*, ed. Lottspeich F, Zorbas H, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998) 195-215

79. Kerscher M, Korting HC, Schafer-Korting M (1991) Skin ceramides: structure and function. *Eur J Dermatol*: 39-43

80. Kim SD, Huh CH, Seo KI, Suh DH, Youn JI (2002) Evaluation of skin surface hydration in Korean psoriasis patients: a possible factor influencing psoriasis. *Clin Exp Dermatol* 27: 147-152

81. Kita K, Sueyoshi N, Okino N, Inagaki M, Ishida H, Kiso M, Imayama S, Nakamura T, Ito M (2002) Activation of bacterial ceramidase by anionic glycerophospholipids: possible involvement in ceramide hydrolysis on atopic skin by Pseudomonas ceramidase. *Biochem J* 362: 619-626

82. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM (1983) Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 24: 120-130

83. Lampe MA, Williams ML, Elias PM (1983) Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J Lipid Res* 24: 131-140

84. Landmann L (1986) Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J Invest Dermatol* 87: 202-209

85. Landmann L (1988) The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol* 178: 1-13

86. Lavrijsen AP, Higounenc IM, Weerheim A, Oestmann E, Tuinenburg EE, Bodde HE, Ponec M (1994) Validation of an in vivo extraction method for human stratum corneum ceramides. *Arch Dermatol Res* 286: 495-503

87. Lebwohl M (2003) Psoriasis. *Lancet* 361: 1197-1204

88. Lemiére F (2001) Interfaces for LC-MS. In *LCGC Europe* 29-35

89. Lemiére F (2001) Mass analysers for LC-MS. In *LCGC Europe* 22-28

90. Lesellier E, Gaudin K, Chaminade P, Tchapla A, Baillet A (2003) Isolation of ceramide fractions from skin sample by subcritical chromatography with packed silica and evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1016: 111-121

91. Leung DM, Bieber T (2003) Atopic dermatitis. *Lancet* 361: 151-160

92. Lundstorm A, Egelrud T (1990) Cell shedding from human plantar skin in vitro: evidence that two different types of protein structures are degraded by a chymotrypsin- like enzyme. *Arch Dermatol Res* 282: 243-237

93. Macheleidt O, Kaiser HW, Sandhoff K (2002) Deficiency of epidermal protein-bound omega-hydroxyceramides in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 119: 166-173

94. Mackenzie IC (1973) An examination of cellular organization within the stratum corneum by a silver staining method. *J Invest Dermatol* 61: 245-250

95. Madison KC (2003) Barrier Function of the Skin: ‘‘La Raison d’Être’’ of the Epidermis. *J Invest Dermatol* 121: 231-241

96. Matsumoto M, Sugiura H, Uehara M (2000) Skin barrier function in patients with completely healed atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 23: 178-182

97. Matsumoto M, Umemoto N, Sugiura H, Uehara M (1999) Difference in ceramide composition between "dry" and "normal" skin in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 79: 246-247

98. McNabb TJ, Cremesti AE, Brown PR, Fischl AS (1999) The separation and direct detection of ceramides and sphingoid bases by normal-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering detection. *Anal Biochem* 276: 242-250

99. Meguro S, Arai Y, Masukawa Y, Uie K, Tokimitsu I (2000) Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL). *Arch Dermatol Res* 292: 463-468

100. Menon GK, Elias PM, Lee SH, Feingold KR (1992) Localization of calcium in murine epidermis following disruption and repair of the permeability barrier. *Cell Tissue Res* 270: 503-512

101. Menon GK, Grayson S, Elias PM (1986) Cytochemical and biochemical localization of lipase and sphingomyelinase activity in mammalian epidermis. *J Invest Dermatol* 86: 591-597

102. Merrill AH, Jr. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 277: 25843–25846

103. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R (1993) Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta* 1182: 147-151

104. Motta S, Monti M, Sesana S, Mellesi L, Ghidoni R, Caputo R (1994) Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions. *Arch Dermatol* 130: 452-456

105. Motta S, Sesana S, Monti M, Giuliani A, Caputo R (1994) Interlamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 186: 131-132

106. Murata Y, Ogata J, Higaki Y, Kawashima M, Yada Y, Higuchi K, Tsuchiya T, Kawainami S, Imokawa G (1996) Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency? *J Invest Dermatol* 106: 1242-1249

107. Neubert R, Wohlrab W, Marsch W, Dermatopharmazie: Vehikel – Wirkstoffe - Pharmakologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, (2001)

108. Norlén L, Nicander I, Lundh Rozell B, Ollmar S, Forslind B (1999) Inter- and intraindividual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function in vivo. *J Invest Dermatol* 112: 72-77

109. Ohman H, Vahlquist A (1998) The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the "acid skin mantle"? *J Invest Dermatol* 111: 674-677

110. Öhman H, Vahlquist A (1994) In vitro studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 74: 375-379

111. Ohnishi Y, Okino N, Ito M, Imayama S (1999) Ceramidase activity in bacterial skin flora as a possible cause of ceramide deficiency in atopic dermatitis. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 101-104

112. Pettus BJ, Bielawska A, Kroesen BJ, Moeller PD, Szulc ZM, Hannun YA, Busman M (2003) Observation of different ceramide species from crude cellular extracts by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 1203-1211

113. Pettus BJ, Kroesen BJ, Szulc ZM, Bielawska A, Bielawski J, Hannun YA, Busman M (2004) Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by normal-phase high-performance liquid chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 577-583

114. Pilgram G, van der Meulen J, Gooris G, Koerten H, Bouwstra J (2001) The influence of two azones and sebaceous lipids on the lateral organization of lipids isolated from human stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 1511: 244-254

115. Plewig G, Marples R (1970) Regional differences of cell sizes in human stratum corneum. Part I. *J Invest Dermatol* 34: 13-18

116. Ponec M, Boelsma E, Weerheim A (2000) Covalently bound lipids in reconstructed human epithelia. *Acta Derm Venereol* 80: 89-93

117. Ponec M, Weerheim A (1990) Retinoids and lipid changes in keratinocytes. *Methods Enzymol* 190: 30-41

118. Ponec M, Weerheim A, Lankhorst P, Wertz P (2003) New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 120: 581-588

119. Poole CF, Poole SK (1989) Modern thin-layer chromatography. *Anal Chem* 61: 1257A-1269A

120. Proksch E, Jensen JM, Elias PM (2003) Skin lipids and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 21: 134-144

121. Raap U, Werfel T, Jaeger B, Schmid-Ott G (2003) Atopische Dermatitis und psychischer Stress. *Hautarzt* 54: 925-929

122. Raith K, Farwanah H, Wartewig S, Neubert R (2004) Progress in the analysis of stratum corneum ceramides. *Eur J Lipid Sci Technol* 106: 561–571

123. Raith K, Neubert R (1998) Structural studies on ceramides by electropsray MS/MS. *Rapid Comm Mass Spectrom* 12: 935-938

124. Raith K, Zellmer S, Lasch J, Neubert R (2000) Profiling of human stratum corneum ceramides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 418: 167-173

125. Raka J, Sherma J, Planar Chromatography in Clinical Chemistry. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. Meyers RA, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000) 1583–1603

126. Rawlings AV, Harding CR (2004) Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1: 43-48

127. Rippke F, Schreiner V, Schwanitz HJ (2002) The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. *Am J Clin Dermatol* 3: 261-272

128. Robson KJ, Stewart ME, Michelsen S, Lazo ND, Downing DT (1994) 6-Hydroxy-4-sphingenine in human epidermal ceramides. *J Lipid Res* 35: 2060-2068

129. Rogers J, Harding C, Mayo A, Banks J, Rawlings A (1996) Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons. *Arch Dermatol Res* 288: 765-770

130. Rudikoff D, Lebwohl M (1998) Atopic dermatitis. *Lancet* 351: 1715-1721

131. Saint-Léger D, Francois AM, Léveque JL, Stoudemayer TJ, Grove GL, Kligman AM (1988) Age-associated changes in stratum corneum lipids and their relation to dryness. *Dermatologica* 177: 159-164

132. Saint-Leger D, Francois AM, Leveque JL, Stoudemayer TJ, Kligman AM, Grove G (1989) Stratum corneum lipids in skin xerosis. *Dermatologica* 178: 151-155

133. Schaefer H, Redelmeier TE, Skin barrier, principles of percutaneous absorption, Verlag Karger, Basel, Freiburg, Paris, (1996)

134. Schmuth M, Man MQ, Weber F, Gao W, Feingold KR, Fritsch P, Elias PM, Holleran WM (2000) Permeability barrier disorder in Niemann-Pick disease: sphingomyelin-ceramide processing required for normal barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* 115: 459-466

135. Schreiner V, Gooris GS, Pfeiffer S, Lanzendorfer G, Wenck H, Diembeck W, Proksch E, Bouwstra J (2000) Barrier characteristics of different human skin types investigated with X-ray diffraction, lipid analysis, and electron microscopy imaging. *J Invest Dermatol* 114: 654-660

136. Schurer NY, Elias PM (1991) The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res* 24: 27-56

137. Scott IR, Harding CR (1986) Filaggrin breakdown to water binding compounds during development of the rat stratum corneum is controlled by the water activity of the environment. *Dev Biol* 115: 84–92

138. Seidenari S, Giusti G (1995) Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. *Acta Derm Venereol* 75: 429-433

139. Sherma J, Thin Layer Chromatography. In: *Encyclopedia of Chromatography*, ed. Meyers RA, John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2000) 11485-11498

140. Signorelli P, Hannun YA (2002) Analysis and quantitation of ceramide. *Methods Enzymol* 345: 275-294

141. Simon M, Jonca N, Guerrin M (2001) Refined characterization of corneodesmosinproteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J Biol Chem* 276: 20292-20299

142. Steinert PM (2000) The complexity and redundancy of epithelial barrier function. *J Cell Biol* 151: F5-8

143. Steinert PM, Marekov LN (1999) Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol Biol Cell* 10: 4247-4261

144. Stella C, Rudaz S, Veuthey JL, Tchapla A (2001) Silica and other materials as support in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports, Part I. *Chromatographia* Suppl 53: S113-S131

145. Stewart M (1992) Sebaceous glands lipids. *Seminars Dermatol* 11: 100-105

146. Stewart M, Downing D (1991) Chemistry and function of mammalian sebaceous lipids. *Adv Lipid Res* 24: 263-301

147. Stewart ME, Downing DT (1999) A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J Lipid Res* 40: 1434-1439

148. Suzuki Y, Nomura J, Koyama J, Horii I (1994) The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res* 286: 249-253

149. Swartzendruber DC, Wertz PW, Madison KC, Downing DT (1987) Evidence that the corneocyte has a chemically bound lipid envelope. *J Invest Dermatol* 88: 709-713

150. Thiele J, Weber S, Packer L (1999) Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol* 113: 1006-1010

151. Uchida Y, Hara M, Nishio H, Sidransky E, Inoue S, Otsuka F, Suzuki A, Elias PM, Holleran WM, Hamanaka S (2000) Epidermal sphingomyelins are precursors for selected stratum corneum ceramides. *J Lipid Res* 41: 2071-2082

152. Vietzke JP (2000) Hautlipidanalytik mit der Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS): Untersuchung von endogenen und topisch applizierten Lipiden. *Dissertation*. Universität Hamburg, Hamburg

153. Vietzke JP, Brandt O, Abeck D, Rapp C, Strassner M, Schreiner V, Hintze U (2001) Comparative investigation of human stratum corneum ceramides. *Lipids* 36: 299-304

154. Vietzke JP, Strassner M, Hintze U (1999) 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* 50: 15-20

155. Warner RR, Myers MC, Taylor DA (1988) Electrone probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *J Invest Dermatol* 90: 218-229

156. Weerheim A, Ponec M (2001) Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res* 293: 191-199

157. Wertz PW (2000) Lipids and barrier function of the skin. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 208: 7-11

158. Wertz PW, Cho ES, Downing DT (1983) Effect of essential fatty acid deficiency on the epidermal sphingolipids of the rat. *Biochim Biophys Acta* 753: 350-355

159. Wertz PW, Cox PS, Squier CA, Downing DT (1986) Lipids of epidermis and keratinized and non-keratinized oral epithelia. *Comp Biochem Physiol B* 83: 529-531

160. Wertz PW, Downing DT (1983) Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J Lipid Res* 24: 759-765

161. Wertz PW, Downing DT (1987) Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta* 917: 108-111

162. Wertz PW, Kremer M, Squier CA (1992) Comparison of lipids from epidermal and palatal stratum corneum. *J Invest Dermatol* 98: 375-378

163. Wertz PW, Miethke MC, Long SA, Strauss JS, Downing DT (1985) The composition of the ceramides from human stratum corneum and from comedones. *J Invest Dermatol* 84: 410-412

164. Wertz PW, Swartzendruber DC, Madison KC, Downing DT (1987) Composition and morphology of epidermal cyst lipids. *J Invest Dermatol* 89: 419-425

165. Wertz PW, van den Bergh B (1998) The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem Phys Lipids* 91: 85-96

166. Wille J, Kydonieus A (2003) Palmitoleic acid isomer (C16: 1D6) in human skin sebum is efective against GRAM-positive bacteria. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 16: 176-187

167. Willoughby R, Sheehan E, Mitrovich S, A Global View of LC/MS, Global View Publishing, Pittsburgh (1998)

168. Wood LC, Elias PM, Calhoun C, Tsai JC, Grunfeld C, Feingold KR (1996) Barrier disruption stimulates interleukin-1 alpha expression and release from a pre-formed pool in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 106: 397-403

169. Yamamoto A, Serizawa S, Ito M, Sato Y (1991) Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 283: 219-223

170. Yano M, Kishida E, Muneyuki Y, Masuzawa Y (1998) Quantitative analysis of ceramide molecular species by high performance liquid chromatography. *J Lipid Res* 39: 2091-2088

171. Yoshikawa N, Imokawa G, Akimoto K, Jin K, Higaki Y, Kawashima M (1994) Regional analysis of ceramides within the stratum corneum in relation to seasonal changes. *Dermatology* 188: 207-214

172. Young CS, Dolan JW (2003) Success with evaporative light-scattering detection. *LCGC North America* 21: 120-128

173. Zellmer S, Lasch J (1997) Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 691: 321-329

7 Anhang (Veröffentlichungen)

A. Publikationen

1. **Farwanah H**, Raith K, Huschka C, Wohlrab W, R. Neubert (2001) Isolation of ceramides from skin samples by means of the aminopropyl solid phase extraction. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 334: 66

2. **Farwanah H,** Neubert R, Zellmer S, Raith K (2002) An improved procedure for the separation of major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thin-layer chromatography. *Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 780: 443-450

3. **H. Farwanah**, R. Neubert, S. Zellmer und K. Raith (2003) Verbesserte Analytik von Hautlipiden mittels AMD-HPTLC. *CBS* 90: 2-4

4. Raith K, **Farwanah H**, Neubert R (2003) HPTLC and LC/MS in ceramide analysis. *Trends in Clinical and Experimental Dermatology* 106-117

5. **Farwanah H**, Nuhn P, Neubert R, Raith K (2003) Normal phase LC separation of stratum corneum ceramides with detection by evaporative light scattering and APCI mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492: 233-239

6. Raith K, **Farwanah H**, Wartewig S, Neubert R. (2004) Progresses in the analysis of stratum corneum ceramides. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 561–571

7. Heinemann C, Paschold C, Fluhr J, Wigger-Alberti W, Schliemann-Willers S, **Farwanah H**, Raith K, Neubert R and Elsner P (2005) Induction of a hardening phenomenon by repeated application of SLS: Analysis of lipid changes in the stratum corneum *Acta Derm Venereol, im Druck*

8. Raith K, Brenner C, **Farwanah H**, Müller G., Eder K, Neubert R. A new LC/MS method for the determination of cholesterol oxidation products in food: LC-APCI-MS in comparison to related approaches. *J. Chromatog A, angenommen*

9. **Farwanah H**, Raith K, Neubert R, Wohlrab J. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch Dermatol Res, angenommen*

B. Poster

1. **Farwanah H**, Raith K, Zellmer S, Neubert R: Analysis of the major stratum corneum lipids by means of automated multiple development thinlayer chromatography. Proc. 4th World Meeting APV/APGI, Florenz, Italien, 8-11 April, 2002.

2. Raith K, **Farwanah H,** Neubert R: Analysis of human stratum corneum Ceramides using automated multiple development thin-layer chromatography as well as HPLC with evaporative light scattering detection. Proc. 26th Int. Symp. on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Montréal, Kanada, 2-7 Juni, 2002.

3. **Farwanah H**, Raith K, Neubert R: Profiling of stratum corneum ceramides of healthy and diseased persons by AMD-HPTLC and LC/APCIMS. Gordon research conference on barrier function of mammalian skin, Bristol, Rhode Island, USA, 3-8 August, 2003.

4. Raith K, **Farwanah H**, Neubert R: Lipidomics of human stratum corneum ceramides: Online LC/APCI-MS versus offline HPTLC/ESI-MS/MS. 52nd Conference of the American Society for Mass Spectrometry, Nashville, Tennessee, USA, 23-27 Mai, 2004.

5. Elsner P, Heinemann C, Paschold C, Fluhr JW, Wigger-Alberti W, Schliemann-Willers S, **Farwanah H**, Raith K, Neubert R: Hard facts about Hardening. Stratum corneum IV, Paris, France, 17-19 June, 2004.

Lebenslauf

Persönliches

Name, Vorname	Farwanah, Hany
Geburtsdatum/-ort	01.02.1973 in Marburg / Lahn
Familienstand	verheiratet
Ehefrau	Niveen Farwanah
Eltern	Vater: Prof. Abdel-Rahman Farwanah Mutter: Halima Farwanah

Werdegang

1977-1989	Primär-, Real und Sekundärschule in Libyen und Gaza
Dezember 1989	Abitur in Gaza
April 1990	Einreise nach Deutschland
Mai 1990 bis Dezember 1990	Deutschkurse in Iserlohn, Hannover und Dortmund
Januar 1991 bis Januar 1992	Studienkolleg für ausländische Studierende in Bonn
1992-1997	Pharmaziestudium an der Uni-Mainz und der Uni-Marburg
April 1998 bis September 1998	Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1998 bis Januar 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Philipps-Universität Marburg
Seit Mai 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 Absatz 2b der Promotionsordnung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Bereiches der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die vorliegende Arbeit wurde des Weiteren keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hany Farwanah Halle (Saale), den 09.02.2005