

1 Summary and Zusammenfassung

1.1 Summary

One of the most important challenges in protein science is the comprehensive mapping of posttranslational modifications (PTMs) in qualitative, quantitative as well as dynamic terms. These efforts are driven by the immense importance of PTMs in the regulation of cellular processes and the strong alternation in their expression in response to pathogenic conditions. At present, there is a strong need for methods sensitive enough to detect and quantify the minute amounts of different phosphorylated and sulfated peptides present in biological samples. An extensive analysis of the locations and degree of these modifications requires a combination of affinity based enrichments and mass spectrometry based identification.

As an alternative enrichment method, this thesis describes an approach, combining host-guest chemistry with the imprinting of a low molecular weight template, which is simple and generic. The resulting receptors have shown their abilities as affinity reagents in (Phospho-/Sulfo-) proteomics (proof of concept).

The performance of molecularly imprinted polymers (MIPs) is mainly dictated by the interaction of the template with the functional monomer pre- and post-polymerization on a molecular level. In the initial part of the thesis, an in depth study has been performed examining the effect of functional monomers on the morphology and performance of oxyanion imprinted polymers.

The hydrogen-bond acceptor sites in these molecules have been targeted using a 1,3-diarylurea as functional monomer and phenyl phosphonic acid (PPA) and phenyl sulfonic acid (PSA) have been used as model templates. The association parameters for the monomeric host were studied by ^1H NMR and ITC titrations, whereas the interaction mode between the functional monomer and the mono-TBA salts was elucidated by NOESY spectroscopy; collectively confirming the formation of the expected complex stoichiometries. The effect of the functional monomer on imprinted polymers was also found to correlate with physical characteristics like morphology (surface area and pore size distributions) and binding parameters (total number of binding sites and polymer-template association energy, capacity). These MIPs selectively recognize their anion template over other similar oxyanions but show a pronounced sensitivity to the presence of acidic and basic mobile phase additives.

With this knowledge of model oxyanion imprinting, receptors have been developed based on epitope imprinting strategy leading to a synthetic pTyr/sTyr and pSer selective imprinted polymer receptor.

For this purpose, the diarylurea host monomer (two equivalents with respect to template) was used to prepare MIPs against a model template, the bis-PMP salt of N-Fmoc-pTyr-OEt, using ethyleneglycol dimethacrylate (EGDMA) as a crosslinking monomer (pTyr-MIP). The binding site incorporates two monourea ligands placed by preorganization around a phosphotyrosine. The tight binding site displayed a good binding affinity and selectivity for amino acid and peptides containing these modifications. EGDMA based polymers shown good selectivity in organic mobile phases but showed poor selectivity in aqueous environment.

The hydrophilic pentaerythritol triacrylate (PETA) crosslinking monomer was chosen aiming the development of materials operating in aqueous environment. The polymer produced with PETA exhibited not only dramatically increased binding characteristics and selectivity, but also capability of operating in the water based mobile phases.

The phosphorylated and sulfated species in biological samples are isobaric and thus differentiation between them in routinely used mass spectrometer is problematic. Sulfated protein fragments have so far proven elusive targets, difficult to analyse by mass spectrometry and with only few effective receptors capable of recognizing such fragments. In the investigation, it was found that the pTyr-MIP crossreacts with sulfated tyrosine containing amino acids in an acidic mobile phases and is capable of capturing sulfated peptides from a mixture of peptides, whereas mass spectroscopy could not discriminate sulfated peptide over non-sulfated peptide. To the best of my knowledge, this thesis presents the first artificial receptor that has successfully demonstrated to be capable of binding tyrosine sulfated peptides. This MIPs were capable of selectively capturing both, phosphorylated and a sulfated peptides, from a complex mixture and could release the peptides separately based on elution conditions.

Further pSer-MIPs were synthesized against the model template N-Fmoc-pSer-OEt using a diarylurea host monomer complementary to pSer and PETA as crosslinking monomer. The pTyr-MIP and pSer-MIP has been analyzed using them as stationary phases in chromatographic column and a good specific selectivity factor was found for these amino acids. These materials packed in pipette tip SPE columns are capable of selective extraction of these modified peptides from a mixture of peptides when spiked in the complex sample.

The applications of MIPs prepared via the above substructured approaches may lead to a new concept for addressing labile biomolecules and open new ways to a wide range of tailored materials for affinity based enrichment of peptides and proteins.

Selectivity of pTyr-MIP materials was tested in collaboration with a proteomic research group using protein digests spiked with low levels of the pTyr peptide phosphor-angiotensin. Benchmarking with an established TiO₂ method, the pTyr MIP could selectively enrich the p-Tyr peptides down to the lower femtomolar level. In the pipette tip SPE study, pTyr- and pSer-MIPs are capable of selectively capturing these modified peptides from real samples in spiking experiments.

1.2 Zusammenfassung

Einer der wichtigsten Herausforderungen in der Protein-Forschung ist die umfassende Kartierung von posttranslationalen Modifikationen (PTM) in qualitativer, quantitativer sowie dynamischer Hinsicht. Diese Bemühungen werden durch die immense Bedeutung der PTMs in der Regulation zellulärer Prozesse und die starke Veränderung ihrer Expression als Reaktion auf pathogene Bedingungen voran getrieben. Derzeit besteht ein großer Bedarf an Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung kleinster Mengen verschiedener phosphorylierter und sulfatisierten Peptide in biologischen Proben. Eine umfassende Analyse der Lokalisierung und des Grades dieser Veränderungen erfordert eine Kombination von affinitätsbasierten Anreicherungsverfahren und Massenspektrometrie-basierter Identifikation.

Als alternative Anreicherungsverfahren beschreibt diese Arbeit einen Ansatz, welcher Wirt-Gast-Chemie mit der Prägung eines niedermolekularen Templates kombiniert. Diese Methode ist einfach und allgemein anwendbar. Die daraus resultierenden Rezeptoren konnten ihre Tauglichkeit als Affinitätsreagenzien in der (Phospho-/ Sulfo-) Proteomik unter Beweis stellen (proof of concept).

Die Leistung von molekular geprägten Polymeren (MIP) wird auf molekularer Ebene hauptsächlich durch die Wechselwirkung des Templates mit funktionalen Monomeren vor und nach der Polymerisation bestimmt. Zu Beginn der Arbeit wurde eine eingehende Untersuchung des Einflusses funktionaler Monomeren auf die Morphologie und die Leistung von mit Oxyanionen geprägten Polymeren durchgeführt.

Die Wasserstoff-Akzeptor-Stellen in diesen Molekülen wurden über ein funktionales 1,3-Diarylharnstoff-Monomer adressiert und als Modell-Template wurden Phenylphosphonsäure (PPA) und Phenylsulfonsäure (PSA) verwendet. Die Bindungsparameter zu dem Wirt-Monomer wurden über $^1\text{H-NMR}$ und ITC Titrations untersucht, während die Art der Wechselwirkungen zwischen den funktionalen Monomeren und dem TBA-Mono-Salz durch NOESY-Spektroskopie aufgeklärt wurde; beides bestätigte die Bildung der Komplexe in der erwarteten Stöchiometrie. Es wurde auch der Einfluss der funktionalen Monomere auf die physikalischen Merkmale der geprägten Polymere wie Morphologie (spezifische Oberfläche und Porengrößenverteilung) und Bindungseigenschaften (Anzahl der Bindungsstellen, Bindungsenergien zwischen Polymer und Template sowie Bindungskapazitäten) analysiert. Diese MIPs erkennen selektiv ihre anionischen Template in Gegenwart anderer, ähnlicher Oxyanionen, zeigen aber eine ausgesprochene Empfindlichkeit gegenüber der Anwesenheit von sauren und basischen Zusatzstoffen in mobilen Phasen.

Mithilfe des so erworbenen Verständnisses über die Prägung mit Modell-Oxyanion wurden Rezeptoren auf der Grundlage der Epitop-Prägungs-Strategie entwickelt. Dadurch wurde ein künstlicher, pTyr / Styr und pSer selektiver, geprägter Polymer-Rezeptor erhalten. Dabei wurde ein Diarylharnstoff-Wirt-Monomer verwendet (zwei Äquivalenten bezogen auf das Templat), um MIPs für ein Modell-Templat, das Bis-PMP-Salz von N-Fmoc-pTyr-OEt, herzustellen (pTyr-MIP). Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA) fungierte dabei als vernetzendes Monomer. Die Bindungsstelle enthält zwei Monoharnstoff-Liganden, die sich durch Präorganisation um das Phosphotyrosin anordnen. Die erhaltenen Bindungsstellen zeigten eine gute Affinität und Selektivität für die Aminosäure und Peptide mit dieser Modifikation. Obwohl EGDMA basierte Polymere eine gute Selektivität in organischen mobilen Phasen haben, ist letztere in wässriger Umgebung eher schlecht.

Das hydrophile Pentaerythrittriacyrylat (PETA) wurde als Crosslinker-Monomer gewählt, um Materialien herzustellen, die auch in wässriger Umgebung funktionieren. Die mit PETA produzierten Polymere zeigten nicht nur stark erhöhte Bindungseigenschaften und Selektivität, sondern waren auch für Wasser-basierte mobile Phasen geeignet.

Phosphorylierte und sulfatisierte Spezies in biologischen Proben sind Isobaren, somit sind sie durch routinemäßig verwendete massenspektrometrische Methoden schwer zu unterscheiden. Sulfatisierte Proteinfragmente haben sich als schwer erfassbare Analyten herausgestellt, für die

sich ernsthafte Schwierigkeiten bei massenspektrometrischer Untersuchung ergeben und für die bisher nur wenige effektive Rezeptoren existieren, die in der Lage sind solche Fragmente zu erkennen. In der Untersuchung wurde festgestellt, dass die pTyr-MIPs mit Aminosäuren, die ein sulfatisiertes Tyrosin enthalten, in sauren mobilen Phasen kreuzreagiert und so sulfatisierte Peptide aus einer Mischung von Peptiden gezielt anreichern können, wohingegen mit der Massenspektroskopie keine Unterscheidung von sulfatisierten Peptide und nicht sulfatisierten Peptiden möglich ist. In dieser Arbeit wurden meines Wissens nach das erste Mal künstliche Rezeptoren, die Tyrosin-sulfatisierte Peptide binden können, erfolgreich nachgewiesen. Diese MIPs waren in der Lage, sowohl phosphorylierte als auch sulfatisierte Peptide in einer Mischung selektiv zu erfassen und je nach Elutionsbedingungen getrennt wieder freizugeben.

Desweiteren wurde ein pSer-MIP mit dem Modell-Templat N-Fmoc-pSer-OEt unter Verwendung des Diarylharstoff-Wirt-Monomers und PETA als Vernetzungsmonomer komplementär zu pSer synthetisiert. Das pTyr-MIP und das pSer-MIP wurden als stationäre Phasen in chromatographischen Säulen getestet und es wurden eine gute spezifische Selektivitäts-Faktor für diese Aminosäuren gefunden. Diese Materialien wurden als Festphasen-Extraktions-Säule in Pipettenspitzen gepackt und sind in der Lage, selektiv diese modifizierten Peptide aus einer komplexen Probe (Mischung verschiedener Peptide) zu extrahieren.

Die Anwendungen von MIPs, die mit Hilfe der zuvor genannten Ansätze hergestellt wurden, könnte ein neues Konzept für die Erfassung labiler Biomoleküle sein und neue Wege für eine breite Palette von maßgeschneiderten Materialien für die affinitätsbasierten Anreicherung von Peptiden und Proteinen ebnet. Die Selektivität der p-Tyr-MIPs Materialien wurde in Zusammenarbeit mit einer Proteom-Forschungsgruppe anhand von Proben aus Proteinverdauung getestet, die mit kleinen Mengen des pTyr-Peptids Phosphor-Angiotensin versetzt waren. Im Leistungsvergleich mit einem etablierten TiO_2 -basierten Verfahren konnten pTyr-MIPs die pTyr-Peptide bis zum unteren femtomol Bereich selektiv anreichern. In der Festphasenextraktions-Studie mit Pipettenspitze waren pTyr- und pSer-MIPs in der Lage, selektiv modifizierten Peptide aus Realproben im Spiking-Versuche zu erfassen.