

# Mesoporöse Materialien in der Peptidomanalyse\*\*

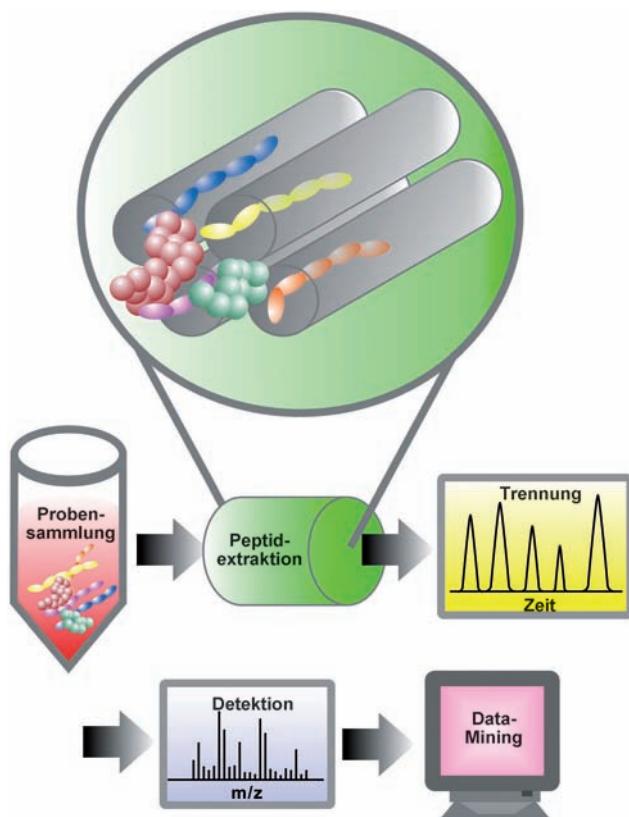
Feng Li, Brittany Dever, Hongquan Zhang, Xing-Fang Li und X. Chris Le\*

Massenspektrometrie · Mesoporöse Materialien ·

Peptide · Peptidomik · Proteine

**B**iologisch aktive Peptide wie Peptidhormone und Zytokine regulieren diverse organische Funktionen, z. B. im Hormon-, Entzündungs- und Nervensystem, und spielen daher eine zentrale Rolle für die menschliche Gesundheit und die Entwicklung von Krankheiten.<sup>[1]</sup> Endogene Peptide können aus der proteolytischen Spaltung von Proteinen stammen und sind Indikatoren für Proteaseaktivität, -abbau und -degeneration. Die Gesamtkonzentration von Peptiden in biologischen Proben spiegelt bestimmte biologische Ereignisse wider und liefert nützliche Informationen für die klinische Diagnose.<sup>[2]</sup> Deshalb kann die globale Analyse von Peptiden in komplexen biologischen Mixturen (bezeichnet als Peptidomimetika) zu einem besseren Verständnis der biochemischen Funktionen endogener Peptide sowie zur Entwicklung von diagnostischen und prognostischen Biomarkern beitragen.<sup>[2]</sup>

Ein typisches Vorgehen bei der Peptidomanalyse von komplexen Proben wie menschlichem Serum umfasst die Schritte der Probensammlung, Extraktion, Trennung, Detektion und Data-Mining (Schema 1). Von diesen fünf Schlüsselschritten wurde die selektive Extraktion von Peptiden als ein starkes Hindernis für die Weiterentwicklung der Peptidomforschung identifiziert,<sup>[2,3]</sup> vor allem wegen der Komplexität und dem hohen Dynamikumfang von Biomolekülen in den zu extrahierenden Proben. Zum Beispiel ist die Detektion von Peptiden geringer Konzentration in menschlichem Serum sehr schwierig, da in größeren Mengen vorkommende Proteine, Salze und Fette die Messung überlagern.<sup>[3]</sup> Mit Blick auf dieses Problem entwickelten Zou und Mitarbeiter kürzlich eine hocheffiziente und selektive Methode zur Extraktion von Peptiden aus menschlichem Serum durch Verwendung von geordnetem mesoporösem Kohlenstoff (OMC).<sup>[4]</sup> Die Porengröße des OMC-Materials von 4.8 nm bewirkt, dass Moleküle über ungefähr 10 kDa Molekulargewicht nicht mehr in die Poren eintreten können, was ausreicht, um die meisten der größeren störenden Serumproteine abzutrennen. Die Verwendung von OMCs erhöht die Gesamteffizienz der Peptidextraktion enorm und erfasst



**Schema 1.** Typische Schritte bei der Analyse des Peptidoms komplexer Proben. Die Verwendung neuer mesoporöser Materialien verbessert die Effizienz und Selektivität der Peptidextraktion.

auch Peptide im niedrigen Gewichtsbereich (<2 kDa), die traditionell schwierig zu extrahieren sind. In Kombination mit zweidimensionaler Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (2D-LC-MS/MS) gelang es den Forschern, 3402 verschiedene endogene Peptide in 20 µL Serum zu identifizieren.<sup>[4]</sup>

Mesoporöse Materialien wie OMCs bringen alle wünschenswerten Eigenschaften eines idealen Extraktionsmaterials mit sich, einschließlich einer großen Oberfläche, einem hohen Porenvolumen, chemischer Inertheit und einer guten mechanischen Stabilität.<sup>[5]</sup> In den letzten Jahren wurden zahlreiche mesoporöse Materialien mit wohldefinierter Porengrößenverteilung und kontrollierbarer Oberflächenfunktionalität synthetisiert.<sup>[5]</sup> Die enge Größenverteilung der geordneten Mesoporen erleichtert die großenselektive Extraktion von endogenen Peptiden und den großenbedingten

[\*] F. Li, B. Dever, Dr. H. Zhang, Prof. X.-F. Li, Prof. X. C. Le  
Department of Chemistry and Department of Laboratory Medicine  
and Pathology, University of Alberta  
Edmonton, Alberta, T6G 2G3 (Kanada)  
E-Mail: xc.le@ualberta.ca  
Homepage: <http://www.ualberta.ca/~xcle>

[\*\*] Die Autoren danken Katerina Carastathis für Hinweise und Vorschläge zum Manuskript.

Ausschluss größerer Proteine. Zum Beispiel haben die hochgeordneten mesoporösen  $\text{SiO}_2$ -Partikel in MCM-41 eine Porengröße von 2 nm und eine Molekulargewichtsgrenze von 12 kDa.<sup>[6]</sup> Dieses mesoporöse Material wurde genutzt, um niedermolekulare Peptide aus menschlichem Plasma selektiv anzureichern, was die Identifizierung von 988 verschiedenen Peptiden ermöglichte.<sup>[6]</sup>

Eine andere wichtige Eigenschaft der mesoporösen Materialien ist die vielseitige Einführung von Oberflächenfunktionalitäten, um eine Differenzierung unterschiedlicher Arten von Peptiden zu ermöglichen. Mesoporöses MCM-41, das mit einer starken Kationenaustauschgruppe modifiziert war, konnte 1328 verschiedene Peptide extrahieren. MCM-41, das mit einer starken Anionenaustauschgruppe modifiziert war, extrahierte 204 Peptide, und das unmodifizierte MCM-41 extrahierte 849 Peptide.<sup>[7]</sup> Nur 28 (oder 1 %) der 2381 endogenen Peptide wurden in allen drei Extrakten identifiziert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Oberflächenfunktionalitäten der mesoporösen Materialien eine wichtige Rolle für die Selektivität der Extraktion spielen. Andere Oberflächenmodifikationen von mesoporösen Materialien mit Amino-,<sup>[8]</sup>  $\text{Cu}^{2+}$ -<sup>[9]</sup> und C<sub>8</sub>-Gruppen<sup>[10]</sup> zeigten ebenfalls selektive Anreicherungen von unterschiedlichen Arten von Peptiden. Darüber hinaus ermöglichen diese letztgenannten Materialien eine einfache magnetische Abtrennung, da die Mikrokügelchen aus einem magnetischen Kern und einer mesoporösen Schale bestanden.<sup>[8–10]</sup> Die mit  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen modifizierten mesoporösen  $\text{SiO}_2$ -Mikrokügelchen ermöglichen die effiziente Anreicherung von Peptiden durch Chelatbildung mit den Carbonsäure- und Aminogruppen der Peptide.<sup>[9]</sup> Die mit C<sub>8</sub>-Gruppen modifizierten magnetischen mesoporösen  $\text{SiO}_2$ -Mikrokügelchen binden kein Salz, was eine wünschenswerte Eigenschaft für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse ist.<sup>[10]</sup> Qin et al.<sup>[4]</sup> machten sich in ihrer Studie die präzise Molekulargewichtsgrenze geordneter Mesoporen zusammen mit der starken Hydrophobie des Kohlenstoffs zunutze. Ihre Rekordzahl an identifizierten Peptiden aus menschlichem Serum ist somit der Kombination aus größenselektivem Effekt und starkem Adsorptionsvermögen des OMC-Materials zu verdanken.<sup>[4]</sup>

Jüngste Forschungen zur Synthese, Modifizierung und Anwendung mesoporöser Materialien haben das große Potenzial dieser Materialien aufgezeigt, durch Verbesserung existierender Techniken der Peptidanreicherung (wie organische Präzipitation, Ultrafiltration, Festphasenextraktion und magnetische Abtrennung) entscheidende Beiträge zur Peptidomforschung zu leisten. Zu den vorteilhaften Eigenschaften mesoporöser Materialien gehören 1) eine präzise und kontrollierbare Molekulargewichtsgrenze zur Abtrennung von Peptiden von störenden Proteinen, 2) ein starker Retentionsfaktor zur Peptidanreicherung, 3) die Fähigkeit

zum Salzausschluss zur Erleichterung einer nachgeschalteten massenspektrometrischen Analyse und 4) die Möglichkeit, kleinste Probenmengen in einfachen Protokollen einzusetzen. Diese Eigenschaften mesoporöser Materialien können auch für andere analytische Prozesse genutzt werden, wie etwa am Beispiel enzymatischer Reaktoren für den Proteinverdau,<sup>[11]</sup> der Anreicherung von Glycanen<sup>[12]</sup> und dem Einfang von posttranslatorisch modifizierten Peptiden/Proteinen<sup>[12,13]</sup> demonstriert wurde. Im Prinzip könnten unterschiedliche mesoporöse Materialien (z.B. Si-, C-, Ti-, Kern-Schale-Partikel) mit unterschiedlichen Porengrößen synthetisiert und auf spezifische Anwendungen zugeschnitten werden. Die attraktiven Eigenschaften mesoporöser Materialien und ihre erfolgreichen Anwendungen, die in der Peptidomanalyse aufgezeigt wurden, lassen den Schluss zu, dass diese Materialien auch in der Proteom- und Metabolomanalyse sehr nützlich sein könnten.

Eingegangen am 8. November 2011  
Online veröffentlicht am 3. Februar 2012

- [1] K. Siddle, J. C. Hutton, *Peptide Hormone Secretion/Peptide Hormone Action*, Oxford University Press, **1991**.
- [2] a) E. P. Diamandis, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2079–2082; b) G. Menschaert, T. T. M. Vandekerckhove, G. Baggerman, L. Schoofs, W. Luyten, W. V. Criekinge, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2051–2061.
- [3] L. Zhao, H. Qin, R. Wu, H. Zou, *J. Chromatogr. A* **2011**, DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.051.
- [4] H. Qin, P. Gao, F. Wang, L. Zhao, J. Zhu, A. Wang, T. Zhang, R. Wu, H. Zou, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12426–12429; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *51*, 12218–12221.
- [5] R. Ryoo, S. H. Joo, M. Kruk, M. Jaroniec, *Adv. Mater.* **2001**, *13*, 677–681.
- [6] R. Tian, H. Zhang, M. Ye, X. Jiang, L. Hu, X. Li, X. Bao, H. Zou, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 980–983; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 962–965.
- [7] R. Tian, L. Ren, H. Ma, X. Li, L., Hu, M. Ye, R. Wu, Z. Tian, Z. Liu, H. Zou, *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 1270–1278.
- [8] J. Wan, K. Qian, J. Zhang, F. Liu, Y. Wang, P. Yang, B. Liu, C. Yu, *Langmuir* **2010**, *26*, 7444–7450.
- [9] S. Liu, H. Chen, X. Lu, C. Deng, X. Zhang, P. Yang, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7719–7723; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7557–7561.
- [10] S. Liu, Y. Li, C. Deng, Y. Mao, X. Zhang, P. Yang, *Proteomics* **2011**, *23*, 4503–4513.
- [11] Q. Min, R. Wu, L. Zhao, H. Qin, M. Ye, J. J. Zhu, H. Zou, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6144–6146.
- [12] H. Qin, L. Zhao, R. Li, R. Wu, H. Zou, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7721–7728.
- [13] Y. Zhang, C. Chen, H. Qin, R. Wu, H. Zou, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2271–2273.
- [14] Z. Lu, M. Ye, W. Zhong, Y. Yin, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1906–1910; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1862–1866.