

# **Massenspektrometrische Untersuchungen zur Struktur der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren- $\alpha$ und - $\beta/\delta$**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**



von Rico Schwarz

Geboren am 25.03.1987 in Burgstädt

Gutachter: 1. Prof. Dr. habil. Andrea Sinz  
2. Prof. Dr. habil. Mike Schutkowski  
3. Prof. Dr. habil. Simone König

verteidigt am 15.03.2017, Halle (Saale)



**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen der Aminosäuren .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Grundlagen.....</b>	<b>6</b>
1.1. Biologische Grundlagen .....	6
1.1.1. Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren .....	6
1.1.2. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- $\alpha$ .....	10
1.1.3. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- $\beta/\delta$ .....	11
1.2. Massenspektrometrische Grundlagen .....	13
1.2.1. Ionisationstechniken .....	14
1.2.1.1. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation .....	14
1.2.1.2. Elektrospray-Ionisation .....	16
1.2.2. Massenanalysatoren .....	19
1.2.2.1. Der Flugzeit-Massenanalysator .....	20
1.2.2.2. Der Quadrupol-Analysator .....	21
1.2.2.3. Die lineare Ionenfalle .....	22
1.2.2.4. Der Orbitrap-Massenanalysator.....	23
1.2.3. Die Hybridmassenspektrometer LTQ-Orbitrap-XL und Orbitrap Fusion Tribrid .....	25
1.2.4. Fragmentierungsmethoden.....	27
1.3. Proteinstrukturuntersuchungen mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie .....	29
1.3.1. Chemische Quervernetzungsreagenzien .....	32
1.3.1.1. Homobifunktionelle Reagenzien .....	33
1.3.1.2. Heterobifunktionelle Quervernetzungsreagenzien .....	35
1.3.1.3. Kopplungsreagenzien .....	36
1.3.2. Photoaktivierbare Aminosäuren.....	38
<b>2. Zielstellung.....</b>	<b>41</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>42</b>
3.1. Material .....	42
3.1.1. Chemikalien .....	42

3.1.2.	Verbrauchsmaterialien .....	44
3.1.3.	Laborgeräte .....	44
3.1.4.	<i>E.coli</i> -Stämme.....	45
3.1.5.	Antibiotika .....	46
3.1.6.	Medien und Puffer .....	46
3.1.7.	Proteine, Enzyme und Peptide .....	47
3.1.8.	Primer und Plasmide .....	48
3.1.8.1.	Plasmide.....	48
3.1.8.2.	Primer .....	49
3.1.9.	Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion und Ligation.....	49
3.1.10.	Lösungen.....	50
3.1.10.1.	Gelelektrophoreselösungen .....	50
3.1.10.2.	Lösungen für die enzymatische Proteolyse .....	51
3.1.10.3.	Lösungen für MALDI-MS.....	51
3.1.11.	FPLC-Systeme und Zubehör.....	51
3.1.11.1.	FPLC-Systeme.....	51
3.1.11.2.	FPLC-Säulen .....	51
3.1.12.	Lösungen für die Chromatographie .....	52
3.1.12.1.	Lösungen für die Proteinreinigung .....	52
3.1.12.2.	Nano-HPLC-Lösungen .....	52
3.1.13.	HPLC-Systeme und Säulen.....	52
3.1.14.	Massenspektrometer .....	53
3.1.15.	Quervernetzungsreagenzien und photoaktivierbare Aminosäuren .....	53
3.1.16.	Software und <i>Tools</i> .....	54
3.2.	Molekularbiologische Methoden .....	55
3.2.1.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	55
3.2.2.	Plasmidpräparation .....	56
3.2.3.	Agarose-Gelelektrophorese.....	56
3.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	57
3.2.5.	Kolonie-PCR.....	58
3.2.6.	Restriktionsspaltung.....	58
3.2.7.	Ligation .....	59
3.2.8.	Transformation chemisch kompetenter Zellen .....	59
3.3.	Proteinchemische Methoden .....	59
3.3.1.	Proteingehaltsbestimmung nach Bradford .....	59
3.3.2.	Eindimensionale Gelelektrophorese .....	60
3.3.2.1.	Coomassie-Proteinfärbung .....	61

3.3.2.2.	Coomassie <i>Blue Silver</i> -Färbung .....	61
3.3.3.	Proteinexpression .....	62
3.3.4.	Proteinreinigung .....	62
3.3.4.1.	Reinigung der PPAR- $\alpha$ -LBD und der photoaktivierbaren Varianten.....	62
3.3.4.2.	Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und Bpa-Varianten .....	63
3.3.5.	Acetonfällung .....	64
3.3.6.	In-Lösungs-Spaltung .....	64
3.3.7.	In-Gel-Spaltung .....	65
3.4.	Chemische Quervernetzungsreaktionen und Photoaffinitätsmarkierungsstudien..	66
3.4.1.	Chemische Quervernetzung des PPAR- $\alpha$ .....	66
3.4.1.1.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit heterobifunktionellen Reagenzien .....	66
3.4.1.2.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz EDC .....	67
3.4.1.3.	Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	67
3.4.2.	Chemische Quervernetzung des PPAR- $\beta/\delta$ .....	68
3.4.2.1.	Chemische Quervernetzung des PPAR- $\beta/\delta$ mit homobifunktionellen aminreaktiven Reagenzien.....	68
3.4.2.2.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit carboxylreaktivem Reagenz .....	69
3.4.2.3.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz DMTMM .....	70
3.4.2.4.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionellem Reagenz .....	70
3.4.2.5.	Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	70
3.5.	Massenspektrometrische Methoden .....	71
3.5.1.	Probenvorbereitung .....	71
3.5.2.	Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie .....	71
3.5.3.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	72
3.5.4.	Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS .....	72
3.5.5.	Identifizierung der Quervernetzungsprodukte .....	74
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>76</b>
4.1.	Strukturuntersuchungen an der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	76
4.1.1.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenzien.....	76
4.1.2.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit den Kopplungsreagenzien EDC und Sulfo-NHS .....	77
4.1.3.	Expression und Reinigung der Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	78
4.1.4.	Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -LBD.....	81

---

4.1.5.	Untersuchung der Dimersisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	88
4.2.	Strukturuntersuchungen an PPAR- $\beta/\delta$ .....	91
4.2.1.	Expression und Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	91
4.2.2.	Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit aminreaktiven Reagenzien .....	93
4.2.3.	Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem carboxylreaktiven Reagenz SDH und dem Kopplungsreagenz DMTMM .....	101
4.2.4.	Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionalen Reagenzien .....	105
4.2.5.	Spezifischer Einbau von photoaktivierbaren Aminosäuren in die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	105
4.2.6.	Strukturuntersuchungen an Bpa-Varianten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mittels Photoaffinitätsmarkierungsstudien .....	106
4.2.7.	Fragmentierungsexperimente der Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD ..	108
4.2.8.	Ungerichteter Einbau von Photomethionin in die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	108
4.2.9.	Strukturuntersuchungen am PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein .....	109
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
5.1.	Die verschiedenen Quervernetzungsstrategien für Konformationsstudien von Strukturen von Proteinen und Proteinkomplexen .....	113
5.2.	Strukturuntersuchungen an der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	115
5.2.1.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit heterobifunktionellen Reagenzien .....	115
5.2.2.	Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz EDC/Sulfo-NHS .....	116
5.2.3.	Strukturuntersuchungen anhand der Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD-Varianten .....	116
5.2.3.1.	Bpa-Varianten .....	116
5.2.3.2.	TfmdF-Varianten .....	119
5.2.4.	Dimerisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	120
5.3.	Strukturuntersuchungen an PPAR- $\beta/\delta$ .....	120
5.3.1.	Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit aminreaktiven Reagenzien .....	121
5.3.2.	Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem carboxylreaktiven Reagenz SDH und dem Kopplungsreagenz DMTMM .....	122
5.3.3.	Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionellen Reagenzien .....	123
5.3.4.	Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mittels photoaktivierbarer Aminosäuren .....	123
5.3.5.	Fragmentierungsexperimente der Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD ..	125
5.3.6.	Strukturuntersuchungen am PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein .....	126
<b>6.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>128</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>.....</b>	<b>XXXVI</b>

<b>Danksagung .....</b>	<b>LXXXVII</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>LXXXVIII</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XC</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>XCIII</b>

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Zusammenspiel zwischen PPAR und Bindungspartnern .....	7
Abbildung 2: Schema der vier PPAR-Domänen .....	7
Abbildung 3: Konformationsänderungen der LBD von Kernrezeptoren .....	8
Abbildung 4: Röntgenkristallstrukturen der drei PPAR-Subtypen.....	9
Abbildung 5: Schema einer Laser-Desorptions-Ionenquelle .....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ESI-Quelle.....	17
Abbildung 7: Elektrospray aus einer Nano-ESI-Kapillare .....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der <i>Taylor-Konusbildung</i> .....	19
Abbildung 9: Schematische Darstellung eines TOF-Analysators mit Reflektron.....	21
Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines linearen Quadrupol-Analysators .....	22
Abbildung 11: Darstellung einer segmentierten linearen Ionenfalle .....	23
Abbildung 12: Schnitt durch einen Orbitrap-Analysator.....	24
Abbildung 13: Einlass von Ionen aus der <i>C-Trap</i> .....	25
Abbildung 14: Schema des LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometers .....	26
Abbildung 15: Schema des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers.....	27
Abbildung 16: Nomenklatur der Fragmentionen quervernetzter Peptide.....	28
Abbildung 17: Schematische Darstellung der <i>top-down</i> - und der <i>bottom-up</i> -Strategie .....	31
Abbildung 18: Schematische Darstellung der möglichen Quervernetzungsprodukte .....	33
Abbildung 19: Quervernetzungsreaktion von BS <sup>2</sup> G .....	34
Abbildung 20: Quervernetzungsreaktion des Urea-Linkers .....	34
Abbildung 21: Quervernetzungsreaktion von SDH mit DMTMM.....	35
Abbildung 22: Schema der Quervernetzungsreaktion mit Sulfo-SDA.....	36
Abbildung 23: Quervernetzungsreaktion von SBC .....	36
Abbildung 24: Quervernetzungsreaktion von EDC und Sulfo-NHS .....	38
Abbildung 25: Quervernetzungsreaktion von DMTMM.....	38
Abbildung 26: Quervernetzungsreaktionen von Photomethionin, Bpa und TfmdF .....	40
Abbildung 27: Chemische Struktur ausgewählter PPAR- $\alpha$ -Liganden .....	66
Abbildung 28: Aminosäuresequenz des PPAR- $\beta/\delta$ .....	68
Abbildung 29: Chemische Strukturen der PPAR- $\beta/\delta$ -Agonisten .....	69
Abbildung 30: SDS-PAGE der PPAR- $\alpha$ -LBD, quervernetzt mit SBC .....	76
Abbildung 31: SDS-PAGE der Quervernetzungsreaktion der PPAR- $\alpha$ -LBD mit EDC/Sulfo-NHS .....	77

Abbildung 32: Nickel-Affinitätsreinigung der Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	79
Abbildung 33: Anionenaustauschchromatographie der Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD.....	80
Abbildung 34: SDS-PAGE der Anionenaustauschchromatographie der PPAR- $\alpha$ -TfmdF-Varianten.....	81
Abbildung 35: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\alpha$ -LBD in der Variante L258Bpa .....	82
Abbildung 36: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\alpha$ -LBD in der Variante F273Bpa. ....	83
Abbildung 37: Fragmentionenmassenspektrum eines Quervernetzungsproduktes in der PPAR- $\alpha$ -LBD, Variante L258Bpa; identifiziert in Experimenten ohne Liganden .....	84
Abbildung 38: MALDI-TOF-Massenspektren der Bpa-Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD.....	86
Abbildung 39: SDS-PAGE der Photoaffinitätsmarkierungsstudien der beiden TfmdF-Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	87
Abbildung 40: SDS-PAGE der Photoaffinitätsmarkierungsstudien der Varianten L258Bpa und F273Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD .....	88
Abbildung 41: Kalibriergerade für die Größenausschlusschromatographie.....	89
Abbildung 42: Größenausschlusschromatogramm und SDS-Gele der PPAR- $\alpha$ -LBD.....	90
Abbildung 43: Größenausschlusschromatogramm und SDS-Gel der vernetzten Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD.....	91
Abbildung 44: SDS-PAGE der Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD.....	93
Abbildung 45: Röntgenkristallstruktur der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	94
Abbildung 46: Fragmentionenmassenspektrum des Quervernetzungsproduktes zwischen Ser-181/Lys-182 und Lys-197/Lys-198.....	95
Abbildung 47: Identifizierte Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BS <sup>2</sup> G .....	97
Abbildung 48: SDS-PAGE einer Quervernetzungsreaktion mit Urea-Linker.....	99
Abbildung 49: Fragmentionenmassenspektrum eines Quervernetzungsproduktes mit dem Urea-Linker zwischen Gly-167 und Lys-198 .....	100
Abbildung 50: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BuUrBu .....	101
Abbildung 51: SDS-Gel einer Quervernetzungsreaktion der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM.....	102
Abbildung 52: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM.....	103
Abbildung 53: Fragmentionenmassenspektrum des Quervernetzungsproduktes mit DMTMM zwischen Gly-167 und Glu-373 der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD .....	104

Abbildung 54: SDS-Gel der Quervernetzungsreaktion der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit Sulfo-SDA.....	105
Abbildung 55: Fragmentionenmassenspektrum der Quervernetzung zwischen Bpa-180 und Ile-379.....	107
Abbildung 56: Röntgenkristallstruktur der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD dargestellt mit den Quervernetzungen der beiden Varianten .....	107
Abbildung 57: SDS-PAGE der Expression der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit Photomethionin.....	109
Abbildung 58: NMR-Struktur der PPAR- $\beta/\delta$ -DBD mit identifizierten Quervernetzungen durch BS <sup>2</sup> G.....	110
Abbildung 59: Quervernetzungsprodukte in PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein durch BS <sup>2</sup> G..	111
Abbildung 60: Röntgenkristallstruktur des BVT.13-gebundenen PPAR- $\gamma$ mit Bindungspartnern.....	112
Abbildung A 1: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BS <sup>2</sup> G.....	XXXVI
Abbildung A 2: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BuUrBu .....	XXXVII
Abbildung A 3: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM.....	XXXVIII
Abbildung A 4: Quervernetzungsprodukte in Photoaffinitätsmarkierungsstudien der Bpa-Varianten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD.....	XXXIX
Abbildung A 5: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust fragmentiert mit CID .....	XL
Abbildung A 6: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust fragmentiert mit CID.....	XLI
Abbildung A 7: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust fragmentiert mit HCD.....	XLII
Abbildung A 8: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust fragmentiert mit HCD .....	XLIII
Abbildung A 9: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust fragmentiert mit ETD .....	XLIV
Abbildung A 10: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust fragmentiert mit ETD.....	XLV
Abbildung A 11: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust fragmentiert mit der Kombinationstechnik ETciD.....	XLVI
Abbildung A 12: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust fragmentiert mit der Kombinationstechnik ETciD .....	XLVII

Abbildung A 13: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379  
ohne Wasserverlust fragmentiert mit der Kombinationstechnik EThcD .....XLVIII  
Abbildung A 14: MS/MS des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379  
mit Wasserverlust fragmentiert mit der Kombinationstechnik EThcD ..... XLIX

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Konzentrationen der Proteaseinhibitoren, RNase und DNase .....	48
Tabelle 2: Allgemeine Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes .....	58
Tabelle 3: PCR-Schritte mit den jeweiligen Temperaturen und Zeiten.....	58
Tabelle 4: Chemikalien für die Herstellung eines 12%igen SDS-Gels .....	61
Tabelle 5: Ladungsabhängige Verschiebungs- und Isolationsfenster für die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit BS <sup>2</sup> G- <i>D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub></i> .....	74
Tabelle 6: Zusammenfassung der gefundenen Quervernetzungsstellen der beiden PPAR- $\alpha$ -LBD Varianten L258Bpa und F273Bpa.....	85
Tabelle 7: Molekulargewichte und Konzentrationen der Proteine der Kalibriergeraden ....	89
Tabelle 8: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein.....	98
Tabelle A 1: Verunreinigungen aus der Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie der PPAR- $\alpha$ -L258Bpa .....	L
Tabelle A 2: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -L258Bpa.....	L
Tabelle A 3: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -F273Bpa.....	LV
Tabelle A 4: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BS <sup>2</sup> G <i>D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub></i> .....	LIX
Tabelle A 5: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM und BuUrBu .....	LXV
Tabelle A 6: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte der Photoaffinitätsmarkierungsstudien der Varianten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD.....	LXXIV
Tabelle A 7: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein mit BS <sup>2</sup> G <i>D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub></i> .....	LXXVII

**Abkürzungsverzeichnis**

ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AEX	<i>Anion Exchange Chromatography</i>
AF	Aktivierungsfunktionshelix
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCL6	<i>B-Cell Lymphoma 6 Protein</i>
bp	Basenpaar
Bpa	<i>para</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin
BSA	Bovines Serumalbumin
BS <sup>2</sup> G	Bis(sulfosuccinimidyl)-glutarat
Bu	$\gamma$ -Aminobuttersäure
BuUr	Isocyano- $\gamma$ -Aminobuttersäure
BuUrBu	Urea-Linker
<i>C-Trap</i>	<i>Curved Trap</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CI	Chemische Ionisation
CID	<i>Collision-Induced Dissociation</i>
CoA	Koaktivatoren
CoR	Korepressoren
Da	Dalton
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DESI	<i>Desorption Electrospray Ionization</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTMM	4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholiniumchlorid

## Abkürzungsverzeichnis

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
ETciD	kombinierte Fragmentierung aus ETD und CID
ETD	Elektronentransfer-Dissoziation
EThcD	kombinierte Fragmentierung aus ETD und HCD
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FocA	<i>Formate Channel A</i>
FTICR	Fourier Transformation-Ionenzyklotron- resonanz
fw	Vorwärts gerichtet ( <i>forward</i> )
HCD	<i>Higher-Energy Collision-Induced Dissociation</i>
HCl	Salzsäure
H/D	Wasserstoff/Deuterium
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
IMAC	<i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i>
IM-MS	Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
KO	<i>Knock-Out</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC/MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
LDI	Laser-Desorption/Ionisation
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LIT	Lineare Ionenfalle ( <i>linear ion trap</i> )
LTQ	Lineare Ionenfalle (Thermo Fisher Scientific)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MeOH	Methanol
MGF	<i>Mascot Generic Format</i>
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MS	Massenspektrometrie; Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCoA2	<i>Nuclear Receptor Co-Activator 2</i>
NCoR	<i>Nuclear Receptor Co-Repressor</i>
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Ammoniumdihydrogenphosphat
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Ammoniumhydrogencarbonat
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMR	Kernspinresonanz

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	<i>PPAR Binding Protein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
Pf1B	<i>Pyruvate Formate Lyase</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktiverter Rezeptor
ppm	<i>Parts Per Million</i>
PPRE	<i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>
RAR	<i>Retinoid Acid Receptor</i>
rev	Rückwärts gerichtet ( <i>reverse</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SBC	<i>N-Succinimidyl-para-Benzoyldihydrocinnamat</i>
SDH	Suberinsäure-1,8-Dihydrazid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SMRT	<i>Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptor</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i>
SRC	<i>Steroid Receptor Co-Activator</i>
Sulfo-NHS	<i>N-Hydroxysulfosuccinimid</i>
Sulfo-SDA	<i>Sulfosuccinimidyl 4,4'-azipentanoat</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
TEV	Tobaaco Etch Virus
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TfmdF	<i>para-Trifluormethyldiaziriny-L-Phenylalanin</i>

Th	Thomson
TNF	Tumornekrosefaktor
TOF	Flugzeitanalysator ( <i>Time-of Flight</i> )
TR	<i>Thyroid Hormone Receptor</i>
TRiC/CCT	<i>TCP-1 Ring Complex/ Chaperonin Containing TCP-1</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Atomare Masseneinheit
U	Unit (Enzymaktivität)
UPM	Umdrehung pro Minute
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
WT	Wildtyp

**Abkürzungen der Aminosäuren**

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

### Zusammenfassung

Die Strategie der chemischen Quervernetzung wird in Kombination mit Massenspektrometrie seit einigen Jahren für die Identifizierung der dreidimensionalen Strukturen von Proteinen und Proteinkomplexen angewendet. Durch die Einführung neuer kovalenter Verbindungen mittels Quervernetzungsreagenzien, meist homobifunktionellen aminreaktiven Substanzen und photoaktivierbaren Aminosäuren, können Konformationsänderungen nachvollzogen werden. Dabei agieren die Reagenzien als molekulares Lineal, so dass die erhaltenen Abstandsinformationen für die Erstellung neuer Strukturmodelle angewendet werden können.

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) aus der Familie der Kernrezeptoren sind an der Entstehung von Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämie, dem metabolischen Syndrom und Krebs beteiligt. Sie stellen daher potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Das Verständnis des Zusammenspiels der verschiedenen PPARs mit ihren Kofaktoren und Bindungspartnern ist unerlässlich für die Entwicklung neuer Arzneistoffe. Die drei bis heute bekannten PPAR-Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) werden durch niedermolekulare Substanzen aktiviert und haben Einfluss auf die Gentranskription. Dabei hat PPAR- $\alpha$  einen Einfluss auf den Lipidmetabolismus, wohingegen die physiologischen Funktionen von PPAR- $\beta/\delta$  bisher wenig untersucht sind. Um die physiologischen Funktionen der PPARs besser zu verstehen, sind Strukturdaten unerlässlich, jedoch existieren momentan nur hochaufgelöste Strukturen der isolierten Ligandenbindungsdomänen (LBD). Durch chemische Quervernetzung können neue Strukturdaten unter physiologischen Bedingungen gewonnen werden, die zum Verständnis der Funktionen der PPARs, insbesondere des PPAR- $\beta/\delta$ , beitragen können.

In dieser Arbeit wurden durch einen spezifischen Austausch von natürlichen Aminosäuren gegen photoaktivierbare Aminosäuren und dem Einsatz von Quervernetzungsreagenzien die dreidimensionalen Strukturen der beiden Subtypen PPAR- $\alpha$  und - $\beta/\delta$  untersucht. Aus Vorarbeiten waren bereits mittels aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien Strukturdaten der PPAR- $\alpha$ -LBD gewonnen worden. Nun wurden mittels eines spezifischen Austauschs in der PPAR- $\alpha$ -LBD an den Positionen Leu-258 und Phe-273 erfolgreich die photoreaktive Aminosäure *para*-Benzoyl-L-Phenylalanin (Bpa) eingebaut. Nach der UV-A-Bestrahlung wurden mehrere Quervernetzungsprodukte identifiziert, die Rückschlüsse auf mögliche Konformationen der PPAR- $\alpha$ -LBD zuließen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die PPAR- $\alpha$ -LBD im

freien Zustand flexibler ist als im ligandengebundenen Zustand. Da sich die Zahl der Quervernetzungsprodukte nach Ligandenbindung stark reduzierte, konnte von einer starreren Konformation ausgegangen werden. Dies wurde vornehmlich bei der Variante F273Bpa beobachtet, während für die Variante L258Bpa, für die der Austausch in der hochflexiblen  $\Omega$ -Schleife stattfand, nur geringe Unterschiede zwischen ligandengebundenem und freiem Protein gefunden wurden.

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD konnte erfolgreich in *E.coli* exprimiert werden. Mittels unterschiedlicher Quervernetzungsreagenzien wurde die Konformationsänderung nach Bindung verschiedener Liganden untersucht. Ähnlich wie bei Subtyp PPAR- $\alpha$  wurde hier ebenfalls eine starrere Konformation nach Ligandenbindung beobachtet. Insbesondere einige Quervernetzungsprodukte des *N*-Terminus zu verschiedenen Aminosäuren der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD sind nicht im Einklang mit der veröffentlichten Röntgenkristallstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM) und deuten auf eine starke Konformationsänderung des Proteins in Lösung hin.

Der Austausch der beiden Aminosäuren Phe-180 und Tyr-443 gegen Bpa mit anschließender Photoreaktion führte zu mehreren spezifischen Quervernetzungsprodukten. Durch das Vorhandensein dieser Quervernetzungsprodukte sowohl im freien, als auch ligandengebundenen Zustand ist die Aussagekraft über eine Konformationsänderung schwierig. Jedoch ergab sich durch die Kombination der verschiedenen Quervernetzungsansätze ein plausibles Bild der Struktur vor und nach Ligandenbindung.

Um die so gewonnenen Strukturdaten zu bestätigen, wurden Quervernetzungsexperimente des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz BS<sup>2</sup>G durchgeführt. Dabei wurden Quervernetzungsprodukte identifiziert, die eine ausgeprägte Konformationsänderung, sowohl im freien, als auch im ligandengebundenen Zustand bestätigen. Da bis dato keine hochauflösende Struktur des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins existiert, wurden die erhaltenen Quervernetzungsprodukte in die hochaufgelöste Struktur des PPAR- $\gamma$  (PDB-Eintrag: 3DZU) eingetragen, um erste Hinweise zur Konformation des PPAR- $\beta/\delta$  zu erhalten. Die Quervernetzungsprodukte mit dem flexiblen *N*-Terminus konnten jedoch nicht in diese Röntgenkristallstruktur übertragen werden, da dieser fehlte. Alle Quervernetzungsprodukte sind im Einklang mit der veröffentlichten Röntgenkristallstruktur. In den letzten Jahren wurden drei hochauflösende Strukturen von Kernrezeptoren veröffentlicht. Diese zeigen eine Interaktion der LBDs und DNA-

Bindungsdomänen (DBDs). Die Daten aus den Quervernetzungsreaktionen bestätigen dies und erweitern die bekannten Strukturen, da erstmalig auch Strukturdaten über den hochflexiblen *N*-Terminus gewonnen werden konnten.

Während der Photoaffinitätsmarkierungsstudien wurde ein Wasserverlust der Bpa-vernetzten Peptide vor der Fragmentierung beobachtet. Zusätzlich war aus vorherigen Studien die unzulängliche Fragmentierung der Bpa-vernetzten Peptide bekannt. Um Einblick in das Fragmentierungsverhalten der Bpa-Quervernetzungsprodukte zu erhalten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die F180Bpa Variante der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD unter UV-Bestrahlung intramolekular vernetzt und das proteolytische Peptidgemisch mittels verschiedener Fragmentierungsmethoden untersucht. Dabei kamen die kollisionsinduzierten Methoden CID und HCD, als auch ETD und die Kombinationsmethoden ETciD und EThcD zum Einsatz. Es konnte gezeigt werden, dass sich die drei ETD-basierten Fragmentierungstechniken für die sichere Identifizierung von mehrfach geladenen Vorläuferionen am besten eignen, da durch den radikalischen Mechanismus eine von der Bindungsenergie unabhängige Spaltung stattfindet. Die so entstehenden komplexeren Fragmentionenspektren der ETD-basierten Techniken sind informativer als die der kollisionsbasierten Methoden (CID und HCD), jedoch aufgrund ihrer Komplexität schwieriger interpretierbar.

## Summary

During the last 15 years, chemical cross-linking combined with mass spectrometry has evolved into an alternative tool to obtain structural information of a protein or protein complex. Usually amine-reactive cross-linkers and/or photoreactive amino acids are used to insert a covalent bond in the protein under investigation. The spacer exhibited by the cross-linker acts as a „molecular ruler“ to map distances between the cross-linked amino acids. The distances might than be used for studying conformational changes in proteins upon ligand binding or for a structural modeling.

The peroxisome-proliferator activated receptors (PPARs) are members of the nuclear receptor family. They are involved in the development of a number of diseases such as the metabolic syndrome, dyslipidemia, type 2 diabetes and cancer. As such, PPARs are important targets for drug development necessitated a detailed understanding of the interaction between PPARs and their protein binding partners. Three PPAR subtypes are known ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) that are activated by small molecules. All three subtypes are involved in gene transcription. PPAR- $\alpha$  influences lipid metabolism while the physiological functions of PPAR- $\beta/\delta$  are elusive. High resolution X-ray stuctures have been solved for the ligand binding domains (LBD) of PPARs, but there are only few structures available for full-length PPAR- $\gamma$ .

Aim of this work was to obtain three-dimensional structural information of PPAR- $\alpha$  and - $\beta/\delta$  upon ligand binding by chemical cross-linking and by specific ally incorporating photoreactive amino acids. To verify cross-linking data of previous studies, two variants of the PPAR- $\alpha$ -LBD were expressed, in which *para*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) was incorporated at the positions Leu-258 and Phe-273. After UV-irradiation, several cross-links were identified, revealing that a larger number of cross-links were identified in the ligand-free state than in the -bound state. This indicates a more flexible structure of PPAR- $\alpha$ -LBD in the ligand-free state and a more stable conformation after ligand binding. Especially the F273Bpa variant, conformational changes between the free- and bound-state were more pronounced. For variant L258Bpa, conformational changes were less intense, probably due to the exchange position being located the high flexible  $\Omega$ -loop. The PPAR- $\beta/\delta$ -LBD was expressed and purified in *E.coli*. PPAR- $\beta/\delta$ -LBD was cross-linked by different cross-linkers in the ligand-free and -bound-state. As for PPAR- $\alpha$ -LBD, a more rigid structure was observed upon ligand binding. Some of the identified cross-links, especially those connecting the *N*-terminus and various amino acids in the PPAR-

$\beta/\delta$ -LBD, does not match the published X-ray structure (pdb: 3TKM). Therefore, a major conformational change can be assumed to take place upon ligand binding.

To verify the structural information obtained for PPAR- $\beta/\delta$ -LBD, additional cross-linking experiments were conducted with PPAR- $\beta/\delta$  full-length protein. PPAR- $\beta/\delta$  was cross-linked with the amine-reactive cross-linker BS<sup>2</sup>G both in the presence and absence of ligands. A number of cross-links were identified confirming pronounced conformational changes as in the PPAR- $\beta/\delta$ -LBD. Interestingly, these conformational changes were observed in the ligand-free as well as in the ligand-bound state. As there are currently no high resolution structures available for PPAR- $\beta/\delta$ , the cross-links identified were mapped into the published X-ray structure of PPAR- $\gamma$  (pdb: 3DZU). Several of the cross-links identified, especially those with the *N*-terminus, could not be mapped into that structure because of the missing *N*-terminus. Apart from those missing cross-links, all data are in a good agreement with the published X-ray structure. In the last years, three structures of nuclear receptors have been published, revealing an interaction between LBDs and DNA-binding domains (DBDs). The cross-linking data found herein confirm these interactions and expand existing high-resolution structures with additional data of the highly flexible *N*-terminus.

In previous studies, ineffective and unique fragmentation of Bpa-cross-linked peptides was observed. In this work Bpa-cross-linked peptides exhibited a neutral loss of H<sub>2</sub>O from the precursor ion, even before the fragmentation process is induced. To study the fragmentation behaviour of Bpa-cross-linked peptides, the F180Bpa variant of PPAR- $\beta/\delta$ -LBD was cross-linked and the peptide mixture was fragmented by different fragmentation methods. The two collisional activation methods CID and HCD as well as ETD and the combined techniques ETciD and EThcD were applied. For multiply charged precursor ions, ETD was found to be the optimum fragmentation method resulting in the most confident identification of cross-linked products. The complicated fragment ion spectrum created by ETD contained a large amount of information on the cross-linked species and allowed an unambiguous identification of cross-links.

## 1. Grundlagen

### 1.1. Biologische Grundlagen

#### 1.1.1. Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren

Kernrezeptoren stellen eine Superfamilie dar, die aus 48 Proteinen mit strukturell ähnlichem Aufbau besteht [1]. Sie werden anhand ihrer Dimerisierung und DNA-Präferenz in vier Unterfamilien eingeteilt. Eine der Unterfamilien der Kernrezeptoren bildet Heterodimere mit den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR) und bindet an direkte Wiederholungen von DNA-Sequenzen. Zu dieser Unterfamilie gehören neben den *Retinoid Acid Receptors* (RAR), Vitamin D-Rezeptoren (VDR) und *Thyroid Hormone Receptors* (TR) auch die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) [2-4]. Diese Rezeptorklassen unterscheiden sich kaum hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur, wodurch anhand von Strukturuntersuchungen klassenübergreifende Rückschlüsse gezogen werden können. PPARs liegen im inaktiven Zustand als Heterodimer mit dem RXR und einem Korepressor vor. Nach Aktivierung durch Liganden des PPARs und RXRs dissoziiert der Korepressor. Das Heterodimer bindet im Zellkern an die Peroxisom-Proliferator-Erkennungssequenz (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Response Element*, PPRE) und aktiviert die Gentranskription [5, 6] (Abbildung 1). Das PPRE besteht aus direkten Wiederholungselementen (*Direct Repeat-1 Elements*) der beiden Hexanukleotidsequenzen AGGTCA, unterbrochen durch ein Nukleotid [7, 8]. Um die Gentranskription zu inhibieren oder zu induzieren, können eine Vielzahl an Korepressoren, wie der *Nuclear Receptor Co-Repressor* (NCoR) und *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid Hormone Receptor* (SMRT), und Koaktivatoren, wie der *Steroid Receptor Co-Activator* (SRC)-1 und *PPAR Binding Protein* (PBP), an das Heterodimer binden [9-12].

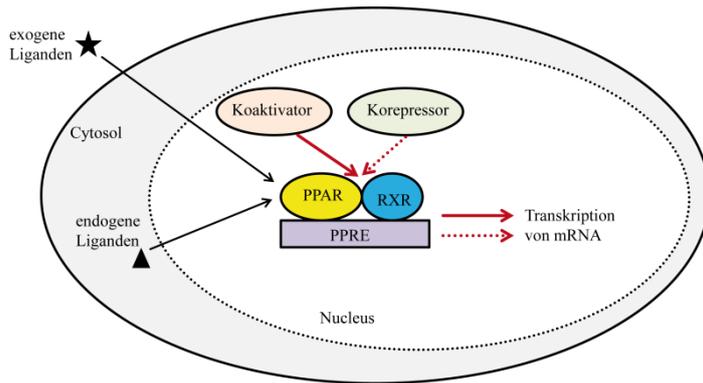


Abbildung 1: Zusammenspiel zwischen PPAR, RXR, PPRE, Koaktivatoren/Korepressoren und Liganden für die Transkriptionsaktivierung/-deaktivierung.

Die PPARs bestehen aus vier funktionellen Domänen (Abbildung 2). Die A/B-Domäne befindet sich am hochflexiblen N-Terminus und beinhaltet die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktionshelix 1 (AF-1) [13]. Sie ist Angriffspunkt für die Phosphorylierung der PPARs durch Kinasen [14]. An die A/B-Domäne schließt sich die C-Domäne an, welche die DNA-Bindedomäne (DBD) darstellt. Die DBD enthält zwei Zinkfinger-Motive, wodurch sie maßgeblich an der Bindung des PPRE beteiligt ist [15]. Domäne D, auch als *Hinge*-Region bezeichnet, ist hoch flexibel und bindet die Kofaktoren. In der E/F-Domäne befindet sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD). Diese enthält C-terminal die ligandenabhängige AF-2. An die AF-2 können ebenfalls PPAR-Kofaktoren über die Aminosäuresequenzen LXXLL (Koaktivatoren) und LXXXLXXX (Korepressoren) binden [16, 17]. Die Bindung der Kofaktoren und die daraus folgende Gentranskription wird durch den Liganden in der hydrophoben Bindungstasche maßgeblich beeinflusst [18, 19]. Dabei nimmt die Natur des Liganden eine entscheidende Rolle ein. So wurden unterschiedliche Konformationen der LBD der Kernrezeptoren gefunden, je nachdem ob ein Agonist, Antagonist oder inverser Agonist bindet (Abbildung 3) [20]. Zusätzlich ist die LBD maßgeblich an der Heterodimerisierung mit RXR beteiligt [21].

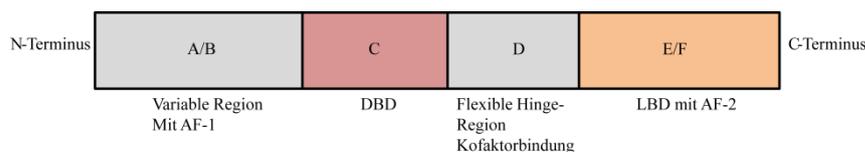


Abbildung 2: Schema der vier PPAR-Domänen

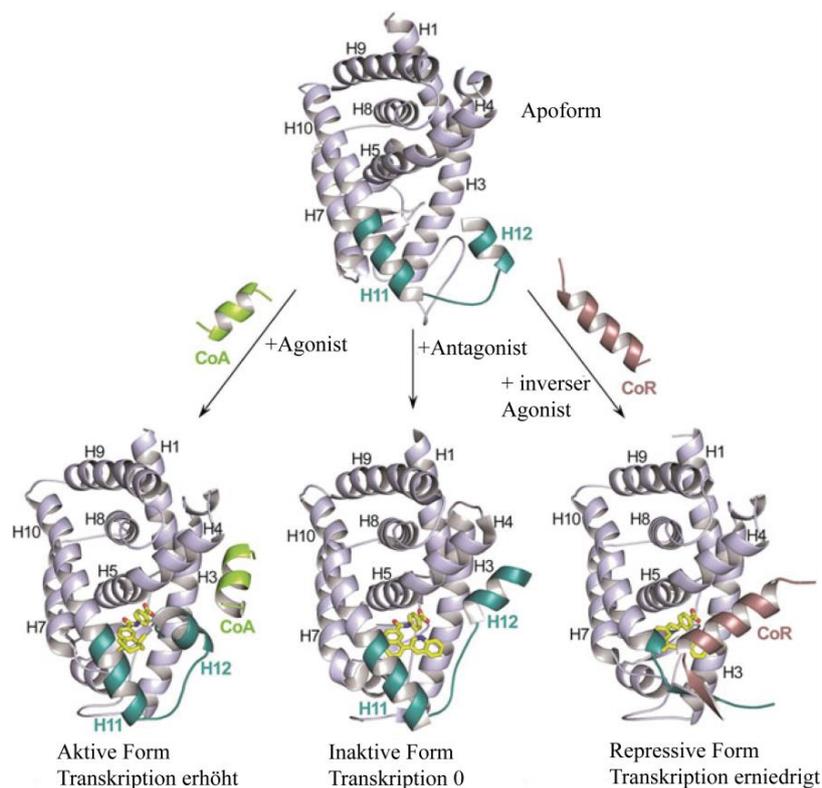


Abbildung 3: Konformationsänderungen der LBD von Kernrezeptoren nach Bindung eines Agonisten (links), eines Antagonisten (Mitte) und eines inversen Agonisten (rechts) (modifiziert nach [20]). Je nach Art des Liganden werden Koaktivatoren (CoA) oder Korepressoren (CoR) rekrutiert. Die Helices sind mit H1-H12 gekennzeichnet.

Die strukturelle Aufklärung der PPARs und deren Komplexe ist für die Entwicklung neuer Arzneistoffe von großer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden Röntgenkristallstrukturen der LBD der verschiedenen PPARs publiziert (Abbildung 4) [22-24]. Diese weisen mit unterschiedlichen Kofaktoren und Liganden nur geringfügige Unterschiede in ihren Tertiärstrukturen auf. Die LBD der PPARs besteht aus einem gemischten  $\beta$ -Faltblatt aus drei  $\beta$ -Faltblattsträngen und zwölf  $\alpha$ -Helices, welche ein antiparalleles Helix-Sandwich und drei Seiten der hydrophoben Bindungstasche mit einer Größe von  $1300 \text{ \AA}^3$  bilden [24]. Diese Bindetasche ist größer als für andere nukleäre Rezeptoren, wodurch PPARs eine Vielzahl an natürlichen Liganden, wie freie Fettsäuren, Eicosanoide, aber auch synthetische lipophile Säuren, binden können [25]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Heterodimerisierung des PPAR- $\alpha$  mit RXR- $\alpha$  in Deletionsvarianten ohne AF-2 (entsprechend Helix 12, Abbildung 3) und der Helices 10 und 11 nicht mehr stattfinden kann [26]. Neben der AF-2 ist die flexible  $\Omega$ -Schleife

(orange in Abbildung 4) an der Bindung von Liganden beteiligt. Erste Untersuchungen an der aktiven LBD von RAR- $\gamma$  und der inaktiven LBD von RXR- $\alpha$  zeigten, dass nach Bindung des Liganden an diese Kernrezeptoren eine spezifische Konformation der AF-2 stabilisiert wird und die AF-2 die Bindungstasche nach einem „Mausefallenprinzip“ verschließt [27]. Dieser Mechanismus wurde anschließend für alle Kernrezeptoren angenommen. Neuere Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie, NMR und Wasserstoff/Deuterium-Austausch (H/D) gekoppelt mit Massenspektrometrie ergaben eine ungeordnete Struktur der AF-2 von Kernrezeptoren im ligandenfreiem Zustand [28-36]. Für die PPARs stehen neben Röntgenkristallstrukturdaten der LBD auch hochaufgelöste NMR-Strukturdaten (DBD des PPAR- $\beta/\delta$  PDB-Eintrag: 2ENV; LBD des PPAR- $\gamma$  PDB-Eintrag: 2QMV) zur Verfügung. Bisher existieren keine hochaufgelösten Strukturdaten für die hochflexible A/B-Domäne mit der AF-1 und dem *N*-Terminus. Die umfangreichsten Röntgenkristallstrukturen wurden mit dem Subtyp PPAR- $\gamma$  (PDB-Einträge: 3DZU, 3DZY und 3EEO) gewonnen, in denen das Volllängenprotein ohne den flexiblen *N*-Terminus mit RXR- $\alpha$  und verschiedenen Liganden und Kofaktoren kokristallisiert wurde [37].

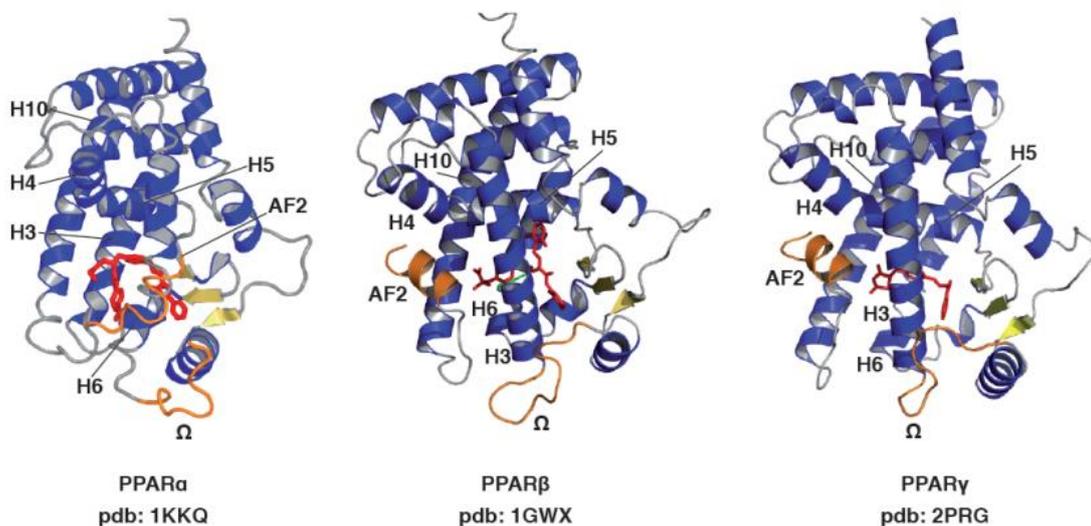


Abbildung 4: Ausgewählte Röntgenkristallstrukturen der drei PPAR-Subtypen [22-24]. Die AF2 und die  $\Omega$ -Schlaufe sind in orange, der jeweilige kokristallisierte Ligand in rot und das antiparallele  $\beta$ -Faltblattmotiv in gelb dargestellt.

Die PPARs sind im Körper ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren [38]. Sie wurden 1990 entdeckt und ihre Bezeichnung rührt von einer Beobachtung in Nagetieren,

dass Agonisten wie Clofibrat die Proliferation und das Wachstum von Peroxisomen beeinflussen [39, 40]. Im menschlichen Organismus konnte dies bisher nicht bewiesen werden [41]. Drei PPAR-Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) sind bis dato identifiziert worden [25, 42, 43]. Sie werden durch niedermolekulare Liganden, wie Prostaglandine und Fettsäuren, aber auch durch synthetische Liganden aktiviert [44-46]. Die PPARs sind an der Entstehung von Diabetes mellitus Typ II, Dyslipidämie, dem metabolischen Syndrom und Krebs beteiligt [47-50]. PPAR- $\alpha$  ist für den Lipidmetabolismus in der Leber und der quergestreiften Muskulatur von Bedeutung, während PPAR- $\gamma$  die Fettsäurelagerung in verschiedenen Geweben reguliert [51-53]. PPAR- $\beta/\delta$  wird ubiquitär exprimiert [54] und ist am Fettsäuremetabolismus [55], der Zelldifferenzierung [56] und der Entstehung von Krebs beteiligt [57]. Daher sind die PPARs seit einigen Jahren bedeutsame Zielstrukturen für neue Arzneistoffe.

### **1.1.2. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- $\alpha$**

Im menschlichen Organismus wird PPAR- $\alpha$  verstärkt in Geweben exprimiert, die ihre Energie aus dem Lipidmetabolismus gewinnen. Dazu zählen Leber, Herz- und Skelettmuskeln, in denen PPAR- $\alpha$  die Lipidhomöostase reguliert [58-63]. PPAR- $\alpha$  wird ebenfalls im braunen Fettgewebe, Niere, Nebenniere, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert [62-64]. Natürliche endogene Liganden mit hoher Bindungsaffinität zum PPAR- $\alpha$  sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Derivate der Leukotriene und Hydrolyseprodukte des *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL). PPAR- $\alpha$  ist ebenfalls ein Hauptregulator im mitochondrialen und peroxisomalen Stoffwechselweg der  $\beta$ -Oxidation, welche an der Entstehung von Lebererkrankungen, wie der Hepatokarzinogenese in Nagetieren und Arzneimittel-induzierten Leberschäden, beteiligt ist [65]. Die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  inhibiert in vaskulären glatten Muskelzellen die proinflammatorische Genexpression und verlangsamt damit die Entstehung von Atherosklerose [66, 67]. Die biologischen Funktionen von PPAR- $\alpha$  im kardiovaskulären System wurden anhand von *Knock-Out* (KO)-Mäusen, in denen das Gen für PPAR- $\alpha$  ausgeschaltet wurde, untersucht [68-70]. Dabei entwickelten die KO-Mäuse progressive kardiale Fibrosen mit abnormalen Mitochondrien und Myofibrillen [70]. Außerdem zeigten histologische Studien eine kardiale Hypertrophie [71]. Ex vivo-Studien deuteten an, dass ein Verlust von PPAR- $\alpha$  durch erhöhten oxidativen Stress an der Schädigung des Myosin II beteiligt ist [71-74]. Der Schutz der Zellen vor oxidativem Stress wird durch

aktiviertes PPAR- $\alpha$  gewährleistet. Dabei unterdrückt PPAR- $\alpha$  die NF- $\kappa$ B-induzierte Zytokinproduktion [75, 76]. Die erhöhte, PPAR- $\alpha$  vermittelte Transkription von Genen kann durch die p38 *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) mittels Phosphorylierungen an PPAR- $\alpha$  erniedrigt werden [77, 78]. Dieser p38 MAPK-Weg wird durch kardialen Stress aktiviert, wie er bei Diabetes, Herzfehlern und kardialer Hypertrophie vorkommt. Als Gegenregulation wird PPAR- $\alpha$  ebenfalls vermehrt aktiviert, was zu veränderten Glucose- und Fettsäurewerten führt, die bei diesen Erkrankungen beobachtet werden können [77, 79]. Die PPAR- $\alpha$ -Überexpression im Mausmyokard schwächt die Genexpression des Glucosetransporters und damit die Glucoseaufnahme in die Zellen [80]. Zudem kommt es zu einer Ansammlung an Triglyceriden in kardialen Muskelzellen [81]. In der Pathophysiologie der diabetischen Kardiomyopathie spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle. Diese kann durch den PPAR- $\alpha$  Agonisten Fenofibrat unterdrückt werden und zeigt die wichtige Rolle der PPAR- $\alpha$  Liganden bei dieser Erkrankung [82, 83]. Die Arzneistoffgruppe der Fibrate als PPAR- $\alpha$  Agonisten wird insbesondere zur Behandlung der Hyperlipidämie eingesetzt. Die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  durch Fibrate senkt durch eine verringerte Expression von Apolipoprotein C-III die Konzentration an Triglycerid-reichen Lipoproteinen im Blut [84, 85]. Ebenfalls wird die *High Density Lipoprotein* (HDL)-Konzentration bei gleichzeitiger Senkung der *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Konzentration im Blut durch vermehrte Expression an Apolipoprotein A-I und A-II erhöht [84-86]. Durch die Verringerung der Konzentrationen von VLDL, LDL und freien Triglyceriden bei gleichzeitiger Erhöhung von HDL-Konzentrationen wird das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere bei Diabetes mellitus Typ II, gesenkt [87].

### **1.1.3. Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- $\beta/\delta$**

PPAR- $\beta/\delta$  wird vermehrt im Fettgewebe, Leber, Knochen, Herz- und Skelettmuskel, Gehirn, Niere, Darm und Blutgefäßen exprimiert [64, 88, 89]. Die physiologische Funktion von PPAR- $\beta/\delta$  ist allerdings bisher wenig untersucht und verstanden [90, 91]. Es ist jedoch bekannt, dass die Aktivierung von PPAR- $\beta/\delta$  den Lipidmetabolismus im Fettgewebe, im Skelettmuskel und im Herz steigert. Im Skelettmuskel konnte unter Fasten und Anstrengung eine erhöhte Expression von PPAR- $\beta/\delta$  gezeigt werden [92]. Des Weiteren konnte eine Interaktion zwischen PPAR- $\beta/\delta$  und der bewegungsinduzierten *AMP-Activated Protein Kinase* (AMPK) gezeigt werden. Diese Wechselwirkung erhöht

die Glucoseaufnahme, die Fettsäureoxidation, die mitochondriale Biogenese und die Insulinsensitivität. Zusätzlich konnte ein synergistischer Effekt auf die Gentranskription der Laktatdehydrogenase b und damit eine verminderte Laktatakkumulation gezeigt werden [93, 94]. Außerdem erhöht die Aktivierung des PPAR- $\beta/\delta$  die HDL-Konzentration im Blut bei gleichzeitiger Senkung der Insulinresistenz und LDL-Konzentration [95]. Dabei wird die Insulinresistenz durch eine vermehrte Bildung des Glucagon-ähnlichen Peptid 1 gesenkt [96]. Die Aktivierung des PPAR- $\beta/\delta$  könnte somit in Zukunft für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ II eingesetzt werden. Zudem begünstigt PPAR- $\beta/\delta$  die Zellproliferation und -differenzierung [54]. PPAR- $\beta/\delta$  beeinflusst sowohl die Keratinozytendifferenzierung in der Haut als auch die Wundheilung [97, 98]. Im Gehirn beeinflusst es die Differenzierung der Oligodendrozyten [99] und im Darm die Differenzierung der Epithelzellen [100]. In den Knochen ist PPAR- $\beta/\delta$  von den drei PPAR-Subtypen der am stärksten exprimierte; er vermindert die Osteoklastogenese und verstärkt die Osteoblastendifferenzierung [101]. Er ist ebenfalls der am stärksten exprimierte Subtyp in blutbildenden Stammzellen [102]. Bis zu einer gewichtsbedingten Begrenzung hat die Aktivierung von PPAR- $\beta/\delta$  durch die Hemmung der Expression von *Vascular Cell Adhesion Molecule* (VCAM) 1 und *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP1) entzündungshemmende Effekte [103-105]. In Ratten, die unter diabetischer Myopathie litten, konnte eine kardial verringerte Expression an PPAR- $\beta/\delta$  festgestellt werden [106, 107]. Eine Reduktion der Expression von PPAR- $\beta/\delta$  im Krankheitsbild der Hyperglykämie ist verbunden mit einer Zunahme der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und einer erhöhten Aktivität von Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin 6 und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH). Die genaue Funktion von Liganden des PPAR- $\beta/\delta$  auf die Regulation von kardialen Muskelzellen im Krankheitsbild des Diabetes mellitus muss noch evaluiert werden und bedarf weiterer Studien [83, 106]. Der selektive PPAR- $\beta/\delta$ -Agonist GW1516 ist für Effekte in der Fettsäure-induzierten Entzündung von kardialen Muskelzellen verantwortlich [108]. Ebenfalls reduziert wurde die Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen, MCP-1 und TNF- $\alpha$  in der Palmitat-stimulierten, humanen kardialen AC16 Zelllinie sowie in Herzen von Mäusen, die unter eine fettreichen Diät gesetzt wurden. Damit könnte die Aktivierung von PPAR- $\beta/\delta$  als antiinflammatorisches Prinzip therapeutisch bei der diabetischen Kardiomyopathie Anwendung finden [108]. Eine andere Studie konnte zeigen, dass PPAR- $\beta/\delta$  im ligandenfreien Zustand in Makrophagen

das *B-Cell Lymphoma 6 Protein* (BCL6) bindet und nach Ligandenstimulierung von diesem Protein dissoziiert und die Expression von NF- $\kappa$ B -Zielgenen, wie MCP-1, reduziert [109]. Damit wird wiederum Entzündungsprozessen entgegengewirkt. Die ligandenunabhängige Repression konnte durch PPAR- $\beta/\delta$ -Deletionsvarianten bewiesen werden. Dabei stieg nach Deletion von PPAR- $\beta/\delta$  die Expression verschiedener Gene an [110, 111]. So konnte auch eine Herunterregulierung der PPAR- $\alpha$ - und PPAR- $\gamma$ -vermittelten Transaktivierung durch PPAR- $\beta/\delta$  gezeigt werden [112]. In Gegensatz zu den beiden anderen Subtypen, PPAR- $\alpha$  und - $\gamma$ , besitzt PPAR- $\beta/\delta$  im freien Zustand nur eine kurze Halbwertszeit und wird schnell ubiquitinyliert und abgebaut. Durch die Aktivierung mit Liganden wird die Ubiquitinylierung jedoch verhindert [77, 113]. Interessanterweise werden die Gene für Ubiquitin-C durch PPAR- $\beta/\delta$  reguliert [114]. Neben natürlichen und synthetischen Agonisten, wie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Ombuin, GW0742 und GW1516, werden auch synthetische Antagonisten, wie GSK0660, DG172 und PT-S58, eingesetzt, um die biologischen Funktionen von PPAR- $\beta/\delta$  vollständig zu verstehen [44, 115-117].

## 1.2. Massenspektrometrische Grundlagen

Die Massenspektrometrie (MS) ist seit Ende der 1980er Jahre unersetzlich in der Analytik von Proteinen und deren Komplexen [118, 119] und findet darüberhinaus in allen naturwissenschaftlichen Bereichen Anwendung. Dabei werden die organischen oder anorganischen Analyten durch geeignete Ionisationsverfahren in die Gasphase überführt und anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) detektiert. Eine große Anzahl an Ionisationsmethoden kann heutzutage angewendet werden, wobei diese in „harte“ Ionisationsmethoden, wie Elektronenstoßionisation (EI) und chemische Ionisation (CI), und „weiche“ Ionisationsmethoden, wie Elektrosprayionisation (ESI) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) eingeteilt werden [120]. In den letzten Jahren wurden verschiedene Ionisationsverfahren, wie *Desorption Electrospray Ionization* (DESI) [121] oder *Direct Analysis in Real Time* (DART) [122], entwickelt, um Analyten ohne Probenvorbereitung analysieren zu können. Durch die geringe Probemenge und die Möglichkeit, auch außerhalb des Labors schnelle und sichere Ergebnisse zu produzieren, wird die Massenspektrometrie in Zukunft immer wichtiger für unseren Alltag werden, wie z.B. bei der Überprüfung von Lebensmitteln oder der Sprengstoffkontrolle an Flughäfen [120, 123].

Die beiden sanften Ionisationsmethoden ESI und MALDI kamen in dieser Arbeit zur Anwendung und werden im Folgenden näher erläutert.

### 1.2.1. Ionisationstechniken

#### 1.2.1.1. Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation

In den 1960er Jahren wurde die Grundlagentechnik der Laser-Desorption/Ionisation (LDI) entwickelt. Hiermit war es einfach kleine organische Moleküle unter 2000 u zu analysieren. Für größere Biomoleküle blieb es jedoch schwierig eindeutige Massenspektren zu erhalten [124]. Die punktuell hohen Temperaturen und Ionisationsenergien erschwerten dabei die Analyse von leicht fragmentierbaren Substanzen. In den 1980er Jahren wurde das Prinzip der LDI weiter zur Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) optimiert [125-128]. Zur selben Zeit wurde eine Methode aus der Kombination von flüssiger Matrix plus ultrafeinem Cobaltpulver entwickelt, die sich jedoch nicht durchsetzte [129-132]. Die Probe wird bei MALDI mit einer geeigneten Matrix (1:1000-1:10000) auf einem metallischen Probenhalter kokristallisiert und in die MALDI-Quelle überführt (Abbildung 5). Dabei müssen beim Kristallisationsvorgang homogene Kristalle aus Matrix und Analyt entstehen, um eine effektive Ionisation zu ermöglichen. Für die Probenpräparation werden die Analyt- und Matrixlösungen in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch entweder direkt auf dem Probenhalter oder schon zuvor gemischt und auf den Probenhalter aufgetragen. Diese Methode nennt sich *dried-droplet*-Präparation. Die Matrices müssen einen niedrigen Dampfdruck aufweisen, damit sie sich im Vakuum der Ionenquelle nicht verflüchtigen und das Laserlicht ausreichend absorbieren [133]. Als Matrices haben sich Sinapinsäure [134], 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) [135] und auch Kombinationen mit DHB als Hauptbestandteil, wie Super-DHB [136], für die Analyse von Proteinen durchgesetzt. Für Peptide hat sich hingegen  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure bewährt [137]. Als Strahlungsquellen kommen in der MALDI häufig UV-Laser, wie Stickstofflaser und Nd:Yag-Laser, zum Einsatz [120]. Diese emittieren kurze Pulse von 3-10 ns, die benötigt werden, um eine Abtragung der Probenschicht aus Matrix- und Analytmolekülen zu gewährleisten. Durch die kurzen Intervalle beim Beschießen der Probe in der MALDI-Ionenquelle wird neben der geringeren thermischen Belastung der Probe ein einheitlicher Startpunkt insbesondere für den Flugzeitanalysator (*Time-of-Flight*, TOF) gewährleistet (Abbildung 5). Zusammen

mit einer Verzögerung des Anlegens der Beschleunigungsspannung, der *Delayed-Extraction*-Methode, wird der Einfluss der Ionenerzeugung auf das Auflösungsvermögen und die Massengenauigkeit verringert [120]. Der Ionisationsvorgang ist immer noch Bestandteil laufender Forschungsprojekte und bis heute nicht im Detail geklärt. Durch den Laserbeschuss werden die Ionen und Neutralteilchen mittels Überschallexpansion als Desorptionswolke ins Vakuum der MALDI-Quelle desorbiert. Für den Prozess der Ionenerzeugung selbst werden mehrere Möglichkeiten diskutiert. Zum einen kann eine direkte Übertragung von Protonen auf die Analyten in der Gasphase stattfinden, zum anderen können diese im Kristall schon als Ionenpaar vorliegen und gemeinsam desorbiert werden, wodurch die Ladung übertragen wird [120]. Des Weiteren können durch Photoionisation in der Gasphase absorbierende Analyten direkt zu einem Anion- bzw. Kationradikal ionisiert werden. Welcher Prozess den größten Anteil ausmacht, hängt vom jeweiligen Analyten und der Matrix ab [120]. Im Gegensatz zur Elektrospray-Ionisation (ESI) werden durch den MALDI-Prozess vorwiegend einfach geladene Ionen erhalten. Dies ist mit dem *Lucky-Survivor*-Modell erklärbar [133]. Das durch den Laserbeschuss entstandene Plasma besteht sowohl aus einfach wie auch aus mehrfach geladenen Kationen und Anionen. Je höher eine Spezies geladen ist, desto schneller und effektiver ist die Neutralisation infolge der Rekombination aus kationischen und anionischen Plasmabestandteilen. Bei einfach geladenen Teilchen findet diese Rekombination nur langsam statt, wodurch diese detektierbar sind [133]. Heutzutage ist der MALDI-Prozess Standard in der bildgebenden Massenspektrometrie (MALDI-Imaging) von Gewebeschnitten [138] und für die Spezifizierung von Mikroorganismen [139].

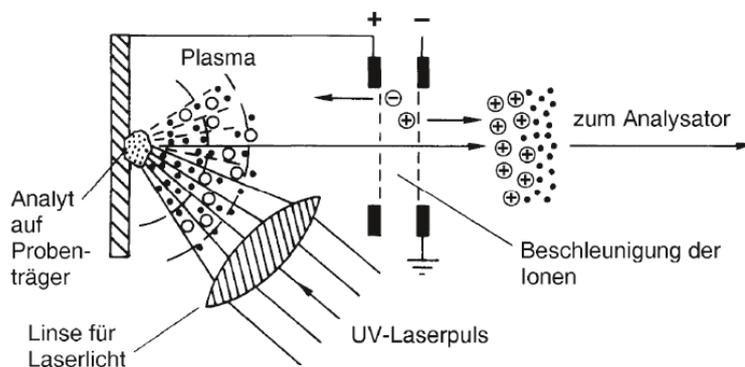


Abbildung 5: Schema einer Laser-Desorptions-Ionenquelle [120]

### 1.2.1.2. Elektrospray-Ionisation

Die ESI ist die am häufigsten in der Massenspektrometrie angewendete Ionisationsmethode, insbesondere für Peptide und Proteine. Sie ist die erste Wahl für die Kopplung von Massenspektrometrie mit der Flüssigkeitschromatographie (LC/MS) [120]. Die Analyten werden dabei unter Atmosphärendruck aus einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom in die Gasphase überführt. Im Fall von höhermolekularen Analyten entstehen durch den ESI-Prozess typischerweise mehrfach geladene Ionen, wodurch die  $m/z$ -Werte in einen für die meisten Massenanalytoren analysierbaren  $m/z$ -Bereich (meist bis  $m/z$  2000) verschoben werden. Die zugrunde liegenden Prinzipien der Elektrospray-Ionisation wurden schon 1917 von Zeleny [140] und 1964 von Taylor [141] formuliert, bevor sie 1968 von der Arbeitsgruppe um Dole entwickelt wurde [142]. Jedoch hatte die Arbeitsgruppe Schwierigkeiten, die Ionen der hochmolekularen Polystyrole mit ihren Massenspektrometern nachzuweisen. John Fenn erkannte Ende der 1980er Jahre, dass sich Analyten mit einem Molekulargewicht von bis zu 2000 u mit einem Quadrupol und einer geeigneten ESI-Quelle analysieren lassen [143]. Entscheidend für die Überführung der Aerosoltröpfchen aus der Atmosphäre in das Vakuum des Massenspektrometers ist Energiezufuhr in Form von Wärme. Dadurch wird das Ausfrieren der Tröpfchen unter der adiabatischen Expansion verhindert. Die von Fenn entwickelte ESI-Quelle ist in Abbildung 6 dargestellt. Dabei wird unter Normalfluss (5-20  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) die Probenlösung über eine Sprühkapillare, an der ein Potenzial von 3-4 kV anliegt, unter Atmosphärendruck versprüht. Als Alternative zu einem heißen, gegengerichteten Stickstoffstrom ist auch eine beheizbare Kapillare zur Verdampfung des Lösungsmittels möglich. Über eine kurze Transferkapillare gelangt ein kleiner Anteil des versprühten Materials in die erste Pumpstufe (ca. 1 mbar). Das Gas breitet sich in einer Überschallexpansion frei aus und gelangt über den Skimmer in das Hochvakuum des Massenspektrometers (ca  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  mbar) [120].

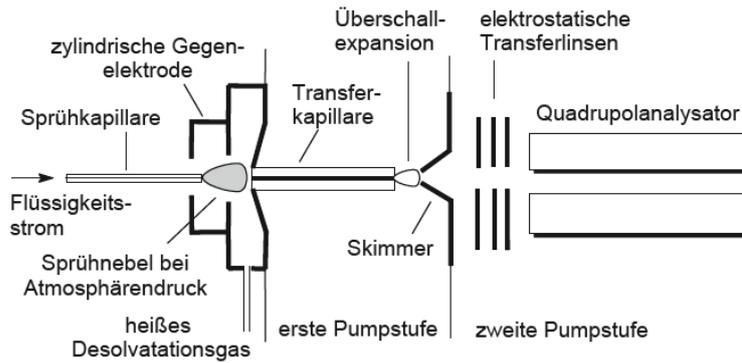


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ESI-Quelle entwickelt von Fenn (aus [120] nach [143])

Bei Verwendung einer engeren Sprühkapillare aus Borosilikatglas mit einem Volumen von wenigen Mikrolitern und einer Spitzenöffnung mit einem Durchmesser von 1-4  $\mu\text{m}$ , kann sich ein stabiles Elektrospray schon bei Flussgeschwindigkeiten von 20-50 nl/min realisieren lassen (Nano-ESI) [144]. Bei der Nano-ESI entstehen Tröpfchen mit einem 100-1000-fach kleineren Volumen im Vergleich zur Normalfluss-ESI. Unter Nano-ESI-Bedingungen ist es ebenfalls möglich, hochpolare Lösungsmittel, wie Wasser, zu verwenden. Zusätzlich ist der Probenverbrauch extrem niedrig und Puffersalze werden besser toleriert als bei der konventionellen ESI [145]. Die angelegte Spannung an die Sprühkapillare ist mit 0,7-1,2 kV ebenfalls geringer als bei der Normalfluss-ESI. Entscheidend für Nano-ESI ist die Entstehung eines breiten Konusstrahls, dem sogenannten *Taylor-Konus* [141] (Abbildung 7), der aus geladenen Mikrotröpfchen besteht. Dafür müssen experimentelle Parameter, wie Polarität des Lösungsmittels, Probenkonzentration und Sprühspannung optimiert werden. So kann zum Beispiel eine zu hohe Sprühspannung durch übermäßig breite Streuung der Mikrotröpfchen zu einem Probenverlust führen und durch elektrische Entladungen die Kapillarspitze und die Geräteelektronik beschädigen [120].

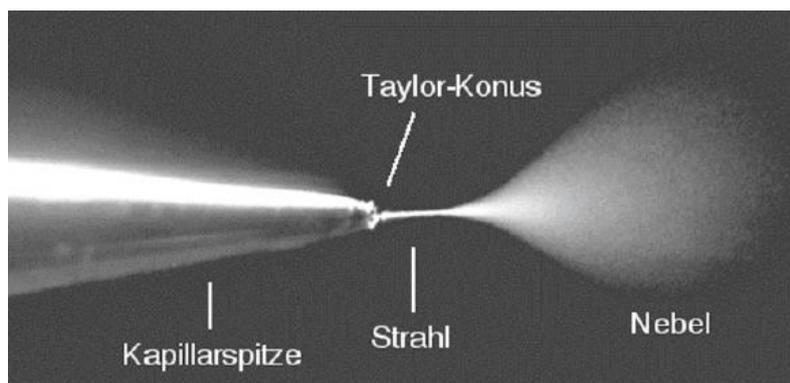


Abbildung 7: Elektrospray aus einer Nano-ESI-Kapillare mit Bildung des *Taylor-Konus* [120].

Im Gegensatz zu anderen Ionisationsmethoden, wie MALDI, müssen in der Lösung Analytationen vorherrschen, da Ionen beim ESI-Prozess nicht aktiv gebildet werden. Die Ionenbildung kann durch einen dreistufigen Prozess aus Erzeugung des elektrisch geladenen Sprays, Verkleinerung der Tröpfchengröße und die vollständige Desolvatisierung der Ionen beschrieben werden. Durch eine angelegte Kapillarspannung werden die geladenen Teilchen in der Lösung getrennt. Je nachdem, ob die Kapillare als Anode oder Kathode und das Massenspektrometer als Gegenpart fungiert, wandern die Ionen entweder Richtung Massenspektrometer oder Kapillarwand. An der Öffnung der Kapillare wird der Flüssigkeitsstrom einem elektrischen Feld ausgesetzt, was zur Verformung des Flüssigkeitsstroms zum *Taylor-Konus*, führt. Wenn die Oberflächenspannung durch die elektrostatischen Kräfte überwunden ist, emittiert von der Spitze, dem Punkt mit der höchsten Ladungsdichte, ein Flüssigkeitsstrahl in Richtung Massenspektrometer. Dieser ist nicht stabil und zerfällt in Mikrotröpfchen. Durch Coulomb-Abstoßungen driften diese rasch auseinander, wodurch ein feines Spray entsteht (Abbildung 8).

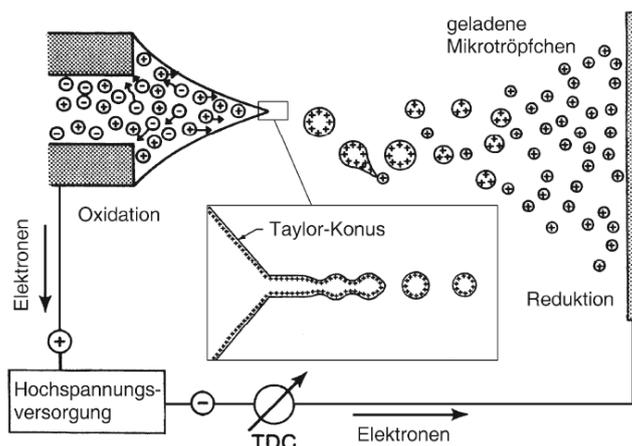


Abbildung 8: Schematische Darstellung der *Taylor-Konusbildung*, Ionenemission und dem Zerfall in ein feines Spray [146].

Für den Prozess der feinen Tröpfchenbildung nahm man ursprünglich an, dass durch Coulomb-Explosionen die Mikrotröpfchen immer kleiner werden. Neuere Untersuchungen mittels Blitzlicht-Mikrofotografie zeigen, dass sich feine Mikrotröpfchen von größeren Tröpfchen abstoßen [146, 147]. Dies geschieht am verjüngten Ende des Tröpfchens, welches während des Fluges deformiert wird. Dadurch ist die Ladungsdichte auf der Oberfläche nicht homogen verteilt, wodurch am Rayleigh-Limit [148], wenn die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung übersteigt, kleine Tröpfchen als Tröpfchen-Ableger abgesondert werden. Diese Tröpfchen-Ableger besitzen nur 1-2% der Masse, aber 10-18% der Ladung des Vorläufertröpfchens [147]. Für die Freisetzung der Ionen aus den geladenen Mikrotröpfchen gibt es zwei Modelle. Das Modell des geladenen Rückstands (*charged residue model*) geht davon aus, dass es nach Verdampfen der Lösungsmittelmoleküle zu einer vollständigen Desolvatisierung der Analytmoleküle kommt und auf diese die verbliebenen Ladungen des Mikrotröpfchens übertragen werden [120, 142, 149]. Das zweite, etwas neuere Modell der Ionenverdampfung (*ion evaporation model*) beschreibt die Bildung von desolvatisierten Ionen durch direkte Verdampfung von der Oberfläche des hochgeladenen Mikrotröpfchens [150, 151]. Der letzte Schritt der Freisetzung von Ionen bei ESI wird weiterhin diskutiert [147, 150].

### 1.2.2. Massenspektrometern

Die in dieser Arbeit verwendeten (Hybrid-)Massenspektrometer enthalten unterschiedliche Massenspektrometern, die im Weiteren näher erläutert werden.

### 1.2.2.1. Der Flugzeit-Massenanalysator

Schon 1946 wurde der erste Flugzeit-Massenanalysator (*time-of-flight*, TOF) konstruiert [152]. In einem TOF-Analysator werden die Ionen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten in einer feldfreien Driftstrecke zeitlich voneinander getrennt. Dabei erreichen leichtere Ionen den Detektor früher als schwerere Ionen. Dafür ist eine pulsierende Ionisationsmethode, wie MALDI (1.2.1.1), hervorragend geeignet, da diese durch den Laserpuls einen einheitlichen Startpunkt ermöglicht. Die Kopplung der MALDI mit dem TOF-Analysator erzeugte eine große Nachfrage an leistungsfähigeren TOF-Massenspektrometern, um Ionen mit sehr hohen Massen (theoretisch unbegrenzt [153, 154]) analysieren zu können. Nach Erzeugung der Ionen werden diese durch eine angelegte Spannung  $U$  beschleunigt. Dieser Zusammenhang der elektrischen und kinetischen Energie ist in Gleichung I dargestellt. Ist die Länge des Flugrohres bekannt, kann über die Bestimmung der Flugzeit  $t$  von Ionen in einer feldfreien Umgebung bei konstanter Geschwindigkeit  $v$  über die Strecke  $s$  ihr  $m/z$ -Wert bestimmt werden (Gleichung I und II).

$$E_{el} = ezU = \frac{1}{2} m_i v^2 = E_{kin}$$

Gleichung I: Zusammenhang der potentiellen Energie  $E_{el}$  und der kinetischen Energie  $E_{kin}$  eines geladenen Teilchens im elektrischen Feld.

$$\frac{m_i}{z} = \frac{2eUt^2}{s^2}$$

Gleichung II: Beziehung des  $m/z$ -Wertes ( $m$ : Masse des Ions,  $z$ : Ladung) eines Ions und den Geräteparametern der Strecke  $s$ , der Spannung  $U$  und dem experimentellen Zeitwert  $t$ .

In dieser Arbeit kam das zur neueren Generation von MALDI-TOF-Geräten gehörende Ultraflex III MALDI-TOF/TOF-Gerät der Firma Bruker Daltonik zum Einsatz. Die durch den MALDI-Prozess entstehenden Ionen besitzen vor ihrer Beschleunigung in der Gasphase unterschiedliche Startpunkte, Startzeiten, Anfangsenergien und Bewegungsrichtungen [155]. Um den dadurch bedingten Auflösungsverlust zu kompensieren, wird in den neueren Geräten eine hohe Beschleunigungsspannung (10-30 kV) angelegt, die Extraktion der Ionen um 200 ns vor der Beschleunigung verzögert (*delayed extraction*) [156, 157], eine zweistufige Beschleunigungsquelle zum Ausgleich anfänglicher Energieverteilungen verwendet [158] und ein hohes Vakuum ( $10^{-7}$  mbar) im Massenspektrometer angelegt [159]. Zudem ist es möglich, die Ionen in dem 1994

entwickelten Reflektron [160] zu fokussieren (Abbildung 9). Dabei fungiert das Reflektron als Ionenspiegel, so dass Ionen mit gleichem  $m/z$ -Wert, aber unterschiedlichen kinetischen Energien gemeinsam am Reflektron-Detektor ankommen. Das Reflektron besteht aus ringförmigen Elektroden, an denen das 1,05 bis 1,10-fache der Beschleunigungsspannung angelegt wird. Die Ionen dringen in das Feld des Reflektrons ein, verlieren dabei ihre kinetische Energie und werden in entgegengesetzter Richtung aus dem Reflektron ausgeworfen. Ionen mit höheren kinetischen Energien dringen tiefer und länger ins Feld des Reflektrons ein als Ionen mit niedrigeren kinetischen Energien. Dadurch wird die Flugzeit von Ionen mit gleichen  $m/z$ -Werten, aber unterschiedlichen kinetischen Energien, korrigiert und die Auflösung des Massenspektrometers deutlich verbessert [155, 161]. Das Reflektron befindet sich hinter der feldfreien Driftregion und vor einem Detektor, wodurch nach Abschaltung der Reflektronspannung das Massenspektrometer auch im linearen Modus betrieben werden kann (Abbildung 9).

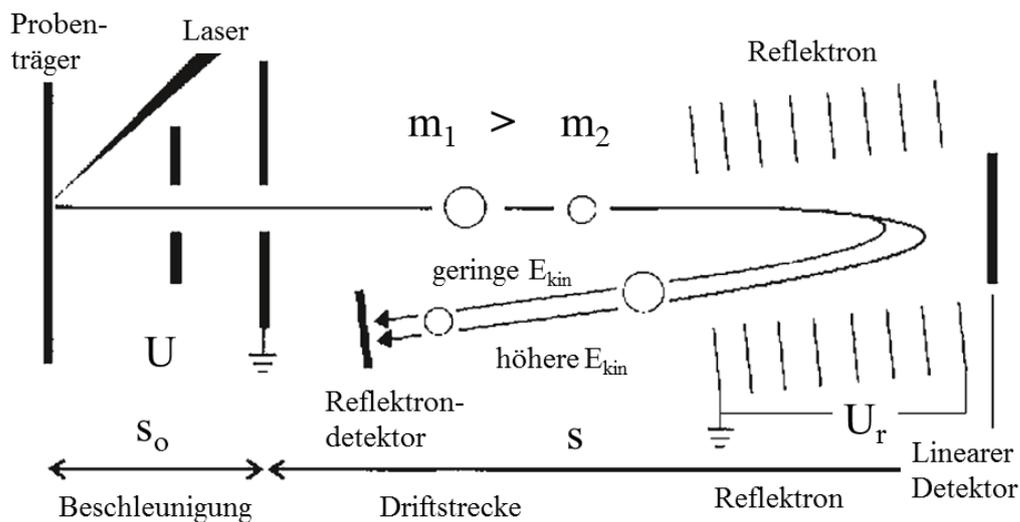


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines TOF-Analysators mit Reflektron [120].

### 1.2.2.2. Der Quadrupol-Analysator

Der Quadrupol-Analysator eignet sich sowohl als Massenfilter als auch als Kollisionszelle, Massenanalysator und Ionentransferoptik [120]. Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 10 dargestellt. So besteht der Quadrupol-Analysator aus vier hyperbolisch oder zylindrisch geformten Stabelektroden, die quadratisch angeordnet sind. Dabei haben die Stäbe einen Durchmesser von 10-20 mm und eine Länge von 15-25 cm. Die jeweils gegenüberliegenden Stäbe werden auf dem gleichen Potenzial gehalten, welches sich aus einer Gleichstrom- und Wechselstromkomponente zusammensetzt. Die

auf die Ionen einwirkenden abstoßenden und anziehenden Kräfte in x- und y-Richtung wechseln sich zeitlich ab.

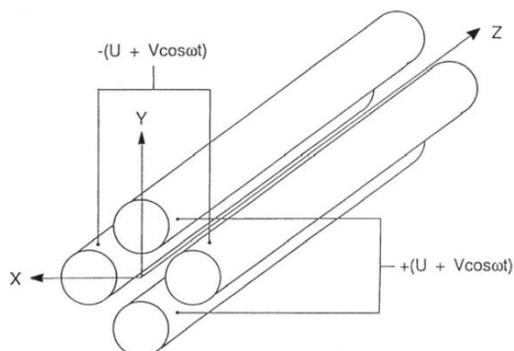


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines linearen Quadrupol-Analysators [120].

Mit Hilfe der Mathieu-Gleichung kann das Quadrupolfeld erklärt werden, durch das sich die Ionen hindurch bewegen [120]. Bei einer ganz bestimmten Radiofrequenzspannung und Gleichstromspannung können nur Ionen mit bestimmten  $m/z$ -Werten bzw.  $m/z$ -Bereichen durch den Quadrupol in z-Richtung oszillieren. Alle anderen Ionen und Neutralteilchen werden entweder aus dem Quadrupol geschleudert oder prallen an die Elektrodenstäbe. Die dabei angelegte Radiofrequenz liegt im Bereich zwischen 1-4 MHz und die Spannungen bei 100-2000 V. Wird die Gleichstromspannung auf Null gesetzt, wird der gesamte Ionenstrom in einem breiten  $m/z$ -Bereich durch den Quadrupol geleitet. Dank dieser Eigenschaft werden Quadrupole nicht nur als Massenfilter genutzt, sondern eignen sich hervorragend als Ionentransferoptiken und Kollisionszellen, wie in den in dieser Arbeit verwendeten Hybrid-Massenspektrometern [162].

### 1.2.2.3. Die lineare Ionenfalle

Ein Quadrupol-Analysator kann, wie unter 1.2.2.2 beschrieben, als Ionentransferoptik dienen. Wird der Quadrupol-Analysator unter mäßigem Vakuum von  $10^{-3}$  bis  $10^{-2}$  mbar gehalten, findet im Inneren durch die Gegenwart eines Puffergases, wie Stickstoff, eine Stoßkühlung statt, die die Ionenbewegung dämpft und die Transmission erhöht [120, 163]. Positioniert man nun am Ende des Quadrupols zwei Elektroden mit etwas höheren Potenzialen, können die Ionen im Inneren des Quadrupols eingefangen werden. Somit spricht man nicht mehr von linearen Quadrupol-Analysatoren, sondern von linearen Ionenfallen (LIT). Ursprünglich wurden LITs entwickelt, um Ionen zu sammeln, bevor sie als Ionenpaket einem geeigneten Massenanalysator, wie dem TOF-Analysator,

zugeführt wurden [164]. Inzwischen werden sie nicht nur zur Akkumulation und Stoßkühlung verwendet, sondern durch axiale bzw. radiale Ionenanregung zum Scannen der Ionenpakete oder zur Auswahl von Vorläuferionen für die Tandem-MS [165]. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridgeräte enthalten eine segmentierte lineare Ionenfalle (Abbildung 11). Dabei besteht die LIT aus einem Quadrupol mit hyperbolischen Elektrodenstäben, die in drei Segmente unterteilt sind. Das mittlere Segment ist das größte von den drei Segmenten und dient der Ionenspeicherung, wohingegen die beiden anderen Segmente zum Einfangen der Ionen dienen. Die Ionen können anschließend entweder axial oder radial ausgeworfen werden. Beim axialen Auswurf wird an die äußeren Segmente eine Wechselspannung angelegt, wodurch die Ionen die LIT axial in z-Richtung verlassen. Stimmt dabei die angelegte Wechselspannung mit der radialen Säkularfrequenz der Ionen überein, werden Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses bzw. Bereichs aus der LIT ausgeworfen [166]. Der radiale Auswurf von Ionen wird durch zwei Schlitze in einem Paar der gegenüberliegenden Stäbe und eine zusätzliche Zweiphasenwechselspannung an den x-Stäben realisiert. Durch diese zusätzlich angelegte Wechselspannung ist es möglich, bestimmte Ionen anhand ihrer  $m/z$ -Verhältnisse radial aus der LIT durch die Schlitze auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) zu leiten. In modernen Geräten befindet sich an beiden Seiten ein Detektor, um die Sensitivität zu erhöhen [165].

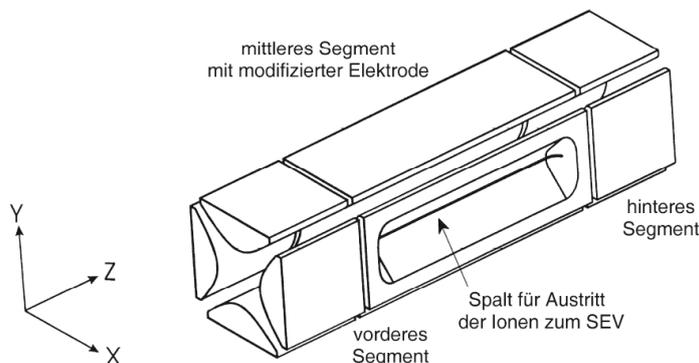


Abbildung 11: Darstellung einer segmentierten linearen Ionenfalle [120]

#### 1.2.2.4. Der Orbitrap-Massenanalysator

Der 2005 von der Firma Thermo Fisher Scientific auf den Markt gebrachte und von Alexander Makarov entwickelte Orbitrap-Massenanalysator gewährleistet eine hohe Auflösung, sowie eine exakte Massenbestimmung der Analyten. Er ist eine Weiterentwicklung der 1923 entwickelten Kingdon-Falle [167] und deren Verbesserung

durch Knight, in der Ionen zwar einem Detektor zugeschickt, jedoch keine  $m/z$ -Verhältnisse ermittelt werden konnten. Er besteht aus einer zylindrischen Zentralelektrode, die von einer zweiteiligen fassförmigen Elektrode umgeben ist (Abbildung 12) [168]. Wird an die Zentralelektrode ein Potenzial angelegt und werden die Ionen tangential eingeleitet, oszillieren diese in  $z$ -Richtung um die Zentralelektrode. Dies wird durch ein exakt definiertes Quadrupolfeld der Ionenfalle und dem logarithmischen Feld des aus zwei Teilen bestehenden zylindrischen Kondensators gewährleistet [169]. Der durch die Ionen erzeugte Bildstrom wird gemessen und die  $m/z$ -Werte der einzelnen Ionen können anschließend mittels Fourier-Transformation des Transienten berechnet werden (Abbildung 12). Dabei verhält sich die axiale Schwingungsfrequenz ( $\omega_z$ ) umgekehrt proportional zur Wurzel aus Ladung ( $q$ ) zu Masse ( $m_i$ ) (Gleichung III). Die Feldkrümmung ( $k$ ) ist hingegen unabhängig von der Tangentialgeschwindigkeit und der räumlichen Verteilung der Ionen in der Orbitrap, wodurch die axiale Schwingung nur vom  $m/z$  Verhältnis der Ionen abhängt [170].

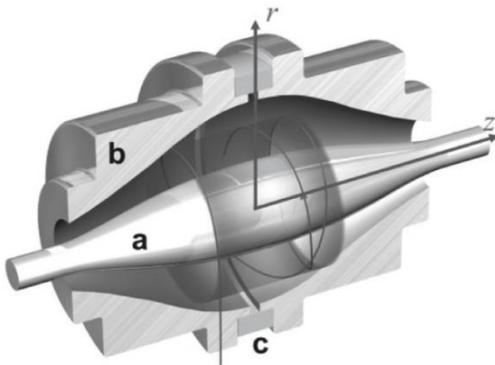


Abbildung 12: Schnitt durch einen Orbitrap-Analysator. Die Ionen oszillieren in  $z$ -Richtung um die Zentralelektrode (a). Die Außenelektrode (b) ist durch einen Keramikring (c) in zwei Hälften geteilt. Der von den oszillierenden Ionen erzeugte Bildstrom wird mittels Fourier-Transformation anhand Gleichung III in  $m/z$ -Werte umgerechnet.

$$\omega_z = \sqrt{k \left( \frac{q}{m_i} \right)}$$

Gleichung III

Der Ioneneinlass und Hochvakuum in der Orbitrap sind von entscheidender Bedeutung, um sie als Massenanalysator nutzen zu können. Dabei hat sich ein C-förmig gekrümmter RF-Quadrupol bewährt, der als *C-Trap* (*Curved Trap*) bezeichnet wird. In der *C-Trap*

werden die Ionen akkumuliert und durch Stoßkühlung mit Stickstoff verlangsamt. Durch kurze Hochspannungsimpulse von einigen hundert Nanosekunden werden die verlangsamteten Ionen aus der *C-Trap* in die Orbitrap ausgestoßen. Die *C-Trap* fungiert dabei wie eine konvexe Linse, wobei die äußeren Elektroden die Ionen schieben und die inneren Elektroden diese ziehen. Über elektrostatische Linsen werden die Ionen weiter gebündelt und in die Orbitrap überführt. Durch die an die Zentralelektrode angelegte Spannung werden die Ionen in der Orbitrap eingefangen (Abbildung 13)[120].

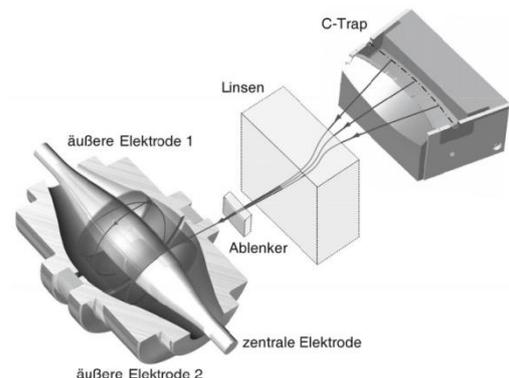


Abbildung 13: Einlass von Ionen aus der *C-Trap* über elektrostatische Linsen in den Orbitrap-Analysator [120].

### 1.2.3. Die Hybridmassenspektrometer LTQ-Orbitrap-XL und Orbitrap Fusion Tribrid

Im Laufe der Zeit wurde ersichtlich, dass ein einzelner Massenanalysator im Gerät für bestimmte Applikationen oft nicht ausreicht. Es wurden Hybridgeräte entwickelt, die verschiedene Massenanalysatoren für verschiedene Applikationen enthalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridgeräte LTQ-Orbitrap-XL und Orbitrap Fusion Tribrid der Firma Thermo Fisher Scientific bestehen aus einem Orbitrap-Analysator und einer linearen Ionenfalle (LIT). Eine der früheren Hybridgeräte ist das LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer (Abbildung 14). Die mittels (Nano)-ESI gebildeten Ionen werden durch eine beheizte Transferkapillare in das Hybridgerät injiziert. Über Transferlinsen, den Skimmer, und einen Oktopol werden die Ionen in die lineare Ionenfalle (Bezeichnung LTQ von Thermo Fisher Scientific) transferiert. Hier können die Ionen entweder direkt oder nach Stoßgasfragmentierung mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (*Collision-Induced Dissociation*, CID) (1.2.4) niederaufgelöst, aber sehr sensitiv analysiert werden. Alternativ können die Ionen über einen weiteren Quadrupol in die *C-Trap* transferiert und von dort in den Orbitrap-Analysator zur hochgenauen Massenbestimmung weitergeleitet

werden. Neben der Fragmentierung mittels CID ist es ebenfalls möglich, die Ionen in der Kollisionszelle nach der *C-Trap* mittels *Higher Energy Collision-Induced Dissociation* (HCD) zu fragmentieren. HCD generiert ähnliche Fragmentionen wie CID, jedoch mehrere interne Fragmente, und die entstehenden Fragmentionen können aufgrund des Aufbaus der LTQ-Orbitrap-XL nur in der Orbitrap analysiert werden.

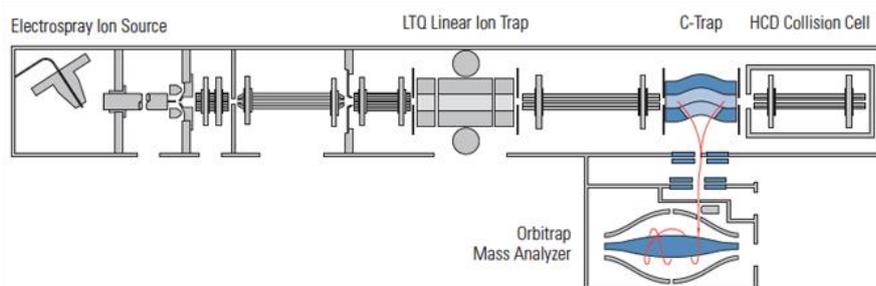


Abbildung 14: Schema des LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometers (planetorbitrap.com).

In einem der neusten Hybridgeräte, dem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer (Abbildung 15), wurde der Aufbau verändert, sodass nach jeder Fragmentierungsart die Fragmentionen entweder in der LIT oder in der Orbitrap analysiert werden können. Um eine bessere Überleitung und eine höhere Ausbeute der Ionen zu gewährleisten, wurde der Skimmer gegen eine Ansammlung an Linsen, der *S-Lens*, ausgetauscht. Ein sich anschließender gekrümmter Quadrupol verhindert die Weiterleitung und damit Verschmutzung der Massenanalysatoren durch Neutralteilchen, da diese gegen die Stäbe prallen. Die zweigeteilte LIT befindet sich in diesem Massenspektrometer hinter der Kollisionszelle für HCD, dem *Ion Routing Multipole*, wodurch auch bei HCD eine Analyse der Fragmentionen in der LIT möglich ist. In der zweigeteilten LIT (Hoch- und Niederdruckbereich) findet in der Hochdruckkammer die Fragmentierung mittels CID und Elektrontransferdissoziation (ETD) (1.2.4) statt, wobei in der Niederdruckkammer die Fragmentionen analysiert werden. Dadurch erhöht sich die Sensitivität der LIT. Die Ionen können auch, wie im LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer, über die *C-Trap* in die Orbitrap transferiert und analysiert werden. Der sogenannte Ultra-High-Field-Orbitrap-Massenanalysator der neuen Generation ist kompakter und ermöglicht höhere Scanraten (bis zu 20 Hz) als in der LTQ-Orbitrap-XL (Scanrate bis zu 1 Hz). Dieser neue Orbitrap-Massenanalysator kann bei der Aufnahme von Massenspektren eine maximale

Auflösung von 480.000 bei  $m/z$  200 erreichen. Der Orbitrap-Massenanalysator in der LTQ-Orbitrap-XL erreicht dagegen eine maximale Auflösung von 100.000 bei  $m/z$  400. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die beiden maximalen Auflösungen nicht vollständig verglichen werden können, da sie sich auf unterschiedliche  $m/z$ -Werte beziehen.

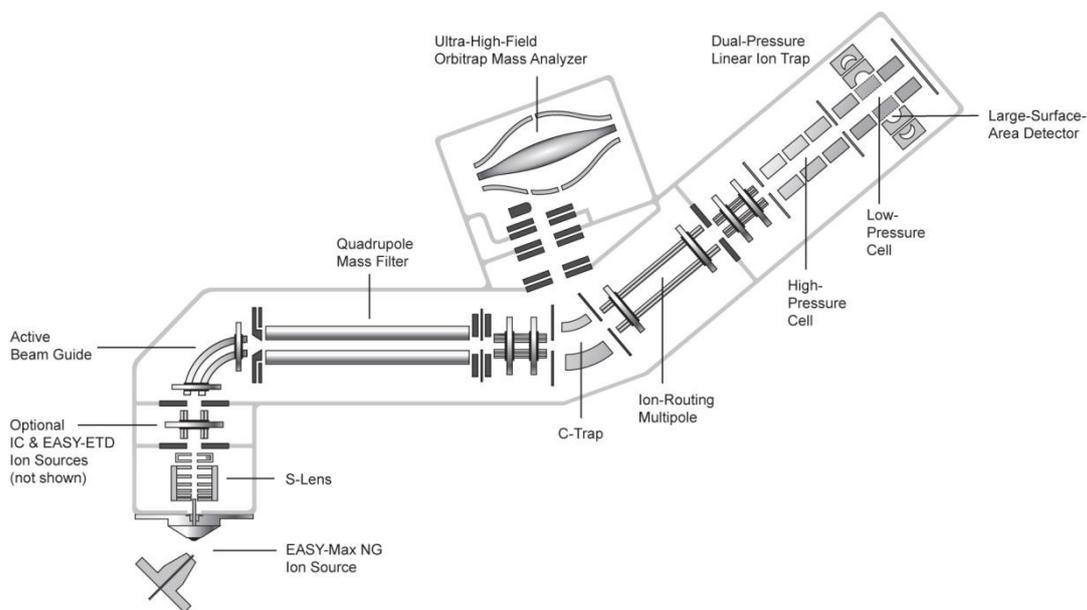


Abbildung 15: Schema des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers (planetorbitrap.com)

#### 1.2.4. Fragmentierungsmethoden

Durch die in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer, insbesondere der Hybridgeräte, konnte eine Vielzahl an Fragmentierungsmethoden für die Analyse von quervernetzten Peptiden herangezogen werden. Durch die kollisionsinduzierten Fragmentierungsmethoden (CID und HCD) wird die schwächste Bindung im Molekül gebrochen. Bei den in dieser Arbeit analysierten Peptiden und Quervernetzungsprodukten ist dies die Peptidbindung. Dadurch entstehen charakteristische Ionen abhängig davon, ob die Ladung am C- oder N-Terminus des fragmentierten Peptids verbleibt (Abbildung 16) [171, 172].

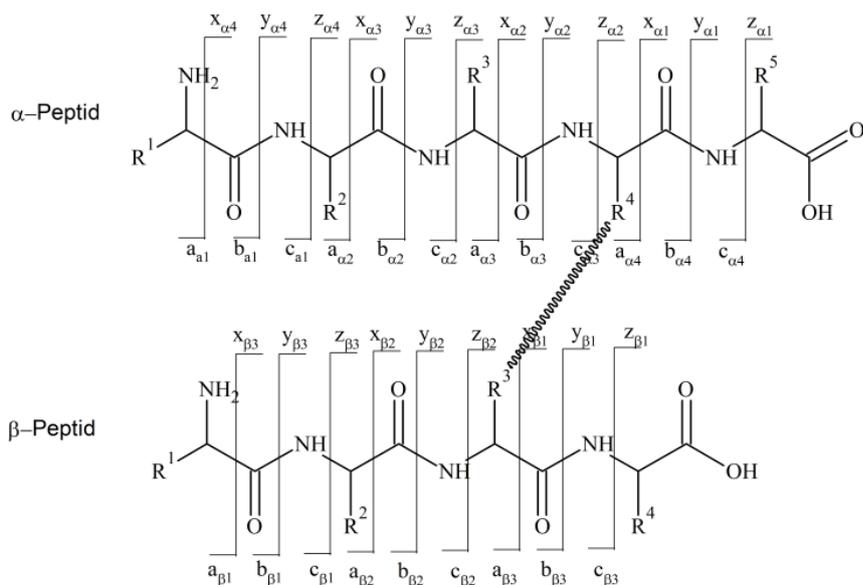


Abbildung 16: Nomenklatur der Fragmentionen quervernetzter Peptide nach Roepstorff und Schilling [171, 172].

In den Hybridgeräten findet die Fragmentierung mit CID durch Zusammenstöße mit Stickstoff in der LIT statt. Dadurch entstehen charakteristische b- und y-Fragmentionen. Nutzt man HCD, z.B. im *Ion Routing Multipole* des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers (Abbildung 15), entstehen neben b- und y-Ionen, auch a-Ionen und interne Fragmente. Trotz der höheren verwendeten Energien ist es mit HCD möglich, posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, zu analysieren, da deren Bindungen zum Peptid bei dieser Fragmentierung intakt bleiben [173]. In dem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer ist durch eine mit Fluoranthen gefüllte Kammer hinter der *S-Lens* die Fragmentierung mittels ETD möglich. Dabei überträgt das Fluoranthenradikal nach Sublimierung seinen radikalischen Charakter auf die Peptide der Probe. Dies geschieht im Hochdruckbereich der zweigeteilten LIT (Abbildung 15). Durch Umlagerung können unabhängig von der Bindungsenergie verschiedene Bindungsbrüche stattfinden. Dadurch entstehen z- und c- Ionen durch Spaltung der N-C $\alpha$ -Bindung. In dem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer ist es ebenfalls möglich, ETD mit einer der kollisionsinduzierten Fragmentierungsmethoden zu kombinieren. Dabei findet als Erstes die Fragmentierung mittels ETD in der LTQ statt. Anschließend wird entweder CID in der LTQ mittels Stoßgas durchgeführt (ETciD) oder das Ionenpaket wird in den *Ion Routing Multipole* geleitet und dort mittels HCD fragmentiert (ETHcD). Durch die anschließende kollisionsinduzierte Fragmentierung werden einerseits die durch nicht-

kovalente Wechselwirkungen aneinanderhaftenden Ionen getrennt, andererseits werden aus vorhandenen Vorläuferionen die typischen kollisionsinduzierten Fragmentionen gebildet [174].

### **1.3. Proteinstrukturuntersuchungen mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie**

Für die physiologischen Funktionen von Proteinen und deren Komplexen mit Interaktionspartnern sind deren dreidimensionale Strukturen entscheidend [175]. Um die 3D-Strukturen von Proteinen und deren Komplexen aufzuklären, werden hauptsächlich die beiden Methoden NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie eingesetzt, da sie zu hochaufgelösten Strukturmodellen führen. Der Nachteil beider Methoden ist die benötigte Proteinmenge, meist im mg-Bereich, und die oft nicht physiologischen Bedingungen, unter denen die Strukturdaten erhalten werden. Als Alternative hat sich daher seit einigen Jahren die chemische Quervernetzung kombiniert mit Massenspektrometrie (MS) etabliert. Dabei werden geringe Proteinmengen im attomol- bis femtomol-Bereich benötigt und es besteht die Möglichkeit, unter physiologischen Bedingungen zu arbeiten. Die durch die Quervernetzung erhaltenen Distanzbeschränkungen können anschließend zur computergestützten Modellierung von Proteinstrukturen verwendet werden. So konnten die ersten Strukturvorschläge des Komplexes zwischen dem Formiat-Kanal A (*Formate Channel A*, FocA) und der Pyruvat-Formiat-Lyase (*Pyruvate Formate Lyase*, PflB) anhand chemischer Quervernetzung erstellt werden [176]. Ebenso wurde die Struktur des 1 MDa *TCP-1 Ring Complex/ Chaperonin Containing TCP-1* (TRiC/CCT)-Chaperon-Komplex mittels chemischer Quervernetzung und MS aufgeklärt [177]. Anhand dieses Beispiels ist ersichtlich, dass die Größe des zu untersuchenden Proteinkomplexes theoretisch unbegrenzt ist, da der quervernetzte Komplex proteolytisch gespalten wird und die Peptide mittels MS analysiert werden. Die niederaufgelösten Strukturdaten können zur Verifizierung von bekannten hochaufgelösten Strukturdaten bzw. als Grundlage für Modelling-Studien verwendet werden. Zudem ist es möglich, Bindungsstudien von Liganden an ihren Rezeptoren durchzuführen, wie in dieser Arbeit gezeigt wird.

Bei der chemischen Quervernetzung wird ein Protein oder Proteinkomplex mit einem Quervernetzungsreagenz definierter Reaktivität vernetzt. Dadurch werden bestimmte

funktionelle Gruppen von Aminosäuren in einem Protein bzw. Proteinkomplex durch das Reagenz kovalent miteinander verknüpft. Die Quervernetzungsprodukte werden anhand der *top-down*- oder *bottom-up*-Methode analysiert (Abbildung 17). Bei der *top-down*-Strategie wird das intakte, vernetzte Protein in die Gasphase überführt und anschließend werden bestimmte Ladungszustände isoliert und fragmentiert [178]. Dies setzt leistungsfähige Massenspektrometer voraus, die sowohl durch eine hohe Auflösung die teils hochgeladenen Spezies voneinander trennen, als auch die sehr großen Proteinionen effektiv in die Gasphase und den Massenanalysator transferieren können. Ein weiteres Problem besteht in der oft ineffektiven Fragmentierung mittels CID bei komplexeren Molekülen, wodurch oft nur geringe Sequenzinformationen gewonnen werden. Die Entwicklung des Orbitrap-Massenanalysators und der Fragmentierungsmethode ETD machte die *top-down*-Methode, die früher den Anwendern von FTICR (Fourier Transformation-Ionenzyklotronresonanz)-Geräten vorenthalten war, für eine breitere Gruppe an Nutzern anwendbar [178].

Bei der wesentlich häufiger verwendeten *bottom-up*-Strategie [118] wird das quervernetzte Protein bzw. der Proteinkomplex direkt in Lösung gespalten oder zunächst mittels eindimensionaler Gelelektrophorese getrennt, anschließend entsprechende Gelbanden ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine mit einer geeigneten Protease in Peptide gespalten. Im Laufe der Jahre hat sich die Protease Trypsin, die C-terminal nach Lysin und Arginin spaltet, etabliert. Die C-terminal am Peptid stehende basische Aminosäure gewährleistet eine positive Ladung für die weitere Analyse. Das heterogene Peptidgemisch wird, bevor es in der Ionenquelle ionisiert und im Massenspektrometer analysiert wird, mittels LC getrennt. Die erhaltenen Massenspektren werden mittels einer geeigneten Software einer Datenbankanalyse unterworfen. Dabei wird eine Massenbibliothek aus den theoretischen Peptidmassen, die durch die Spaltung mit der Protease entstehen können, erstellt und mit den Daten der Analyse verglichen.

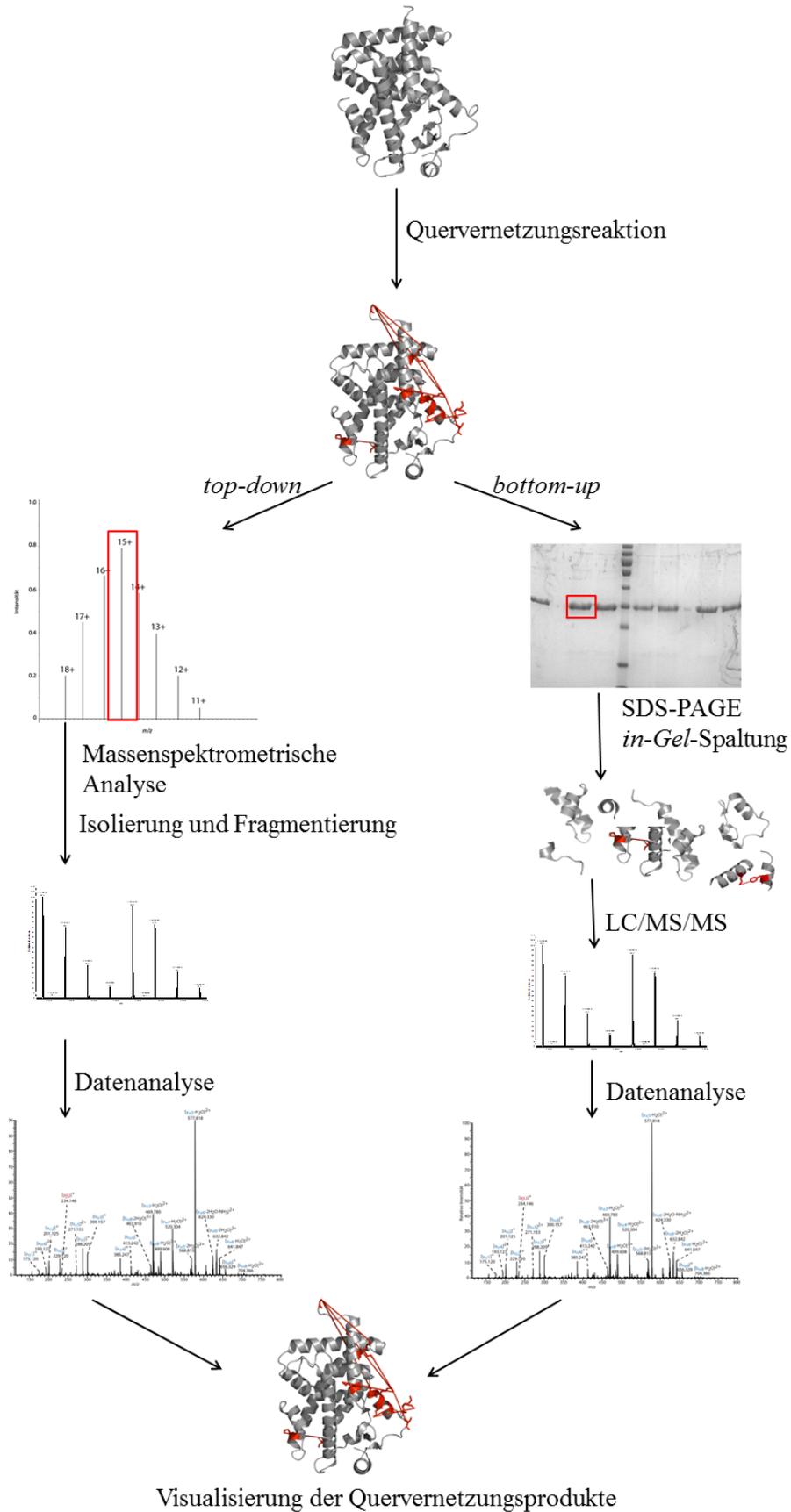


Abbildung 17: Schematische Darstellung der *top-down*- (links) und der *bottom-up*-Strategie (rechts).

### 1.3.1. Chemische Quervernetzungsreagenzien

Die ersten Quervernetzungsreaktionen wurden meist mit kleinen chemischen Reagenzien, wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd durchgeführt, was jedoch schlecht kontrollierbar war [179]. Mitterweile wird die Reaktion mit Formaldehyd und Glutaraldehyd wieder genutzt, um Proteine und deren Komplexe in lebenden Zellen mit anschließender massenspektrometrischer Analyse zu untersuchen [179, 180]. Die Entwicklung der Kombination aus Quervernetzung und MS für die Proteinstrukturanalyse führte in den letzten Jahren zur Synthese einer Vielzahl an Quervernetzungsreagenzien, von denen etliche kommerziell erhältlich sind. Die Reagenzien vernetzen unterschiedliche funktionelle Gruppen in Aminosäuren [118]. Die *Spacer* der Reagenzien sind unterschiedlich lang, wodurch sich der überbrückbare  $\text{Ca-Ca}$ -Abstand zwischen den vernetzten Aminosäuren unterscheidet. Allgemein können bei einer chemischen Quervernetzungsreaktion drei unterschiedliche Quervernetzungsprodukte entstehen (Abbildung 18). Als hydrolysierte Produkte (Typ 0-Cross-link; Nomenklatur nach Schilling et al. [172]) bezeichnet man Peptide, die zwar mit dem Reagenz reagiert haben, jedoch nicht quervernetzt wurden, da das Reagenz anstatt mit einer zweiten Aminosäure mit Wasser reagiert hat. Die hydrolysierten Produkte eignen sich zur Bestimmung der Zugänglichkeit bestimmter Aminosäuren für das Reagenz bzw. zur Analyse der Oberflächenstruktur von Proteinen [181]. Wenn beide reaktiven Funktionen mit Seitenketten der Aminosäuren reagieren, können intra- (Typ-1) und interpeptidale (Typ-2) Quervernetzungsprodukte entstehen. Bei intrapeptidalen (Typ-1) Produkten befindet sich das Quervernetzungsprodukt innerhalb eines Peptides, was oft nur geringe Strukturinformationen beinhaltet. Die höchste Aussagekraft haben interpeptidale (Typ-2) Produkte. Hier werden zwei unterschiedliche Peptide innerhalb eines Proteins oder Proteinkomplexes miteinander verknüpft (Abbildung 18).

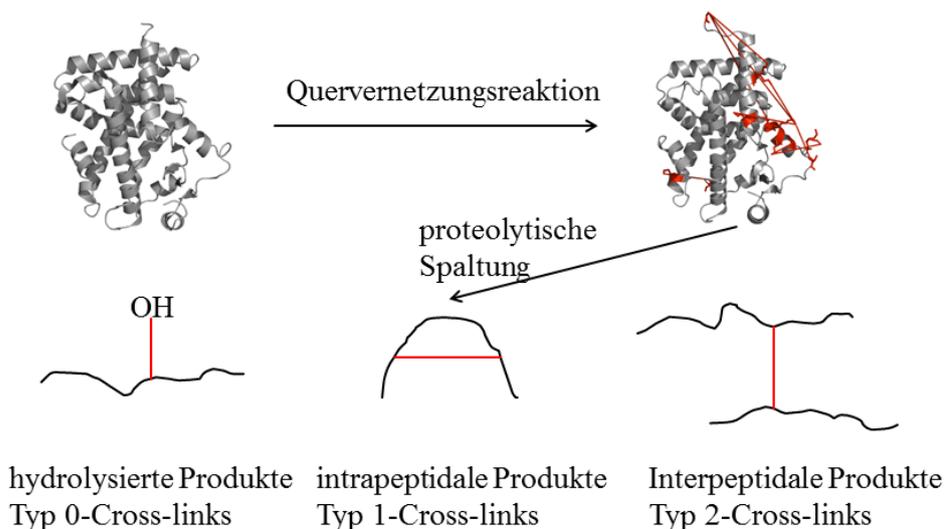


Abbildung 18: Schematische Darstellung der drei möglichen Quervernetzungsprodukte einer Quervernetzungsreaktion nach proteolytischer Spaltung (Nomenklatur nach Schilling et al [172]).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Quervernetzungsreagenzien und modifizierte Aminosäuren für die chemischen Quervernetzungsreaktionen verwendet, die im Weiteren erläutert werden.

### 1.3.1.1. Homobifunktionelle Reagenzien

Bei den homobifunktionellen Reagenzien handelt es sich um Moleküle mit zwei identischen funktionellen Gruppen. Das in dieser Arbeit verwendete Bis(sulfosuccinimidyl)-Glutarat (BS<sup>2</sup>G) besitzt zwei *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ester, die mit Aminogruppen der Lysine und dem *N*-Terminus in Proteinen zu einer kovalenten Amidfunktion reagieren können (Abbildung 19). Gleichzeitig sind Hydroxidfunktionen von Serinen, Threoninen und Tyrosinen in den Proteinen der Reaktion zugänglich, jedoch in geringerem Ausmaß [182]. BS<sup>2</sup>G vernetzt dabei Aminosäuren mit einem C $\alpha$ -C $\alpha$ -Abstand von bis zu 27 Å [183, 184]. Mit Hilfe dieses Reagenzes konnten im p53-Tetramer Strukturdaten der intrinsisch ungeordneten Regionen gewonnen und so Strukturen erstellt werden [185]. Aufgrund der beiden Sulfosuccinimidyl-Reste ist BS<sup>2</sup>G wasserlöslich und eignet sich daher, um cytosolische Proteine und Proteinkomplexe strukturell zu untersuchen.

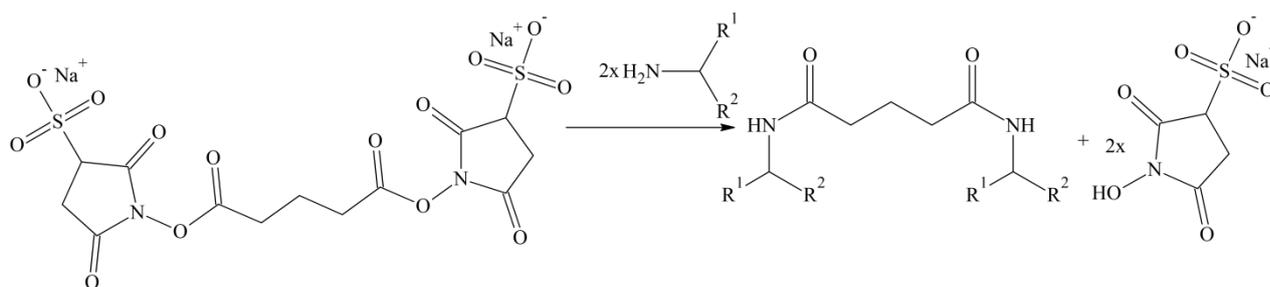


Abbildung 19: Quervernetzungsreaktion von BS<sup>2</sup>G mit zwei Aminfunktionen (z.B. in Lysin) zu einem Quervernetzungsprodukt.

Ein weiterer Vertreter der homobifunktionellen Reagenzien ist der MS-spaltbare „Urea-Linker“ (BuUrBu) [186]. Dieser besitzt ebenfalls zwei NHS-Ester, jedoch besteht der *Spacer* zwischen den beiden funktionellen Gruppen nicht aus einer Kohlenstoffkette wie bei BS<sup>2</sup>G, sondern enthält eine zentrale Harnstoffeinheit. Durch kollisionsinduzierte Fragmentierungsmethoden wird eine spezifische Spaltung an der Harnstoffgruppe induziert. Durch diese charakteristischen Fragmentationen ist eine automatische Datenanalyse theoretisch möglich. Dabei handelt es sich um Fragmente mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu)- bzw. einer Isocyano- $\gamma$ -Aminobuttersäure (BuUr)-Modifikation (Abbildung 20), die sich um 26 Da unterscheiden.

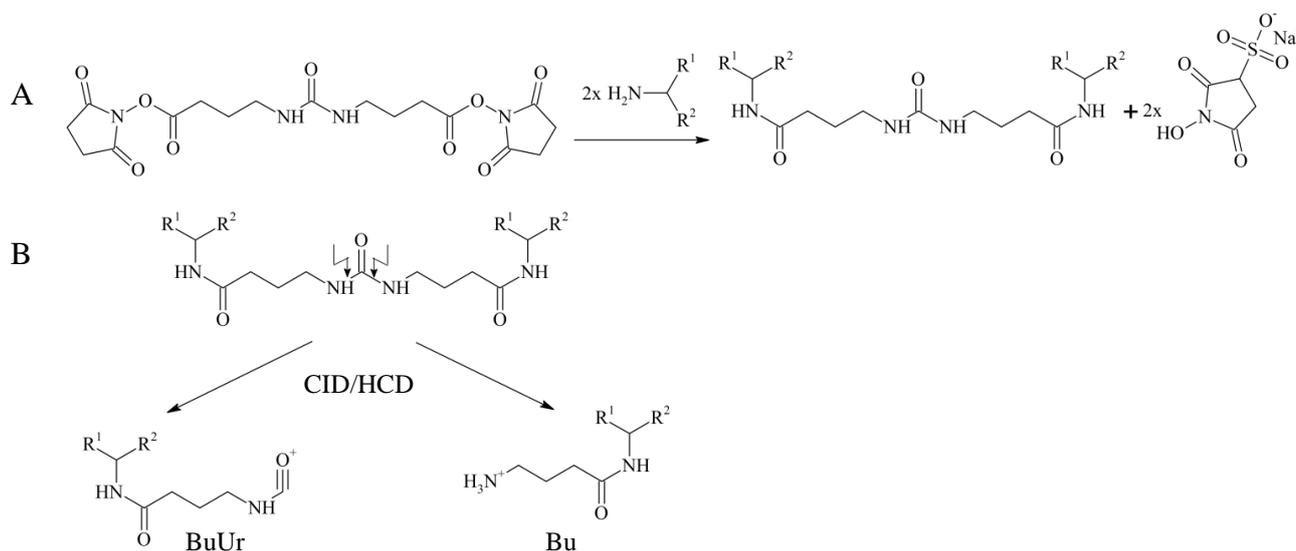


Abbildung 20: Quervernetzungsreaktion von Urea-Linker mit zwei Aminfunktionen (A) und anschließender Fragmentierung (B) zu den charakteristischen Fragmenten mit BuUr- und Bu-Modifikation.

Suberinsäure-1,8-Dihydrazid (SDH) gehört ebenfalls zu den homobifunktionellen Reagenzien, besitzt jedoch im Gegensatz zu BS<sup>2</sup>G und BuUrBu zwei Hydrazidfunktionen

(Abbildung 21). Mit dieser Art von Quervernetzungsreagenzien werden mit Hilfe von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-Methylmorpholiniumchlorid (DMTMM) (1.3.1.3) bei neutralem pH-Wert Carboxylfunktionen zur Reaktion gebracht. Dies konnte erstmals für den TRiC/CCT-Chaperonkomplex und das 26S-Proteasom gezeigt werden [187].

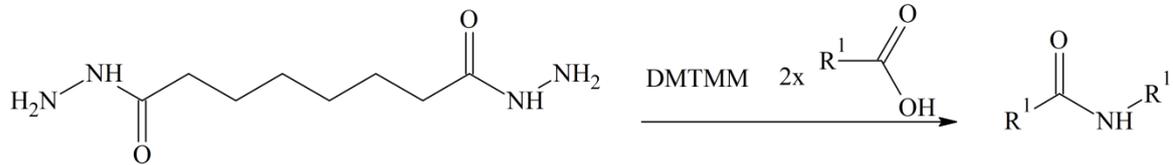


Abbildung 21: Quervernetzungsreaktion von SDH mit DMTMM als Katalysator.

### 1.3.1.2. Heterobifunktionelle Quervernetzungsreagenzien

Diese Reagenzien besitzen zwei unterschiedliche reaktive funktionelle Gruppen. Oft wird ein NHS-Ester und damit eine spezifische Reaktion mit Aminogruppen mit einer alternativen funktionellen Gruppe kombiniert. Dies können beispielsweise Maleimidfunktionen sein, welche mit Cysteinen reagieren, oder photoaktivierbare Funktionen, wie Azide, Diazirine oder Benzophenone [118]. Die photoaktivierbaren Funktionen insertieren dabei über ein reaktives Carben oder biradikalischen Zwischenschritt in alle 20 proteinogenen Aminosäuren. Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien Sulfosuccinimidyl 4,4'-azipentanoat (Sulfo-SDA) [188] und *N*-Succinimidyl-*para*-Benzoyldihydrocinnamat (SBC) [189] besitzen neben dem aminreaktiven NHS-Ester eine photoaktivierbare Funktion. Der Vorteil dieser Reagenzien ist, dass Aminosäureregionen, in denen keine Lysine zur Verfügung stehen, zur Reaktion gebracht werden können, wie anhand von Interaktionsstudien von Calmodulin mit Munc13 gezeigt werden konnte [190]. Im Fall von Sulfo-SDA ist die photoaktivierbare Funktion eine Diazirinegruppe, die durch UV-A-Bestrahlung durch Stickstoffverlust ein hoch reaktives Carben generiert, welches in alle Aminosäureseitenketten insertieren kann (Abbildung 22). Das Quervernetzungsreagenz SBC besitzt hingegen einen Benzophenonring, der nach UV-A Bestrahlung (360 nm) über einen biradikalischen Mechanismus in alle Aminosäuren insertieren kann (Abbildung 23). Für Benzophenone wurde eine Präferenz für Methionine gezeigt [191].

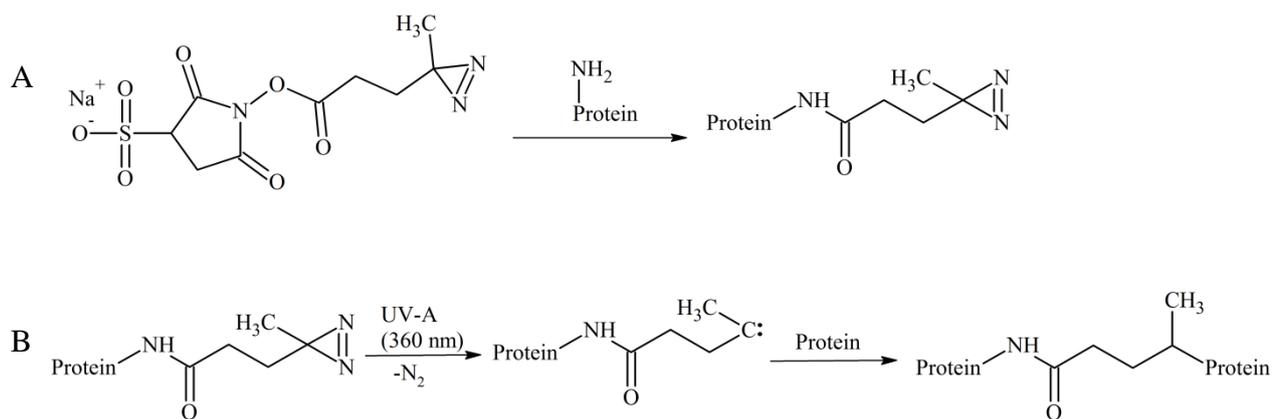


Abbildung 22: Schema der Quervernetzungsreaktion mit Sulfo-SDA. In der zweistufigen Reaktion findet zunächst die Reaktion der NHS-Gruppe mit Amingruppen statt (A), gefolgt von der Photo-Reaktion des Diazirins (B).

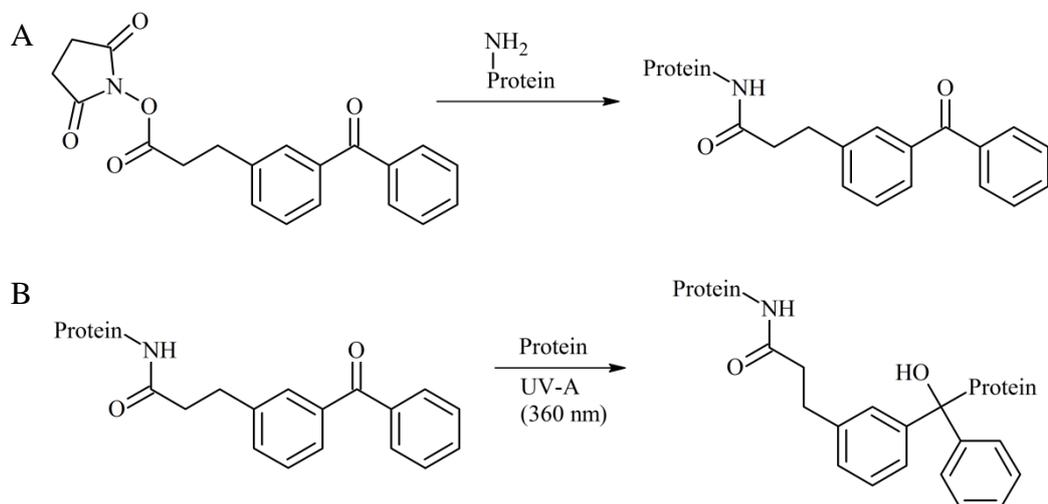


Abbildung 23: Reaktionsschema des heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenz SBC. In der zweistufigen Reaktion findet zunächst die Reaktion der NHS-Gruppe mit Amingruppen statt (A), gefolgt von der Photo-Reaktion des Benzophenons durch UV-A Bestrahlung (B).

### 1.3.1.3. Kopplungsreagenzien

Eine Sonderstellung nehmen die Kopplungsreagenzien, wie DMTMM und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) ein (Abbildungen 24 und 25). DMTMM und EDC sind Nulllängenreagenzien, da sie die Aminfunktionen mit Carboxylfunktionen in Proteinen direkt verknüpfen. EDC aktiviert Carboxyl-Funktionen der Asparaginsäure und Glutaminsäure, wodurch ein nukleophiler Angriff durch

Aminogruppen ermöglicht wird (Abbildung 24A). Da das EDC-Intermediat nicht stabil ist, wird Sulfo-NHS hinzugegeben [192]. Dieses reagiert mit dem EDC-Intermediat, sodass die Carboxyl-Funktion weiterhin aktiviert bleibt und nukleophil angreifbar ist (Abbildung 24B). Nach dem nukleophilen Angriff der Aminogruppen entsteht eine neue kovalente Bindung, die nur zwischen Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zueinander möglich ist. Im Gegensatz zu den aminreaktiven Quervernetzungsreagenzien, welche einen bestimmten Abstand durch ihren *Spacer* überbrücken können, ist der durch EDC überbrückbare Abstand nur durch eine Flexibilität der Aminosäureseitenketten gegeben. DMTMM hat gegenüber EDC den Vorteil, dass es sowohl im physiologischen pH-Bereich bessere Ausbeuten an Quervernetzungsprodukten liefert und zudem kein Hilfsreagenz, wie Sulfo-NHS, benötigt [187, 193]. EDC wurde beispielsweise zusammen mit Dihydraziden in Experimenten mit Ubiquitin verwendet, um die bekannte Struktur des Ubiquitin zu bestätigen und komplementäre Quervernetzungsprodukte zu aminreaktiven Reagenzien zu erhalten [193]. DMTMM hingegen wurde als Katalysator für die Reaktion von Quervernetzungsreagenzien mit Hydrazidfunktionen verwendet [187], jedoch nicht, um gezielt Quervernetzungen zwischen Amin- und Carboxylfunktionen in Proteinen für Quervernetzungsstudien zu induzieren. Beide Reagenzien werden in der Synthese von Hyaluronsäurederivaten verwendet, wobei bei DMTMM keine pH-Wertänderung bei einer besseren Effektivität gegenüber EDC/Sulfo-NHS verzeichnet wurde [194].

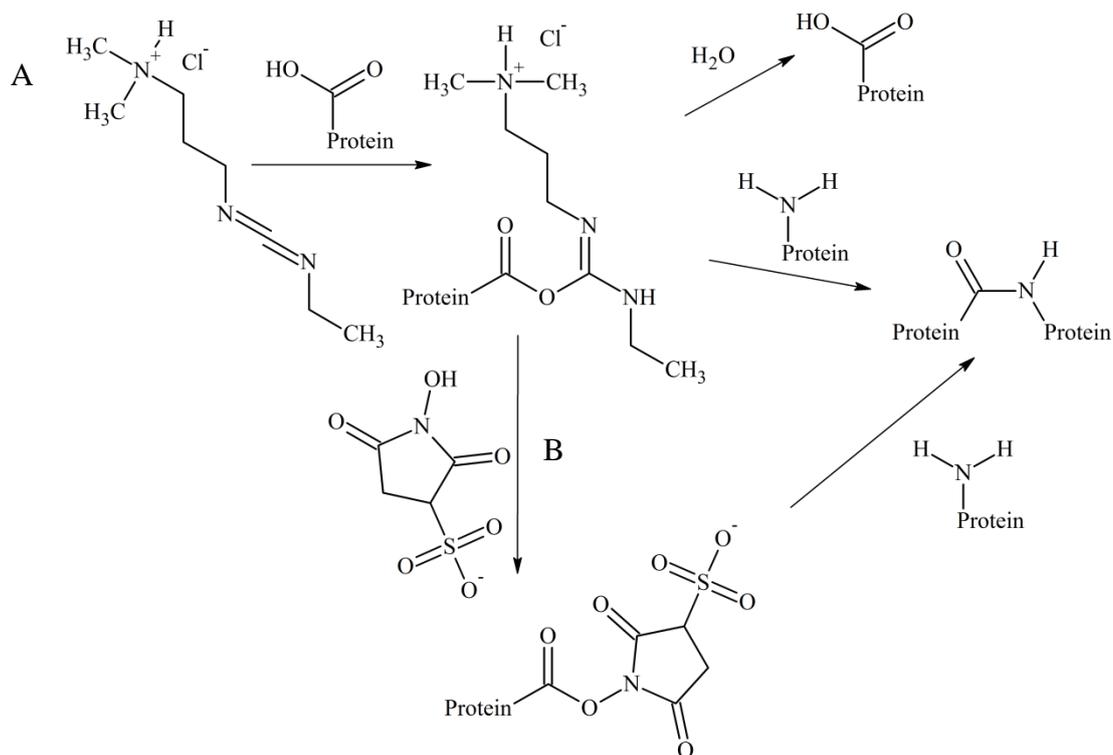


Abbildung 24: Quervernetzungsreaktion von EDC (A) und Sulfo-NHS (B).

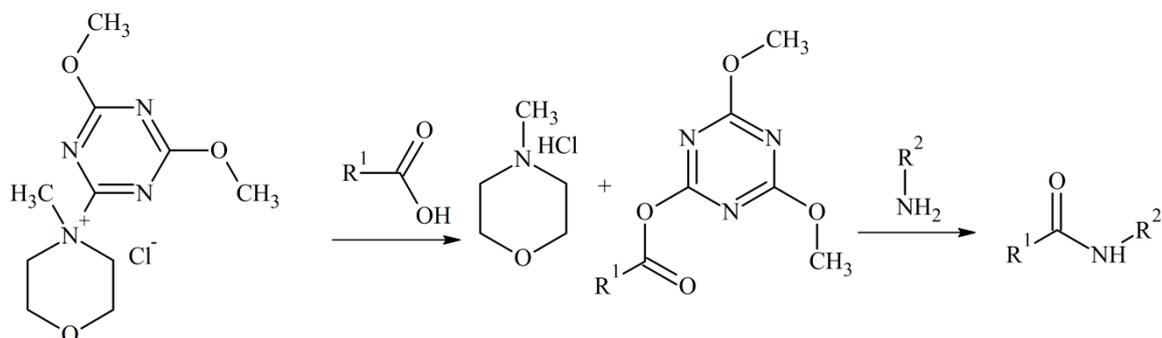


Abbildung 25: Quervernetzungsreaktion von DMTMM zwischen einer Carboxyl- und Aminfunktion.

### 1.3.2. Photoaktivierbare Aminosäuren

Die photoaktivierbaren Aminosäuren („Photoaminosäuren“) stellen eine Alternative zu den herkömmlichen Quervernetzungsreagenzien dar. Sie werden in den Zellen direkt über den Translationsweg der mRNA in die Proteine eingebaut. Dabei werden zwei Wege unterschieden.

Photoaminosäuren, wie Photomethionin und Photoleucin, werden über einen unspezifischen Einbau, anstelle der natürlichen Aminosäuren Methionin und Leucin, in Proteine eingebaut [195]. Dieser Einbau funktioniert sowohl in bakteriellen Zellen, wie

*E.coli*, als auch in humanen Zellen [195, 196]. Anschließend kann das Photoamino-säure-enthaltende Protein gereinigt oder direkt in der Zelle der Photoreaktion zugeführt werden. Dazu wird die in den Photoamino-säuren enthaltene photoaktivierbare Funktion (z.B. ein Diazirin) über UV-A-Bestrahlung aktiviert (Abbildung 26A). Im Fall der Diazirine entsteht durch Stickstoffverlust ein hochreaktives Carben, welches anschließend in jede Aminosäure in der direkten Umgebung insertieren kann.

Ein alternativer Weg des Einbaus ist der spezifische Einbau photoaktivierbarer Aminosäuren mittels genetischer Modifikation [197, 198]. Dabei wird die bakterielle Zelle mit einem Plasmid transformiert, welches für ein bestimmtes Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Paar codiert. Die spezifische tRNA erkennt das Amber-Stopcodon TAG im genetischen Code. Anstelle des Abbruchs der Proteinsynthese wird die photoreaktive Aminosäure eingebaut. Im genetischen Code muss somit an der Austauschposition der natürlichen Aminosäure gegen die photoaktivierbare Aminosäure das Amber-Stopcodon vorliegen, um einen Austausch auf Proteinebene zu ermöglichen. Während der Translation wird die unnatürliche Aminosäure eingebaut. Anschließend kann entweder das Protein für weitere Experimente gereinigt oder innerhalb der Zelle mit UV-A-Bestrahlung vernetzt werden. In dieser Arbeit wurden so die beiden Photoamino-säuren *para*-Benzoyl-L-Phenylalanin (Bpa) und *para*-Trifluormethyldiazirinyll-L-Phenylalanin (TfmdF) spezifisch in PPAR- $\alpha$  und - $\beta/\delta$  eingebaut (Abbildung 26). Bpa besitzt eine Benzophenonfunktion, die mittels UV-A-Bestrahlung bei ca. 360 nm aktiviert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass über den biradikalischen Mechanismus Methionine bevorzugt reagieren [191]. TfmdF enthält eine Diazirinfunktion, die nach Bestrahlung über ein reaktives Carben in alle 20 proteinogenen Aminosäuren insertieren kann [199].

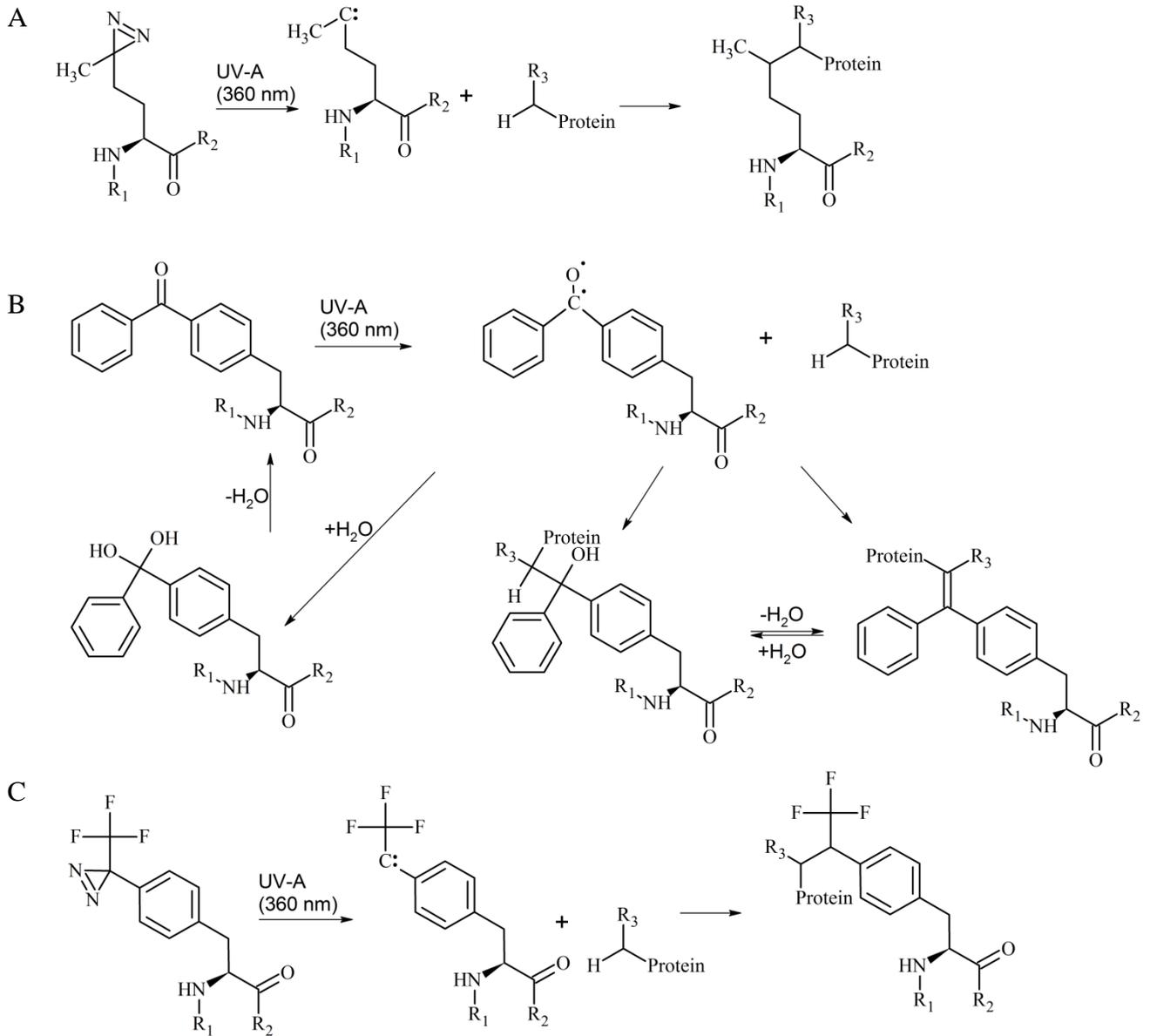


Abbildung 26: Quervernetzungsreaktionen von Photomethionin (A), Bpa (B) und TfmdF (C).

## 2. Zielstellung

Die PPARs sind an der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie Diabetes mellitus Typ II oder Krebs beteiligt. Daher sind sie seit einigen Jahren Zielstrukturen für Arzneistoffe. Ein Verständnis der Konformationsänderungen in PPARs nach Ligandenbindung ist für die Entwicklung neuer Arzneistoffe von großer Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels chemischer Quervernetzungsstrategien mit anschließender massenspektrometrischer Analyse Informationen über die Konformationsänderungen des PPAR- $\alpha$  und - $\beta/\delta$  vor und nach der Ligandenbindung zu erhalten. Die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des PPAR- $\alpha$  war bereits in vorhergehenden Studien erfolgreich exprimiert worden. Die LBD des PPAR- $\beta/\delta$  sollte im Rahmen dieser Arbeit hergestellt werden. Zusätzlich sollten beide LBDs mit eingebauten photoreaktiven Aminosäuren in *E.coli* exprimiert und gereinigt werden. So sollten verschiedene Liganden mittels (photo-)chemischer Quervernetzung und nachfolgender MS-Analyse der Reaktionsprodukte auf ihr Bindevverhalten an beiden LBDs untersucht werden. Zusätzlich sollte das PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein, für das bisher keine Röntgenkristallstrukturen existieren, mittels chemischer Quervernetzung untersucht werden, um Aussagen zur Konformation von allen Domänen des Proteins zu erhalten.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton, Lichrosolv 99,8%		Merck Millipore
Acetonitril, HyPerSolv 99,9%	ACN	VWR
Acrylamid/Bisacrylamid		Merck Millipore
Agar-Agar		Merck Millipore
Ameisensäure 98%	FA	Fluka
Ammoniumchlorid	NH <sub>4</sub> Cl	Sigma Aldrich
Ammoniumdihydrogenphosphat	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Ammoniumhydrogencarbonat	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich
Ammoniumperoxidsulfat	APS	Sigma Aldrich
L(+)-Arabinose ≥ 99%		Roth
<i>para</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin	Bpa	Bachem
Bradfordkonzentrat Protein Assay		Bio-Rad
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Coomassie-Brilliant-Blue G250		Sigma Aldrich
Coomassie-Brilliant-Blue R250		Sigma Aldrich
CutSmart-Puffer (10-fach konzentriert)		New England Biolabs
d-Desthiobiotin		Sigma Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
Dithiothreitol	DTT	Sigma Aldrich
DNA-Basenmarker Quick Load 100 bp		New England Biolabs7
DNA-Basenmarker GeneRuler 1kb		Thermo Fisher Scientific
DNA-Ladepuffer (sechsfach konzentriert)		Thermo Fisher Scientific
Essigsäure	AcOH	Roth
Ethanol, Lichrosolv 99,9%	EtOH	Merck Millipore
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Sigma Aldrich
Fenofibrinsäure		Sigma Aldrich
Harnstoff		Roth

Hefeextrakt		Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Roth
Gel-Ladepuffer Purple (sechsfach konzentriert)		New England Biolabs
Glycerol 99%		Merck Millipore
Imidazol		Merck Millipore
Iodacetamid	IAA	Sigma Aldrich
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth
Kaliumchlorid	KCl	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Sigma Aldrich
Laemmlli-Probenpuffer (zweifach konzentriert)		Biorad
Magnesiumsulfat	$\text{MgSO}_4$	Sigma Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol		Bio-Rad
Methanol, HyPerSolv 99,9%	MeOH	VWR
Natriumchlorid 99,8%	NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat	SDS	Sigma Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	$\text{NaHCO}_3$	VWR
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma Aldrich
NEBuffer 4 (10-fach konzentriert)		New England Biolabs
Phenylmethansulfonylfluorid	PMSF	Molekula
PPAR- $\alpha$ -Agonist GW7647		Sigma Aldrich
PPAR- $\alpha$ -Antagonist GW6471		Sigma Aldrich
PPAR- $\beta/\delta$ -Agonist GW0742		Sigma Aldrich
PPAR- $\beta/\delta$ -Agonist GW1516		Sigma Aldrich
Proteaseinhibitortablette Complete EDTA-frei		Roche
Rotiphorese 10-fach SDS PAGE		Roth
Saccharose reinst, DAB		Grüssing
Salzsäure 37%	HCl	Sigma Aldrich
Salzsäure 37% (Endotoxin-frei)	HCl	Sigma Aldrich
SeaKem LE Agarose		Lonza
D-Sorbitol $\geq$ 98%		Roth
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-diamin	TEMED	Bio-Rad

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	TRIS	Roth
Trifluoressigsäure 99,8%	TFA	Sigma Aldrich
Trifluorethanol	TFE	Fluka
Trypton/Pepton aus Casein		Roth

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
Amicon Ultra 15 ml-Zentrifugationsfilter (Ausschlussgröße 10 kDa)	Merck Millipore
Amicon Ultra 0,5 ml-Zentrifugenfilter (Ausschlussgröße 10 kDa)	Merck Millipore
Filtropur S 0,2-Filtrationseinheiten	Sarstedt
Gelextraktionskit	Peqlab
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific
Injektionsspritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Braun
Mikrosäulen ZipTip C4	Merck Millipore
Mikrosäulen ZipTip C18	Merck Millipore
Parafilm „M“	Pechiney
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf/VWR
Plastikküvetten	VWR
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Plasmid Mini-Prep Kit	Jena Bioscience
96-Well-Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific
Zeba Spin-Entsalzungssäulen (0,5 ml, 10 ml) (Ausschlussgröße 7 kDa)	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.3. Laborgeräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Agarosegelkammer/Messgerät	VWR
Analysenwaage LE225D	Sartorius
Autoklav VX-75	Systemec
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad
HeraSafe KS	Thermo Fisher Scientific

Mini-Protean Tetra Cell Elektrophorese-System	Bio-Rad
MiVac Duo Concentrator	Barnstead GeneVac
PCR-Thermocycler	Biometra
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf/VWR
Polarstar Galaxy-Plattenleser	BMG Lab Technologies
Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro	Amersham Biosciences
Schüttelinkubator Innova 44	New Brunswick Scientific
Thermoshake	Gerhardt
Trockenschrank	Binder
Ts1-ThermoShaker	Analytik Jena
Ultrazentrifuge Optima L-90K	Beckman Coulter GmbH
Ultraschallstab Vibracell 75185	Bioblock Scientific
Vakuumkonzentrator miVac	GeneVac
Vakuumkonzentrator Savant SPD1010	Thermo Fisher Scientific
Vortex Mixer	NeoLab
Wasseraufbereitungsanlage TKA	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckman Coulter GmbH
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifugen MiniSpin Plus	Eppendorf
Zentrifuge Minizentrifuge	Kisker Biotech
Zentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter GmbH
Zentrifugenrotor 45 Ti 45000 RPM	Beckman Coulter GmbH
Zentrifugenrotor JLA 9.1000 9000 RPM	Beckman Coulter GmbH

### 3.1.4. *E.coli*-Stämme

*E.coli*-Stamm

BL21 (DE3)

*Genotyp*

*E. coli*, F<sup>-</sup> *ompT gal dcm Ion hsdS<sub>B</sub>* (r<sup>-</sup> *BM<sup>-</sup><sub>B</sub>*)  
 $\lambda$ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*])

DH5 $\alpha$  *E.coli*, F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 nupG*  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ <sup>-</sup>

### 3.1.5. Antibiotika

Die fertigen Antibiotikallösungen wurden vor der Benutzung steril filtriert.

Antibiotikum	Stammkonzentration	Endkonzentration	Hersteller
Chloramphenicol	32 mg/ml in Ethanol	30 $\mu$ g/ml	Roth
Kanamycinsulfat	30 mg/ml in Milli-Q-H <sub>2</sub> O	30 $\mu$ g/ml	Roth

### 3.1.6. Medien und Puffer

Alle Medien und Puffer wurden mit hochreinem, entionisierten Milli-Q-H<sub>2</sub>O hergestellt.

Agar-Medium-Platten 500 ml LB-Medium wurden mit 7,5 g Agar-Agar versetzt und autoklaviert. Ca. 10-20 ml des warmen Mediums wurden in jede Petrischale gegossen. Für eine Selektion wurden dem Agar-Medium nach dem Autoklavieren Antibiotika in Form der 1000-fach konzentrierten Stammlösungen zugesetzt.

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (10-fach konzentriert) 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in H<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert (Gomori (200)).

LB (*Lysogeny Broth*)-Medium 10 g Trypton/Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl wurden in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst und mit 10 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Minimalmedium 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05 M Glucose und 1 mM MgSO<sub>4</sub> wurden in H<sub>2</sub>O gelöst, auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert. Anschließend wurden 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, Spurenelementelösung 1 (0,1 mM CaCl<sub>2</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,08 mM Na<sub>2</sub>EDTA und 0,092 mM FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O) und Spurenelementelösung 2 (0,135 mM

	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, 0,106 mM MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,0156 mM ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O und 0,0215 mM CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O) steril filtriert zugesetzt.
SOC ( <i>Super Optimal Broth with Catabolite Repression</i> )-Medium	20 g Pepton/Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose wurden in 1 l H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert.
TB ( <i>Terrific Broth</i> )-Medium	12 g Pepton, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol wurden in 900 ml H <sub>2</sub> O gelöst und autoklaviert. Danach wurden 100 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Puffer (10-fach konzentriert) zugesetzt.

### 3.1.7. Proteine, Enzyme und Peptide

<i>Protein/Peptid</i>	<i>Hersteller</i>
Benzonase Nuclease $\geq 250$ U/ $\mu$ l	Sigma Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Chymotrypsinogen A	GE Healthcare
DNase 1	AppliChem
Endoproteinase GluC	Promega
Leupeptin	Sigma Aldrich
Lysozym (Hühnereiweiß)	Roth
Nco I 10000 U/ml	New England Biolabs
Nde I 20000 U/ml	New England Biolabs
Ovalbumin	GE Healthcare
<i>PageRuler prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
<i>PageRuler unstained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific
Pepstatin A	Sigma Aldrich
<i>Peptide Calibration Standard II</i>	Bruker Daltoniks
PPAR- $\beta/\delta$ (human rekombinant)	Biomol
<i>Protein Calibration Standard II</i>	Bruker Daltoniks
Ribonuclease A	GE Healthcare
RNase A	AppliChem

Trypsin <i>sequencing grade modified (porcin)</i>	Promega
Tobacco Etch Virus Protease ProTEV plus 5 U/ $\mu$ l	Promega
<i>Xho</i> I (20000 U/ml)	New England Biolabs

Nach dem Aufschluss der *E.coli*-Zellen wurden zur Deaktivierung der in den Zellen befindlichen Proteasen die einzelnen Proteaseinhibitoren nach Tabelle 1 alternativ zu einer Tablette Proteaseinhibitor Complete EDTA-frei (Roche) zugeführt. Zusätzlich wurden DNase I und RNase A zum Entfernen der DNA und RNA der Lösung zugesetzt.

Tabelle 1: Konzentrationen der Proteaseinhibitoren, RNase und DNase.

<i>Proteaseinhibitor/RNase/DNase</i>	<i>Stamm-Konzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>	<i>in Lösung</i>
Leupeptin	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O	0,4 $\mu$ g/ml	
Pepstatin A	1 mg/ml in Ethanol	0,7 $\mu$ g/ml	
DNase I	5 mg/ml in IMAC-A	5 $\mu$ g/ml	
PMSF	0,2 M in Ethanol	0,5 mM	
RNase A	5 mg/ml	10 $\mu$ g/ml	

### 3.1.8. Primer und Plasmide

#### 3.1.8.1. Plasmide

pEvol-pBpF	Peter Schultz, Scripps, Institute La Jolla, CA, USA
pUltra-MjY	Peter Schultz, Scripps, Institute La Jolla, CA, USA
pMM CHisPPAR $\alpha$ L258Stop	Mathias Müller, MLU Halle-Wittenberg
pMM CHisPPAR $\alpha$ L460Stop	Mathias Müller, MLU Halle-Wittenberg
pMM CHisPPAR $\alpha$ WT	Mathias Müller, MLU Halle-Wittenberg
pET28a(+)	Dirk Tänzler, MLU Halle-Wittenberg
pET28a-Variante1	Eurofins Genomics, Ebersberg
pET28a-Variante2	Eurofins Genomics, Ebersberg
pET28a-Variante3	Eurofins Genomics, Ebersberg
PPARD_full_new	Life Technologies, Darmstadt
pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDWT	diese Arbeit
pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDF180	diese Arbeit
pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDF192	diese Arbeit

pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDF213	diese Arbeit
pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDF248	diese Arbeit
pRS CStrepPPAR $\beta$ / $\delta$ LBDY443	diese Arbeit

### 3.1.8.2. Primer

PrimerT7fw	5'-CGAAATTAATACGACTCACTATA-3'
PrimerT7rev	5'-AAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCC-3'
PPARa fw	5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGG-3'
PPARa rev	5'-GCCCGTACATGTCCCGGTAGATTTCCCTGC-3'
WT fw	5'-GCCGCTCTGCATCCGCTCTTGCAGGAAATCTAC-3'
WT rev	5'-GTAGATTTCCCTGCAAGAGCGGATGCAGAGCGGC-3'
Vari1 fw	5'-GCCGAAGTGCGCATTTAGCACTGTTGCCAATGC-3'
Vari1 rev	5'-GCATTGGCAACAGTGCTAAATGCGCACTTCCGC-3'
Vari2 fw	5'-ACGTTAGTTGCAAAATAGGTTGCGAATGGCATT-3'
Vari2 rev	5'-AATGCCATTCGCAACCTATTTTGCAACTAACGT-3'
Vari3 fw	5'-GCCGCTCTGCATCCGTAGTTGCAGGAAATCTAC-3'
Vari3 rev	5'-GTAGATTTCCCTGCAACTACGGATGCAGAGCGGC-3'
PPARDNco1fw	5'-ATGCACCATGGATGTGGTCACATCCGCAGT-3'
PPARDXho1rev	5'-TATGCCTCGAGTTAATACATATCTTTATAG-3'
MutationF180rev	5'-TAGATATGTTTGCTCTATGCTTTCAGATCT-3'
MutationF180fw	5'-AGATCTGAAAGCATAGAGCAAACATATCTA-3'
MutationF192rev	5'-TTTGGTCATGTTCTAGTTTTTCAGATAGGC-3'
MutationF192fw	5'-GCCTATCTGAAAAACTAGAACATGACCAAA-3'
MutationF213rev	5'-CATGAATAACCTACGGTGCGGTATGGCTTG-3'
MutationF213fw	5'-CAAGCCATACCGCACCGTAGGTTATTCATG-3'
MutationF248rev	5'-TACACTGACAGCGATACTAAACATGCACGC-3'
MutationF248fw	5'-GCGTGCATGTTTAGTATCGCTGTCAGTGTA-3'
Nco1 fw 2	5'-CCAGAGCTCCCATGGTGTGGTCACATCCGC-3'
Tyr fw TAG	5'-TATAAAGATATGTAGTAACTCGAGCACCAC-3'
Tyr rev TAG	5'-GTGGTGCTCGAGTTACTACATATCTTTATA-3'

### 3.1.9. Reagenzien für Polymerase-Kettenreaktion und Ligation

10 mM ATP	Sigma Aldrich
-----------	---------------

100 mM dATP	New England Biolabs
100 mM dCTP	New England Biolabs
100 mM dGTP	New England Biolabs
100% Dimethylsulfoxid (DMSO)	New England Biolabs
100 mM dTTP	New England Biolabs
5x GC-Puffer	New England Biolabs
5x HF-Puffer	New England Biolabs
KOD Xtreme Hot Start DNA Polymerase 1000 U/ml	Novagen
50 mM MgCl <sub>2</sub>	New England Biolabs
Phusion DNA-Polymerase 2000 U/ml	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase 200 U/μl	Thermo Fisher Scientific

### 3.1.10. Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, mit hochreinem entionisierten Milli-Q-H<sub>2</sub>O hergestellt.

#### 3.1.10.1. Gelelektrophoreselösungen

Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung: 10% (m/v) APS in H<sub>2</sub>O

Coomassie-Färbelösung: 1% (m/v) Coomassie-Brilliant Blue R250 in 40 % (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure in H<sub>2</sub>O

Färbelösung A: 5% (m/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 in H<sub>2</sub>O

Färbelösung B: 2% (m/v) *ortho*-Phosphorsäure, 10% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O

Fixierlösung: 40% (v/v) Methanol/ 10% (v/v) Essigsäure in H<sub>2</sub>O

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung: 10% (m/v) SDS in H<sub>2</sub>O

TRIS-HCl-Pufferlösung: 1,5 M TRIS-HCl in H<sub>2</sub>O (pH 8,8)  
0,5 M TRIS-HCl in H<sub>2</sub>O (pH 6,8)

Entfärbelösung 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O

### 3.1.10.2. Lösungen für die enzymatische Proteolyse

Alkylierungslösung A:	55 mM IAA in Proteolysepuffer A
Alkylierungslösung B:	100 mM IAA/ 400 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Denaturierungslösung:	8 M Harnstoff/ 400 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Extraktionslösung:	5% TFA in H <sub>2</sub> O/ACN (1:2) (v/v)
Proteolysepuffer A:	100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Proteolysepuffer B:	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Reduktionslösung A:	10 mM Dithiothreitol (DTT) in Proteolysepuffer A
Reduktionslösung B:	45 mM DTT/ 400 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O
Waschlösung:	50% (v/v) ACN/ 50% (v/v) 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O

### 3.1.10.3. Lösungen für MALDI-MS

Sinapin-Matrix:	Gesättigte Sinapin-Lösung in TA50 oder TA90 (siehe unten)
Super-DHB-Matrix:	50 mg/ml Super-DHB (Mischung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure) in TA50 oder TA90
TA50:	50% (v/v) ACN/ 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in H <sub>2</sub> O
TA90:	90% (v/v) ACN/ 0,1% (v/v) TFA/ 1 mM NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O

### 3.1.11. FPLC-Systeme und Zubehör

#### 3.1.11.1. FPLC-Systeme

ÄKTA-FPLC mit Fraktionssammler	GE Healthcare
ÄKTA-Prime plus mit Fraktionssammler mit Probenschleifen (0,5 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	GE Healthcare
50 ml-Superloop	GE Healthcare

#### 3.1.11.2. FPLC-Säulen

HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare
HisTrap FF-Säule (1 ml)	GE Healthcare

HisTrap HP-Säule (5 ml)	GE Healthcare
HiTrapQ XL-Säule (1 ml)	GE Healthcare
StrepTrap HP-Säule (1 ml)	GE Healthcare

### 3.1.12. Lösungen für die Chromatographie

#### 3.1.12.1. Lösungen für die Proteinreinigung

Alle Lösungen wurden vor ihrer Benutzung steril filtriert und entgast.

AEX-A-Puffer	20 mM HEPES, 5 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerol in H <sub>2</sub> O wurden mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt.
AEX-B-Puffer	20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10% Glycerol in H <sub>2</sub> O wurden mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt.
IMAC-A	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerol in H <sub>2</sub> O wurden mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt.
IMAC-B	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerol in H <sub>2</sub> O wurden mit 10 N NaOH auf pH 8 eingestellt.
Strep-tag-Lösung A	50 mM HEPES, 500 mM NaCl, 2,5 mM TCEP in H <sub>2</sub> O wurden mit 10 N NaOH auf pH 6,8 eingestellt.
Strep-tag-Lösung B	Strep-tag-Lösung A mit 10 mM d-Desthiobiotin

#### 3.1.12.2. Nano-HPLC-Lösungen

Fließmittel A:	5% (v/v) ACN/ 0,1% (v/v) Ameisensäure (FA) in H <sub>2</sub> O
Fließmittel B:	80% (v/v) ACN/ 0,08% (v/v) FA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel C:	0,1% (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel D:	0,1% (v/v) FA in H <sub>2</sub> O
Fließmittel E:	0,08% (v/v) FA in Acetonitril
Fließmittel F:	0,1% (v/v) TFA in H <sub>2</sub> O

### 3.1.13. HPLC-Systeme und Säulen

*HPLC-Systeme:*

UltiMate Nano-HPLC-System	Thermo Fisher Scientific
---------------------------	--------------------------

---

UltiMate 3000 Nano-HPLC-System Thermo Fisher Scientific

*Vorsäulen:*

Acclaim PepMap (C18, 100 µm x 20 mm, 5 µm, 100 Å) Thermo Fisher Scientific

Acclaim PepMap (C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å) Thermo Fisher Scientific

Acclaim PepMap (C8, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å) Thermo Fisher Scientific

*Trennsäulen:*

Acclaim PepMap (C18, 75 µm x 150 mm, 3 µm, 100 Å) Thermo Fisher Scientific

Acclaim PepMap (C18, 75 µm x 250 mm, 3 µm, 100 Å) Thermo Fisher Scientific

**3.1.14. Massenspektrometer**

*Massenspektrometer*

*Hersteller*

MALDI-TOF/TOF-MS (Ultraflex III)

Bruker Daltonik

LTQ-Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometer

Thermo Fisher Scientific

mit Nano-ESI-Quelle

Proxeon

Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer

Thermo Fisher Scientific

mit Nano-ESI-Quelle Nanospray Flex

Thermo Fisher Scientific

**3.1.15. Quervernetzungsreagenzien und photoaktivierbare Aminosäuren**

*Quervernetzungsreagenz*

*Abkürzung*

*Hersteller*

Bis(sulfosuccinimidyl)-Glutarat  $D_0/D_4$

BS<sup>2</sup>G  $D_0/D_4$

Thermo Fisher Scientific

4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-

DMTMM

Sigma Aldrich

Methylmorpholiniumchlorid

1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-

EDC

Thermo Fisher Scientific

carbodiimid-Hydrochlorid

*N*-Hydroxysulfosuccinimid

Sulfo-NHS

Thermo Fisher Scientific

Urea-Linker

BuUrBu

Francesco Falvo, Mathias Schäfer, Universität zu Köln

Suberinsäure-1,8-Dihydrazid  $D_0/D_{12}$

SDH  $D_0/D_{12}$

Creative Molecules Inc.

*N*-Succinimidyl-*para*-Benzoyldihydrocinnamat

SBC

Fabian Krauth, MLU Halle-Wittenberg

Sulfosuccinimidyl 4,4'-azipentanoat	Sulfo-SDA	Thermo Fisher Scientific
<i>Photoaktiverbare Aminosäure</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>para</i> -Benzoyl-L-Phenylalanin	Bpa	Bachem
Photomethionin		Thermo Fisher Scientific
<i>para</i> -Trifluormethyldiazirinyll-L-Phenylalanin	TfmdF	Andrew Smith, University of Leeds

### 3.1.16. Software und Tools

<i>Programm</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Hersteller</i>
Adobe Illustrator CS4	Bildbearbeitungsprogramm	Adobe Systems
ChemSketch 12.01	Zeichenprogramm für chemische Verbindungen	ACD Labs
Circos 0.67-7	Software zur Visualisierung von Daten in Kreisform	Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre
DCMS-Link 2.0	Erweiterung für Xcalibur Software zur Methodenerstellung für die Nano-HPLC	Thermo Fisher Scientific
ExpASy Proteomics	Serversammlung von Programmen, zur Identifizierung von Proteinen der SwissProt-Datenbank, Proteinmodifikationen, Sequenzanalyse	www.expasy.ch
Flex Analysis 3.3	Analyseprogramm für MALDI-TOF/TOF-MS (Ultraflex III)	Bruker Daltonik GmbH
Fluostar Galaxy 32	Software für das Spektralphotometer Polarstar Galaxy	BMG Lab Technologies
GENTle 1.9.4	Klonierungsprogramm	Universität zu Köln
MaxQuant 1.5.2.8	Quantifizierung von Proteinen	MPI für Biochemie, Martinsried
Merox 1.4.13 – 1.5.1	Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit spaltbareren Quervernetzungsreagenzien	MLU Halle-Wittenberg
Orbitrap Fusion Tune	Akquisitionsoftware des Orbitrap Fusion	Thermo Fisher

Application 2.0.1258.15	Tribrid-MS	Scientific
Perseus 1.5.1.6	Quantifizierung von Proteinen	MPI of Biochemistry, Martinsried
Proteome Discoverer 1.2-1.4	Erstellung von Massenlisten und automatische MS-Datenauswertung	Thermo Fisher Scientific
PyMOL 0.99rc6	Programm zur Visualisierung der räumlichen Koordinaten von Proteinstrukturen	DeLano Scientific LLC
Sigma Plot 8.0	Darstellungsprogramm für Daten als Plots- bzw. Diagonalplots	Systat Software GmbH
SnapGene Viewer 2.5	Klonierungsprogramm	GSL Biotech LLC
Stavrox 1.9 – 3.5.1	Identifizierung von Quervernetzungsprodukten	MLU Halle- Wittenberg
Strawberry Perl 5.22.0.1	Programmiersprache für Circos	
Thermo Tune Plus 2.5.5	Akquisitionsoftware des LTQ-Orbitrap- XL-Massenspektrometers	Thermo Fisher Scientific
Xcalibur 2.07	Auswertungssoftware des Nano-ESI- LTQ-Orbitrap XL-MS	Thermo Fisher Scientific
Xcalibur 3.0.63	Auswertungssoftware der Nano-ESI- Orbitrap Fusion-MS	Thermo Fisher Scientific

## 3.2. Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Der jeweilige *E.coli*-Stamm wurde unter sterilen Bedingungen in eine Vorkultur aus *Lysogeny Broth* (LB)-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen überführt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am Folgetag wurde mit der Übernachtskultur 50 ml LB-Medium in einem Verhältnis von 1:100 (v/v) Vorkultur / LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 5000 UPM geerntet. Danach wurden die Zellen in 50 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung

resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben geerntet. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter, steriler 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und mit 15% (v/v) Glycerol versetzt. Die Zellsuspension wurde in 100 µl-Schritten aliquotiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 3.2.2. Plasmidpräparation

Eine Kolonie des *E.coli*-Stamms DH5α mit gewünschter Plasmid-DNA wurde unter sterilen Bedingungen mittels einer sterilen 10 µl-Pipettenspitze selektiert und in 5-10 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen überführt. Bei 37 °C wurden die Ansätze über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2-5 ml der Kultur mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerprotokoll aufgeschlossen und gereinigt. Mittels UV-Spektroskopie wurde die Plasmid-DNA unverdünnt oder 1:10 (v/v) verdünnt mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O folgendermaßen bestimmt. Von der Probe wurden jeweils Extinktionen bei den Wellenlängen 260 nm ( $E_{260}$  = DNA-Konzentration), 280 nm ( $E_{280}$  = Protein-Konzentration) und 320 nm ( $E_{320}$  = Aggregate) bestimmt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Annahme, dass 50 µg/ml reine doppelsträngige DNA einer  $E_{260}$  von 1 entsprechen, wurde die DNA-Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = (E_{260} - E_{320} - E_{280}) * V * 50$$

Die Reinheit der Plasmid-DNA wurde zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) bestätigt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch SeqLab (Microsynth, Göttingen) sequenziert. Proben mit korrekter Plasmid-DNA wurden für die Transformation chemisch kompetenter Zellen (3.2.8) weiterverwendet.

### 3.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

0,6 g - 1,0 g Agar-Agar wurden in 100 ml halb-konzentriertem TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer oder TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer unter Kochen in der Mikrowelle gelöst. Anschließend wurde das heiße Gel in die Gelkammer gegossen, der Probenkamm hineingesteckt und das Gel für ca. eine Stunde polymerisiert. Alternativ wurde vor dem Gießen des Gels 10 µl GelGreen Nucleic Acid Stain (10000 x in H<sub>2</sub>O) in die heiße Lösung pipettiert. Je nach Probenkamm und Probe wurden bis zu 40 µl Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Ansatz (3.2.4), Kolonie-PCR (3.2.5), Restriktionsverdau (3.2.6)

oder Ligation (3.2.7) in die Geltaschen geladen. Das Gel wurde bei 200 V, 500 mA für 45 min entwickelt. Falls kein Färbemittel vor dem Gießen zugesetzt wurde, wurde das Gel in 25 ml einer 0,2 M NaCl-Lösung mit 5 µl GelGreen Nucleic Acid Stain (10000 x in H<sub>2</sub>O) für 45 min unter Schwenken gefärbt. Unter UV-Licht wurden die Gele analysiert, Banden von Interesse ausgeschnitten und die DNA mittels Gelextraktionskit (Peqlab) isoliert.

#### **3.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die PCR wurde die zu vervielfältigende Plasmid-DNA mit den Komponenten, wie in Tabelle 2 dargestellt, gemischt. Bei schwierig zu vervielfältigender Plasmid-DNA wurde zusätzlich zum GC-Puffer, einem optimierten Puffer für GC-reiche Sequenzen, DMSO und MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Dabei agiert DMSO in Konzentrationen von 1-10% (v/v) als Katalysator für die Reaktion der Polymerase beim Vervielfältigen von GC-reicher Plasmid-DNA [201]. MgCl<sub>2</sub> über 1,5 mM erhöht die Produktkonzentration, da es als Kofaktor für die Polymerasen dient [202]. Im PCR-Thermocycler fand anschließend die PCR statt. In Tabelle 3 sind die PCR-Schritte für einen Zyklus mit den jeweiligen Temperaturen und Zeiten dargestellt. Je nach Länge des zu amplifizierenden Produktes wurden die Zeiten für die Elongation angepasst. Die Denaturierungszeit variierte dabei von 30 s bis 5 min. Es wurden pro PCR-Ansatz 30-45 Zyklen ab dem Schritt der 2. Denaturierung (Tabelle 2) durchgeführt. Nach erfolgter PCR wurden die Ansätze bis zu ihrem Entnehmen aus dem Thermocycler bei 4 °C gekühlt. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) kontrolliert.

Tabelle 2: Allgemeine Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes.

<i>Komponente</i>	<i>Volumen</i> [µl]
Plasmid-DNA (30-50 ng)	1
5x GC/HF-Puffer	10
10 mM dNTPs	1
100% DMSO	1,5
50 mM MgCl <sub>2</sub>	2
Primer fw. (50-200 pmol)	2
Primer rev. (50-200 pmol)	2
Polymerase	0,5
Milli-Q-H <sub>2</sub> O	Ad 50,0

Tabelle 3: PCR-Schritte mit den jeweiligen Temperaturen und Zeiten.

<i>PCR-Schritt</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeit</i>
1. Denaturierung	98	30 s oder 300 s
2. Denaturierung	98	10 s oder 30 s
3. Annealing	55-70	30 s
4. Elongation	72	15 s bis 150 s
5. Elongation	72	10 min

### 3.2.5. Kolonie-PCR

Eine Kolonie mit zur untersuchenden DNA wurde unter sterilen Bedingungen in einen PCR-Ansatz überführt (3.2.4). Mit einer 10 µl-Pipettenspitze wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikazusätzen angeimpft, um die zu untersuchende *E-coli*-Kolonie mit der enthaltenden Plasmid-DNA für weitere Experimente zu sichern.

### 3.2.6. Restriktionsspaltung

Je nach Plasmid (3.1.8.1) oder PCR-Ansatz (3.2.4) wurden die Proben mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (100-200 U) (3.1.7) versetzt und für eine Stunde bei 37 °C gespalten. Anschließend wurde der Ansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese

(3.2.3) auf die richtigen Spaltprodukte hin überprüft oder direkt für einen Ligationsansatz (3.2.7) mit dem GeneJet PCR-Purification-Kit (Thermo Fisher Scientific) gereinigt.

### **3.2.7. Ligation**

Die aus der Restriktionsspaltung (3.2.6) erhaltenen und gereinigten Plasmide und *Inserts* mit komplementären Enden wurden auf ein Volumen von 20 µl in verschiedenen molaren Verhältnissen von Plasmid:Insert (1:2, 1:4, 1:8) gemischt. Zum jeweiligen Ligationsansatz wurde T4-Ligase-Puffer hinzugegeben, um eine optimale Aktivität der Ligase zu gewährleisten. In jeden Ansatz wurden 200 U T4 DNA-Ligase und 0,1 mM ATP verwendet. ATP wird von der Ligase zur Ligation benötigt und wurde zusätzlich hinzugefügt, um eine vollständige Ligation zu erhalten. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C im PCR-Thermocycler ligiert. Nach der Ligation wurden die Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) analysiert, anschließend für eine Transformation von *E.coli*-Zellen genutzt (3.2.8) und mittels SeqLab (Microsynth, Göttingen) sequenziert.

### **3.2.8. Transformation chemisch kompetenter Zellen**

Ein Aliquot chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-4 µl Plasmidlösung (60-200 ng/µl Plasmidkonzentration) wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 60 s (*E.coli*-DH5α) oder 90 s (*E.coli*-BL21(DE3)) im Ts1-ThermoShaker. Die Zellen wurden nach erfolgtem Hitzeschock auf Eis gekühlt und mit *Super Optimal Broth with Catabolite Repression* (SOC)-Medium 1:5 (v/v) verdünnt. Nach dem Kultivieren der Zellen für 1 h bei 37 °C, 500 UPM im Ts1-ThermoShaker wurden diese auf Agar-Medium-Platten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C bebrütet.

## **3.3. Proteinchemische Methoden**

### **3.3.1. Proteingehaltsbestimmung nach Bradford**

Um die Proteinkonzentration in den Lösungen zu ermitteln, wurden Proteingehaltsbestimmungen nach Bradford durchgeführt [203]. Dabei wurden 20 µl Probe in 980 µl Bradford-Reagenz, bestehend aus 1 Teil Bradford-Reagenz (Biorad) (50 mg/l Coomassie Brilliant Blue G-250 gelöst in 1:1:2 (v/v/v) Methanol:Wasser:ortho-Phosphorsäure) und 4 Teilen Milli-Q-H<sub>2</sub>O, gemischt und für 15 min inkubiert. Alternativ

wurden 1-2  $\mu\text{l}$  Probe in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, mit 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gemischt und sofort vermessen. Die Extinktionen bei 595 nm der 1 ml-Proben wurden im Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro und die 96-Well-Mikrotiterplatten im Polarstar Galaxy-Plattenleser bestimmt. Um die erhaltenen Absorptionswerte richtig zu interpretieren, wurde eine Vergleichsmessung mittels BSA durchgeführt. Dabei wurden Lösungen mit BSA-Konzentrationen von 0,25 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,75 mg/ml und 1,00 mg/ml, wie oben beschrieben, mit Bradford-Reagenz gemischt und analysiert. Über die lineare Regression der BSA-Kalibrierkurve wurde die Proteinmenge in der Probe bestimmt. Mittels der molekularen Masse des zu untersuchenden Proteins wurde die Konzentration an Protein in der Probe ermittelt.

### **3.3.2. Eindimensionale Gelelektrophorese**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode, um Proteine anhand ihrer Stokes-Radien aufzutrennen. Durch das Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine an der Oberfläche negativ geladen, wodurch sie nach Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Die Proben wurden 1:1 (v/v) mit doppelt konzentriertem Laemmli-Puffer gemischt, wobei die Proteine durch das SDS und Erhitzen für 5 min bei 95 °C denaturiert wurden [204]. Die Disulfidbrücken wurden durch das zugesetzte Mercaptoethanol reduziert. Die SDS-Gele wurden im Mini-Protean Tetra Cell Elektrophorese-System von Biorad hergestellt (Tabelle 4). Dabei wurde zunächst das Trenngel gegossen und nach dem Polymerisieren für mindestens 30 min mit dem Sammelgel inklusive Probenkamm überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurden die Gele entweder sofort verwendet oder bis zu zwei Wochen bei 6 °C aufbewahrt. Die Gele wurden anschließend in Laufpuffer, bestehend aus verdünntem Rotiphorese SDS-PAGE-Puffer (10-fach konzentriert), gesetzt. Die Probentaschen wurden entweder mit 15  $\mu\text{l}$  (15 Taschen) oder 20  $\mu\text{l}$  (10 Taschen) Probe gefüllt. Die Gele wurden durch Anlegen eines Stroms bei 20 mA/Gel entwickelt. Alternativ wurden die Gele bei einer Spannung von 100 V entwickelt, bis die Lauffront das Ende des Sammelgels erreicht hatte. Die Proteine wurden anschließend bei 200 V im Trenngel getrennt. Beendet wurde die SDS-PAGE, bevor die Lauffront aus dem Gel heraus wandern konnte. Anschließend wurden die Gele von den Glasplatten vorsichtig gelöst und gefärbt (3.3.2.1; 3.3.2.2).

Tabelle 4: Chemikalien für die Herstellung eines 12%igen SDS-Gels

<i>Chemikalie</i>	<i>Trenngel (12%)</i>	<i>Sammelgel (5%)</i>
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	3000 µl	650 µl
1,5 M TRIS-HCl-Lösung, pH 8,8	2500 µl	-
0,5 M TRIS-HCl-Lösung, pH 6,8	-	1250 µl
MilliQ-H <sub>2</sub> O	4340 µl	3000 µl
10% (v/v) SDS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
APS	50 µl	25 µl

### 3.3.2.1. Coomassie-Proteinfärbung

Nach der SDS-PAGE (3.3.2) wurden die Proteine mittels des anionischen Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt [205]. Der Farbstoff interagiert dabei mit kationischen und hydrophoben Seitenketten der Proteine. Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung (3.1.10.1) überschichtet. Das Färben erfolgte dabei entweder unter Schwenken über Nacht oder durch 5-minütiges Erhitzen in der Mikrowelle und Schwenken bei Raumtemperatur für eine Stunde. Nach erfolgter Anfärbung der Proteine wurde das nichtgebundenen Coomassie Brilliant Blue R250 in den Gelen mittels Waschen mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O und Entfärbelösung (3.1.10.1) entfernt. Das Entfärben geschah ebenfalls entweder über Nacht oder durch 5-minütiges Erhitzen in der Mikrowelle und einer Stunde Schwenken bei Raumtemperatur.

### 3.3.2.2. Coomassie *Blue Silver*-Färbung

Die kolloidale Färbung nach dem Protokoll mit Coomassie Brilliant Blue G250 ist eine sensitivere Alternative zu Coomassie Brilliant Blue R250 [206]. Die Gele werden vor dem Färben mindestens 30 Minuten in die Fixierlösung (3.1.10.1) gegeben. Anschließend werden die Gele mittels Milli-Q-H<sub>2</sub>O gewaschen und in einer Mischung aus Färbelösung A und B (1:49 (v/v)) (3.1.10.1) gefärbt. Dies geschah ausschließlich über Nacht, um das vollständige Anfärben zu gewährleisten. Anschließend wurden die Gele mehrfach mit Milli-Q-H<sub>2</sub>O gewaschen.

### 3.3.3. Proteinexpression

Für die Expression der Ligandenbindungsdomänen (LBD) von PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\beta/\delta$  wurden *E.coli* BL21-(DE3)-Zellen mit dem entsprechendem Plasmid (3.1.8.1) transformiert. Für die Expression der PPAR- $\alpha$ - und PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten mit photoaktivierbaren Aminosäuren wurden *E.coli* BL21-(DE3)-Zellen zunächst mit den Plasmiden pEvol-pBpF (*para*-Benzoyl-L-Phenylalanin (Bpa)-Varianten) oder pUltra-MjY (Trifluormethyldiazirinyll-L-Phenylalanin (TfmdF)-Varianten) für die Expression des spezifischem tRNA:Aminoacyl/tRNA-Synthetase-Paars transformiert [197]. Die transformierten Zellen wurden erneut chemisch kompetent gemacht (3.2.1) und mit den Plasmiden für die Proteinexpression der PPAR- $\alpha$ - und PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten transformiert, selektiert und Vorkulturen erstellt. Verschiedene Volumina (5 ml, 10 ml, 50 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml) sterilen Mediums (3.1.6) wurden mit den Vorkulturen der PPAR- $\alpha$ - und PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und der Varianten auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft, mit den jeweiligen Antibiotika (3.1.5) versetzt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,5-1,0 kultiviert. Nach erneuter Antibiotikazugabe wurde die Expression mit 0,1-1 mM IPTG (PPAR- $\alpha$ -/PPAR- $\beta/\delta$ -LBD) oder 0,1-1 mM IPTG, 0,2% Arabinose (PPAR- $\alpha$ -/PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten) [198], 1% (m/v) Sorbitol (PPAR- $\alpha$ -Varianten) und 1% (m/v) Saccharose (PPAR- $\alpha$ -Varianten) induziert. Die Expression der PPAR-Varianten mit photoaktivierbarer Aminosäure erfolgte in Gegenwart von entweder 0,1 mM Bpa in 0,5 M NaOH, 10 mM Photomethionin oder 0,1 mM TfmdF. Sobald die photoaktivierbare Aminosäure zugegeben wurde, wurde ausschließlich unter Lichtausschluss gearbeitet. Die Kulturen wurden entweder für vier Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 18 °C kultiviert, bevor sie bei 4 °C geerntet wurden. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets bei -20 °C eingefroren. Vor und nach der Induktion wurde ein Volumen entnommen, welches dem Kehrwert der OD<sub>600</sub> entsprach. Die Proteinexpression wurde anschließend mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (3.3.1) überprüft.

### 3.3.4. Proteinreinigung

#### 3.3.4.1. Reinigung der PPAR- $\alpha$ -LBD und der photoaktivierbaren Varianten

Alle Reinigungsschritte der PPAR- $\alpha$ -Varianten wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die gefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut und mit IMAC-A-Puffer (3.1.12.1) 1:2 Pellet:Puffer (m/v) resolubilisiert. RNase A, DNase 1 und Proteaseinhibitoren wurden zugesetzt (Tabelle 1), bevor ein Aufschluss mittels

Ultraschall (Amplitude 20-35% für 10-25 s, 5-8-malige Wiederholung) erfolgte. Das Lysat wurde für 45 min, 4 °C bei 16100 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5415R). Der Überstand wurde abgenommen und steril filtriert. Das Pellet wurde verworfen. Das filtrierte Lysat wurde über eine Probenschleife (10 ml-Probenschleife oder 50 ml-Superloop, GE Healthcare) mit 0,5 ml/min auf eine 1 ml-HisTrap FF-Säule zur Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie mittels FPLC aufgetragen. Vor der Elution wurde die Säule mit 20 Säulenvolumina IMAC-A-Puffer gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mit einem Stufengradienten von 0-10% und 10-100% IMAC-B-Puffer (3.1.12.1) über jeweils 15 Säulenvolumina. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (3.3.1). PPAR- $\alpha$ -Wildtyp- oder PPAR- $\alpha$ -Varianten-enthaltende Fraktionen wurden vereint. Zur Abtrennung des Imidazols wurde in 0,5 ml- oder 10 ml-Amicon-Filtrationseinheiten (Ausschlussgröße 10 kDa) dreimal mit AEX-A-Puffer umgepuffert. Danach wurde die Proteinlösung über eine Probenschleife auf eine 1 ml-HiTrapQ XL-Säule zur Anionenaustauschchromatographie mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 1 ml/min Fließgeschwindigkeit mit einem Stufengradient von 0-10% und 10-100% AEX-B-Puffer über jeweils 10 Säulenvolumina. Die Reinigung wurde mit SDS-PAGE (3.3.2) kontrolliert und PPAR- $\alpha$ -Wildtyp- oder PPAR- $\alpha$ -Varianten-enthaltende Fraktionen wurden vereint. Die Proteinlösungen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **3.3.4.2. Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und Bpa-Varianten**

Alle Reinigungsschritte der PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten wurden wie unter 3.3.4.1 beschrieben unter Lichtausschluss durchgeführt. Die gefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut und mit Strep-tag-Lösung A (3.1.12.1) 1:2 (m/v) resolubilisiert. Anschließend wurde eine Tablette Proteaseinhibitor Complete EDTA-frei (Roche) und 0,5 mg/ml Lysozym aus Hühnereiweiß (3.1.7) hinzugegeben. Nach dem Aufschluss mit Lysozym für 30 Minuten wurden den Lösungen 2,5 U Benzonase Nuclease (3.1.7) hinzugefügt und für 30 min inkubiert. Danach wurden sie entweder dreimal 15 Sekunden mit Ultraschall bei einer Amplitude von 35% behandelt oder bei 35.000 UPM für eine Stunde bei 4 °C in der Ultrazentrifuge Optima L-90K pelletiert. Die Überstände wurden steril filtriert und die Pellets verworfen. Die Proteine wurden mittels FPLC an einem ÄKTA-Prime System über einen 50 ml-Superloop auf zwei miteinander verbundene 1 ml-StrepTrap HP-Säulen

mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen mit 5 Säulenvolumina Strep-tag-Lösung A mit 1 ml/min gewaschen, bevor die Proteine mit Strep-tag-Lösung B (3.1.12.1) eluiert wurden (1 ml/min). Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE überprüft (3.3.1) und Zielprotein-enthaltende Fraktionen wurden vereint. Die vereinten Fraktionen wurden mittels 0,5 ml-Amicon-Filtrationseinheiten (Ausschlussgröße 10 kDa) gewaschen und auf ca. 200 µl eingengt, bevor der Strep-tag II über Nacht bei 6 °C durch die ProTEV-Protease abgespalten wurde. Der Erfolg der ProTEV-Protease-Spaltung wurde mittels SDS-PAGE (3.3.1) überprüft. Anschließend wurden die Lösungen erneut mindestens dreimal mittels Strep-tag-Lösung A gewaschen, um den freien Strep-tag II zu entfernen. Danach wurde das Protein bei 4-6 °C bis zu seiner Nutzung für Quervernetzungsexperimente (3.4) gelagert.

### **3.3.5. Acetonfällung**

Zielprotein-enthaltende Proben wurden im Verhältnis 1:3 (v/v) mit -20 °C kaltem Aceton gemischt und für mindestens zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 16.100 x g bei 4 °C für eine Stunde präzipitiert. Die Überstände wurden verworfen. Die Präzipitate wurden entweder für die eindimensionale Gelelektrophorese (3.3.1) in Laemmli-Puffer aufgenommen oder direkt einer *in-Lösungs*-Spaltung (3.3.6) unterzogen.

### **3.3.6. In-Lösungs-Spaltung**

Alle Vorgänge wurden in der Sterilbank durchgeführt. Das Präzipitat der Acetonfällung (3.3.5) wurde in 20 µl Denaturierungslösung (3.1.10.2) aufgenommen und für 10 min im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurden die Disulfidbrücken mit 5 µl Reduktionslösung B (3.1.10.2) für 45 min bei 56 °C reduziert. Um die Oxidation der Cysteine zu Disulfidbrücken zu unterbinden, wurden die Thiol-Gruppen der Cysteine mit 5 µl Alkylierungslösung B (3.1.10.2) 45 min unter Lichtausschluss alkyliert. Die Lösungen wurden mit Proteolysepuffer B (3.1.10.2) 1:7 (v/v) verdünnt, sodass die Harnstoffkonzentration unter 1 M lag. 0,25 µg Trypsin in 20 µl Proteolysepuffer B wurde den Lösungen hinzugegeben und die Spaltung unter leichtem Schütteln über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Die Spaltung wurde am nächsten Morgen mit 10% TFA-Lösung gestoppt. Die Proben wurden zügig mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-MS/MS (3.5.4) analysiert.

### 3.3.7. In-Gel-Spaltung

Alle Vorgänge wurden in der Sterilbank durchgeführt. Nach der Trennung der Proteine mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (3.3.1) wurden die Gelbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Würfel ( $1 \text{ mm}^3$ ) zerkleinert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend folgte die proteolytische Spaltung nach folgendem Protokoll [207]: Die Gelstückchen wurden mit  $500 \mu\text{l}$  Acetonitril (ACN) unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur 10 min gewaschen und der Überstand anschließend verworfen. Danach wurden  $50 \mu\text{l}$  der Reduktionslösung A (3.1.10.2) bei  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Schütteln für 45 min hinzugeben, um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Nach erneutem Waschen mit ACN für 10 min und Verwerfen des Überstandes wurden die Thiolgruppen der Cysteine mit Alkylierungslösung A (3.1.10.2) für 45 min unter Lichtausschluss alkyliert. Die Gelstücke wurden erneut mit  $500 \mu\text{l}$  ACN 10 min gewaschen und die Überstände wurden verworfen. Um die Gelstücke weitestgehend zu entfärben, wurde  $100 \mu\text{l}$  Waschlösung (3.1.10.2) hinzugegeben und die Gelstücke wurden bei Raumtemperatur 30 min geschüttelt. Anschließend wurden  $500 \mu\text{l}$  ACN hinzugegeben und für 10 min geschüttelt und der Überstand verworfen. Der Waschvorgang wurde solange wiederholt, bis die Gelstücke entfärbt waren. Für die Spaltung wurde entweder  $0,25 \mu\text{g}$  Trypsin in  $20 \mu\text{l}$  Proteolysepuffer A (3.1.10.2) oder  $0,25 \mu\text{g}$  GluC in  $20 \mu\text{l}$  Proteolysepuffer B (3.1.10.2) hinzugegeben und die Gelstücke wurden im Kühlschrank 30 min inkubiert. Die gequollenen Gelstücke wurden im Falle der Spaltung mit Trypsin mit Proteolysepuffer A überschichtet. Die Spaltung mit Trypsin erfolgte bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht unter leichtem Schütteln. Bei der Spaltung mit GluC/Trypsin wurde zunächst zwei Stunden mit GluC ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) gespalten, bevor  $0,25 \mu\text{g}$  Trypsin in  $20 \mu\text{l}$  Proteolysepuffer B hinzugegeben wurde. Die Gelstücke wurden mit Proteolysepuffer B vollständig bedeckt. Die Spaltung mit GluC/Trypsin erfolgte bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht unter leichtem Schütteln. Am nächsten Morgen wurden die Reaktionen durch eine 1:3 (v/v) Verdünnung mit Extraktionslösung (3.1.10.2) gestoppt. Nach leichtem Schütteln bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für mindestens 15 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke wurden erneut mit  $100 \mu\text{l}$  Extraktionslösung überschichtet. Nach Extrahieren für mindestens 15 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wurden die Überstände vereint und im Vakuumkonzentrator eingengt. Die eingengten Proben wurden abhängig von der massenspektrometrischen Analyse mit 0,1% TFA-Lösung entweder auf ca.  $50 \mu\text{l}$  oder auf ca.  $150 \mu\text{l}$  aufgefüllt (3.5.4). Die Proben wurden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min mit  $16.100\times g$  zentrifugiert. Es wurden anschließend 40



Der erste Reaktionsschritt geschah unter Lichtausschluss, um eine Reaktion der Benzophenonfunktion des SBC zu vermeiden. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben mit UV-A Licht mit 4-16 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrolle wurde zu einer Probe Ethanol oder DMSO gegeben und unter den selben Bedingungen bestrahlt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mittels SDS-PAGE (3.3.2) getrennt, bevor die Gelbanden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) unterzogen wurden.

#### **3.4.1.2. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz EDC**

Die PPAR- $\alpha$ -LBD (5  $\mu$ M) wurde auf Eis aufgetaut und ein 50-facher Überschuss der Agonisten GW7647 (Abbildung 27A) oder MD78 (Abbildung 27C) wurde zum Protein gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde den Proben das Kopplungsreagenz EDC zugegeben. EDC und Sulfo-NHS wurden in 500-2000-fachem molaren Überschuss zu der PPAR- $\alpha$ -LBD gegeben. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur für 10, 20, 30 oder 60 Minuten statt. Gestoppt wurde die Reaktion mit dem Reduktionsmittel DTT (Endkonzentration 20 mM). Als Kontrolle wurde einer Probe DMSO oder Ethanol anstelle der Liganden zugesetzt.

#### **3.4.1.3. Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -LBD**

Die die photoreaktiven Aminosäuren Bpa oder TfmdF enthaltenden PPAR- $\alpha$ -Varianten (5  $\mu$ M) wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden der Agonist GW7647 (Abbildung 27A) in Ethanol oder der Antagonist GW6471 (Abbildung 27B) in DMSO im 200-fachen molaren Überschuss zu dem Protein gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. In Experimenten mit TfmdF-enthaltenden Varianten wurde zusätzlich der Agonist Fenofibrinsäure (Abbildung 27D) im 200-fachen molaren Überschuss zum Protein gegeben. Als Kontrolle wurde zu einer Probe nur Ethanol oder DMSO anstelle des Liganden gegeben. Die Endkonzentration von DMSO oder Ethanol in der Probe betrug 1% (v/v). Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Proben mit UV-A-Licht verschiedener Dosen (4, 6, 8, 12 und 16 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt, um die photoaktivierbare Aminosäure Bpa oder TfmdF zur Reaktion zu bringen (Abbildung 26). Nach erfolgter UV-A-Bestrahlung wurden die Proben über eine eindimensionale Gelelektrophorese (3.3.1) getrennt, Proteinbanden wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mittels Trypsin oder GluC/Trypsin unterzogen. Alternativ wurden die Proben über eine

Acetonfällung (3.3.5) einer *in-Lösung*-Spaltung (3.3.6) zugeführt. Die entstandenen Spaltprodukte wurden unverzüglich mit Nano-HPLC/Nano-ESI-MS/MS (3.5.4) analysiert.

### 3.4.2. Chemische Quervernetzung des PPAR-β/δ

#### 3.4.2.1. Chemische Quervernetzung des PPAR-β/δ mit homobifunktionellen aminreaktiven Reagenzien

Sowohl das PPAR-β/δ-Volllängenprotein als auch die PPAR-β/δ-LBD wurden mit dem aminreaktiven Quervernetzungsreagenz BS<sup>2</sup>G (Abbildung 19) vernetzt. Das Reagenz wurde als 1:1 (m/m)-Mischung aus nichtdeuteriertem (*D*<sub>0</sub>) und vierfach deuteriertem (*D*<sub>4</sub>) Derivat eingesetzt. PPAR-β/δ-LBD wurde wie unter 3.3.3 beschrieben exprimiert und wurde wie unter 3.3.4.2 beschrieben gereinigt. Das PPAR-β/δ-Volllängenprotein wurde als *N*-terminal His<sub>6</sub>-markiertes Protein eingesetzt (Abbildung 28).

	10	20	30	40
MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQ	GAMEQPQEEA	PEVREEEEEKE	EVAEAEGAPE	LNGGPQHALP
50	60	70	80	90
SSSYTDLRSR	SSPSSLDDQL	QMGCDGASCG	SLNMECRVCG	DKASGFHYGV
110	120	130	140	150
RRTIRMKLEY	EKCERSCKIQ	KKNRNKCQYC	RFQKCLALGM	SHNAIRF
170	180	190	200	210
<i>GLTANE</i> GSQY	NPQVADLKAF	SKHIYNAYLK	NFNMTKKKAR	SILTGKASHT
230	240	250	260	270
LWQAEKGLVW	KQLVNLPPY	KEISVHVFYR	CQCTTVETVR	ELTEFAKSIP
290	300	310	320	330
VTLLKYGVHE	AIFAMLASIV	NKDGLLVANG	SGFVTREFLR	SLRKPFSDII
350	360	370	380	390
NALELDDSDL	ALFIAAIIIC	GDRPGLMNVP	RVEAIQDTIL	RALEFHLOAN
410	420	430	440	
LLQKMADLRQ	LVTEHAQMMQ	RIKKTETETS	LHPLLQEIYK	DMY*

Abbildung 28: Aminosäuresequenz des PPAR-β/δ. Die TEV-Protease Schnittstelle ist unterstrichen, die DNA-Bindedomäne (DBD) ist hellgrau unterlegt. Die LBD ist dunkelgrau unterlegt, die *Hinge* Region zwischen DBD und LBD ist kursiv dargestellt. Durch die TEV-Protease Schnittstelle werden zwei zusätzliche Aminosäure (GA) *N*-terminal an das Protein angefügt.

PPAR-β/δ wurde als Lyophilisat mit Strep-tag-Lösung A (3.1.12.1) in einer Konzentration von 5 μM gelöst. Die PPAR-β/δ-LBD wurde auf Eis aufgetaut und anschließend auf eine Konzentration von 5 μM mit Strep-tag-Lösung A verdünnt. Die PPAR-β/δ-Agonisten GW0742 (*K*<sub>D</sub> = 0,4 nM, *EC*<sub>50</sub> = 1 nM) und GW1516 (*K*<sub>D</sub> = 1,1 nM,

EC<sub>50</sub> = 1 nM) (Abbildung 29) wurden im 20-fachen molaren Überschuss in DMSO zu den Proteinen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.

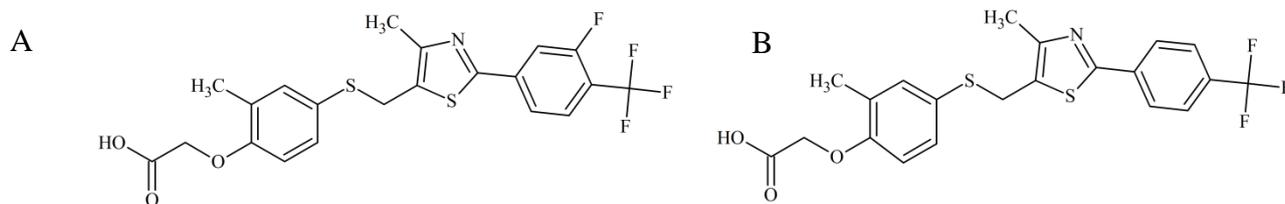


Abbildung 29: Chemische Strukturen der PPAR- $\beta/\delta$ -Agonisten GW0742 (A) und GW1516 (B).

Als Kontrolle wurde eine Probe mit DMSO eingesetzt. Anschließend wurde eine Mischung aus BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub>/*D*<sub>4</sub> im 200-fachen molaren Überschuss (Vollängen PPAR- $\beta/\delta$ ) oder 100- bzw. 200-fachem molaren Überschuss (PPAR- $\beta/\delta$ -LBD) zugegeben. Die LBD von PPAR- $\beta/\delta$  wurde zudem mit dem MS-spaltbaren Urea-Quervernetzungsreagenz [186] in 50-, 100- bzw. 200-fachem molaren Überschuss versetzt (Abbildung 20). Die Quervernetzungsreaktionen wurden für 2 h auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde das überschüssige Quervernetzungsreagenz mit 2 M NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (Endkonzentration 20 mM) zur Reaktion gebracht. Mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (3.3.1) wurden die Quervernetzungsprodukte getrennt, entsprechende Gelbanden wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mit Trypsin unterzogen.

#### 3.4.2.2. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit carboxylreaktivem Reagenz

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde, wie unter 3.4.2 beschrieben, mit den Agonisten GW0742 und GW1516 versetzt und inkubiert. Für die Quervernetzungsreaktion zwischen Carboxylgruppen der Glutaminsäuren und Asparaginsäuren in PPAR- $\beta/\delta$ , als auch der Carbonsäuren der PPAR- $\beta/\delta$ -Agonisten GW0742 und GW1516, wurde das Kopplungsreagenz DMTMM zugesetzt. DMTMM reagiert mit Carboxylgruppen zu einem Intermediat, welches reaktiver als die reine Carbonsäure für nukleophile Angriffe ist. DMTMM wurde in verschiedenen Konzentrationen (500  $\mu$ M, 1 mM, 4,3 mM und 43 mM) zur PPAR- $\beta/\delta$ -LBD hinzugegeben. Zu DMTMM wurde das Quervernetzungsreagenz SDH-*D*<sub>0</sub>/*D*<sub>12</sub> in 100- oder 200-fachem Überschuss im Verhältnis zum Protein zugesetzt. Dieses sollte die durch DMTMM aktivierten Carboxylgruppen miteinander vernetzen (Abbildung 21). Nach zweistündiger Reaktion auf Eis wurden die Proben unmittelbar mit Laemmli-Puffer gemischt und mittels eindimensionaler

Gelelektrophorese (3.3.1) wurden die Proteine getrennt. Entsprechende Gelbanden wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mit Trypsin überführt.

#### **3.4.2.3. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz DMTMM**

Wie unter 3.4.2.2 beschrieben, aktiviert DMTMM Carboxylgruppen über die Bildung eines Intermediates für einen nukleophilen Angriff. Im physiologischen pH-Bereich können die Aminogruppen der Lysine und des *N*-Terminus des Proteins als Elektronendonatoren fungieren und das durch DMTMM entstandene Intermediat nukleophil angreifen (Abbildung 25). Die LBD des PPAR- $\beta/\delta$  wurde wie unter 3.4.2.1 mit den Agonisten GW0742 und GW1516 versetzt und inkubiert. Anschließend wurde das Kopplungsreagenz DMTMM in 8000-fachen molaren Überschuss hinzugegeben und für 2 h auf Eis inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit Laemmli-Puffer gemischt und mittels eindimensionaler Gelelektrophorese analysiert (3.3.1). Gelbanden der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurden ausgeschnitten und einer tryptischen *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) unterzogen.

#### **3.4.2.4. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionellem Reagenz**

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde mit dem heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenz Sulfo-SDA versetzt (Abbildung 22). Wie unter 3.4.1.1 für die LBD von PPAR- $\alpha$  beschrieben, wurde eine zweistufige Reaktion durchgeführt. Nach dem ersten Reaktionsschritt und dem Abstoppen der Reaktion durch  $\text{NH}_4\text{CO}_3$ -Lösung wurden die Agonisten GW0742 oder GW1516 (Abbildung 29) im 20-fachen molaren Überschuss zur PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gegeben und für 30 min auf dem Eis inkubiert. Nach UV-A-Bestrahlung mit  $8 \text{ J/cm}^2$  und anschließender Analyse mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (3.3.2) wurden die Gelbanden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mit Trypsin unterzogen.

#### **3.4.2.5. Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD**

Nach Spaltung des Fusionsproteins mittels TEV-Protease wurden die die Photoamino-säure Bpa-enthaltenden PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten mit Strep-tag-Lösung A auf eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  verdünnt. Die Agonisten GW0742 und GW1516 (Abbildung 29) wurden in DMSO in 20 bis 25-fachem Überschuss zum Protein gegeben

und für 30 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Probe mit reinem DMSO ohne Zugabe von Ligand mitgeführt. Die Proben wurden anschließend auf Eis mit UV-A-Licht (8 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt, um die photoaktivierbare Aminosäure zur Reaktion zu bringen. Nach UV-A-Bestrahlung wurden die Proben mittels eindimensionaler Gelelektrophorese (3.3.1) getrennt, nach der Färbung der Gele wurden die Gelbanden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mittels Trypsin oder einer Mischung aus Trypsin und GluC unterzogen.

### **3.5. Massenspektrometrische Methoden**

#### **3.5.1. Probenvorbereitung**

Die Analytlösungen aus den Quervernetzungsreaktionen (3.4), sowie den *in-Lösung*- (3.3.6) und *in-Gel*-Spaltungen (3.3.7) wurden vor der massenspektrometrischen Analyse, falls nicht anders beschrieben, entsalzt. Dafür wurden 20-40 µl Probenlösung mit TFA-Lösung auf pH 1,5-2 gebracht und anschließend mit ZipTip C4- oder C18-Mikrosäulen nach folgendem Protokoll entsalzt: Die Mikrosäulen wurden mit 50% (v/v) ACN/ Milli-Q-H<sub>2</sub>O angefeuchtet und anschließend mit 0,1% (v/v) TFA-Lösung äquilibriert. Für die Bindung der Peptide oder Proteine wurde die Lösung mindestens zehnmal über die Mikrosäule gegeben. Um restliche Salze zu entfernen, wurden die Mikrosäulen anschließend mit 100 µl 0,1% (v/v) TFA-Lösung gewaschen. Die Proteine oder Peptide wurden mit 20 µl einer 50% (v/v) ACN/ 0,1% (v/v) TFA-Lösung eluiert.

#### **3.5.2. Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie**

5-10 µl Analytlösung, in 1:1 (v/v) Methanol/ 0,1% FA oder wie unter 3.5.1 hergestellt, wurden in Palladium/Gold-beschichtete Borosilikatglasemitter (New Objective) oder selbst hergestellte Gold-beschichtete Borosilikatglasemitter gefüllt. Mittels des LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometers wurden im Positivionenmodus Massenspektren in verschiedenen Massenbereichen bei einer Auflösung von 60.000 bis 100.000 bei *m/z* 400 im Orbitrap-Massenanalysator oder niederaufgelöst in der linearen Ionenfalle aufgenommen. Gegebenenfalls wurden Ionen in der linearen Ionenfalle isoliert und anschließend mittels CID bei variablen normalisierten Kollisionsenergien (bis 35%), fragmentiert. Die entstehenden Fragmentationen wurden abhängig von der absoluten Intensität entweder in der linearen Ionenfalle oder dem Orbitrap-Massenanalysator

analysiert. Hoch abundante Signale (Intensität über  $10^5$ ) wurden im Orbitrap-Massenanalysator und niedrig abundante in der linearen Ionenfalle analysiert.

### 3.5.3. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

1-2  $\mu\text{l}$  Probenlösung (3.5.1) wurden auf einem Stahl- oder *Anchor*-Probenhalter (Bruker Daltonik) pipettiert. Danach wurde die Lösung mit 1  $\mu\text{l}$  Matrixlösung (3.1.10.3) überschichtet. Nach Auskristallisieren der Proben wurden diese mittels des Ultraflex III MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers (Bruker Daltonik) analysiert. Vor der Messung wurde das Gerät mittels *Peptid Calibration Standard II* oder *Protein Calibration Standard II* (Bruker Daltonik) kalibriert. Dabei durfte die Kalibration bei Messungen im linearen Modus nicht über 50 ppm abweichen und im Reflektor-Modus nicht über 3 ppm. Die Kalibranten wurden in unmittelbarer Nähe zu den Analysen pipettiert, um eine korrekte Kalibration sicherzustellen. Je nach Probe wurden bis zu 10000 Laserschüsse addiert. Für die Peptid-Fragment-Fingerprintanalyse wurden Signale isoliert und mittels CID fragmentiert. Die Spektren wurden anschließend manuell ausgewertet oder durch eine Datenbanksuche in der SwissProt-Datenbank analysiert.

### 3.5.4. Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS

Proben der *in-Lösungs-* (3.3.6) oder *in-Gel-Spaltung* (3.3.7) wurden mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS (LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer) analysiert. Dabei wurde die Probe (70-140  $\mu\text{l}$ ) mit 20  $\mu\text{l}/\text{min}$  über eine 200  $\mu\text{l}$  Probenschleife auf eine Vorsäule (Acclaim PepMap C18, 100  $\mu\text{m}$  x 20 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) mit Fließmittel A (3.1.12.2) gegeben. Die Peptide wurden an die Vorsäule gebunden und Salze, wurden durch 15-minütiges Waschen mit Fließmittel C (3.1.12.2) entfernt. Anschließend wurden die gebundenen Peptide eluiert und mittels einer Trennsäule (Acclaim PepMap C18, 75  $\mu\text{m}$  x 250 mm, 3  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) mit einem linearen Gradienten von 0-40% Fließmittel B (3.1.12.2) mit 300  $\text{nl}/\text{min}$  bei 30  $^{\circ}\text{C}$  Säulentemperatur getrennt. Für die Peptid-Massen-Fingerprintanalyse wurde ein Gradient über 30 min, für Quervernetzungsreaktionen ein Gradient über 90 min verwendet. Anschließend wurde die Trennsäule für 11 min mit 100% Fließmittel B und danach für 15 min mit Fließmittel A gespült. Die Vorläuferionenmassenspektren ( $m/z$  300-2000) wurden ausschließlich im Orbitrap-Massenanalysator bei einer Auflösung von 60.000 bei  $m/z$  400 aufgenommen, um eine eindeutige Identifizierung der Quervernetzungsprodukte zu ermöglichen. Aus jedem

Vorläuferionenmassenspektrum wurden die fünf höchsten Signale in einer „Top5-Methode“ bei einem Isolationsfenster von 2,5 Th isoliert und mittels CID in der linearen Ionenfalle fragmentiert. Die Fragmentationenspektren wurden in der LTQ aufgenommen. Um auch niederabundante Spezies fragmentieren zu können, wurden nach dreimaligen Fragmentieren die jeweiligen Signale auf eine Ausschlussliste für 180 s gesetzt.

Alternativ wurden die Proben mittels des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers analysiert. Die Peptidmischungen (bis 40  $\mu$ l) wurden mit 20  $\mu$ l/min über eine Probenschleife auf eine Vorsäule (Acclaim PepMap C8, 300  $\mu$ m x 5 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) mit Fließmittel D (3.1.12.2) geladen. Um Salze zu entfernen, wurde die Vorsäule 15 min mit Fließmittel F (3.1.12.2) gewaschen. Die gebundenen Peptide wurden eluiert und mittels einer Trennsäule (Acclaim PepMap C18, 75  $\mu$ m x 250 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) mit einem linearen Gradienten von 1-35% Fließmittel E (3.1.12.2) über 90 min mit 300 nl/min getrennt. Anschließend wurde der Gradient innerhalb von 5 min auf 85% Fließmittel E gesetzt und die Säule wurde für 5 min gewaschen. Alle Spektren wurden ausschließlich im Orbitrap-Massenanalysator aufgenommen. Die Vorläuferionen wurden bei einer Auflösung von 120.000 bei  $m/z$  200 in einem Bereich von  $m/z$  300-2000 aufgenommen. Anschließend wurden die intensivitätsstärksten Signale mit einem Isolationsfenster von 2 Th isoliert, in einem Zeitraum von 5 s fragmentiert und die Fragmentationen im Orbitrap-Massenanalysator bei einer Auflösung von 15.000 bei  $m/z$  200 analysiert. Nach zweimaligem Fragmentieren eines Signals wurde dieses für 60 s auf eine Ausschlussliste mit einem Ausschlussfenster von  $\pm 2$  ppm gesetzt. Dadurch wurde ermöglicht, auch niederabundante Spezies zu fragmentieren. Als Fragmentierungstechniken kamen die folgenden Methoden zum Einsatz: CID (35% normalisierte Kollisionsenergie) in der linearen Ionenfalle, Elektronentransferdissoziation (ETD) mittels des Reaktandgases Fluoranthen für 50 ms in der linearen Ionenfalle und höher energetische kollisionsinduzierte Dissoziation (HCD) im *Ionen-Routing Multipole* des Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometers. Bei Verwendung von HCD wurden drei Spektren gemittelt (29% normalisierte Kollisionsenergie  $\pm$  15% gestufte Kollisionsenergie). Bei den Fragmentierungsexperimenten (4.2.7) kamen zusätzlich die beiden kombinierten Fragmentierungstechniken ETciD und EThcD zum Einsatz. Dabei fand als erstes die ETD-Fragmentierung für 50 ms in der linearen Ionenfalle statt und anschließend entweder CID (10% zusätzliche Kollisionsenergie) oder HCD (25% zusätzliche Kollisionsenergie) im *Ion Routing Multipole*. Für Proben mit dem

Quervernetzungsreagenz BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub>/*D*<sub>4</sub> wurde zusätzlich ein ladungsabhängiges Isolations- und Verschiebungsfenster (Tabelle 5) angelegt. Dadurch wurde ermöglicht, in einem Fragmentationenmassenspektrum sowohl die Vorläuferionen von Quervernetzungsprodukten mit BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub> als auch mit BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>4</sub> gleichzeitig zu fragmentieren. Dies vereinfachte die nachfolgende Datenauswertung.

Tabelle 5: Ladungsabhängige Verschiebungs- und Isolationsfenster für die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub>/*D*<sub>4</sub>.

<i>Ladung des Vorläuferions</i>	<i>Differenz des Ladungsabhängiges Verschiebungsfenster [Th]</i>	<i>Breite des Ladungsabhängiges Isolationsfenster [Th]</i>
+2	+1	4
+3	+0,66	3,5
+4	+0,5	3
+5	+0,4	2,5
+6	+0,33	2
+7	+0,28	1,5
+8	+0,25	1

### 3.5.5. Identifizierung der Quervernetzungsprodukte

Um die Quervernetzungsprodukte aus 3.4 sicher identifizieren zu können, wurden die beiden Programme StavroX [208] und MeroX [209] (nur für das spaltbare Urea-Quervernetzungsreagenz; (3.1.14)) verwendet. Aus den Rohdaten wurde mit Hilfe des Proteome Discoverers mgf-(*Mascot generic format*)-Dateien erstellt, welche von den beiden Programmen verwendet wurden. Die experimentell bestimmten Massen wurden mit theoretischen Massen abgeglichen. Alle identifizierten Quervernetzungsprodukte wurden manuell verifiziert. Dabei wurden sowohl die Vorläuferionen- als auch Fragmentationmassenspektren überprüft. Als Kontrolle wurden die Daten mittels der Proteome Discoverer-Software nach potentiellen Verunreinigungen und Falsch-Positiven Treffern in der SwissProt-Datenbank durchsucht. Für das Programm StavroX wurden folgenden Einstellungen für das Suchen nach Quervernetzungsprodukten gewählt: Statische Modifikation: Carbamidomethylierung am Cystein; variable Modifikationen: Oxidation am Methionin (bis zu zweimal), Deamidierung von Glutamin (einmal) und

Asparagin (einmal); für aminreaktive Quervernetzungsreagenzien wurden als Reaktionsstellen Lysine, *N*-Termini, Serine, Threonine und Tyrosine [182] und für photoaktivierbare Aminosäuren alle 20 proteinogene Aminosäuren angenommen. Für carboxylreaktive Quervernetzungsreagenzien wurden die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und die *C*-Termini als mögliche Reaktionsstellen festgelegt. Für EDC und DMTMM wurden als mögliche reaktive Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure, die *C*-Termini, Lysine und die *N*-Termini angenommen. Bei heterobifunktionellen amin-/photoreaktiven Quervernetzungsreagenzien wurden einerseits der *N*-Terminus, Lysin, Threonin, Serin, andererseits alle 20 proteinogenen Aminosäuren festgelegt. Die Massengenauigkeit für die Vorläuferionen wurde auf 3 ppm und für die Fragmentionen auf 10 ppm (Messungen am Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer) bzw. 0,8 Da (Messungen am LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer) gesetzt. Der Massenbereich wurde zwischen 200-8000 Da gewählt. Als Proteasen wurden Trypsin (spaltet *C*-terminal an Lysinen und Argininen) und für die proteolytische Spaltung mit Trypsin/GluC zusätzlich GluC (spaltet *C*-terminal an Glutaminsäure und Asparaginsäure) mit jeweils drei Fehlschnittstellen gewählt. Als mögliche Fragmentionen wurden  $\gamma$ -, *b*- und *a*-Ionen für CID und HCD,  $\gamma$ -, *z*-,  $z'$ -,  $z''$  und *c*-Ionen für ETD angenommen. Für die kombinierten Fragmentierungstechniken EThcD und ETciD wurden die oben genannten Ionen ausgewählt. Für MeroX wurde zusätzlich nach spezifischen Spaltprodukten des Urea-Linkers gesucht. Dabei handelt es sich um Peptidfragmente mit  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu)- bzw. einer Isocyano- $\gamma$ -Aminobuttersäure (BuUr)-Modifikation (Abbildung 20) (1.3.1.1).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Strukturuntersuchungen an der PPAR- $\alpha$ -LBD

In dieser Arbeit sollten mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie die Strukturänderungen der PPAR- $\alpha$ -LBD vor und nach Ligandenbindung im physiologischen pH-Bereich untersucht werden.

#### 4.1.1. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenzien

Die optimalen Bedingungen für die Expression und Reinigung der PPAR- $\alpha$ -LBD in *E.coli* waren bereits in vorangegangenen Studien etabliert worden [210]. Daher konnte die PPAR- $\alpha$ -LBD in Quervernetzungsstudien für Konformationsuntersuchungen nach Ligandenbindung eingesetzt werden. Die PPAR- $\alpha$ -LBD wurde, wie unter 3.4.1.1 beschrieben, mit dem heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenz SBC in einer zweistufigen Reaktion bei pH 8 mit und ohne Liganden vernetzt (Abbildung 30).

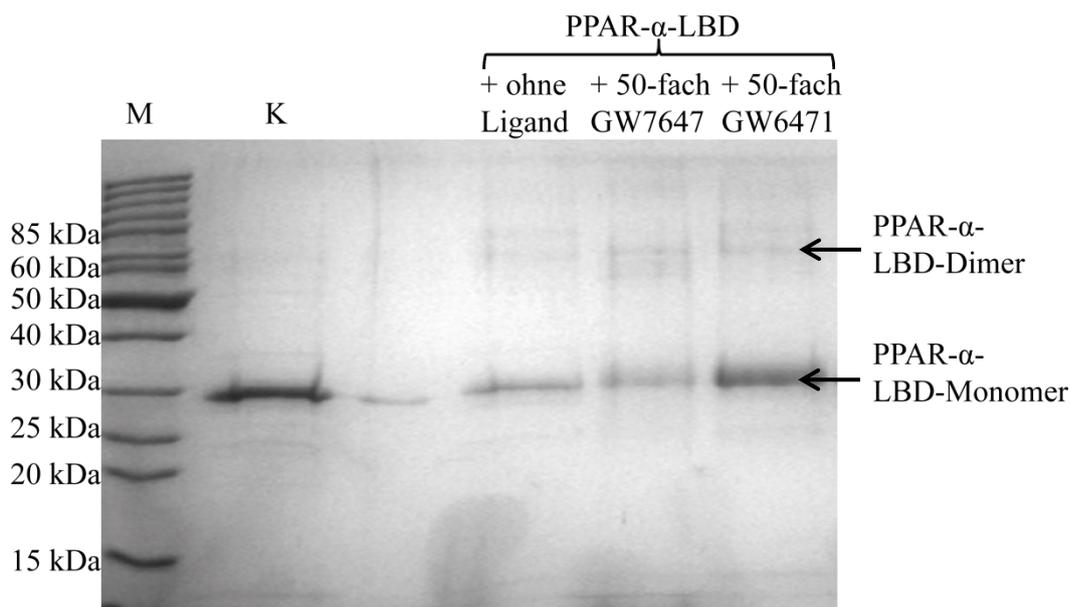


Abbildung 30: SDS-PAGE (12%) der mit SBC quervernetzten PPAR- $\alpha$ -LBD. M= Proteinmarker; K= Kontrolle ohne Quervernetzungsreagenz und Ligand.

Anhand der SDS-PAGE-Analyse (3.3.2) ist ersichtlich, dass es in der zweistufigen Reaktion zum Teil zu Proteinverlusten kam. Da die PPAR- $\alpha$ -LBD Homodimere bildet (4.1.5) wurde auf eine *in-Lösung*-Spaltung (3.3.6) verzichtet, entsprechende Monomerbanden ausgeschnitten und mit Trypsin einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) unterzogen. Nach Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Analyse und

Auswertung der Daten mit der StavroX-Software konnten keine Quervernetzungsprodukte identifiziert werden.

#### 4.1.2. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit den Kopplungsreagenzien EDC und Sulfo-NHS

Die PPAR- $\alpha$ -LBD (5  $\mu$ M) wurde mit dem Kopplungsreagenz EDC bei pH 8 mit Hilfe von Sulfo-NHS vernetzt. Dadurch sollten Konformationsänderungen über benachbarte Aminosäurereste vor und nach der Ligandenbindung verfolgt werden. Im Vorfeld wurden die optimale Reaktionszeit und molaren Überschüsse von EDC und Sulfo-NHS etabliert. Dafür wurden EDC und Sulfo-NHS bei Raumtemperatur in 250-2000-fachen molaren Überschüssen zur PPAR- $\alpha$ -LBD zugegeben. Die Reaktionszeiten variierten zwischen 10-30 Minuten. Nach Abstoppen der Reaktion und anschließender SDS-PAGE-Analyse (3.3.2) wurden die optimalen Bedingungen auf eine Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur festgelegt. Als molare Überschüsse wurde ein 500-facher Überschuss an EDC und 250-facher Überschuss an Sulfo-NHS als am optimalsten geeignet festgestellt. Anschließend wurde die PPAR- $\alpha$ -LBD, wie unter 3.4.1.2 beschrieben, mit den Liganden MD78 und GW7647 versetzt und inkubiert. Danach wurde die Quervernetzungsreaktion mit optimierten molaren Überschüssen an EDC und Sulfo-NHS und optimierter Reaktionszeit durchgeführt.

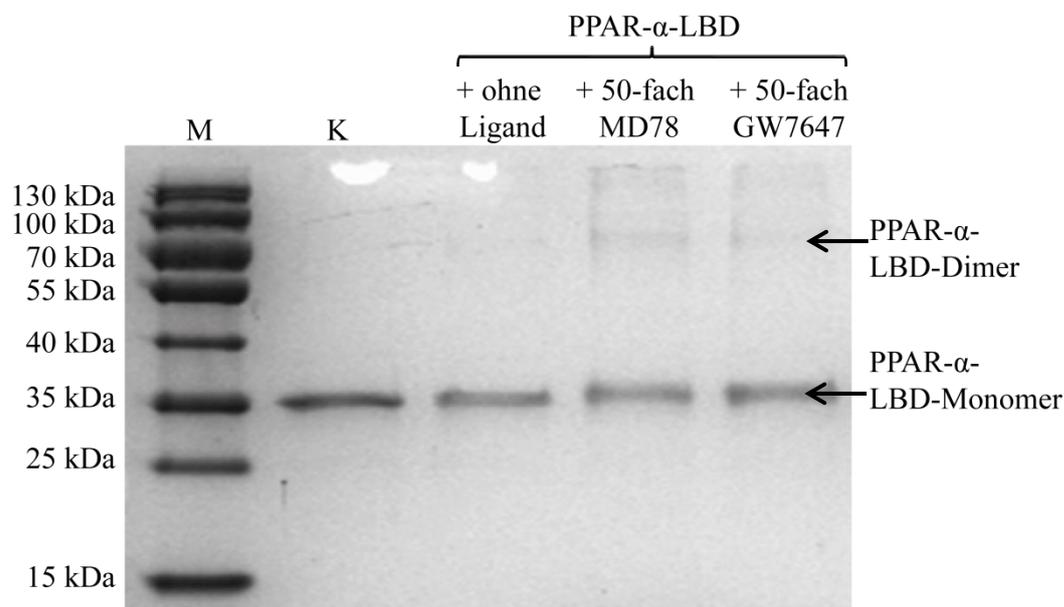


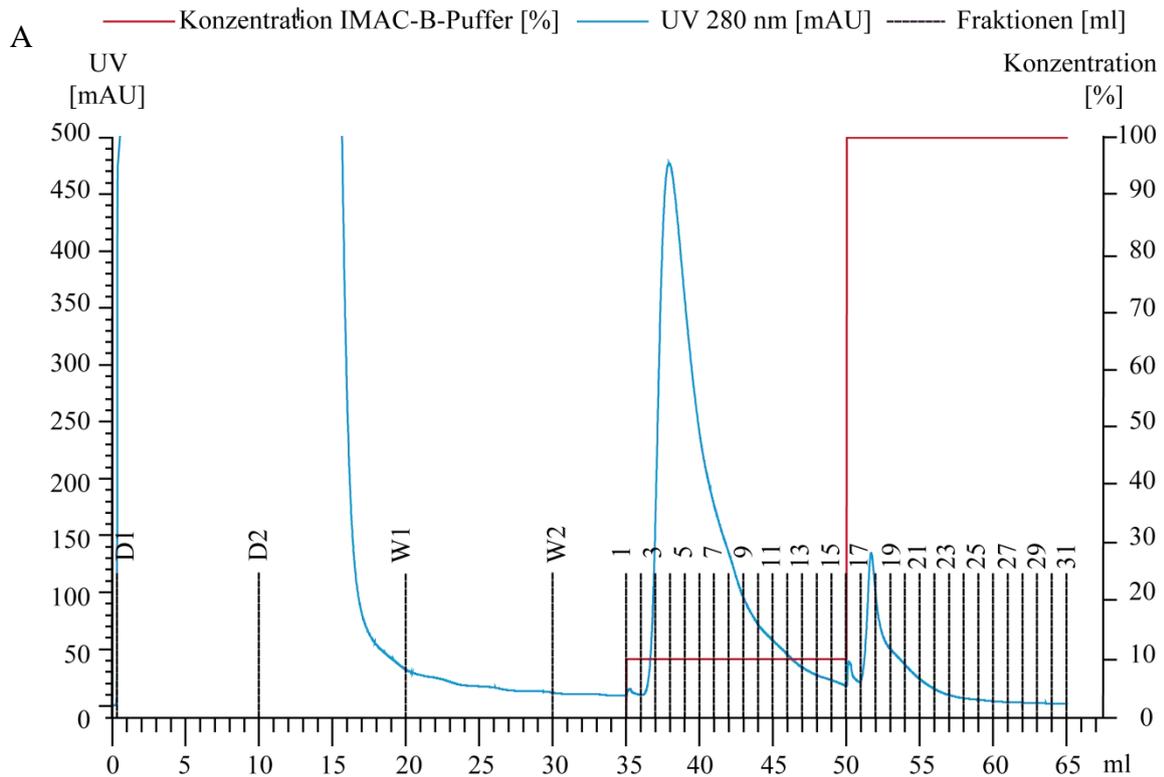
Abbildung 31: SDS-PAGE (12%) der Quervernetzungsreaktion von PPAR- $\alpha$ -LBD mit EDC/Sulfo-NHS bei einer Reaktionszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur. M= Proteinmarker; K= Kontrolle ohne Quervernetzungsreagenz und Ligand.

Die leicht verschmierten Banden der PPAR- $\alpha$ -LBD und das Auftauchen des PPAR- $\alpha$ -LBD-Homodimers zeigten den Erfolg der Quervernetzungsreaktion (Abbildung 31). Die Banden des Dimers und Monomers wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mit Trypsin unterzogen, gefolgt von einer Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS-Analyse (3.5.4). In den Banden des Dimers konnten keine Quervernetzungsprodukte mit sequenzgleichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptiden gefunden werden, die nur aus dem Homodimer stammen können. Andere Quervernetzungsprodukte in der Dimerbande sind nicht aussagekräftig, da sie sowohl vom Dimer als auch Monomer herrühren könnten. In der Monomerbande konnten nur Quervernetzungsprodukte identifiziert werden, die isobar zu linearen, nicht vernetzten Peptiden der PPAR- $\alpha$ -LBD sind. Grund dafür ist, dass bei der Vernetzung mit EDC die Peptide unter einem Wasserverlust verknüpft werden, aber jeweils zwei *N*- und *C*-Termini besitzen. Damit sind die Quervernetzungsprodukte und lineare Peptide mit denselben Sequenzen isobar. Eine eindeutige Identifizierung der Quervernetzungsprodukte war somit nicht möglich.

#### **4.1.3. Expression und Reinigung der Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD**

Zusätzlich waren im Rahmen vorangegangener Arbeiten die photoaktivierbaren Varianten L258Bpa und L460Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD erfolgreich exprimiert worden, allerdings in geringen Ausbeuten [210]. Um die Ausbeuten zu verbessern, sollten für *E.coli*-Codon optimierte Plasmide eingesetzt werden. Darüber hinaus sollten weitere Bpa-Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD hergestellt werden. Es wurden drei *E.coli*-Codon optimierte Plasmide eingesetzt (3.1.8.1). Durch das Plasmid pET28a-Variante1 sollte ein Austausch von Phe-273 zu Bpa stattfinden. Die Plasmide pET28a-Variante2 (L258Bpa) und pET28a-Variante3 (L460Bpa) sollten dabei zu größeren Ausbeuten an löslichem Protein als in den vorangegangenen Arbeiten führen. Alle Plasmide wurden in *E.coli* BL21(DE3)-Zellen transformiert, die das Plasmid pEvol-pBpf (3.2.8) enthielten. Die Reinigung der photoaktivierbaren Bpa-Varianten wurde analog zur Reinigung der PPAR- $\alpha$ -LBD durchgeführt (3.3.4.1). Die Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD wurde über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (Abbildung 32) und nachfolgender Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 33) als reines Protein (35 kDa) erhalten. Analog dazu wurde die Variante F273Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD gereinigt. Die Variante L460Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD konnte hingegen nicht erfolgreich exprimiert und gereinigt

werden. Mit den beiden erfolgreich gereinigten Varianten L258Bpa und F273Bpa wurden anschließend Photoaffinitätsmarkierungsstudien durchgeführt.



B

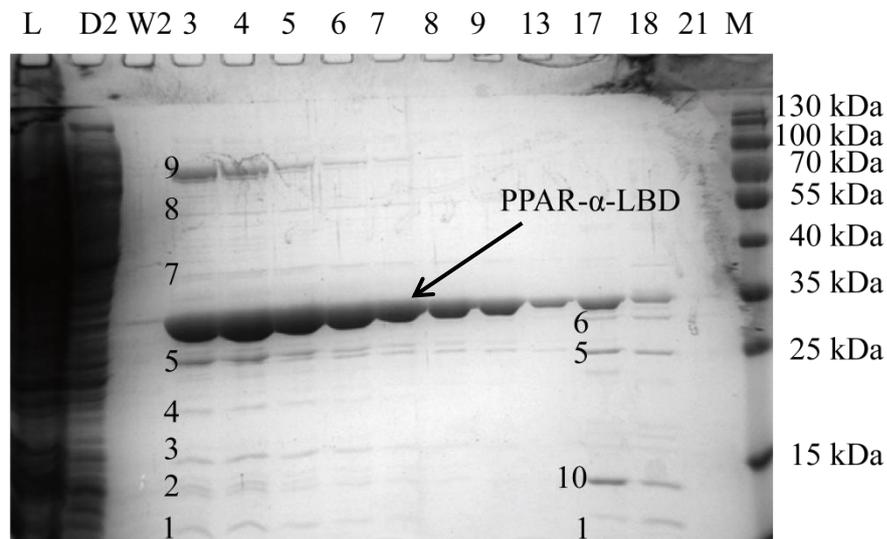


Abbildung 32: Nickel-Affinitätsreinigung der Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD. Signale aus dem Chromatogramm (UV: 280 nm) der Nickel-Affinitätsreinigung (A) wurden mittels SDS-PAGE (12%) (B) analysiert. L= Ladefraktion; D= Durchfluss; W= Waschfraktion; 1-31= Elutionsfraktionen; M= Proteinmarker. Die einzelnen Gelbanden (1-10) wurden mittels LC/MS/MS analysiert (Tabelle A 1).

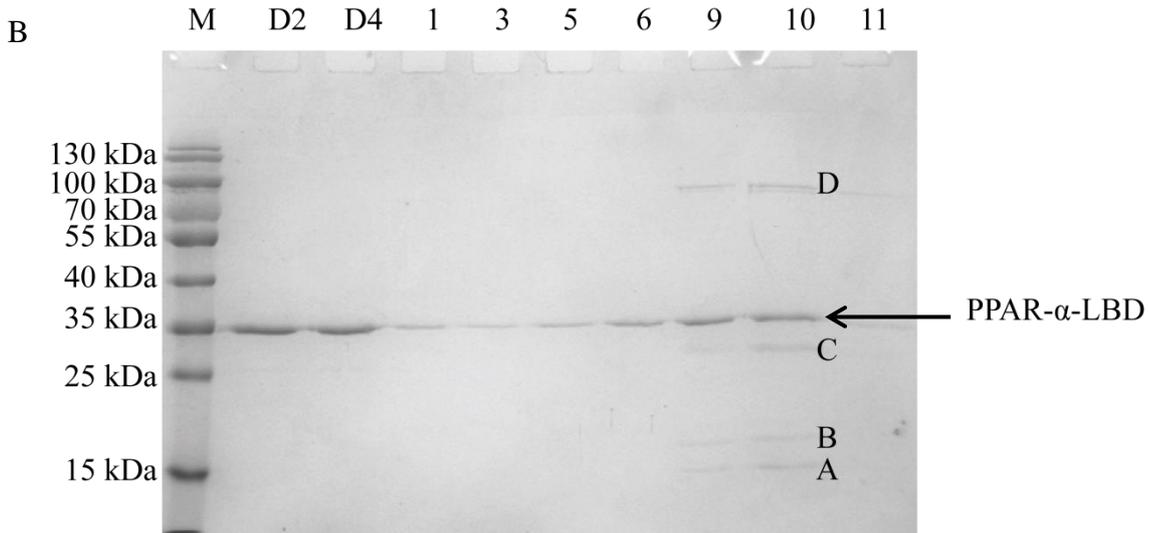
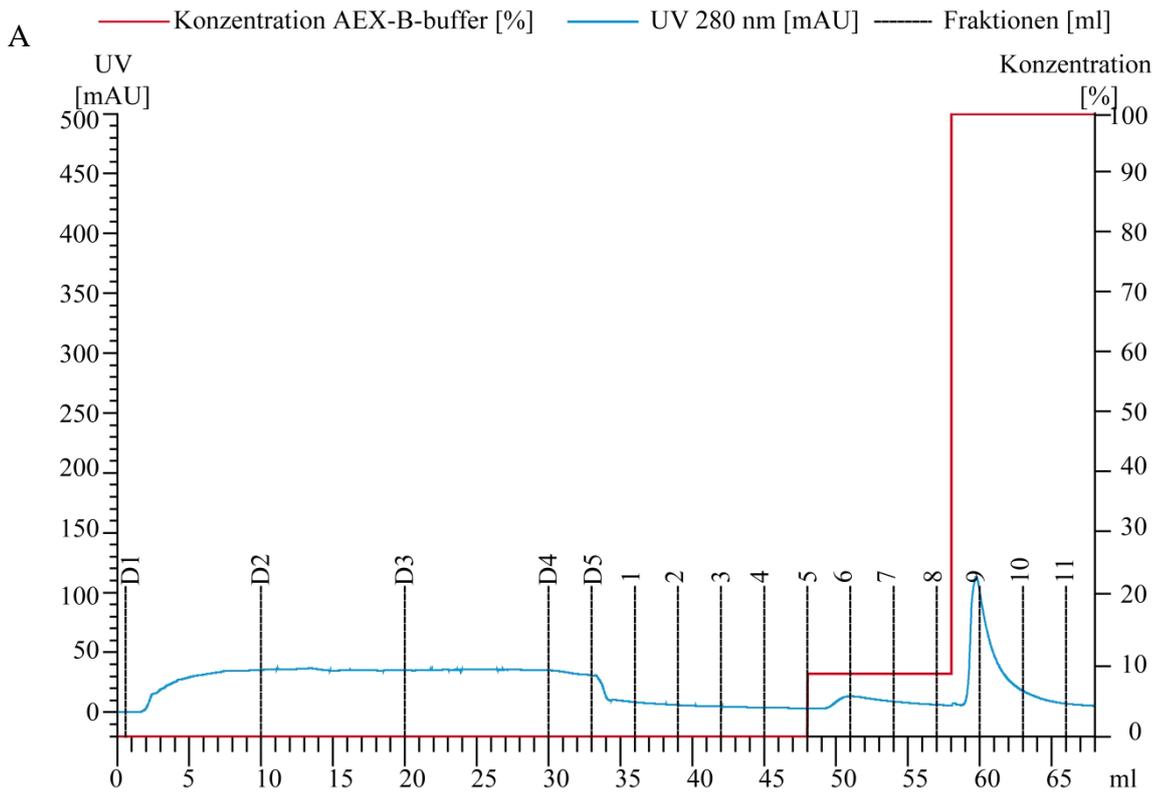


Abbildung 33: Anionenaustauschchromatographie der Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD. Signale aus dem Chromatogramm (UV: 280 nm) der Anionenaustauschchromatographie (A) wurden mittels SDS-PAGE (12%) (B) analysiert. D= Durchfluss; 1-11= Elutionsfraktionen; M= Proteinmarker. Die einzelnen Gelbanden (A-D) wurden mittels LC/MS/MS analysiert (Tabelle A 1).

Neben der photoaktivierbaren Aminosäure Bpa sollten zudem die Aminosäuren Leu-258 und Phe-273 gegen die Diazirin-haltige Aminosäure TfmdF ausgetauscht werden. Die

beiden Varianten L258TfmdF und F273TfmdF der PPAR- $\alpha$ -LBD wurden analog zu den Bpa-Varianten in *E.coli* exprimiert (3.3.3) und gereinigt (3.3.4.1). Im Gegensatz zu den Bpa-Varianten war die Ausbeute an TfmdF-Varianten gering (Abbildung 34).

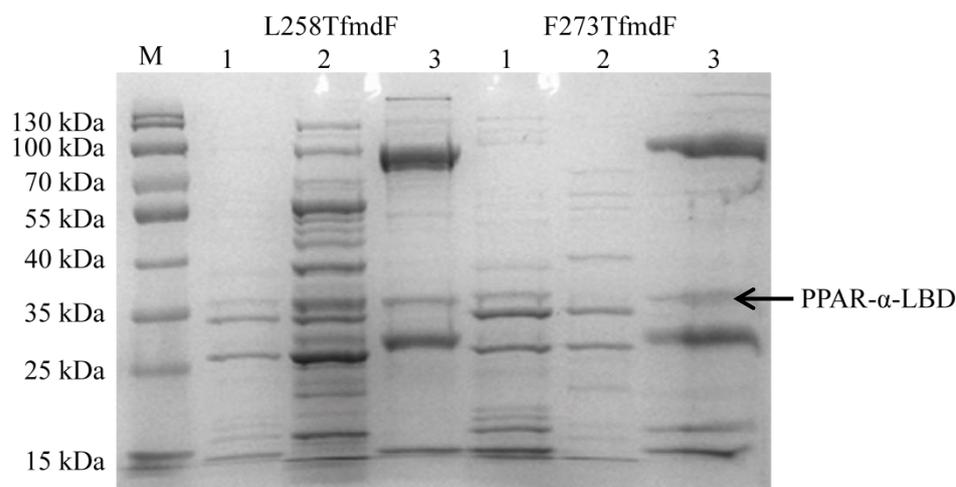


Abbildung 34: SDS-PAGE (12%) der Anionenaustauschchromatographie der PPAR- $\alpha$ -TfmdF-Varianten. M= Proteinmarker; 1= eingegangte Durchflussfraktionen; 2= eingegangte Elutionsfraktionen mit 0-10% AEX-Puffer B; 3= eingegangte Elutionsfraktionen mit 10-100% AEX-Puffer B.

Alle PPAR- $\alpha$ -TfmdF-Varianten enthaltenden Elutionsfraktionen wurden vereint und für Photoaffinitätsmarkierungsstudien eingesetzt (3.4.1.3).

#### 4.1.4. Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -LBD

Wie unter 3.4.1.3 beschrieben, wurden die beiden Varianten L258Bpa und F273Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD mit UV-A-Licht (360 nm) in An- und Abwesenheit der beiden Liganden GW6471 und GW7647 (Abbildung 27) bestrahlt. Monomerbanden der PPAR- $\alpha$ -LBD wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung (3.3.7) mit Trypsin oder einer Mischung aus GluC/Trypsin unterzogen. Die verifizierten Quervernetzungsprodukte wurden mittels PyMOL in die bekannte Struktur der PPAR- $\alpha$ -LBD mit Antagonist GW6471 (PDB-Eintrag: 1KKQ) eingetragen (Abbildungen 35 und 36), um die Konformationsänderung nach Ligandenbindung nachzuvollziehen.

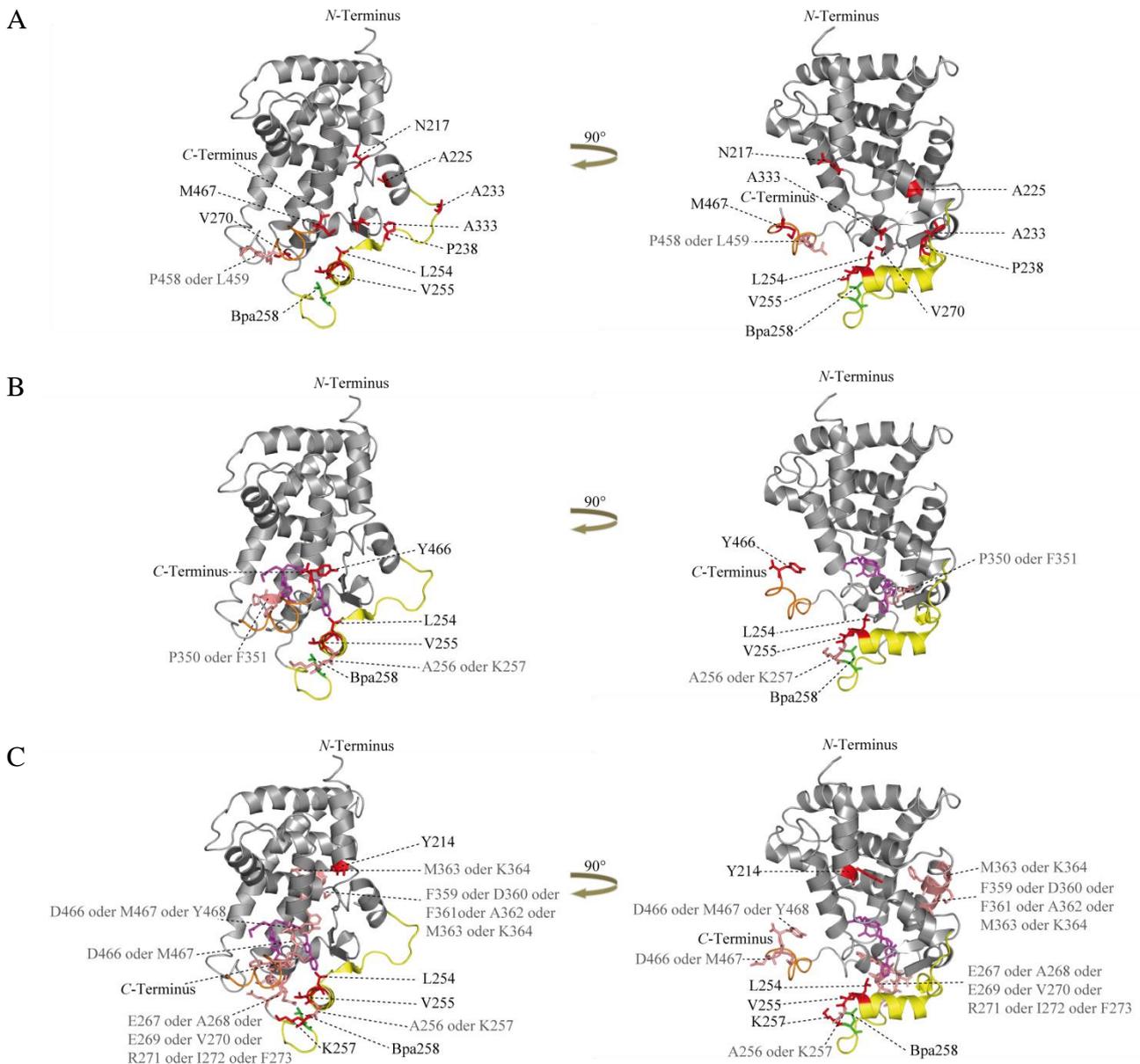


Abbildung 35: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\alpha$ -LBD, Variante L258Bpa. Die quervernetzten Aminosäuren wurden in die Röntgenkristallstruktur (PDB-Eintrag: 1KKQ) eingetragen. Mit Bpa quervernetzte Aminosäuren im ligandenfreien (A), mit GW7647- (B) und GW6471-gebundenen (C) Zustand sind annotiert. Die  $\Omega$ -Schleife ist in gelb, der Antagonist GW6471 in magenta, die AF2 in orange dargestellt. Die eindeutig identifizierten Quervernetzungsstellen sind rot und die Quervernetzungsregionen lachsfarben markiert. Die nicht eindeutig anhand der Fragmentationsspektren zugeordneten Quervernetzungsstellen sind in grau dargestellt.

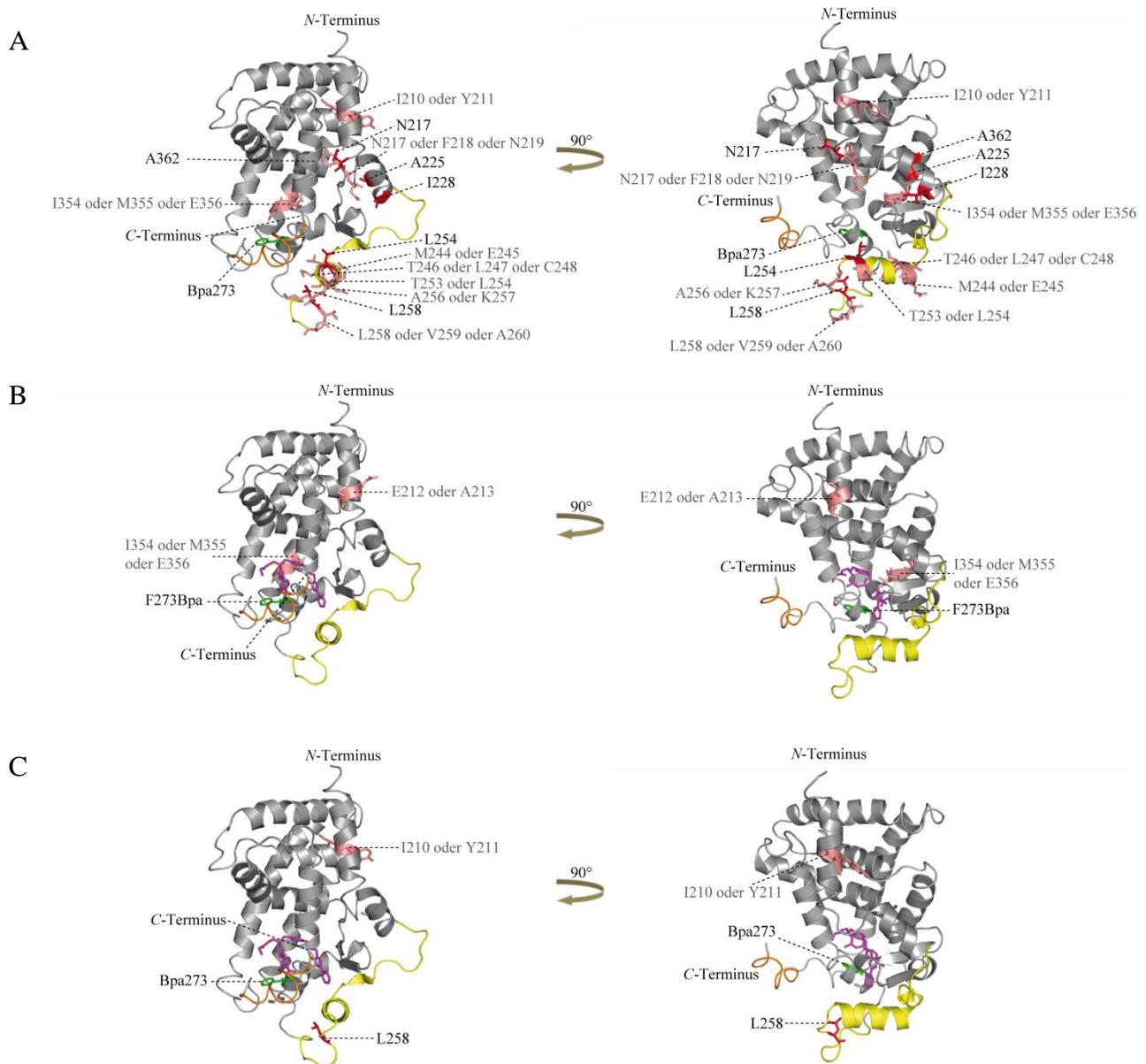


Abbildung 36: Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\alpha$ -LBD, Variante F273Bpa. Die quervernetzten Aminosäuren wurden in die Röntgenkristallstruktur (PDB-Eintrag: 1KKQ) eingetragen. Mit Bpa quervernetzte Aminosäuren im ligandenfreien (A), mit GW7647- (B) und GW6471-gebundenen (C) Zustand sind annotiert. Die  $\Omega$ -Schleufe ist in gelb, der Antagonist GW6471 in magenta, die AF2 in orange dargestellt. Die eindeutig identifizierten Quervernetzungsstellen sind rot und die Quervernetzungsregionen lachsfarben markiert. Die nicht eindeutig anhand der Fragmentationsspektren zugeordneten Quervernetzungsstellen sind in grau dargestellt.

So konnte eine Quervernetzung von Bpa-258 sowohl zu Pro-238 als auch zu Ala-233 anhand eines Fragmentationmassenspektrums identifiziert werden (Abbildung 37).

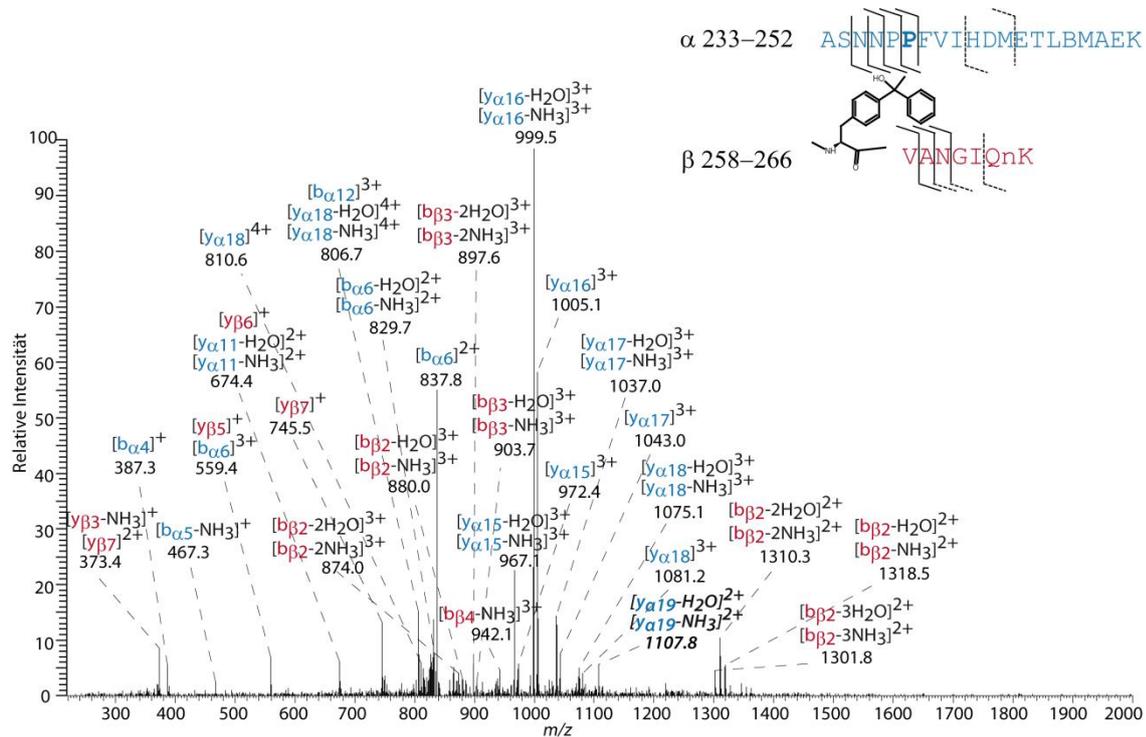


Abbildung 37: Fragmentationmassenspektrum eines 4+ geladenen Vorläuferions bei  $m/z$  850.402 eines Quervernetzungsproduktes in der PPAR- $\alpha$ -LBD (ohne Ligand), Variante L258Bpa; n= deamidiertes Asparagin; B= carbamidomethyliertes Cystein; Quervernetzungsstelle Pro-238 ist in fett und das zusätzliche Signal  $[y_{\alpha 19}$ -Ion] für die Quervernetzung zu Ala-233 ist kursiv gedruckt.

Dabei konnte die Quervernetzung zu Pro-238 anhand eines zweifach geladenen  $b_{\alpha 6}$ -Ion bei  $m/z$  837,8 und eines dreifach geladenen  $y_{\alpha 15}$ -Ion bei  $m/z$  972,4 identifiziert werden. Im selben Fragmentationmassenspektrum konnte Ala-233 anhand eines zweifach geladenen  $y_{\alpha 19}-H_2O/NH_3$ -Ion bei  $m/z$  1107,8 als Quervernetzungsstelle identifiziert werden. Insgesamt wurde eine Vielzahl an Quervernetzungsprodukten in ligandenfreiem und ligandengebundenem Zustand identifiziert (Tabellen 6, A 2 und A 3).

Tabelle 6: Zusammenfassung der gefundenen Quervernetzungsstellen der beiden PPAR- $\alpha$ -LBD-Varianten L258Bpa und F273Bpa. Wenn die Quervernetzungsstelle nicht eindeutig identifiziert werden konnte, sind mehrere Aminosäuren angegeben.

<i>PPAR-<math>\alpha</math>-LBD-L258Bpa</i>			<i>PPAR-<math>\alpha</math>-LBD-F273Bpa</i>		
<i>mit Agonist</i>	<i>mit Antagonist</i>	<i>ohne Liganden</i>	<i>mit Agonist</i>	<i>mit Antagonist</i>	<i>ohne Liganden</i>
<i>GW7647</i>	<i>GW6471</i>		<i>GW7647</i>	<i>GW6471</i>	
L254	Y214	N217	E212/A213	I210/Y211	I210/Y211
V255	L254	A225	I354/M355/ E356	L258	N217
A256/K257	V255	A233			N217/F218/N219
P350/F351	A256/K257	P238			A225
Y468	K257	L254			I228
E471	E267/A268/ E269/V270/	V255			M244/E245
H477	R271/I272/ F273	V270			T246/L247/ C248
		A333			
	F359/D360/ F361/A362/M363/K364	P458/L459			T253/L254
		M467			L254
	M363/K364	H475			A256/K257
	D466/M467	H477			L258
	D466/M467/Y468				L258/V259/A256
					60
					I354/M355/ E356
					A362

Da nicht auszuschließen war, dass die photoaktivierbare Aminosäure Bpa neben den Aminosäuren im Protein ebenfalls mit den Liganden reagieren könnte, wurden die beiden Bpa-Varianten nach dem Bestrahlen mit 8 J/cm<sup>2</sup> mittels MALDI-TOF-MS (3.5.3) in An- und Abwesenheit der Liganden analysiert. Durch eine Massenverschiebung von  $\approx m/z$  500, welche der Masse des Liganden GW7647 (Molekulargewicht: 502,75 g/mol) entspricht, wurde die Bindung des Agonisten GW7647 an die PPAR- $\alpha$ -LBD der beiden Varianten bestätigt. Jedoch konnte dies nicht für den Antagonisten GW6471 gezeigt werden (Abbildung 38). Es wurden auch das Protein *Catabolite gene activator* (23,6 kDa) und Abbauprodukte der beiden Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD identifiziert.

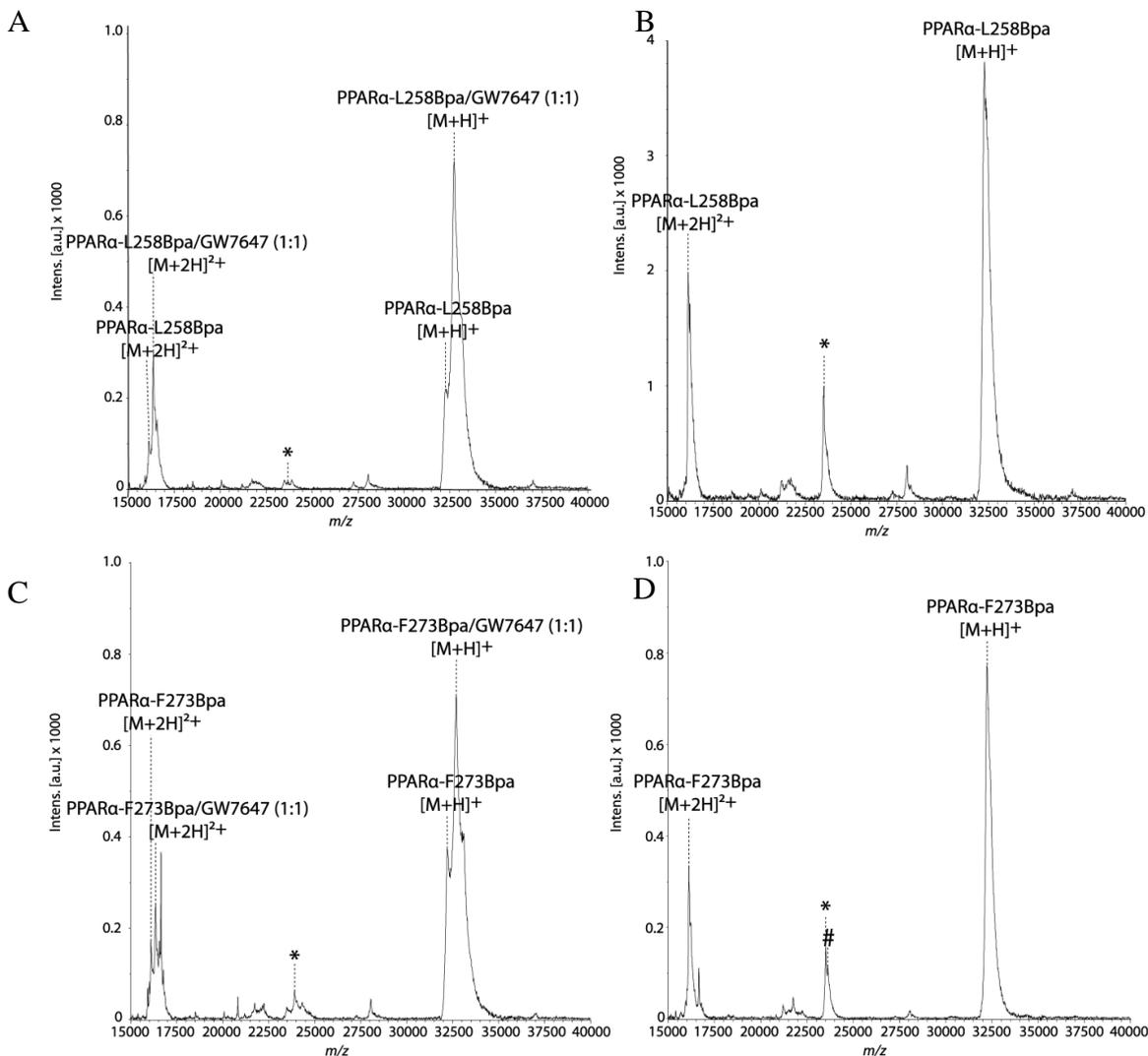


Abbildung 38: MALDI-TOF-Massenspektren der Bpa-Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD. Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD mit Agonist GW7647 (A), mit Antagonist GW6471 (B). Variante F273Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD mit Agonist GW7647 (C), mit Antagonist GW6471 (D). Der *Catabolite gene activator* ist als # und das Abbauprodukt der PPAR- $\alpha$ -LBD als \* dargestellt.

Als zweite photoaktivierbare Aminosäure sollte die Diazirin-enthaltende Aminosäure TfmdF analog zu dem Benzophenon Bpa in die PPAR- $\alpha$ -LBD eingebaut werden. Dabei wurden die PPAR- $\alpha$ -LBD-Varianten L258TfmdF und F273TfmdF in *E.coli* exprimiert und gereinigt (3.3.4.1 und 4.1.3). Obwohl kein sauberes Protein erhalten werden konnte, wurden Photoaffinitätsmarkierungsstudien durchgeführt. Dabei wurden beide Varianten in Abwesenheit und Anwesenheit der Liganden GW6471, GW7647 und Fenofibrat mit 8 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt (3.4.1.3). Nach der SDS-PAGE-Analyse (3.3.2) wurden Banden in Höhe des Monomers bei 35 kDa ausgeschnitten (Abbildung 39) und einer *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin unterzogen.

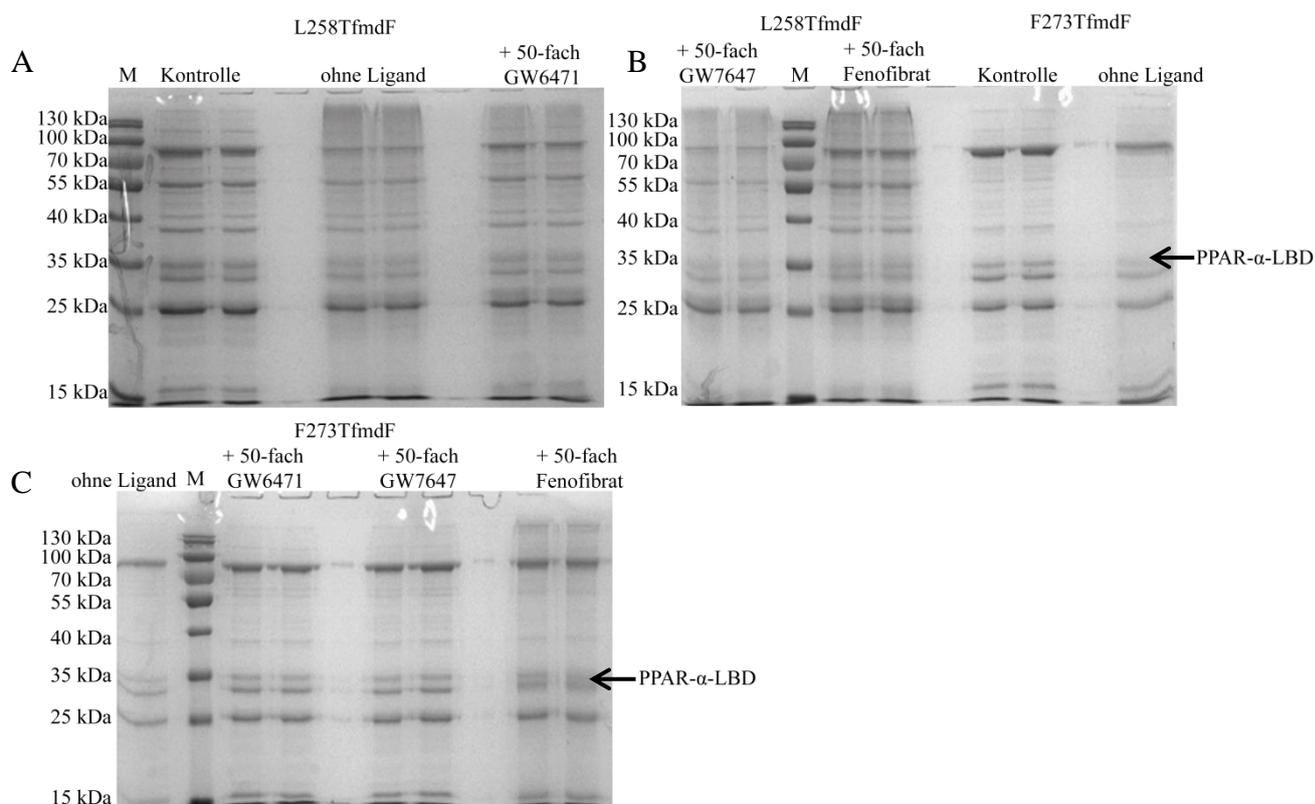


Abbildung 39: SDS-PAGE (12%) der Photoaffinitätsmarkierungsstudien (8 J/cm<sup>2</sup>) der beiden TfmdF-Varianten L258TfmdF (A und B) und F273TfmdF (B und C) der PPAR- $\alpha$ -LBD in An- und Abwesenheit der Liganden GW6471, GW7647 und Fenofibrat; M= Proteinmarker.

Die Nano-HPLC/Nano-ESI-Orbitrap-MS/MS-Analyse ergab keine Quervernetzungsprodukte. Der Einbau des TfmdF konnte nachgewiesen werden, jedoch war selbst in den nicht UV-bestrahlten Banden der Stickstoffverlust des Diazirins sichtbar. Ebenfalls konnte mittels MS/MS vor der Bestrahlung das Reaktionsprodukt

des Carbens mit Wasser identifiziert werden. Aufgrund der vielversprechenderen Bpa-Daten wurde in dieser Arbeit auf weiterführende Experimente mit TfmdF verzichtet.

#### 4.1.5. Untersuchung der Dimersisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD

Anhand der Quervernetzungs- und Photoaffinitätsmarkierungsstudien der PPAR- $\alpha$ -LBD wurde mittels SDS-PAGE-Analyse eine weitere Bande in der Höhe von 60-80 kDa nachgewiesen. Nach Ausschneiden dieser Bande und *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin mit nachfolgender Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Analyse wurde die PPAR- $\alpha$ -LBD eindeutig nachgewiesen. Um die Dimerbildung der PPAR- $\alpha$ -LBD zu bestätigen, wurden die Varianten L258Bpa und F273Bpa in An- und Abwesenheit des Antagonisten GW6471 mit UV-A-Strahlung (4-16 J/cm<sup>2</sup>) behandelt. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels SDS-PAGE-Analyse getrennt (Abbildung 40).

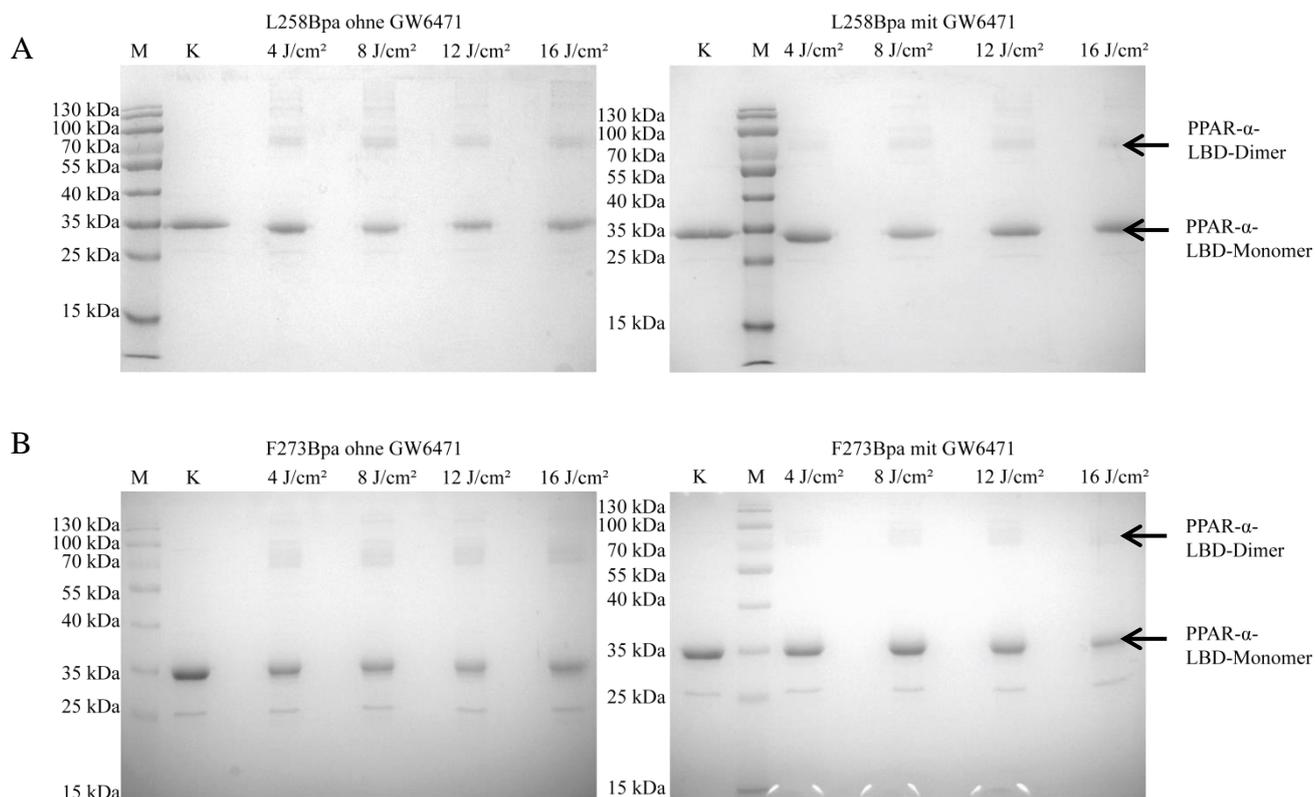


Abbildung 40: SDS-PAGE (12%) der Photoaffinitätsmarkierungsstudie der Varianten L258Bpa (A) und F273Bpa (B) der PPAR- $\alpha$ -LBD in An- und Abwesenheit des Antagonisten GW6471.

Das Homodimer der PPAR- $\alpha$ -LBD war schon ab einer UV-Bestrahlung von 4 J/cm<sup>2</sup> (ohne Ligand) und ab 8 J/cm<sup>2</sup> (mit Ligand) sichtbar. Um die Dimerisierung weiter zu studieren, wurde die PPAR- $\alpha$ -LBD ohne vorherige Quervernetzung mittels

Größenausschlusschromatographie untersucht und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Zur Ermittlung der molekularen Masse wurde eine Kalibriergerade mit Standardproteinen (Tabelle 7) erstellt (Abbildung 41).

Tabelle 7: Molekulargewichte und Konzentrationen der Proteine für die Kalibriergerade (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg-Säule).

Protein	Molekulargewicht [Da]	Konzentration für Kalibrierung [ $\mu\text{M}$ ]
Ribonuclease A	13700	79,4
Chymotrypsinogen A	25000	14,8
Ovalbumin	43000	23,3
BSA	66400	17,5

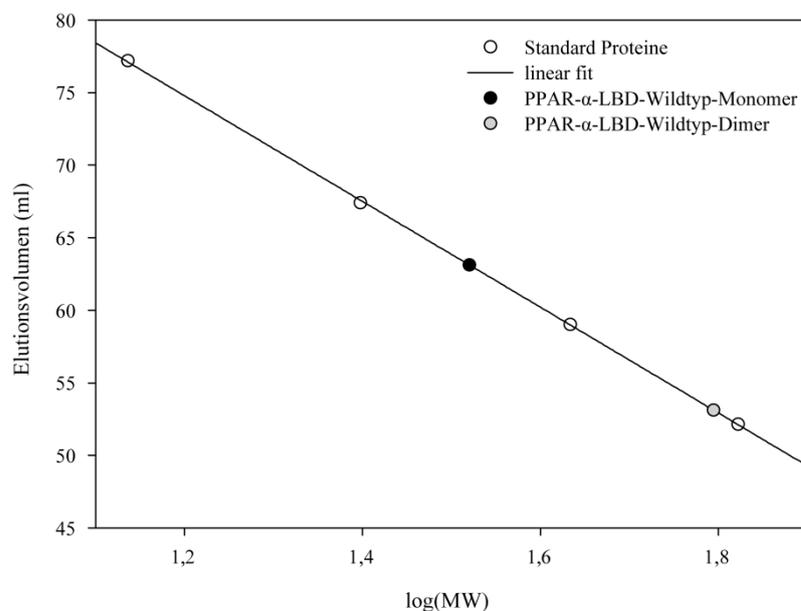


Abbildung 41: Kalibriergerade für die Größenausschlusschromatographie (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg-Säule) mit den Proteinen (Tabelle 7).

Dadurch ließen sich Rückschlüsse aus dem Chromatogramm auf die Stokes-Radien und damit auf die Molekulargewichte der eluierten Proteine schließen. Aus den SDS-Gelen der Elutionsfraktionen aus der Größenausschlusschromatographie ist ersichtlich, dass die PPAR- $\alpha$ -LBD Homodimere bildet (Abbildung 42). Zur Bestätigung wurden Gelbanden ausgeschnitten und einer tryptischen *in-Gel*-Spaltung unterzogen. In allen Banden konnte die PPAR- $\alpha$ -LBD mittels Peptidmassen-Fingerprint-Analyse durch MALDI-TOF-MS und LC/ESI-MS/MS nachgewiesen werden.

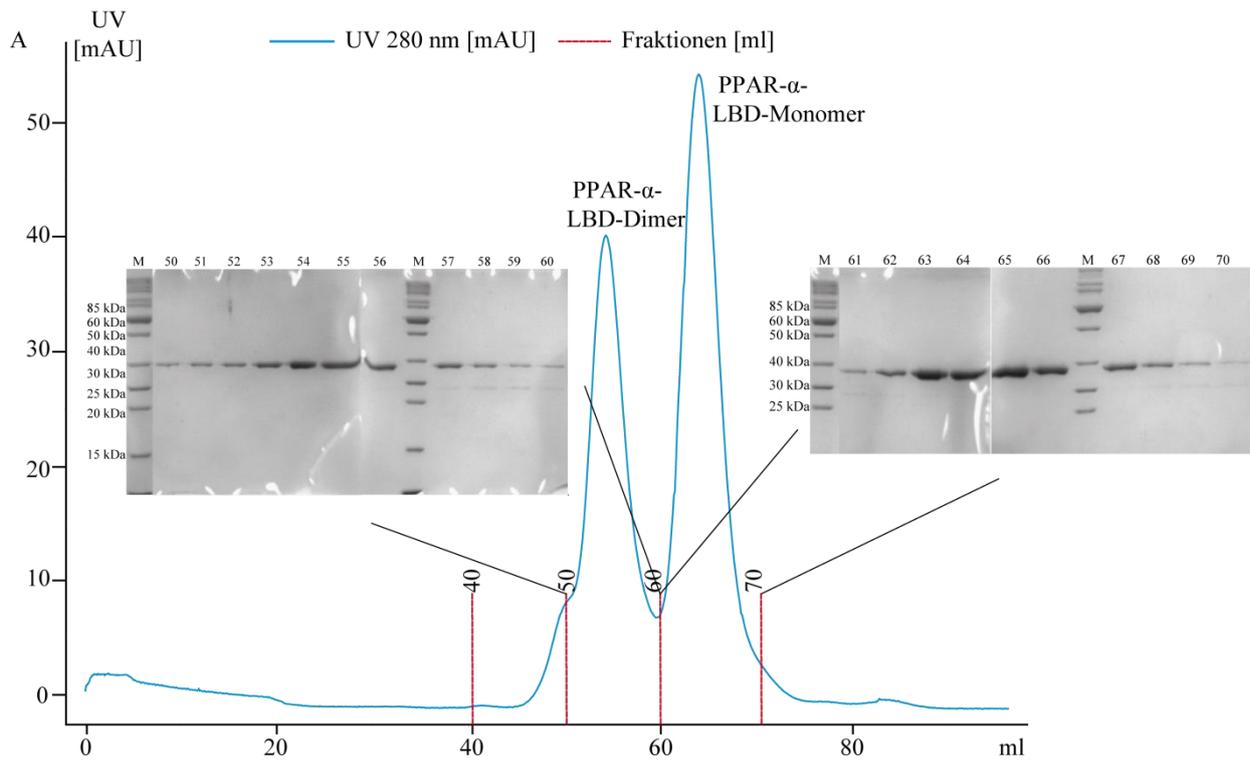


Abbildung 42: Größenausschlusschromatogramm (bei 280 nm) und SDS-Gele (12%) der Größenausschlusschromatographischen Trennung der PPAR- $\alpha$ -LBD. M= Proteinmarker; 50-70= Elutionsfraktionen

Zusätzlich wurde die mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigte Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD mit UV-A-Licht (16 J/cm<sup>2</sup>) bestrahlt. Anschließend wurde das Protein ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie analysiert (Abbildung 43). In der SDS-PAGE-Analyse war das Dimer neben dem Monomer sichtbar (Abbildung 43) und konnte nach einer tryptischen *in-Gel*-Spaltung mittels LC/ESI-MS/MS bestätigt werden. Da das Protein nicht mit stabilen Isotopen (<sup>15</sup>N oder <sup>13</sup>C) markiert worden war, war eine genaue Bestimmung der Quervernetzungsstelle innerhalb des Dimers allerdings nicht möglich.

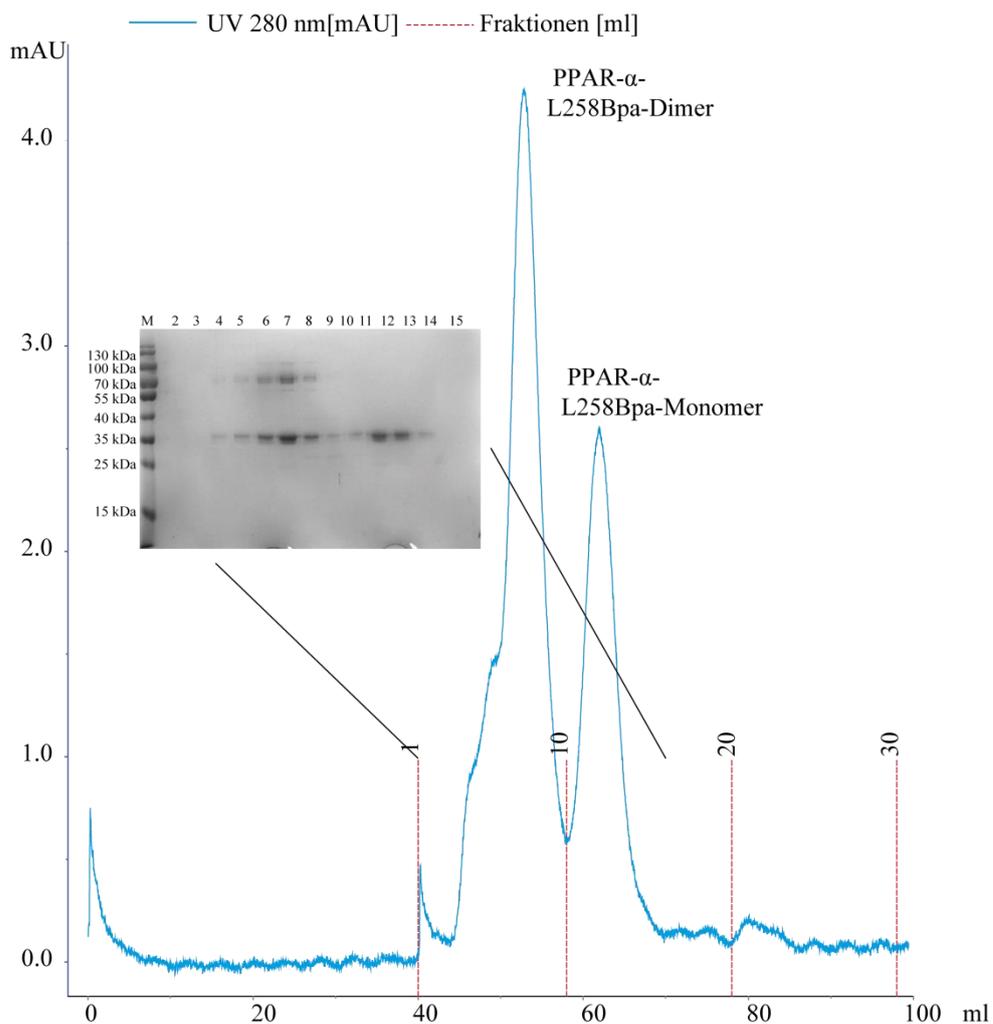


Abbildung 43: Größenausschlusschromatogramm (bei 280 nm) und SDS-Gel (12%) der größenausschlusschromatographischen Trennung der photochemisch vernetzten Variante L258Bpa der PPAR- $\alpha$ -LBD. M= Proteinmarker; 1-30= Elutionsfraktionen

## 4.2. Strukturuntersuchungen an PPAR- $\beta/\delta$

Mittels chemischer Quervernetzung und Massenspektrometrie sollten nun Strukturuntersuchungen sowohl an der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD als auch am PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein in An- und Abwesenheit der Agonisten GW0742 und GW1516 erfolgen.

### 4.2.1. Expression und Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD

Das Plasmid PPARD\_full\_new wurde von Life Technologies als ein für *E.coli* optimiertes Plasmid synthetisiert. Das Plasmid wurde in *E.coli*-DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (3.2.8), um es zu sichern und zu vervielfältigen. Nach der

Plasmidpräparation (3.2.2) wurde das Insert mit der Sequenz für die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (890 bp) durch die beiden Primer PPARDNco1fw und PPARDXho1rev (3.1.8) amplifiziert. Das amplifizierte Insert wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Nco* I (3.1.7) geschnitten, ebenso wie das Plasmid pET-28a(+) (3.1.8.1). Über die entstandenen komplementären Enden wurde durch eine Ligation (3.2.7) über Nacht das Plasmid pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDWT hergestellt. Dieses wurde in *E.coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Die entstandenen Kolonien wurden mit einer Kolonie-PCR (3.2.5) auf positive Klone getestet. Dabei wurden zwei positive Klone erkannt, die anschließend über Nacht kultiviert wurden. Über eine Plasmidpräparation (3.2.2) wurde das Plasmid isoliert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen Restriktionsverdau (3.2.6), anschließender Agarose-Gelelektrophorese (3.2.3) und einer DNA-Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde das Plasmid in *E.coli* BL(21) DE3-Zellen transformiert (3.2.8). Die Bedingungen (Temperatur, Zeit, IPTG-Konzentration) wurden optimiert, um die größtmögliche lösliche Proteinmenge zu erhalten. Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde mittels des Strep-tags II über eine Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit wurde mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft. Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD eluierte in den Waschfraktionen (Abbildung 44, Fraktionen W3-W16) und Elutionsfraktionen (Abbildung 44, Fraktionen E1-E5). Die Protein-enthaltenden Fraktionen (Fraktionen W10-E5) wurden vereint. Nach dem Konzentrieren in Amicon-Zentrifugationseinheiten wurde durch eine Proteingehaltsbestimmung nach Bradford eine Ausbeute an PPAR- $\beta/\delta$ -LBD von ca. 13  $\mu\text{g/g}$  aufgeschlossenen Zellen bestimmt. Nach Abspaltung des Strep-tags II wurde die Proteinlösung mindestens dreimal mit Strep-tag-Lösung A (3.1.12.1) in Amicon-Zentrifugationseinheiten gewaschen, um den Strep-tag II zu entfernen. Danach wurde die Proteinlösung im Kühlschrank bei 4-6 °C bis zur Verwendung für die Quervernetzungsreaktionen aufbewahrt.

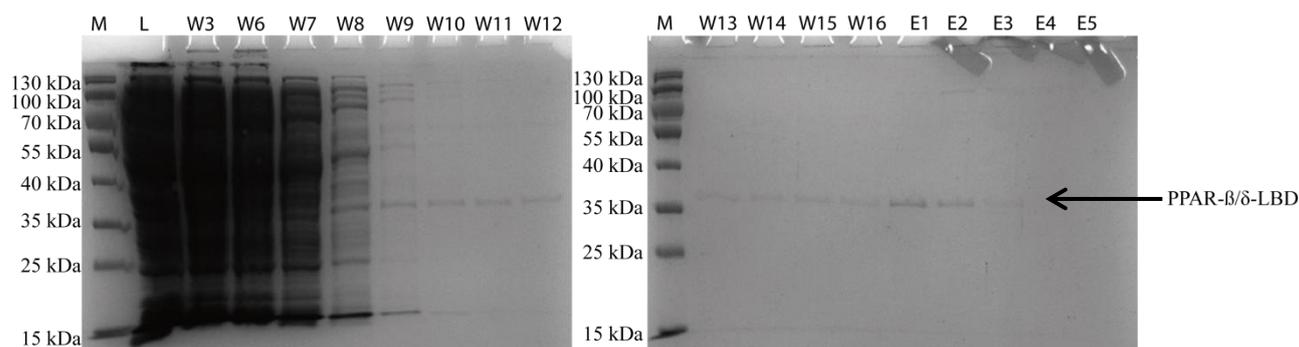


Abbildung 44: SDS-PAGE (12%) der Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mittels Affinitätschromatographie über den Strep-tag II. M= Proteinmarker; L= Ladekontrolle; W3-W16= Waschfraktionen; E1-E5= Elutionsfraktionen.

#### 4.2.2. Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit aminreaktiven Reagenzien

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (dunkelgrau unterlegte Aminosäuresequenz, Abbildungen 28 und 45) sollte nach erfolgreicher Reinigung (3.3.3) mittels verschiedener Quervernetzungsreagenzien (3.1.15) im ligandenfreien als auch -gebundenen Zustand vernetzt werden. Dafür wurden die beiden Agonisten GW0742 and GW1516 verwendet (Abbildung 29) [44]. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert. Entsprechende Banden der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung mittels Trypsin unterzogen. Die LC/ESI-MS/MS-Analyse resultierte in der Identifizierung mehrerer Vernetzungsprodukte (Tabelle 8). Der Vorteil der Verwendung einer Mischung aus deuteriertem und nicht-deuteriertem BS<sup>2</sup>G-Quervernetzungsreagenz besteht in der Identifizierung der Vernetzungsprodukte anhand des typischen Isotopenmusters mit einem Massenabstand von 4 u. Durch das ladungsabhängige Isolations- und Verschiebungsfenster (Tabelle 5) während der MS-Analyse war es möglich, sowohl im Vorläuferionen- als auch im Fragmentenmassenspektrum, beide Spezies ( $D_0$  und  $D_4$ ) gleichzeitig zu fragmentieren. Dadurch wurde nicht nur die Identifizierung von Quervernetzungsprodukten vereinfacht, sondern auch die Zahl an falsch-positiven Ergebnissen verringert. Als Beispiel sei die Quervernetzung von Ser-181/Lys-182 zu Lys-197/Lys-198 gezeigt (Abbildung 46). Durch die hohe Auflösung und Massengenauigkeit des Orbitrap-Massenanalysators ließ sich die Quervernetzungsstelle auf das Serin oder Lysin im  $\alpha$ -Peptid einschränken. Gleichzeitig konnten Fragmente verifiziert werden, da im Fragmentenmassenspektrum ebenfalls das typische  $D_0/D_4$ -Muster des Quervernetzungsreagenz sichtbar ist, was die Position der Quervernetzung bestätigte (Abbildung 46).

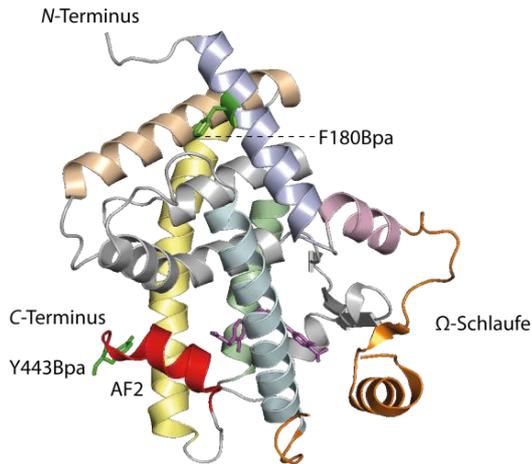


Abbildung 45: Röntgenkristallstruktur der PPAR-β/δ-LBD kokristallisiert mit dem Liganden GW0742 (PDB-Eintrag 3TKM). Die Aktivierungsfunktionshelix 2 (AF2) ist in rot dargestellt, die flexible Ω-Schleife in orange, die durch Bpa ausgetauschten Aminosäuren in grün und der Ligand GW0742 in magenta. Die an den Quervernetzungen beteiligten Helices sind farbig dargestellt (Helix 1: hellblau; Helix 2: rosa; Helix 4: blasscyan; Helix 8: blassgrün; Helix 10: weizenfarben; Helix 11: blassgelb).

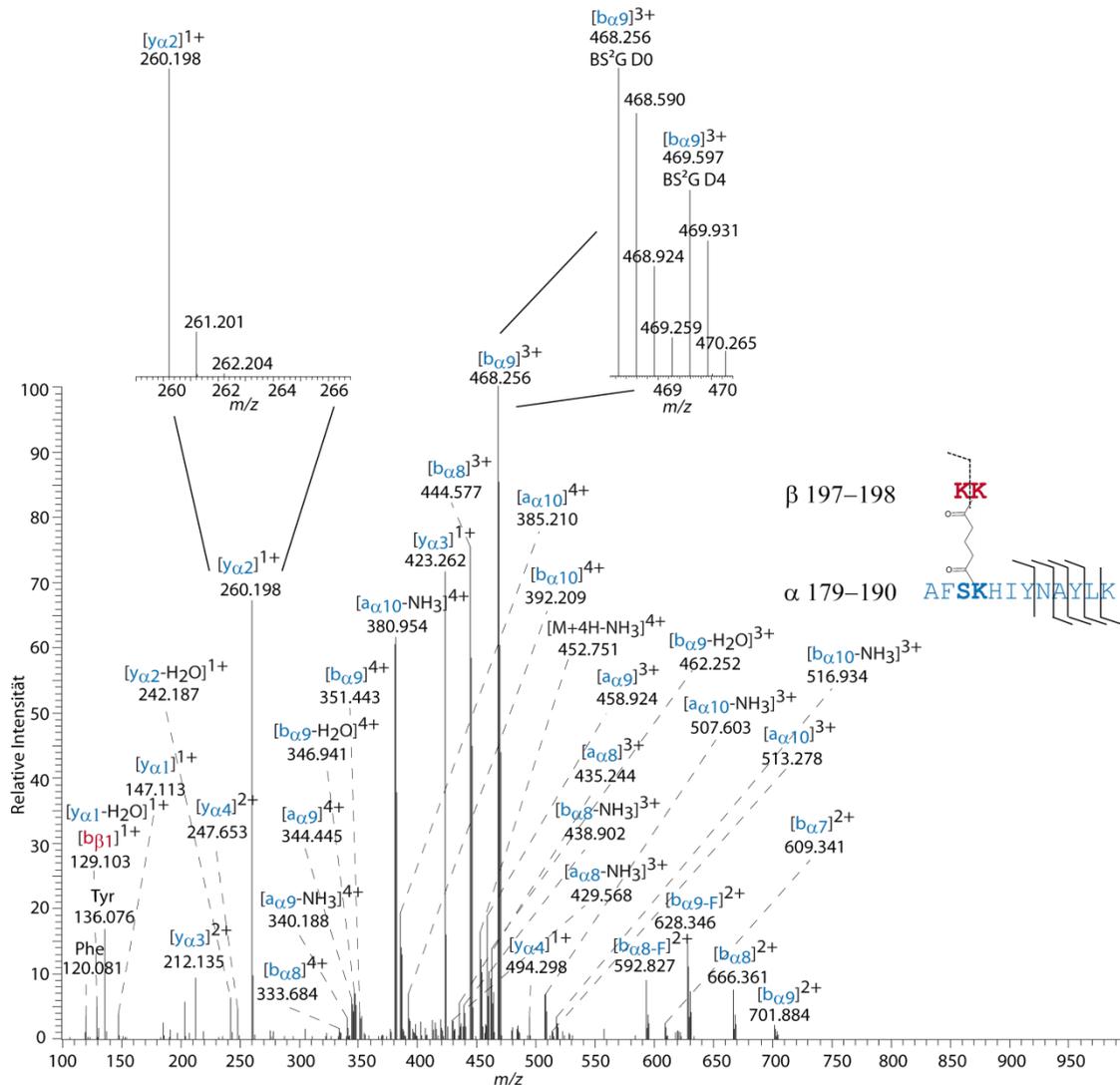


Abbildung 46: Fragmentionenmassenspektrum eines 5+ geladenen Vorläuferions ( $m/z$  366.010) eines Quervernetzungsproduktes zwischen Ser-181/Lys-182 und Lys-197/Lys-198. Anhand der Fragmentionen ließ sich die Quervernetzung nicht eindeutig zu Ser-181 oder Lys-182 zuordnen. Vergrößerte Bereiche des Fragmentionenmassenspektrums sind zusätzlich dargestellt.

Eine Vielzahl an Quervernetzungsprodukten konnte sowohl in An- als auch in Abwesenheit der Liganden identifiziert werden (Abbildungen 47 und A 1, Tabellen 8 und A 4). BS<sup>2</sup>G ist durch seinen *Spacer* (7,7 Å) zwischen den beiden reaktiven NHS-Estergruppen in der Lage, einen Ca-Ca-Abstand von bis zu 27 Å zu überbrücken [183, 184]. Nach manueller Verifikation der Quervernetzungsprodukte wurden diese in die Röntgenkristallstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM) der GW0742-gebundenen PPAR-β/δ-LBD eingetragen und als Kreisplots dargestellt (Abbildungen 47 und A 1). Mehrere

Quervernetzungsprodukte der *N*-terminalen Aminosäure der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (Gly-167) konnten nur in Anwesenheit der beiden Liganden identifiziert werden und sind nicht vereinbar mit dieser Röntgenkristallstruktur. So wurden im ligandengebundenen Zustand Quervernetzungsprodukte von Gly-167 zu den Aminosäuren Lys-324 und Lys-423/Lys-424 gefunden (Abbildung 47). Zusätzlich wurden im GW0742-gebundenen Zustand Quervernetzungen zwischen Gly-167 und Lys-440 in der Aktivierungsfunktionshelix 2 (AF2) sowie zwischen den Aminosäuren Lys-197/Lys-198 und Lys-324 identifiziert. Im GW1516-gebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde eine Quervernetzung zwischen Gly-167 und Lys-231 in der flexiblen  $\Omega$ -Schleife (nicht aufgelöster Bereich der Röntgenkristallstruktur) gefunden. Diese Quervernetzungsprodukte wurden nicht im freien Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gefunden und deuten auf eine spezifische, stabilisierte Konformation nach Ligandenbindung hin. Diese Quervernetzungsprodukte können nur entstehen, wenn sich die vernetzten Aminosäuren so nahe kommen, um durch das Quervernetzungsreagenz verknüpft zu werden. Andere Quervernetzungsprodukte, die nur im ligandengebundenen Zustand gefunden wurden, sind durch den überbrückbaren Abstand des Quervernetzungsreagenzes erklärbar. Darunter zählen die beiden Quervernetzungsprodukte zwischen Gly-167 zu den Aminosäuren Lys-267 und Lys-404.

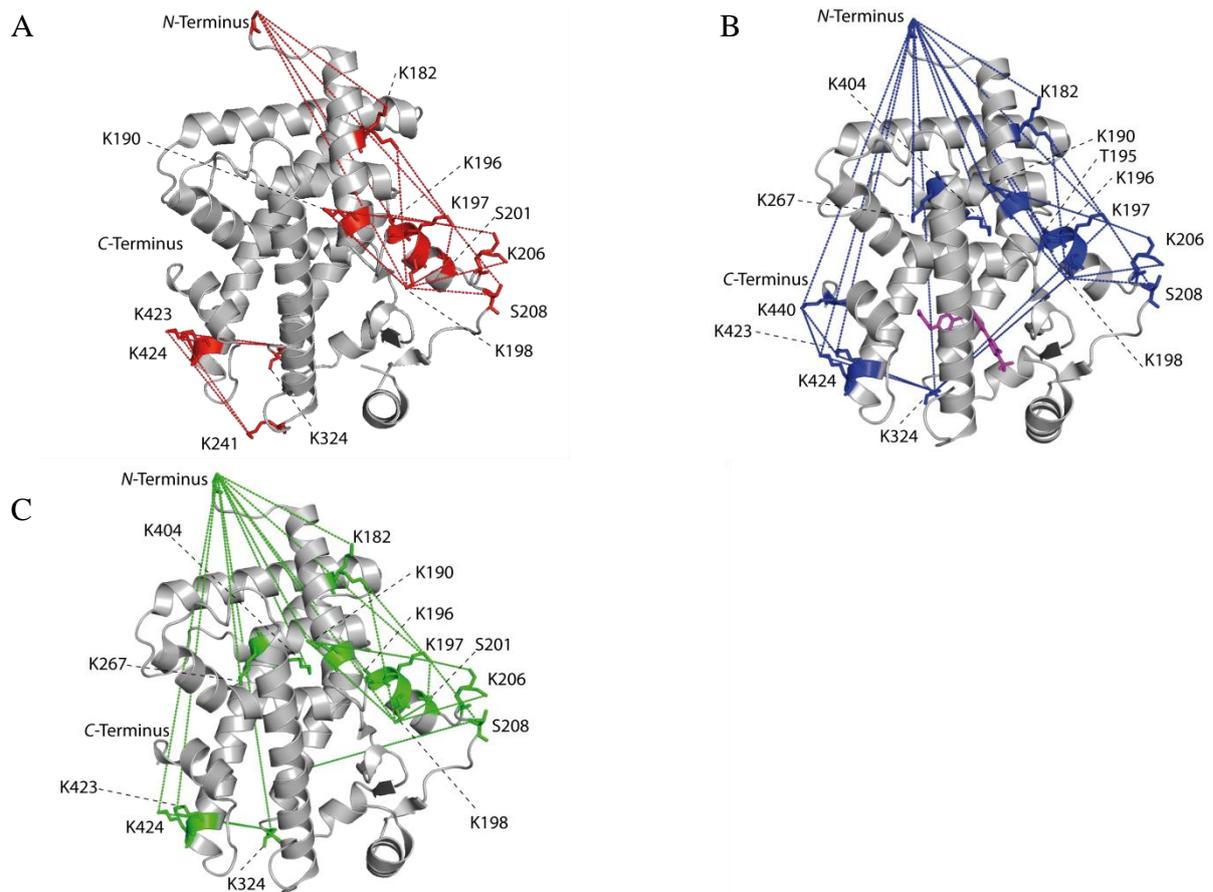


Abbildung 47: Identifizierte Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BS<sup>2</sup>G. Quervernetzungsprodukte sind in rot (ohne Liganden, A), blau (mit GW0742, B) oder grün (mit GW1516, C) dargestellt, ebenso wie die beteiligten Aminosäuren. Der in der Röntgenstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM) kristallisierte Ligand GW0742 ist in magenta (B) dargestellt.

## Ergebnisse

Tabelle 8: Zusammenfassung aller gefundenen Quervernetzungsprodukte für PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (BS<sup>2</sup>G, DMTMM, BuUrBu und Bpa) und PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein (BS<sup>2</sup>G); X= Bpa; { = N-Terminus; } = C-Terminus.

<i>PPAR-<math>\beta/\delta</math>-LBD</i>				<i>PPAR-<math>\beta/\delta</math>-Volllängenprotein</i>			
<i>quervernetzte</i>	<i>Ligand</i>			<i>quervernetzte</i>	<i>Ligand</i>		
<i>Aminosäuren</i>	<i>ohne</i>	<i>GW0742</i>	<i>GW1516</i>	<i>Aminosäuren</i>	<i>ohne</i>	<i>GW0742</i>	<i>GW1516</i>
{167+S181/K182	✓	✓	✓	{+K107	✓		✓
{167+K182	✓	✓	✓	{+S116/K118			✓
{167+K190	✓	✓	✓	{+K121/K122	✓	✓	✓
{167+T195/K196/ K197		✓		{+K122	✓	✓	✓
{167+K196/K197/ K198	✓	✓	✓	{+K126	✓		✓
{167+K197/K198	✓	✓	✓	{+K155	✓		✓
{167+K198	✓			{+K197/K198	✓	✓	✓
{167+S201	✓			{+K198	✓		✓
{167+K231			✓	{+K423			✓
{167+E264	✓	✓	✓	K82+K121/K122	✓		
{167+K267		✓	✓	K107+K155	✓		✓
{167+K324		✓	✓	K118+K122	✓	✓	✓
{167+E331		✓		K118+K126	✓		✓
{167+E373	✓	✓	✓	K118+K134	✓		
{167+D377	✓	✓	✓	K118+S181/K182	✓		
{167+K404		✓	✓	K118+K198	✓		
{167+ K423/K424		✓	✓	K121+K126	✓	✓	✓
{167+K440		✓		K122+K126	✓	✓	✓
{167+}443		✓		K122+K134	✓	✓	✓
{167/G167/S168/ Q169/Y170+X180	✓			K122+K155			✓
X180+I379	✓	✓	✓	K122+K157	✓		
S181/K182+K197/ K198	✓	✓	✓	K126+K155	✓		
S181/K182+K198	✓	✓		K127+K133	✓		
K182+K197/K198	✓	✓	✓	K134+K197/K198	✓		✓
K190+K197/K198	✓	✓	✓	K155+K182	✓		
K190+K198	✓	✓	✓	K155+K190	✓		
T195/K196/K197+ K198	✓	✓		K155+K197	✓	✓	✓
K197/K198+S201	✓	✓	✓	K155+K197/K198	✓		
K197/K198+K206	✓	✓	✓	K155+K404	✓		
K197/K198+S208	✓	✓	✓	K157+K197/K198	✓		
K197/K198+K206/ S208/T210	✓			K190+K197/K198	✓		

## Ergebnisse

K197/K198+K324		✓			K197/K198+S201	✓	✓	✓
K197/K198+K423/ K424	✓				K198+S201	✓	✓	✓
K197+K424	✓				K324+K423/K424	✓		
K198+S201	✓	✓	✓		K423+K440	✓		✓
K198+K206	✓	✓						
S201/T204/K206/ S208+K302	✓							
K226+Y249/K241	✓							
K241+K423/K424	✓							
S298/K302+K400	✓							
K324+K423/K424	✓	✓	✓					
K324+K424	✓	✓						
I330+X443	✓							
K333+K423/K424	✓							
M419+X443	✓	✓	✓					
K423+D441	✓	✓	✓					
K423/K424+T425/ T427/T429/S430	✓							
K423/K424+K440	✓	✓	✓					

Als zweites homobifunktionelles, aminreaktives Quervernetzungsreagenz wurde der MS-spaltbare Urea-Linker verwendet [186] (Abbildung 20). Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde mit dem Quervernetzungsreagenz zur Reaktion gebracht und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 48).

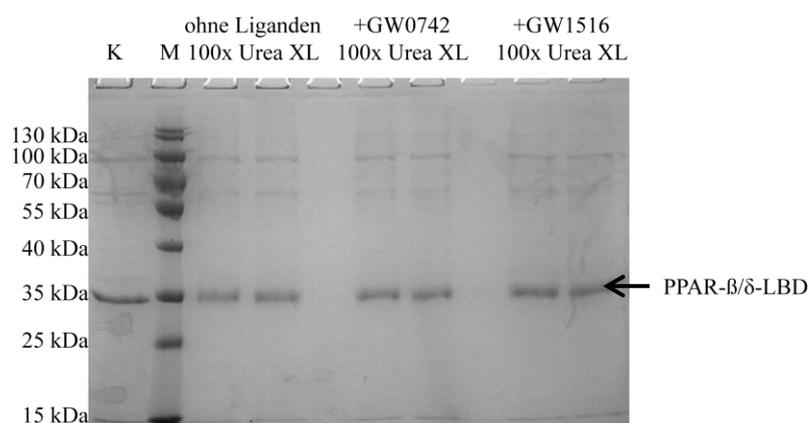


Abbildung 48: SDS-PAGE (12%) einer Quervernetzungsreaktion mit Urea-Linker. K= Kontrolle aus nicht vernetzter PPAR- $\beta/\delta$ -LBD; M= Proteinmarker; 100x Urea XL= 100-facher molarer Überschuss an Urea-Linker im Vergleich zum Protein (5  $\mu$ M).

Die Banden der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurden ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin unterzogen. Die tryptischen Spaltprodukte wurden mit Nano-HPLC/Nano-ESI-

Orbitrap-MS/MS-Analyse mittels der kollisionsaktivierten Fragmentierungstechniken CID und HCD analysiert. Durch die Kollisionsenergie wurde die schwächste Bindung gebrochen, was im Falle der Quervernetzungsreaktionen mit dem Urea-Linker das Quervernetzungsreagenz selbst war (Abbildung 20). Die dadurch entstehenden spezifischen Signale erlaubten eine automatische Auswertung. Als Beispiel sei die Quervernetzung zwischen Gly-167 zu Lys-198 gezeigt (Abbildung 49). Das dreifach positiv geladene Vorläuferion bei  $m/z$  673,033 wurde mittels CID (35% normalisierte Kollisionsenergie) fragmentiert. Die Quervernetzungsstelle konnte anschließend im Fragmentionenmassenspektrum eindeutig anhand des zweifach positiv geladenen  $b_{\alpha 1}$ -Ion bei  $m/z$  378,229 und des einfach positiv geladenen  $y_{\beta 3}$ -Ions bei  $m/z$  374,251 identifiziert werden. Ebenfalls wurden die spezifischen Fragmentionen des Urea-Linkers identifiziert.

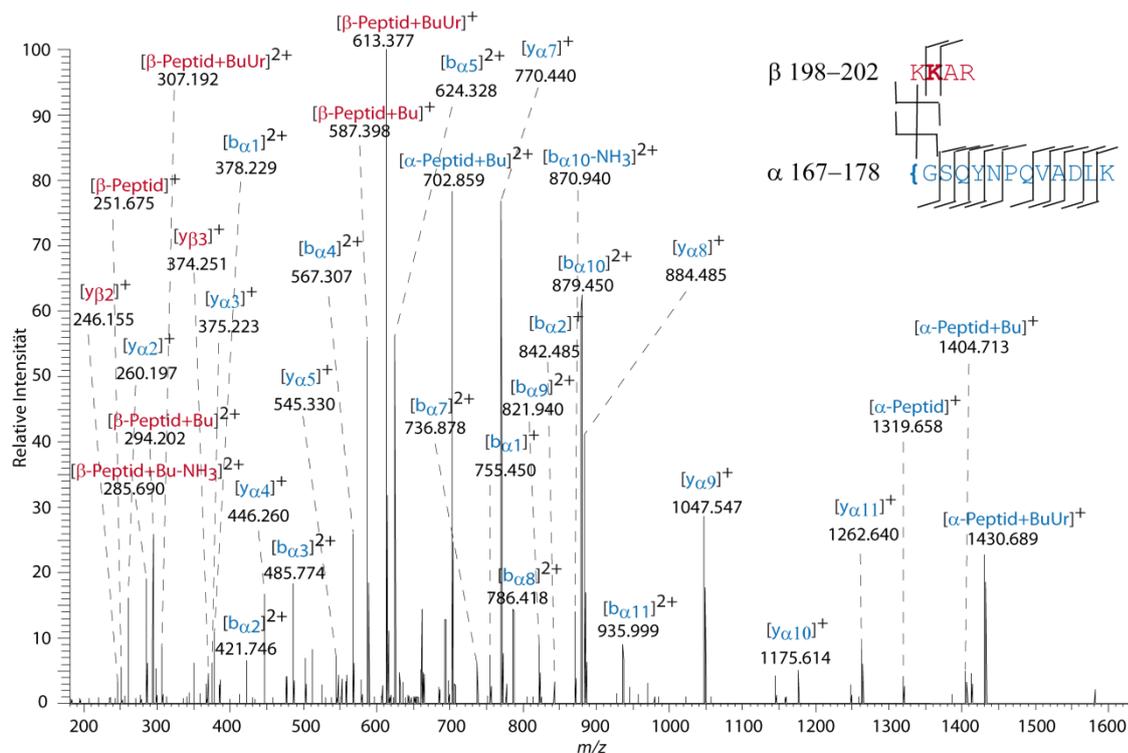


Abbildung 49: Fragmentionenmassenspektrum eines Quervernetzungsproduktes mit dem Urea-Linker zwischen Gly-167 und Lys-198. Im Fragmentionenmassenspektrum wurden die spezifischen Fragmente  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu) und Isocyano- $\gamma$ -Aminobuttersäure (BuUr) des Urea-Linkers identifiziert (Abbildung 20).

Mit dem spaltbaren Reagenz wurden viele Quervernetzungsprodukte im ligandenfreien Zustand identifiziert, jedoch reduzierte sich die Zahl der gefundenen Quervernetzungsprodukte stark im ligandengebundenen Zustand. Es wurden ähnliche

Quervernetzungsstellen gefunden wie in den Quervernetzungsreaktionen mit BS<sup>2</sup>G-*D*<sub>0</sub>/*D*<sub>4</sub> (Abbildungen 50 und A 2, Tabellen 8 und A 5).

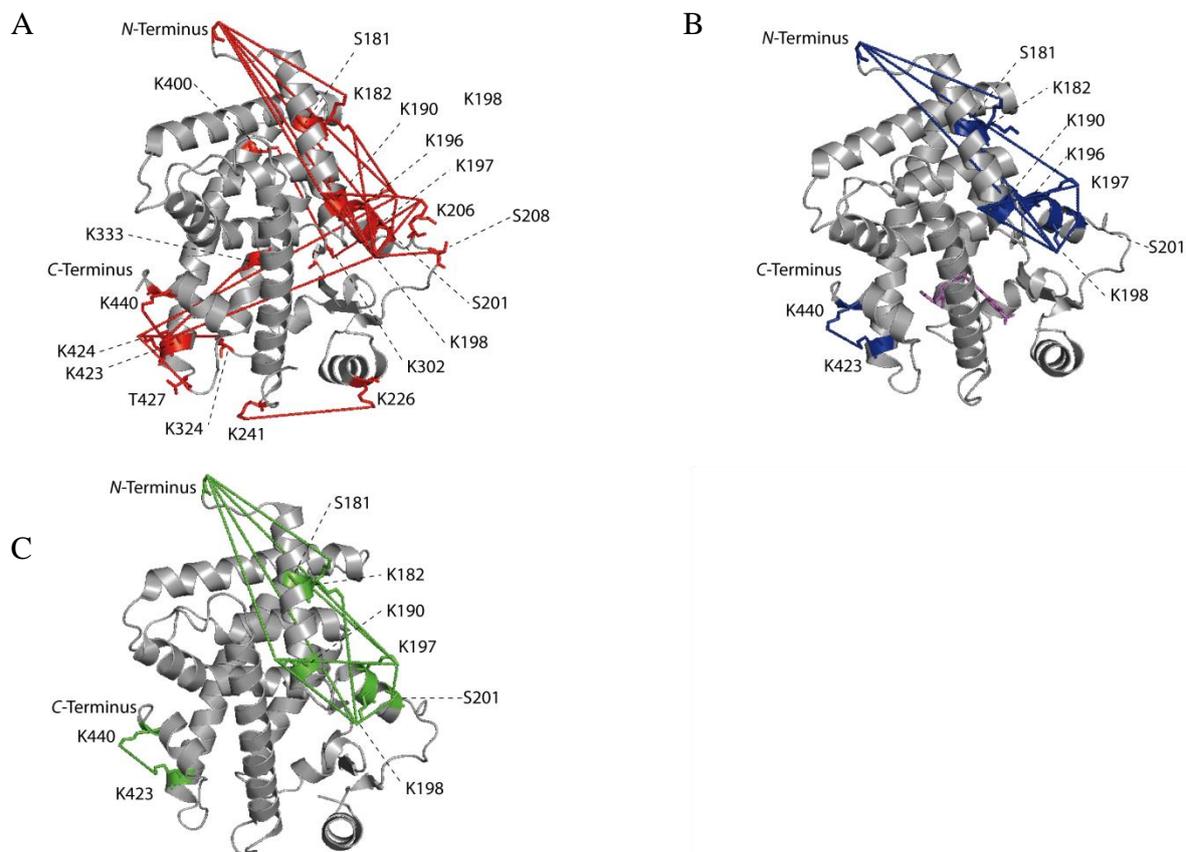


Abbildung 50: Identifizierte Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BuUrBu. Quervernetzungsprodukte sind in rot (ohne Liganden, A), blau (mit GW0742, B) oder grün (mit GW1516, C) dargestellt, ebenso wie die beteiligten Aminosäuren. Der in der Röntgenstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM) kristallisierte Ligand GW0742 ist in magenta (B) dargestellt.

#### 4.2.3. Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem carboxylreaktiven Reagenz SDH und dem Kopplungsreagenz DMTMM

Um nicht nur die Aminogruppen von Lysinen und dem *N*-Terminus an der Quervernetzungsreaktion zu beteiligen, sollten auch die Carboxylgruppen der Asparaginsäure, Glutaminsäure, des *C*-Terminus und der Liganden zur Reaktion gebracht werden. Dabei kam das homobifunktionelle, carboxylreaktive Quervernetzungsreagenz SDH zur Anwendung (Abbildung 21) [187]. Dies verknüpft Carboxylgruppen nach Aktivierung durch DMTMM [187]. Kontrolliert wurde das Ergebnis der

Quervernetzungsreaktion mittels SDS-PAGE. Gelbanden der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurden ausgeschnitten und nach einer tryptischen *in-Gel*-Spaltung mittels LC/ESI-MS/MS analysiert. Mit StavroX wurden die Daten nach Quervernetzungsprodukten durchsucht. Es konnten keine Quervernetzungsprodukte von SDH zwischen sauren Aminosäuren identifiziert werden, jedoch konnten einige durch DMTMM verknüpfte Aminosäuren identifiziert werden. DMTMM ist ein Kopplungsreagenz, welches Carboxylgruppen aktiviert und einen nukleophilen Angriff durch Amine begünstigt. Dadurch verknüpft es saure Aminosäuren mit dem *N*-Terminus und Lysinen innerhalb eines Protein. Im Gegensatz zu BS<sup>2</sup>G und dem spaltbaren Urea-Linker werden Aminogruppen und Carboxylgruppen so direkt miteinander verbunden. Durch DMTMM können nur Aminosäuren vernetzt werden, die sich für einen bestimmten Zeitraum in unmittelbarer Nähe zueinander ( $C\alpha$ - $C\alpha$ -Abstand von ca. 10 Å) befinden. Nach der Inkubation mit den Liganden GW0742 und GW1516 wurde DMTMM in einem 8000-fachen molaren Überschuss zur PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gegeben. Kontrolliert wurde das Ergebnis der Quervernetzungsreaktion mittels SDS-PAGE (Abbildung 51) und LC/ESI-MS/MS.

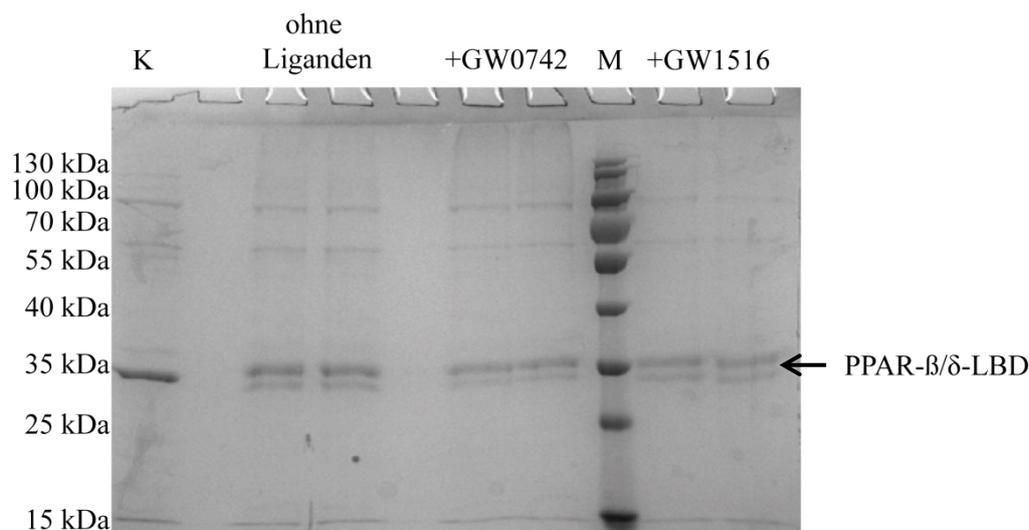


Abbildung 51: SDS-Gel (12%) einer Quervernetzungsreaktion mit 8000-fach molarem Überschuss DMTMM im Vergleich zum Protein (5  $\mu$ M). K= Kontrolle aus nicht vernetzter PPAR- $\beta/\delta$ -LBD; M= Proteinmarker; +GW0742= PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit 20-fachem molarem Überschuss an Agonist GW0742; +GW1516= PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit 20-fachem molarem Überschuss an Agonist GW1516.

Sowohl im ligandengebundenen, als auch im freien Zustand konnte eine Vielzahl an Quervernetzungsprodukten in der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD durch die hohe Auflösung und Massengenauigkeit des Orbitrap-Massenanalysators sicher identifiziert werden

(Abbildungen 52 und A 3, Tabellen 8 und A 5). Als Beispiel sei die Quervernetzung zwischen Gly-167 mit Glu-373 genannt (Abbildung 53). Dieses Quervernetzungsprodukt wurde sowohl im freien als auch ligandengebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD identifiziert. Anhand der einfach positiv geladenen Fragmentationen  $b_{\alpha 1}$  bei  $m/z$  1196,661 und  $b_{\beta 2}$  bei  $m/z$  1529,745 konnten die beiden Verknüpfungsstellen eindeutig identifiziert werden.

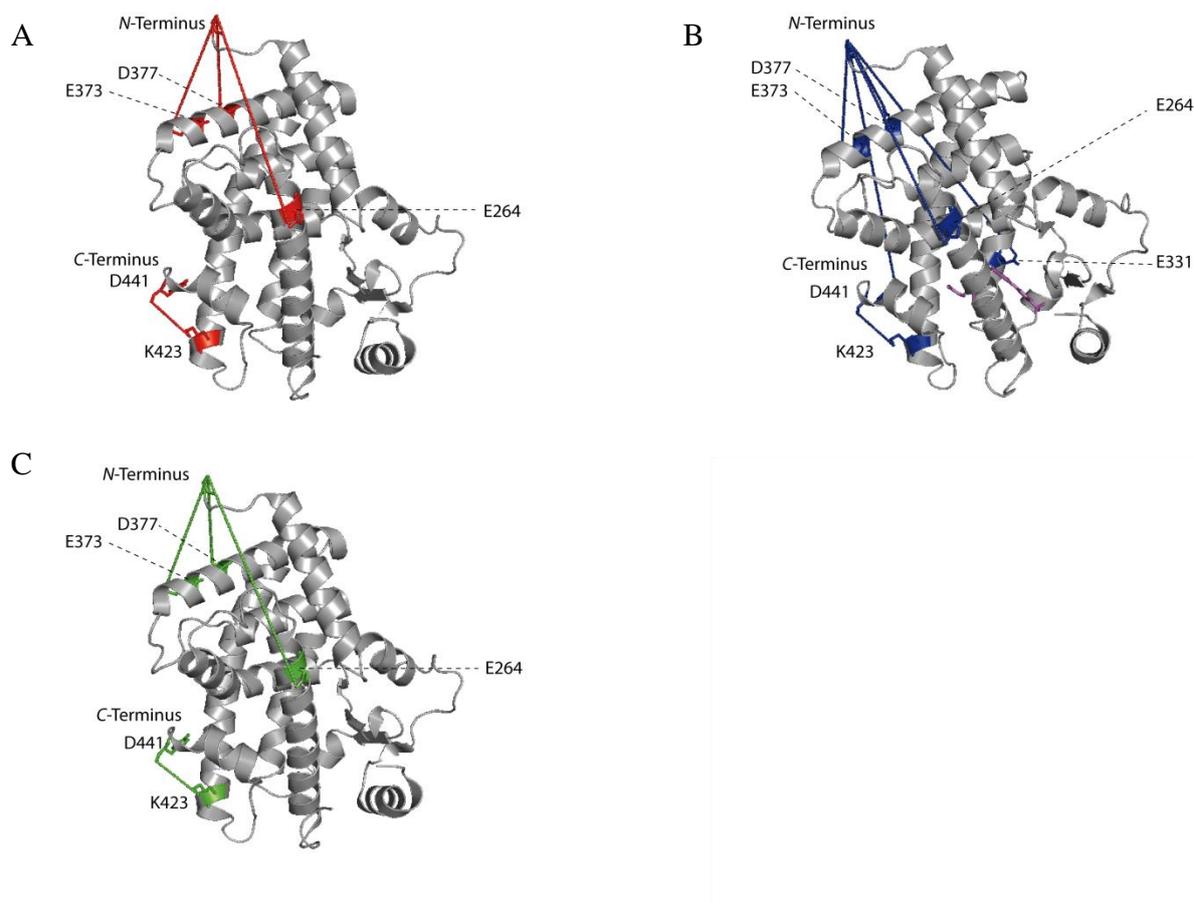


Abbildung 52: Identifizierte Quervernetzungsprodukte der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM. Quervernetzungsprodukte sind in rot (ohne Liganden, A), blau (mit GW0742, B) oder grün (mit GW1516, C) dargestellt, ebenso wie die beteiligten Aminosäuren. Der in der Röntgenstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM) kristallisierte Ligand GW0742 ist in magenta (B) dargestellt.

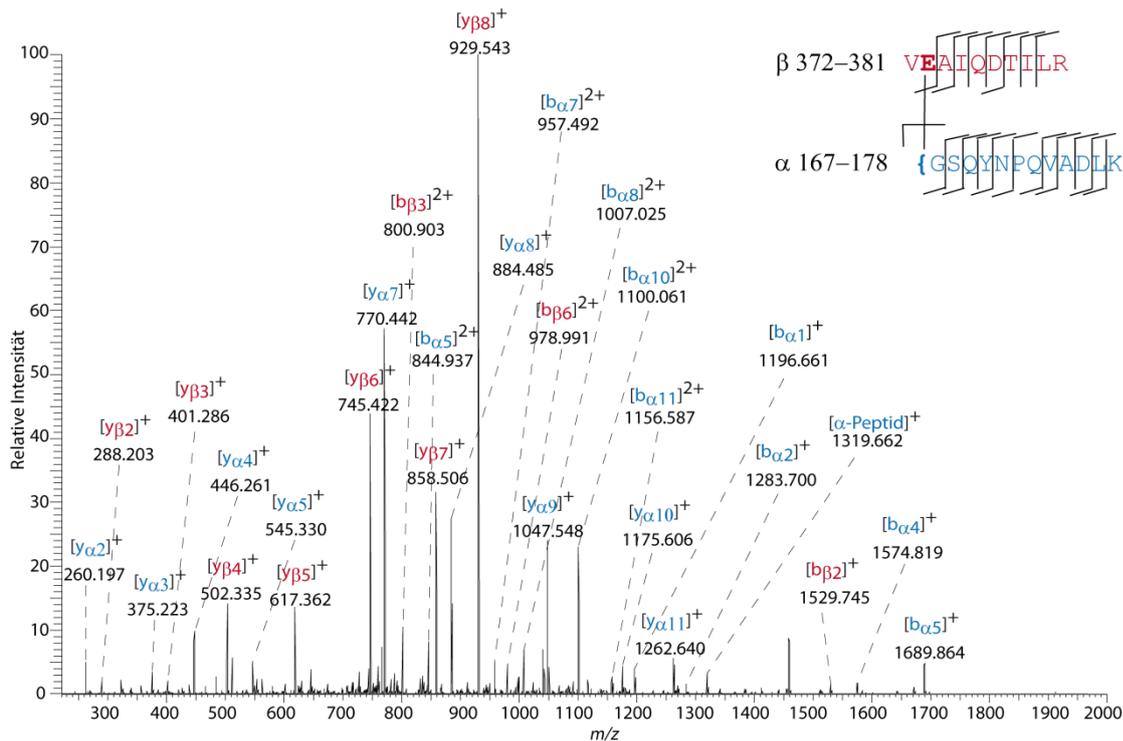


Abbildung 53: Fragmentationenmassenspektrum des Quervernetzungsproduktes innerhalb der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit DMTMM zwischen Gly-167 und Glu-373. Fragmentiert wurde ein 3+ geladenes Vorläuferion bei  $m/z$  820,104; { definiert den N-Terminus.

In den Experimenten mit DMTMM wurde, sowohl im ligandenfreien als auch -gebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD, eine Quervernetzung zwischen Gly-167 und Glu-264 gefunden (Abbildung 52). Interessant ist, dass diese Region ebenfalls mit BS<sup>2</sup>G im ligandengebundenen Zustand vernetzt gefunden wurde (Lys-267) (Abbildung 47). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich der *N*-Terminus der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (Gly-167) an Helix 4 annähert, auf der sich sowohl Glu-264 als auch Lys-267 befinden, um diese Quervernetzungen auszubilden (Abbildung 45). Im GW0742-gebundenen Zustand wurden zwei zusätzliche Quervernetzungen gefunden. Dabei wurde der *C*-Terminus (Tyr-443) mit dem *N*-Terminus (Gly-167) der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD, sowie der *N*-Terminus (Gly-167) mit Glu-331 verknüpft. Beide Quervernetzungen sind nicht vereinbar mit der publizierten Röntgenkristallstruktur (PDB-Eintrag: 3TKM). Die beteiligten Aminosäuren müssen sich zur Ausbildung der Quervernetzung in unmittelbarer Nähe befinden. Das lässt nur den Schluss zu, dass sich der *N*-Terminus der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD im GW0742-gebundenen Zustand den Helices 4 und 8 annähert (Abbildung 45). Interessanterweise

konnten im GW1516-gebundenen Zustand diese Quervernetzungsprodukte nicht identifiziert werden.

#### 4.2.4. Quervernetzung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionalen Reagenzien

Um weitere Aminosäuren, zusätzlich zu Lysin bzw. Asparaginsäuren und Glutaminsäuren einer Quervernetzungsreaktion zu unterziehen, wurde das heterobifunktionelle, amin-/photoreaktive Quervernetzungsreagenz Sulfo-SDA verwendet (Abbildung 22). Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde dabei, wie unter 3.4.2.4 beschrieben, mit dem Quervernetzungsreagenz vernetzt. Anschließend wurde Ligand hinzugegeben und die Photoreaktion mit UV-A-Bestrahlung ( $8 \text{ J/cm}^2$ ) induziert (Abbildung 54). Nach der SDS-PAGE-Analyse wurden Gelbanden ausgeschnitten und mittels *in-Gel*-Spaltung und LC/ESI-MS/MS analysiert. Da die Abspaltung des Strep-tags II durch die TEV-Protease über Nacht nicht vollständig war, wurde auch die Bande des Fusionsproteins analysiert. Allerdings konnten in keiner Probe Quervernetzungsprodukte identifiziert werden.

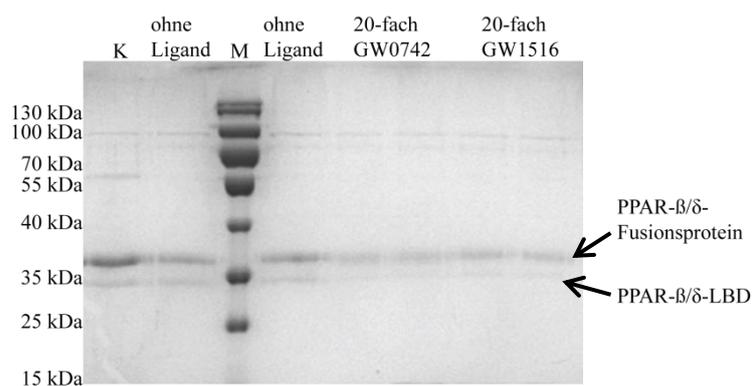


Abbildung 54: SDS-Gel (12%) der Quervernetzungsreaktion der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit 100-fachem molarem Überschuss an Sulfo-SDA, Ligand wurde im 20-fachen molaren Überschuss hinzugegeben. M= Proteinmarker; K= Kontrolle der unbestrahlten PPAR- $\beta/\delta$ -LBD ohne Liganden.

#### 4.2.5. Spezifischer Einbau von photoaktivierbaren Aminosäuren in die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD

Für spätere Photoaffinitätsmarkierungsstudien (3.4.2.5) sollte die photoaktivierbare Aminosäure Bpa durch einen gezielten Austausch in die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD an verschiedenen Positionen anstelle der natürlichen Aminosäure eingebaut werden. Dabei kam die von Schultz und Kollegen entwickelte Methode zur Anwendung [197]. Durch gezielte Mutagenese wird das Amber-Stopcodon TAG im genetischen Code an der Stelle eingeführt, an der die natürliche Aminosäure gegen die unnatürliche photoaktivierbare

Aminosäure ausgetauscht werden soll. Hierfür wird ein zusätzliches Plasmid pEvol-pBpf (3.1.8.1) verwendet, welches für ein spezifisches tRNA/Aminoacyl-tRNA-Synthetasepaar kodiert. Anstelle eines Abbruchs der Proteinsynthese wird so durch die neue spezifische tRNA der Einbau der unnatürlichen Aminosäure stattfinden. Durch gerichtete Mutagenese wurde das Plasmid pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDWT zu den Plasmiden pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDF180, pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDF192, pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDF213, pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDF248 und pRS CStrepPPAR $\beta/\delta$ LBDY443 (3.1.8.1) umkloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsverdau, gefolgt von einer Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Sequenzierung überprüft. Aufgrund der Größe und des hydrophoben Benzophenonrings von Bpa (Abbildung 26A) wurden die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin für den Austausch gewählt. Die Expression und Reinigung erfolgte analog zur PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (4.2.1). Es konnte eine Proteinausbeute von bis zu 6,5  $\mu\text{g/g}$  aufgeschlossenes Zellmaterial erreicht werden. Jedoch schwankte die Ausbeute und Reinheit je nach Bpa-Variante. Auf weitere Reinigungsschritte wurde, aufgrund der zum Teil sehr geringen Ausbeute und der Möglichkeit, hochauflösende Massenspektrometrie für die Analyse einzusetzen, verzichtet.

#### **4.2.6. Strukturuntersuchungen an Bpa-Varianten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mittels Photoaffinitätsmarkierungsstudien**

Die Varianten F180Bpa, F192Bpa, F213Bpa, F248Bpa und Y443Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurden in *E.coli* exprimiert und gereinigt (3.3.3; 3.3.4.2). Die Austauschpositionen wurden bewusst ausgewählt. So befindet sich Tyr-443 am C-Terminus der AF2, welcher maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligt ist (Abbildung 45). Die Photoreaktion wurde mittels UV-A-Bestrahlung induziert. Anschließend wurden die Proben einer *in-Lösung*-Spaltung mit GluC/Trypsin unterzogen oder über eine SDS-PAGE-Analyse getrennt, Gelbanden ausgeschnitten und über eine *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin analysiert. Der Einbau war an allen Positionen außer Phe-248 erfolgreich und konnte mittels Tandem-MS nachgewiesen werden. Für die Varianten F192Bpa und F213Bpa konnte der Einbau zwar bestätigt, es konnten aber keine Quervernetzungsprodukte identifiziert werden. Für die Varianten F180Bpa und Y443Bpa wurden einige Quervernetzungsprodukte identifiziert (Abbildungen 56 und A 4, Tabellen 8 und A 6). Für die Variante F180Bpa konnte im ligandenfreien als auch -gebundenen Zustand eine

Quervernetzung zwischen Bpa-180 und Ile-379 identifiziert werden (Abbildung 55). Ile-379 befindet sich auf Helix 10 in direkter Nachbarschaft zu Helix 1, auf der Bpa-180 eingebaut wurde (Abbildung 56). Die Quervernetzungsstelle Ile-379 wurde eindeutig durch das  $y_2$ -Ion bei  $m/z$  288,205, das zweifach positiv geladene  $y_3$ -Ion mit Wasserverlust bei  $m/z$  469,780 und das zweifach geladene  $b_8$ -Ion mit Wasserverlust bei  $m/z$  704,366 identifiziert.

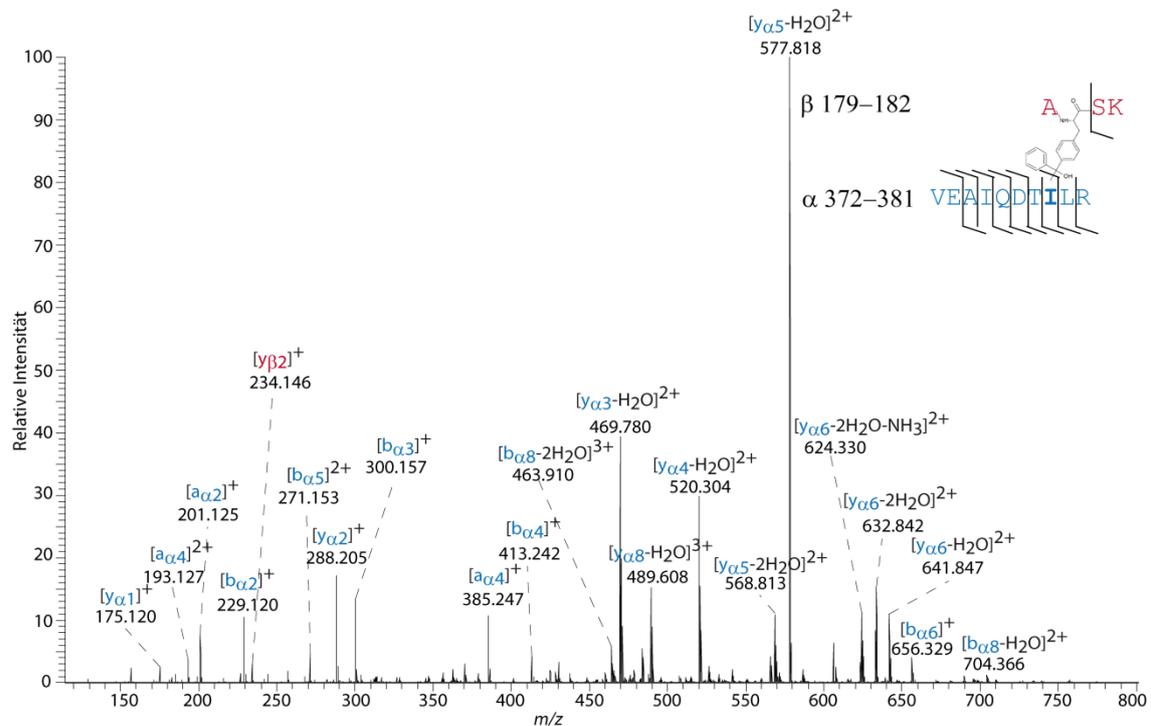


Abbildung 55: Fragmentionenmassenspektrum des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379. Fragmentiert wurde ein 4+ geladenes Vorläuferion bei  $m/z$  428,986.

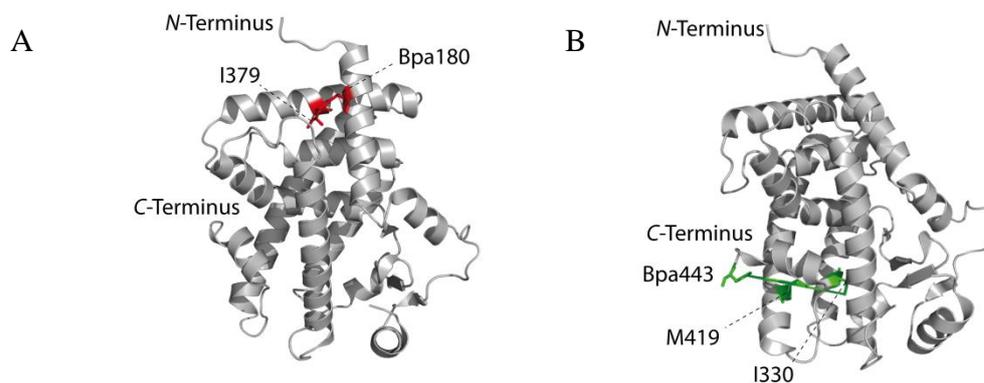


Abbildung 56: Röntgenkristallstruktur der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD (PDB-Eintrag: 3TKM). (A) Die Quervernetzung zwischen Bpa-180 und Ile-379 ist in rot dargestellt, ebenso die beiden Aminosäuren; (B) Die Quervernetzungen zwischen Bpa-443 zu Ile-330 und Met-419 sind in grün dargestellt, ebenso wie die beteiligten Aminosäuren.

Für die Variante Y443Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde eine Quervernetzungsstelle sowohl im ligandenfreien als auch -gebundenen Zustand zwischen Bpa-443 und Met-419 identifiziert und im ligandenfreien Zustand zusätzlich eine zwischen Bpa-443 und Ile-330. Beide Quervernetzungsprodukte sind im Einklang mit der publizierten Röntgenkristallstruktur (Abbildung 56).

#### **4.2.7. Fragmentierungsexperimente der Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD**

Nachdem die Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD in Abwesenheit von Liganden mit UV-A-Bestrahlung (8 J/cm<sup>2</sup>) vernetzt worden war, wurden verschiedene Fragmentierungsexperimente durchgeführt. Während der Analyse der Quervernetzungsreaktionen der Bpa-Varianten von PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\beta/\delta$  fiel die meist schlechte Fragmentierung der Quervernetzungsprodukte auf. Daneben war häufig ein abundanter Verlust von Wasser und/oder Ammoniak zu beobachten. Ein Wasserverlust wurde oft schon vor der Fragmentierung mittels CID beobachtet. Mit verschiedenen Fragmentierungstechniken sollte eine effizientere Fragmentierung und Sequenzabdeckung der Peptide erzielt werden, um die Quervernetzungsstellen sicher zu identifizieren. Dafür kamen neben der Fragmentierung mittels CID auch HCD, ETD, EThcD und ETciD zur Anwendung. EThcD und ETciD sind Kombinationstechniken aus ETD und CID bzw. ETD und HCD (1.2.4). Für die Fragmentierungsexperimente wurden nach der SDS-PAGE-Analyse entsprechende Gelbanden einer *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin unterzogen. Die Spaltprodukte wurden anschließend mittels LC/ESI-MS/MS mit den jeweiligen Fragmentierungstechniken analysiert. Das einzige in allen Proben identifizierte Quervernetzungsprodukt zwischen Bpa-180 und Ile-379 konnte, außer für HCD, mit einer angemessenen Sequenzabdeckung identifiziert werden (Abbildungen A 5 bis A 14). Bei HCD (35% normalisierter Kollisionsenergie) traten gehäuft interne Fragmente auf, die die Sequenzabdeckung reduzierten und die automatische Auswertung der Spektren erschwerte. Die Kombination aus ETD und einer kollisionsinduzierten Dissoziationsmethode (CID oder HCD) eignete sich für die Sequenzabdeckung und die Zuordnung der Fragmentionen am besten.

#### **4.2.8. Ungerichteter Einbau von Photomethionin in die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD**

Als Alternative zum spezifischen Einbau von Bpa wurde ein ungerichteter Einbau der photoaktiverbaren Aminosäure Photomethionin (3.1.15) gewählt. Es konnte kürzlich

gezeigt werden, dass *E.coli*-Zellen in der Lage sind, Photomethionine anstelle von Methionin in Proteine einzubauen [195]. Für den Einbau von Photomethionin wurden die mit dem Plasmid der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD transformierten *E.coli* BL21(DE3)-Zellen verwendet. Dabei wurden die Zellen in LB-Medium vorgezogen und auf Minimalmedium überführt. Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 bei 37 °C kultiviert. Mit diesem Medium wurde neues Minimalmedium angeimpft, um die Zellen langsam an das Wachsen in nährstoffarmer Umgebung anzupassen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Kulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 kultiviert und mit 1 mM IPTG in Anwesenheit von 30 mg/l Photomethionin induziert. Die Kultur wurde, vor Licht geschützt, über Nacht bei 18 °C kultiviert und anschließend geerntet. Mittels SDS-PAGE wurde die Expression überprüft (Abbildung 57). Anschließend wurde die Gelbande der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD ausgeschnitten und einer *in-Gel*-Spaltung mit Trypsin unterzogen. Mittels LC/ESI-MS/MS wurde der Einbau des Photomethionins bestätigt. Aufgrund vielversprechender Bpa-Daten wurde jedoch die Strategie des ungerichteten Einbaus mit Photomethionin im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Diese Strategie soll in Zukunft verfolgt werden.

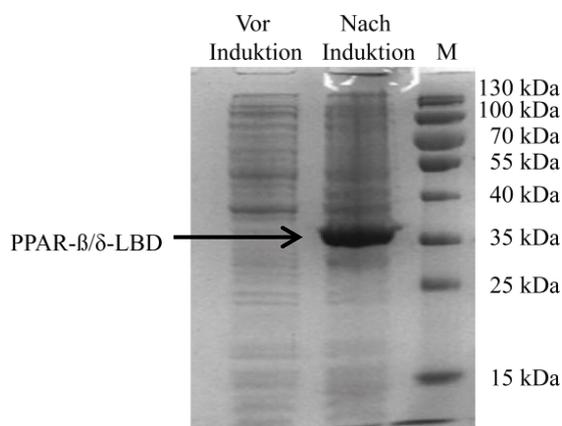


Abbildung 57: SDS-PAGE (12%) der Expression der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit Photomethionin. M= Proteinmarker.

#### 4.2.9. Strukturuntersuchungen am PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein

Da der *N*-Terminus (Gly-167) der isolierten PPAR- $\beta/\delta$ -LBD nicht natürlich vorkommt, jedoch mit diesem starke Konformationsänderungen nach Ligandenbindung beobachtet wurden, wurden zusätzliche Quervernetzungsexperimente mit BS<sup>2</sup>G (Abbildung 19) mit dem PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein (Abbildung 28 und 3.4.2) durchgeführt. Für PPAR- $\beta/\delta$  existieren Röntgenkristallstrukturdaten für die LBD, sowie eine NMR-Struktur für die

DNA-Bindedomäne (DBD) (PDB-Eintrag: 2ENV). Für das PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein mit den hochflexiblen Regionen des *N*-Terminus und der *Hinge*-Region existieren bislang keine Strukturdaten (Abbildung 45). Mittels chemischer Quervernetzung des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins mit BS<sup>2</sup>G sollten nun die Strukturinformationen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD aus den vorherigen Quervernetzungsexperimenten bestätigt werden und zusätzliche Strukturdaten für die DBD und die flexiblen Regionen des PPAR- $\beta/\delta$  gewonnen werden. Da alle PPARs strukturell ähnlich sind, wurden die gefundenen Quervernetzungen in die NMR-Struktur der DBD des PPAR- $\beta/\delta$  und in eine der drei Röntgenkristallstrukturen des PPAR- $\gamma$ -Volllängenproteins (PDB-Eintrag: 3DZU) [37] eingefügt, um Hinweise zur Strukturänderung des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins nach Ligandenbindung zu gewinnen. In dieser Röntgenkristallstruktur des PPAR- $\gamma$ -Volllängenproteins fehlt lediglich der flexible *N*-Terminus (Aminosäuren 1-102). Im ligandenfreien als auch -gebundenen Zustand wurde eine Vielzahl an Quervernetzungsprodukten mit BS<sup>2</sup>G im PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein identifiziert, insbesondere in der DBD, der *Hinge*-Region und dem flexiblen *N*-Terminus von PPAR- $\beta/\delta$  (Abbildungen 58 und 59, Tabellen 8 und A 7).

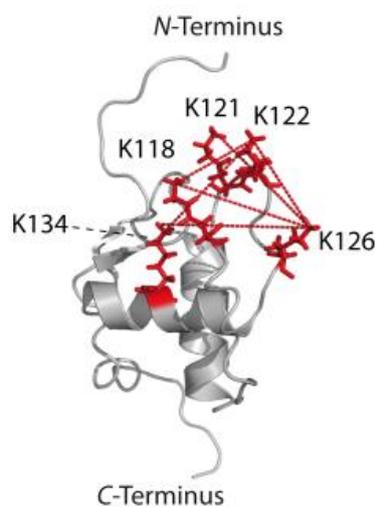


Abbildung 58: NMR-Struktur der PPAR- $\beta/\delta$ -DBD (PDB-Eintrag: 2ENV). Die gefundenen Quervernetzungen in der DBD sind, ebenso wie die beteiligten Aminosäuren, in rot dargestellt.

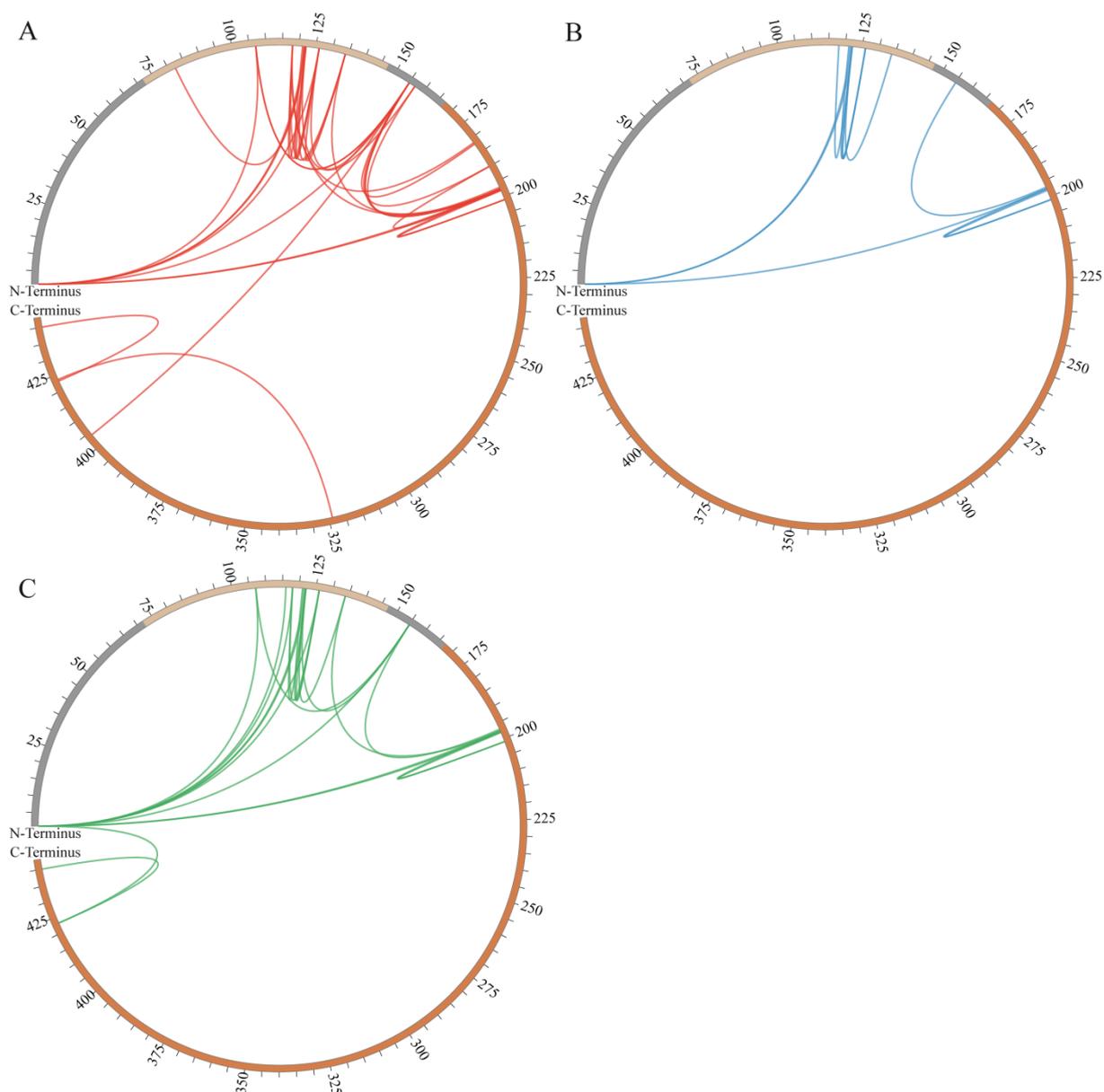


Abbildung 59: Kreisdarstellung (Circos-Plots) der identifizierten Quervernetzungsprodukte (BS<sup>2</sup>G) im PPAR-β/δ-Volllängenprotein ohne Ligand (A), mit GW0742 (B) und mit GW1516 (C).

Alle gefundenen Quervernetzungsprodukte der PPAR-β/δ-DBD sind im Einklang mit der veröffentlichten NMR-Struktur (Abbildung 58). Im ligandenfreien Zustand wurde eine Quervernetzung zwischen Lys-155 und Lys-404 gefunden. Diese Quervernetzung befindet sich in denselben Regionen wie Gly-167 und Lys-404 in den Quervernetzungsreaktionen der PPAR-β/δ-LBD mit BS<sup>2</sup>G (Abbildungen 45 und 47). Insgesamt wurden mehr Quervernetzungen im ligandenfreien Zustand identifiziert als im ligandengebundenen, was für eine höhere Flexibilität des Proteins im freien Zustand

spricht. Die Quervernetzungen aus diesen Experimenten wurden in die Röntgenkristallstruktur von PPAR- $\gamma$  (PDB-Eintrag: 3DZU) eingetragen. Es war nicht möglich, die Vernetzungsprodukte mit den 1-102 *N*-terminalen Aminosäuren in die Struktur zu übertragen, da die Röntgenkristallstruktur diese flexible Region nicht enthält. Alle Quervernetzungen, die eingetragen werden können, sind unter Annahme einer gewissen Flexibilität der beteiligten Regionen bzw. dem überbrückbaren Abstand des Quervernetzungsreagenzes BS<sup>2</sup>G in Übereinstimmung mit dieser Röntgenkristallstruktur (Abbildung 60).

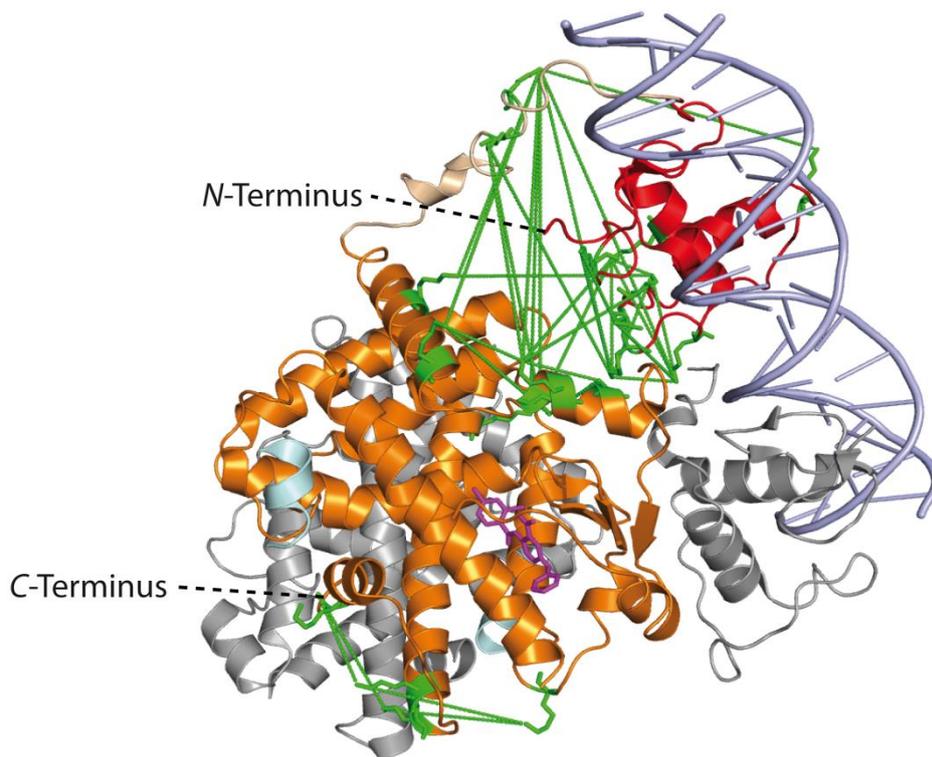


Abbildung 60: Röntgenkristallstruktur des BVT.13-gebundenen PPAR- $\gamma$  (PDB-Eintrag: 3DZU), kokristallisiert mit dem DNA-Response Element (PPRE), den Koaktivator-Peptiden (NCoA2) und RXR- $\alpha$ . Identifizierte Quervernetzungsprodukte in PPAR- $\beta/\delta$  sind in grün dargestellt, ebenso die beteiligten Aminosäuren. Die PPAR- $\gamma$ -DBD ist in rot dargestellt, die PPAR- $\gamma$ -LBD in orange, die *Hinge*-Region in weizenfarben, die DNA in hellblau, die Koaktivatoren in blasscyan und der Agonist BVT.13 in magenta.

## 5. Diskussion

### 5.1. Die verschiedenen Quervernetzungsstrategien für Konformationsstudien von Strukturen von Proteinen und Proteinkomplexen

Seit einigen Jahren ist die chemische Quervernetzung kombiniert mit Massenspektrometrie fester Bestandteil der Strukturanalytik von Proteinen und Proteinkomplexen [118]. Die Analyse der quervernetzten Produkte findet meist nach einer Trennung durch eine eindimensionale Gelelektrophorese statt. Ein Problem stellt dabei die unvollständige Extraktion der proteolytischen Spaltprodukte dar, woraus sich die meist geringe Intensität der quervernetzten Produkte in den Massenspektren ergibt. Damit trotzdem eine eindeutige massenspektrometrische Identifizierung der Quervernetzungsprodukte möglich ist, werden verschiedene Strategien angewendet, die im Weiteren diskutiert werden.

Die Entwicklung immer leistungsfähigerer Massenspektrometer, wie das Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer, ist dabei von entscheidender Bedeutung. Mit diesen modernen Geräten ist es möglich, Kombinationen verschiedener Fragmentierungsmethoden durchzuführen. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führte dies zu aussagekräftigeren Fragmentationenspektren und damit zu einer verbesserten Identifizierung der Quervernetzungsprodukte. Mit dem älteren LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer konnten Fragmentationenspektren nur niederaufgelöst in der linearen Ionenfalle aufgenommen werden. Durch die damit verbundene geringere Massengenauigkeit von 1 Da ist eine eindeutige Zuordnung der Signale, insbesondere bei höher geladenen Fragmentationen, meist nicht möglich. Damit steigt die Zahl der falsch-positiven Quervernetzungsprodukte. Gleichzeitig können die vernetzten Aminosäuren meist ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden. Im Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer wurden sowohl Vorläufer- als auch Fragmentationenspektren hochaufgelöst im Orbitrap-Analysator erhalten, wodurch die Zuordnung der Signale entscheidend verbessert wurde. Insbesondere die hohe Auflösung der Isotopensignale spielte dabei eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurden die deuterierten Varianten von BS<sup>2</sup>G und SDH eingesetzt, um aufgrund des spezifischen Massenunterschiedes Quervernetzungsprodukte eindeutig zu identifizieren. Zusätzlich wurden im Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer die deuterierten und nicht-deuterierten Vorläuferionen gemeinsam fragmentiert und

analysiert. Der Vorteil, beide Vorläuferionen gleichzeitig zu fragmentieren, besteht in dem spezifischen Massenabstand von 4 Th zwischen nicht-deutertem zu deutertem BS<sup>2</sup>G in einem einzigen Fragmentenmassenspektrum. Dadurch werden die Spektrenauswertung und die Identifizierung der Quervernetzungspositionen im Protein stark vereinfacht. Für SDH war die gemeinsame Fragmentierung der nicht-deuterten und deuterten Varianten nicht möglich, da aufgrund der 12-fachen Deuterierung des SDH die Retentionsunterschiede bei der flüssigchromatographischen Trennung der quervernetzten Peptide zu groß sind.

Eine weitere Strategie zur vereinfachten Analyse von vernetzten Peptiden wäre die Anreicherung von Quervernetzungsprodukten bzw. die Abreicherung nicht vernetzter Produkte. Eine selektive Identifizierung von Bindungspartnern eines Proteins ist dabei mit trifunktionellen Reagenzien mit Biotinanker möglich, mit deren Hilfe auch eine Anreicherung der Quervernetzungsprodukte auf Peptidebene möglich ist. Peptide können ebenfalls mittels starker Kationenaustausch- oder Größenausschlusschromatographie getrennt werden. Dabei reichern sich die Quervernetzungsprodukte aufgrund ihrer höheren Ladung in bestimmten Fraktionen an [211].

Eine weitere Möglichkeit, die Ausbeute an Quervernetzungsprodukten zu erhöhen, besteht in der Optimierung der jeweiligen Quervernetzungsreaktion. So sollten die Reaktionsbedingungen und die molare Menge an Reagenz passend zu den möglichen Angriffspunkten im Protein gewählt werden, um eine ausreichende Vernetzung der Proteine ohne Artefaktbildung zu gewährleisten. Dies konnte beispielsweise anhand von Peptidstudien unter Verwendung der Photoaminoaciden Photomethionin und Photoleucin gezeigt werden [212]. Dabei wurden die verschiedenen Peptide mit unterschiedlicher Menge UV-A-Strahlung bestrahlt, wodurch bei höheren Strahlungsdosen die Reaktionsprodukte zunahmten.

Die genannten Anreicherungsstrategien führen schlussendlich zu einer erhöhten Konzentration an Quervernetzungsprodukten und einer verbesserten Identifizierung [211].

Die aus Diazirinen nach der UV-A-Bestrahlung entstehenden hochreaktiven Carbene reagieren häufig mit dem verwendeten Lösungsmittel bzw. mit der im Molekül benachbarten Methylfunktion. Um die Ausbeute an Quervernetzungsprodukten zu erhöhen, werden neu synthetisierte Verbindungen mit Diazirinfunktionen mit Phenyl-

und/oder Trifluormethylresten verknüpft [213]. Dieses Vorgehen soll einerseits die Umlagerung des Carbens zum Alken unterbinden und andererseits das reaktive Carben stabilisieren, sodass minderreaktive Intermediate keine falsch-positiven Quervernetzungsprodukte erzeugen können. So kann eine höhere Ausbeute an Quervernetzungsprodukten erzielt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, eine Photomethionin- und Photoleucinvariante zu synthetisieren, die anstelle der endständigen Methylfunktion eine Trifluormethylfunktion enthält. Jedoch führte die Synthese nicht zum gewünschten Endprodukt. Grund hierfür waren die unterschiedlichen Reaktivitäten der Vorstufenmoleküle mit dem Trifluormethylrest, die eine Synthese nicht erlaubten.

Für den gezielten Einbau von unnatürlichen, photoreaktiven Aminosäuren in Proteine sind die Austauschpositionen von entscheidender Rolle. So sollte das Benzophenon-enthaltende Bpa gegen große, hydrophobe Aminosäuren wie Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin, bevorzugt ausgetauscht werden, da sonst die Beibehaltung der 3D-Struktur des Proteins nicht gewährleistet werden kann. Es konnte zwar anhand der RNA-Polymerase im Komplex mit Faktoren Crl und Sigma S gezeigt werden, dass ein Austausch von Arginin und Glutaminsäure zu Bpa keinen Einfluss auf Struktur und Funktion hat, doch dies sollte vermieden werden, um potentielle Ladungsträger nicht zu entfernen [214].

## **5.2. Strukturuntersuchungen an der PPAR- $\alpha$ -LBD**

### **5.2.1. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit heterobifunktionellen Reagenzien**

Anhand vorhergehender Quervernetzungsstudien und Röntgenstrukturanalysen der PPAR- $\alpha$ -LBD war bereits eine Strukturänderung unter Ligandenbindung gezeigt worden [210]. Da diese Studien mit aminreaktiven Reagenzien durchgeführt worden waren, sollten mit heterobifunktionellen, amin-/photoreaktiven Substanzen weitere Strukturinformationen der PPAR- $\alpha$ -LBD im freien und ligandengebundenen Zustand erhalten werden. Die Verwendung des SBC-Reagenz führte jedoch zu Proteinverlusten und keinen Quervernetzungsprodukten. Proteinverluste können entstehen, da durch die spezifische Reaktion mit den Lysinseitenketten der PPAR- $\alpha$ -LBD die zugängliche Oberfläche mit dem hydrophoben Reagenz modifiziert wird, was zu einer Strukturänderung der PPAR- $\alpha$ -LBD führt. Da aufgrund der Dimerisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD keine proteolytische Spaltung in Lösung durchgeführt werden konnte, war ein

Verlust an quervernetzten Peptiden durch die Extraktion aus den Gelbanden nach der SDS-PAGE-Analyse nicht vermeidbar. Die Optimierung der Konzentration an Quervernetzungsreagenz bzw. der Reaktionszeit könnte hier zu vielversprechenderen Ergebnissen führen.

### **5.2.2. Chemische Quervernetzung der PPAR- $\alpha$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz EDC/Sulfo-NHS**

Die Experimente der PPAR- $\alpha$ -LBD mit dem Kopplungsreagenz EDC/Sulfo-NHS führten nicht zu eindeutigen Quervernetzungsprodukten. Zu diesem Zeitpunkt war es nicht möglich, Fragmentenmassenspektren hochauflösend im Orbitrap-Analysator zu analysieren, wodurch eine eindeutige Unterscheidung der teils hochgeladenen Quervernetzungsprodukte unmöglich war. Eine Unterscheidung wäre mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS) denkbar, da in der *Drift*-Röhre isobare Spezies anhand ihrer *Collisional-Cross-Section* (CCS) getrennt werden können. Bei der CCS handelt es sich um eine physikochemische Eigenschaft der Ionen, die abhängig von ihrer chemischen Struktur und Konformation ist [215]. Isobare Spezies mit unterschiedlichen CCS-Werten können dadurch in der *Drift*-Röhre voneinander getrennt und analysiert werden. Dies könnte für die Unterscheidung der hydrolysierten und quervernetzten Spezies hilfreich sein. Mit IM-MS wurden beispielsweise verschiedene isomere Glykane voneinander getrennt und analysiert [216].

### **5.2.3. Strukturuntersuchungen anhand der Varianten der PPAR- $\alpha$ -LBD-Varianten**

#### **5.2.3.1. Bpa-Varianten**

Der Einbau von Bpa in Proteine konnte erstmals am Chromatin Remodeling-Enzym ISWI gezeigt werden [217]. Der Einbau von Bpa anstelle der natürlichen Aminosäuren Leu-258 und Phe-273 in PPAR- $\alpha$ -LBD war ein Erfolg, jedoch war die Ausbeute an Protein sehr unterschiedlich. Die Variante L460Bpa, in der Leu-460 gegen Bpa ausgetauscht werden sollte, konnte nicht exprimiert werden. Ein Austausch von Leucin zu Bpa führt vermutlich zu instabiler PPAR- $\alpha$ -LBD und somit zum Abbau des Proteins.

In den Varianten L258Bpa und F273Bpa konnten nach Bestrahlung mehrere Quervernetzungsprodukte identifiziert werden (Abbildungen 35 und 36). In einigen Fällen war es aufgrund der geringen massenspektrometrischen Intensitäten der Vorläuferionen, der ungenügenden Fragmentierung und der niederaufgelösten

Fragmentationenspektren nicht möglich, die genaue Position der Quervernetzung zu identifizieren. Mit Variante L258Bpa wurde eine geringfügigere Konformationsänderung in An- und Abwesenheit der Liganden GW6471 und GW7647 im Vergleich zu Variante F273Bpa festgestellt. Grund hierfür könnte sein, dass sich Leu-258 auf der hochflexiblen  $\Omega$ -Schleufe befindet, die sowohl in ligandenfreiem als auch -gebundenem Zustand verschiedene Konformationen annehmen kann.

Einige der Produkte ergaben jedoch einen Hinweis auf eine Strukturänderung der PPAR- $\alpha$ -LBD nach Ligandenbindung. Dazu zählen die beiden Vernetzungsprodukte zwischen Bpa-258 und Asn-217 sowie Tyr-214, wobei Asn-217 im ligandenfreien und Tyr-214 im Antagonist-gebundenen Zustand, jedoch nicht im Agonist-gebundenen Zustand, identifiziert wurden (Abbildung 35). Auch die Vernetzung zwischen Bpa-273 und den Aminosäuren 210-213 wurde im freien als auch ligandengebundenen Zustand gefunden (Abbildung 36). Diese Vernetzungen können nur mit einer starken Konformationsänderung erklärt werden, in der die Helix 1 der photoreaktiven Aminosäure Bpa-258 näher kommt. Eine Erklärung könnte sein, dass sich nach Bindung des Antagonisten GW6471 die  $\Omega$ -Schleufe in Richtung Tyr-214 bewegt, wodurch Bpa und Tyr-214 vernetzt werden können (Abbildung 35). Eine tiefgreifende Änderung der Konformation konnte für die PPAR- $\alpha$ -LBD nach Bindung des Antagonisten GW6471 schon in früheren Studien mit aminreaktiven Reagenzien gezeigt werden [210]. Überraschend war, dass im ligandenfreien Zustand eine Vernetzung von Bpa-258 zu Asn-217 gefunden wurde, was vermuten lässt, dass diese Konformation auch im freien Zustand vorliegt (Abbildung 35). NMR-Studien an freiem als auch Ligandengebundenem PPAR- $\alpha$  zeigten eine Stabilisierung der Konformation nach Ligandenbindung [43]. Dies konnte anhand der in dieser Arbeit erstellten Quervernetzungsdaten bestätigt werden. Im Prinzip sind die für die PPAR- $\alpha$ -L258Bpa-Variante im freien als auch ligandengebundenen Zustand gefundenen Quervernetzungen identisch, jedoch kann anhand der höheren Anzahl der Quervernetzungsprodukte von einer leicht erhöhten Flexibilität der PPAR- $\alpha$ -LBD im ligandenfreien Zustand ausgegangen werden (Abbildungen 35 und 36 und Tabelle 6).

Für die Variante PPAR- $\alpha$ -F273Bpa wurden mehrere Produkte im ligandenfreien Zustand gefunden, insbesondere zwischen Helices 1 und 2 und der  $\Omega$ -Schleufe (Abbildung 36 und Tabelle 6). Dies spricht für das Vorhandensein verschiedener, gleichzeitig auftretender

Konformationen. Die gefundenen Quervernetzungsprodukte reduzieren sich drastisch unter Ligandenbindung, was den Schluss zulässt, dass nach Ligandenbindung, unabhängig ob Agonist oder Antagonist, bestimmte Konformationen des PPAR- $\alpha$ -LBD stabilisiert werden.

Es wurde bereits beschrieben, dass die C-terminale Helix 12, auch Aktivierungsfunktionshelix 2 (AF2) genannt, in Abwesenheit von Liganden eine stabile, aktive Konformation einnehmen kann [6]. Die Transkriptionsaktivität von PPAR- $\alpha$  wird durch die Position dieser Helix durch Interaktionen mit Liganden beeinflusst. Anhand der gefundenen Quervernetzungen (Tabellen 6, A 2 und A 3) kann allerdings keine Aussage über die Position der AF2 im freien und ligandengebundenen Zustand getroffen werden. Dafür müssten weitere Bpa-Varianten generiert werden, bei denen ein Aminosäureaustausch direkt in der AF2 stattfindet. Des Weiteren sollten Koaktivatoren oder -repressoren mit in die Experimente eingebunden werden, um Aussagen über die in der Zelle vorkommende Konformation zu treffen.

In MALDI-TOF-MS-Messungen der intakten PPAR- $\alpha$ -LBD im freien und ligandengebundenen Zustand wurde nach UV-A-Bestrahlung bei beiden Bpa-Varianten eine Massenverschiebung nur nach Bindung des Agonisten GW7647 beobachtet. Dies lässt eine unterschiedliche Bindung der beiden Liganden vermuten, da bei dem Antagonisten GW6471 keine Massenverschiebung beobachtet wurde (Abbildung 38). Der Agonist GW7647 muss sich sowohl in der Nähe von Bpa-258 ( $\Omega$ -Schlaufe), als auch von Bpa-273 (nahe der Bindungstasche) befinden (Abbildungen 36 und 38). Die Quervernetzung zu dem Agonisten GW7647 könnte neben einer starren Konformation ein Grund dafür sein, dass eine geringe Anzahl an Quervernetzungen zwischen Bpa und Aminosäuren der PPAR- $\alpha$ -LBD gefunden wurden. Interessanterweise wurde der Antagonist GW6471 nach UV-A-Bestrahlung nicht kovalent an die PPAR- $\alpha$ -LBD gebunden, dennoch wurden weniger Quervernetzungsprodukte identifiziert (Tabelle 6), was wiederum für eine starre Konformation nach Ligandenbindung spricht, die sich jedoch strukturell je nach Ligand unterscheidet. Die beschriebene Studie an den LBDs der Kernrezeptoren würde dies bestätigen [20]. In dieser Studie wurden verschiedene Substanzen auf ihr Bindungsverhalten an die Estrogenrezeptoren- $\alpha$  und - $\beta$  und den PPAR- $\gamma$  untersucht. Dabei konnte beispielsweise gezeigt werden, dass PPAR- $\gamma$  in der Lage ist, mehrere solcher kleinen Liganden zu binden. Dabei konnten zwei Bindungstaschen identifiziert werden, wobei Agonisten mit beiden Bindungstaschen

interagieren und partielle Agonisten nur mit einer Bindungstasche. Die drei untersuchten Kernrezeptoren stellten dabei eine Auswahl dar, doch die gefundenen Ergebnisse lassen sich aufgrund der starken Homologie der LBDs auf alle Kernrezeptoren übertragen.

#### 5.2.3.2. TfmdF-Varianten

Die Diazirin-enthaltende Aminosäure TfmdF konnte in anderen Studien bereits erfolgreich in kleine Proteine eingebaut werden [199]. Die Expression und Reinigung der TfmdF-enthaltenden Fraktionen war nur bedingt erfolgreich, da die Ausbeuten an Protein gering waren und kein sauberes Protein erhalten werden konnte. Die Reaktionsbedingungen sowie die Konzentrationen an Induktionsmittel und photoaktivierbarer Aminosäure wurden von den Experimenten mit Bpa übernommen, jedoch war die Aminosäure TfmdF anschließend nur in geringen Konzentrationen im Medium vorhanden. Da die Diazirinfunktion in TfmdF hochreaktiv ist, war zudem unklar, welcher Anteil der Aminosäure durch UV-A-Licht aktiviert wurde und wieviel zum Alken umgewandelt wurde. Da die beiden Reinigungsschritte nicht zu sauberem Protein führten, wurden alle Zielprotein-enthaltenden Fraktionen vereint und damit die Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Durch die hohe Anzahl an kontaminierenden Proteinen musste hier ebenfalls auf eine *in-Lösungs*-Spaltung verzichtet werden, da isobare Spezies vorlagen und schlussendlich falsch-positive Resultate nicht auszuschließen waren. Die *in-Gel*-Spaltungen führten zu keinen eindeutigen Quervernetzungsprodukten. Die Gründe hierfür liegen einerseits im Verlust der proteolytischen Spaltpeptide während der Extraktion, andererseits in den unbekanntem Fragmentierungseigenschaften der TfmdF-quervernetzten Peptide. Aufgrund der geringen Menge der zur Verfügung stehenden Aminosäure TfmdF konnten die Fragmentierungsexperimente nicht weitergeführt werden. Die intakte Form von TfmdF konnte in keiner der beiden Varianten nachgewiesen werden. Höchstwahrscheinlich reagierte das Diazirin in TfmdF bereits während der Vorbereitung für die SDS-PAGE-Analyse und anschließender *in-Gel*-Spaltung durch das Umgebungslicht ab. Zwar wurden alle Experimente unter Lichtausschluss durchgeführt, jedoch war dies beim Ausschneiden der entsprechenden Gelbanden nicht komplett möglich. Der Einbau von TfmdF konnte bei beiden Varianten L258TfmdF und F273TfmdF anhand des umgewandelten Alkens und des Reaktionsproduktes mit Wasser bestätigt werden. Für weitere Experimente sollten daher zuvor die Fragmentierungseigenschaften der TfmdF-quervernetzten Peptide untersucht werden. Ebenfalls könnte eine Anreicherung der mehrfach geladenen,

quervernetzten Produkte durch eine Kationenaustausch- oder Größenausschlusschromatographie zu einer Identifizierung von Quervernetzungsprodukten mit TfmdF führen.

#### **5.2.4. Dimerisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD**

In allen Experimenten der PPAR- $\alpha$ -LBD wurde nach der SDS-PAGE-Analyse eine Dimerisierung der PPAR- $\alpha$ -LBD beobachtet, die mittels Größenausschlusschromatographie verifiziert wurde (Abbildungen 42 und 43). Eine Aussage über die Struktur des Homodimers war nicht möglich, da keine Quervernetzungsprodukte mit sequenzgleichen Peptiden identifiziert wurden. Alle anderen Vernetzungsprodukte könnten ebenfalls von einem Monomer herrühren. Um die Struktur des Dimers eindeutig aufzuklären, ist eine Markierung des Proteins mit schweren Isotopen wie  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^{18}\text{O}$  unerlässlich. Die Strukturaufklärung der PPAR- $\alpha$ -LBD-Dimere wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

#### **5.3. Strukturuntersuchungen an PPAR- $\beta/\delta$**

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD sollte als zweites Zielprotein analog zur PPAR- $\alpha$ -LBD hinsichtlich Konformationsänderungen nach Ligandenbindung untersucht werden. Dazu wurde die Expression in *E.coli* und die Reinigung der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD optimiert. Dabei eluierte die mit einem Strep-tag II exprimierte PPAR- $\beta/\delta$ -LBD in der sehr spezifischen Affinitätsreinigung sowohl in den Wasch- als auch in den Elutionsfraktionen, was zu Proteinverlusten führte (Abbildung 44). Ein Grund hierfür könnte die Abschwächung der Interaktion des Strep-tags II mit der Streptavidinmatrix durch eine zu kurze Aminosäurekette zwischen dem Strep-tag II und dem Zielprotein sein. Aufgrund der Flexibilität der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD könnte die Bindung des Strep-tags II zur Streptavidinmatrix so teilweise unterbunden werden. Hierfür wäre ein Linker aus mehreren Aminosäuren, wie Glycin oder Serin, zwischen dem Strep-tag II und PPAR- $\beta/\delta$ -LBD hilfreich. Zudem wäre auch die Erweiterung zu einem doppelten Strep-tag II zur Verbesserung der Bindung an das Säulenmaterial denkbar. Dadurch könnten Reinigungsverluste möglicherweise vermieden werden. Dennoch konnten sowohl die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD als auch die vier Bpa-Varianten, erfolgreich gereinigt und für Quervernetzungsexperimente genutzt werden.

### 5.3.1. Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit aminreaktiven Reagenzien

Die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD wurde in An- und Abwesenheit der Liganden mit dem aminreaktiven Reagenz BS<sup>2</sup>G vernetzt und es konnte eine Vielzahl an Quervernetzungsprodukten identifiziert werden. Insbesondere nach der Ligandenbindung wurden mehrere Quervernetzungsprodukte zwischen der *N*-terminalen Aminosäure Gly-167 und verschiedenen Lysinen der isolierten PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gefunden (Abbildungen 47 und A 1 und Tabelle 8). Einige dieser Produkte sind nicht im Einklang mit der veröffentlichten Röntgenkristallstruktur, in der die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem Agonisten GW0742 kokristallisiert wurde (PDB-Eintrag: 3TKM). Sie können nur mit einer hohen Flexibilität der *N*-terminalen Region der LBD erklärt werden. Als Beispiele dienen die im ligandengebundenen Zustand gefundenen Quervernetzungen zwischen Gly-167 und Lys423/424 in der *C*-terminalen Region der Helix 11 bzw. Lys-324 in der *N*-terminalen Region der Helix 8 (Abbildungen 45 und 47). Des Weiteren wurden im Agonist GW0742-gebundenen Zustand mehrere Quervernetzungsprodukte zwischen Gly-167 und Lys-440 in der AF2 sowie zwischen den Lysinen Lys-197/198 (Helix 2) und Lys-324 (*N*-terminale Region der Helix 8) gefunden. Interessanterweise wurde im GW1516-gebundenen Zustand eine Quervernetzung von Gly-167 zu Lys-231 in der hochflexiblen  $\Omega$ -Schleufe identifiziert. Diese Quervernetzung kann mit einer starken Konformationsänderung nach Ligandenbindung erklärt werden, sodass die  $\Omega$ -Schleufe in räumlicher Nachbarschaft zur *N*-terminalen Region kommt (Abbildung 47).

Ebenfalls wurden Vernetzungen im ligandengebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gefunden, die durch die überbrückbare Länge von BS<sup>2</sup>G von bis zu 27 Å erklärbar sind [182, 184]. Dazu zählen die Vernetzungen zwischen Gly-167 und Lys-404 (*N*-terminale Region der Helix 11) und Lys-267 (*C*-terminale Region der Helix 4) (Abbildungen 45 und 47). Der Hinweis, dass diese Quervernetzungen nicht im freien Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD identifiziert wurden, lassen den Schluss zu, dass verschiedene Konformationen durch die Ligandenbindung stabilisiert werden.

Zusätzlich wurden Quervernetzungsexperimente mit dem MS-spaltbaren Urea-Linker durchgeführt [186]. Dabei wurden im freien Zustand die gleichen Regionen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD vernetzt wie mit BS<sup>2</sup>G. Interessanterweise reduzierte sich die Zahl der gefundenen Quervernetzungen drastisch im ligandengebundenen Zustand (Abbildungen 50 und A 2, Tabellen 8 und A 5). Dies spricht für eine starrere Konformation der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD nach Ligandenbindung.

### 5.3.2. Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem carboxylreaktiven Reagenz SDH und dem Kopplungsreagenz DMTMM

Zusätzlich zu den aminreaktiven Reagenzien wurden SDH- $D_0/D_{12}$  in Kombination mit DMTMM verwendet. Carboxylreaktive Reagenzien wie SDH wurden erstmals verwendet, um zusätzliche Strukturinformationen aus sauren Regionen des Chaperonkomplexes TRiC/CCT und des 26S-Proteasoms zu erhalten [187]. Für die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gelang dies jedoch nicht. Zum einen ist die Reaktion der Carboxylfunktionen mit DMTMM bei neutralem pH-Wert langsam, zum anderen ist die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD stark flexibel, wodurch die Reaktion zwischen den Carboxylfunktionen nicht stattfinden konnte. Da SDH das Kopplungsreagenz DMTMM als Katalysator benötigt, DMTMM aber selbst direkt Amin- mit Carboxylfunktionen verbindet, erklärt dies einerseits die fehlenden Quervernetzungsprodukte durch SDH und andererseits die Bildung mehrerer Quervernetzungsprodukte durch DMTMM. Die Reaktion mit DMTMM findet somit schneller statt als mit SDH, wodurch potentielle Bindungsstellen für SDH entfernt werden. Überraschenderweise konnte kein mit SDH-modifiziertes Protein nachgewiesen werden. Daher wurden Experimente nachfolgend nur mit DMTMM durchgeführt. Dabei wurden sowohl im freien, als auch ligandengebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD eine Vielzahl an Quervernetzungen identifiziert (Abbildungen 52 und A 3, Tabellen 8 und A 5). In allen Zuständen wurde eine Vernetzung zwischen Gly-167 und Glu-264 (C-terminale Region der Helix 4) gefunden. Diese Region wurde ebenfalls mit BS<sup>2</sup>G im ligandengebundenen Zustand identifiziert (Abbildung 47). Das lässt den Schluss zu, dass sich die N-terminale Region der LBD an Helix 4 annähern muss, damit Quervernetzungen mit BS<sup>2</sup>G und DMTMM, welches einen C $\alpha$ -C $\alpha$ -Abstand von ca. 10 Å überbrücken kann, entstehen können. Im Agonist GW0742-gebundenen Zustand wurden zwei zusätzliche Quervernetzungsprodukte innerhalb der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD identifiziert. Dabei wurde Gly-167 mit dem C-Terminus der LBD und mit Glu-331 (in Helix 8) vernetzt. Beide Vernetzungen können nicht mit der veröffentlichten Röntgenkristallstruktur erklärt werden und bestätigen wiederum eine Stabilisierung einer spezifischen Konformation, in der sich der N-Terminus den Helices 4 und 8 annähert (Abbildungen 45 und 52). Interessanterweise wurden diese Vernetzungen nicht im GW1516-gebundenen Zustand der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD identifiziert, was auf mögliche verschiedene Bindungsmodi der Agonisten hindeutet.

### **5.3.3. Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit heterobifunktionellen Reagenzien**

Für die Quervernetzung von PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit dem heterobifunktionellen Reagenz Sulfo-SDA wurden keine Produkte identifiziert. Leider konnte der Strep-tag II nicht vollständig vom Fusionsprotein entfernt werden, wodurch zwei Proteinvarianten vorlagen. Zudem wurde die Stabilität der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD selbst bei niedrigen Temperaturen auf einen Tag abgeschätzt, da nach zwei Tagen eine Präzipitation des Proteins beobachtet werden konnte. Weiterhin wurde in den Umpufferungsschritten zur Entfernung des für die Affinitätsreinigung eingesetzten d-Desthiobiotin ein Proteinverlust verzeichnet, wodurch sich die absolute Proteinmenge verringerte. Es wurde kontrolliert, ob das Diazirin des Sulfo-SDA durch Lichteinfluss vor der Quervernetzungsreaktion schon zum Alken reagiert hatte, jedoch wurde fast nur das intakte Reagenz mittels Nano-ESI-MS identifiziert.

### **5.3.4. Strukturuntersuchungen der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mittels photoaktivierbarer Aminosäuren**

Die Varianten F180Bpa, F192Bpa, F213Bpa und Y443Bpa konnten in unterschiedlichen Mengen in *E.coli* exprimiert und gereinigt werden. Nur für die Variante F248Bpa konnte kein Bpa-Einbau erzielt werden. Höchstwahrscheinlich wird die Struktur der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD durch den Austausch des Phe-248 zu Bpa zu stark verändert, sodass das Protein rasch abgebaut wird. Es konnte gezeigt werden, dass Phe-248 bei der Bindung des Agonisten GW0742 eine wichtige Rolle spielt [218]. Da diese Position entscheidend für die Bindung und die damit einhergehende Konformationsänderung nach Ligandenbindung ist, könnte dies eine Erklärung für den fehlenden Bpa-Einbau an Position 248 darstellen. Interessanterweise gelang die Expression der PPAR- $\alpha$ -LBD-Variante F273Bpa, bei der ein Austausch an der entsprechenden Position stattfand. Trotz der konservierten Position, die in allen drei PPARs vorhanden ist, scheint die Stabilisierung des gesamten Proteins nach Bpa-Austausch unterschiedlich zu sein.

Die Ausbeuten für die beiden Varianten F192Bpa und F213Bpa war am geringsten. Es scheinen hier ebenfalls strukturelle Eigenschaften der Austauschpositionen eine entscheidende Rolle zu spielen, inwiefern eine bestimmte Variante exprimiert werden kann. Nach der Bestrahlung mit UV-A-Licht konnten keine Quervernetzungsprodukte mit diesen beiden Varianten identifiziert werden. Die Bpa-Austauschpositionen beider

Varianten liegen in flexiblen Regionen. So liegt die unnatürliche Aminosäure bei Variante F192Bpa zwischen den Helices 1 und 2, bei Variante F213Bpa hingegen auf einem Teil der flexiblen  $\Omega$ -Schleufe (Abbildung 45). F192Bpa befindet sich in der Region, in der mit BS<sup>2</sup>G die meisten Quervernetzungen gefunden wurden (Abbildungen 45 und 47 und Tabelle 8). F213Bpa befindet sich hingegen in großer räumlicher Nähe zu Lys-231, das mit BS<sup>2</sup>G in Experimenten mit dem Agonisten GW1516 vernetzt wurde. Die Gründe für eine fehlende Identifizierung von Quervernetzungsprodukten können vielfältig sein. Einerseits könnten verschiedene Produkte entstanden sein, sodass die Intensitäten der einzelnen Vorläuferionen zu intensitätsschwach sind, um auswertbare Fragmentenmassenspektren zu erhalten. Andererseits wurde beobachtet, dass mit Bpa vernetzte Peptide vor der Fragmentierung im Massenspektrometer an der Vernetzungsstelle einen Wasserverlust erleiden, wodurch die absoluten Intensitäten der einzelnen Produkte verringert wurden. Des Weiteren unterliegt die PPAR- $\beta$ -LBD an bestimmten Positionen Deamidierungs- und Oxidationsreaktionen, wodurch eine Vielzahl an Vorläuferionen entstehen, die die Signalintensität des Quervernetzungsproduktes verringern. Insbesondere die Region um Bpa-192 ist ungeordnet und somit anfällig für Deamidierungs- und Oxidationsreaktionen.

Die Varianten F180Bpa und Y443Bpa hingegen konnten mit akzeptablen Ausbeuten erhalten werden. F180Bpa liegt auf Helix 1 in der Region des flexiblen *N*-Terminus, welcher im ligandengebundenen Zustand mit BS<sup>2</sup>G häufig vernetzt gefunden wurde (Abbildungen 45 und 47). Y443Bpa entspricht dem *C*-Terminus der AF2 und wurde ausgewählt, um Strukturänderungen der AF2 nachvollziehen zu können. Nach UV-A-Bestrahlung wurden nur wenige Quervernetzungen identifiziert, was die Selektivität dieser Quervernetzungsstrategie widerspiegelt. Die meisten der gefundenen Quervernetzungsprodukte wurden sowohl im freien als auch ligandengebundenen Zustand identifiziert (Abbildungen 56 und A 4, Tabellen 8 und A 6). Für die PPAR- $\beta/\delta$ -LBD Variante F180Bpa konnte eine Quervernetzungsstelle zwischen Bpa-180 und Ile-379 (Helix 10) identifiziert werden. Eine Quervernetzung innerhalb der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD-Variante Y443Bpa wurde nur im ligandenfreien Zustand identifiziert. Dabei handelt es sich um die Vernetzung zwischen Bpa-443 (AF2) mit Ile-330 (Helix 8). Interessanterweise wurde keine Quervernetzung zwischen der AF2 und der  $\Omega$ -Schleufe gefunden. Dies weist darauf hin, dass beide Helices nach Ligandenbindung nicht in räumliche Nähe kommen, was ebenfalls im Einklang mit der veröffentlichten

Röntgenkristallstruktur steht [218]. Zudem wurde ebenfalls keine Quervernetzung zwischen Bpa-180 mit dem C-Terminus identifiziert. Dies könnte bedeuten, dass sich nur ein kleiner Teil des flexiblen N-Terminus nach Bindung des Agonisten GW0742 in Richtung des C-Terminus orientiert. Für diese Hypothese spricht auch, dass keine Vernetzungsprodukte zwischen Bpa-180 und den Regionen der Helices 8 und 11 identifiziert wurden (Abbildung 45).

### **5.3.5. Fragmentierungsexperimente der Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD**

Die Fragmentierungseigenschaften der quervernetzten Peptide sind entscheidend für eine sichere Identifizierung der Quervernetzungsstellen und somit für die Erstellung von Strukturmodellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass N-terminale bzw. oxidierte, mit Bpa modifizierte, Methionine ein außergewöhnliches Fragmentierungsverhalten zeigen [219]. Die Fragmente können dabei nur durch einen Bruch der neu gebildeten kovalenten Bindung zwischen Methionin und Bpa entstehen. Zudem wurden dominante Wasserverluste im Fragmentenmassenspektrum beobachtet. Um die Fragmentierung und damit die Identifizierung der Bpa-Quervernetzungsprodukte besser zu verstehen, wurde die Variante F180Bpa der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD gewählt, da sie in größeren Mengen exprimiert werden konnte. In den Photoaffinitätsmarkierungsstudien wurde eine spezifische Quervernetzung zwischen Bpa-180 zu Ile-379 gefunden. Die mit dem Orbitrap Fusion Tribrid-Massenspektrometer verfügbaren Fragmentierungsmethoden CID, HCD, ETD, ETciD und ETHcD eigneten sich, um dieses spezifische Quervernetzungsprodukt zu identifizieren. In der Analyse der Quervernetzungsprodukte fielen dabei Vorläuferionen auf, die einen Wasserverlust zeigten und die nach der Fragmentierung zu annähernd identischen Spektren führten (Abbildungen A 5 bis A 14). Mittels CID wurden mehrere Ionen mit Wasserverlusten detektiert. Interessanterweise wurden diese erst ab der Bpa-Quervernetzungsstelle detektiert (Abbildung A 5). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Alkoholfunktion der Bpa-vernetzten Position in der Gasphase protoniert vorliegt und schon bei geringer Kollisionsenergie ein Wasserverlust auftritt. Dies wird durch das Fragmentenmassenspektrum der durch Wasserverlust erhaltenen Spezies bestätigt (Abbildung A 6). Hier sind ebenfalls dieselben Peptidfragmente die intensivsten Signale, jedoch ist kein Wasserverlust zu beobachten. Das bestätigt die Hypothese, dass dieser spezifische Wasserverlust nicht vom Peptidrückgrat herrührt, sondern von der vernetzten Aminosäure Bpa. Mit HCD wurden

Fragmentationenmassenspektren erhalten, in denen eine Vielzahl an internen Fragmenten zu verzeichnen war (Abbildungen A 7 und A 8). Höchstwahrscheinlich war die normalisierte Kollisionsenergie mit 35 % zu hoch und sollte daher in späteren Experimenten verringert werden, um bessere Daten zu erhalten. Die Fragmentierungsmethoden ETD, ETciD und EThcD führten allesamt zu einer verbesserten Fragmentierung des Peptids. Durch die Vielzahl an c- und z- Ionen ist das Spektrum einerseits komplexer auszuwerten, enthält aber andererseits mehr Informationen über das Quervernetzungsprodukt (Abbildungen A 9 bis A 14). Die in dieser Arbeit verwendete StavroX-Software [208] ist in der Lage, ebenfalls c- und z- Ionen sowie deren Varianten (c', z', z'') zu berücksichtigen, allerdings ist eine manuelle Auswertung unverzichtbar.

In zukünftigen Experimenten sollte eine ETD-basierte Fragmentierungsmethode zum Einsatz kommen, um Quervernetzungsstellen von höher geladenen Vorläuferionen eindeutig zu identifizieren. Zusätzlich sollte Bpa mit <sup>13</sup>C-Isotopenmarkierung eingesetzt werden, um anhand des Isotopenmusters die Quervernetzungsprodukte eindeutig zu belegen. Um die Eliminierung der Alkoholfunktion zu bestätigen, würde sich eine <sup>18</sup>O-Isotopenmarkierung des Benzophenonrings eignen.

### 5.3.6. Strukturuntersuchungen am PPAR-β/δ-Volllängenprotein

Um die Quervernetzungsdaten der PPAR-β/δ-LBD mit den verschiedenen Reagenzien zu bestätigen, wurde das PPAR-β/δ-Volllängenprotein mit BS<sup>2</sup>G in An- und Abwesenheit der Liganden GW0742 und GW1516 vernetzt. Bisher existieren von PPAR-β/δ lediglich Röntgenkristallstrukturen der LBD sowie eine NMR-Struktur der DBD von PPAR-β/δ. Da die drei Subtypen der PPARs strukturell verwandt sind, kann für die Beurteilung der Quervernetzungsprodukte in PPAR-β/δ die Struktur des Volllängenproteins von PPAR-γ (PDB-Eintrag: 3DZU) herangezogen werden [37]. In der genannten Röntgenkristallstruktur fehlt allerdings die hochflexible Region des N-Terminus (Aminosäuren 1-102). Nach der Reaktion mit BS<sup>2</sup>G wurden viele Vernetzungsprodukte identifiziert, insbesondere in der flexiblen *Hinge*-Region und der DBD (Abbildungen 58, 59 und 60, Tabellen 8 und A 7). Im ligandenfreien Zustand wurde ein Vernetzungsprodukt zwischen Lys-155 (*Hinge*-Region) und Lys-404 (Helix 11) identifiziert. Diese Vernetzung weist auf dieselben Regionen hin wie die Quervernetzung von Gly-167 und Lys-404 in der PPAR-β/δ-LBD (Abbildung 47). Die Tatsache, dass

dieses Quervernetzungsprodukt sowohl im freien, als auch im ligandengebundenen Zustand identifiziert wurde, deutet an, dass diese spezifische Konformation unabhängig vom jeweiligen Liganden ist. Vermutlich sind der *N*-Terminus und die Helix 1 der isolierten PPAR- $\beta/\delta$ -LBD flexibler als im PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein und daher einer stärkeren Konformationsänderung nach Ligandenbindung unterworfen. Im GW1516-gebundenen Zustand wurde eine Quervernetzung zwischen dem *N*-Terminus und Lys-423 (AF2) in der LBD des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins gefunden (Abbildung 60). Das lässt vermuten, dass sich nach Bindung von GW1516 die *N*- und *C*-Termini in direkter Nachbarschaft zueinander befinden. Interessanterweise wurde diese Vernetzung nicht im GW0742-gebundenen Zustand gefunden, was jedoch nicht bedeutet, dass diese Vernetzung nicht vorlag. Um detailliertere Aussagen über die Konformationsänderungen im PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein nach Bindung der einzelnen Liganden treffen zu können, sind weitere Experimente notwendig.

Zusammenfassend geben die Daten der Quervernetzungsstudien erste Einblicke in Konformationsänderungen im PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein nach Ligandenbindung. In den letzten Jahren wurden drei Röntgenkristallstrukturen von Kernrezeptoren (PDB-Einträge: 3DZU, 3DZY und 3E00) veröffentlicht. Diese zeigen eine Interaktion der DBDs und LBDs [1, 37, 220, 221]. Die Daten dieser Arbeit bestätigen und erweitern diese hochaufgelösten Strukturen, indem sie Informationen zur Interaktion der DBD und LBD von PPAR- $\beta/\delta$  in Lösung liefern. Wie bereits erwähnt, existieren bisher keine hochauflösenden Strukturen des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins. Daher wurden die mit BS<sup>2</sup>G für das PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein erhaltenen Quervernetzungen in die Röntgenkristallstruktur von PPAR- $\gamma$  (gebunden an einen Liganden und kokristallisiert mit dem *DNA-Response Element*, den Koaktivatorpeptiden und dem RXR- $\alpha$  (PDB-Eintrag: 3DZU)) eingetragen. Alle gefundenen Quervernetzungen in der DBD, zwischen DBD und LBD sowie zwischen der *Hinge*-Region und DBD bzw. LBD sind im Einklang mit dieser veröffentlichten Röntgenkristallstruktur (Abbildung 60). Ein Quervernetzungsprodukt mit einer Länge von 40,8 Å zwischen der *Hinge*-Region und der Helix 11 in der LBD kann durch die hohe Flexibilität der *Hinge*-Region leicht erklärt werden. Somit wurden mit Hilfe der chemischen Quervernetzung und MS erste strukturelle Informationen über die hochflexible *N*-terminale Region des PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenproteins erhalten.

## 6. Ausblick

Die massenspektrometrische Strukturanalyse der isolierten Ligandenbindungsdomänen von PPAR- $\alpha$  und PPAR- $\beta/\delta$  nach Bindung spezifischer Liganden erlaubte Einblicke in Konformationsänderungen nach Ligandenbindung. Durch den Einbau der photoreaktiven Aminosäure Bpa an definierten Positionen der PPARs konnten spezifische Konformationsänderungen nachvollzogen werden. Um die Identifizierung der gebildeten Quervernetzungsprodukte zu erleichtern sollten isotoopenmarkierte photoreaktive Aminosäuren zur Anwendung kommen. Für weitere Quervernetzungsexperimente sollten die Vollängenproteine der PPARs zum Einsatz kommen. Dadurch könnten in naher Zukunft, durch Verständnis der kompletten Struktur, die Wirkungen und unerwünschten Wirkungen der PPARs erklärt und vorhersagbar sein. Zudem wird es möglich werden, neue Arzneistoffe mit Hilfe der Quervernetzungsreaktionen auf ihr Bindeverhalten an den PPARs zu untersuchen. Ein Verständnis der 3D-Struktur der Heterodimere aus PPARs und RXRs mit ihren jeweiligen Bindungspartnern ist unerlässlich für die Vorhersage der PPAR-Wirkung *in vivo*. Da für die Analyse dieser Komplexe nur geringe Proteinmengen und Zeit benötigt werden, sollte die Technik der chemischen Quervernetzung und Massenspektrometrie für die Analyse der PPAR/RXR-Heterodimere eingesetzt werden. Trotz der fortschreitenden Entwicklung neuer Massenspektrometer mit hoher Massengenauigkeit, Sensitivität und Auflösung, sowie neuer Software zur Bewältigung der riesigen Datenmengen, sollten für weitere Experimente isotoopenmarkierte Reagenzien und photoaktivierbare Aminosäuren zum Einsatz kommen. Das wird nicht nur die falsch-positiven Resultate verringern, sondern auch die automatische Analyse der Quervernetzungsprodukte erleichtern.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Rastinejad F, Ollendorff V, Polikarpov I. Nuclear receptor full-length architectures: confronting myth and illusion with high resolution. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(1):16-24.
2. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The Nuclear Receptor Superfamily - the 2nd Decade. *Cell.* 1995;83(6):835-9.
3. Rastinejad F, Huang P, Chandra V, Khorasanizadeh S. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J Mol Endocrinol.* 2013;51(3):T1-T21.
4. Cotnoir-White D, Laperriere D, Mader S. Evolution of the repertoire of nuclear receptor binding sites in genomes. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;334(1-2):76-82.
5. Qi C, Zhu YJ, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, coactivators, and downstream targets. *Cell Biochem Biophys.* 2000;32:187-204.
6. Michalik L, Zoete V, Krey G, Grosdidier A, Gelman L, Chodanowski P, et al. Combined simulation and mutagenesis analyses reveal the involvement of key residues for peroxisome proliferator-activated receptor alpha helix 12 dynamic behavior. *J Biol Chem.* 2007;282(13):9666-77.
7. JugeAubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, et al. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements - Importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem.* 1997;272(40):25252-9.
8. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: A nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 1996;12:335-&.
9. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-Independent Repression by the Thyroid-Hormone Receptor-Mediated by a Nuclear Receptor Co-Repressor. *Nature.* 1995;377(6548):397-404.
10. Chen JD, Evans RM. A Transcriptional Co-Repressor That Interacts with Nuclear Hormone Receptors. *Nature.* 1995;377(6548):454-7.
11. Zhu YJ, Qi C, Calandra C, Rao MS, Reddy JK. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expression.* 1996;6(3):185-95.

12. Zhu YJ, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25500-6.
13. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, VidalPuig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) - Differential activity of PPAR gamma 1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997;272(32):20230-5.
14. Usuda D, Kanda T. Peroxisome proliferator-activated receptors for hypertension. *World journal of cardiology.* 2014;6(8):744-54.
15. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-Cis Retinoic Acid and Peroxisome Proliferator Signaling Pathways through Heterodimer Formation of Their Receptors. *Nature.* 1992;358(6389):771-4.
16. Webb P, Anderson CM, Valentine C, Nguyen P, Marimuthu A, West BL, et al. The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Mol Endocrinol.* 2000;14(12):1976-85.
17. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Gene Dev.* 1998;12(21):3343-56.
18. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.
19. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: Cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999;20(3):321-44.
20. Delfosse V, Maire AL, Balaguer P, Bourguet W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta pharmacologica Sinica.* 2014.
21. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor and Retinoid X-Receptor. *P Natl Acad Sci USA.* 1993;90(4):1440-4.
22. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, et al. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR alpha. *Nature.* 2002;415(6873):813-7.

23. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, et al. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Cell*. 1999;3(3):397-403.
24. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998;395(6698):137-43.
25. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD, Moore LB, Collins JB, et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *P Natl Acad Sci USA*. 2001;98(24):13919-24.
26. Dowell P, Peterson VJ, Zabriskie TM, Leid M. Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformational change. *J Biol Chem*. 1997;272(3):2013-20.
27. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, et al. Crystal-Structure of the Rar-Gamma Ligand-Binding Domain Bound to All-Trans-Retinoic Acid. *Nature*. 1995;378(6558):681-9.
28. Kallenberger BC, Love JD, Chatterjee VKK, Schwabe JWR. A dynamic mechanism of nuclear receptor activation and its perturbation in a human disease. *Nat Struct Biol*. 2003;10(2):136-40.
29. Johnson BA, Wilson EM, Li Y, Moller DE, Smith RG, Zhou GC. Ligand-induced stabilization of PPAR gamma monitored by NMR spectroscopy: Implications for nuclear receptor activation. *J Mol Biol*. 2000;298(2):187-94.
30. Berger JP, Petro AE, Macnaul KL, Kelly LJ, Zhang BB, Richards K, et al. Distinct properties and advantages of a novel peroxisome proliferator-activated protein gamma selective modulator. *Mol Endocrinol*. 2003;17(4):662-76.
31. Lu JY, Cistola DP, Li E. Analysis of ligand binding and protein dynamics of human retinoid X receptor alpha ligand-binding domain by nuclear magnetic resonance. *Biochemistry-US*. 2006;45(6):1629-39.
32. Hughes TS, Chalmers MJ, Novick S, Kuruvilla DS, Chang MR, Kamenecka TM, et al. Ligand and Receptor Dynamics Contribute to the Mechanism of Graded PPAR gamma Agonism. *Structure*. 2012;20(1):139-50.
33. Yan XG, Broderick D, Leid ME, Schimerlik MI, Deinzer ML. Dynamics and ligand-induced solvent accessibility changes in human retinoid X receptor homodimer

determined by hydrogen deuterium exchange and mass spectrometry. *Biochemistry-U.S.* 2004;43(4):909-17.

34. Figueira ACM, Saidenberg DM, Souza PCT, Martinez L, Scanlan TS, Baxter JD, et al. Analysis of Agonist and Antagonist Effects on Thyroid Hormone Receptor Conformation by Hydrogen/Deuterium Exchange. *Mol Endocrinol.* 2011;25(1):15-31.

35. Hamuro Y, Coales SJ, Morrow JA, Molnar KS, Tuske SJ, Southern MR, et al. Hydrogen/deuterium-exchange (H/D-Ex) of PPAR gamma LBD in the presence of various modulators. *Protein Sci.* 2006;15(8):1883-92.

36. Dai SY, Burris TP, Dodge JA, Montrose-Rafizadeh C, Wang Y, Pascal BD, et al. Unique Ligand Binding Patterns between Estrogen Receptor alpha and beta Revealed by Hydrogen-Deuterium Exchange. *Biochemistry-U.S.* 2009;48(40):9668-76.

37. Chandra V, Huang PX, Hamuro Y, Raghuram S, Wang YJ, Burris TP, et al. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR-alpha nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 2008;456(7220):350-U33.

38. Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res.* 2005;51(2):85-94.

39. Marx N, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their role in the vessel wall: possible mediators of cardiovascular risk? *J Cardiovasc Risk.* 2001;8(4):203-10.

40. Issemann I, Green S. Activation of a Member of the Steroid-Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators. *Nature.* 1990;347(6294):645-50.

41. Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* 2000;60(8):1245-50.

42. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotech.* 1999;10(6):564-70.

43. Vincent ZA, Aurelien GA, Michielin O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Bba-Mol Cell Biol L.* 2007;1771(8):915-25.

44. Sznajdman ML, Haffner CD, Maloney PR, Fivush A, Chao E, Goreham D, et al. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR delta) - Synthesis and biological activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13(9):1517-21.

45. Li JE, Futawaka K, Yamamoto H, Kasahara M, Tagami T, Liu TH, et al. Cinnamaldehyde Contributes to Insulin Sensitivity by Activating PPAR delta, PPAR gamma, and RXR. *Am J Chinese Med.* 2015;43(5):879-92.
46. Toral M, Gomez-Guzman M, Jimenez R, Romero M, Zarzuelo MJ, Utrilla MP, et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptorbeta/delta agonist GW0742 prevents hypertension, vascular inflammatory and oxidative status, and endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Journal of hypertension.* 2015;33(9):1831-44.
47. Plutzky J. The potential role,of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *American Journal of Cardiology.* 2003;92(4A):34j-41j.
48. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature medicine.* 2004;10(4):355-61.
49. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Retinoid-X Receptor Heterodimer Is Activated by Fatty-Acids and Fibrate Hypolipemic Drugs. *J Mol Endocrinol.* 1993;11(1):37-47.
50. Adhikary T, Wortmann A, Schumann T, Finkernagel F, Lieber S, Roth K, et al. The transcriptional PPAR beta/delta network in human macrophages defines a unique agonist-induced activation state. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(10):5033-51.
51. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999;20(5):649-88.
52. Rau O, Syha Y, Zettl H, Kock M, Bock A, Schubert-Zsilavec M. alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma. *Arch Pharm.* 2008;341(3):191-5.
53. Cronet P, Petersen JFW, Folmer R, Blomberg N, Sjoblom K, Karlsson U, et al. Structure of the PPAR alpha and -gamma ligand binding domain in complex with AZ 242; Ligand selectivity and agonist activation in the PPAR family. *Structure.* 2001;9(8):699-706.
54. Giordano Attianese GM, Desvergne B. Integrative and systemic approaches for evaluating PPARbeta/delta (PPARD) function. *Nuclear receptor signaling.* 2015;13:e001.
55. Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of hepatology.* 2015;7(8):1012-9.

56. Chon SH, Tannahill R, Yao X, Southall MD, Pappas A. Keratinocyte differentiation and upregulation of ceramide synthesis induced by an oat lipid extract via the activation of PPAR pathways. *Exp Dermatol.* 2015;24(4):290-5.
57. Montagner A, Wahli W, Tan NS. Nuclear receptor peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) beta/delta in skin wound healing and cancer. *Eur J Dermatol.* 2015;25:4-11.
58. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: An adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:193-230.
59. Pyper SR, Viswakarma N, Yu S, Reddy JK. PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer. *Nuclear receptor signaling.* 2010;8:e002.
60. Dong C, Zhou H, Shen C, Yu LG, Ding Y, Zhang YH, et al. Role of peroxisome proliferator-activated receptors gene polymorphisms in type 2 diabetes and metabolic syndrome. *World J Diabetes.* 2015;6(4):654-61.
61. Azhar S, Kelley G. PPAR alpha: its role in the human metabolic syndrome. *Future Lipidol.* 2007;2(1):31-53.
62. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116(3):571-80.
63. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006;45(2):120-59.
64. Hamblin M, Chang L, Fan YB, Zhang JF, Chen YE. PPARs and the Cardiovascular System. *Antioxid Redox Sign.* 2009;11(6):1415-52.
65. Montanez JE, Peters JM, Correll JB, Gonzalez FJ, Patterson AD. Metabolomics: An Essential Tool to Understand the Function of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Toxicol Pathol.* 2013;41(2):410-8.
66. Robinson E, Grieve DJ. Significance of peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system in health and disease. *Pharmacology & therapeutics.* 2009;122(3):246-63.
67. Esposito E, Rinaldi B, Mazzon E, Donniacuo M, Impellizzeri D, Paterniti I, et al. Anti-inflammatory effect of simvastatin in an experimental model of spinal cord trauma: involvement of PPAR-alpha. *J Neuroinflamm.* 2012;9.

68. Campbell FM, Kozak R, Wagner A, Altarejos JY, Dyck JRB, Belke DD, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels - Reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPAR alpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. *J Biol Chem.* 2002;277(6):4098-103.
69. Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, et al. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *J Clin Invest.* 1998;102(6):1083-91.
70. Watanabe K, Fujii H, Takahashi T, Kodama M, Aizawa Y, Ohta Y, et al. Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor alpha associated with age-dependent cardiac toxicity. *J Biol Chem.* 2000;275(29):22293-9.
71. Guellich A, Damy T, Lecarpentier Y, Conti M, Claes V, Samuel JL, et al. Role of oxidative stress in cardiac dysfunction of PPAR alpha (-/-) mice. *Am J Physiol-Heart C.* 2007;293(1):H93-H102.
72. Coirault C, Lambert F, Pourny JC, Lecarpentier Y. Velocity of actomyosin sliding in vitro is reduced in dystrophic mouse diaphragm. *Am J Resp Crit Care.* 2002;165(2):250-3.
73. Harris DE, Work SS, Wright RK, Alpert NR, Warshaw DM. Smooth Cardiac and Skeletal-Muscle Myosin Force and Motion Generation Assessed by Cross-Bridge Mechanical Interactions in-Vitro. *J Muscle Res Cell M.* 1994;15(1):11-9.
74. Keller DI, Coirault C, Rau T, Cheav T, Weyand M, Amann K, et al. Human homozygous R403W mutant cardiac myosin presents disproportionate enhancement of mechanical and enzymatic properties. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(3):355-62.
75. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor kappa B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32833-41.
76. Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, et al. PPAR alpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Bioph Res Co.* 2004;324(2):697-704.

77. Wadosky KM, Willis MS. The story so far: post-translational regulation of peroxisome proliferator-activated receptors by ubiquitination and SUMOylation. *Am J Physiol-Heart C*. 2012;302(3):H515-H26.
78. Barger PM, Browning AC, Garner AN, Kelly DP. p38 mitogen-activated protein kinase activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha - A potential role in the cardiac metabolic stress response. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44495-501.
79. Neubauer S. Mechanisms of disease - The failing heart - An engine out of fuel. *New Engl J Med*. 2007;356(11):1140-51.
80. Finck BN. Effects of PPARalpha on cardiac glucose metabolism: a transcriptional equivalent of the glucose-fatty acid cycle? *Expert review of cardiovascular therapy*. 2006;4(2):161-71.
81. Banke NH, Wende AR, Leone TC, O'Donnell JM, Abel ED, Kelly DP, et al. Preferential Oxidation of Triacylglyceride-Derived Fatty Acids in Heart Is Augmented by the Nuclear Receptor PPAR alpha. *Circulation research*. 2010;107(2):233-41.
82. Baraka A, AbdelGawad H. Targeting Apoptosis in the Heart of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharm T*. 2010;15(2):175-81.
83. Lee TI, Kao YH, Chen YC, Huang JH, Hsiao FC, Chen YJ. Peroxisome proliferator-activated receptors modulate cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Res Clin Pr*. 2013;100(3):330-9.
84. Fruchart JC, Staels B, Duriez P. The role of fibric acids in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2001;3(1):83-92.
85. Taniguchi A, Fukushima M, Sakai M, Tokuyama K, Nagata I, Fukunaga A, et al. Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 2001;50(4):477-80.
86. Neschen S, Morino K, Dong J, Wang-Fischer Y, Cline GW, Romanelli AJ, et al. n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner. *Diabetes*. 2007;56(4):1034-41.
87. Israelian-Konaraki Z, Reaven PD. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Cardiology*. 2005;103(1):1-9.
88. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006;116(3):590-7.

89. Kilgore KS, Billin AN. PPAR beta/delta ligands as modulators of the inflammatory response. *Curr Opin Invest Dr.* 2008;9(5):463-9.
90. Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future cardiology.* 2010;6(5):657-91.
91. Lee WS, Kim J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Heart: Lessons from the Past and Future Directions. *Ppar Res.* 2015.
92. Russell AP, Hesselink MKC, Lo SK, Schrauwen P. Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *Faseb J.* 2005;19(6):986-+.
93. Gan Z, Burkart-Hartman EM, Han DH, Finck B, Leone TC, Smith EY, et al. The nuclear receptor PPARbeta/delta programs muscle glucose metabolism in cooperation with AMPK and MEF2. *Genes Dev.* 2011;25(24):2619-30.
94. Gan ZJ, Rumsey J, Hazen BC, Lai L, Leone TC, Vega RB, et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2564-75.
95. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *P Natl Acad Sci USA.* 2001;98(9):5306-11.
96. Daoudi M, Hennuyer N, Borland MG, Touche V, Duhem C, Gross B, et al. PPARbeta/delta activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1564-74.
97. Kim DJ, Murray IA, Burns AM, Gonzalez FJ, Perdew GH, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *J Biol Chem.* 2005;280(10):9519-27.
98. Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Gene Dev.* 2001;15(24):3263-77.
99. Vittoria Simonini M, Polak PE, Boullerne AI, Peters JM, Richardson JC, Feinstein DL. Regulation of oligodendrocyte progenitor cell maturation by PPARdelta: effects on bone morphogenetic proteins. *ASN neuro.* 2010;2(1):e00025.
100. Varnat F, Heggeler BB, Grisel P, Boucard N, Corthesy-Theulaz I, Wahli W, et al. PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology.* 2006;131(2):538-53.

101. Scholtyssek C, Katzenbeisser J, Fu H, Uderhardt S, Ipseiz N, Stoll C, et al. PPARbeta/delta governs Wnt signaling and bone turnover. *Nature medicine*. 2013;19(5):608-13.
102. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nature medicine*. 2012;18(9):1350-8.
103. Burris TP, Busby SA, Griffin PR. Targeting Orphan Nuclear Receptors for Treatment of Metabolic Diseases and Autoimmunity. *Chem Biol*. 2012;19(1):51-9.
104. Coll T, Rodriguez-Calvo R, Barroso E, Serrano L, Eyre E, Palomer X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) beta/delta: a new potential therapeutic target for the treatment of metabolic syndrome. *Current molecular pharmacology*. 2009;2(1):46-55.
105. Zarzuelo MJ, Jimenez R, Galindo P, Sanchez M, Nieto A, Romero M, et al. Antihypertensive Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-beta Activation in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2011;58(4):733-U437.
106. Lee TI, Kao YH, Chen YC, Pan NH, Chen YJ. Oxidative stress and inflammation modulate peroxisome proliferator-activated receptors with regional discrepancy in diabetic heart. *Eur J Clin Invest*. 2010;40(8):692-9.
107. Yu BC, Chang CK, Ou HY, Cheng KC, Cheng JT. Decrease of peroxisome proliferator-activated receptor delta expression in cardiomyopathy of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovascular research*. 2008;80(1):78-87.
108. Alvarez-Guardia D, Palomer X, Coll T, Serrano L, Rodriguez-Calvo R, Davidson MM, et al. PPAR beta/delta activation blocks lipid-induced inflammatory pathways in mouse heart and human cardiac cells. *Bba-Mol Cell Biol L*. 2011;1811(2):59-67.
109. Lee CH, Chawla A, Urbiztondo N, Liao D, Boisvert WA, Evans RM. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: Modulation by PPAR delta. *Science*. 2003;302(5644):453-7.
110. Adhikary T, Brandt DT, Kaddatz K, Stockert J, Naruhn S, Meissner W, et al. Inverse PPARbeta/delta agonists suppress oncogenic signaling to the ANGPTL4 gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene*. 2013;32(44):5241-52.
111. Khozoe C, Borland MG, Zhu BK, Baek S, John S, Hager GL, et al. Analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (PPAR beta/delta) cistrome reveals novel co-regulatory role of ATF4. *Bmc Genomics*. 2012;13.

112. Shi YH, Hon M, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptor delta, an integrator of transcriptional repression and nuclear receptor signaling. *P Natl Acad Sci USA*. 2002;99(5):2613-8.
113. Rieck M, Wedeken L, Muller-Brusselbach S, Meissner W, Muller R. Expression level and agonist-binding affect the turnover, ubiquitination and complex formation of peroxisome proliferator activated receptor beta. *Febs J*. 2007;274(19):5068-76.
114. Kim DJ, Akiyama TE, Harman FS, Burns AM, Shan W, Ward JM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23719-27.
115. Chawla A, Lee CH, Barak Y, He WM, Rosenfeld J, Liao D, et al. PPAR delta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *P Natl Acad Sci USA*. 2003;100(3):1268-73.
116. Abd Malek M, Hoang MH, Jia YY, Lee JH, Jun HJ, Lee DH, et al. Ombuin-3-O-beta-D-glucopyranoside from *Gynostemma pentaphyllum* is a dual agonistic ligand of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta/beta. *Biochem Bioph Res Co*. 2013;430(4):1322-8.
117. Shearer BG, Steger DJ, Way JM, Stanley TB, Lobe DC, Grillot DA, et al. Identification and characterization of a selective peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (NR1C2) antagonist. *Mol Endocrinol*. 2008;22(2):523-9.
118. Sinz A. The advancement of chemical cross-linking and mass spectrometry for structural proteomics: from single proteins to protein interaction networks. *Expert Rev Proteomic*. 2014;11(6):733-43.
119. Young MM, Tang N, Hempel JC, Oshiro CM, Taylor EW, Kuntz ID, et al. High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *P Natl Acad Sci USA*. 2000;97(11):5802-6.
120. Gross J. *Massenspektrometrie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 2013.
121. Takats Z, Wiseman JM, Gologan B, Cooks RG. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*. 2004;306(5695):471-3.
122. Cody RB, Laramée JA, Durst HD. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem*. 2005;77(8):2297-302.

123. Martin AN, Farquar GR, Gard EE, Frank M, Fergenson DP. Identification of High Explosives Using Single-Particle Aerosol Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2007;79(5):1918-25.
124. Posthumus MA, Kistemaker PG, Meuzelaar HLC, Tennoeverdebrauw MC. Laser Desorption-Mass Spectrometry of Polar Non-Volatile Bio-Organic Molecules. *Anal Chem.* 1978;50(7):985-91.
125. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption of Nonvolatile Compounds. *Int J Mass Spectrom.* 1987;78:53-68.
126. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet-Laser Desorption Mass-Spectrometry of Organic-Molecules. *Anal Chem.* 1985;57(14):2935-9.
127. Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Proteins of Mass 100 000 to 250 000 Dalton. *Angewandte Chemie-International Edition in English.* 1989;28(6):760-1.
128. Karas M, Hillenkamp F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10000 Daltons. *Anal Chem.* 1988;60(20):2299-301.
129. Hillenkamp F, Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, an experience. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2000;200(1-3):71-7.
130. Karas M, Bahr U, Giessmann U. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 1991;10(5):335-57.
131. Tanaka K. The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew Chem Int Edit.* 2003;42(33):3860-70.
132. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to  $m/z$  100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 1988;2(8):151-3.
133. Karas M, Gluckmann M, Schafer J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom.* 2000;35(1):1-12.
134. Beavis RC, Chait BT. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 1989;3(12):432-5.

135. Strupat K, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic Acid - a New Matrix for Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 1991;111:89-102.
136. Karas M, Ehring H, Nordhoff E, Stahl B, Strupat K, Hillenkamp F, et al. Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization Mass-Spectrometry with Additives to 2,5-Dihydroxybenzoic Acid. *Org Mass Spectrom.* 1993;28(12):1476-81.
137. Beavis RC, Chaudhary T, Chait BT. Alpha-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry. *Org Mass Spectrom.* 1992;27(2):156-8.
138. McDonnell LA, Heeren RMA. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2007;26(4):606-43.
139. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49(4):543-51.
140. Zeleny J. Instability of Electrified Liquid Surfaces. *Physical Review.* 1917;10(1):1-6.
141. Taylor G. Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proc R Soc Lon Ser-A.* 1964;280(1380):383-+.
142. Dole M, Mack LL, Hines RL. Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics.* 1968;49(5):2240-&.
143. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray Ionization-Principles and Practice. *Mass Spectrom Rev.* 1990;9(1):37-70.
144. Wilm M, Mann M. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem.* 1996;68(1):1-8.
145. Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, et al. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature.* 1996;379(6564):466-9.
146. Kebarle P, Tang L. From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Anal Chem.* 1993;65(22):A972-A86.
147. Cole RB. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2000;35(7):763-72.

148. Rayleigh L. XX. On the equilibrium of liquid conducting masses charged with electricity. *Philosophical Magazine Series 5*. 1882;14(87):184-6.
149. Felitsyn N, Peschke M, Kebarle P. Origin and number of charges observed on multiply-protonated native proteins produced by ESI. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2002;219(1):39-62.
150. Fenn JB, Rosell J, Meng CK. In electrospray ionization, how much pull does an ion need to escape its droplet prison? *J Am Soc Mass Spectr*. 1997;8(11):1147-57.
151. Iribarne JV, Thomson BA. Evaporation of Small Ions from Charged Droplets. *Journal of Chemical Physics*. 1976;64(6):2287-94.
152. Stephens WE. A Pulsed Mass Spectrometer With Time Dispersion. *Physical Review*. 1946;69:691.
153. Fuerstenau SD, Benner WH. Molecular weight determination of megadalton DNA electrospray ions using charge detection time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 1995;9(15):1528-38.
154. Fuerstenau SD, Benner WH, Thomas JJ, Brugidou C, Bothner B, Siuzdak G. Mass Spectrometry of an Intact Virus The authors gratefully acknowledge Jennifer Boydston for her helpful comments and suggestions. G.S. is grateful for support from the NIH (GM55775). The work at LBL was supported by the Director, Office of Energy Research, Office of Health and Environmental Research, Human Genome Program, U.S. Department of Energy under contract number DE-AC03-76SF00098. *Angewandte Chemie*. 2001;40(3):541-4.
155. Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem*. 1992;64(21):1027A-39A.
156. Vestal ML. Modern MALDI time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2009;44(3):303-17.
157. Vestal M, Hayden K. High performance MALDI-TOF mass spectrometry for proteomics. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2007;268(2-3):83-92.
158. Vestal ML, Juhasz P, Martin SA. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*. 1995;9(11):1044-50.
159. Schuerch S, Schaer M, Boernsen KO, Schlunegger UP. Enhanced mass resolution in matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom*. 1994;23(11):695-700.

160. Mamyrin BA. Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom.* 1994;131:1-19.
161. Cotter RJ. Time-of-flight mass spectrometry : instrumentation and applications in biological research. Washington, DC: American Chemical Society; 1997. xvi, 326 p. p.
162. Giles K, Pringle SD, Worthington KR, Little D, Wildgoose JL, Bateman RH. Applications of a travelling wave-based radio-frequency-only stacked ring ion guide. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2004;18(20):2401-14.
163. Douglas DJ. Linear quadrupoles in mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 2009;28(6):937-60.
164. Collings BA, Campbell JM, Mao D, Douglas DJ. A combined linear ion trap time-of-flight system with improved performance and MS(n) capabilities. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2001;15(19):1777-95.
165. Schwartz JC, Senko MW, Syka JE. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002;13(6):659-69.
166. Hager JW. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Sp.* 2002;16(6):512-26.
167. Kingdon KH. A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures. *Physical Review.* 1923;21(4):408-18.
168. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem.* 2000;72(6):1156-62.
169. Perry RH, Cooks RG, Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev.* 2008;27(6):661-99.
170. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics. *Proteomics.* 2006;6 Suppl 2:16-21.
171. Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomedical mass spectrometry.* 1984;11(11):601.
172. Schilling B, Row RH, Gibson BW, Guo X, Young MM. MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003;14(8):834-50.
173. Olsen JV, Macek B, Lange O, Makarov A, Horning S, Mann M. Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis. *Nat Meth.* 2007;4(9):709-12.

174. Brunner AM, Lossel P, Liu F, Huguet R, Mullen C, Yamashita M, et al. Benchmarking multiple fragmentation methods on an orbitrap fusion for top-down phospho-proteoform characterization. *Anal Chem.* 2015;87(8):4152-8.
175. Sinz A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom Rev.* 2006;25(4):663-82.
176. Doberenz C, Zorn M, Falke D, Nannemann D, Hunger D, Beyer L, et al. Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation. *J Mol Biol.* 2014;426(15):2827-39.
177. Kalisman N, Adams CM, Levitt M. Subunit order of eukaryotic TRiC/CCT chaperonin by cross-linking, mass spectrometry, and combinatorial homology modeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(8):2884-9.
178. Kruppa GH, Schoeniger J, Young MM. A top down approach to protein structural studies using chemical cross-linking and Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 2003;17(2):155-62.
179. Sutherland BW, Toews J, Kast J. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom.* 2008;43(6):699-715.
180. Subbotin RI, Chait BT. A Pipeline for Determining Protein-Protein Interactions and Proximities in the Cellular Milieu. *Mol Cell Proteomics.* 2014.
181. Guo X, Bandyopadhyay P, Schilling B, Young MM, Fujii N, Aynechi T, et al. Partial Acetylation of Lysine Residues Improves Intraprotein Cross-Linking. *Anal Chem.* 2008;80(4):951-60.
182. Kalkhof S, Sinz A. Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters. *Anal Bioanal Chem.* 2008;392(1-2):305-12.
183. Kalkhof S, Haehn S, Paulsson M, Smyth N, Meiler J, Sinz A. Computational modeling of laminin N-terminal domains using sparse distance constraints from disulfide bonds and chemical cross-linking. *Proteins.* 2010;78(16):3409-27.
184. Merkley ED, Rysavy S, Kahraman A, Hafen RP, Daggett V, Adkins JN. Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: Mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances. *Protein Sci.* 2014;23(6):747-59.
185. Arlt C, Ihling CH, Sinz A. Structure of full-length p53 tumor suppressor probed by chemical cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics.* 2015;15(16):2746-55.

186. Muller MQ, Dreiocker F, Ihling CH, Schafer M, Sinz A. Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. *Anal Chem.* 2010;82(16):6958-68.
187. Leitner A, Joachimiak LA, Unverdorben P, Walzthoeni T, Frydman J, Forster F, et al. Chemical cross-linking/mass spectrometry targeting acidic residues in proteins and protein complexes. *P Natl Acad Sci USA.* 2014;111(26):9455-60.
188. Gomes AF, Gozzo FC. Chemical cross-linking with a diazirine photoactivatable cross-linker investigated by MALDI- and ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom.* 2010;45(8):892-9.
189. Krauth F, Ihling CH, Ruttinger HH, Sinz A. Heterobifunctional isotope-labeled amine-reactive photo-cross-linker for structural investigation of proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight and electrospray ionization LTQ-Orbitrap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp.* 2009;23(17):2811-8.
190. Herbst S, Lipstein N, Jahn O, Sinz A. Structural insights into calmodulin/Munc13 interaction. *Biol Chem*2014. p. 763.
191. Wittelsberger A, Thomas BE, Mierke DF, Rosenblatt M. Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments. *Febs Lett.* 2006;580(7):1872-6.
192. Hermanson GT. Chapter 4 - Zero-Length Crosslinkers. *Bioconjugate Techniques* (Third edition). Boston: Academic Press; 2013. p. 259-73.
193. Novak P, Kruppa GH. Intra-molecular cross-linking of acidic residues for protein structure studies. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng).* 2008;14(6):355-65.
194. D'Este M, Eglin D, Alini M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to Hyaluronan in water. *Carbohydrate polymers.* 2014;108:239-46.
195. Piotrowski C, Ihling CH, Sinz A. Extending the cross-linking/mass spectrometry strategy: Facile incorporation of photo-activatable amino acids into the model protein calmodulin in *Escherichia coli* cells. *Methods.* 2015;89:121-7.
196. Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Meth.* 2005;2(4):261-8.
197. Xie JM, Schultz PG. Innovation: A chemical toolkit for proteins - an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2006;7(10):775-82.
198. Young TS, Ahmad I, Yin JA, Schultz PG. An Enhanced System for Unnatural Amino Acid Mutagenesis in *E. coli*. *J Mol Biol.* 2010;395(2):361-74.

199. Tippmann EM, Liu W, Summerer D, Mack AV, Schultz PG. A genetically encoded diazirine photocrosslinker in *Escherichia coli*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*. 2007;8(18):2210-4.
200. Gomori G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. *Method Enzymol*. 1955;1:138-46.
201. Winship PR. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(3):1266.
202. Eckert KA, Kunkel TA. DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction. *PCR methods and applications*. 1991;1(1):17-24.
203. Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54.
204. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-&.
205. Neuhoff V, Stamm R, Eibl H. Clear Background and Highly Sensitive Protein Staining with Coomassie Blue Dyes in Polyacrylamide Gels - a Systematic Analysis. *Electrophoresis*. 1985;6(9):427-48.
206. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W. Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric-Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*. 1988;9(6):255-62.
207. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2856-60.
208. Gotze M, Pettelkau J, Schaks S, Bosse K, Ihling CH, Krauth F, et al. StavroX-A Software for Analyzing Crosslinked Products in Protein Interaction Studies. *J Am Soc Mass Spectr*. 2012;23(1):76-87.
209. Gotze M, Pettelkau J, Fritzsche R, Ihling CH, Schafer M, Sinz A. Automated Assignment of MS/MS Cleavable Cross-Links in Protein 3D-Structure Analysis. *J Am Soc Mass Spectr*. 2015;26(1):83-97.
210. Müller MQ, de Koning LJ, Schmidt A, Ihling C, Syha Y, Rau O, et al. An Innovative Method To Study Target Protein-Drug Interactions by Mass Spectrometry. *Journal of medicinal chemistry* 2009. p. 2875-9.

211. Holding AN. XL-MS: Protein cross-linking coupled with mass spectrometry. *Methods*. 2015;89:54-63.
212. Kolbel K, Ihling CH, Sinz A. Analysis of peptide secondary structures by photoactivatable amino acid analogues. *Angewandte Chemie*. 2012;51(50):12602-5.
213. Das J. Aliphatic Diazirines as Photoaffinity Probes for Proteins: Recent Developments. *Chemical reviews*. 2011;111(8):4405-17.
214. Banta AB, Cuff ME, Lin H, Myers AR, Ross W, Joachimiak A, et al. Structure of the RNA polymerase assembly factor Crl and identification of its interaction surface with sigma S. *Journal of bacteriology*. 2014;196(18):3279-88.
215. Jurneczko E, Barran PE. How useful is ion mobility mass spectrometry for structural biology? The relationship between protein crystal structures and their collision cross sections in the gas phase. *Analyst*. 2011;136(1):20-8.
216. Pagel K, Harvey DJ. Ion mobility-mass spectrometry of complex carbohydrates: collision cross sections of sodiated N-linked glycans. *Anal Chem*. 2013;85(10):5138-45.
217. Forne I, Ludwigsen J, Imhof A, Becker PB, Mueller-Planitz F. Probing the Conformation of the ISWI ATPase Domain With Genetically Encoded Photoreactive Crosslinkers and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(4).
218. Batista FA, Trivella DB, Bernardes A, Gratieri J, Oliveira PS, Figueira AC, et al. Structural insights into human peroxisome proliferator activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. *PloS one*. 2012;7(5):e33643.
219. Pettelkau J, Ihling CH, Froberg P, van Werven L, Jahn O, Sinz A. Reliable identification of cross-linked products in protein interaction studies by <sup>13</sup>C-labeled p-benzoylphenylalanine. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2014;25(9):1628-41.
220. Chandra V, Huang P, Potluri N, Wu D, Kim Y, Rastinejad F. Multidomain integration in the structure of the HNF-4alpha nuclear receptor complex. *Nature*. 2013;495(7441):394-8.
221. Lou X, Toresson G, Benod C, Suh JH, Philips KJ, Webb P, et al. Structure of the retinoid X receptor alpha-liver X receptor beta (RXRalpha-LXRbeta) heterodimer on DNA. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(3):277-81.
222. Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009;19(9):1639-45.

## Anhang

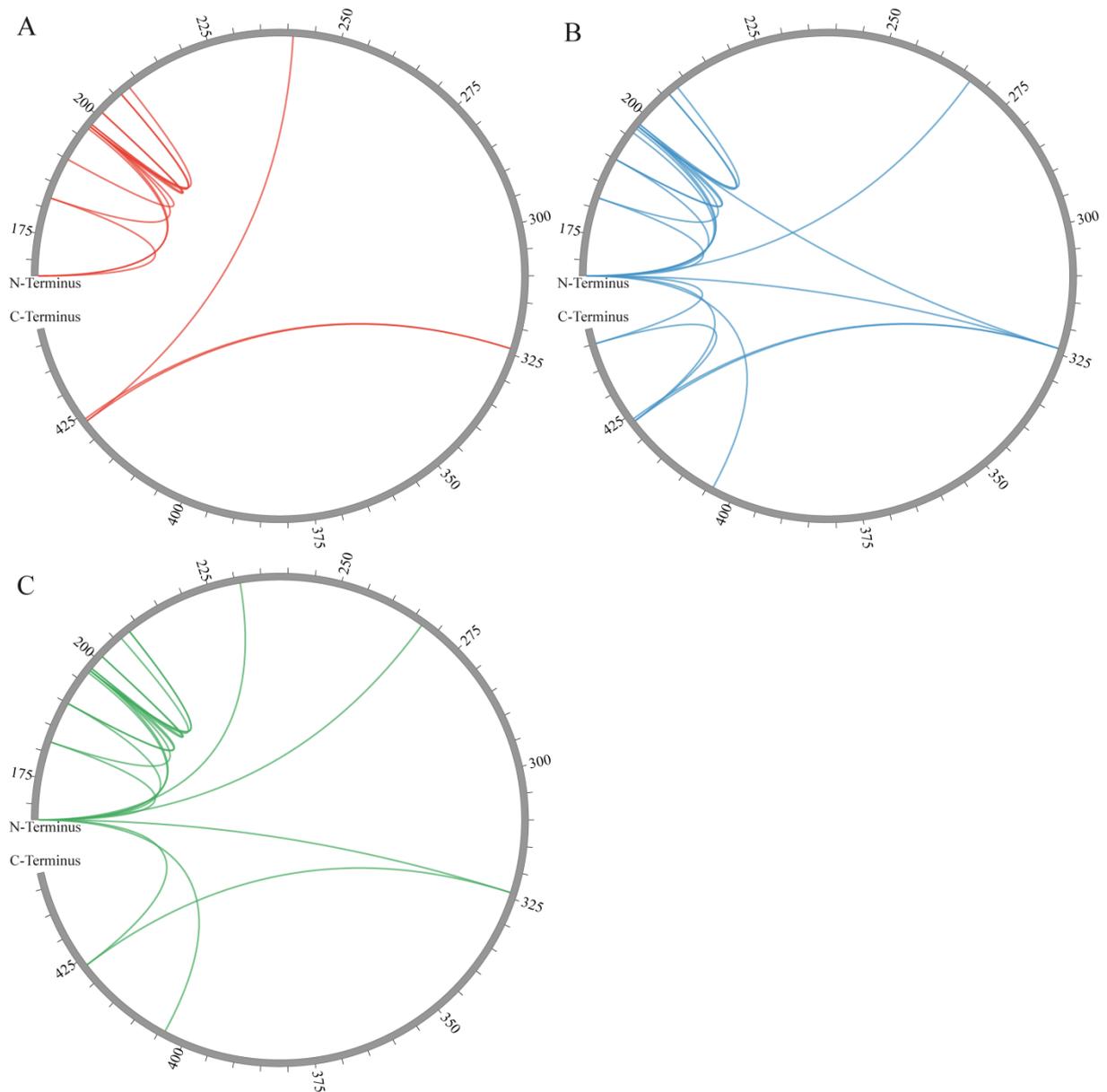


Abbildung A 1: Identifizierte Quervernetzungsprodukte in Experimenten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und dem Quervernetzungsreagenz BS<sup>2</sup>G dargestellt als Circos-Plots [222] ohne Ligand (A), mit GW0742 (B) und GW1516 (C).

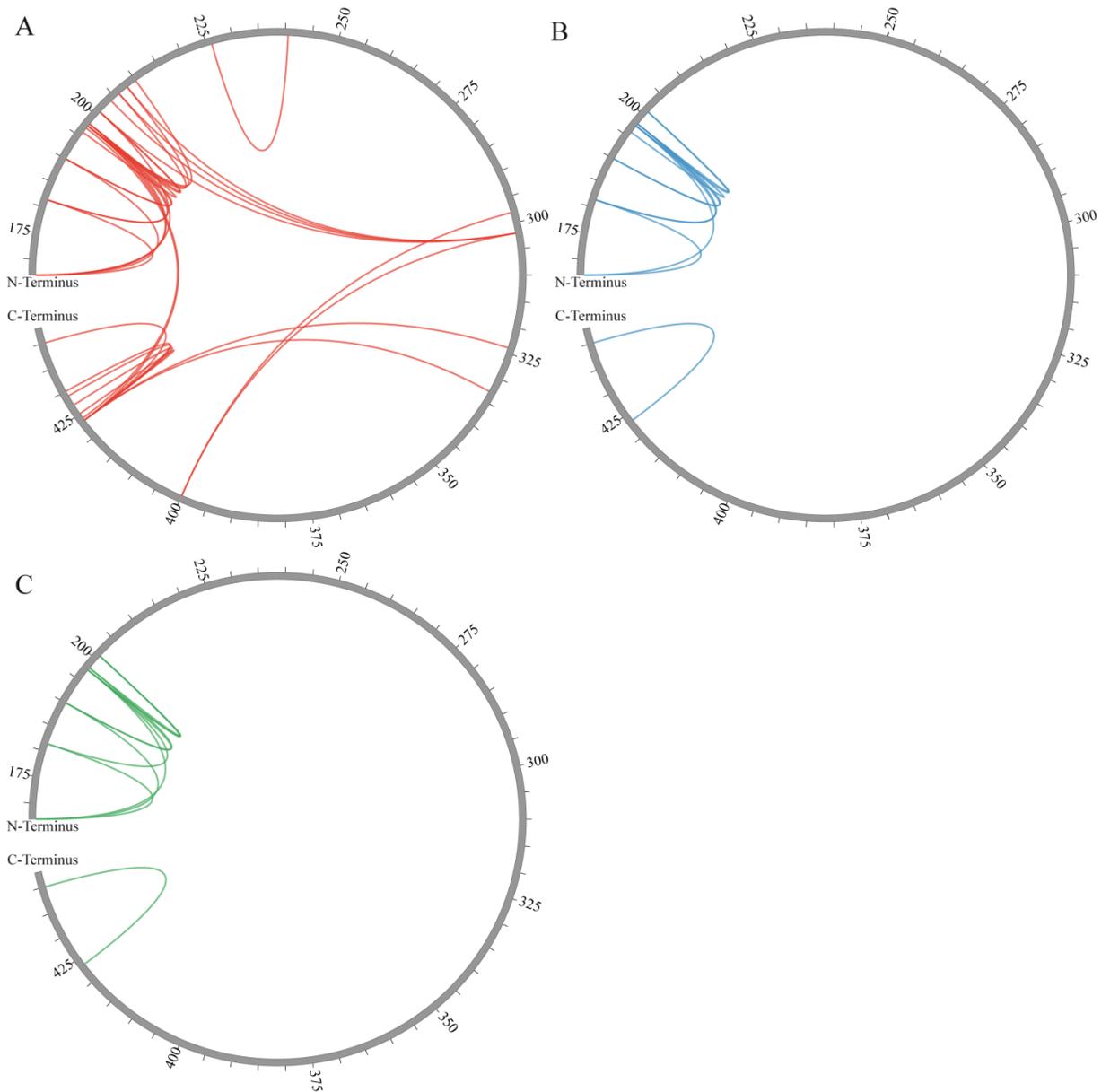


Abbildung A 2: Identifizierte Quervernetzungsprodukte in Experimenten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und dem BuUrBu Quervernetzungsreagenz dargestellt als Circos-Plots [222] ohne Ligand (A), mit GW0742 (B) und GW1516 (C).

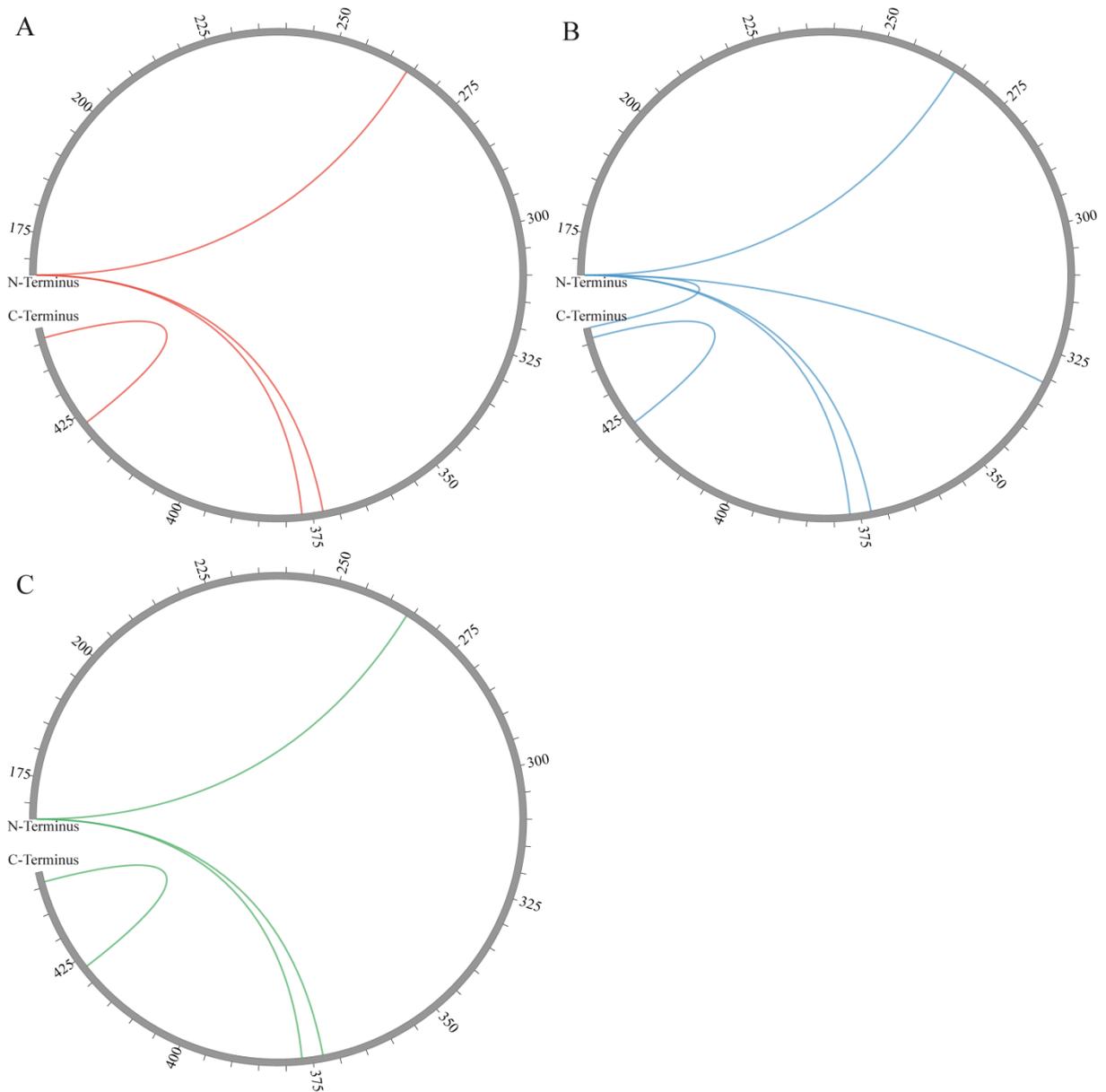


Abbildung A 3: Identifizierte Quervernetzungsprodukte in Experimenten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und dem Kopplungsreagenz DMTMM dargestellt als Circos-Plots [222] ohne Ligand (A), mit GW0742 (B) und GW1516 (C).

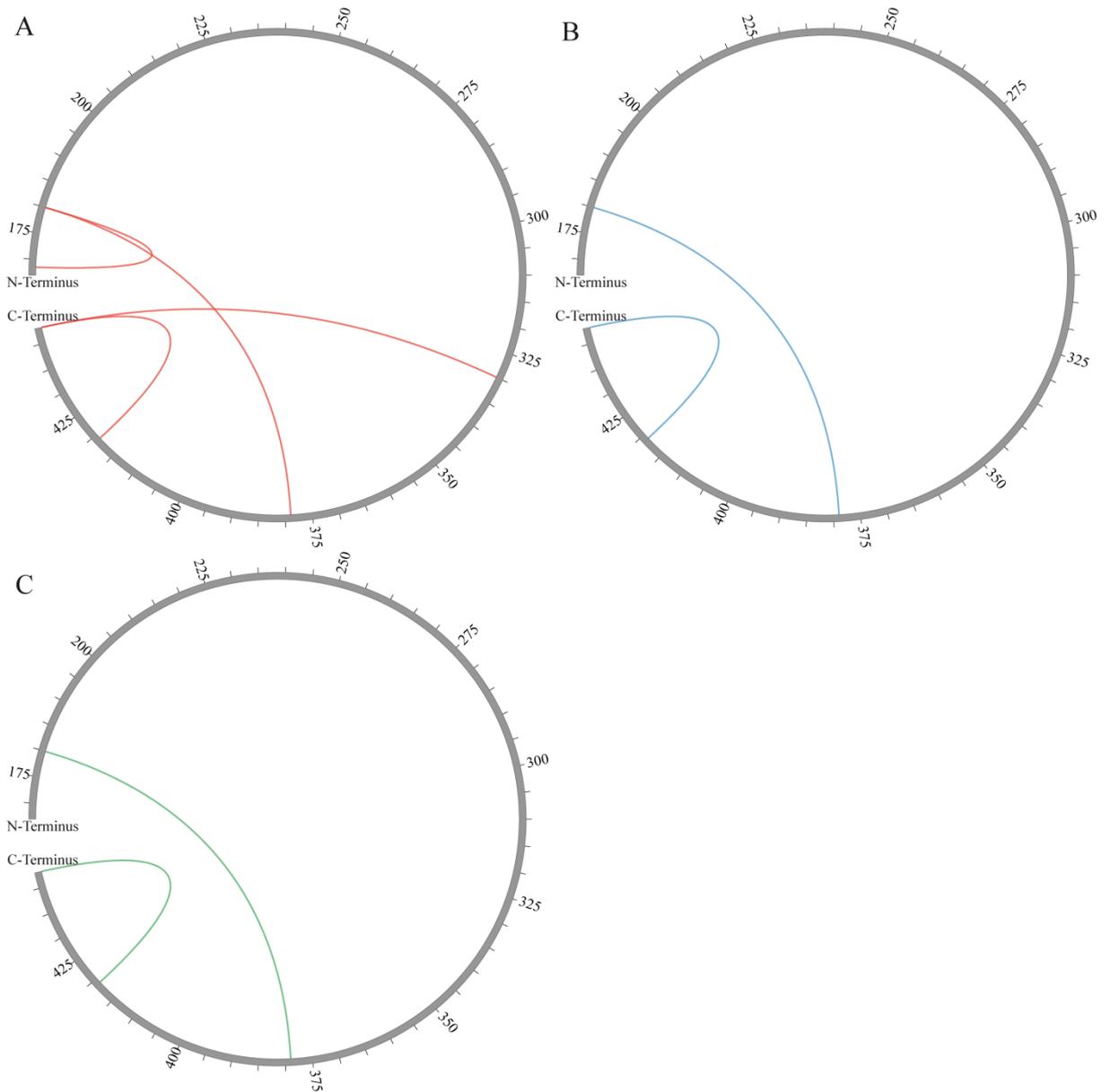


Abbildung A 4: Identifizierte Quervernetzungsprodukte in Photoaffinitätsmarkierungsstudien der Bpa-Varianten der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD dargestellt als Circos-Plots [222] ohne Ligand (A), mit GW0742 (B) und GW1516 (C).

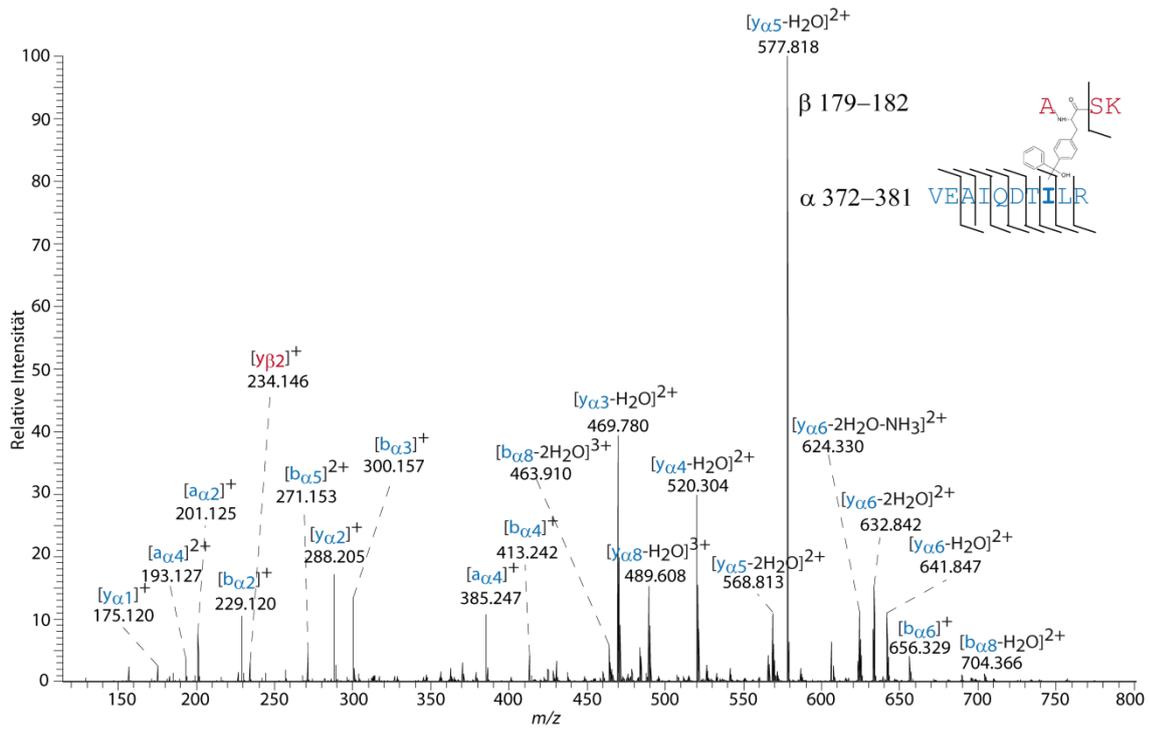


Abbildung A 5: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust bei  $m/z$  428,986 fragmentiert mit CID (35% normalisierte Kollisionsenergie).

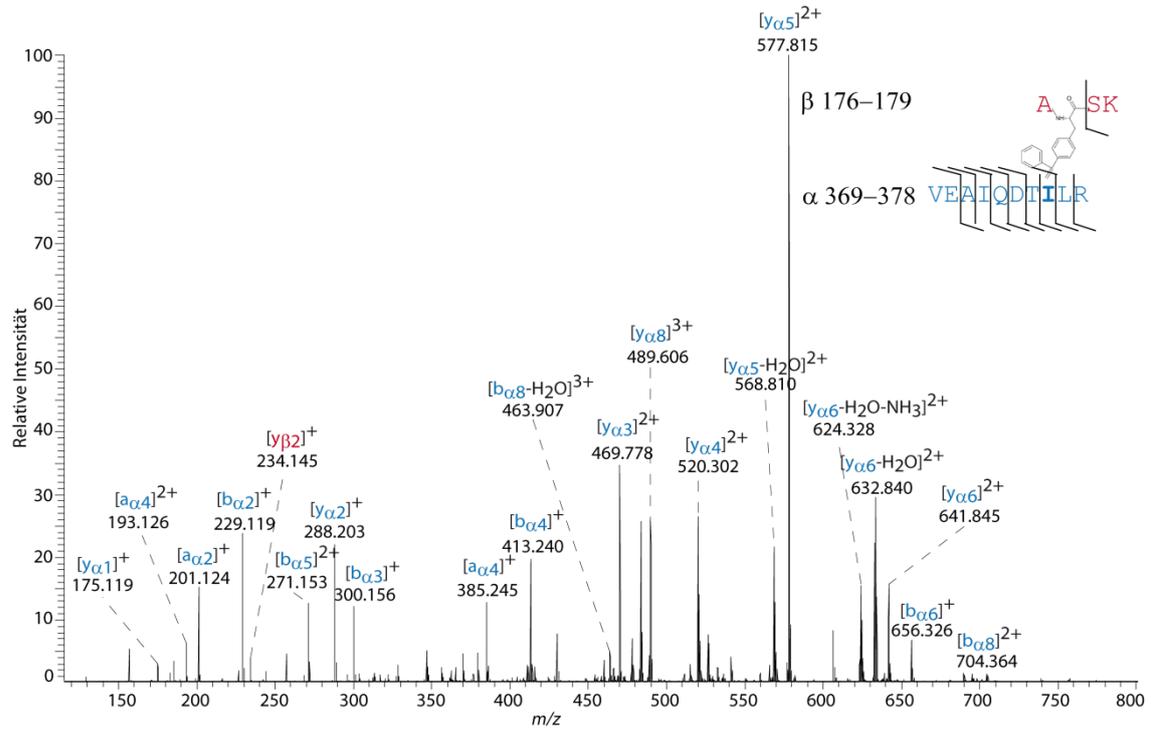


Abbildung A 6: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust bei  $m/z$  424,483 fragmentiert mit CID (35% normalisierte Kollisionsenergie).

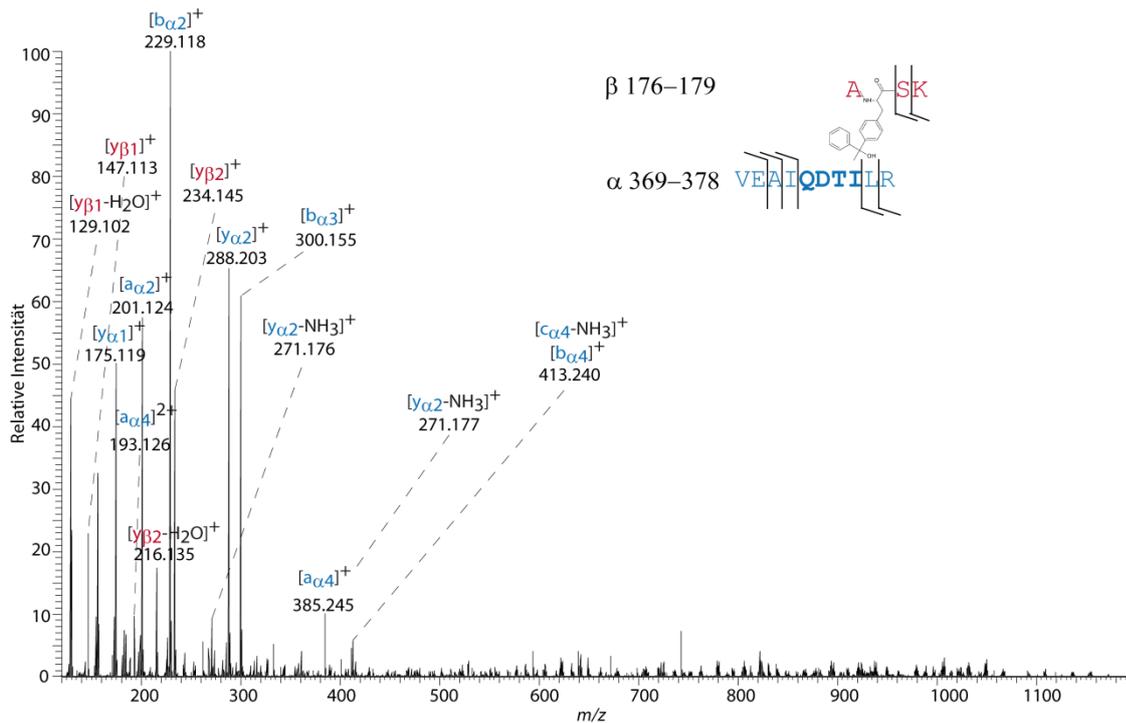


Abbildung A 7: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust bei  $m/z$  428,986 fragmentiert mit HCD (35% normalisierte Kollisionsenergie).

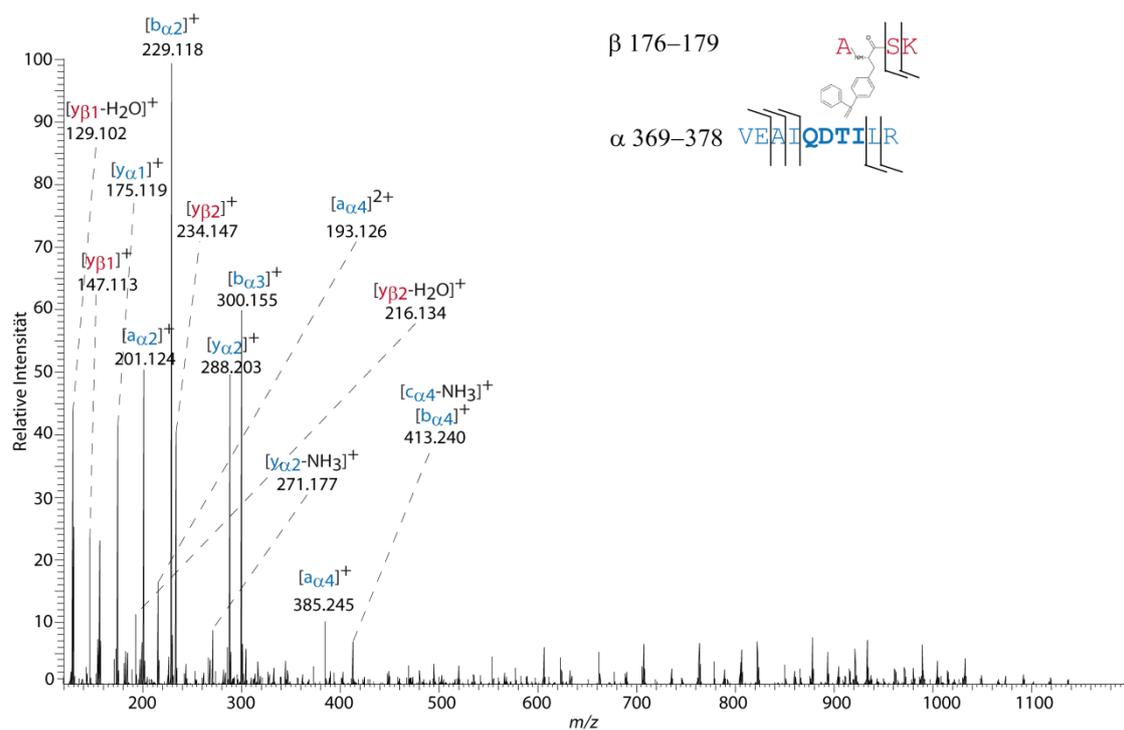


Abbildung A 8: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust bei  $m/z$  424,483 fragmentiert mit HCD (35% normalisierte Kollisionsenergie).

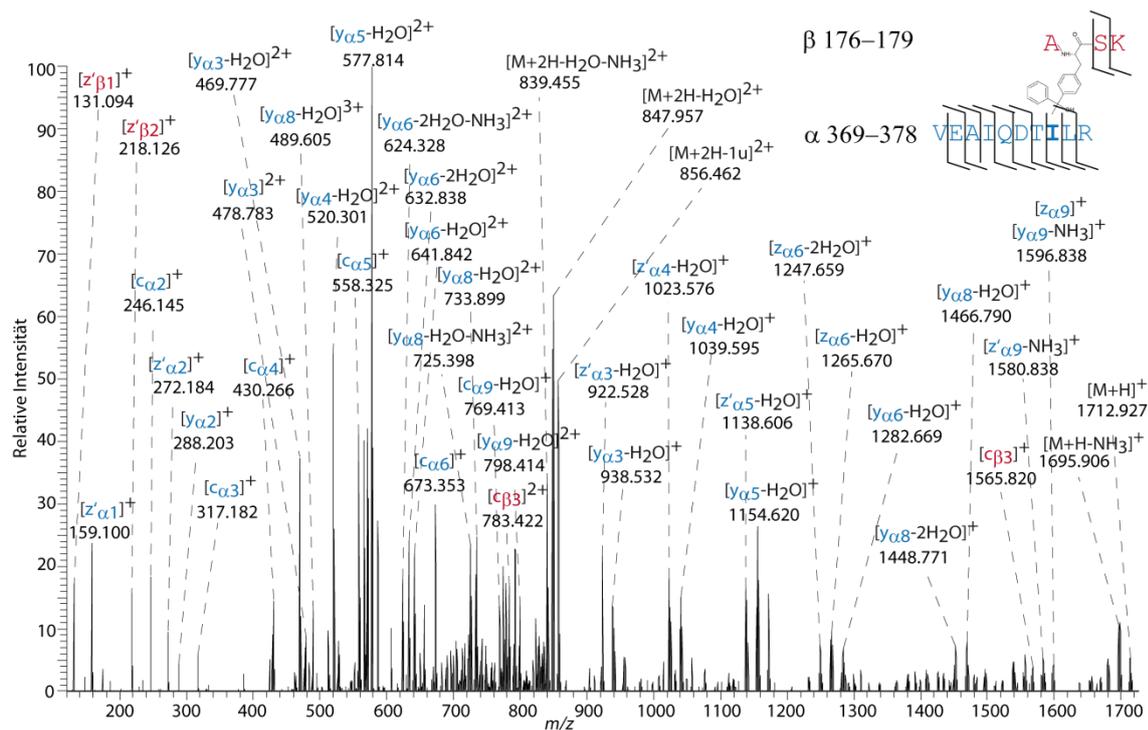


Abbildung A 9: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust bei  $m/z$  428,986 fragmentiert mit ETD (50 ms Reaktionszeit).

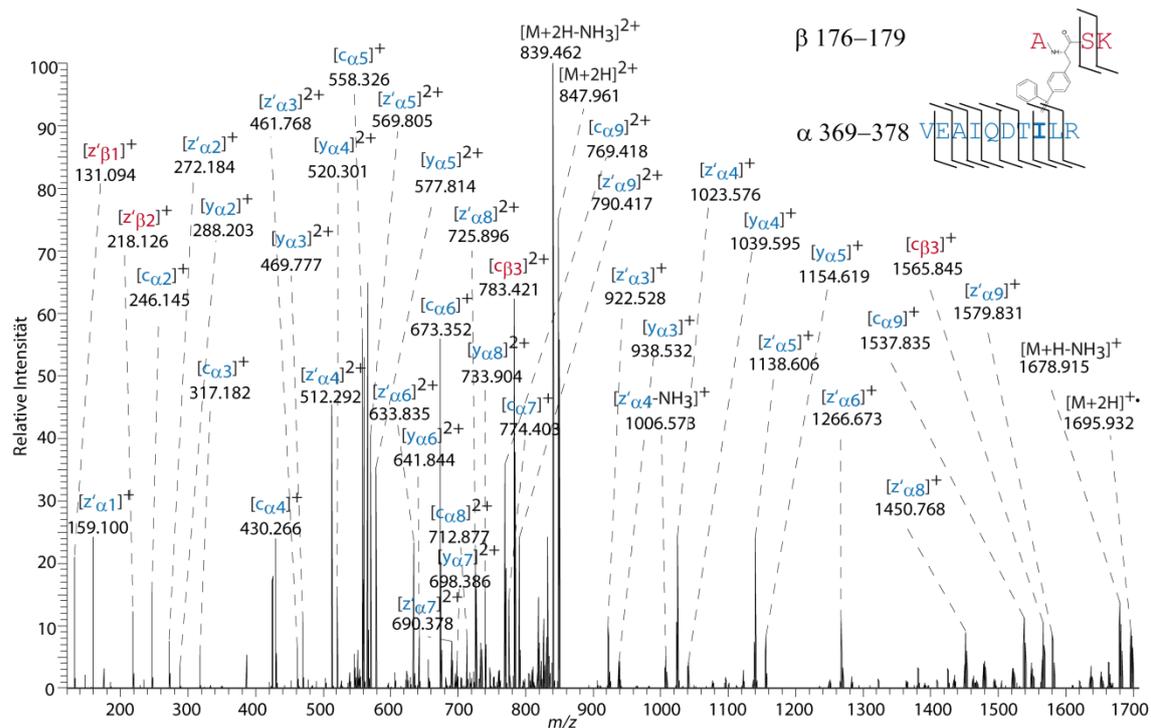


Abbildung A 10: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust bei  $m/z$  424,483 fragmentiert mit ETD (50 ms Reaktionszeit).

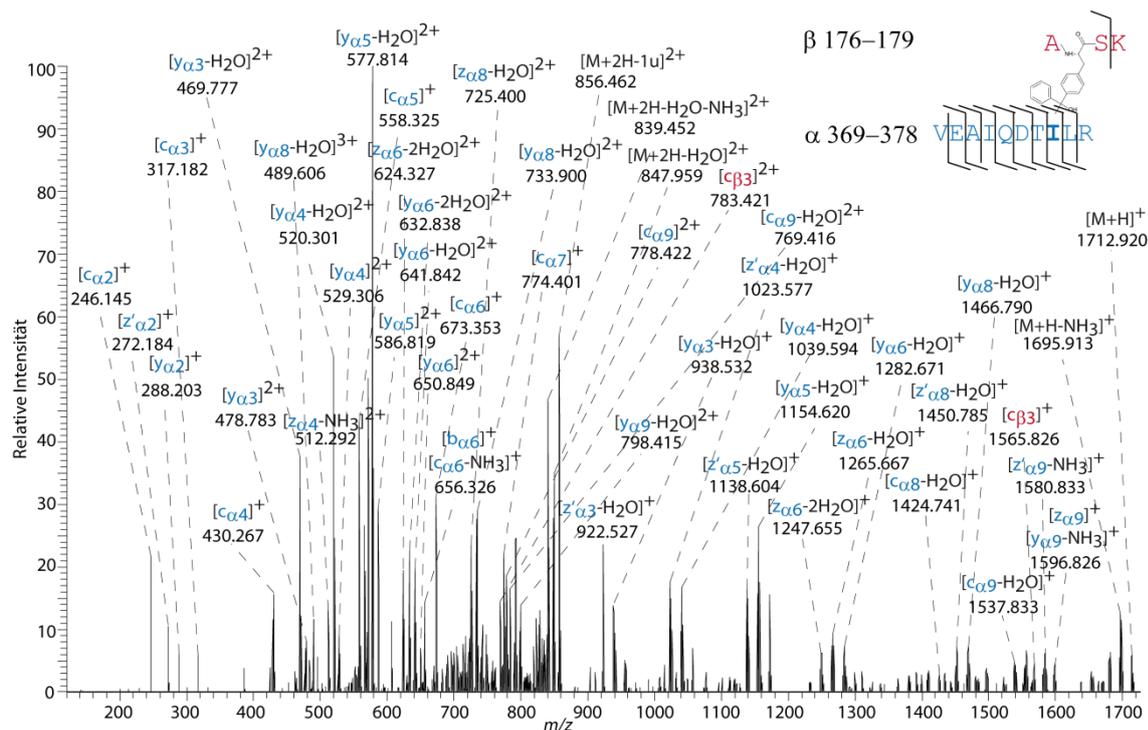


Abbildung A 11: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust bei  $m/z$  428,986 fragmentiert mit der Kombinationstechnik ETciD (50 ms Reaktionszeit ETD und 10% nachfolgende Kollisionsenergie (CID)).



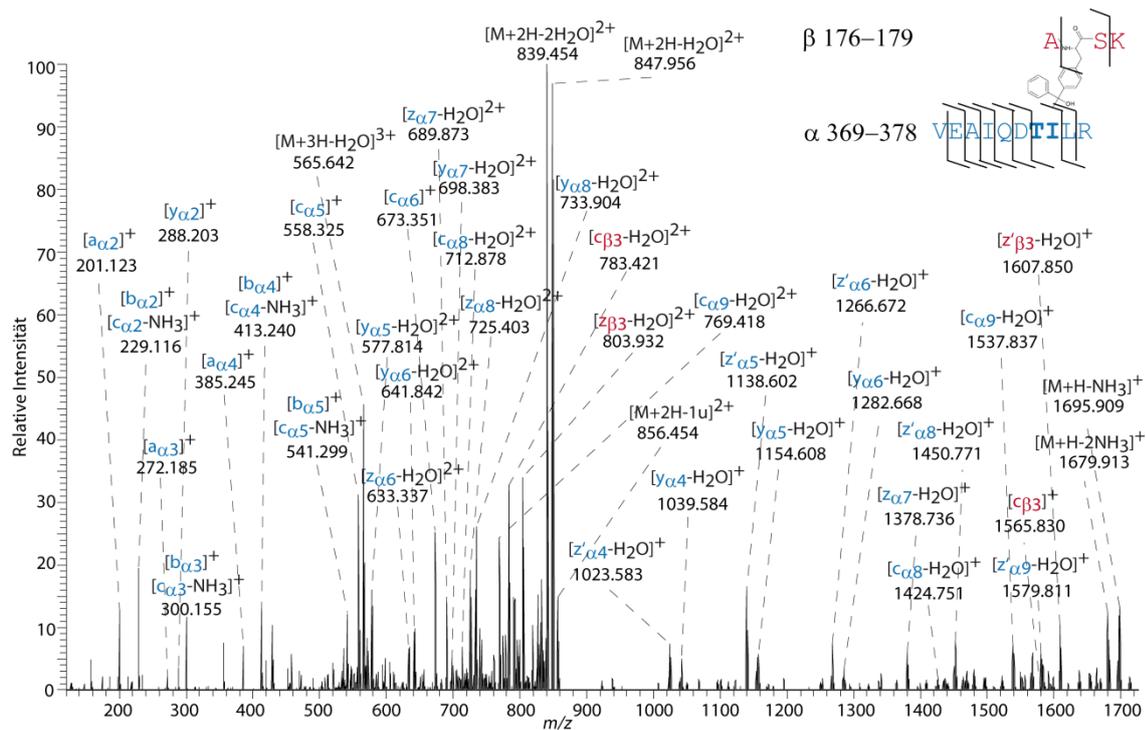


Abbildung A 13: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 ohne Wasserverlust bei  $m/z$  428,986 fragmentiert mit der Kombinationstechnik EThcD (50 ms Reaktionszeit ETD und 25% nachfolgende Kollisionsenergie (HCD)).

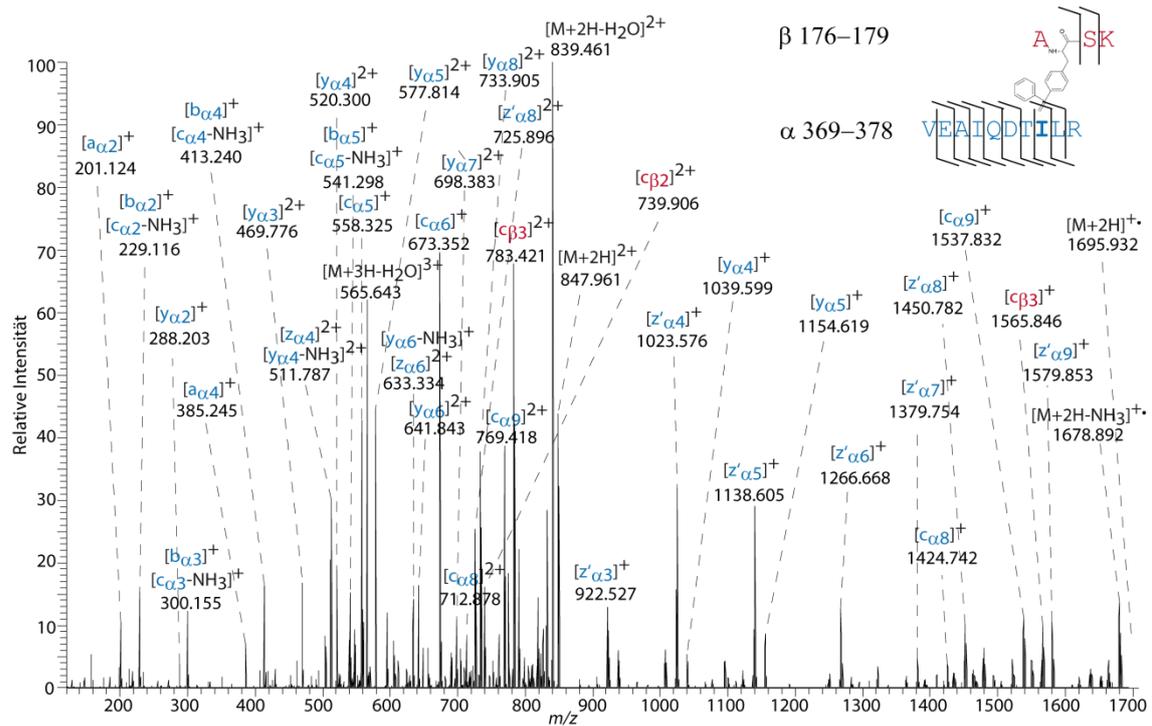


Abbildung A 14: MS/MS des 4+ geladenen Vorläuferions des Quervernetzungsproduktes zwischen Bpa-180 und Ile-379 mit Wasserverlust bei  $m/z$  424,483 fragmentiert mit der Kombinationstechnik EThcD (50 ms Reaktionszeit ETD und 25% nachfolgende Kollisionsenergie (HCD)).

Tabelle A 1: Verunreinigungen aus der Affinitäts- und Anionenaustauschchromatographie der PPAR- $\alpha$ -L258Bpa aus den Abbildungen 32 und 33 analysiert mittels LC-MS/MS.

<i>E.coli Protein</i>	<i>Gelbande</i>	<i>Swiss-Prot-Eintrag</i>
30S Ribosomal protein S10	1	A7ZSL0
50S Ribosomal protein L9	2	A7ZV74
Eisenaufnahmeregulationsprotein	3; B	P0A9B1
50S Ribosomal Protein L5	4	A7ZSJ7
<i>Catabolite gene activator</i>	5; C	P0ACK0
30S Ribosomal protein S2	6	B7UIL4
<i>Uncharacterized protein yhbW</i>	7	P0ADV6
Transkriptionstermination Faktor Rho	8	P0AG32
Glutamine-Fructose-6-Phosphat Aminotransferase	9; D	P17169
Protein hfq	10; A	A7ZV41

Tabelle A 2: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR- $\alpha$ -L258Bpa. n= Asparagin Deamidierung (entsprechend wie D); m= Methionin Oxidation; q= Glutamin Deamidierung (entsprechend wie E); x= Bpa.

<i>gemessene m/z-Werte</i>	<i>kalkulierte protonierte molekulare Masse [Da]</i>	<i>Ladung</i>	<i>Massenabweichung [ppm]</i>	<i>quervernetzte Aminosäuren in PPAR-<math>\alpha</math>-LBD-L258Bpa</i>	<i>ohne Liganden</i>	<i>mit GW6471</i>	<i>mit GW7647</i>	<i>Aminosäuresequenz</i>	<i>In-Lösung- oder in-Gel-Spaltung</i>
542,634	1625,890	3	-1,1	T253/L254 mit Bpa258	✓			$\alpha$ xVANGIqNK $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung</i>

Anhang

737,399	2210,182	3	-0,1	T253/L254 mit Bpa258	✓			$\alpha$ xVANGIQnKEAEVR $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung</i>
813,448	1625,890	2	-0,3	L254 mit Bpa258	✓	✓	✓	$\alpha$ xVANGIQnK $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
881,740	2643,206	3	-0,4	D466 mit Bpa258	✓			$\alpha$ DMYGLEHHHHHH $\beta$ xVANGIQnK	<i>in-Lösung</i>
931,449	1861,890	2	-0,1	N217/F218/ N219/M220/ N221/K222 mit Bpa258	✓			$\alpha$ xVANGIQnK $\beta$ NFN <b>MnK</b>	<i>in-Lösung</i>
926,951	1852,894	2	0,8	A363 mit Bpa258	✓			$\alpha$ xVANGIQnK $\beta$ FDFAMK	<i>in-Lösung</i>
926,951	1852,894	2	0,8	M364 mit Bpa258	✓			$\alpha$ xVANGIQnK $\beta$ FDFAMK	<i>in-Lösung</i>
850,402	3398,585	4	0,0	P238 mit Bpa258	✓			$\alpha$ ASNNPPFVIHDMETLBMAE K $\beta$ xVANGIQnK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
850,402	3398,585	4	0,0	A233 mit Bpa258	✓			$\alpha$ ASNNPPFVIHDMETLBMAE K $\beta$ xVANGIQnK	<i>in-Lösung in-Gel</i>
1133,535	3398,585	3	1,0	M244/E245/ T246/L247 mit Bpa258	✓	✓		$\alpha$ ASNNPPFVIHDMETLBMAE K	<i>in-Lösung</i>

## Anhang

882,069	2644,190	3	1,0	D466/M467/ Y468 mit Bpa258	✓		β xVANGIQnK α <b>DMYGLEHHHHHH</b> β xVANGIQnK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
1060,502	4238,983	4	0,6	E267/A268/ E269/V270/ R271/I272/ F273 mit Bpa258	✓		α <b>EAEVRIFHBBqBTSVETVTE</b> LTEFAK β xVANGIQNK	<i>in-Gel</i>
542,306	1624,906	3	-1,0	A256/K257 mit Bpa258	✓	✓	α xVANGIQNK β TLVAK	<i>in-Gel</i>
542,635	1625,890	3	-0,5	K257 mit Bpa258	✓		α xVANGIQNK β TLVAK	<i>in-Gel</i>
926,460	1851,910	2	2,0	F359/D360/ F361/A362/ M363/K364 mit Bpa258	✓		α xVANGIQNK β <b>FDFAK</b>	<i>in-Gel</i>
661,802	2644,190	4	-2,0	D466/M467 mit Bpa258	✓		α <b>DMYGLEHHHHHH</b> β xVANGIQnK	<i>in-Gel</i>
618,302	1852,894	3	-1,7	M363/K364 mit Bpa258	✓		α xVANGIQnK β <b>FDFAK</b>	<i>in-Gel</i>
691,550	3453,716	5	0,9	R348/K349 mit Bpa258	✓	✓	α <b>SLRKPFBDIMEPKFDFAK</b> β xVANGIQNK	<i>in-Lösung</i>
691,550	3453,716	5	0,9	A362/M363/	✓	✓	α	<i>in-Lösung</i>

## Anhang

				K364 mit Bpa258				SLRKPFBDIMEPKFDFAMK	
777,738	2331,203	3	-1,7	F218 mit Bpa258	✓	✓		β xVANGIQNK α NFNmNKVKAR	<i>in-Lösung</i>
777,738	2331,203	3	-1,7	R226 mit Bpa258	✓	✓		β xVANGIQNK α NFNmNKVKAR	<i>in-Lösung</i>
773,066	2317,176	3	2,8	F218 mit Bpa258	✓	✓		β xVANGIQNK α NFNmNKVKAR	<i>in-Lösung</i>
773,066	2317,176	3	2,8	R226 mit Bpa258	✓	✓		β xVANGIQnK α NFNmNKVKAR	<i>in-Lösung</i>
1176,282	3526,840	3	-2,9	Y214 mit Bpa258	✓	✓		α SLAKRIYEAYLKNFNmKV	<i>in-Lösung</i>
882,463	3526,840	4	-2,8	Y214 mit Bpa258	✓			K β xVANGIQnK α SLAKRIYEAYLKNFNmKV	<i>in-Lösung</i>
849,428	1697,849	2	-0,6	V270 mit Bpa258	✓			K β xVANGIQnK α xVANGIQnK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
812,957	1624,906	2	0,8	V255 mit Bpa258	✓	✓	✓	β EAEVR α xVANGIQNK	<i>in-Gel</i>
646,698	1938,081	3	-0,4	A225 mit Bpa258	✓			β TLVAK α xVANGIQnK	<i>in-Gel</i>
930,957	1860,906	2	0,4	N217 mit	✓			β ARVILSGK α xVANGIQnK	<i>in-Gel</i>

## Anhang

875,432	2624,281	3	0,3	Bpa258 A333 mit	✓	β NFNMNK α DGmLVAYGNGFITR	<i>in-Gel</i>
770,402	3078,590	4	-0,9	Bpa258 P458/L459 mit	✓	β xVANGIQnK α KTESDAALHPLLQEIYR	<i>in-Gel</i>
881,742	2643,206	3	1,9	Bpa258 M467 mit	✓	β xVANGIQnK α DMYGLEHHHHHH	<i>in-Gel</i>
881,742	2643,206	3	1,9	Bpa258 H475 mit	✓	β xVANGIQnK α DMYGLEHHHHHH	<i>in-Gel</i>
881,741	2643,206	3	0,7	Bpa258 H477 mit	✓	β xVANGIQnK α DMYGLEHHHHHH	<i>in-Gel</i>
703,537	3513,653	5	0,4	Bpa258 P350/F351 mit	✓	β xVANGIQnK α PFCDIMEPKFDFAmK	<i>in-Gel</i>
813,448	1625,890	2	-1,1	Bpa258 V255 mit	✓	β xVANGIQnKEAEVR α xVANGIQnK	<i>in-Gel</i>
794,431	1587,853	2	0,4	Bpa258 Y214 mit	✓	β TLVAK α xVANGIQNK	<i>in-Gel</i>
569,280	1705,825	3	0,1	Bpa258 E471 mit	✓	β AYLK α xVANGIQNK	<i>in-Gel</i>
826,145	3301,560	4	-1,1	Bpa258 Y468 mit	✓	β MYGLE α TLVAKxVANGIQnKE	<i>in-Gel</i>
826,145	3301,560	4	-1,1	Bpa258 H477 mit	✓	β DmYGLEHHHHHH α TLVAKxVANGIQnKE	<i>in-Gel</i>
				Bpa258		β DmYGLEHHHHHH	

Anhang

Tabelle A 3: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR- $\alpha$ -F273Bpa. n= Asparagin Deamidierung (entsprechend wie D); m= Methionin Oxidation; B= Carbamidomethylierung am Cystein; x= Bpa

<i>gemessene m/z-Werte</i>	<i>kalkulierte protonierte molekulare Masse [Da]</i>	<i>Ladung</i>	<i>Massenabweichung [ppm]</i>	<i>quervernetzte Aminosäuren in PPAR-<math>\alpha</math>-LBD-F273Bpa</i>	<i>ohne Liganden</i>	<i>mit GW6471</i>	<i>mit GW7647</i>	<i>Aminosäuresequenz</i>	<i>In-Lösung- oder in-Gel-Spaltung</i>
799,386	3194,521	4	0,1	V255/A256/ K257 mit Bpa273	✓			$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA K $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung</i>
1065,513	3194,521	3	1,3	A256/K257 mit Bpa273	✓			$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA K $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
1065,513	3194,521	3	1,3	L254 mit Bpa273	✓			$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA K $\beta$ TLVAK	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
1207,247	3619,723	3	1,0	L258/V259 mit Bpa273	✓			$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA K $\beta$ LVANGIQNK	<i>in-Lösung</i>
1144,180	3430,521	3	1,2	N217/F218/ N219/M220/	✓			$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA	<i>in-Lösung</i>

Anhang

858,386	3430,521	4	0,6	N221/K222 mit Bpa273	✓		K β <b>NFNMNK</b>	<i>in-Lösung</i>
				N217/F218/ N219/M220/ N221/K222 mit Bpa273			α <b>IxHBBQBT</b> SVETVTELEFA K β <b>NFNMNK</b>	
905,931	3620,707	4	-1,4	L258/V259/ A260 mit Bpa273	✓		α <b>IxHBBQBT</b> SVETVTELEFA K β <b>LVANGIQnK</b>	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
1207,576	3620,707	3	1,4	L258 mit Bpa273	✓	✓	α <b>IxHBBQBT</b> SVETVTELEFA K β <b>LVANGIQnK</b>	<i>in-Lösung, in-Gel</i>
1141,181	3421,525	3	1,3	F359/D360/ F361/A362/ M363/K364 mit Bpa258	✓	✓	α <b>IxHBBQBT</b> SVETVTELEFA K β <b>FDFAMK</b>	<i>in-Lösung</i>
1242,561	4967,216	4	1,0	P238/F239/ V240/I241/ H242 mit Bpa273	✓		α <b>IxHBBQBT</b> SVETVTELEFA K β <b>ASNPPFVIHDMETLBMAE</b> K	<i>in-Lösung</i>

Anhang

1175,344	4698,344	4	2,2	H440/A441/ Q442/L443 mit Bpa273	✓		α IxHCCQCTSVETVTELTEFA K β MADLRQLVTEHAQLVQIIK	<i>in-Lösung</i>
891,422	3562,658	4	2,0	I210/Y211 mit Bpa273	✓	✓	α IxHBBQBTSVETVTELTEFA K β IYEAYLK	<i>in-Gel</i>
891,422	3562,658	4	2,0	E212/A213 mit Bpa273		✓	α IxHBBQBTSVETVTELTEFA K β IYEAYLK	<i>in-Gel</i>
939,784	2817,337	3	-0,1	A225 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β ARVILSGK	<i>in-Gel</i>
939,784	2817,337	3	-0,1	I228/L229 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β ARVILSGK	<i>in-Gel</i>
835,721	2505,146	3	0,4	T253/L254 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β TLVAK	<i>in-Gel</i>
1465,679	2930,348	2	0,7	L258 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β LVANGIQNK	<i>in-Gel</i>
977,783	2931,332	3	0,6	L258 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β LVANGIQnK	<i>in-Gel</i>
733,342	2930,348	4	-0,4	L258 mit Bpa273	✓		α IxHBBQBTSVETVTE β LVANGIQNK	<i>in-Gel</i>

Anhang

914,387	2741,146	3	0,4	N217 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ NFNMNK	<i>in-Gel</i>
1371,078	2741,146	2	1,1	N217/F218/ N219 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ NFNMNK	<i>in-Gel</i>
1619,706	3238,402	2	0,7	I354/M355/ E356 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ KPFBDIMPEK	<i>in-Gel</i>
1080,140	3238,402	3	0,8	I354/M355/ E356 mit Bpa273	✓	✓	$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ KPFBDIMPEK	<i>in-Gel</i>
942,737	2826,191	3	1,7	T246/L247/ C248 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ TLBMAEK	<i>in-Gel</i>
911,389	2732,150	3	1,2	A362 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ FDFAMK	<i>in-Gel</i>
1148,826	3444,464	3	0,1	M244/E245 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTE $\beta$ ASNNPPFVIHDME	<i>in-Gel</i>
565,271	3386,581	6	1,8	L258 mit Bpa273		✓	$\alpha$ AEVRIxHBBQBTSVETVTE $\beta$ LVANGIQnK	<i>in-Gel</i>
4212,821	1053,962	4	1,1	D466 mit Bpa273	✓		$\alpha$ IxHBBQBTSVETVTELTEFA K $\beta$ DMYGLEHHHHHH	<i>in-Lösung</i>

Tabelle A 4: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD mit BS<sup>2</sup>G  $D_0/D_4$ . Dargestellt sind die Massen der Quervernetzungsprodukte mit BS<sup>2</sup>G als leicht ( $D_0$ ) und schwer ( $D_4$ ). {= N-Terminus des Proteins; n= Asparagin Deamidierung (entsprechend wie D); m= Methionin Oxidation.

Peptid 1	Peptid 2	Quervernetzte Aminosäuren	$[M+H]^+$	m/z	Ladung	BS <sup>2</sup> G		Ligand		
						$D_0$	$D_4$	Frei	GW0742	GW1516
KPFSDIIEPK 324-333	KTETETSLHPLLQEIYK 424-440	K324+K424	3298,749	825,443	4	✓		✓	✓	
IKK 422-424	QLVnGLPPYKEISVHVFYR 232-250	K241+K423/K424	2743,520	549,510	5	✓		✓		
IKK 422-424	QLVnGLPPYKEISVHVFYR 232-250	K241+K423/K424	2747,551	550,316	5		✓	✓		
NFnMTKKK 191-198	{GSQYNPQVADLK {167-178	{167+K196/K197/K198	2426,207	809,407	3	✓		✓	✓	
NFnMTKKK 191-198	{GSQYNPQVADLK {167-178	{167+K196/K197/K198	2430,228	810,747	3		✓	✓	✓	✓
IKK 422-424	KPFSDIIEPK 324-333	K324+K423/K424	1656,960	552,992	3	✓		✓	✓	
IKK 422-424	KPFSDIIEPK 324-333	K324+K423/K424	1656,958	414,995	4	✓		✓	✓	
IKK 422-424	KPFSDIIEPK 324-333	K324+K423/K424	1660,983	554,333	3		✓	✓		
IKK 422-424	KPFSDIIEPK 324-333	K324+K423/K424	1660,981	416,001	4		✓	✓	✓	✓
KK	{GSQYNPQVADLK	{167+K197/K198	1689,882	563,966	3	✓		✓	✓	

## Anhang

197-198	{167-178									
KK	{GSQYNPQVADLK	{167+K197/K198	1693,907	565,307	3	✓	✓	✓	✓	
197-198	{167-178									
{GSQYNPQVADLK	AFSKHIYNAYLK	{167+K182	2869,460	957,158	3	✓	✓			
{167-178	179-190									
{GSQYNPQVADLK	AFSKHIYNAYLK	{167+K182	2869,460	718,120	4	✓	✓			
{167-178	179-190									
{GSQYNPQVADLK	AFSKHIYnAYLK	{167+K182	2870,439	957,485	3	✓	✓			
{167-178	179-190									
{GSQYNPQVADLK	AFSKHIYnAYLK	{167+K182	2870,439	718,365	4	✓	✓			
{167-178	179-190									
KK	AFSKHIYNAYLK	K182+K197/K198	1825,001	457,006	4	✓	✓	✓		
197-198	179-190									
KKAR	SILTGK	K198+S201	1215,743	405,919	3	✓	✓			
197-200	201-206									
KKAR	SILTGK	K198+S201	1219,767	407,260	3		✓	✓		
197-200	201-206									
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2127,106	532,532	4	✓	✓	✓		
197-198	183-196									
KK	SILTGK	K197/K198+S201	988,604	330,206	3	✓	✓			
197-198	201-206									
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3262,753	544,632	6	✓	✓	✓		
197-198	201-226									
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3262,746	1088,253	3	✓	✓			
197-198	201-226									

Anhang

KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3262,749	816,443	4	✓	✓	
197-198	201-226							
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3262,751	653,356	5	✓	✓	
197-198	201-226							
KK	ASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K208	2663,385	533,483	5	✓	✓	
197-198	207-226							
KK	ASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K208	2667,409	667,608	4		✓	✓
197-198	207-226							✓
KAR	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K198+206	3361,792	673,164	5	✓	✓	✓
198-200	201-226							
KAR	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K198+K206	3365,809	673,968	5		✓	✓
198-200	201-226							✓
LLQKMADLR	{GSQYNPQVADLK	{167+K404	2506,323	836,113	3		✓	✓
401-409	{167-178							✓
LLQKmADLR	{GSQYNPQVADLK	{167+K404	2518,299	840,104	3	✓		✓
401-409	{167-178							
IKK	{GSQYNPQVADLK	{167+K423/K424	1802,966	601,660	3	✓		✓
422-424	{167-178							
IKK	{GSQYNPQVADLK	{167+K423/K424	1806,991	603,002	3		✓	✓
422-424	{167-178							✓
KAR	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K198	2226,149	557,293	4	✓		✓
198-200	183-196							
KAR	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K198	2242,143	561,291	4	✓		✓
198-200	183-196							
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2127,108	709,707	3	✓		✓

## Anhang

197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K197/K198	2143,104	536,532	4	✓		✓	
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K197/K198	2143,102	715,039	3	✓		✓	
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFnMTK	K190+K197/K198	2132,116	533,784	4		✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	AFSKHIYNAYLK	K182+ K197/K198	1825,001	365,806	5	✓		✓	
197-198	179-190								
KK	AFSKHIYNAYLK	K182+ K197/K198	1825,005	609,007	3	✓		✓	
197-198	179-190								
KK	AFSKHIYNAYLK	K182+ K197/K198	1829,028	366,611	5		✓	✓	✓
197-198	179-190								
KK	AFSKHIYNAYLK	K182+ K197/K198	1829,025	458,012	4		✓	✓	✓
197-198	179-190								
KK	ASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+S208	2663,385	666,602	4	✓		✓	
197-198	207-226								
{GSQYNPQVADLK	HIYNAYLKNFNMTK	{167+K190	3175,584	794,652	4		✓	✓	✓
{167-179	183-196								
{GSQYNPQVADLK	HIYNAYLKNFnMTK	{167+K190	3176,573	794,899	4		✓	✓	✓
{167-179	183-196								
{GSQYNPQVADLK	HIYNAYLKNFNmTK	{167+K190	3191,580	798,650	4		✓	✓	✓
{167-179	183-196								
{GSQYNPQVADLK	HIYNAYLKNFNmTK	{167+K190	3192,570	798,898	4		✓	✓	✓
{167-179	183-196								

Anhang

{GSQYNPQVADLK {167-179	AFSKHIYnAYLK 179-190	{167+K182	2874,460	719,370	4	✓	✓	✓
{GSQYNPQVADLK {167-179	AFSKHIYnAYLK 179-190	{167+K182	2874,460	958,825	3	✓	✓	✓
{GSQYNPQVADLK {167-179	AFSKHIYNAYLK 179-190	{167+K182	2873,478	958,498	3	✓	✓	✓
{GSQYNPQVADLK {167-179	TETETSLHPLLQEIYKDMY 425-443	{167+K440	3725,787	1242,600	3	✓	✓	
KK 197-198	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK 201-226	K197/K198+K206	3266,771	654,160	5	✓	✓	✓
{GSQYNPQVADLK {167-179	ELTEFAKSIPSFSSLFLNDQVTLLK 261-285	{167+K267	4242,170	1061,303	4	✓	✓	
KK 197-198	KPFSDIIEPK 324-333	K197/K198+K324	1543,874	515,296	3	✓	✓	
KPFSDIIEPK 324-333	{GSQYNPQVADLK {167-179	{167+K324	2588,327	863,447	3	✓	✓	
IKK 422-424	TETETSLHPLLQEIYKDmY 425-443	K423/K424+K440	2810,421	937,479	3	✓	✓	
IKK 422-424	TETETSLHPLLQEIYKDmY 425-443	K423/K424+K440	2814,443	938,819	3	✓	✓	
NFNMTKK 191-197	{GSQYNPQVADLK {167-179	{167+T195/K196/K197	2301,150	767,722	3	✓	✓	
LLQK <sub>m</sub> ADLR 401-409	{GSQYNPQVADLK {167-179	{167+K404	2522,324	841,446	3	✓		✓
KPFSDIIEPK	{GSQYNPQVADLK	{167+K324	2592,353	864,789	3	✓		✓

## Anhang

324-333	{167-179							
{GSQYNPQVADLK	KTETETSLHPLLQEIYK	{167+K424	3448,775	862,949	4	✓	✓	
{167-179	424-440							
{GSQYNPQVADLK	GLVWKQLVNGLPYK	{167+K231	3130,685	1044,233	3	✓	✓	
{167-179	227-241							
KAR	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K198	2230,176	558,300	4	✓	✓	
198-200	183-196							
KK	ASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+S208	2667,408	534,287	5	✓	✓	
197-198	207-226							
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2131,131	533,538	4	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2131,131	711,049	3	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K197/K198	2147,126	537,537	4	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	HIYNAYLKNFnMTK	K190+K197/K198	2128,091	532,778	4	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3266,774	545,302	6	✓	✓	
197-198	201-226							
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIETLWQAEK	K197/K198+K206	3266,775	817,449	4	✓	✓	
197-198	201-226							
{GSQYNPQVADLK	ELTEFAKSIPSFSSLFLNDQVTLK	{167+K267	4246,207	1062,307	4	✓	✓	
{167-179	261-285							
KK	SILTGK	K197/K198+S201	992,629	331,548	3	✓	✓	
197-198	201-206							

Anhang

KAR	SILTGK	K198+S201	1087,647	363,221	3	✓	✓
198-200	201-206						
KAR	SILTGK	K198+S201	1091,672	364,562	3	✓	✓
198-200	201-206						

Tabelle A 5: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in der PPAR-β/δ-LBD mit DMTMM und Urea Quervernetzungsreagenz. {= N-Terminus des Proteins; }= C-Terminus des Proteins; n= Asparagin Deamidierung (entsprechend wie D); q= Glutamin Deamidierung (entsprechend wie E); m= Methionin Oxidation.

<i>Peptid 1</i>	<i>Peptid 2</i>	<i>Quervernetzte Aminosäuren</i>	<i>[M+H]<sup>+</sup></i>	<i>m/z</i>	<i>Ladung</i>	<i>Quervernetzungsreagenz</i>				
						<i>DMTMM</i>	<i>Urea</i>	<i>Frei</i>	<i>GW0742</i>	<i>GW1516</i>
IKK	DMY}	K423+D441	797,422	399,215	2	✓	✓	✓	✓	✓
422-424	441-443									
ELTEFAK	{GSQYNPQVADLK	{167+E264	2138,078	713,364	3	✓	✓	✓	✓	✓
261-267	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLK	{167+E373	2458,301	820,105	3	✓	✓	✓	✓	✓
372-381	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLK	{167+D377	2458,299	820,104	3	✓	✓	✓	✓	✓
372-381	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+E373	2891,529	964,514	3	✓	✓	✓	✓	✓
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+D377	2891,528	964,514	3	✓	✓	✓	✓	✓
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPqVADLK	{167+E373	2459,281	820,432	3	✓	✓	✓	✓	✓

Anhang

372-381	{167-178									
VEAIqDTILR	{GSQYNPqVADLK	{167+E373	2460,267	820,760	3	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPqVADLK	{167+D377	2459,281	820,432	3	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-178									
VEAIqDTILR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+E373	2892,515	964,843	3	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLK	{167+E373	2458,297	1229,652	2	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+E373	2891,530	723,638	4	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLK	{167+E373	2458,297	615,330	4	✓		✓		
372-381	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPqVADLKAFSK	{167+E373	2892,515	723,884	4	✓	✓	✓	✓	
372-381	{167-182									
DMY}	{GSQYNPQVADLK	{167+}443	1728,791	864,899	2	✓		✓		
441-443	{167-178									
DmY}	{GSQYNPQVADLK	{167+}443	1744,786	872,897	2	✓		✓		
441-443	{167-178									
KPFSDIIEPK	{GSQYNPQVADLK	{167+E331	2474,294	619,329	4	✓		✓		
324-333	{167-178									
ELTEFAK	{GSQYNPQVADLK	{167+E264	2138,075	1069,541	2	✓				✓
261-267	{167-178									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLK	{167+D377	2458,296	1229,652	2	✓				✓
372-381	{167-178									

Anhang

ELTEFAK 261-267	{GSQYNPqVADLK {167-178	{167+E264	2139,063	713,693	3	✓				✓
KAR 198-200	SILTGK 201-206	K198+S201	1187,711	594,359	2		✓	✓	✓	✓
KAR 198-200	SILTGK 201-206	K198+S201	1187,710	396,575	3		✓	✓	✓	✓
KKAR 197-200	SILTGK 201-206	K197/K198+S201	1315,805	439,273	3		✓	✓	✓	✓
KKAR 197-200	SILTGK 201-206	K197/K198+S201	1315,807	658,407	2		✓	✓	✓	✓
KKAR 197-200	SILTGK 201-206	K197/K198+S201	1315,809	329,708	4		✓	✓	✓	✓
KKAR 197-200	AFSKHIYNAYLK 179-190	S181/K182+K198	2152,205	538,807	4		✓	✓		
KKAR 197-200	AFSKHIYNAYLK 179-190	S181/K182+K198	2152,204	718,073	3		✓	✓	✓	
KAR 198-200	HIYNAYLKNFNMTKK 183-197	K190+K198	2454,308	614,332	4		✓	✓		✓
KKAR 197-200	HIYNAYLKNFNMTK 183-196	K190+K198	2454,310	614,333	4		✓	✓		✓
KAR 198-200	HIYNAYLKNFNMTK 183-196	K190+K198	2326,213	582,309	4		✓	✓	✓	
KK 197-198	AFSKHIYNAYLK 179-190	S181/K182+K197/K19 8	1925,064	963,036	2		✓	✓	✓	
KK	AFSKHIYNAYLK	S181/K182+K197/K19	1925,065	482,022	4		✓	✓	✓	✓

## Anhang

197-198	179-190	8							
KK	AFSKHIYNAYLK	S181/K182+K197/K19	1925,061	642,358	3	✓	✓	✓	✓
197-198	179-190	8							
KK	AFSKHIYnAYLK	S181/K182+K197/K19	1926,048	482,267	4	✓	✓	✓	
197-198	179-190	8							
KK	AFSKHIYnAYLK	S181/K182+K197/K19	1926,050	642,688	3	✓	✓	✓	
197-198	179-190	8							
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2227,169	743,061	3	✓	✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFNMTK	K190+K197/K198	2227,167	557,547	4	✓	✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLK <sub>n</sub> FNMTK	K190+K197/K198	2228,156	743,390	3	✓	✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLK <sub>n</sub> FNMTK	K190+K197/K198	2228,156	557,794	4	✓	✓		
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K197/K198	2243,165	748,393	3	✓	✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLKNFNmTK	K190+K197/K198	2243,166	561,547	4	✓	✓	✓	✓
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLK <sub>n</sub> FNmTK	K190+K197/K198	2244,150	748,722	3	✓	✓		
197-198	183-196								
KK	HIYNAYLK <sub>n</sub> FNmTK	K190+K197/K198	2244,150	561,793	4	✓	✓		
197-198	183-196								
KK	SILTGK	K197/K198+S201	1088,668	544,838	2	✓	✓	✓	✓
197-198	201-206								

Anhang

KK	SILTGK	K197/K198+S201	1088,668	363,560	3	✓	✓	✓	✓
197-198	201-206								
KK	{GSQYNPQVADLK	{167+K197/K198	1789,946	895,476	2	✓	✓	✓	
197-198	{167-178								
KKAR	{GSQYNPQVADLK	{167+K197/K198	2017,083	673,033	3	✓	✓		
197-200	{167-178								
KKAR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+K197/K198	2450,320	817,445	3	✓	✓		
197-200	{167-182								
KKAR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+K197/K198	2450,315	613,334	4	✓	✓	✓	✓
197-200	{167-182								
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIE	K197/K198+K206/S20	3362,814	841,459	4	✓	✓		
197-198	TLWQAEK	8/T210							
	201-226								
KK	SILTGKASHTAPFVIHDIE	K197/K198+K206/S20	3362,817	673,369	5	✓	✓		
197-198	TLWQAEK	8/T210							
	201-226								
KK	AFSKHIYNAYLKNFNMT	S181/K182+K197/K19	2660,408	665,857	4	✓	✓		✓
197-198	K	8							
	179-196								
KK	AFSKHIYNAYLKNFNMT	S181/K182+K197/K19	2660,403	532,886	5	✓	✓		
197-198	K	8							
	179-196								
KK	AFSKHIYNAYLKNFNmT	S181/K182+K197/K19	2676,399	892,804	3	✓	✓		
197-198	K	8							
	179-196								

Anhang

KK 197-198	AFSKHIYNAYLKNFNmT K 179-196	S181/K182+K197/K19 8	2676,396	669,854	4	✓	✓		
IKK 422-424	KKAR 197-200	K197/K198+K423/K42 4	1085,715	543,361	2	✓	✓		
{GSQYNPQVA DLK {167-178	HIYNAYLKNFNMTK 183-196	{167+K190	3271,622	1091,212	3	✓	✓		✓
{GSQYNPQVA DLK {167-178	HIYNAYLKNFNmTK 183-196	{167+K190	3287,615	1096,543	3	✓	✓		✓
{GSQYNPQVA DLK {167-178	HIYNAYLKNFNmTK 183-196	{167+K190	3287,619	822,660	4	✓	✓		✓
{GSQYNPQVA DLK {167-178	AFSKHIYNAYLK 179-190	{167+S181/K182	2969,517	1485,262	2	✓	✓		
{GSQYNPQVA DLK {167-178	AFSKHIYNAYLK 179-190	{167+S181/K182	2969,517	990,511	3	✓	✓	✓	✓
{GSQYNPQVA DLK {167-178	AFSKHIYnAYLK 179-190	{167+S181/K182	2970,498	990,838	3	✓	✓		
{GSQYNPQVA DLK	HIYNAYLKNFNMTKK 183-197	{167+K190	3399,720	850,685	4	✓	✓		

Anhang

{167-178							
{GSQYNPQVA	HIYNAYLKNFNmTKK	{167+K190	3415,712	854,683	4	✓	✓
DLK	183-197						
{167-178							
{GSQYNPQVA	HIYNAYLKNFNmTKK	{167+K190	3416,690	854,928	4	✓	✓
DLK	183-197						
{167-178							
KAR	{GSQYNPQVADLK	{167+K198	1888,989	630,335	3	✓	✓
198-200	{167-178						
SILTGKASHTA	YGVHEAIFAMLASIVNK	S201/T204/K206/S208	6337,323	1268,270	5	✓	✓
PFVIHDIETLW	DGLLVANGSGFVTR	+K302					
QAEK	286-316						
201-226							
SILTGKASHTA	YGVHEAIFAMLASIVNK	S201/T204/K206/S208	6338,301	1268,466	5	✓	✓
PFVIHDIETLW	DGLLVAnGSGFVTR	+K302					
QAEK	286-316						
201-226							
ALEFHLQANH	YGVHEAIFAMLASIVNK	S298/K302+K400	6166,242	1234,054	5	✓	✓
PDAQYLFPKLL	DGLLVANGSGFVTR						
QK	286-316						
382-404							
ALEFHLQANH	YGVHEAIFAMLASIVNK	S298/K302+K400	6167,224	1234,251	5	✓	✓
PDAQYLFPKLL	DGLLVAnGSGFVTR						
QK	286-316						
382-404							

Anhang

SILTGK	{GSQYNPQVADLK	{167+S201	2566,357	856,124	3	✓	✓		
201-206	{167-178								
KAR	NFNMTKK	T195/K196/K197+K19	1451,780	726,393	2	✓	✓	✓	
198-200	191-197	8							
KAR	NFNMTKK	T195/K196/K197+K19	1451,779	484,598	3	✓	✓	✓	
198-200	191-197	8							
KAR	NFNMTKK	T195/K196/K197+K19	1451,778	363,700	4	✓	✓	✓	
198-200	191-197	8							
KAR	NFNmTKK	T195/K196/K197+K19	1467,777	734,392	2	✓	✓		
198-200	191-197	8							
KAR	NFNmTKK	T195/K196/K197+K19	1467,773	367,699	4	✓	✓		
198-200	191-197	8							
KK	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+K197/K198	2223,176	556,550	4	✓	✓		✓
197-198	{167-182								
KAR	{GSQYNPQVADLKAFSK	{167+K198	2322,223	581,311	4	✓	✓		
198-200	{167-182								
IKK	KKAR	K197+K424	1085,715	362,567	3	✓	✓		
422-424	197-200								
IKK	KPFSDIIEPK	K324+K423/K424	1757,021	878,993	2	✓	✓		
422-424	324-333								
IKK	KPFSDIIEPK	K324+K423/K424	1757,021	586,330	3	✓	✓		
422-424	324-333								
IKK	KPFSDIIEPK	K324+K423/K424	1757,021	439,998	4	✓	✓		
422-424	324-333								
IKK	TETETSLHPLLQEIYKDm	K423/K424+K440	2910,481	970,810	3	✓	✓	✓	✓

Anhang

422-424	Y}							
	425-443							
IKK	TETETSLHPLLQEIYK}	K423/K424+T425/T42	2485,355	829,105	3	✓	✓	
422-424	425-440	7/T429/S430						
IKK	KPFSDIIEPKFEFAVK	K333+K423/K424	2478,339	620,340	4	✓	✓	
422-424	324-339							
QLVNGLPYK	ASHTAPFVIHDIETLWQA	K226+Y240/K241	5330,804	1066,967	5	✓	✓	
EISVHVFYR	EKGLVWK							
232-250	207-231							
QLVNGLPYK	ASHTAPFVIHDIETLWqA	K226+Y240/K241	5331,811	1067,168	5	✓	✓	
EISVHVFYR	EKGLVWK							
232-250	207-231							
KAR	NFNmTKK	T195/K196/K197+K19	1467,774	489,916	3	✓		
198-200	191-197	8						
KAR	AFSKHIYNAYLK	S181/K182+K198	2024,108	675,358	3	✓		✓
198-200	179-190							
{GSQYNPQVA	HIYNAYLKNFNMTKK	{167+K190	3832,954	767,397	5	✓		✓
DLKAFSK	183-197							
{167-182								
{GSQYNPQVA	AFSKHIYNAYLKNFNMT	{167+K190	3704,855	926,969	4	✓		✓
DLK	K							
{167-178	179-196							
{GSQYNPQVA	HIYNAYLKNFNMTK	{167+K190	3704,853	741,776	5	✓		✓
DLKAFSK	183-196							
{167-182								

Anhang

{GSQYNPQVA DLKAFSK {167-182	HIYNAYLKNFNMTK 183-196	{167+K190	3704,845	1235,620	3	✓	✓
KK 197-198	AFSKHIYNAYLKNFNMT K 179-196	S181/K182+K197/K19 8	2660,407	887,474	3	✓	✓
{GSQYNPQVA DLKAFSK {167-182	HIYNAYLKNFNmTKK 183-197	{167+K190	3848,946	770,595	5	✓	✓
KK 197-198	{GSQYNPQVADLKAFSK {167-182	{167+K197/K198	2223,180	741,731	3	✓	✓
{GSQYNPQVA DLK {167-178	AFSKHIYNAYLKNFNmT K 179-196	{167+K190	3720,968	930,968	4	✓	✓

Tabelle A 6: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte der Photoaffinitätsmarkierungsstudien der Varianten der PPAR-β/δ-LBD. {= N-Terminus des Proteins; }= C-Terminus des Proteins; q= Glutamin Deamidierung (entsprechend wie E); m= Methionin Oxidation; X= Bpa.

<i>Peptid 1</i>	<i>Peptid 2</i>	<i>Quervernetzte Aminosäuren</i>	<i>[M+H]<sup>+</sup></i>	<i>m/z</i>	<i>Ladung</i>	<i>Variante F180Bpa</i>		<i>Ligand</i>		
						<i>Ohne Wasserverlust</i>	<i>Mit Wasserverlust</i>	<i>Frei</i>	<i>GW0742</i>	<i>GW1516</i>
AXSK 179-182	VEAIQDTILR 372-381	X180+I379	1712,923	571,646	3	✓		✓	✓	✓
AXSK 179-182	VEAIQDTILR 372-381	X180+I379	1712,923	428,986	4	✓		✓	✓	✓
AXSK	VEAIQDTILR	X180+I379	1712,923	856,965	2	✓		✓	✓	✓

Anhang

179-182	372-381									
AXSK	VEAIqDTILR	X180+I379	1713,904	571,973	3	✓		✓		
179-182	372-381									
AXSK	VEAIqDTILR	X180+I379	1713,905	429,232	4	✓		✓	✓	
179-182	372-381									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	3013,562	754,146	4	✓		✓	✓	✓
372-381	{167-182									
VEAIqDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	3014,555	1005,523	3	✓		✓		✓
372-381	{167-182									
AXSK	{GSQYNPQVADLK	X180+{167/G167/S1	1874,925	625,647	3	✓		✓		
179-182	{167-178	68/Q169/Y170								
AXSK	VEAIQDTILR	X180+I379	1694,912	856,965	2		✓	✓	✓	✓
179-182	372-381									
AXSK	VEAIQDTILR	X180+I379	1694,911	424,483	4		✓	✓	✓	✓
179-182	372-381									
AXSK	VEAIqDTILR	X180+I379	1695,894	424,729	4		✓	✓	✓	✓
179-182	372-381									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	2995,553	999,189	3		✓	✓		✓
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	3013,569	1005,194	3	✓		✓	✓	✓
372-381	{167-182									
VEAIQDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	2995,554	749,644	4		✓	✓		✓
372-381	{167-182									
VEAIqDTILR	{GSQYNPQVADLKAXSK	X180+I379	2996,543	999,519	3		✓			✓
372-381	{167-182									

Anhang

AXSK 179-182	VEAIQDTILR 372-381	X180+I379	1694,912	565,642	3		✓		✓	
VEAIQDTILR 372-381	{GSQYNPQVADLKAXSK {167-182	X180+I379	3013,565	603,519	5	✓		✓		
VEAIQDTILR 372-381	{GSQYNPQVADLKAXSK {167-182	X180+I379	2995,554	599,917	5		✓	✓		
<i>Peptid 1</i>	<i>Peptid 2</i>	<i>Quervernetzte Aminosäuren</i>	<i>[M+H]<sup>+</sup></i>	<i>m/z</i>	<i>Ladung</i>	<i>Variante Y443Bpa</i>		<i>Ligand</i>		
						<i>Ohne Wasserverlust</i>	<i>Mit Wasserverlust</i>	<i>Frei</i>	<i>GW0742</i>	<i>GW1516</i>
DMX} 441-443	QLVTEHAQMMQR 410-421	M419+X443	1986,889	497,478	4	✓		✓		
DMX} 441-443	QLVTEHAQMMQR 410-421	M419+X443	1986,889	662,968	3	✓		✓		
DMX} 441-443	QLVTEHAQMMQR 410-421	M419+X443	1968,881	656,965	3		✓	✓		
DMX} 441-443	QLVTEHAQMMQR 410-421	M419+X443	1968,874	492,974	4		✓	✓		
DMX} 441-443	KPFSDIIEPK 324-333	I330+X443	1688,824	563,609	3	✓		✓		
DMX} 441-443	KPFSDIIEPK 324-333	I330+X443	1688,824	422,957	4	✓		✓		
DMX} 441-443	HAQMMQR 415-421	M419+X443	1416,586	472,860	3	✓		✓	✓	
HAQMMQR 415-421	IYKDMX} 438-443	M419+X443	1820,828	455,956	4	✓		✓	✓	✓

Anhang

HAQMMQR 415-421	IYKDMX} 438-443	M419+X443	1820,828	607,607	3	✓		✓	
DMX} 441-443	QLVTEHAQMmQR 410-421	M419+X443	1984,871	662,291	3		✓		✓
HAQMmQR 415-421	IYKDMX} 438-443	M419+X443	1836,823	459,955	4	✓			✓ ✓
HAQMmQR 415-421	IYKDmX} 438-443	M419+X443	1834,807	459,451	4		✓		✓ ✓
DMX} 441-443	HAQMmQR 415-421	M419+X443	1432,581	478,192	3	✓			✓ ✓
DMX} 441-443	HAQMmQR 415-421	M419+X443	1414,570	472,189	3		✓		✓ ✓
DMX} 441-443	HAQMmQR 415-421	M419+X443	1414,570	707,782	2		✓		✓ ✓
HAQMmQR 415-421	IYKDMX} 438-443	M419+X443	1818,812	455,453	4		✓		✓

Tabelle A 7: Zusammenfassung der Quervernetzungsprodukte in PPAR- $\beta/\delta$ -Volllängenprotein mit BS<sup>2</sup>G D<sub>0</sub>/D<sub>4</sub>. {= N-Terminus des Proteins; }= C-Terminus des Proteins; n= Asparagin Deamidierung (entsprechend wie D); q= Glutamin Deamidierung (entsprechend wie E); B= Carbamidomethylierung am Cystein; m= Methionin Oxidation.

Peptid 1	Peptid 2	Quervernetzte Aminosäuren	[M+H] <sup>+</sup>	m/z	Ladung	BS <sup>2</sup> G		Ligand		
						D <sub>0</sub>	D <sub>4</sub>	Frei	GW0742	GW1516
NKBQYBR 125-131	FQKBLALGMSHNAIR 132-146	K126+K134	2869,349	718,093	4	✓		✓		
NKBQYBR	FQKBLALGMSHNAIR	K126+K134	2873,366	958,46	3		✓	✓		

Anhang

125-131	132-146							
NKBQYBR	FQKBLALGmSHNAIR	K126+K134	2889,368	578,679	5		✓	✓
125-131	132-146							
NKBQYBR	FQKBLALGMSHnAIR	K126+K134	2874,351	719,343	4		✓	✓
125-131	132-146							
KK	KLVAGLTANEGSQYNPQVADLK	K157+K197/K198	2686,441	896,152	3	✓		✓
197-198	157-178							
KK	KLVAGLTANEGSQYNPQVADLK	K157+K197/K198	2690,462	673,371	4		✓	✓
197-198	157-178							
SBKIQK	FQKBLALGMSHNAIR	K118+K134	2608,347	652,842	4		✓	✓
116-121	132-146							
SBKIQK	FQKBLALGMSHNAIR	K118+K134	2608,350	870,121	3		✓	✓
116-121	132-146							
SBKIqK	FQKBLALGMSHNAIR	K118+K134	2605,304	652,081	4	✓		✓
116-121	132-146							
mPEAEKR	AFSKHIYNAYLK	K155+K182	2430,243	810,752	3		✓	✓
150-156	179-190							
MPEAEKR	AFSKHIYNAYLK	K155+K182	2414,247	805,421	3		✓	✓
150-156	179-190							
MPEAEKR	AFSKHIYNAYLK	K155+K182	2410,224	804,080	3	✓		✓
150-156	179-190							
MPEAEKR	AFSKHIYNAYLK	K155+K182	2410,224	603,312	4	✓		✓
150-156	179-190							
SBKIQK	AFSKHIYNAYLK	K118+S181/K182	2317,235	580,064	4		✓	✓
116-121	179-190							

Anhang

SBKIQK	AFSKHIYNAYLK	K118+S181/K182	2317,233	773,082	3	✓	✓	
116-121	179-190							
KK	HIYNAYLKFNMTK	K190+K197/K198	2131,131	533,538	4	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	HIYNAYLKFNmTK	K190+K197/K198	2143,101	536,531	4	✓	✓	
197-198	183-196							
KK	FQKBLALGMSHNAIR	K134+K197/K198	2120,138	530,790	4	✓	✓	
197-198	132-146							
MPEAEKR	NKBQYBR	K126+K155	1987,910	663,308	3	✓	✓	
150-156	125-131							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1899,948	475,742	4	✓	✓	✓
150-156	106-112							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1899,950	950,479	2	✓	✓	
150-156	106-112							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1895,927	632,647	3	✓	✓	✓
150-156	106-112							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1895,924	474,736	4	✓	✓	✓
150-156	106-112							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1895,927	948,467	2	✓	✓	
150-156	106-112							
MPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1899,949	633,988	3	✓	✓	✓
150-156	106-112							
MPEAEKR	mKLEYEK	K107+K155	1911,920	478,735	4	✓	✓	
150-156	106-112							
mPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1911,919	637,978	3	✓	✓	

Anhang

150-156	106-112								
mPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1915,947	639,320	3		✓	✓	✓
150-156	106-112								
mPEAEKR	MKLEYEK	K107+K155	1911,922	956,465	2	✓		✓	
150-156	106-112								
mPEAEKR	mKLEYEK	K107+K155	1931,939	483,741	4		✓	✓	✓
150-156	106-112								
mPEAEKR	mKLEYEK	K107+K155	1927,915	482,734	4	✓		✓	✓
150-156	106-112								
mPEAEKR	mKLEYEK	K107+K155	1931,940	644,652	3		✓	✓	
150-156	106-112								
mPEAEKR	mKLEYEK	K107+K155	1927,915	643,310	3	✓		✓	✓
150-156	106-112								
SBKIQK	NKBQYBR	K118+K126	1886,869	629,628	3	✓		✓	✓
116-121	125-131								
SBKIQK	NKBQYBR	K118+K126	1890,892	630,967	3		✓	✓	✓
116-121	125-131								
IKK	KPFSDIIEPK	K324+K423/K424	1660,982	554,332	3		✓	✓	
422-424	324-333								
IKK	KPFSDIIEPK	K324+K423/K424	1656,959	552,991	3	✓		✓	
422-424	324-333								
IQKK	NKBQYBR	K121+K126	1639,804	547,273	3	✓		✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	NKBQYBR	K121+K126	1639,803	410,706	4	✓		✓	✓
119-122	125-131								

Anhang

IQKK	NKBQYBR	K121+K126	1643,828	548,614	3	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	NKBQYBR	K121+K126	1643,828	411,712	4	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	nKBQYBR	K121+K126	1640,787	410,952	4	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	nKBQYBR	K121+K126	1640,788	547,601	3	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	nKBQYBR	K121+K126	1644,813	411,959	4	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
IQKK	nKBQYBR	K121+K126	1644,815	548,943	3	✓	✓	✓	✓
119-122	125-131								
KNR	NKBQYBR	K122+K126	1540,713	514,243	3	✓	✓	✓	✓
122-124	125-131								
KNR	NKBQYBR	K122+K126	1540,712	385,934	4	✓	✓	✓	✓
122-124	125-131								
KNR	NKBQYBR	K122+K126	1544,736	386,939	4	✓	✓	✓	✓
122-124	125-131								
KNR	nKBQYBR	K122+K126	1541,695	386,179	4	✓	✓	✓	✓
122-124	125-131								
KNR	nKBQYBR	K122+K126	1545,719	387,185	4	✓	✓	✓	✓
122-124	125-131								
KNR	SBKIQK	K118+K122	1275,685	638,346	2	✓	✓	✓	✓
122-124	116-121								
KNR	SBKIQK	K118+K122	1275,684	425,900	3	✓	✓	✓	✓

Anhang

122-124	116-121									
KNR	SBKIQK	K118+K122	1275,685	319,677	4	✓		✓	✓	✓
122-124	116-121									
KNR	SBKIQK	K118+K122	1279,710	638,346	2		✓	✓	✓	✓
122-124	116-121									
KNR	SBKIQK	K118+K122	1279,708	425,900	3		✓	✓	✓	✓
122-124	116-121									
KNR	SBKIQK	K118+K122	1279,708	319,677	4		✓	✓	✓	✓
122-124	116-121									
KAR	SILTGK	K198+S201	1087,647	544,327	2	✓		✓		✓
198-200	201-206									
KAR	SILTGK	K198+S201	1087,647	363,220	3	✓		✓	✓	✓
198-200	201-206									
KAR	SILTGK	K198+S201	1091,672	546,340	2		✓	✓	✓	✓
198-200	201-206									
KAR	SILTGK	K198+S201	1091,671	364,562	3		✓	✓		✓
198-200	201-206									
KK	SILTGK	K197/K198+S201	988,603	330,206	3	✓		✓	✓	✓
197-198	201-206									
KK	SILTGK	K197/K198+S201	992,628	331,548	3		✓	✓	✓	✓
197-198	201-206									
NKBQYBR	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K126	2694,167	898,727	3	✓		✓		
125-131	0-14									
NKBQYBR	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K126	2698,195	900,070	3		✓	✓		
125-131	0-14									

Anhang

nKBQYBR 125-131	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K126	2699,175	900,396	3	✓	✓		✓
MKLEYEK 106-112	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K107	2626,234	876,083	3	✓	✓		✓
MPEAEKR 150-156	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K155	2546,179	849,398	3	✓	✓		✓
MPEAEKR 150-156	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K155	2542,158	848,058	3	✓	✓		
IQKK 119-122	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K121/K122	2182,083	728,032	3	✓	✓	✓	✓
IQKK 119-122	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K121/K122	2186,107	729,374	3	✓	✓		
IQKK 119-122	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K121/K122	2198,079	733,365	3	✓	✓		✓
KNR 122-124	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K122	2098,987	700,334	3	✓	✓	✓	✓
KNR 122-124	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K122	2103,007	701,674	3	✓	✓		✓
KnR 122-124	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K122	2099,968	700,661	3	✓	✓		✓
KAR 198-200	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K198	2039,984	680,666	3	✓	✓		
KAR 198-200	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K198	2055,978	685,997	3	✓	✓		✓
KK	{GAmEQPQEEAPEVR	{+K197/K198	1956,929	652,981	3	✓	✓	✓	✓

Anhang

197-198	0-14								
KK	{GAMEqPQEEAPEVR	{+K197/K198	1941,923	647,979	3	✓	✓	✓	✓
197-198	0-14								
IKK	TETETSLHPLLQEIYKDmY}	K423+K440	2810,420	937,478	3	✓	✓		✓
422-424	425-444								
KK	MPEAEKR	K155+K197	1230,652	410,889	3	✓	✓	✓	✓
197-198	150-156								
KK	MPEAEKR	K155+K197	1234,676	309,424	4		✓	✓	✓
197-198	150-156								
KK	MPEAEKRK	K155+K197/K198	1358,746	340,442	4	✓		✓	
197-198	150-157								
KK	MPEAEKRK	K155+K197/K198	1362,770	341,448	4		✓	✓	
197-198	150-157								
KAR	SBKIQK	K118+K198	1232,678	411,564	3	✓		✓	
198-200	116-121								
KAR	SBKIQK	K118+K198	1236,702	412,906	3		✓	✓	
198-200	116-121								
mPEAEKR	HIYNAYLKNFNMTK	K155+K190	2732,355	683,844	4		✓	✓	
150-156	183-196								
MPEAEKR	HIYNAYLKNFNmTK	K155+K190	2732,342	683,841	4		✓	✓	
150-156	183-196								
MPEAEKR	LLQmADLR	K155+K404	2059,071	515,523	4	✓		✓	
150-156	401-409								
IQKK	VBGDKASGFHYGVHABEBK	K82+K121/K122	2854,340	952,118	3		✓	✓	
119-122	78-97								

Anhang

KKAR 197-200	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K197/K198	2168,081	723,365	3	✓		✓		✓
KKAR 197-200	{GAMEQPQEEAPEVR 0-14	{+K197/K198	2172,102	724,706	3		✓	✓		
KNR 122-124	FQKBLALGMSHNAIR 132-146	K122+K134	2258,159	565,295	4	✓		✓	✓	
MPEAEKR 150-156	MKLEYEKBER 106-115	K107+K155	2341,098	586,030	4	✓		✓		
KNR 122-124	KLVA GLTANEGSQYNPQVADLK 157-178	K122+K157	2828,494	707,879	4	✓		✓		
KNR 122-124	NKBQYBR 125-131	K122+K126	1544,737	515,583	3		✓		✓	
KKAR 197-200	SILTGK 201-206	K198+S201	1215,742	405,919	3	✓			✓	✓
KNR 122-124	FQKBLALGmSHNAIR 132-146	K122+K134	2274,161	569,296	4	✓				✓
KNR 122-124	FQKBLALGmSHNAIR 132-146	K122+K134	2278,185	570,302	4		✓			✓
KK 197-198	FQKBLALGmSHNAIR 132-146	K134+K197/K198	2136,135	534,789	4		✓			✓
KK 197-198	MPEAEKR 150-156	K155+K197	1230,649	308,418	4	✓				✓
NKBQYBR 125-131	{GAmEQPQEEAPEVR 0-14	{+K126	2714,189	905,401	3		✓			✓
NKBQYBR	{GAmEQPQEEAPEVR	{+K126	2710,170	904,062	3	✓				✓

## Anhang

125-131	0-14							
nKBQYBR	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K126	2699,181	900,399	3		✓	✓
125-131	0-14							
KnR	{GAmEQPQEEAPEVR	{+K122	2103,993	702,003	3		✓	✓
122-124	0-14							
KNR	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K122	2082,989	695,001	3	✓		✓
122-124	0-14							
KnR	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K122	2087,998	696,671	3		✓	✓
122-124	0-14							
KK	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K197/K198	1944,963	648,993	3		✓	✓
197-198	0-14							
KK	{GAmEQPQEEAPEVR	{+K197/K198	1960,958	654,324	3		✓	✓
197-198	0-14							
IKK	{GAMEQPQEEAPEVR	{+K423	2054,027	685,348	3	✓		✓
422-424	0-14							
IKK	{GAmEQPQEEAPEVR	{+K423	2070,016	690,677	3	✓		✓
422-424	0-14							
KKAR	SILTGK	K198+S201	1219,767	407,261	3		✓	✓
197-200	201-206							
KNR	MPEAEKR	K122+K155	1372,699	343,930	4	✓		✓
122-124	150-156							
SBKIQK	{GAmEQPqEEAPEVR	{+S116/K118	2450,153	817,389	3		✓	✓
116-121	0-14							
KK	FQKBLALGmSHNAIR	K134+K197/K198	2136,135	534,789	4		✓	✓
197-198	132-146							

### **Danksagung**

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Andrea Sinz, meiner Doktormutter, für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die damit verbundene Möglichkeit diese Dissertation anzufertigen bedanken. Die vielen konstruktiven Gespräche, Denkanstöße und Feedbacks waren für den Erfolg dieser Arbeit entscheidend. Für ihr außerordentliches Engagement in meiner Promotionszeit möchte ich mich herzlich bedanken. Ebenso haben mich unsere Gespräche für den weiteren Lebensweg maßgeblich geprägt.

Ein besonderer Dank gebührt der gesamten Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme, die vielseitigen Gespräche und Anregungen.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die massenspektrometrischen und biochemischen Methoden möchte ich mich bei Dr. Christian Ihling und Dr. Knut Kölbl bedanken.

Bei Dirk Tänzler möchte ich mich ganz herzlich für die tatkräftige Unterstützung bei der Expression der PPAR- $\beta/\delta$ -LBD und deren Varianten bedanken.

Frau Martina Mannd und Frau Antje Herbrich (ehemals Peters) möchte ich mich für die vielseitige Unterstützung bedanken.

Für die hervorragende Einarbeitung in den Versuch Trifluormethyl-modifiziertes Photomethionin/Photoleucin zu synthetisieren möchte ich Dr. Simon Drescher danken.

Meinen Wahlpflichtfachstudenten der gesamten Jahre möchte ich mich ebenfalls für ihre tatkräftige Unterstützung bei einer Vielzahl an Fragestellungen, wie Fragmentierung von Peptiden und Expression von PPAR- $\beta/\delta$ -Varianten bedanken.

Vielen Dank an Lisa Lampp und Marcel Klemm für die Korrektur dieser Arbeit und die damit verbundenen kritischen Kommentare.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner Frau und meinen Kindern, für die Unterstützung in den Jahren bedanken.

## Publikationen

### Originalarbeiten:

**Rico Schwarz**, Dirk Tänzler, Christian H. Ihling, Mathias Q. Müller, Knut Kölbl ,  
und Andrea Sinz: “Monitoring Conformational Changes in Peroxisome Proliferator-Activated  
Receptor  $\alpha$  by a Genetically Encoded Photoamino Acid, Cross-Linking, and Mass  
Spectrometry” *J. Med. Chem.* 56 , 4252–4263 (2013)

**Rico Schwarz**, Dirk Tänzler, Christian H. Ihling und Andrea Sinz: “Monitoring Solution  
Structures of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\beta/\delta$  upon Ligand Binding” *PLoS  
ONE*.11, e0151412 (2016)

### Vorträge:

PhD-Meeting der Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft, 18.-20.03.2015, Biberach:  
“Monitoring Conformational Changes in PPAR  $\beta/\delta$  by Chemical Cross-linking, Photo-  
Affinity Labeling, and Mass Spectrometry”

48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 01.-04.03.2015,  
Wuppertal: “Monitoring Conformational Changes in PPAR  $\beta/\delta$  by Chemical Cross-linking,  
Photo-Affinity Labeling, and Mass Spectrometry”

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 24.-26.09.2014, Frankfurt am  
Main: “Monitoring Conformational Changes in PPAR $\beta/\delta$  by Cross-linking and Mass  
Spectrometry”

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 11.-13.10.2012, Greifswald:  
“Incorporation of unnatural amino acids to monitor conformational changes in peroxisome  
proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ )”

**Poster:**

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 24.-26.09.2014, Frankfurt am Main: "Monitoring Conformational Changes in PPAR $\beta/\delta$  by Cross-linking and Mass Spectrometry"

47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 02.-05.03.2014, Frankfurt am Main: "Monitoring Conformational Changes in PPAR $\alpha$  by Photo- Affinity Labeling and Mass Spectrometry"

46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 10.-13.03.2013, Berlin: "Monitoring Conformational Changes in PPAR $\alpha$  by Photo-Affinity Labeling and Orbitrap Mass Spectrometry"

Joint Conference of German Mass Spectrometry Society and Polish Mass Spectrometry Society, 04.-07.03.2012, Poznan: "Monitoring Conformational Changes in PPAR $\alpha$  by Photo-Affinity Labeling and High-Resolution Mass Spectrometry"

**Lebenslauf**

**Name:** Rico Schwarz

**Geburtsdatum:** 25.03.1987

**Geburtsort:** Burgstädt

**Beruflicher Werdegang:**

- 01. Januar 2016 bis heute** wissenschaftlicher Mitarbeiter an der  
Universitätsmedizin Rostock im Institut für  
Toxikologie und Pharmakologie
- 01. Dezember 2011 bis 31. Dezember 2015** wissenschaftlicher Mitarbeiter an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
in der Abteilung Pharmazeutischen Chemie  
und Bioanalytik
- 01. Februar 2012 bis 31. Januar 2015** Apotheker auf Mini-Job-Basis in der  
Apotheke im Magistralen Carré in Halle
- 18. Januar 2012** Approbation als Apotheker
- 24. November 2011** 3. Abschnitt der Pharmazeutische Prüfung  
an der Martin-Luther-Universität Halle-  
Wittenberg
- 01. Mai bis 31. Oktober 2011** Pharmazeutisches Praktikum in der Merkur  
Apotheke in Mittweida

- 01. November 2010 bis 30. April 2011**      Anfertigen einer Diplomarbeit in der Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik mit dem Thema: „Einbau der photoreaktiven Aminosäure *para*-Benzoylphenylalanin in die Ligandenbindungsdomäne des Peroxisom-Proliferator-Aktivierten Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) für Photoaffinitätsmarkierungsstudien“
- 28. September 2010**      2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 02. bis 16. September 2009**      Praktikum in der Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik
- 01. Oktober bis 30. November 2008**      wissenschaftliche Hilfskraft in der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Prof. Dr. Neubert
- 11. September 2008**      1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 01. Oktober 2006 bis 30. September 2010**      Studium Pharmazie an der Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
- 01. Mai bis 30. Juni 2006**      Pflegehilfskraft im Krankenhaus Mittweida
- 01. August 2005 bis 30. April 2006**      Zivildienstleistender auf der Intensivstation des Krankenhauses in Mittweida

## Lebenslauf

---

**02. Juli 2005**

Abitur am Städtischen Gymnasium  
Mittweida

**1997 bis 2005**

Besuch des Städtischen Gymnasiums  
Mittweida

**August 1993 bis 1997**

Besuch der Pestalozzi-Grundschule in  
Mittweida

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Hilfe von Dritten angefertigt zu haben. Alle zitierten Textstellen aus mündlichen und schriftlichen Quellen sind im Literaturverzeichnis aufgeführt und als solche gekennzeichnet. Ebenso sind bereitgestellte Materialien und Dienstleistungen von Personen als solche dargestellt. Bei der Auswertung der Daten und Erstellung des Manuskriptes waren keine anderen Personen, insbesondere Promotionsberater, beteiligt. Es wurden ebenfalls keine Dritte für Leistungen im Rahmen des Auswertens der Daten und Erstellen der Arbeit bezahlt. Die vorliegende Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Rostock, den

Rico Schwarz