## Massenspektrometrische Untersuchungen an Peroxisom-Proliferator-aktiviertem Rezeptor alpha

## Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Mathias Q. Müller geboren am 02.11.1981 in Weißenfels

GutachterInnen:

- 1. Prof. Dr. Andrea Sinz
- 2. Prof. Dr. Peter Imming
- 3. Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić

Halle (Saale), den 21. Januar 2011Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juli 2011

# Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis							
	Abbildungsverzeichnis							
Tabellenverzeichnis								
	Abk	ürzung	sverzeichnis	XI				
Ζı	Zusammenfassung 1							
Sι	ımma	iry		5				
1	The	oretisc	he Grundlagen	9				
	1.1	Nukle	äre Rezeptoren	9				
		1.1.1	Aktivierung der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren	9				
		1.1.2	Die Rolle von PPAR $\alpha$ im Lipidmetabolismus $\ . \ . \ . \ . \ .$ .	11				
		1.1.3	Struktur der Ligandenbindungsdomäne	12				
		1.1.4	PPAR-Agonisten	13				
	1.2	Masse	nspektrometrische Methoden	16				
		1.2.1	MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie	16				
		1.2.2	ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie	21				
	1.3	Chem	isches Cross-Linking	28				
		1.3.1	Historie	28				
		1.3.2	Strategie des chemischen Cross-Linkings	29				
		1.3.3	Reaktivität der Cross-Linking-Reagenzien	31				
		1.3.4	Strategien zur Identifizierung von Cross-Linking-Produkten	34				

2 Material und Methoden		erial ur	nd Methoden	41
	2.1	Chemi	kalien und Geräte	41
		2.1.1	Proteine und Peptide	41
		2.1.2	Enzyme	42
		2.1.3	Pufferlösungen	42
		2.1.4	Stammlösungen und Nährmedien	43
		2.1.5	Cross-Linking-Reagenzien	45
		2.1.6	Chemikalien	45
		2.1.7	Primer	47
		2.1.8	Plasmide	48
		2.1.9	<i>E. coli</i> -Stämme	49
		2.1.10	Kits	49
		2.1.11	Laborgeräte	49
		2.1.12	Software	52
	2.2	Molek	ularbiologische Methoden	53
		2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach <i>Inoue</i>	53
		2.2.2	Herstellung elektrokompetenter Zellen	54
		2.2.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen	54
		2.2.4	Elektrotransformation	54
		2.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	55
		2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	55
		2.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	56
		2.2.8	Ortsspezifische Mutagenese	56
		2.2.9	Subklonierung	57
	2.3	Protei	nchemische Methoden	59
		2.3.1	Expression von PPAR $\alpha$	59
		2.3.2	Expression stest der PPAR $\alpha$ Bpa-Mutanten	60
		2.3.3	Reinigung von PPAR $\alpha$	61
		2.3.4	SDS-PAGE	61

		2.3.5	Western Blot	•	62
		2.3.6	Kolloidale Coomassie-Färbung nach <i>Neuhoff</i>		62
		2.3.7	Chemisches Cross-Linking		63
		2.3.8	In-Lösungs-Spaltung		63
		2.3.9	In-Gel-Spaltung		64
	2.4	Masse	nspektrometrische Methoden		65
		2.4.1	Lineare MALDI-TOF-Massenspektrometrie		65
		2.4.2	$Offline\-Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie  .$		66
		2.4.3	Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massen spektrometrie		68
		2.4.4	Identifizierung von Cross-Linking-Produkten		71
3	Erge	ebnisse			73
	3.1	Klonie	$\operatorname{rung}$		73
		3.1.1	Subklonierung von PPAR $\alpha$ in pET-28a		73
		3.1.2	Konstruktion des T-Vektors		75
	3.2	3.2 Expression und Reinigung der PPARa-LBD			75
	3.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen			78	
	3.4	4 Spaltbare Cross-Linker			84
		3.4.1	Motivation		84
		3.4.2	"Edman"-Reagenz		85
		3.4.3	Fragmentierungsverhalten des Thioharnstoff-Reagenzes		94
		3.4.4	Harnstoff-Reagenz		103
	3.5	Cross-	Linking mit der photoreaktiven Aminosäure Bpa		117
4	Disk	ussion	und Ausblick		121
	4.1	Expres	ssion und Reinigung der Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\alpha$		121
	4.2	Unters	suchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen		123
	4.3	Entwi	cklung MS-spaltbarer Cross-Linker		127
		4.3.1	"Edman"-Reagenz		127
		4.3.2	Thioharnstoff-Reagenz		128

		4.3.3 Harnstoff-Reagenz	129
	4.4	Inkorporation photoreaktiver Aminosäuren in $\mathrm{PPAR}\alpha$	131
	4.5	Ausblick	133
A	Anh	nang	135
Lit	teratı	urverzeichnis	xv
Da	anksa	agung	XXV
Publikationen und Tagungsbeiträge XX			XXVII
Le	bensl	slauf	XXXI
Se	lbstä	andigkeitserklärung	xxxIII

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Modell zur Transkriptionsaktivierung durch PPARs	10
1.2	Kristallstrukturen der drei PPAR-LBD-Subtypen $\alpha,\ \beta$ und $\gamma$ $\ .$	13
1.3	Agonisten der PPAR-Subtypen PPAR $\alpha$ und PPAR $\gamma$	14
1.4	Duale Agonisten und Breitband-Agonisten der PPAR-Subtypen	15
1.5	MALDI-Matrices	17
1.6	Aufbau eines TOF/TOF-Analysators mit Reflektron $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	19
1.7	Verzögerte Extraktion in einem linearen Flugzeitmassenanalysator	20
1.8	Schematische Darstellung des MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers	
	Ultraflex III	21
1.9	Schematischer Aufbau einer Elektrospray-Ionenquelle nach Fenn	23
1.10	Aufbau einer linearen Ionenfalle	24
1.11	Schematischer Aufbau des Hybridmassenspektrometers LTQ-Orbitrap-XL	25
1.12	Strategie zur MS-Analyse von Protein-Konformationsänderungen	30
1.13	Nomenklatur der MS/MS-Daten quervernetzter Peptide $\ldots \ldots \ldots$	30
1.14	Reaktionsmechanismus des Cross-Linkings mit NHS-Estern	32
1.15	Reaktionsmechanismus des Cross-Linkings mit Photoaminosäuren	33
1.16	Cross-Linker mit MS-spaltbaren Protein interaktions reportern $\ \ldots \ \ldots$ .	38
9.1	Aminosäurosaguongon von Poptidon und Protoinon	41
2.1	Anniosauresequenzen von repriden und riotemen	41
2.2	Massenspektrometrische Methoden an der LTQ-Orbitrap-XL	70
3.1	Klonierungsschema zur Herstellung eines T-Vektors	74
3.2	Affinitätschromatographische Reinigung von PPAR $\alpha$	76

A.1	Mit den Reagenzien $BS^2G$ und $BS^3$ modifizierte $PPAR\alpha$ -Peptide 135
A.2	Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren "Edman-Reagenzes" 138
A.3	Modifikationen von Lysozym mit einem hydrolysierten "Edman"-Reagenz . $139$
A.4	Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren Thioharnstoff-Reagenze s $\ .\ .\ .\ 139$
A.5	Mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziertes Munc13-1-Peptid140
A.6	ESI-LTQ-Orbitrap-MS eines interpeptidalen Cross-Links in ${\rm PPAR}\alpha$ 141
A.7	Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren Harnstoff-Reagenzes 142
A.8	Mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziertes Munc13-1-
	Peptid (MALDI)
A.9	MALDI-TOF/TOF-MS eines interpeptidalen Cross-Links in PPAR $\alpha$ 143

# Tabellenverzeichnis

1.1	Isotopenmarkierte Cross-Linker
1.2	Spaltbare Cross-Linker
2.1	PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von Genen
2.2	Reaktionsansatz zur ortsspezifischen Mutagenese
2.3	Herstellung des T-Vektors
2.4	Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA
2.5	Restriktionsendonukleolyse von Vektor- und Insert-DNA
2.6	Zusammensetzung 12 % iger Trenngele und 5 % iger Sammelgele 62
2.7	Protein- und Peptidkalibrationsstandards für die MALDI-TOF-MS 66
3.1	Kontaminierende <i>E. coli</i> -Proteine
3.2	Cross-Linking-Produkte mit $BS^3$ und $BS^2G$
3.3	Mit hydrolysierten Cross-Linkern $\rm BS^3$ und $\rm BS^2G$ modifizierte Peptide 84
3.4	Charakteristische Neutralverluste der verschiedenen Cross-Linking-Typen 115
4.1	Theoretisches Cross-Linking-Experiment mit Lysozym
A.1	Mit den hydrolysierten Reagenzien $\mathrm{BS}^3$ und $\mathrm{BS}^2\mathrm{G}$ modifizierte Peptide 136
A.2	Cross-Linking-Produkte des $\mathrm{PPAR}\alpha/\mathrm{GW6471}\text{-}\mathrm{Komplexes}$ mit dem
	Harnstoff-Reagenz (ESI)
A.3	Cross-Linking-Produkte des $\mathrm{PPAR}\alpha/\mathrm{GW}6471$ -Komplexes mit dem
	Harnstoff-Reagenz (MALDI)

Tabellenverzeichnis

# Abkürzungsverzeichnis

ABCA1	ATP-binding cassette transporter-1
Abk.	Abkürzung
AC8	Adenylatcyclase 8
ACN	Acetonitril
$\mathrm{AGC}^{^{\mathrm{TM}}}$	automatische Verstärkungsregelung (Automatic Gain $Control^{TM}$ )
amu	atomare Masseneinheit
$amp^R$	Ampicillinresistenz
API	atmospheric pressure ionization
APS	Ammoniumpersulfat
BID	N-Benzyliminodiacetoyloxysuccinimid
bp	Basenpaar
Bpa	para-Benzoylphenylalanin
$BS^2G$	Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat
$BS^3$	Bis(sulfosuccinimidyl)suberat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
ca.	circa
CaM	Calmodulin
CID	kollisionsinduzierte Fragmentierung
	(Collision-Induced Dissociation)
CNL	Neutralverlust (Constant Neutral Loss)
C-Trap	gebogene Ionenfalle (Curved Ion Trap)
Da	Dalton
DE	verzögerte Extraktion (delayed extraction)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Disuccinimidyladipat
DSS	Disuccinimidylsuberat

DTSSP	Dithiobis(succinimidyl)propionat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
$E_{kin}$	kinetische Energie
ESI	Elektrospray-Ionisation
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FWHM	Massenauflösung bei voller Breite des Peaks bei halbem Maximum
	(full width at half maximum)
GST	Glutathion-S-transferase
GYT	Glycerol Hefe Trypton ( <i>Glycerol Yeast Trypton</i> )
IPTG	$\beta$ -D-Isopropylthiogalaktose
HABT	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
HCD	Higher Energy Collision-Induced Dissociation
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
	(high-performance liquid chromatography)
HRP	$Meerrettichperoxidase (horse \ raddish \ peroxidase)$
IAA	Iodacetamid
Int.	Intensität
ISD	In-Source Decay
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LHRH	Luteinizing-hormone releasing hormone
LB	Lysogeny Broth
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LDL	Low Density Lipoprotein
LID	Laser-induzierte Dissoziation
LIT	Lineare Ionenfalle (linear ion trap)
LTQ	Linearer Tripelquadrupol
$M_{av}$	Durchschnittsmasse (average mass)
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation
	(matrix-assisted laser desorption/ionization)
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NF-1	Nukleärer Faktor 1
$NF-\kappa B$	Nukleärer Faktor- $\kappa B$
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
$OD_{595}$	optische Dichte 595 nm
ori	Replikationsursprung (origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
pdb	Proteindatenbank (protein data bank)
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PIR	Proteininteraktionsreporter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	parts per million
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Auflösung (resolving power)
reISD	In-Source Decay im Reflectronmodus
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SA	Sinapinsäure (sinapinic acid)
SAP	Alkalische Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio)
SOB	Super Optimal Broth
SRB-1	scavenger receptor B-1
ТВ	Terrific Broth
TCEP	Tris-2-carboxyethylphosphin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TF	Gewebefaktor (tissue factor)
TFIIF	Transkriptionsinitiationsfaktor IIF
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Totalionenstrom (total ion current)

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TIS	zeitlich angepaßter Ionenselektor ( <i>Timed Ion Selector</i> )
TOF	Flugzeit (time-of-flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	atomare Masseneinheit
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
XL	Cross-Link/Cross-Linker

## Proteinogene Aminosäuren

Alanin	Ala	А	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	Κ
Asparagin	$\operatorname{Asn}$	Ν	Methionin	Met	Μ
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	$\mathbf{F}$
Cystein	Cys	С	Prolin	Pro	Р
Glutamin	$\operatorname{Gln}$	Q	Serin	Ser	$\mathbf{S}$
Glutaminsäure	$\operatorname{Glu}$	Ε	Threonin	$\mathrm{Thr}$	Т
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	Н	Tyrosin	Tyr	Υ
Isoleucin	Ile	Ι	Valin	Val	V

# Zusammenfassung

Chemisches Cross-Linking gefolgt von einer proteolytischen Spaltung und anschließender massenspektrometrischer Analyse der Cross-Linking-Produkte stellt eine alternative Methode dar, um niederaufgelöste Proteinstrukturen zu erhalten und um Protein-Protein-Interaktionen zu charakterisieren. Aminreaktive Cross-Linking-Reagenzien wie die N-Hydroxysuccinimidester BS<sup>3</sup> (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat) und BS<sup>2</sup>G (Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat) sind für diesen Ansatz weitverbreitet.

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) gehören zur Familie der nukleären Rezeptoren und spielen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Energiehaushaltes der Zelle. Der Subtyp PPAR $\alpha$ , der in dieser Arbeit als Modellprotein für Cross-Linking-Studien verwendet wurde, steuert den Fettsäure-Abbau in der Leber und in Skelettmuskeln. Die PPARs stellen bedeutende Zielstrukturen dar, um antidyslipidämische Wirkstoffe gegen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln.

Zur Expression und Reinigung der Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\alpha$  wurde die Strategie optimiert, sodaß im Vergleich zu früheren Protokollen eine fünfmal höhere Ausbeute erzielt wurde. In einem neuen Ansatz wurde gezeigt, daß chemisches Cross-Linking gefolgt von hochauflösender Massenspektrometrie eine alternative Methode darstellt, um Konformationsänderungen von Proteinen zu analysieren, die durch die Bindung eines Liganden induziert wurden. Mit diesem analytischen Konzept wurden Konformationsänderungen von PPAR $\alpha$  – abhängig von der Bindung verschiedener niedermolekularer Liganden – nachgewiesen.

Bisher gestaltete sich die Interpretierung der massenspektrometrischen Daten von Cross-Linking-Produkten als große Herausforderung, da mit zunehmender Masse potentieller Cross-Linking-Produkte ein hoher Anteil falscher Positiver zu erwarten war. Diese Daten wurden bisher sehr zeitaufwändig manuell überprüft und gefiltert. In dieser Arbeit wurden neue MS-spaltbare Cross-Linking-Reagenzien entwickelt, die mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) in MS/MS-Experimenten charakteristische Fragementionen und Neutralverluste aufweisen. Dadurch wurde die Identifizierung von Cross-Linking-Produkten aus komplexen proteolytischen Peptidgemischen stark vereinfacht.

Ein neues MS-spaltbares Cross-Linking-Reagenz der ersten Generation wurde von der Chemie des Edman-Abbaus inspiriert. Das Herzstück dieses Edman-Reagenzes stellt ein Thiocarbonyl-Schwefel dar, der durch einen intramolekularen nucleophilen Angriff bevorzugt die Glycylprolyl-Amidbindung des Reagenzes spaltet. Die mittels Elektrospray-Ionisation (ESI)-Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) erzeugten CID-Fragmentionenspektren führten folglich zu charakteristischen Fragmentionen und Neutralverlusten. Anhand dieses einzigartigen Fragmentierungsverhaltens des Reagenzes gelang es, eindeutig zwischen quervernetzten und unmodifizierten Peptiden zu unterscheiden. Darüber hinaus ließen sich die unterschiedlichen Quervernetzungsprodukte je nach Typ anhand des Neutralverlustes unterscheiden: Mit hydrolysierten Reagenzien modifizierte Peptide wiesen je nach Orientierung des Reagenzes Neutralverluste von 172 u bzw. 202 u auf, während intrapeptidale Quervernetzungsprodukte durch einen Neutralverlust von 184 u gekennzeichnet waren.

Da zusätzliche Fragmentierungen beiderseits der Thiocarbonylgruppe des Edman-Reagenzes auftraten, wurde ein wesentlich einfacher zu synthetisierendes Thioharnstoff-Reagenz der zweiten Generation entwickelt. Modifizierte Peptide wiesen sowohl mittels ESI als auch mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-Tandemmassenspektrometrie einen Neutralverlust von 85 u auf. Allerdings wurden mögliche Umlagerungsreaktionen beobachtet, die eine eindeutige Zuordnung des Quervernetzungs-Typs erschwerten.

Hierzu wurde in einem Cross-Linking-Reagenz der dritten Generation die Thiocarbonylgruppe durch die weniger reaktive Harnstoff-Gruppe substituiert. Das neue, in zwei Stufen zu synthetisierende Harnstoff-Reagenz ermöglichte eine eindeutige Identifizierung quervernetzter Peptide anhand charakteristischer "26 u-Dubletts" der Fragmentionenspektren – die Wahrscheinlichkeit falsch Positiver reduzierte sich drastisch. Sowohl mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS als auch mittels ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS ließen sich die Quervernetzungs-Typen zusätzlich anhand der Neutralverluste unterscheiden: 103 u/129 u (hydrolysiertes Reagenz) bzw. 85 u (intrapeptidal). Das neue CID-spaltbare Harnstoff-Reagenz besitzt großes Potential, in einer automatisierten massenspektrometrischen Hochdurchsatz-Methode verwendet zu werden, um dreidimensionale Proteinstrukturen und die Interaktion von Protein-Protein-Komplexen zu analysieren.

Da mit aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzien keine intermolekularen Quervernetzungsprodukte zwischen PPAR $\alpha$  und verschiedenen Liganden nachgewiesen wurden, erfolgte in einem alternativen Ansatz die Verwendung photoreaktiver Aminosäuren. Hierzu wurden PPAR $\alpha$ -Mutanten exprimiert, denen an jeweils einer spezifischen Position die photoreaktive Aminosäure Benzoylphenylalanin (Bpa) inkorporiert wurde. Es sind weitere Optimierungsschritte nötig, um ausreichende Mengen löslicher PPAR $\alpha$ -Bpa-Varianten herzustellen, um eine direkte Interaktion zwischen PPAR $\alpha$  und verschiedenen Liganden nachzuweisen.

## Summary

Chemical cross-linking combined with a subsequent enzymatic digestion and mass spectrometric analysis of the created cross-linked products presents an alternative approach to assess low-resolution protein structures and to gain insight into protein interfaces. Amine-reactive cross-linking reagents, such as the N-hydroxy succinimide esters  $BS^3$ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberate) and  $BS^2G$  (Bis(sulfosuccinimidyl)glutarate), are widely used.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear receptors playing an important role in energy homeostasis. The PPAR $\alpha$  subtype used in these cross-linking studies promotes fatty acid catabolism in the liver and skeletal muscle. PPARs represent targets for various antidyslipidemic drugs for treatment of type-2 diabetes.

A five times higher protein yield of the ligand binding domain of PPAR $\alpha$  was achieved by a modified expression and purification strategy compared to existing protocols. The novel analytical strategy of chemical cross-linking followed by high resolution mass spectrometry allowed analyzing conformational changes in target proteins that are induced by drug binding. With this approach conformational changes in PPAR $\alpha$  – upon binding of low-molecular weight compounds – were readily detected, proving that the strategy provides a basis to efficiently characterize target protein-drug interactions.

Nevertheless, cross-linking reagents  $BS^3$  and  $BS^2G$  require time-consuming manual evaluation of MS and MS/MS data due to a higher rate of false-positive cross-links with increasing masses. In this work, novel MS-cleaveable cross-linkers were developed, which allow distinguishing different cross-linking products by collision-induced dissociation (CID) tandem MS experiments based on characteristic product ions and constant neutral losses (CNLs).

A novel first-generation MS-cleaveable cross-linker is based on Edman degradation chemistry and leads to the formation of indicative mass shifted fragment ions and constant neutral losses in electrospray ionization (ESI)-tandem mass spectrometry (MS/MS) product ion mass spectra, allowing an unambiguous identification of cross-linked peptides. Moreover, the characteristic neutral loss reactions facilitate an automated analysis by multiple reaction monitoring (MRM) suited for high throughput studies with good sensitivity and selectivity. The functioning of the novel cross-linker relies on the presence of a highly nucleophilic sulfur in a thiourea moiety, safeguarding for effective intramolecular attack leading to predictive and preferred cleavage of a glycyl-prolyl amide bond.

A simplified thiourea-based second generation cross-linking reagent offers simple synthetic access and easy structural variation of either length or functionalities at both ends. The thiourea moiety exhibits specifically tailored CID fragmentation capabilities – a characteristic CNL of 85 u – ensuring a reliable detection of derivatized peptides by both electrospray ionization (ESI) and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) tandem mass spectrometry and as such possesses a versatile applicability for chemical cross-linking studies. A detailed examination of the CID behavior of the presented thiourea-based reagent reveals that slight structural variations of the reagent will be necessary to ensure its comprehensive and efficient application for chemical cross-linking of proteins.

Conclusively, the thiourea moiety was replaced by a less nucleophilic urea moiety to avoid rearrangements of cross-linking products in the gas phase. The characteristic fragment ion patterns of the novel third generation cross-linker greatly simplify the identification of different cross-linked species, namely, modified peptides as well as intrapeptide and interpeptide cross-links, from complex mixtures and drastically reduce the potential of identifying false-positive cross-links. The novel urea-based CID cleavable cross-linker is expected to be highly advantageous for analyzing protein 3D structures and proteinprotein complexes both by MALDI-TOF/TOF and ESI-LTQ-Orbitrap mass spectrometry in an automated manner. Amine-reactive N-hydroxy succinimide esters do not allow intermolecular cross-linking products between PPAR $\alpha$  and low-molecular weight compounds. Therefore, the photoreactive amino acid benzoyl phenyl alanine (Bpa) was incorporated at specific positions of PPAR $\alpha$ . Further optimization steps are necessary to express and purify soluble PPAR $\alpha$ Bpa mutants for giving insight into close interaction between PPAR $\alpha$  and different ligands.

# 1 Theoretische Grundlagen

### 1.1 Nukleäre Rezeptoren

### 1.1.1 Aktivierung der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) sind liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren aus der Familie der nukleären Rezeptoren. Drei Subtypen sind bekannt: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  (auch als PPAR $\beta$  bezeichnet) und PPAR $\gamma$  [1]. Die historische Bezeichnung dieser Rezeptoren stammt aus der Beobachtung, daß PPAR-Agonisten bei Nagetieren das Wachstum oder die Proliferation von Peroxisomen induzieren [2]. Bei humanen PPARs wurde dies jedoch nicht beobachtet [3]. PPARs werden durch Fettsäuren und Eicosanoide aktiviert und fungieren als Zielstrukturen für antidiabetische und antidyslipidämische Wirkstoffe [4] [5] [6]. PPAR $\alpha$  wird von Fibraten mit lipidsenkenden Eigenschaften reguliert [7], während PPAR $\gamma$  von insulinsensibilisierenden Thiazolidindionen aktiviert wird [8]. PPAR $\delta$  reguliert den reversiblen Cholesterol-Transport und den HDL-Metabolismus [9].

Der Aktivierung der PPARs durch einen Agonisten folgt eine Heterodimerisierung mit weiteren nukleären Rezeptoren, den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR). Gene, die durch PPARs reguliert werden, enthalten in der Promoterregion eine Peroxisom-Proliferator-Erkennungssequenz (PPRE, *peroxisome proliferator recognition element*, Abbildung 1.1), bestehend aus der Wiederholung der Erkennungsmotive AGGTCA, die durch ein beliebiges Nukleotid voneinander getrennt sind [10]. Diese PPREs ermöglichen PPAR:RXR-Heterodimeren die Interaktion mit zwei Bindungsstellen (weiße Rechtecke, Abbildung 1.1 oben) zwischen PPRE und TATA-Box der zu regulierenden Gene.

#### 1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN



Abbildung 1.1: Modell zur Transkriptionsaktivierung durch PPARs [11].

Aktiviert ein Ligand einen entsprechenden PPAR, wird ein Corepressor aus dem PPAR abdissoziiert und der PPAR:RXR-Komplex gebildet. Dieser Komplex erkennt die PPRE-Sequenz der DNA. Nun wird unter Freisetzung des Histons H1 die Chromatinstruktur zugänglich und ein Coaktivator-Acetyltransferase-Komplex bindet an die Promoterregion. Stabilisierende Histone, um die die DNA gewickelt ist, werden acetyliert, wodurch eine transkriptionskompetente Struktur erreicht wird. Schlußendlich binden zusätzliche Transkriptionsfaktoren (zum Beispiel Sp1, NF1) und die basale Transkriptionsmaschinerie inklusive des RNA-Polymerase-II-Initiationskomplexes an die zugängliche Promoterregion. Die Transkription wird nun initiiert [11].

# 1.1.2 Die Rolle des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha (PPARα) im Lipidmetabolismus

Humanes PPAR $\alpha$  wird verstärkt in Organen exprimiert, die ihren Energiebedarf hauptsächlich durch Lipide decken, beispielsweise in Herz, Leber und Skelettmuskeln [12]. Studien an PPAR $\alpha$ -Knockout-Mäusen zeigten die entscheidende Rolle PPAR $\alpha$ s im Lipidmetabolismus. Diese Mäuse litten unter Hypoglykämie, Hypoketonämie, Hyperlipidämie und Steatose (Fettleber) [13]. Dyslipidämie ist ein häufiger Vorläufer von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die durch einen erhöhten Spiegel freier Triglyceride in Kombination mit sinkendem HDL-Cholesterol charakterisiert ist [14]. PPAR $\alpha$ -Agonisten aktivieren und regulieren die Transkription zahlreicher Kontrollgene des Lipidkatabolismus und senken somit die Konzentration freier Triglyceride. Zum anderen erhöhen die gleichen Agonisten die Konzentration des HDL-Cholesterols im Plasma [15], indem sie die Produktion der Apolipoproteine apoA-I [16] und apoA-II [17] in der Leber steigern. Diese Apolipoproteine sind proteinogene Bestandteile des HDLs. Auch die Größe und die Verteilung der Lipoproteine wird von PPAR $\alpha$ -Agonisten gesteuert [18].

PPAR $\alpha$  wird in glatten Muskelzellen exprimiert und verlangsamt dort den Atheroskleroseprozeß, indem es den NF- $\kappa$ B-Signalweg inhibiert [19]. In Endothelzellen inhibiert der Agonist Pyrinixinsäure die durch oxidierte LDLs (*low density lipoproteins*) verursachte Ausschüttung des entzündungsfördernden Endothelin 1 (ET-1) [20]. Die Aktivierung von PPAR $\alpha$  in den Endothelzellen induziert des Weiteren die Expression von ROS-deaktivierenden Enzymen und verhindert dadurch die Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungen [21] [22].

In Makrophagen inhibieren PPAR a-Agonisten die Expression von Proteinen, die Entzündungserscheinungen in Gefäßwänden unterstützen. Beispielsweise inhibiert der Agonist Fenofibrat die Transkription des Metallproteinase-9-Gens [23]. Fibrate inhibieren die Expression des monozytischen Gewebefaktors TF, der zur Bildung arterieller Verschlüsse und zum Zerfallen von Plaques beiträgt [24]. Desweiteren fördert PPAR $\alpha$  die Ausschüttung von Cholesterol aus Makrophagen, indem es die Expression des HDL-Rezeptors SRB-1 [25] und des Cholesterol-Transporters ABCA1 [26] induziert.

#### 1.1.3 Struktur der Ligandenbindungsdomäne

Die ersten publizierten Kristallstrukturen der Ligandenbindungsdomänen (LBD) von PPAR $\alpha$  (pdb-Eintrag: 1KKQ [27]), PPAR $\delta$  (pdb: 1GWX [28]) und PPAR $\gamma$  (pdb: 2PRG [29], pdb: 3PRG [30], pdb: 1FM6 [31]) zeigen, daß PPARs eine größere Ligandenbindungstasche besitzen als andere nukleäre Rezeptoren. Dies könnte ein Grund sein, warum eine große Vielfalt natürlich vorkommender und synthetischer lipophiler Säuren PPARs binden [32].

Die Tertiärstrukturen der LBD stimmen weitgehend überein (Abbildung 1.2): zwölf  $\alpha$ -Helices sind zu einem antiparallelen Helix-Sandwich angeordnet und bilden drei Schichten einer zentralen hydrophoben Bindungstasche mit einem Volumen von ca. 1300 Å<sup>3</sup>. Zwischen den Helices 5 und 6 befindet sich ein gemischtes  $\beta$ -Faltblatt aus drei  $\beta$ -Faltblattsträngen. Der größte Unterschied der drei PPAR-Subtypen liegt zwischen den Aminosäuren 231–265, die eine  $\Omega$ -Schlaufe darstellen. Diese Schlaufenmotive zeichnen sich durch eine planare Struktur mit nach außen gekehrtem Peptidrückgrad aus, wobei Anfang und Ende der Schlaufe räumlich nahe liegen. Das Proteinstrukturmotiv spiegelt die höchsten B-Faktoren (ein kristallographischer Temperaturfaktor) wider, d. h. hier herrscht die höchste Flexibilität im Protein. Die Konformationen der bisher publizierten  $\Omega$ -Schlaufen unterscheiden sich je nach kokristallisiertem Liganden deutlich voneinander und bestätigen die Beteiligung dieses Proteinstrukturmotivs an der Ligandenbindung. Teilweise wurde hier nur eine gering konturierte Elektronendichteverteilung gefunden und erforderte einen Strukturvorschlag mittels Computational Modelings, beispielsweise pdb 117G. Hier wurde PPAR $\alpha$  mit dem Agonisten AZ242 kokristallisiert [33].

Eine weitere bedeutende Funktion besitzt die C-terminale  $\alpha$ -Helix 12, die daher Ak-



**Abbildung 1.2:** Kristallstrukturen der drei PPAR-LBD-Subtypen  $\alpha$  (Antagonist GW6471, pdb: 1KKQ),  $\beta$  (Agonist GW2433, pdb: 1GWX) und  $\gamma$  (Agonist Rosiglitazon, pdb: 2PRG). Die Liganden sind rot im Stabmodell dargestellt. Die Helices sind blau markiert, die  $\beta$ -Faltblätter sind gelb eingefärbt. Die  $\Omega$ -Schlaufen und die *C*-terminalen AF2-Helices sind orange.

tivierungsfunktionshelix 2 (AF2) genannt wird. Bindet ein Agonist an den PPAR, wird eine spezifische Konformation der AF2 stabilisiert, wodurch die Ligandenbindungstasche nach dem Mausefallenprinzip geschlossen wird [34]. Zusammen mit den  $\alpha$ -Helices 3 und 4 bildet sie eine passende Grenzfläche aus, um Koaktivatoren zu binden, beispielsweise NF-1 [33]. PPAR- $\alpha$ -Deletionsvarianten ohne die Helices 10 und AF2 sind nicht mehr in der Lage, Heterodimere mit RXR $\alpha$  auszubilden [35].

### 1.1.4 PPAR-Agonisten

Die meisten bekannten natürlichen PPAR-Agonisten sind Lipide. Sie bestehen aus einer hydrophilen Kopfgruppe, die mit der Helix AF2 interagiert, einem mittleren hydrophoben Abschnitt und einem flexiblen "Schwanz", der die obere oder die untere Region der T-förmigen Ligandenbindungstasche ausfüllt. Die Bindungstasche wird durch die Koordination von  $H_2O$ -Molekülen stabilisiert, auch wenn diese nicht direkt an den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen PPAR und Ligand beteiligt sind [33].

Fibrate sind als typische PPAR $\alpha$ -Agonisten bekannt (Abbildung 1.3). Der Lipidsenker

Fenofibrat (Normalip<sup>®</sup>, Lipanthyl<sup>®</sup>u. a.) stimuliert PPAR $\alpha$  und fördert die Erniedrigung der Triglycerid-Spiegel. Gleichzeitig führt die PPAR $\alpha$ -Aktivierung zu einer gesteigerten Expression von Apolipoprotein-AI, ein proteinogener Bestandteil von HDL. Dadurch steigt der HDL-Cholesterolspiegel im Blut, während der LDL-Cholesterolspiegel sinkt. Folglich erniedrigt sich das Risiko der Entstehung diabetischer Herz-Kreislauf-Erkrankungen [36]. Gemfibrozil (Lopid<sup>®</sup>, Jezil<sup>®</sup>u. a.) reduziert deutlich Triglycerid- und VLDL-Spiegel, steigert moderat den HDL-Spiegel und erniedrigt folglich das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen bei Diabetes mellitus Typ 2-Patienten [37].

Zur Stimulation von PPAR $\gamma$  werden Glitazone als sogenannte Insulinsensitizer eingesetzt (Abbildung 1.3). Diese zur Stoffklasse der Thiazolidindione gehörenden Wirkstoffe werden zur Senkung des Blutzuckerspiegels bei Diabetes mellitus Typ 2-Patienten eingesetzt [38]. Der Insulinsensitizer Rosiglitazon (Avandia<sup>®</sup>) senkt zusätzlich den Spiegel des nukleären Faktors NF- $\kappa$ B, der für Entzündungsreaktionen verantwortlich ist [39]. Rosiglitazon darf nicht bei Leberfunktionsstörungen und Herzinsuffizienz eingenommen werden [38]. Pioglitazon (Actos<sup>®</sup>) darf von übergewichtigen Diabetes mellitus Typ 2-Patienten nur in Kombination mit Metformin eingenommen werden [40]. Bei Metforminunverträglichkeit wird mit Sulfonylharnstoffpräparaten kombiniert [41].



**Abbildung 1.3:** Die Fibrate Fenofibrat und Gemfibrozil sind PPAR $\alpha$ -Agonisten, die als Lipidsenker eingesetzt werden. Die Glitazone Rosiglitazon und Pioglitazon (PPAR $\gamma$ -Agonisten) werden als Insulinsensitizer angewendet.

Die Einnahme von insulinsensibilisierenden Glitazonen (PPAR<sub>γ</sub>-Agonisten) führt bei

Diabetes mellitus Typ 2-Patienten häufig zu einer Gewichtszunahme und Fettleibigkeit. Diese Störung des Lipidmetabolismus könnte durch Kombination mit lipidmodulierenden Fibraten (PPAR $\alpha$ -Agonisten) reguliert werden (Abbildung 1.4). Daher kommt der Entwicklung dualer PPAR $\alpha/\gamma$ -Agonisten eine enorme Bedeutung zu [42]. Der erste vielversprechende Wirkstoff Muraglitazar (Pargluva<sup>®</sup>) wurde wegen erhöhter kardiovaskulärer Risiken und möglicher Karzinogenität nicht zugelassen [43]. Die Studien an Tesaglitazar (Galida<sup>®</sup>) wurden in der Klinischen Phase III wegen erhöhter Risiken (Leukopenie, Anämie) beendet. Es werden weiterhin duale Agonisten mit einer ausgewogeneren PPAR $\alpha/\gamma$ -Aktivität entwickelt [44].

Einen neueren Ansatz bieten PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ -Breitbandagonisten, die kardiovaskuläre Risiken senken sollen (Abbildung 1.4). Bezafibrat (Bezalip<sup>®</sup>) ist ein PPAR $\alpha$ -Agonist, dem in klinischen Studien zusätzlich eine partielle PPAR $\gamma/\delta$ -Aktivität nachgewiesen wurde [45]. Klinische Studien an Diabetes Typ 2-Patienten mit koronarer Herzkrankheit verliefen erfolgreich [46].



**Abbildung 1.4:** Die klinischen Studien der dualen PPAR $\alpha/\gamma$ -Agonisten Muraglitazar und Tesaglitazar wurden beendet. Der PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ -Breitband-Agonist Bezafibrat reduziert die Wahrscheinlichkeit kardiovaskulärer Erkrankungen von Diabetes Typ 2-Patienten.

### 1.2 Massenspektrometrische Methoden

Im folgenden werden die in dieser Arbeit eingesetzten massenspektrometrischen Techniken beschrieben.

### 1.2.1 MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

### **MALDI-Matrices**

Bereits in den 1960er Jahren wurden Laser eingesetzt, um intakte organische Moleküle anzuregen und aus der kondensierten Phase in die Gasphase zu desorbieren [47]. Michael Karas und Franz Hillenkamp optimierten diesen Prozeß, indem sie große Moleküle in geeignete organische Matrices einbetteten. Diese Matrices zeigten hohe Absorptionen bei ultravioletter Laserstrahlung [48] [49]. Mittels der neuen Ionisierungsmethode MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation) gelang es, intakte Biomakromoleküle nahezu ohne Fragmentierung massenspektrometrisch zu analysieren [50] [51].

Moderne MALDI-Quellen sind meist mit einem Neodym-dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Festkörperlaser (Nd:YAG) ausgestattet. Die Laser-Wellenlängen liegen bei 266 nm (Frequenzvervierfachung) bzw. 355 nm (Frequenzverdreifachung) [52]. Der MALDI-Prozeß ist bis heute nicht detailliert verstanden und Gegenstand weiterer Untersuchungen. Prinzipiell werden Analytmoleküle in einer die Laserwellenlänge absorbierenden Matrixsubstanz auf einem metallischen Probenteller kokristallisiert. Ein Laserpuls weniger Nanosekunden wird im Vakuum der MALDI-Quelle auf die Probe eingestrahlt und die Matrixmoleküle werden elektronisch angeregt, möglicherweise über das  $\pi$ -Elektronensextett der aromatischen Matrices. Die in den Matrixmolekülen gespeicherte Anregungsenergie relaxiert in kurzer Zeit in das Festkörpergitter und bewirkt eine starke Störung und Ausdehnung. Weit vor Erreichen eines thermischen Gleichgewichts erfolgt ein Phasenübergang, der einen Teil der Festkörperoberfläche explosiv auflöst. So werden neben Matrixmolekülen auch Analytmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Die Anregung innerer Freiheitsgrade der beteiligten Moleküle scheint so gering zu sein, daß selbst labile Biomakromoleküle diesen Prozeß intakt überstehen. Experimentelle Beobachtungen bestätigen, daß die Matrixmoleküle ebenfalls an der Ionisierung der Analytmoleküle beteiligt sind [53] [54].

Als erste Matrix zur Proteinanalytik wurde Nikotinsäure (NA, Abbildung 1.5) verwendet [55]. Die Proteinmatrix Sinapinsäure (SA) reduziert die Bildung photochemischer Addukte [56]. Der Einsatz von 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix ermöglicht eine robustere Analytik von intakten Proteinen in Gegenwart von anorganischen Salzen und Detergentien wie SDS [57] [58]. Die Matrix  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA) eignet sich hervorragend zur Peptidanalytik [59]. Die halogenierte Matrix  $\alpha$ -Cyano-4chlorzimtsäure (Cl-CCA) ist wesentlich sensitiver als HCCA. Durch eine hypsochrome Verschiebung der Laser-Absorption im Vergleich zur HCCA ist dieser Vorteil nur beim Einsatz von N<sub>2</sub>-Lasern ( $\lambda = 337$  nm) ersichtlich [60]. Durch die effizientere Ionisierung der Analyten werden im Vergleich zu HCCA mehr neutrale und saure Peptide (insbesondere Phosphopeptide) analysiert [61].



Abbildung 1.5: MALDI-Matrices zur Analytik von Biomakromolekülen.

Zur Probenpräparation ist die Dünnschichtmethode weitverbreitet: Hierzu wird eine gesättigte Lösung der Matrix in einem organischen Lösungsmittel mit einer Analytlösung gemischt und auf einen Probenteller präpariert. Das Lösungsmittel (beispielsweise Aceton- oder Acetonitril/H<sub>2</sub>O/TFA-Gemische) verflüchtigt sich schnell durch den niedrigen Dampfdruck und folglich werden die Analytmoleküle in feine Matrixkristalle eingebettet [62]. Durch Anker-Probenteller (*Anchor Targets*<sup>®</sup>, Bruker Daltonik) wird die Größe der Probenplätze reduziert, da diese kleine hydrophile Probenplätze (Durchmesser 200 – 800 µm) auf einer hydrophoben Oberfläche aufweisen. Das Matrix/Analyt-Lösungsgemisch verdampft und schrumpft auf der hydrophilen Stelle, wodurch die Proben bis zu hundertfach konzentriert werden. Folglich verbessert sich die Nachweisgrenze, der

Probenplatz ist besser zu lokalisieren und ermöglicht eine automatisierte Meßreihe [63] [64].

#### Flugzeit-Analysatoren (Time-of-Flight)

Die physikalischen Hintergründe und der Aufbau eines Flugzeitanalysators (*Time-of-Flight, TOF*) wurden von Stephens [65] und Cotter [66] beschrieben. Die Quadratwurzel aus dem Masse-zu-Ladungsverhältnis m/q ist direkt proportional zur Flugzeit t (Gleichung 1.2):

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{1}{2}m\frac{L^2}{t^2} = qU$$
(1.1)

$$t = \sqrt{\frac{m}{2qU}} \cdot L \tag{1.2}$$

Die Variable U entspricht der Beschleunigungsspannung, v der Geschwindigkeit eines Ions und L der Länge des Flugrohrs.

Zur Verbesserung der Massenauflösung wurden Flugzeitmassenspektrometer entwickelt, die Messungen im Reflektronmodus erlauben [67] [68]. Diese kompensieren die Effekte unterschiedlicher Startzeiten und -orte der desorbierten Ionen, unterschiedliche kinetische Energien  $E_{kin}$  und die verschiedenen Bewegungsrichungen der Ionen zum Analysator [69]. Das Reflektron befindet sich am Ende der feldfreien Driftregion des Flugrohrs (Abbildung 1.6). Elektrodenringe mit steigender Spannung erzeugen ein abbremsendes elektrisches Feld. Die Reflektronspannung ist ca. 1,05 bis 1,1 x größer als die Beschleunigungsspannung von ca. 20 kV. Die Ionen tauchen in das Reflektron ein, bis deren kinetische Energien üblicherweise auf Null sinken; dann werden sie in Richtung des zweiten Flugrohrs zurückgestoßen und nehmen wieder kinetische Energie auf. Ionen mit höherer kinetischer Energie tauchen tiefer in das Reflektron ein und deren Flugzeit wird so korrigiert. Folglich erreichen Ionen gleicher m/z, aber unterschiedlicher kinetischer Energie zur gleichen Zeit den Reflektor-Detektor [70].

Die verzögerte Extraktion (Delayed Extraction, DE) wird angewendet, um die zeitliche und räumliche Verteilung sowie die Beschleunigungsverteilung der Ionen in der Quelle



**Abbildung 1.6:** Aufbau eines Flugzeitanalysators, der mit einem Reflektron ausgestattet ist (frei nach [71]). Die gefüllten Kreise stellen Ionen eines vorgegebenen m/z-Verhältnisses mit einer bestimmten kinetischen Energie dar. Die leeren Kreise entsprechen Ionen gleicher m/z-Verhältnisse, aber einer niedrigeren kinetischen Energie, welche das Reflektron später erreichen und mit der gleichen kinetischen Energie wieder verlassen wie zuvor. Beide Ionen erreichen den Reflektor-Detektor gleichzeitig.

zu kompensieren. Es findet eine zeitliche Verzögerung zwischen der Entstehung von Ionen und der Extraktion der Ionen aus der Quelle statt [72] [73] [74]. Hierzu werden die Ionen entsprechend ihrer Anfangskinetik getrennt: Erst nach einer Verzögerung im Nanosekunden-Bereich wird die Beschleunigungsspannung als kurzer Puls angeschaltet. Die laserinduzierten Reaktionen sind nun beendet, bevor die Beschleunigung der Ionen beginnt. Ionen mit hoher anfänglicher kinetischer Energie haben nun einen längeren Weg zurückgelegt als Ionen mit niedriger kinetischer Energie. Schnellere Ionen erfahren dadurch nur einen Teil der Beschleunigungsspannung der langsameren Ionen (Abb. 1.7).

Zur Fragmentierung von Peptiden in dem hier verwendeten MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer Ultraflex III wurde die Technik der Laser-induzierten Dissoziation (LID) verwendet. Dabei werden wie bei der CID-Fragmentierung (*collision induced dissociation*) bevorzugt Peptidbindungen gespalten. Hierzu wird die Laserfluenz<sup>1</sup> erhöht, um pro Laserschuß eine höhere Anzahl an Ionen zu erzeugen. Die Anfangsbeschleunigungsspannung wird auf 8kV gesetzt, um eine längere Flugzeit der Ionen ( $10 - 20 \,\mu$ s) zu gewährleisten, während Fragmentierungen auftreten. Alle Vorläuferionen haben nun eine Geschwindigeit entsprechend Gleichung 1.1. Fragmentionen, die nach dem Anlegen

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Die Fluenz beschreibt das Verhältnis aus der Anzahl der Teilchen zur Fläche, durch welche sie hindurchtreten. SI-Einheit: 1/m<sup>2</sup>



Abbildung 1.7: Schematische Beschreibung der verzögerten Extraktion in einem linearen Flugzeitmassenanalysator. Die leeren Kreise beschreiben Ionen eines m/z-Verhältnisses einer bestimmten kinetischen Energie. Die ausgefüllten Kreise zeigen Ionen eines gleichen m/z-Verhältnisses, aber zu hoher kinetischer Energie. Mittels verzögerter Extraktion wird die Energieverteilung der Ionen gleicher m/z-Verhältnisse korrigiert [75].

der Beschleunigungsspannung von 8 kV entstanden sind, behalten die gleiche Geschwindigkeit wie ihre korrespondierenden Vorläuferionen und werden daher gemeinsam als eine "Ionenfamilie" bezeichnet. Entsprechend ihrer Geschwindigkeit erreichen verschiedene "Ionenfamilien" zu Zeiten laut Gleichung 1.1 den zeitlich angepaßten Ionenselektor TIS (Abbildung 1.8). Der TIS ermöglicht durch zeitabhängiges Ein- und Ausschalten der Spannung, daß nur gewünschte "Ionenfamilien" entlang der Driftregion TOF 1 die LIFT-Zelle erreichen [76].

In der LIFT-Zelle werden die selektierten Vorläufer- und Fragmentionen durch eine zusätzlich angelegte Spannung von 19 kV erneut beschleunigt. Bei gleichbleibender Spannung werden nun Ionen gleicher Masse, aber einer gewissen Geschwindigkeitsverteilung fokussiert. Anschließend wird die Spannung um 2 - 3 kV abgesenkt, um die Ionen Richtung Ausgang der LIFT-Zelle zu beschleunigen. Dort werden die Ionen im letzten Schritt auf Maximalgeschwindigkeit beschleunigt und entsprechend ihres m/z-Verhältnisses detektiert: Vorläuferionen werden auf eine maximale kinetische Energie von 27 kV beschleunigt. Fragmentionen erfahren einen Bruchteil der kinetischen Energie, direkt proportional


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers Ultraflex III (Bruker Daltonik). Die Driftregion TOF1 reicht von der MALDI-Quelle bis zur LIFT-Zelle; Die Driftregion TOF2 reicht von der LIFT-Zelle bis zum Reflektron [76].

zu ihrem m/z-Verhältnis. Alle Ionen werden gemeinsam in einem Massenspektrum analysiert [76].

In dieser Arbeit wurde das Auftreten von Fragmentierungen während des MALDI-Prozesses (*In-Source Decay*) genutzt, um Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten zu erzeugen (siehe Kapitel 3.4.3 und 3.4.4). Dieser Prozeß findet statt, bevor die Fragmentionen mittels verzögerter Extraktion Richtung Flugzeitanalysator beschleunigt werden [77]. Im Reflektronmodus (reISD) entstehen bevorzugt y-Fragmentionen – die Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten von Peptiden zeigen jedoch auch b-Fragmentionen in geringerer Intensität [76].

### 1.2.2 ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie

### Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Mittels API (*atmospheric pressure ionization*) gelang es erstmals, Analyten direkt aus der Lösungsphase in die Gasphase zu überführen und in einen Analysator zu transferieren [78]. Basierend auf Arbeiten von Malcolm Dole [79] wurde die erste ESI-Quelle für Massenanalysatoren von John Fenn entwickelt [80] [81]. Die Probenlösung wird mittels Spritzenpumpe durch eine Edelstahlnadel gedrückt, an die eine Spannung von 3 - 4 kV relativ zur umgebenen Zylinderelektrode angelegt ist (Abbildung 1.9 A). Das Aerosol wird durch einen N<sub>2</sub>-Trockengasstrom geleitet und das Lösungsmittel verdampft. Durch eine kurze Kapillare gelangt ein kleiner Teil der Analyten in eine Kammer mit einem niederen Druck von ca.  $10^{-2}$  bar. Dort wird das Trockengas größtenteils abgepumpt. Dann erfolgt ein Transfer durch einen Skimmer ins Hochvakuum (ca.  $10^{-7} - 10^{-8}$  bar). Durch passend angelegte Spannungen an Kapillare und Skimmer gelangen die komplett desolvatisierten Ionen durch eine Transfer-Optik zum Analysator.

Zur Verringerung der Probenvolumina und Erhöhung der Sensitivität wurde die Ionisierungsmethode zur Nano-ESI miniaturisiert. Die Innendurchmesser der Borsilikat-Glaskapillaren wurden verkleinert, sodaß kleinere Tropfen bei kleineren Flußraten versprüht werden [82]. Die Nadelspitze hat Innendurchmesser von 5 – 30 µm; Flußraten von 100 - 300 nl/min sind für ein stabiles Elektrospray ausreichend [83]. Die ESI-Kapillare kann mit Gold beschichtet sein und es werden geringere Spannungen von 0, 7 - 1, 5 kV angelegt. Durch die Hochspannung werden Analytlösungen durch Kapillarkräfte emittiert. Bei Bedarf wird ein leichter Rückdruck angelegt. Im Vergleich zur klassischen ESI sind die Tropfendurchmesser mit weniger als 200 nm etwa 100 bis 1000 mal kleiner.

Bei der Elektrospray-Ionisierung verkleinern sich elektrisch geladene Tröpfchen des Sprays durch Verdunstung des Lösungsmittels, bis komplett desolvatisierte Ionen entstehen. Zunächst findet im elektrischen Feld eine Ladungstrennung statt. Am Ende der ESI-Kapillare verengt sich der Meniskus zu einem Taylor-Konus (Abbildung 1.9 B, [84] [85]).

Die Theorie des Coulomb-Zerfalls (*Coulomb Fission*) beschreibt den Tröpfchenzerfall vom Durchmesser mehrerer Mikrometer zu tausenfach kleineren Tröpfchen im elektrischen Feld: Die Ladungen auf der Tröpfchenoberfläche sind durch Coulomb-Abstoßung äquidistant verteilt. Das Lösungsmittel verdampft und die Ladungsdichte steigt. Am Raleigh-Limit übersteigt die elektrostatische Abstoßung die Kraft der Oberflächenspannung, folglich zerfällt der Tropfen in kleinere Tröpfchen [88]. Am Ende des Taylor-Konus wird eine Serie kleinerer, deformierter Mikro-Tröpfchen an einem verlängerten Tropfenende emittiert [89]. Hier ist die Ladungsdichte auf der Oberfläche nicht mehr homogen



**Abbildung 1.9:** (A) Schematischer Aufbau einer Elektrospray-Ionenquelle nach Fenn [81]. (B) Darstellung eines Taylor-Konus [85] [86]. (C) Mittels Blitzphotographie erzeugte Schattenabbildung geladener Tröpfchen, die durch eine Coulomb-Spaltung entstehen. Die Tröpfchen bewegen sich von oben nach unten in Richtung Analysator [87].

verteilt [90]. Dieses Konzept wurde durch Blitz-Mikrofotografien innerhalb einer Millisekunde nachgewiesen (siehe Abbildung 1.9 C, [87] [91] [92] [93]).

Die Entstehung desolvatisierter Ionen wird mittels zweier Modelle beschrieben: Das Modell des geladenen Rückstandes (*CRM*, *charged-residue model*) von Dole geht davon aus, daß jedes geladenes Tröpfchen ein einziges Analyt-Ion enthält und durch eine Serie mehrerer Coulomb-Explosionen entsteht. Diese Nano-Tröpfchen werden durch ein Trokkengas (z. B.  $N_2$ ) vollständig desolvatisiert [79] [94].

Das Ionenemissionsmodell (*IEM*, *ion evaporation model*) von Iribarne und Thomson beschreibt eine direkte Ionenemission aus hochgeladenen Tröpfchen von ca. 8 nm Durchmesser. Freie Ionen werden oberhalb des Raleigh-Limits in die Gasphase emittiert. Da sich dabei der Tröpfchen-Radius verkleinert, bleibt die Ionenemission erhalten [95] [96].

Experimentelle Beobachtungen niedrig geladener Proteinspezies und Addukte bestätigen das CRM-Modell. Mit ESI können auch nicht-kovalente Addukte nachgewiesen werden [97].

Das IEM-Modell unterstützt die Annahme, daß Analytmoleküle entsprechend ihrer

räumlichen Ausdehnung unterschiedlich viele Ladungen tragen. Unter identischen ESI-Bedingungen sind flache, planare Moleküle durchschnittlich höher geladen als globuläre, eher kugelförmige Ionen [98].

### Lineare Ionenfallen

Lineare Ionenfallen bestehen aus einem Quadrupolanalysator, der von zwei Endelektroden begrenzt ist. Ein quadrupolares Radiofrequenz-Potential speichert die Ionen in radialer Dimension. An den Endelektroden erzeugt eine Gleichstromspannung ein elektrisches Randfeld zur axialen Speicherung der Ionen [99]. Um störende Randfelder zu vermeiden, bestehen moderne zweidimensionale Ionenfallen aus einem segmentierten Quadrupol (Abbildung 1.10). Zur Speicherung der Ionen wird eine Gleichspannung an die Endsektionen angelegt [100].

Die Ionen werden durch Kollision mit einem Inertgas gekühlt, wodurch eine verbesserte Massenauflösung erreicht wird. Diese zweidimensionalen Ionenfallen haben eine zehnmal höhere Speicherkapazität als dreidimensionale Paul-Fallen; sie können bis zu 30 000 Ionen ohne das Auftreten von Raum-Ladungs-Effekten aufnehmen, da die Ionenwolke entlang der z-Achse linear fokussiert wird. In 3D-Fallen treten bereits ab 500 Ionen Raum-Ladungs-Effekte auf, da die Ionenwolke punktuell fokussiert wird [100].

In der hier verwendeten linearen Ionenfalle (LTQ, Thermo Fisher Scientific) als Teil des LTQ-OrbitrapXL-Massenspektrometers werden mittels einer automatischen Verstär-



Abbildung 1.10: Anordnung der segmentierten Elektroden einer zweidimensionalen, linearen Ionenfalle [99].

kungsregelung AGC (*automatic gain control*) durch kurze Vorscans im Mikrosekundenbereich die Totalionenströme innerhalb eines gewünschten Massenbereichs ermittelt. Anhand dieser Daten wird die Injektionszeit für den darauffolgenden Analysescan bestimmt, um die lineare Ionenfalle nicht zu überfüllen [101].

Die Ionen können die Ionenfalle auf zweierlei Art verlassen: Zur axialen Ejektion wird eine zusätzliche Wechselspannung zwischen den beiden Randelektroden angelegt. Es entsteht ein elektrostatisches Potential entlang der z-Achse. Ionen mit spezifischem m/zoszillieren in einer Resonanzfrequenz und verlassen die Ionenfalle massenselektiv in axialer Richtung, beispielsweise zu einem weiteren Analysator. Zur radialen Ejektion wird das Radiofrequenz-Potential so verändert, daß die Ionen beim Erreichen der m/z-spezifischen Resonanzfrequenz die Ionenfalle seitlich in Richtung zweier Sekundärelektronenvervielfacher verlassen und detektiert werden [99].

### Orbitraps

Das Prinzip, Ionen in elektrostatischen Feldern auf Orbitalbahnen zu speichern, wurde von Kingdon beschrieben [102]. Alexander Makarov bestätigte 1999 die physikalischen Zusammenhänge in Grundlagenuntersuchungen anhand eines ersten Orbitrap-Analysators [103] [104]. Dieser besteht aus einer spindelförmigen Zentralelektrode (Durchmesser 8 mm) und einer faßförmigen Außenelektrode (Durchmesser 30 mm, Abbildung 1.11).



Abbildung 1.11: Schematischer Aufbau des Hybridmassenspektrometers LTQ-Orbitrap-XL [105].

An die Zentralelektrode ist eine elektrostatische Spannung mehrerer Kilovolts angelegt. Die Außenelektrode verbleibt auf einem Grundpotential. Die Ionen mit einer kinetischen Energie mehrerer Kilovolts werden tangential senkrecht zur z-Achse durch die Außenelektrode injiziert. Folglich rotieren sie um die Zentralelektrode und oszillieren axial entlang der z-Achse [106]. Die axiale Frequenz  $\omega$  verhält sich indirekt proportional zur Wurzel des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses m/q (Gleichung 1.3). Die Variabel k stellt eine Gerätekonstante dar.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/q}} \tag{1.3}$$

Das erste Hybridmassenspektrometer mit der Kombination einer linearen Ionenfalle (LTQ) und einem Orbitrap-Analysator (Thermo Fisher Scientific) wurde im Jahre 2005 vorgestellt, das in den vergangenen Jahren kontinuierlich weiterentwickelt wurde. In Abbildung 1.11 ist das für diese Arbeit verwendete Gerät schematisch dargestellt. Die Ionen werden von der ESI-Quelle über eine Serie von Radiofrequenz-Multipolen in die lineare Ionenfalle LTQ transferiert. Dort werden die Ionen an zwei sich radial gegenüberliegenden Sekundärelektronenvervielfachern detektiert oder selektierte Ionenpakete werden axial in eine gebogene Ionenfalle (Curved Trap, C-Trap) transferiert. Am Eingang der C-Trap verursacht ein  $N_2$ -Gasbad Energieverluste der Ionen durch schwache Kollisionen. Drücke von ca. 1 mbar schließen mögliche kollisionsinduzierte Fragmentierungen der Ionen aus. Durch die besondere Geometrie der C-Trap und die Kollisionskühlung der Ionen wird das Ionenpaket verdichtet. Durch eine spezielle Schaltfolge von Hochspannungen (ca.  $1, 0 - 1, 2 \,\mathrm{kV}$ ) verläßt das verdichtete Ionenpaket die C-Trap und erreicht über eine Transferionenoptik mit Beschleunigungselektroden tangential die Orbitrap. Die Injektionszeit ist wesentlich kürzer als die Dauer einer axialen Schwingung, sodaß kohärente Ionenbewegungen in der Orbitrap garantiert werden. Über die Außenelektroden wird ein Bildstrom abgegriffen, sobald sich die Spannung der Zentralelektrode auf ca.  $3,5\,\mathrm{kV}$  stabilisiert hat. Mittels schneller Fouriertransformation wird ein Frequenzspektrum erzeugt und mit Hilfe einer Zweipunktkalibration in ein Massenspektrum konvertiert [105].

In der Orbitrap können bis zu  $2\cdot 10^6$ Ionen ohne merkliche Raum-Ladungs-Effekte

gespeichert werden. Eine Massenauflösung von 60 000 (FWHM) bei m/z 400 ist bei einer Akquisitionszeit von einer Sekunde möglich. Die Auflösung steigt linear mit der Detektionszeit bis auf 100 000. Bei externer Kalibration ist eine Massengenauigkeit besser als 5 ppm, bei interner Kalibration mittels einer Lock-Masse besser als 3 ppm möglich [107]. Innerhalb eines Massenspektrums sind dynamische Breiten von über 3 000 möglich, zwischen verschiedenen Spektren steigt der Wert auf über 500 000 [105].

In dieser Arbeit wurden die Fragmentierungstechniken CID und HCD (*higher energy collision induced dissociation*) angewendet. Die Technik CID wird in der LTQ durchgeführt: Die dort gespeicherten Ionen eines vorgegebenen m/z-Bereiches werden durch ein elektrisches Potential auf eine Stufe höherer kinetischer Energie angeregt. Dort kollidieren die Ionen mit einem Neutralgas (Stickstoff oder Helium), wodurch ein Teil der kinetischen Energie in interne Energie umgewandelt wird; daraus resultieren kleinere Fragmente durch Bindungsbrüche der Vorläuferionen [108]. Die Fragmentionen können sowohl in der LTQ als auch in der Orbitrap analysiert werden [106].

Um höherenergetische Fragmentierungen durchzuführen, wurde hinter die C-Trap eine HCD-Kollisionszelle installiert. Das Prinzip der Fragmentierung ähnelt sich der CID, jedoch werden die Ionen allein mittels einer Radiofrequenz angeregt. Die Kollisionsenergie verhält sich direkt proportional zur Masse und Ladung des Vorläuferions. Die Fragmentionen werden in die C-Trap transferiert, fokussiert und in der Orbitrap analysiert. Dadurch werden auch kleinere Fragmentionen (m/z < 100 Da) detektiert [109].

Der hohe Verlust an Ionen beim Transfer von der linearen Ionenfalle zur Orbitrap stellt eine große Herausforderung dar. Weiterhin wird als laufende Entwicklung die Geometrie der Orbitrap verändert, um zum einen die Empfindlichkeit zu optimieren (kompaktere Orbitrap), und zum anderen die Massenauflösung zu erhöhen (Vergrößerung des Durchmessers der Zentralelektrode) [110]. Letzteres wird auch durch die Verwendung von vier Detektionselektroden erreicht [111].

# 1.3 Chemisches Cross-Linking<sup>2</sup>

## 1.3.1 Historie

Proteine nehmen eine Schlüsselfunktion zur Regulation zellulärer Prozesse ein. Beispielsweise steuern Proteine die DNA-Replikation, Transkription, Translation, Spleißen und Einführung posttranslationaler Modifikationen, die intra- und interzelluläre Kommunikation, den Metabolismus und den Zellzyklus. Die Anzahl der sequenzierten Genome diverser Organismen nimmt exponentiell zu [112], doch die physiologische Funktion vieler Proteine ist noch unzureichend verstanden. Methoden der strukturellen Proteomik haben zum Ziel, Zusammenhänge zwischen der dreidimensionalen Struktur von Proteinen und Proteinkomplexen und deren Funktion aufzuklären [113].

Zur Strukturanalyse von Proteinen und deren Interaktionspartnern haben sich hochauflösende Methoden wie die Kernresonanzspektroskopie (NMR) [114] und die Röntgenkristallographie [115] etabliert. Allerdings ergeben sich einige Nachteile: Die Methoden erfordern große Mengen gereinigter Proteine im Milligramm-Maßstab. Viele Ansätze scheitern an der schlechten Löslichkeit vieler Proteine in den verwendeten Puffern (z. B. Membranproteine) oder den optimalen Kristallisationsbedingungen. Die Interpretation der Strukturdaten ist sehr zeitaufwendig [116] [117].

Die Methode des chemischen Cross-Linkings wird bereits seit den 1960er Jahren verwendet [118], um Protein-Protein- oder Protein-Nukleinsäure-Interaktionen zu analysieren [119]. Hierbei werden die Seitenketten von Aminosäuren mit Hilfe kleiner organischer Reagenzien kovalent verknüpft. Es wurden vornehmlich unspezifische Reagenzien wie Formaldehyd und Glutaraldehyd verwendet und die Interaktionspartner wurden meistens immunologisch oder radiochemisch identifiziert. Die Verwendung aminosäurespezifischer Cross-Linker und die anschließende massenspektrometrische Analyse von Cross-Linking-Produkten eröffnete neue Möglichkeiten, anhand von Distanzbeschränkungen zwischen Aminosäuren ein niederaufgelöstes Strukturmodell zu erstellen [117] [120]. Ein anderer

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Hier wird der englische Begriff Cross-Linking verwendet, der sich im deutschen Sprachraum durchgesetzt hat.

Ansatz besteht in der Nutzung eines erweiterten genetischen Codes, um photoreaktive Aminosäuren in Proteine zu inkorporieren und so gezielt Quervernetzungen zwischen interagierenden Proteinen durch UV-Bestrahlung zu induzieren [121].

### 1.3.2 Strategie des chemischen Cross-Linkings

Vor der Cross-Linking-Reaktion sollte eine geeignete Protease gewählt werden, um eine möglichst vollständige Sequenzabdeckung des zu untersuchenden Proteins bzw. Proteinkomplexes zu garantieren. Da *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) primäre Amine der Lysin-Seitenketten modifizieren und daher tryptische Spaltstellen verlorengehen, ist häufig eine zweite Protease nötig. Kontrollexperimente (ohne Cross-Linker, ohne Interaktionspartner) sollten durchgeführt werden, um die Anzahl falsch-positiver Cross-Links zu reduzieren. Weiterhin sollten Parameter wie die Konzentration des Cross-Linkers, Reaktionszeit und der pH-Wert optimiert werden, ohne die dreidimensionale Proteinstruktur durch die Einführung zu vieler Modifikationen zu stören. Die Reaktionsbedingungen werden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie und eindimensionaler Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kontrolliert (Abbildung 1.12) [122].

Anschließend werden Gelbanden, die von Interesse sind, ausgeschnitten und einer proteolytischen *In-Gel-Spaltung* unterzogen. Alternativ können die Cross-Linking-Produkte mittels Größenausschlußchromatographie getrennt und in Lösung proteolytisch gespalten werden. Die komplexen Mischungen aus modifizierten und unmodifizierten Peptiden werden massenspektrometrisch analysiert [122].

Fragmentionen aus Tandem-MS-Analysen werden nach der Roepstorff-Nomenklatur als a-, b- und c- (*N*-terminale Fragmente) bzw. x-, y- und z-Fragmentionen (*C*-terminale Fragmente) bezeichnet [123]. Zusätzlich werden Fragmentionen des quervernetzten Peptides mit dem größeren Molekulargewicht ( $\alpha$ -Peptid) durch den Index  $\alpha$  vom kleineren  $\beta$ -Peptid unterschieden (Abbildung 1.13) [124].

Zur Identifizierung von quervernetzten Aminosäuren wird mit geeigneter Software (GPMAW [125], CoolToolBox [126], StavroX (Michael Götze)) ein virtuelles Cross-Linking-Experiment durchgeführt. Die theoretischen Massenlisten werden mit den expe-



Abbildung 1.12: Analytische Strategie zur Analyse von Protein-Konformationsänderungen in Abhängigkeit der Ligandenbindung mittels chemischen Cross-Linkings und hochauflösender Massenspektrometrie. XL: Cross-Linking-Reaktion.





rimentell ermittelten Massenlisten innerhalb einer bestimmten Massenabweichung verglichen. Die quervernetzten Aminosäuren werden mittels Tandem-MS verifiziert. Die daraus bestimmten Distanzbeschränkungen geben Informationen zu einer niederaufgelösten Proteinstruktur und können für computerbasierte Strukturberechnungen verwendet werden [127].

#### 1.3.3 Reaktivität der Cross-Linking-Reagenzien

### N-Hydroxysuccinimidester

Die am weitesten verbreiteten Cross-Linking-Reagenzien sind homobifunktionelle, aminreaktive N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), welche bevorzugt primäre Amine quervernetzen. Primäre Amine befinden sich an freien N-Termini von Proteinen und den  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenketten; sie greifen die nucleophile Carbonylfunktion von NHS-Estern in einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus an – es werden kovalente Amid- und Imidbindungen gebildet; die NHS-Gruppe fungiert als Abgangsgruppe. Die Cross-Linking-Produkte werden in drei Typen eingeteilt: Typ 0 beschreibt Peptide, die mit hydrolysierten Linkern modifiziert sind. Durch das Beenden der Cross-Linking-Reaktion mit NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> ist eine Aminolyse des Reagenzes möglich. Typ 1 entspricht intrapeptidalen Cross-Links und Typ 2 beschreibt interpeptidale Cross-Links (Abbildung 1.14) [124].

Die NHS-Ester sind nur in organischen Lösungsmitteln löslich. Beispielsweise werden hochkonzentrierte Stammlösungen in DMSO verwendet und beim Reaktionsstart 1000fach mit Pufferlösung verdünnt. Alternativ werden wasserlösliche NHS-Ester verwendet, die eine Sulfonsäuregruppe enthalten [118]. NHS-Ester sind sehr hydrolyseempfindlich und sollten unter Feuchtigkeitsausschluß im Exsikkator aufbewahrt werden [122].

Unter physiologischen Bedingungen (pH 7,0 – 7,5) liegt die Halbwertszeit der Cross-Linking-Reaktion im Stundenbereich. Unter steigendem pH-Wert erhöht sich die Reaktivität und es findet weniger Hydrolyse statt [128]. Bei pH 9 wird keine Hydrolyse mehr beobachtet [129].

Es werden zusätzlich stabile Ester mit Serin, Threonin und Tyrosin gebildet [130] [131]. Diese Reaktion ist reversibel und läuft langsamer ab als die Bildung von Carbonsäureami-



**Abbildung 1.14:** Reaktionsmechanismus des Cross-Linkings mit homobifunktionellen N-Hydroxysuccinimidestern – hier am Beispiel Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS<sup>2</sup>G).

den aus primären Aminen. Weiterhin wurde eine Aminolyse mit  $NH_4^+$ -Kontaminationen des Puffers beobachtet [132]. Primäre Amine des freien *N*-Terminus sind am reaktivsten. Im sauren pH-Bereich werden mehr Tyrosine modifiziert, während im basischen pH-Bereich Lysine reakiver sind [133]. Histidine, die sich in räumlicher Nähe befinden, katalysieren über ein *N*-acetyliertes His-Intermediat die Bildung stabiler Ester mit Tyrosin [131].

Als NHS-Alternativen wurden Abgangsgruppen mit höheren Reaktionskinetiken untersucht: *N*-Hydroxyphthalimide, Hydroxybenzotriazole und 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole (HABT). Studien an GST-Dimeren zeigten, daß der NHS-Ester DSS achtmal langsamer reagiert als ein entsprechendes HABT-Derivat [134].

#### Photoreaktive Aminosäuren

Als alternative Strategie zur Verwendung aminreaktiver Cross-Linking-Reagenzien werden Proteine mit photoreaktiven Aminosäuren eingesetzt. Diazirine wie Photo-Met, Photo-Leu und Photo-Ile weisen ein UV-Absorptionsmaximum bei 350 nm auf – die Photoreaktion ist *in vivo* innerhalb weniger Minuten möglich [135]. Unter UV-



Abbildung 1.15: Reaktionsmechanismus des Cross-Linkings mit den Photoaminosäuren (A) Photoleucin, das ein Diazirin als photoreaktive Gruppe enthält, und (B) Benzoylphenylalanin, das ein photoreaktives Benzophenon enthält.

Bestrahlung entsteht unter Abspaltung eines  $N_2$ -Moleküls ein hochreaktives Carben, das in Heteroatom-H-Bindungen oder C-H-Bindungen des Interaktionspartners inkorporiert wird (Abbildung 1.15 A). Allerdings führt die Photolyse auch zur Bildung von Diazoisomeren und alkylierenden Nebenreaktionen [136].

Zur Inkorporation der photoreaktiven Aminosäuren in Proteine werden Zellkulturen in Minimalmedien durchgeführt, die die gewünschte Photoaminosäure enthalten, jedoch nicht die entsprechende Wildtyp-Aminosäure [135].

Benzophenone reagieren spezifischer: Sie bilden unter UV-Anregung (355 nm) chemisch stabile Biradikale. Das Sauerstoff-Radikal abstrahiert anschließend ein Wasserstoff-Radikal des Reaktionspartners. Folglich bildet das Photophor eine C-C-Bindung mit dem Alkylradikal des Reaktionspartners (Abbildung 1.15 B). Da die Photoaktivierung reversibel verläuft, reagieren Benzophenone effizienter als Diazirine [137]. Die Seitenkette des Benzoylphenylalanins (Bpa) reagiert bevorzugt mit der  $\delta$ -Methylgruppe der Seitenkette in Methioninen [138] [139] [140].

Zur Herstellung rekombinanter Bpa-enthaltender Proteine wird ein erweiterter genetischer Code verwendet. Für *E. coli* wurde aus Mutationsbibliotheken ein korrespondierendes tRNA:Aminoacyl/tRNA-Synthetase-Paar selektiert, um die unnatürliche Aminosäure Bpa auf Amber-Stop-Codons UAG zu inkorporieren [121]. Auf der Plasmid-DNA wird das Tripelcodon der zu mutierenden Aminosäure zum Amber-Stop-Codon mutiert. Dieses Plasmid und ein zweites Plasmid, das die tRNA<sup>Bpa</sup> und die Bpa-tRNA-Synthetase codiert, werden in *E. coli* transformiert. Die Expression wird in einem klassischen Medium durchgeführt, dem zusätzlich Bpa zugefügt wurde [141].

### 1.3.4 Strategien zur Identifizierung von Cross-Linking-Produkten

#### Isotopenmarkierte Cross-Linker

Mit zunehmender Größe des zu untersuchenden Proteinkomplexes wird die Wahrscheinlichkeit größer, daß modifizierte und unmodifizierte Peptide gleiche theoretische Massezu-Ladungsverhältnisse (m/z) besitzen. Zusätzlich sind die Signale quervernetzter Peptide wesentlich intensitätsschwächer als die Signale unmodifizierter Peptide. Daher wurden verschiedene Strategien entwickelt, die quervernetzten Peptide zu markieren, um sie so in komplexen Peptidmischungen erkennen zu können.

Die Einführung von Isotopenmarkierungen ist sehr verbreitet: Diese können zum einen durch eine tryptische Spaltung der quervernetzten Proteinkomplexe in mit <sup>18</sup>O angereichertem  $H_2O$  eingeführt werden. Quervernetzte Peptide (Typ-2-Cross-Links, Abbildung 1.14) enthalten zwei *C*-Termini, wodurch viermal <sup>18</sup>O inkorporiert wird. Folglich enthalten die Massenspektren 8-amu-Massenverschiebungen im Vergleich zu den unmarkierten Proben [142] [143].

Die <sup>18</sup>O-Markierung kann teilweise unvollständig verlaufen und daher die Identifizierung der quervernetzten Peptide erschweren. Daher ist es sinnvoller, Cross-Linker mit stabilen Isotopenmarkierungen zu entwickeln. So wurde ein Maleinsäure-NHS-Ester mit zwei <sup>18</sup>O-markierten Carbonyl-Sauerstoffen hergestellt. Wird dieser im 1:1-Verhältnis mit dem entsprechenden unmarkierten Cross-Linker eingesetzt, ergeben sich 4-amu-Massenabstände in den Übersichtsspektren [144].

Vierfach deuterierte Cross-Linker sind am weitesten verbreitet (Tabelle 1.1):  $D_4$ -Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat, -pimelat, und -sebacat wurden gemeinsam mit ihren entsprechenden  $D_0$ -Varianten im Jahr 2001 vorgestellt [145].  $D_0/D_4$ -Disuccinimidyladipat (DSA) folgte ein Jahr später [146]. Am bekanntesten sind die isotopenmarkierten Va
 Tabelle
 1.1:
 Isotopenmarkierte, homobifunktionelle, aminreaktive
 Cross-Linker:
 Sulfo-N-hydroxy 

 succinimidester unterschiedlicher Spacer-Längen.
 Sulfo-N-hydroxy Sulfo-N-hydroxy Sulfo-N-hydroxy



Spacer	Cross-Linker	Abk.	Länge	Referenz
	$D_0/D_4$ -Bis(sulfosuccinimidyl)-			
n = 1	-glutarat	$BS^2G$	$7,7{ m \AA}$	[147] [148]
$\mathrm{n}=2$	-adipat	DSA	$8,6{ m \AA}$	[146]
$\mathrm{n}=3$	-pimelat		$9,5{ m \AA}$	[145]
n = 4	-suberat	$BS^3$	$11,4{\rm \AA}$	[145] [148]
n = 6	-sebacat		$13,2{\rm \AA}$	[145]

rianten von Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (BS<sup>2</sup>G) und -suberat (BS<sup>3</sup>), welche für die Strukturaufklärung des CaM/AC8-Komplexes (Calmodulin und Adenylatcyclase-8) hilf-reich waren [147] [148].

Nachteilig ist zu erwähnen, daß bei einer Nano-HPLC-Trennung auf C18-Partikelsäulen die undeuterierten Peptide unterschiedlich eluieren als ihre deuterierten Äquivalente. Eine Alternative wären <sup>13</sup>C-markierte Cross-Linker, da <sup>13</sup>C-markierte Reagenzien keine Retentionsunterschiede zu <sup>12</sup>C-enthaltenden Molekülen aufweisen. Ein weiterer Nachteil ist, daß isotopenmarkierte Cross-Linker im 1:1-Verhältnis eingesetzt werden, wodurch sich die Signalintensität in Übersichtsmassenspektren halbiert.

Zukünftig werden niedermolekulare Fragmentionen, die vom Cross-Linker selbst abstammen, verstärkt in Betracht gezogen, um das Vorhandensein einer Vernetzung zu bestätigen [149].

#### Spaltbare Cross-Linker

Niederabundante, quervernetzte Peptide anhand ihres Fragmentierungsverhaltens zu identifizieren, verspricht der Einsatz von spaltbaren Cross-Linkern (Tabelle 1.2).

Short B	AMG	DTSSP		EGS	N N
Short C		$ \begin{array}{c} & & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & & \\ & & $	l not		O M
Abk.	Name		Länge	Spaltbedingung	Ref
DST	Disuccinimi	dyltartrat	$6,4{ m \AA}$	Na-meta-periodat	[150]
BAMG Bis(succinimidyl)-3-azidomethylglutarat		$7,5{ m \AA}$	TCEP	[151]	
DTSSP	DTSSP Dithiobis(succinimidylpropionat)		$12,0{\rm \AA}$	DTT oder TCEP	[151]
EGS	GS Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)		$16,1{\rm \AA}$	Hydroxylamin-HCl	[152]

**Tabelle 1.2:** Homobifunktionelle, aminreaktive Cross-Linker: Chemisch spaltbare und MS-spaltbare *N*-hydroxysuccinimidester. Die Spaltstellen sind rot markiert.

**Chemisch spaltbare Cross-Linker** — Chemisch spaltbare Cross-Linker sind schon seit den 1980er Jahren bekannt (Tabelle 1.2). Der Weinsäure-Cross-Linker Disuccinimidyltartrat (DST) läßt sich in 15 mM Natrium-*meta*-periodat an der *cis*-Diolfunktion spalten [150].

11, 2 Å

15, 1 Å

CID-MS/MS

CID-MS/MS

[153]

[154]

Bi(succinimidyl)succinamylaspartylprolin

Bi(succinimidyl)succinamylaspartylprolylglycin

Bis(succinimidyl)-3-azidomethylglutarat (BAMG) enthält eine Azidofunktion, die in 10 mM Tris-2-carboxyethylphosphin (TCEP) zum primären Amin reduziert wird. Somit werden durch einen nucleophilen Angriff des primären Amins die Carbonsäureamidfunktionen des Cross-Linkers gespalten. Je nach Cross-Linking-Typ entstehen charakteristische, unterschiedlich modifizierte Peptide [151].

Die Esterfunktionen von EGS (Ethylenglycolbis(succinimidylsuccinat)) sind in 0, 5 MHydroxylamin bei pH 8,5 spaltbar. Es entsteht ein spezifisches Muster aus modifizierten Peptidionen und Ethylenglycol-Reporterionen [155]. Der Austausch aller zwölf *Spacer*-Wasserstoffe durch Deuterium (D<sub>12</sub>-EGS) erleichterte die Zuordnung dieser Ionen durch

SuDP

SuDPG

12-amu-Ionenpaare je nach Cross-Linking-Typ [156].

Der Dithio-Cross-Linker DTSSP (Dithiobis(succinimidylpropionat)) wurde bereits in den 1970er Jahren verwendet, um die Struktur der ATPase-Komplexe in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* zu charakterisieren [157]. Die quervernetzten Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen sowie immunologisch nachgewiesen. Radiochemische Identifizierungen gelangen mit <sup>35</sup>S-markiertem DTSSP [119]. DTSSP ist mit Dithiothreitol (DTT) spaltbar, was daher Probenvorbereitungsschritte unter reduzierenden Bedingungen ausschließt. Daher wurden Kontroll-Experimente in Abwesenheit des Cross-Linkers durchgeführt [132] [158]. Mittels Laser-induzierter Spaltung in MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Experimenten wird bevorzugt die Dithiolgruppe asymmetrisch reduziert; es entsteht ein charakteristisches 32/34-u-Fragmentionenmuster [159].

Von entscheidendem Nachteil der chemisch spaltbaren Cross-Linker sind die aufwendigen Probenvorbereitungsschritte und damit verbundenen hohen Probenmengen für ein Cross-Linking-Experiment.

**MS-spaltbare Cross-Linker** — Der Einsatz von Cross-Linkern mit MS-spaltbaren Reporterionen erleichtert die Unterscheidung quervernetzter von unmodifizierten Peptiden. Das Reagenz *N*-Benzyliminodiacetoyloxysuccinimid (BID) spaltet in MS/MS-Experimenten ein Tropylium-Reporterion (m/z 91) ab (Abbildung 1.16 A) [160]. Es wurde auch die wasserlösliche Sulfo-NHS-Ester-Variante SulfoBID synthetisiert [161].

Um Cross-Linking-Experimente in Zellkulturen durchzuführen, wurden membrangängige, spaltbare Cross-Linker der sogenannten Proteininteraktionsreporter (PIR)-Familie mittels Festphasen-Peptidsynthese hergestellt (Abbildung 1.16 B). Ausgehend von Lys wurden an die Amine zwei RINK-Gruppen gekuppelt, die ursprünglich als Amidierungsreagenz in der Peptidsynthese verwendet wurden [162]. Es folgen zwei Succinamyl-Gruppen als *Spacer* und zwei aminreaktive NHS-Ester. Die RINK-Lys-RINK-Gruppe fungiert als PIR bei niederenergetischen CID-MS/MS-Experimenten; die charakteristische Massenverschiebung verifiziert quervernetzte Peptide. Je nach Cross-Linking-Typ



**Abbildung 1.16**: Cross-Linker mit MS-spaltbaren Proteininteraktionsreportern (PIR): **(A)** BID und SulfoBID enthalten eine CID-spaltbare Benzylgruppe (m/z 91). **(B)** Grundstruktur der Familie der PIR-Cross-Linker. Der spaltbare PIR enthält ein Lysin (grün) flankiert von zwei RINK-Gruppen (orange). Das Lys kann über den Rest R (rot) mit weiteren Gruppen und Affinitätsmarkierungen (z. B. Biotin) gekuppelt werden.

verbleiben succinylamidierte Peptide; MS<sup>3</sup>-Experimente bestätigen die modifizierte Aminosäure und die Peptidsequenz [163].

Um Cross-Linking-Produkte affinitätschromatographisch anzureichern, wurde über eine photospaltbare Gruppe und einen PEG-*Spacer* eine Biotin-Markierung an die PIR-Gruppe als Rest R gekuppelt (Abbildung 1.16 B). Die Affinitätsmarkierung läßt sich anschließend über eine photolytische Spaltstelle ( $\lambda = 360$  nm) entfernen, da diese hochabundante Signale in den Massenspektren zeigen würden [164].

Um die Membrangängigkeit der PIR-Reagenzien für *in-vivo*-Experimente zu optimieren, wurde das Lysin entweder um Methionin [165] oder um eine Prolylglutamat-Gruppe [166] verlängert. Letzteres enthält zussätzlich eine Biotin-Affinitätsmarkierung. Um den Biotinrest vor der massenspektrometrischen Analyse photometrisch abspalten zu können, wurde ein Hydroxymethyl-Photolinker zwischengeschaltet [167]. Zur erleichterten Unterscheidbarkeit der Cross-Linker-Fragmente wurden sowohl das Lys als auch die Succinamylgruppen insgesamt 14-fach <sup>13</sup>C-markiert [168].

Aufgrund der extrem großen *Spacer*-Längen dieser Proteininteraktionsreporter von ca. 43 Å sind die Strukturinformationen nur bedingt aussagekräftig. Für die Identifizierung von Proteininteraktionspartnern kann die PIR-Familie hilfreich sein, jedoch wurden bislang noch keine überzeugenden Ergebnisse publiziert. Ein alternatives Konzept nutzt die unterschiedlichen Bindungsenergien von Peptidbindungen. Aspartylprolin- oder Glycylprolin-Peptidbindungen besitzen die geringsten Bindungsenergien und werden bei niederenergetischer, kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) bevorzugt gespalten. So wurden die Peptid-Cross-Linker SuDP [153] und SuDPG [154] entwickelt (Tabelle 1.2). Diese Reagenzien vereinigen die Vorteile der unkomplizierten Probenvorbereitung der isotopenmarkierten Cross-Linker und die zuverlässige Bestätigung quervernetzter Peptide durch die eingeführte "Sollbruchstelle".

Allerdings ist deren Synthese schwierig und wird von unerwünschten Nebenreaktionen begleitet. Durch die hohe Hydrolyseanfälligkeit sind diese Reagenzien nur begrenzt lagerbar.

Um eine automatisierte Identifizierung von Cross-Linking-Produkten aus komplexen Mischungen zu ermöglichen, sind weitere Optimierungsschritte nötig – ein Prinzip, das in dieser Arbeit verwirklicht wurde.

# 2 Material und Methoden

# 2.1 Chemikalien und Geräte

# 2.1.1 Proteine und Peptide

Cytochrom C ( <i>Pferdeherz</i> )	Sigma, Taufkirchen
Insulin ( <i>Rinderpankreas</i> )	Sigma, Taufkirchen
LHRH (Luteinizing-Hormone Releasing Hormone)	Sigma, Taufkirchen
Lysozym ( $H\ddot{u}hnereiwei\beta$ )	Sigma, Taufkirchen
Munc 13-1-Peptid (CaM-Bindungsregion)	Synthese von Olaf Jahn, Göttingen
Substanz P	Sigma, Taufkirchen
Ubiquitin ( <i>Rindererythrozyten</i> )	Sigma, Taufkirchen

Substanz P RPKPQQFFGLM-NH<sub>2</sub>

LHRH pEHWSTGLRPG-NH<sub>2</sub>

Munc13-1 CRAKANWLRAFNKVRMQLQEAR

Lysozym (Hühnereiweiß)
1 KVFGRCELAA AMKRHGLDNY RGYSLGNWVC AAKFESNFNT QATNRNTDGS
51 TDYGILQINS RWWCNDGRTP GSRNLCNIPC SALLSSDITA SVNCAKKIVS
101 DGNGMNAWVA WRNRCKGTDV QAWIRGCRL

**Abbildung 2.1:** Aminosäuresequenzen der Peptide Substanz P, LHRH, Munc13-1 und des Proteins Lysozym (Hühnereiweiß), die für massenspektrometrische Untersuchungen MS-spaltbarer Cross-Linker verwendet wurden. Die Aminosäure "pE" in LHRH entspricht der Pyroglutaminsäure.

# 2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (SAP)	Promega, Mannheim
AspN	Roche, Penzberg
Benzonase	Merck, Darmstadt
$Eco\mathrm{RV}$	New England-Biolabs, Frankfurt am Main
GluC	Roche, Penzberg
NcoI	New England-Biolabs, Frankfurt am Main
NdeI	New England-Biolabs, Frankfurt am Main
Pfu-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	New England-Biolabs, Frankfurt am Main
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin (sequencing grade)	Roche, Penzberg
XhoI	New England-Biolabs, Frankfurt am Main

# 2.1.3 Pufferlösungen

AEX-Puffer A	$20\mathrm{mM}$ HEPES, $5\mathrm{mM}$ NaCl, $1\mathrm{mM}$ TCEP, $10\%~(\mathrm{v/v})$
	Glycerol, pH 8
AEX-Puffer B	$20\mathrm{mM}$ HEPES, $500\mathrm{mM}$ NaCl, $1\mathrm{mM}$ TCEP, $10\%~(\mathrm{v/v})$
	Glycerol, pH 8,0
DNA-	$0,25\%~({\rm m/v})$ Bromphenolblau, $0,25\%~({\rm m/v})$ Xylency anol
Probenpuffer	FF, 30 $\%~(\rm v/v)$ Glycerol in MilliQ-H_2O
(6x konz.)	
Harnstoff-Puffer	$8\mathrm{M}$ Harnstoff, $100\mathrm{mM}$ Tris, $1\mathrm{mM}$ EDTA, pH 8,0
IMAC-Puffer A	$20\mathrm{mM}$ HEPES, $150\mathrm{mM}$ NaCl, $20\mathrm{mM}$ Imidazol, $1\mathrm{mM}$ TCEP,
	10% (v/v) Glycerol, pH 8,0
IMAC-Puffer B	$20\mathrm{mM}$ HEPES, $150\mathrm{mM}$ NaCl, $500\mathrm{mM}$ Imidazol, $1\mathrm{mM}$
	TCEP, $10\%~(v/v)$ Glycerol, pH 8,0
Laemmli-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 $\%$ (w/v) SDS, 30 $\%$ (v/v)
	Glycerol in MilliQ-H $_2{\rm O}$
Lyse-Puffer	$25\mathrm{ml}$ AEX-Puffer A, 1 Tablette Protease-Inhibitor Complete
	(Roche), $5\mu g/ml$ DNaseI, $10\mu g/ml$ RNaseA

Lyse-Puffer Ex	$100\mu l$ BugBuster 10x (Novagen), $2\mu l$ PMSF (100 mM), $2\mu l$
	${\rm MgSO}_4$ (1 M), 10 µl Lysozym (10 mg/ml), 0,3 µl Benzonase $^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$
	(25 U/µl), $\Sigma$ 1000 µl PBS-Puffer (20 mM)
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $\mathrm{Na_{2}HPO_{4}},1,76\mathrm{mM}$
	$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4},  \mathrm{pH}$ 7,4
TBE-Puffer	$45\mathrm{mM}$ Tris-HCl, $45\mathrm{mM}$ Borsäure, $1,5\mathrm{mM}$ EDTA pH 8,0.
(5x konz.)	Vor Gebrauch wurde der Puffer mit MilliQ-H $_2O$ zehnfach
	verdünnt, so daß eine $0,5\% ige~(v/v)$ TBE-Lösung entstand.
Transformations-	nach Inou e $etal$ [169]: $55\mathrm{mM}\mathrm{MnCl}_2\cdot4\mathrm{H}_2\mathrm{O},15\mathrm{mM}$
puffer	$\rm CaCl_2 \cdot 2H_2O,250mM$ KCl, $10\rm mM$ PIPES, pH 6,7

# 2.1.4 Stammlösungen und Nährmedien

Agar-Platten	Dem LB-Medium (Lysogeny Broth) wurde vor dem Autoklavie-
	ren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugegeben. Nach dem Abkühlen
	auf ca. 40 °C wurden je 20 ml des Mediums in eine Petrischa-
	le gegossen. Dienten die Agar-Platten zur Selektion, wurden
	vor dem Gießen die Antibiotika in Form von 1000-fach konzen-
	trierten Stammlösungen zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei
	8 °C.
Ampicillin	$100\mathrm{mg}/\mathrm{ml}$ Ampicillin in 50 $\%$ (v/v) EtOH. Die Lösung wurde
	sterilfiltriert und bei $-20^{\circ}\mathrm{C}$ gelagert.
Bpa-TB-Medium	Eine 2 mM Bpa-Suspension in MilliQ-H $_2{\rm O}$ wurde in der Mi-
	krowelle aufgekocht, bis sich das Bpa gelöst hatte. Diese wurde
	unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 (v/v) mit doppelt
	konzentriertem, autoklaviertem TB-Medium vereinigt.
Chloramphenicol	$30\mathrm{mg}/\mathrm{ml}$ Chloramphenicol in EtOH. Die Lösung wurde steril-
	filtriert und bei $-20$ °C gelagert.

GYT-Medium	Es wurden $10\mathrm{ml}$ Glycerol, $125\mathrm{mg}$ Hefeextrakt und $250\mathrm{mg}$ Pep-
	ton aus Casein in 100 ml bidestilliertem $\mathrm{H_2O}$ gelöst und auto-
	klaviert.
IPTG	Isopropylthiogalaktose wurde in MilliQ-H $_2{\rm O}$ zu einer Konzen-
	tration von 1 M angesetzt und sterilfiltriert. Die Lagerung er-
	folgte bei $-20$ °C.
K-Phosphat (10x)	Es wurden $23,1{\rm g/l}~{\rm KH_2PO_4}$ und $125,4{\rm g/l}~{\rm K_2HPO_4}$ in bide-
	stilliertem $\mathrm{H}_{2}\mathrm{O}$ gelöst und autoklaviert.
Kanamycin	$35\mathrm{mg}/\mathrm{ml}$ Kanamycin in MilliQ-H $_2\mathrm{O}.$ Die Lösung wurde steril-
	filtriert und bei $-20$ °C gelagert.
LB-Medium	Es wurden $10\mathrm{g}$ Pepton aus Casein, $5\mathrm{g}$ Hefe extrakt und $10\mathrm{g}$
(Lysogeny Broth)	NaCl in 1 l bidestilliertem $\mathrm{H}_{2}\mathrm{O}$ gelöst und mit 10 M NaOH auf
	p H 7,5 eingestellt. Das Medium wurde autoklaviert (25 min,
	121 °C). Bei Bedarf wurden Antibiotika in Form von 1000-fach
	konzentrierten Stammlösungen nach dem Autoklavieren zuge-
	geben.
SOB-Medium	Pro Liter Medium wurden $20{\rm g}$ Pepton aus Casein, $5{\rm g}$ Hefeex-
(Super Optimal	trakt in 2,5 mM KCl- und 10 mM NaCl-Lösung gegeben. Nach
Broth)	dem Autoklavieren (25 min, 121 °C) wurden 10 ml einer 2 M
	Glucoselösung und 10 ml einer 1 M $\mathrm{MgCl}_2/1\mathrm{M}\mathrm{MgSO}_4\text{-Lösung}$
	zugesetzt. Beide Lösungen wurden zuvor sterilfiltriert.
TB-Medium	Es wurden $12\mathrm{g}$ Pepton aus Casein, $24\mathrm{g}$ Hefe extrakt und $4\mathrm{ml}$
(Terrific Broth)	Glycerol in 900 ml bidestilliertem $\rm H_2O$ gelöst und autoklaviert.
	Vor Gebrauch wurden $100\mathrm{ml}$ K-Phosphat (10x konzentriert)
	zugegeben.

# 2.1.5 Cross-Linking-Reagenzien

Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA):  $D_0$ -Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (D\_0-BS<sup>2</sup>G)  $D_4$ -Bis(sulfosuccinimidyl)glutarat (D\_4-BS<sup>2</sup>G)  $D_0$ -Bis(sulfosuccinimidyl)subtrat (D\_0-BS<sup>3</sup>)  $D_4$ -Bis(sulfosuccinimidyl)subtrat (D\_4-BS<sup>3</sup>)

Synthese von Frank Dreiocker (Universität zu Köln):

Bi(succinimidyl)succinamyl-carbamothioyl-glycylprolylglycin (BuTuGPG,

Edman-Linker)

Bis(succinimidylsuccinamyl)thioharnstoff (BuTuBu, Thioharnstoff-Linker)

Bis (succinimidyl succinamyl) harnstoff (BuUrBu, Harnstoff-Linker)

# 2.1.6 Chemikalien

	VWB
	• • • • • •
(HCCA)	Bruker Daltonik
	Merck
(FA)	Sigma
$(\mathrm{NH}_4\mathrm{HCO}_3)$	Sigma
(APS)	Bio-Rad
	Merck
(Xgal)	Roth
	AppliChem
	Sigma
(DHB)	Sigma
(DMSO)	Sigma
(DTT)	Sigma
	(HCCA) (FA) (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ) (APS) (Xgal) (DHB) (DHB) (DMSO) (DTT)

Ethylendiamintetraessigsäure	(EDTA)	AppliChem
Glycerol ROTIPURAN <sup>®</sup>		Roth
GW6471		Sigma
Harnstoff		Sigma
[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]ethansulfonsäure	(HEPES)	Sigma
Imidazol Buffer grade		AppliChem
Iodacetamid	(IAA)	Sigma
${\rm Isopropyl-}\beta\text{-}{\rm D-thiogalactopyranosid}$	(IPTG)	Roth
Isopropanol, für die Spektroskopie, Uvasol $^{\textcircled{R}}$		$\mathrm{Merck}/\mathrm{VWR}$
$\rm Mangan(II)\text{-}chlorid\text{-}Tetrahydrat}~(\rm MnCl_2\cdot4H_2O)$		AppliChem
Magnesiumsulfat	$(MgSO_4)$	AppliChem
Natriumchlorid	(NaCl)	Roth
Natriumdodecyl sulfat (10 %, v/v)	(SDS)	Bio-Rad
Phenylmethylsulfonylfluorid	(PMSF)	AppliChem
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)	(PIPES)	AppliChem
Proteinstandard (Precision Plus Protein Unstained)		Bio-Rad
Proteinstandard (PageRuler <sup>TM</sup> Plus Unstained)		Fermentas
Salzsäure, $0, 1 \mathrm{M}$ (Endotoxin-frei)	(HCl)	Sigma
Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure)	(SA)	BrukerDaltonik
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	(TEMED)	VWR
Trifluoressigsäure	(TFA)	Sigma
Tris-2-carboxyethylphophin-hydrochlorid	(TCEP)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan	(Tris)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan-hydrochlorid	(Tris-HCl)	Sigma

# 2.1.7 Primer

5' Nde PPARa 196	GCGACTACATATGGAAGATTCTGAAACTCG
3' Xho STOP PPARa	GCGAATCTCGAGTCAGTACATGTCCCTGTAG
5' Nco PPARa 196	CCGCTAACCATGGAAGATTCTGAAACTGC
3' Xho PPARa	GCGAATCTCGAGTCCGTACATGTCCCTGTAG
PPARa-L258Stop-F	CGCTGGTGGCCAAGTAGGTGGCCAATGGCATC
PPARa-L258Stop-R	GATGCCATTGGCCACCTACTTGGCCACCAGCG
PPARa-K266Stop-F	GGCATCCAGAACTAGGAGGCGGAGGTC
PPARa-K266Stop-R	GACCTCCGCCTCCTAGTTCTGGATGCC
PPARa-F273Stop-F	CGGAGGTCCGCATCTAGCACTGCTGCCAGTG
PPARa-F273Stop-R	CACTGGCAGCAGTGCTAGATGCGGACCTCCG
PPARa-F318Stop-F	GTTTATGAGGCCATATAGGCCATGCTGTCTTCTG
PPARa-F318Stop-R	CAGAAGACAGCATGGCCTATATGGCCTCATAAAC
PPARa-K448Stop-F	CTGGTGCAGATCATCTAGAAGACGGAGTCGGATG
PPARa-K448Stop-R	CATCCGACTCCGTCTTCTAGATGATCTGCACCAG
PPARa-K449Stop-F	GTGCAGATCATCAAGTAGACGGAGTCGGATGC
PPARa-K449Stop-R	GCATCCGACTCCGTCTACTTGATGATCTGCAC
PPARa-L459Stop-F	GCTGCGCTGCACCCGTAGCTGCAGGAGATCTAC
PPARa-L459Stop-R	GTAGATCTCCTGCAGCTACGGGTGCAGCGCAGC
PPARa-L460Stop-F	CGCTGCACCCGCTATAGCAGGAGATCTACAGG
PPARa-L460Stop-R	CCTGTAGATCTCCTGCTATAGCGGGTGCAGCG
5' KpnI PPARa 196	CGGATGGTACCATGGAAGATTCTGAAACTGC
3' BamHI STOP PPARa	GTGATAGGATCCTCAGTACATGTCCCTGTAG

# 2.1.8 Plasmide

	Ursprungs-	
Name	plasmid	Herkunft
$\mathrm{pBlueScript}~\mathrm{II}~\mathrm{SK}(+)$	_	Novagen, Darmstadt
$pCMV$ -PPAR $\alpha$		Oliver Rau, Goethe-Universität Frankfurt
pET15b-His-TEV-Prot	pET-15b	Sabrina Pfennig, MLU Halle-Wittenberg
pET-28a		Novagen, Darmstadt
pEvol-pBpF		Peter Schultz, Scripps, La Jolla, CA, USA [141]
pMM NHisPPAR $\alpha$ WT	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.1.1
pMM CHisPPAR $\alpha$ WT	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.1.1
pMM CHisPPAR $\alpha$ L258Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ K266Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ F273Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ F318Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ K448Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ K449Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPARaL459Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pMM CHisPPAR $\alpha$ L460Stop	pET-28a	diese Arbeit, Kapitel 3.5
pTH24		Torleif Härd, Karolinska Inst., Stockholm [170]

Klonierungsstämme	Genotyp
$Dh5\alpha$	$\mathrm{F}^-$ end A 1 glnV44 thi-1 rec A1 rel A1 gyrA96 deo 
ER2566	$\mathrm{F}^-~\lambda^-$ fhu A2 [Ion] $omp\mathrm{T}$ lac Z::T7 gene 1gal sul A11
	$\Delta(\mathrm{mcrC}\text{-mrr})114{::}\mathrm{IS10}\ \mathrm{R}(\mathrm{mcr}\text{-}73{::}\mathrm{miniTn10}\text{-}\mathrm{TetS})2$
	R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]
XL1-Blue	$end{\rm A1}~gyr{\rm A96}({\rm nal}^R)$ thi-1 $rec{\rm A1}~lac$ gl nV44 F'[::Tn10
	proAB <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> $\Delta$ (lacZ)M15] hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )
Expressionsstämme	Genotyp
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	E. coli B F <sup>-</sup> ompT $hsdS(r_B^-m_B^-) dcm^+$ Tet <sup>r</sup> gal $\lambda$ (DE3)
	$end {\rm A} \ {\rm Hte} \ [argU \ proL \ {\rm Cam}^R] \ [argU \ ile Y \ leu W \ {\rm Strep}/{\rm Spec}^R]$
BL21(DE3)	E. coli F <sup>-</sup> ompT gal dcm Ion $hsdS_B(r_B^-m_B^-) \lambda$ (DE3 [lacI
	lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

# 2.1.9 E. coli-Stämme

# 2.1.10 Kits

Plasmid Mini-Prep Kit	Jena Bioscience
PCR Purification Kit	Jena Bioscience
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen

# 2.1.11 Laborgeräte

# Massenspektrometer

MALDI-TOF/TOF-MS:	Ultraflex III (Bruker Daltonik, Bremen)		
	mit SmartBeam-Laser $^{^{\mathrm{TM}}}$ (Bruker Daltonik, Bremen)		
ESI-LTQ-Orbitrap-MS:	LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen)		
	mit Nano-ESI-Quelle (Proxeon, Odense, Dänemark)		

# Nano-HPLC-Systeme

gekoppelt an das MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer Ultraflex III:

Nano-HPLC-System	Ultimate 3000 (Dionex, Idstein)
HPLC-Vorsäule	PepMap, C18, 300 $\mu m$ x 5 mm, 5 $\mu m,$ 100 Å (Dionex, Idstein)
HPLC-Trennsäule	PepMap, C18, 75 $\mu m$ x 150 mm, 3 $\mu m,$ 100 Å (Dionex, Idstein)
Spritzenpumpe	Syringe Pump 402 (Gilson, Limburg)
Fraktionssammler	Proteineer fc (Bruker Daltonik, Bremen)

gekoppelt an das Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL:

Nano-HPLC-System	Ultimate (Dionex, Idstein)
ausgestattet mit	Ultimate Mikropumpe, Ultimate UV-Detektor, Ultimate
	SWITCHOS II, Famos Mikro-Autosampler
HPLC-Vorsäule	PepMap, C18, 300 $\mu m$ x 5 mm, 5 $\mu m,$ 100 Å (Dionex, Idstein)
HPLC-Trennsäule	PepMap, C18, 75 $\mu m$ x 150 mm, 3 $\mu m,$ 100 Å (Dionex, Idstein)

# Sonstige Geräte

Analysenwaage LE225D	Sartorius, Göttingen	
Brutschrank BKE 40	Memmert, Schwalbach	
Dampfautoklav V75	Systec, Wettenberg	
DNA-Elektrophoresekammer Mini-Sub-Cell GT	Bio-Rad, München	
Elektroporator BTX ECM 630	Qbiogene, Heidelberg	
FPLC-System ÄKTA FPLC mit Fraktionssammler	GE Healthcare, München	
Frac-920		
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad, München	

Bio-Rad, München

Gelelektrophoreseapparatur Mini-Protean Tetra Cell mit Stromgeber POWERPACK 300 Heizblöcke Inkubationsschüttler Certomat BS-T

Laborwaage acculab Mikrosäulen ZipTip C4 und C18 Mikrowelle pH-Meter MV 870 Pipetten 2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl

Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl Reaktionsgefäße 0, 5 ml, 1, 5 ml, 2, 0 ml Schütteltische Duomax 1030 und Titramax 101 Spannungsgeber PowerPac 300 Spektralphotometer Ultrospec 1100 pro Thermocycler TPersonal Thermomixer compact Tischkühlzentrifuge 5415R Tischzentrifuge Allegra 21R mit Rotor S4180

Tischzentrifuge minispin Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner Ultraschallhomogenisator VC 750

Vakuumkonzentrator miVac Vortexmixer 7-2020 Wasseraufbereitungsanlage DirectQ5 VWR, Darmstadt B. Braun Biotech Int., Melsungen Sartorius, Göttingen Millipore, Eschborn Bosch, Stuttgart Präcitronic, Dresden Eppendorf, Hamburg und VWR, Darmstadt Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Heidolph, Kehlheim Bio-Rad, München GE Healthcare, München Biometra, Göttingen Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Beckmann Coulter, Palo Alto, CA, USA Eppendorf, Hamburg VWR, Darmstadt Sonics & Materials, Newton, CT, USA GeneVac, Ipswich, UK neoLab, Heidelberg Millipore, Eschborn

# 2.1.12 Software

Biotools 3.3	Auswertungssoftware für MS- und MS/MS- sowie LC/MS-	
	Daten (Bruker Daltonik)	
CoolToolBox	Evaluation von massenspektrometrischen Peaklisten (MS)	
	zur Identifizierung von Cross-Linking-Produkten basierend	
	auf Excel 2003 Visual Basics, entwickelt von Leo J. de Ko-	
	ning, Universiteit van Amsterdam, NL	
ExPASy Proteomics	Teil der SwissProt-Datenbank, Analytik-Software zur Identi-	
Server	fizierung, Sequenzanalyse und Tertiärstrukturvorhersage von	
	Proteinen; www.expasy.org	
Flex Control 3.3	Akquisition von MALDI-TOF/TOF-MS(/MS)-Daten (Bru-	
	ker Daltonik)	
Flex Analysis 3.3	Software für die Prozessierung und Auswertung von Massen-	
	spektren (Bruker Daltonik)	
GPMAW 8.2	General Protein/Mass Analysis for Windows (Lighthouse	
	Data, www.welcome.to/gpmaw); Evaluation von massen-	
	spektrometrischen Peaklisten zur Identifizierung von Cross-	
	Linking-Produkten	
Hystar 3.2	Steuerung und Koordination von HPLC-Systemen und Mas-	
	senspektrometern (Bruker Daltonik)	
Mascot	Evaluation von massenspektrometrischen Peaklisten (MS	
	und $\mathrm{MS}^2)$ zur Peptidmassenfingerprint analyse (PMF) und	
	$Peptid fragmentierungs finger print analyse \ (PFF), \ In -house-$	
	Lizenz; www.matrixscience.com	
Proteome	Auswertungssoftware für MS- und MS/MS- sowie LC/MS-	
Discoverer 1.0	Daten (Thermo Fisher Scientific)	
Qual Browser 2.07	Software für die Prozessierung und Auswertung von Massen-	
	spektren (Thermo Fisher Scientific)	

StavroX 1.4	Evaluation von massenspektrometrischen Peaklisten (MS		
	und $MS/MS$ ) zur Identifizierung von Cross-Linking-		
	${\it Produkten\ basierend\ auf\ Delphi,\ entwickelt\ von\ Michael\ G\"ot-$		
	ze (Inst. für Biochemie, MLU Halle-Wittenberg)		
WarpLC 1.2	Software für die Steuerung der Aufnahme von MALDI-		
	$\mathrm{TOF}/\mathrm{TOF}\text{-}\mathrm{MS}(/\mathrm{MS})\text{-}\mathrm{Daten}$ und Koordination der Daten-		
	prozessierung von Massenspektren (Bruker Daltonik)		
Xcalibur 2.0.7	Software für die Steuerung der Datenaufnahme von ESI-		
	$\operatorname{LTQ-Orbitrap-MS}^n$ und Koordination der Datenprozessie-		
	rung von Massenspektren (Thermo Fisher Scientific)		

# 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach Inoue

Zur Vorkultur wurde aus einem Verdünnungsausstrich einer *E. coli*-Kultur eine Kolonie gepickt und in 25 ml SOB-Medium gegeben. Nun wurde tagsüber für 6-8 h bei einer Schüttlerfrequenz von 250 rpm bei 37 °C kultiviert. Abends wurden drei 11-Schüttelkolben ohne Schikanen mit je 250 ml SOB-Medium vorbereitet und mit 2 ml, 4 ml bzw. 10 ml der Vorkultur inokuliert. Danach wurde über Nacht bei einer Schüttlerfrequenz von 200 rpm bei 18 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Kulturen bei einer OD<sub>595</sub> von 0,55 auf Eiswasser gekühlt und sedimentiert (10 min, 2700xg, 4 °C). Kulturen mit zu hoher OD<sub>595</sub> wurden verworfen. Anschließend wurde das Medium abdekantiert und das Zellpellet in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Danach wurde erneut sedimentiert und das Pellet in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer resuspendiert. Zum Schluß wurden 10 ml DMSO hinzugegeben, die Mischung wurde 10 min auf Eis gekühlt, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bei -80 °C gelagert [169].

#### 2.2.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Es wurden 500 ml LB-Medium mit *E. coli*-Zellen aus einer Übernachtkultur auf eine  $OD_{595}$  von 0,1 angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Bei einer  $OD_{595}$  von 0,35–0,40 wurden die Zellen 30 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen sedimentiert (15 min, 2700xg, 4 °C); das Pellet wurde mit 500 ml eiskaltem, sterilen H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Es folgten weitere Waschschritte mit 250 ml 10 % (v/v) eiskaltem Glycerol und mit 10 ml 10 % (v/v) eiskaltem Glycerol.

Das gewaschene Pellet wurde in ca. 1 ml eiskaltem GYT-Medium resuspendiert, so daß eine  $OD_{595}$  von 100 resultierte. Die elektrokompetenten Zellen wurden in 80 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein 80  $\mu$ l-Aliquot der *E. coli*-Zellen des gewünschten Stamms wurde auf Eis aufgetaut und danach mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA (ca. 10 ng/ml) versetzt. Nach ca. 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen in einem Thermoschüttler für 60 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900  $\mu$ l SOC-Medium wurden die Zellen 60 min lang bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert.

Die Zellen wurden pelletiert (5 min, 2700xg, 4 °C) und anschließend wurde der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde im verbliebenen Medium resuspendiert und zur Selektion auf Agarplatten mit der gewünschten Antibiotika-Resistenz ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.4 Elektrotransformation

Ein 80  $\mu$ l-Aliquot der *E. coli*-Zellen des gewünschten Stamms wurde auf Eis aufgetaut, in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette mit 2  $\mu$ l salzfreier Plasmid-DNA gemischt und 3 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden unmittelbar nach einem elektrischen Puls von 1,8V in 900  $\mu$ l auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen und 60 min lang bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde die konz. Zellsuspension auf Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Über Nacht auf Agarplatten selektierte *E. coli*-Kolonien (Dh $5\alpha$ ) wurden in 5 ml TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt und bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln für 12 h bis maximal 16 h inkubiert.

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid Mini-Prep Kits (Jena Bioscience) nach Herstellerangaben isoliert. Zur photometrischen Bestimmung der Plasmidkonzentration wurden 4 µl der Plasmid-DNA mit MilliQ-H<sub>2</sub>O auf 70 µl aufgefüllt und in eine Mikro-Quarzküvette überführt. Die Extinktionen wurden bei Wellenlängen von 260 nm zur DNA-Konzentrationsbestimmung, bei 280 nm zur Bestimmung von eventuellen Verunreinigungen durch Proteine und bei 330 nm zur Bestimmung des Blindwertes gemessen. Der Quotient ( $E_{260} - E_{330}$ ) / ( $E_{280} - E_{330}$ ) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors V nach Gleichung 2.1 berechnet:

$$c[\mu g/ml] = (E_{260} \cdot 50 \cdot V) - E_{330}$$
(2.1)

#### 2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1% igen Agarosegels wurden 3 g Agarose in 300 ml TBE-Puffer suspendiert, in der Mikrowelle geschmolzen und auf ca. 60 °C abgekühlt. Dann wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von  $0,5 \,\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Das Gel wurde ca. 8 mm hoch in einen Gelschlitten gegossen, der Probenkamm eingesteckt und 1 h polymerisiert.

Zur Probenvorbereitung wurden  $10\,\mu$ l wäßrige DNA-Lösung mit  $2\,\mu$ l DNA-Probenpuffer (6x konzentriert) gemischt und in die Probentaschen des mit Laufpuffer überschichteten Agarosegels gegeben. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte für 30 min bei 120 mA.

### 2.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Reaktionsansätze wurden nach Tabelle 2.1 hergestellt. Zur Kontrolle wurden die PCR-Produkte auf 2%igen Agarosegelen visualisiert. Im Falle einer anschließenden Restriktions-Endonukleolyse wurden die PCR-Produkte mittels PCR Purification Kit (Jena Bioscience) gereinigt.

Tabelle 2.1: PCR-Reaktionsansatz zur Amplifikation von Genen. Links: Reaktionsansatz, rechts: PCR-<br/>Programm.

37.1	17			
Volumen	Komponente	Zyklus	Temp.	Zeit
1 μl	Templat-DNA $(100  \mathrm{ng}/\mu \mathrm{l})$			
2μl	Primer forward $(5\mu\mathrm{M})$	1	$95^{\circ}\mathrm{C}$	$5 \min$
$2\mu l$	Primer reverse $(5 \mu M)$	$\frac{1}{2}$ (30 x)	95°C	30 s Denaturierung
1 µl	dNTP-Mix (10  mM)	2 (00 A)	50 0	
5]	10x Pfu Polymoroso Puffer		$55^{\circ}\mathrm{C}$	30 s Anlagerung
JμI	10x 1 ju-1 orymerase-1 uner		$72^{\circ}\mathrm{C}$	60 s Elongation
1 µl	$Pfu$ -Polymerase nativ $(2, 5 \mathrm{U}/\mu\mathrm{l})$			
ad 50 $\mu$ l	$H_2O$	3	72 °C	10 min

### 2.2.8 Ortsspezifische Mutagenese

Die Reaktionsansätze wurden nach Tabelle 2.2 hergestellt. Die Kontrolle erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese, wobei eine Negativkontrolle ohne Primer berücksichtigt wurde. Zur Selektion wurden je 2  $\mu$ l Reaktionsansatz in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert und auf SOB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum selektiert.
Volumen	men Komponente		Temp.	Zeit
$0,2\mu l$	Templat-DNA $(100  \mathrm{ng}/\mu \mathrm{l})$			
$2\mu l$	Primer forward $(5\mu M)$	1	$95^{\circ}\mathrm{C}$	$5 \min$
$2\mu l$	Primer reverse $(5 \mu M)$			
1 ul	dNTP-Mix (10 mM)	2 (25 x)	$95^{\circ}\mathrm{C}$	30 s Denaturierung
- p			$70^{\circ}\mathrm{C}$	$30\mathrm{s}$ Anlagerung
5μi	10x Pju-Polymerase-Puffer		68 °C	12.5 min Elongation
$1  \mu l$	$Pfu$ -Polymerase nativ $(2, 5 \text{ U}/\mu \text{l})$			
ad 50 $\mu l$	$H_2O$	3	$68^{\circ}\mathrm{C}$	10 min

**Tabelle 2.2:** Reaktionsansatz zur ortsspezifischen Mutagenese. Links: Reaktionsansatz, rechts: Temperaturverlauf.

## 2.2.9 Subklonierung

#### Herstellung des T-Vektors

Der Reaktionsansatz (Tabelle 2.3 links) wurde im Thermocycler 2 h lang bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels PCR Cleanup Kit (Jena Bioscience) gereinigt. Zum Einfügen der 3'-T-Überhänge wurde der Reaktionsansatz (Tabelle 2.3 rechts) im Thermocycler 2 h lang bei 70 °C inkubiert und mittels PCR Cleanup Kit (Jena Bioscience) gereinigt. Die Inserts wurden analog Tabelle 2.1 mit *Taq*-Polymerase (2,5 U je 150  $\mu$ l Masteransatz) amplifiziert, wobei der 3'-A-Überhang automatisch angefügt wurde.

Volumen	Komponente		Volumen	Komponente
2 µl	pBlueScript II SK (+)		10 µl	pBlueScript II SK (+),
	$(1\mu g/\mu l)$			linearisiert $(0, 2\mu g/\mu l)$
$2\mu l$	EcoRV (20 U/ µl)		6 μl	dTTP $(10 \text{ mM})$
$5\mu l$	NEBuffer 3		$3\mu l$	Taq-Puffer (10 x)
$5\mu l$	BSA (10 x)		$2\mu l$	Taq-Polymerase (10 U/ $\mu$ l)
			8 µl	BSA (10 x)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O	-	ad 30 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 2.3:** Reaktionsansatz zur Herstellung eines T-Vektors. Links: Restriktionsendonukleolyse mit *Eco*RV. Rechts: Einfügen der 3'-T-Überhänge

#### Ligation des T-Vektors

Die Reaktion wurde laut Tabelle 2.4 angesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Es wurden 2 µl des Ligationsansatzes in elektrokompetente *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert, die zusätzlich 50 µl X-Gal (4% in DMF) und 4 µl 1 mM IPTG enthielten. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37 °C wurden weiße Kolonien isoliert und die Plasmid-DNA mittels Plasmid Mini-Prep Kit (Jena Bioscience) präpariert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Biotech in Martinsried.

Tabelle 2.4: Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA

Volumen	Komponente
$100\mathrm{ng}$	T-Vektor
$150\mathrm{ng}$	Insert $(850 \text{ bp})$
$2\mu l$	T4-Puffer $(10 \text{ x})$
$0,5\mu l$	T4-DNA-Ligase (400 cohesive end units/ $\mu l)$
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

#### Subklonierung in pET-28a

Vektor- und Insert-DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Tabelle 2.5 versetzt und geschnitten. Der passende Puffer für eine doppelte Spaltung wurde nach Tabellen des Herstellers gewählt. Anschließend wurden die DNA-Stücke mittels Agarosegelelektrophorese getrennt, ausgeschnitten und mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt. Die Desphosphorylierung der 5'-Enden der Vektor-DNA erfolgte mittels Alkalischer Phosphatase bei 37 °C für eine Stunde. Die Ligation wurde nach Tabelle 2.4 durchgeführt.

Tabelle 2.5: Restriktionsendonukleolyse von Vektor- und Insert-DNA

Volumen	Komponente
$3\mu{ m g}$	DNA
$1  \mu l$	Restriktions endonuklease 1 (10 U/ $\mu l)$
1 µl	Restriktions endonuklease 2 (10 U/ $\mu l)$
$5\mu l$	NEBuffer
$5  \mu l$	BSA (10 x, bei Bedarf)
ad 50 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

# 2.3 Proteinchemische Methoden

#### 2.3.1 Expression von PPAR $\alpha$

Wenn nicht anders beschrieben, entspricht die Abkürzung "PPAR $\alpha$ " der Ligandenbindungsdomäne des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha.

Das Expressionsplasmid wurde chemisch in *E. coli* BL21 DE3 CodonPlus RIL (Merck Novagen, Darmstadt) transformiert und auf LB-Kanamycin-Agarplatten selektiert. Auf Basis einer 100 ml-Vorkultur frisch transformierter *E. coli*-Zellen in TB-Medium wurde eine 1 l-Kultur Medium auf eine  $OD_{595}$  von 0,08 inokuliert und bei 37 °C bis zu einer  $OD_{595}$  von 0,9 bei kultiviert. Nun wurden die Zellen auf Eiswasser auf ca. 18 °C gekühlt

und mit IPTG zu einer Endkonzentration von  $0, 1 \,\mathrm{M}$  induziert. Die Expression erfolgte über Nacht für 20 h bei  $18 \,^{\circ}$ C.

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet (3 000xg, 10 min), in 25 ml Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß erfolgte mittels Ultraschall (50 W, 2 min, 4 °C). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (45000xg, 40 min) abgetrennt. Der Überstand wurde unmittelbar danach für die chromatographische Reinigung des Proteins mittels Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) verwendet.

## 2.3.2 Expressionstest der PPAR aBpa-Mutanten

Das Expressionsplasmid der gewünschten PPAR $\alpha$ Bpa-Mutante wurde zusammen mit dem Plasmid pEvol-pBpF (Kapitel 2.1.8) in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und in 5 ml TB-Medium eine Vorkultur hergestellt. Die Expressionsbedingungen entsprachen weitgehend dem Protokoll des PPAR $\alpha$ -Wildtyps (Kapitel 2.3.1) – die Expressionstests wurden in 20 ml-Kulturen Bpa-TB-Medium durchgeführt.

Nach gewünschten Expressionzeiten (2, 18, 22, 25 h) wurden aus der Kultur Volumina in Millilitern abgenommen und pelletiert, die dem Reziprokwert der  $OD_{595}$  der *E. coli*-Kultur entsprachen. Das Pellet wurde einmal mit 200 µl 20 mM Tris (pH 8) gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100 µl Lyse-Puffer Ex resuspendiert und für 10 min bei maximaler Schüttlerfrequenz geschüttelt. Anschließend wurden 7 µl dieses Gesamtlysates abgenommen. Der verbliebene Rest wurde pelletiert (45 000xg, 20 min) und 7 µl des Überstandes abgenommen. Zur Präparation der Einschlußkörper (*Inclusion bodies*) wurde das Pellet in 100 µl Harnstoff-Puffer für 15 min bei maximaler Schüttlerfrequenz geschüttelt und davon 7 µl abgenommen.

Die einzelnen Fraktionen des Expressionstests wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE und Western Blots analysiert.

#### 2.3.3 Reinigung von PPAR $\alpha$

Die Proteinreinigung wurde an einem ÄKTA-FPLC-System (GE Healthcare) durchgeführt. Nach Zellaufschluß wurden die löslichen Bestandteile sterilfiltriert, zur affinitätschromatographischen Reinigung auf eine 1 ml-HisTrapFF-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und über 10 Säulenvolumina mit IMAC-Puffer A gewaschen. Es wurde mittels eines linearen Gradienten über 20 Säulenvolumina bis 100 % IMAC-Puffer B bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Die Detektion erfolgte bei 280 nm.

PPAR $\alpha$  enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und mittels einer 10 ml-HiTrap-Entsalzungssäule (GE Healthcare) in AEX-Puffer A umgepuffert. Die so entsalzten Fraktionen wurden zur Anionenaustauschchromatographie auf eine 1 ml-HiTrap Q HP-Säule (GE Healthcare) aufgetragen, über 10 Säulenvolumina mit AEX-Puffer A gewaschen und schließlich mittels eines linearen Salzgradienten über 20 Säulenvolumina bis 100 % AEX-Puffer B bei einer Flußrate von 2 ml/min eluiert. Das Protein wurde bei einer Endkonzentration von 2 mg/ml aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Reinheit von PPAR $\alpha$  wurde sowohl per SDS-PAGE als auch massenspektrometrisch überprüft.

#### 2.3.4 SDS-PAGE

Die SDS-Gele für die Geleektrophorese apparatur Mini Protean TetraCell (Bio-Rad, München) wurden nach Tabelle 2.6 hergestellt. Das Trenngel wurde zwischen die Gelplatten gegossen, mit MilliQ-H<sub>2</sub>O überschichtet und ca. 30 min polymerisiert.

Die Geloberfläche wurde dreimal mit MilliQ- $H_2O$  gewaschen, das Sammelgel darübergegossen und die Probenkämme eingesteckt. Nach ca. 45 min war die Polymerisation beendet. Zur Lagerung wurden die fertigen Gele in feuchte, fusselfreie Tücher eingeschlagen, in einer Plastiktüte verpackt und im Kühlschrank maximal eine Woche lang gelagert.

Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Puffer vermischt (1:1 (v/v)) und davon maximal 20 µl in eine Probentasche geladen. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte für 15 min bei 100 V und 35 – 45 min bei 200 V.

2 Gele	Trenngel $12\%$	Sammelgel 5%
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40 $\%~(v/v)$	$3000  \mu l$	625 μl
$1,5\mathrm{M}$ Tris-HCL, pH 8,8	$2500\mu l$	
$0,5\mathrm{M}$ Tris-HCL, pH 6,8		$1250\mu l$
$\rm MilliQ\text{-}H_2O$	$4340\mu l$	3040 µl
10% (v/v) SDS	100 µl	50 µl
TEMED	20 µl	10 µl
10% (v/v) APS	100 µl	$25\mu l$

Tabelle 2.6: Zusammensetzung  $12\,\%$ iger Trenngele und  $5\,\%$ iger Sammelgele.

## 2.3.5 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE getrennten Proteine wurden in einem Semi-Dry-Transfersystem (Trans-Blot SD cell, Bio-Rad) laut Herstellerprotokoll auf eine PVDF-Membran transferiert. Es folgten drei zehnminütige Waschschritte mit PBS-Puffer. Zur Immundetektion wurde der primäre Antikörper Anti-His<sub>6</sub> (monoklonal, *Maus*, Roche) 1:10000 verdünnt in PBS-Puffer eingesetzt, der zum Blocken unspezifisch bindender Proteine 1% Milchpulver enthielt. Als sekundärer Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion wurde der HRP-konjugierte Antikörper IgG vom Kaninchen (Roche) 1:20000 verdünnt verwendet.

#### 2.3.6 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff

Fixierlösung:	40% (v/v) MeOH, $10%$ (v/v) Essigsäure
Färbelösung:	2% (v/v) Lösung A, $98%$ (v/v) Lösung B
	Lösung A: 5 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 in MilliQ-H2O
	Lösung B: 2 % (w/v) $ortho\mbox{-}Pho\mbox{-}pho\mbox{-}säure, 20 \% (w/v) (\rm NH_4)_2 SO_4$ in
	$\rm MilliQ-H_2O$
Entfärben:	$\rm MilliQ-H_2O$

Die Färbelösung wurde 4 h vor dem Einsatz hergestellt und auf einen Schüttler gestellt.

Die Gele wurden mit MilliQ- $H_2O$  gewaschen und 1 h in der Fixierlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Fixierlösung abgegossen und durch 25 ml Färbelösung pro Gel ersetzt und über Nacht geschwenkt. Die Entfärbung erfolgte durch Schwenken der Gele in MilliQ- $H_2O$  [171].

## 2.3.7 Chemisches Cross-Linking

Pro Cross-Linking-Ansatz wurden die Stammlösungen von PPAR $\alpha$  (1 mg/ml) und entsprechenden Liganden (5 mM in DMSO) mit 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 10 % (v/v) Glycerol (pH 8,0) auf 1 ml aufgefüllt, so daß sich eine Endkonzentration der Interaktionspartner von 10  $\mu$ M einstellte. Zum Äquilibrieren des Protein-Ligand-Komplexes wurden die Reaktionsmischungen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente ohne Ligand durchgeführt.

Die Cross-Linker-Stammlösungen (200 mM in DMSO) wurden unmittelbar vor Beginn der Cross-Linking-Reaktion hergestellt. Zum Start der Cross-Linking-Reaktionen wurden die entsprechenden Stammlösungen in einem 50-, 100- bzw. 200-fachen molaren Überschuß im Vergleich zum Protein-Ligand-Komplex zugegeben. Zu definierten Reaktionszeiten von 5, 15, 30, 60 und 120 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 200  $\mu$ l-Aliquots in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Reaktion wurde mit NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Endkonzentration 20 mM) beendet. Die Proben wurden entweder weiterverarbeitet (SDS-PAGE und/oder proteolytische Spaltung) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.8 In-Lösungs-Spaltung

Es wurde eine Lösung aus ca.  $2 \mu g$  Proteinprobe in  $50 \mu l$  Proteasepuffer (200 mM  $NH_4HCO_3$ , 2 M Harnstoff) hergestellt. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden 5  $\mu l$  einer 10 mM DTT-Lösung zugegeben und bei 60 °C für 15 min inkubiert. Die Alkylierung des Proteins erfolgte im Dunkeln für 15 min bei Raumtemperatur unter Zugabe von 5  $\mu l$  einer 50 mM Iodacetamid-Lösung. Trypsin (Stammlösung: 1  $\mu g$  Trypsin in 2  $\mu l$  1 mM HCl) wurde im Verhältnis 1:80 (Enzym:Substrat (w/w)) zugegeben. Die Proteo-

lyse erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Peptidgemische wurden im Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von ca. 20  $\mu$ l eingeengt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.3.9 In-Gel-Spaltung

Für die proteolytische *In-Gel*-Spaltung wurden folgende Lösungen vorbereitet: Die Reduktions- und Entfärbelösungen wurden frisch hergestellt. Die Aliquots der Trypsin-Stammlösung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

Entfärbelösungen:	Lösung E1: 50 % (v/v) ACN in MilliQ-H_2O
	Lösung E2: ACN
	Lösung E3: 100 mM $\rm NH_4HCO_3$
Reduktionspuffer:	$10\mathrm{mM}$ DTT in $100\mathrm{mM}$ $\mathrm{NH}_4\mathrm{HCO}_3$
Alkylierungspuffer:	$55\mathrm{mM}$ Iodacetamid in $100\mathrm{mM}$ $\mathrm{NH_4HCO_3}$
Stammlösung Trypsin:	$1\mu{\rm g}$ Trypsin in $2\mu{\rm l}$ $1{\rm mM}$ HCl pro Aliquot
Proteolysepuffer:	$50\mathrm{mM}$ $\mathrm{NH}_4\mathrm{HCO}_3,$ pH 7,8
Extraktionslösung:	$50\%$ (v/v) ACN/5 $\%$ (v/v) TFA in MilliQ-H_2O

Die mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten Gele wurden zweimal mit MilliQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Gelbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Würfel von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zum Entfärben wurden die Gelstücke einmal mit 100  $\mu$ l MilliQ-H<sub>2</sub>O, zweimal mit je 100  $\mu$ l der Lösung E1 gewaschen und jeweils 10 min geschüttelt. Die Überstände wurden nach jedem Waschschritt verworfen. Nun wurden 80  $\mu$ l der Lösung E2 zugegeben, 5 min geschüttelt und die Überstände verworfen. Danach wurden 80  $\mu$ l der Lösung E3 zugegeben, 5 min geschüttelt telt, dann 80  $\mu$ l der Lösung E2 zugegeben, weitere 10 min geschüttelt und schließlich alle Überstände verworfen. Schlußendlich wurden die Gelstücke im Vakuumkonzentrator getrocknet.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurden die trockenen Gelstücke in  $80 \,\mu$ l Reduktionspuffer gequollen und bei 56 °C für 45 min inkubiert. Danach wurden die Überstände

entfernt und durch 80  $\mu$ l Alkylierungspuffer ersetzt. Die Alkylierung erfolgte bei Raumtemperatur 45 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Überstände entfernt und die Gelstücke erneut unter Zugabe von 80  $\mu$ l der Lösung E2 gewaschen. Nach 5 min Schütteln wurden 80  $\mu$ l der Lösung E3 zugegeben, weitere 10 min geschüttelt und die Überstände verworfen. Zum Schluß wurden die Gelstücke im Vakuumkonzentrator getrocknet.

Zur Proteolyse wurden die Trypsin-Aliquots mit Proteolysepuffer auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Die Gelstücke wurden auf Eis für 30 min in je 5  $\mu$ l dieser Trypsin-Lösung gequollen. Anschließend wurden die Gelstücke mit Proteolysepuffer überschichtet und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Zur Extraktion der Peptide wurde die Proteolyse mit 50  $\mu$ l Extraktionslösung beendet, 10 min geschüttelt und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Zum Schluß wurden die vereinigten Überstände im Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von ca. 20  $\mu$ l eingeengt. Die Peptidgemische wurden bei Bedarf schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

## 2.4 Massenspektrometrische Methoden

#### 2.4.1 Lineare MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Intakte, quervernetzte Proteinproben wurden mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Ultraflex III) im linearen Meßmodus analysiert. Die Proteinproben wurden nach der Cross-Linking-Reaktion mit ZipTip-C4-Säulen (Millipore) nach Herstellerprotokoll entsalzt. Die Probenpräparation erfolgte nach der Doppelschichtmethode mit Sinapinsäure (SA). Folgende gesättigte Matrixlösungen wurden frisch hergestellt:

Matrixlösung 1:	SA in EtOH
Matrixlösung 2:	SA in 30 % (v/v) ACN, $0,1$ % (v/v) TFA in MilliQ-H <sub>2</sub> O

Der MALDI-Probenteller wurde mit einem dünnen Film der Matrixlösung 1 überzogen. Anschließend wurde je 1  $\mu$ l Proteinprobe (ca. 5 pmol) mit 1  $\mu$ l Matrixlösung 2 vermischt und davon 1  $\mu$ l auf den Probenteller aufgetragen. Es wurde ein selbst hergestellter Pro-

Protein	Signal	m/z	Peptid	$[{ m M}+{ m H}]^+$ bei $m/z$
Insulin	$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+$	5735	Angiotensin I	1046,5418
Cytochrom C	$[\mathrm{M}+2\mathrm{H}]^{2+}$	6181	Angiotensin II	1296,6848
Myoglobin	$[\mathrm{M}+2\mathrm{H}]^{2+}$	8477	Substance P	1347,7354
Ubiquitin I	$[M + H]^+$	8566	Bombesin	1619,8223
Cytochrom C	$[M + H]^+$	12361	ACTH clip 1–17	2093,0862
Myoglobin	$[M + H]^+$	16952	ACTH clip 18–39	2465,1983
			Somatostatin 28	3147,4710

 Tabelle 2.7: Verwendeter Proteinkalibrationsstandard f
 ür die MALDI-TOF-Massenspektrometrie im linearen

 Modus (links) und verwendeter Peptidkalibrationsstandard im Reflektronmodus (rechts).

teinkalibrationsstandard verwendet (siehe Tabelle 2.7 links).

Die MALDI-TOF-MS-Messungen (Ultraflex III) wurden bei positiver Ionisation durchgeführt. Pro Probenplatz ("Spot") wurden 2000 Laserschüsse im Bereich m/z 5000–50000 zu einem Spektrum akkumuliert.

#### 2.4.2 Offline-Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Die Peptidproben wurden mittels Nano-HPLC (Ultimate 3000) bei einer Flußrate von 300 nl/min getrennt und anhand ihrer UV-Absorption bei 214 nm und 280 nm detektiert. Das Nano-HPLC-System wurde *offline* mit einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Ultraflex III, Bruker Daltonik, Bremen) gekoppelt. Folgende Fließmittel wurden verwendet:

Fließmittel A:	$5\%$ (v/v) ACN, $0,05\%$ (v/v) TFA in MilliQ-H_2O
Fließmittel B:	$80\%~(v/v)$ ACN, $0,04\%~(v/v)$ TFA in MilliQ-H $_2O$

Die Peptidgemische aller Proteinproben wurden mittels eines automatischen Probengebers in eine 200  $\mu$ l-Probenschleife injiziert und nach dem Äquilibrieren des HPLC-Systems mit 95 % (v/v) Fließmittel A auf eine Vorläule geladen (Acclaim PepMap, C18, 300  $\mu$ m x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex). Zur Entsalzung wurde 15 min mit 95 % (v/v) Fließmittel A gewaschen. Die proteolytischen Peptidgemische wurden auf einer Trennsäule (Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 150 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex) mittels eines linearen Gradienten über 60 min getrennt: 0 – 60 min: 5 – 50 % (v/v) B; 60 – 62 min: 50 – 100 % (v/v) B; 62 – 67 min: 100 % (v/v) B; 67 – 72 min: 5 % (v/v) B.

Eluierende Peptide wurden in 18 s-Fraktionen mit Hilfe eines Pipettierroboters (Proteineer fc) mit 1, 1 µl Matrixlösung (0, 8 mg/ml HCCA in 90 % (v/v) ACN, 0, 1 % (v/v) TFA, 1 mM  $\mathrm{NH}_4\mathrm{H}_2\mathrm{PO}_4$ ) gemischt und direkt auf einen MALDI-Probenteller (AnchorChip 384 MTP 800 µm) aufgetropft.

Für die Trennung der tryptischen Munc 13-1-Peptide wurde das Protokoll leicht verändert: Die Elutionszeit wurde auf 30 min verkürzt und die Fraktionen wurden in 30 s-Schritten auf den MALDI-Probenteller aufgetropft. Die Steuerung des Nano-HPLC-Systems, der UV-Datenaufnahme und des Fraktionssammlers erfolgte mittels der Software Hystar 3.2.

Die MALDI-TOF/TOF-MS(/MS)-Analysen wurden bei positiver Ionisation im Reflektronmodus durchgeführt. Zur Aufnahme der Übersichtsspektren wurden bei einer Laserfrequenz von 100 Hz 2000 Laserschüsse pro Probenplatz im Bereich m/z 800–5000 zu einem Spektrum akkumuliert. Die Kalibrierung der Massenspektren erfolgte extern mittels einer Standardpeptidmischung (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonik, Tabelle 2.7 rechts). Die monoisotopischen Massensignale mit einem Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) > 2 wurden automatisch nach dem SNAP-Algorithmus (Sophisticated Numerical Annotation Procedure) durchgeführt. Pro Probenplatz wurden die 7 Signale mit der höchsten Intensität und einem S/N > 30 für eine Laser-induzierte Fragmentierung (LID) ausgewählt. Hierbei wurde berücksichtigt, daß Signale innerhalb einer Elutionszeit von 1,5 min und einer relativen Massenabweichung von 10 ppm nur einmal bei maximaler Intensität fragmentiert werden.

Im MS/MS-Modus wurden pro Probenplatz bei einer Laserfrequenz von 200 Hz 600 Laserschüsse zur Messung des intakten Vorläuferions aufgenommen. Ein vorzeitiger Abbruch erfolgte, wenn ein S/N von 30 nicht erreicht wurde. Für Fragmentionenspektren wurden weitere 1800 Lasserschüsse bei 50 % höherer Laserleistung akkumuliert. Die prozessierten Spektren wurden anhand des m/z des Vorläuferions kalibriert und mittels SNAP-Algorithmus S/N > 2 annotiert. Sämtliche MS- und MS/MS-Daten wurden nach Probenplätzen sortiert zu einer Gesamtdatei zusammengeführt. Die Software WarpLC 1.2 koordinierte die Software zur Datenaufnahme (Flex Control 3.3) und Datenprozessierung (Flex Analysis 3.3).

Zur Analyse MS-spaltbarer Cross-linker wurden manuell *In-Source Decay-*MS/MS (ISD-MS/MS)-Experimente durchgeführt, indem die Laserenergie relativ zur klassischen LID-MS/MS um ca. 10% erhöht wurde.

#### 2.4.3 Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie

Die Peptidmischungen wurden mittels Nano-HPLC (Ultimate) bei einer Flußrate von 300 nl/min getrennt und mittels ihrer UV-Absorption bei 214 nm detektiert. Das Nano-HPLC-System wurde direkt mit einer Nano-ESI-Quelle (Proxeon) eines LTQ-Orbitrap XL Hybrid-Massenspektrometers gekoppelt (Thermo Fisher Scientific).

Zur Trennung der Peptidmischungen wurden folgende Fließmittel wurden verwendet:

Fließmittel A:	5% (v/v) ACN, $0,1%$ (v/v) FA
Fließmittel B:	80% (v/v) ACN, $0,1% (v/v)$ FA

Die Peptidgemische aller Proteinproben wurden mittels automatischem Probengeber in eine 200 µl-Probenschleife injiziert und nach dem Äquilibrieren des HPLC-Systems mit 95 % (v/v) Fließmittel A auf eine Vorläule geladen (Acclaim PepMap, C18, 300 µm x 5 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex). Zur Entsalzung wurde 15 min mit 95 % (v/v) Fließmittel A gewaschen. Die proteolytischen Peptidgemische wurden auf einer Trennsäule (Acclaim PepMap, C18, 75 µm x 250 mm, 5 µm, 100 Å, Dionex) mittels eines linearen Gradienten über 90 min getrennt: 0 – 90 min: 1 – 50 % (v/v) B; 90 – 91 min: 50 – 100 % (v/v) B; 91 – 102 min: 100 % (v/v) B; 102 – 117 min: 1 % (v/v) B.

Zur Kalibration wurde eine nach Herstellerprotokoll gemischte LTQ Calibration Solution (Thermo Fisher Scientific), bestehend aus Stammlösungen von Coffein, dem Peptid MRFA-acetat und dem Polysiloxan Ultramark 1621, verwendet. Als Referenzmasse ("Lock"-Masse) wurde das Signal m/z 445,120025 des Polydimethylcyclosiloxans  $[Si(CH_3)_2O]_6H^+$  gesetzt.

Die Modellpeptide Substanz P und LHRH wurden ohne Nano-HPLC-Trennung manuell per Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert. Die entsalzten Peptidgemische wurden in metallbeschichtete Borsilikat-Emitter (Proxeon, Odense) präpariert. Alle Massenspektren (MS,  $MS^n$ ) wurden in der Orbitrap bei einer Auflösung von  $R = 100\ 000$  analysiert. Ausgewählte Signale wurden in der LTQ isoliert und mittels CID fragmentiert, wobei die relative Fragmentierungsenergie zwischen 25 % und 40 % variierte. Sämtliche in dieser Arbeit dargestellten  $MS^n$ -Daten wurden mittels CID bei einer relativen Fragmentierungsenergie von 35 % erzeugt (Abbildung 2.2 A).

Nano-HPLC-gekoppelte Massenspektren wurden über 122 min registriert: Hierzu wurde ein Massenspektrum bei einer Auflösung von R = 60 000 (m/z 400) in einem Massenbereich m/z 300 – 2000 aufgenommen (Abbildung 2.2 B). Datenabhängig wurden die drei höchsten Signale in der LTQ isoliert, mittels CID fragmentiert (relative Fragmentierungsenergie 35%) und bei einer Auflösung von R = 15 000 (m/z 400) in der Orbitrap analysiert. Zur korrekten Bestimmung der Ladungszahl wurde ein Extraktionsfenster von  $\pm 1,5$  u gewählt. Bereits fragmentierte Signale wurden für 180 s auf eine dynamische Ausschlußliste gesetzt, um auch weniger abundante Ionen eines Massenspektrums zu fragmentieren. Bei der Verwendung spaltbarer Cross-Linker wurden die drei höchsten Signale der MS/MS-Daten erneut in der LTQ isoliert, mittels CID (relative Fragmentierungsenergie 35%) fragmentiert und in der LTQ analysiert. Ein Schema dieser MS-Methode ist in Abbildung 2.2 B1 dargestellt.

Bei der Verwendung des MS-spaltbaren Harnstoff-Reagenzes wurde alternativ eine Neutralverlust-Methode erstellt (Abbildung 2.2 B2). Die Neutralverlustliste "CNL" enthielt alle Fragmentionenmassen des Harnstoff-Reagenzes (Tabelle 3.4 in Kapitel 3.4.4). Von jedem Massenspektrum wurden die drei höchsten Signale in der LTQ isoliert, fragmentiert (CID 35 %) und in der Orbitrap analysiert (R = 15~000 bei m/z~400). Wurden Neutralverluste der Liste "CNL" detektiert, erfolgte eine erneute Isolierung, Fragmentie-



**Abbildung 2.2:** Massenspektrometrische Methoden zur Analytik der Modellpeptide Substanz P und LHRH mittels *offline*-Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS (**A**) und der proteolytischen Spaltpeptide von Munc13-1, Lysozym und PPAR $\alpha$ , die mittels Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert wurden (**B**).

(B1) Je Spektrum wurden die drei Signale mit der höchsten Intensität fragmentiert. Die Zahlen entsprechen der Reihenfolge der einzelnen MS-Scan-Ereignisse. (B2) Spezialfall MS-spaltbares Harnstoff-Reagenz: Datenabhängige MS<sup>3</sup>-Fragmentierung der drei höchsten Signale, wenn die MS<sup>2</sup>-Daten einen Neutralverlust aufweisen, der in einer Neutralverlustliste "CNL" aufgelistet ist. Diese Neutralverluste entsprechen Fragmenten des Harnstoff-Reagenzes, wobei die Ladungszahlen von z=2 bis z=5 berücksichtigt wurden: 85 u, 102 u, 103 u, 128 u, 129 u. Siehe Tabelle 3.4 in Kapitel 3.4.4.

rung (CID 35%) und Detektion der drei höchsten Signale in der LTQ.

Die Datenakquisition wurde mittels XCalibur 2.07 und DCMS link 2.0 kontrolliert.

#### 2.4.4 Identifizierung von Cross-Linking-Produkten

Aus den Übersichtsspektren wurde mittels Warp-LC (MALDI-TOF/TOF-MS) bzw. Proteome Discoverer (Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS) eine Massenliste erstellt und mittels Excel 2007 dreispaltig aufbereitet. Spalte 1 enthielt die Retentionszeit (MALDI: Spot-Nummer, ESI: "First Scan" -Nummer, Spalte 2 die monoisotopischen Massen  $[M + H]^+$ und Spalte 3 die absolute Intensität der Signale. Diese dreispaltige Liste wurde durch die Analysesoftwaresammlung CoolToolBox [126] innerhalb einer definierten Massenabweichung (MALDI-MS: 50 ppm, ESI-MS: 3 ppm) mit der Massenliste eines virtuellen Cross-Linking-Experiments verglichen. Bei der Verwendung isotopenmarkierter Cross-Linker  $(D_0/D_4)$  wurden Pärchen mit einem Massenabstand von 4 amu zuvor herausgefiltert.

Die MS/MS-Daten möglicher Cross-Linking-Produkte wurden mit theoretischen MS/MS-Daten manuell abgeglichen, die von GPMAW [125] generiert wurden.

Bestätigte Cross-Links in PPAR $\alpha$  wurden anhand einer entsprechenden Röntgenkristallstruktur (pdb 1KKQ) mittels PyMOL [172] überprüft. Die dadurch ermittelten Aminosäureabstände, ausgehend von C $_{\alpha}$ -C $_{\alpha}$  oder N $_{\epsilon}$ -N $_{\epsilon}$ -Abständen (in Lysin), wurden mit der *Spacer*-Länge des eingesetzten Cross-Linkers verglichen.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Klonierung

## 3.1.1 Subklonierung von PPAR $\alpha$ in pET-28a

Zur Konstruktion eines PPAR $\alpha$ -Expressionsplasmids wurde das Plasmid pCMV-PPAR $\alpha$ mit der Aminosäuresequenz 167–468 zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 2.1.8). Diese Variante enthält die PPAR $\alpha$ -Ligandenbindungsdomäne (Aminosäuren 196–468); die *N*-terminalen 29 Aminosäuren stellen eine Verbindung zur DNA-bindenden Domäne dar. Um optimale Expressionsbedingungen zu gewährleisten, wurde sowohl eine PPAR $\alpha$ -Variante<sup>1</sup> mit *N*-terminalem His-Tag als auch mit *C*-terminalem His-Tag hergestellt (Abbildung 3.1 B). Die Aminosäuresequenz entsprach der PPAR $\alpha$ -Ligandenbindungsdomäne (Aminosäuren 196–468, Abbildung 3.1 C). Hierzu wurden die PPAR $\alpha$ -Inserts mittels PCR amplifiziert und dabei die gewünschten Restriktionsschnittstellen durch passende Primer eingefügt (Kapitel 2.2.7). Für die *N*-terminale Variante wurden die Primer "5' Nde PPARa 196" und "3' Xho STOP PPARa" (Kapitel 2.1.7) synthetisiert, um die Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I einzufügen. Für die *C*-terminale Variante wurden die Primer "5' Nco PPARa 196" und "3' Xho PPARa" synthetisiert, um die Restriktionsschnittstellen *Nco*I und *Xho*I einzufügen.

Nach der PCR wurde die Insert-DNA mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen in die Vektor-DNA pET-28a subkloniert. Die Herstellung des Plasmids pMM CHisPPAR $\alpha$ WT (*C*-terminaler His-Tag, Kapitel 2.1.8) war erfolgreich.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Wenn im Text nicht anders erwähnt, entspricht "PPARα" der Ligandenbindungsdomäne des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors alpha, Aminosäuren 196–468.



**Abbildung 3.1:** (A) Klonierungsschema zur Herstellung eines T-Vektors. MCS: Multiple Klonierungsstelle zwischen *Sac*I und *Kpn*I. LacZ:  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase. (B) Ausschnitt der MCS von pET-28a, die das Gen PPAR $\alpha$  196–468 enthält. Die obere Variante enthält einen *N*-terminalen His-Tag, der sich mit Thrombin abspalten läßt. Die unten abgebildete Variante enthält einen *C*-terminalen His-Tag. Hierzu wurde das *C*-terminale Stop-Codon TGA in ein Glycin GGA mutiert. (C) Aminosäuresequenz der PPAR $\alpha$ -Ligandenbindungsdomäne 196–468. Das Met-195 resultiert aus dem Startcodon ATG.

#### 3.1.2 Konstruktion des T-Vektors

Der 3'-Überhang des NHisPPAR $\alpha$ WT-Inserts bestand aus sechs Nukleotiden. Für eine optimale NdeI-Aktivität und -Spezifität war dieser Überhang jedoch zu kurz. Daher wurde aus dem Klonierungsplasmid pBlueScript II SK(+) ein T-Vektor konstruiert (Kapitel 2.2.9, Abbildung 3.1 A), der einen 3'-T-Überhang besitzt [173]. Die Insert-DNA wurde mit der Taq-Polymerase amplifiziert, die automatisch einen 3'-A-Überhang anfügt. Das Ligationsprodukt wurde in chemisch kompetente *E. coli DH5* $\alpha$ -Zellen transformiert, deren Genotyp das  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galactosidase fehlt. Der T-Vektor enthielt dieses Fragment und ermöglichte daher eine Blau/Weiß-Selektion der Ligationsprodukte auf Agarplatten. Es wurden ca. 400 blaue und lediglich 10 weiße Kolonien selektiert. Alle weißen Kolonien enthielten den T-Vektor mit dem NHisPPAR $\alpha$ WT-Insert. Nun gelang die Restriktionsendonukleolyse mit NdeI und das Insert wurde erfolgreich in das Expressionsplasmid pET-28a subkloniert.

# 3.2 Expression und Reinigung der Ligandenbindungsdomäne von PPARα

Zur Expression von PPAR $\alpha$  wurde das Expressionsplasmid in *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup>RIL transformiert, da das PPAR $\alpha$ -Gen zwölf Codons enthält, die *E. coli* nur selten verwendet und daher die Translation gebremst wird. Der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup>RIL ist eine gentechnisch veränderte Variante des *E. coli* K12-Stamms, der zusätzliche tRNAs für einen erweiterten Codongebrauch der Aminosäuren Arg, Ile und Leu enthält. Die Ausbeute an löslichem Protein wurde dadurch erhöht.

Die Zellen wurden in TB-Medium kultiviert, das durch den enthaltenen Phosphat-Puffer einen stabilen pH-Wert gewährleistet. Durch den höheren Gehalt an Trypton und Hefe-Extrakt im Vergleich zum LB-Medium sind höhere optische Dichten möglich. Niedrig konzentriertes IPTG als Induktionsmittel (0, 1 mM statt 1 mM), eine Expressionstemperatur von  $18 \,^{\circ}$ C und eine verlängerte Expressionszeit von 20 h ermöglichten eine langsamere Translation und folglich eine höhere Ausbeute an löslichem Protein.

Nach der Expression wurden die Zellwände enzymatisch mit Lysozym lysiert; die Nukleinsäuren wurden mit Benzonase<sup>®</sup> gespalten. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und der lösliche Überstand wurde mittels Zentrifugation abgetrennt und sterilfiltriert (Porengröße  $0, 45 \,\mu\text{m}$ ). Für die affinitätschromatographische Reinigung wurde eine mit Ni<sup>2+</sup> beladene HisTrap FF-Säule (GE Healthcare) verwendet. Im Gegensatz zur zuvor eingesetzten HiTrap HP-Säule (GE Healthcare) band der His-Tag von PPAR $\alpha$  hier vollständig an die stationäre Phase. Der Puffer, in dem das Protein auf die Säule aufgetragen wurde (IMAC A), enthielt 20 mM Imidazol, um die Wechselwirkung metallbindender Proteinmotive (zum Beispiel Zink-Finger, Metalloproteinmotive) zu reduzieren. PPAR $\alpha$  eluierte bei einer Imidazolkonzentration von  $100 - 150 \,\mathrm{mM}$  (Abbildung 3.2 A). Die Elutionsfraktionen wurden spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert; PPAR $\alpha$ -enthaltende Fraktionen wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE identifiziert und anschließend vereinigt (Abbildung 3.2 B). Statt einer Dialyse erfolgte das Umpuffern in den Puffer für die Anionenaustauschchromatographie (AEX A) chromatographisch unter Verwendung einer 10 ml-HiTrap-Entsalzungssäule (GE Healthcare). Diese Methode ließ sich schneller und unter geringeren Probenverlusten durchführen. Anhand der SDS-Gele ließ sich eine Reinheit des PPAR $\alpha$  von ca. 80% abschätzen.



**Abbildung 3.2:** Affinitätschromatographische Reinigung von PPARα mittels eines *N*-terminalen His-Tags an einer Ni<sup>2+</sup>-beladenen HisTrap FF-Säule. **(A)** FPLC-Chromatogramm (Detektion bei 280 nm). F: Durchfluß (*flow-through*); W: Waschfraktion. Die Fraktionen 3–5 enthalten PPARα. **(B)** SDS-PAGE (12%-Trenngel). M: Molekulargewichtsmarker; P: Pellet; S: Überstand (*supernatant*).

Als zweiter Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Der pH-Wert der verwendeten Puffer (AEX A und B) lag 1,5 Einheiten über dem pI-Wert von PPAR $\alpha$ . Es wurde eine HiTrap Q HP-Säule (GE Healthcare) verwendet, deren kleinere Partikelgröße (34 µm statt 90 µm bei der HiTrap FF-Säule) eine bessere Trennung ermöglichte (Abbildung 3.3 A). PPAR $\alpha$  eluierte bei geringen NaCl-Konzentrationen (30 mM) und wies eine Reinheit von ca. 95 % auf (Abbildung 3.3 B). Bei höheren NaCl-Konzentrationen (100 – 400 mM) eluierten verschiedene *E. coli*-Proteine, wie zum Beispiel das Molekulare Chaperon DnaK und den Transkriptionsterminationsfaktor  $\rho$  (Tabelle 3.1).

Die Reinigung des PPAR $\alpha$  mit C-terminalem His-Tag erfolgte analog.



**Abbildung 3.3:** Anionenaustausch-Chromatographie zur Reinigung von PPAR $\alpha$  mit *N*-terminalem His-Tag mittels einer 1 ml-HiTrap Q HP-Säule. (A) FPLC-Chromatogramm (Detektion bei 260 nm und 280 nm). Die Fraktionen 1–3 enthalten PPAR $\alpha$ . (B) SDS-PAGE (12%-Trenngel). M: Molekulargewichtsmarker; D: nach Entsalzung; F: Durchfluß (*flow-through*); W: Waschfraktion.

Tabelle 3.1: Kontaminierende E. coli-Proteine, die mittels Anionenaustausch-Chromatographie (Abbildung
3.3 B, Gelspuren 2 und 3) von PPAR $\alpha$ abgetrennt wurden. Die Proteine wurden mittels MALDI-TOF/TOF-
MS (Peptidmassenfingerprintanalyse) identifiziert. Die MS/MS-Daten aller Peptide wurden mit der NCBI-
Datenbank verglichen.

	Gelbande		Anzahl der
Protein (E. coli)	(Abb. 3.3 B)	NCBI-Eintrag	ident. Peptide
β-Carboanhydrase	А	gi 14277936	4
$\label{eq:formulation} Formyltetrahydrofol at deformylase$	В	gi 24112628	4
DAHP-Synthase	С	gi 23200234	6
${\rm Imidazolgly cerol phosphat dehydratase}$	D	gi 83588023	6
Transkription sterminations faktor $\rho$	Е	gi 15804373	3
Molekulares Chaperon DnaK	F	gi 15799694	10
$\beta$ -Carboanhydrase	G	${ m gi} 14277936$	3
Transkription sterminations faktor $\rho$	Н	gi 15804373	14
Hypothetisches Protein b2255	Ι	gi 16130190	4
Molekulares Chaperon DnaK	Κ	gi 15799694	3

# 3.3 Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Chemisches Cross-Linking eignet sich als Methode, um Konformationsänderungen von Proteinen nach Ligandenbindung zu verfolgen. Um die Machbarkeit des Konzeptes zu überprüfen, wurde die Röntgenkristallstruktur von PPAR $\alpha$  in Gegenwart des Antagonisten GW6471 (pdb 1KKQ [27]) zu Grunde gelegt. Weitere Cross-Linking-Experimente wurden in Gegenwart eines potentiellen Agonisten YS81 (ein Pyrinixinsäurederivat [174]) durchgeführt. Für Kontrollexperimente wurde freies PPAR $\alpha$  verwendet (Abbildung 3.4 A).

PPAR $\alpha$  wurde mit einem *N*-terminalen His-Tag exprimiert und gereinigt. Anschließend wurde das Protein für 30 Minuten mit dem Liganden (Antagonist GW6471 oder Agonist YS81) inkubiert, um den Komplex zu stabilisieren. Danach wurden die aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzien BS<sup>2</sup>G und BS<sup>3</sup> zugegeben, welche eine Distanz von ca.



**Abbildung 3.4:** (A) PPAR $\alpha$ -Antagonist GW6471 [27] und ein potentieller PPAR $\alpha$ -Agonist YS81 [174]. (B) Gelelektrophoretische Trennung der Cross-Linking-Reaktionsansätze verschiedener PPAR $\alpha$ /Liganden- Komplexe nach 60 min Reaktionszeit (200 pmol pro Gelspur). M: Molekulargewichtsmarker;  $\alpha$ : PPAR $\alpha$  vor dem Cross-Linking-Experiment; –: Cross-Linking des freien PPAR $\alpha$  ohne Ligand; 1: Cross-Linking in Gegenwart des Antagonisten GW6471; 2: Cross-Linking in Gegenwart des potentiellen Agonisten YS81.

7,7 Å bzw. 11,4 Å zwischen den reaktiven Stellen überbrücken. Die Reagenzien wurden in einem 1:1-Gemisch nicht-deuterierter  $(D_0)$  bzw. vierfach-deuterierter  $(D_4)$  Derivate eingesetzt, um die Cross-Linking-Produkte in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse anhand ihres charakteristischen Isotopenmusters einfacher zu identifizieren (Tabelle 1.1).

Die Cross-Linking-Reaktionsprodukte wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 3.4 B). Neben den 32 kDa großen PPAR $\alpha$ -Monomeren wurden die quervernetzten Homodimere (64 kDa) und -trimere (96 kDa) detektiert, welche durch Röntgenkristallstrukturen bereits bestätigt worden waren [27]. Eine schwache Bande bei ca. (75 kDa) entspricht einer Überlagerung der Homodimer- und -trimerbanden. Im Vergleich zur Referenzbande des unmodifizierten PPAR $\alpha$  (3.4 B, Spur " $\alpha$ ") sind die Banden durch die Cross-Linker-Modifizierungen diffuser geworden. Eindeutige ligandenabhängige Unterschiede ergeben sich aus der SDS-PAGE allerdings nicht.

Die Gelbanden der PPAR $\alpha$ -Monomere wurden ausgeschnitten und mit Trypsin und/oder AspN proteolytisch gespalten. Die komplexen Peptidgemische wurden mittels Nano-HPLC getrennt und entweder *offline* gekoppelt per Matrixunterstützter Laserdesorption/Ionisation-(MALDI)-Flugzeit/Flugzeit-(TOF/TOF)-Massenspektrometrie oder *online* gekoppelt per Nano-Elektrospray-(ESI)-Linearer-Ionenfallen-(LTQ)-Orbitrap-Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 1.12). Die erhaltenen Massenlisten wurden nach 4-amu-Massenabständen gefiltert. Sämtliche Cross-Linking-Produkte wurden durch MS/MS-Daten bestätigt.

Die Quervernetzung von Lys-349 und Lys-449 wurde sowohl in freiem PPAR $\alpha$  als auch in beiden PPAR $\alpha$ /Ligand-Komplexen lokalisiert (Abbildung 3.5)<sup>2</sup>. Der intrapeptidale Cross-Link zwischen Lys-204 und Lys-208 (Abbildung Anhang A.1 B) wurde in Komplexen mit Antagonist GW6471, Agonist YS81 und freiem PPAR $\alpha$  identifiziert und bestätigt die gute Zugänglichkeit der exponierten, *N*-terminalen Helix 1.

Die wenigsten Cross-Linking-Produkte wurden in freiem PPAR $\alpha$  gefunden und bestätigen die Annahme, daß der freie PPAR hochflexibel ist (Tabelle 3.2). Sobald Liganden die große Bindungstasche (Abbildung 3.6) ausfüllen, wird die Struktur stabilisiert.

Die größten Unterschiede an identifizierten Cross-Links wurden im PPAR $\alpha$ /GW6471-Komplex beobachtet: Der große überbrückte Abstand zwischen Lys-222 und Lys-449 (m/z 1379,7401) unterstützt die Bedeutung der Aktivierungsfunktionshelix AF2 (Aminosäuren 458–467, Abbildung 3.6). Im Falle einer Bindung des Antagonisten wird ein Konformationswechsel induziert, indem AF2 den Eingang der Bindungstasche nach dem Mausefallenprinzip verschließt. Das Lys-449 befindet sich in unmittelbarer Nähe der AF2 und gelangt durch den Konformationswechsel in räumliche Nähe zu Lys-222. Dieser Cross-Link wurde nur mit dem längeren Reagenz BS<sup>3</sup> (11, 4 Å) gefunden, jedoch nicht mit BS<sup>2</sup>G (7, 7 Å), wodurch sich die erhaltene Distanzbeschränkung genauer eingrenzen läßt.

Eine zweite weite Distanz wurde zwischen Lys-252 und Lys-449 mit beiden Cross-Linkern überbrückt und untermauert das Zusammenspiel zwischen der AF2 und der hochflexiblen  $\Omega$ -Schlaufe bei der Bindung des Antagonisten (Abbildung 3.6). Der hochflexible Bereich der  $\Omega$ -Schlaufe wurde in Röntgenkristallstrukturen nicht aufgelöst [33].

Neben den quervernetzten Lysinen wurde eine große Anzahl an Lysinen mit hydro-

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Im Interesse einer originalgetreuen Darstellung der Massenspektren wurde die englische Spektrenbezeichnung beibehalten.



**Abbildung 3.5:** Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analyse eines Cross-Linking-Produktes von PPAR $\alpha$ in Gegenwart des Antagonisten GW6471. **(A)** Ausschnitt eines hochaufgelösten Massenspektrums eines BS<sup>3</sup>-Cross-Linking-Produktes mit einem charakteristischen  $D_0/D_4$ -Isotopenmuster. Die Ionen wurden bei einer Auflösung von R = 60 000 in der Orbitrap analysiert. **(B)** In der linearen Ionenfalle (LTQ) analysierte Fragmentionen (durch CID-MS/MS in der LTQ gebildet) des doppelt geladenen intramolekularen Cross-Linking-Produktes (*m*/*z* 576,7838). Das Lys-349 in PPAR $\alpha$  ist mit Lys-449 quervernetzt.

lysierten Cross-Linkern modifiziert. Diese liefern zwar keine direkte strukturelle Information über PPAR $\alpha$ , jedoch geben sie Hinweise über die Oberflächenzugänglichkeit des Proteins. In exponierter Lage befindliche Lysine wurden in allen untersuchten PPAR $\alpha$ -Komplexen modifiziert, zum Beispiel Lys-252 auf der  $\Omega$ -Schlaufe (Abbildung A.1 A). Allerdings wurde je nach Proteinkonformation (mit oder ohne Ligand) ein unterschiedliches Muster an Lys-Modifizierungen gefunden. Mit dem kürzeren BS<sup>2</sup>G (7,7Å) wurden mehr Lysine modifiziert als mit dem längeren BS<sup>3</sup> (11,4Å). Beispielsweise wurden ausschließlich im PPAR $\alpha$ /GW6471-Komplex Lys-299 und Lys-425 mit hydrolysiertem BS<sup>2</sup>G modifiziert gefunden. Das Lys-222 wurde nur im PPAR $\alpha$ /YS81-Komplex mit hydrolysiertem BS<sup>2</sup>G modifiziert (Tabelle 3.3).

Eine vollständige Liste aller PPAR $\alpha$ -Peptide, die mit hydrolysierten Cross-Linkern BS<sup>2</sup>G und BS<sup>3</sup> modifiziert wurden, befindet sich im Anhang A.1.

Die Interaktionsstudie des Komplexes aus PPAR $\alpha$  und dem potentiellen Agonisten

**Tabelle 3.2:** Interpeptidale Cross-Linking-Produkte der PPAR $\alpha$ /GW6471- und PPAR $\alpha$ /YS81-Komplexe mit den aminreaktiven,  $D_0/D_4$ -isotopenmarkierten Cross-Linkern BS<sup>3</sup> und BS<sup>2</sup>G. XL: Cross-Linker. Alle Massen sind für  $D_0$ -Cross-Linking-Produkte angegeben.  $\Delta$ m: Massenabweichung zwischen theoretischer und experimenteller Masse.

		$\Delta \mathrm{m}$				vernetzte
$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{exp}}$	$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{theor}}$	[ppm]	Ligand	XL	Sequenz	Aminosäuren
1152,5601	$1152,\!5605$	0,3	_	$BS^3$	KPFC   KTES	K349, K449
$1152,\!5600$	$1152,\!5605$	$0,\!4$	GW6471	$BS^3$	KPFC   KTES	K349, K449
1152,5600	$1152,\!5605$	$0,\!4$	YS81	$BS^3$	KPFC   KTES	K349, K449
1379,7401	1379,7352	$_{3,4}$	GW6471	$BS^3$	NFNMNKVK   KT	K222, K449
1389,7843	1389,7835	$0,\!6$	GW6471	$BS^3$	EKTLVAK   KTES	K252, K449
1110,5127	1110,5136	0,8	_	$BS^2G$	KPFC   KTES	K349, K449
1110,5123	1110,5136	1,2	GW6471	$BS^2G$	KPFC   KTES	K349, K449
1110,5129	1110,5136	$0,\!6$	YS81	$BS^2G$	KPFC   KTES	K349, K449
1347,7360	1347,7366	0,4	GW6471	$\rm BS^2G$	EKTLVAK   KTES	K252, K449



**Abbildung 3.6:** Röntgenkristallstruktur des PPAR $\alpha$ /GW6471-Komplexes (pdb 1KKQ). Mit BS<sup>3</sup> quervernetzte Lysine sind blau dargestellt. Mit hydrolysierten Cross-Linkern (BS<sup>3</sup> und/oder BS<sup>2</sup>G) modifizierte Lysine sind hellblau abgebildet. Der Antagonist GW6471 (links) ist rot, die Aktivierungsfunktionshelix AF2 orange dargestellt. Identifizierte Cross-Links zwischen N<sub>e</sub>-Atomen der Lysine sind durch rote Strichlinien eingezeichnet. Die Abstände zwischen den C<sub> $\alpha$ </sub>-Atomen sind 15,2 Å (Lys-349 – Lys-449), 31,0 Å (Lys-222 – Lys-449), 26,0 Å (Lys-252 – Lys-449) und 7,7 Å (Lys-204 – Lys-208).

YS81 ergab keine charakteristischen Vernetzungsprodukte, die auf einen Konformationswechsel der AF2 oder der  $\Omega$ -Schlaufe schließen lassen. Möglicherweise bindet dieser Agonist die Ligandenbindungstasche in einer anderen Art und Weise. Während der Antogonist GW6471 die T-förmige Bindungstasche komplett ausfüllt und die PPAR $\alpha$ -Konformation stabilisiert, füllt der wesentlich kleinere Agonist YS81 die Bindungstasche nur teilsweise aus. Die Cross-Linking-Daten ähneln den Daten des freien PPAR $\alpha$  sehr stark und lassen somit auf eine vergleichbare stabile Konformation schließen.

**Tabelle 3.3:** Mit hydrolysierten Cross-Linkern BS<sup>3</sup> und BS<sup>2</sup>G modifizierte Peptide in ligandenfreiem PPAR $\alpha$ und PPAR $\alpha$ /GW6471- bzw. PPAR $\alpha$ /YS81-Komplexen. XL: Cross-Linker; Alle Massen sind für  $D_0$ -Cross-Linking-Produkte angegeben.  $\Delta$ m: Massenabweichung zwischen theoretischer und experimenteller Masse. Angegeben sind alle Peptide, die Unterschiede zwischen den untersuchten Komplexen aufweisen. Eine vollständige Liste befindet sich im Anhang Tabelle A.1.

		$\Delta m$				vernetzte
$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{exp}}$	$\left[\mathrm{M}+\mathrm{H}\right]^{+}_{\mathrm{theor}}$	[ppm]	Ligand	XL	Sequenz	Aminosäuren
1454,7778	1454,7778	0,0	_	$BS^3$	DQVTLLKYGVY	K310
1454,7774	1454,7778	0,3	GW6471	$BS^3$	DQVTLLKYGVY	K310
1904,1223	$1904,\!1225$	$^{0,1}$	GW6471	$BS^3$	QLVTEHAQLVQIIKK	K448
1777,8477	$1777,\!8465$	0,7	-	$\rm BS^2G$	IYEAYLKNFNMNK	K216
2303,3093	2303,3092	0,1	-	$\rm BS^2G$	VKARVILSGKASNNPPFVIH	K224
1449,7191	1449,7155	$^{2,5}$	YS81	$\rm BS^2G$	NFNMNKVKAR	K222, K224
902,5190	902,5193	0,3	GW6471	$\rm BS^2G$	EKTLVAK	K252
902,5191	902,5193	0,2	YS81	$\rm BS^2G$	EKTLVAK	K252
634,3082	634,3083	0,2	-	$\rm BS^2G$	EPKF	K358
634,3082	634,3083	0,2	YS81	$\rm BS^2G$	EPKF	K358
1820,9068	1820,9069	$^{0,1}$	GW6471	$\rm BS^2G$	DRPGLLNVGHIEKMQ	K399
1590,8781	1590,8783	$^{0,1}$	GW6471	$\rm BS^2G$	DDIFLFPKLLQK	K425

# 3.4 Spaltbare Cross-Linker zur effizienteren Identifizierung quervernetzter Peptide

#### 3.4.1 Motivation

Die Cross-Linking-Reagenzien  $BS^3$  und  $BS^2G$  sind am weitesten verbreitet, um Tertiärund Quartärstrukturen von Proteinen und Proteinkomplexen zu studieren [147] [148]. Die Interpretation der MS/MS-Daten von potentiellen interpeptidalen Quervernetzungen gestaltete sich schwierig, da zwei Serien von y- und b-Fragmentionen häufig nicht eindeutig dem  $\alpha$ -Pepid oder dem  $\beta$ -Peptid zugeordnet werden konnten. Da NHS-Ester mit primären Aminen reagieren, entfallen potentielle Ladungsträger an Lysinen, wodurch die Qualität der MS/MS-Daten leidet. Folglich waren einige Tandem-MS-Daten der Konformationsstudie von PPAR $\alpha$  nicht aussagekräftig genug (Kapitel 3.3).

Als Alternative zur rascheren und effizienteren Identifizierung quervernetzter Peptide wurden in dieser Arbeit neue, spaltbare Cross-Linker entwickelt, die an einer definierten Sollbruchstelle mittels niederenergetischer kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) in der Gasphase gespalten werden. Desweiteren sollte sich die *Spacer*-Länge der neuen Reagenzien an BS<sup>3</sup> orientieren (11, 4 Å). Anhand charakteristischer Neutralverluste (CNLs – *constant neutral losses*) der spaltbaren Cross-Linker sollte die Unterscheidung der Cross-Linking-Typen vereinfacht werden. Durch höherenergetische MS<sup>3</sup>-CID-Experimente sollten die quervernetzten Peptide sequenziert werden; anhand der Modifizierung mit Cross-Linker-Bruchstücken sollte die Position der Quervernetzung eindeutig bestimmt werden.

## 3.4.2 "Edman"-Reagenz

#### Struktur des "Edman"-Reagenzes

Als Vorbild für das Konzept dieses innovativen Cross-Linkers diente die Chemie des Edman-Abbaus [175], [176], bei der durch schrittweisen Abbau der N-terminalen Aminosäuren Proteine sequenziert werden [177]. Die klassische Edman-Abbau-Reaktion wird durch den nucleophilen Angriff des Schwefel-Atoms in einem N-terminalen Phenylthiocarbamyl (PTC)-Peptidderivat initialisiert. Es entsteht ein fünfgliedriger Thiazolonring. Diese Reaktion wurde von Gaskell *et al.* in der Gasphase studiert [178] [179].

Das Herzstück des spaltbaren "Edman"-Reagenzes BuTuGPG (Abbildung 3.7) ist eine Glycyl-prolyl-amidbindung, die bevorzugt mittels niederenergetischer CID gespalten wird. Die Abkürzung orientiert sich an die Abfolge von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu), Thioharnstoff (Tu), und den darauffolgenden Aminosäuren Gly, Pro, Gly; im Einbuchstabencode GPG. Die Synthese wurde von Frank Dreiocker (Universität zu Köln) durchgeführt (Syntheseschema siehe Anhang A.2). Die extrem hohe Nucleophilie des Thioharnstoff-Schwefels führte während der Synthese zu unerwünschten, cyclischen Nebenprodukten, beispielsweise Diketopiperazinen [180]. Um dies zu verhindern, wurde *C*-terminal zum Prolin ein weiters Glycin angefügt. Auf der *N*-terminalen Seite des Glycins wurde der Thioharnstoff mit Buttersäure verknüpft, wodurch sich die *Spacer*-Länge des CrossLinkers auf 16,7 Å erhöhte. Zur Verdeutlichung der Spaltstelle ist in allen abgebildeten Massenspektren die BuTuG-Partialstruktur cyan, die PG-Partialstruktur rot dargestellt.

Das Edman-Reagenz wird von zwei NHS-Gruppen flankiert, die im Falle eines nucleophilen Angriffs primärer Amine (freie *N*-Termini von Proteinen oder Lys-Seitenketten) als Abgangsgruppen fungieren. Die Veresterung der Hydroxylgruppen von Serin, Threonin und Tyrosin ist zusätzlich möglich [130] [131].



**Abbildung 3.7:** Struktur des homobifunktionellen, aminreaktiven Cross-Linking-Reagenzes BuTuGPG ("Edman"-Reagenz).

Das "Edman"-Reagenz enthält einen Thiocarbonyl-Schwefel, der durch einen nucleophilen Angriff die darauffolgende Glycylprolin-Amidbindung in der Gasphase spaltet. Das Schwefelatom von Thiocarbonylen ist nucleophiler als ein Carbonyl-Sauerstoffatom [178]. Die bevorzugte Fragmentierung an dieser Stelle wird durch ein relativ basisches Prolin ermöglicht, welches in einem initialen Schritt am Amid-Stickstoff protoniert wird (Abbildung 3.8 A). Durch die Asymmetrie des "Edman"-Reagenzes werden die Peptide auf zweierlei Art modifiziert, wodurch unter niederenergetischen CID-Bedingungen charakteristische Neutralverluste und Fragmentionen resultieren: Peptide, die mit hydrolysiertem "Edman"-Reagenz modifiziert werden, zeigen entsprechend der Orientierung des Cross-Linkers entweder eine Thiazolonabspaltung (CNL von 202 u) oder eine Glycylprolin-Abspaltung (CNL von 172 u, Abbildung 3.8 B). Intrapeptidale Cross-Links zeichnen sich durch einen CNL von 184 u aus, da das Glycylprolin-Spaltprodukt als Modifikation am Peptid verbleibt (Abbildung 3.8 A). Interpeptidale Cross-Linking-Produkte würden keine Neutralverluste zeigen, sondern ein charakteristisches Muster von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Peptiden, die sowohl mit einem Thiazolon als auch mit einem Glycylprolin modifiziert sind.



**Abbildung 3.8:** Fragmentierungsmechanismus des "Edman"-Reagenzes unter CID-Bedingungen. (A) Intrapeptidaler Cross-Link: Bevorzugte Spaltung der Gly-Pro-Amidbindung durch selektiven nucleophilen Angriff des Thiocarbonyl-Schwefelatoms. Es folgt eine charakteristische CID-Fragmentierungsreaktion des intrapeptidal quervernetzten Peptides mit BuTuGPG. Dabei wird vermutlich ein bicyclisches BuTuG als Neutralteilchen abgespalten, was zu einem CNL von 184 u führt. (B) Charakteristische Fragmentierung von Peptiden, die mit einem hydrolysierten "Edman"-Reagenz modifiziert sind. Je nach Orientierung des Cross-Linkers wird entweder ein Thiazolon abgespalten, was in einem Neutralverlust (CNL) von 202 u resultiert, oder ein Glycylprolin-Rest wird abgespalten (CNL 172 u).

#### Modifikationen von Substanz P und LHRH

Zum besseren Verständnis des Fragmentierungsverhaltens des "Edman"-Reagenzes wurde Substanz P (Aminosäuresequenz in Abbildung 2.1) als Modellpeptid ausgewählt, da es sowohl *N*-terminal als auch an der Seitenkette von Lys-3 primäre Amine enthält. Die Cross-Linking-Reaktionen wurden in 20 mM HEPES-Puffer bei pH 7,4 durchgeführt und unter den genannten Bedingungen (Kapitel 2.3.7) beendet. Die Peptidgemische wurden entsalzt und mittels Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert. Die MS-Analyse ist schematisch in Abbildung 2.2 A in Kapitel 2.4.3 beschrieben.

Das Massenspektrum in Abbildung 3.9 A zeigt einen intrapeptidalen Cross-Link bei m/z 843,42 als zweifach geladenes Signal sowie bei m/z 575,27 als dreifach geladene gemischte Spezies (zweifach protoniert und Kalium-Addukt). Hier ist das *N*-terminale Amin mit Lys-3 quervernetzt. Modifikationen mit hydrolysierten Cross-Linkern sind bei m/z 852,43 als zweifach geladene Spezies und bei m/z 1685,84 als einfach geladene Spezies zu sehen. Das Signal bei m/z 1032,97 zeigt, daß sowohl der *N*-Terminus als auch Lys-3 mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert sind.

In Abbildung 3.9 B ist das CID-MS/MS-Produktionenspektrum eines Ions bei m/z852,43 gezeigt, das dem mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifizierten Peptid entspricht. Je nach Orientierung des Cross-Linkers sind Neutralverluste von 172 u oder 202 u zu sehen. Entsprechend des Reaktionsschemas in Abbildung 3.8 B ist Substanz P über die Glycylprolin-Partialstruktur mit dem Cross-Linker verknüpft und die Thiazolon-Partialstruktur wird als CNL von 202 u abgespalten. Alternativ verbleibt Substanz P über die Thiazolon-Partialstruktur modifiziert, während die Glycylprolin-Partialstruktur mit einem CNL von 172 u abgespalten wird. Anhand der MS/MS-Daten ist nicht eindeutig zu klären, ob der N-Terminus oder Lys-3 in Substanz P modifiziert sind. Interessanterweise sind hoch abundante Signale des intakten Peptids zu sehen, die eine weitere Spaltung des "Edman"-Reagenzes zu beiden Seiten der Thiocarbonylgruppe zeigen. Der Basispeak bei m/z 716,90 (Abbildung 3.9 B) bestätigt eine Fragmentierung des Thioharnstoffs an der Bindung zur Aminobuttersäure. Das Signal bei m/z 737,88 entspricht der Fragmentierung des Thioharnstoffs an der Bindung zum Glycin. Fast alle b- oder y-Fragmentionen im Peptid weisen Neutralverluste von 172 u auf.

Die CID-MS/MS-Daten des intrapeptidalen Cross-Links  $[M + BuTuGPG + 2H]^{2+}$ (m/z 843,42) sind in Abbildung 3.9 C dargestellt. Das Fragmention bei m/z 751,41 demonstriert die Fragmentierung der Glycylprolin-Amidbindung. Dabei wird ein Thiazolon mit einem Neutralverlust von 184 u) abgespalten, der für intrapeptidale Vernetzungsprodukte typisch ist. Entsprechend des Fragmentierungsmechanismus (Abbildung 3.8 A) wird eine bicyclische Struktur für das abgespaltene Neutralteilchen vorgeschlagen. Anhand der exakten Massenbestimmung des Neutralverlustes wurde eine Summenformel von C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> bestimmt.

Zur Bestätigung der Peptidsequenz wurden CID-MS<sup>3</sup>-Daten des Fragmentes bei m/z751,41 akquiriert (Abbildung 3.9 D). Theoretisch sind zwei verschiedene Orientierungen des "Edman"-Reagenzes möglich, jedoch wurde nur eine Orientierung eindeutig bestätigt: Das Fragmention  $[b_1 + PG]^+$  bei m/z 311,19 beweist, daß der *N*-Terminus mit der PG-Partialstruktur des Cross-Linkers modifiziert ist.

Anhand der charakteristischen Neutralverluste läßt sich der Cross-Linking-Typ (interpeptidal, intrapeptidal, hydrolysierter/amidierter Cross-Linker; siehe Abbildung 1.14) anhand der CID-MS/MS-Daten zuverlässig bestimmen. Bei Bedarf unterstützen CID-MS<sup>3</sup>-Daten die Sequenzierung der modifizierten Peptide.

Begleitend zu den Studien mit Substanz P wurde LHRH (*Luteinizing-hormone relea*sing hormone, Aminosäuresequenz in Abbildung 2.1) als ein weiteres Modellpeptid ausgewählt, da es keine primären Amine enthält. Lediglich Ser-3 wurde mit hydrolysierten "Edman"-Reagenzien modifiziert und bestätigte die für diese Modifikation charakteristischen Neutralverluste von 172 u und 202 u (Abbildung 3.8 B).



**Abbildung 3.9:** (**A**) ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrum von Substanz P, das mit dem "Edman"-Reagenz modifiziert ist. (**B**)  $MS^2$ -CID-Produktionenspektrum von  $[M+BuTuGPG-OH + 2H]^{2+}$  bei m/z 852,43, das in der LTQ fragmentiert wurde. Die Fragementionen wurden in der Orbitrap analysiert. (**C**) MS/MS-CID-Produktionenspektrum von  $[M+BuTuGPG + 2H]^{2+}$  bei m/z 843,42. Das mit einem Stern (\*) markierte Signal entspricht einer zusätzlichen Fragmentierung der Thioharnstoffgruppe. (**D**)  $MS^3$ -CID-Produktionenspektrum von  $[M+PG + 2H]^{2+}$  bei m/z 751,41.



Abbildung 3.9: (Fortsetzung)

#### Cross-Linking-Experimente mit Lysozym

Um die Anwendbarkeit des "Edman"-Reagenzes zur Strukturuntersuchung von Proteinen zu überprüfen, wurde das 14,3 kDa große Protein Lysozym aus Hühnereiweiß [181] als Modellprotein ausgewählt. Sowohl der freie N-Terminus als auch die Seitenketten der sechs Lysine enthalten primäre Amine, die für Modifikationen in Frage kommen. Zwölf Arginine ermöglichen eine optimale tryptische Spaltung des Lysozyms nach den Cross-Linking-Experimenten (Aminosäuresequenz in Abbildung 2.1).

Zur Reaktionskontrolle wurden die Cross-Linking-Produkte nach unterschiedlichen molaren Überschüssen des "Edman"-Reagenzes (50-, 100- und 200-facher Überschuß) sowie verschiedenen Reaktionszeiten (5–120 Minuten) mittels MALDI-TOF-MS im linearen Meßmodus analysiert. Bis zu sechs Modifikationen wurden in Lysozym nachgewiesen, deren Signale mit zunehmender Reaktionszeit und zunehmendem molaren Überschuß des Cross-Linking-Reagenzes ansteigen (Abbildung 3.10).



Abbildung 3.10: MALDI-TOF-MS im linearen Meßmodus von Lysozym. Unterschiedliche molare Überschüsse des Edman-Reagenzes (50-, 100- und 200-fach) sowie die Reaktionszeiten (5 – 120 min) sind angegeben. Das berechnete Durchschnitts-Molekulargewicht des Lysozyms (Hühnereiweiß) von 14313 Da stimmt mit dem Signal bei *m/z* 14313 überein. Das Signal bei *m/z* 14478 entspricht vermutlich glykosyliertem Lysozym [182].

Das modifizierte Lysozym wurde *in Lösung* tryptisch gespalten und anschließend per Nano-HPLC/nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert (MS-Methode in Abbildung 2.2 B1). Es konnte gezeigt werden, daß das Peptid der Aminosäuresequenz 115–125 intra-


**Abbildung 3.11:** (A) ESI-LTQ-Orbitrap-Fragmentionenspektrum von  $[M+BuTuGPG + 2H]^{2+}$  des intrapeptidal quervernetzten Lysozym-Peptids der Aminosäuren 115–125 (*m/z* 836,39). Lys-116 ist mit Tyr-118 quervernetzt. (B) ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Analyse des Vorläuferions  $[M+PG + 2H]^{2+}$  bei *m/z* 744,57.

peptidal zwischen Lys-116 und Tyr-118 quervernetzt wurde. Abbildung 3.11 A zeigt die ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Daten nach Isolierung und CID-Fragmentierung des doppelt geladenen Vorläuferions bei m/z 836,39. Diese einzige mögliche Modifikation wird durch einen Neutralverlust von 184 u, entsprechend dem Basispeak bei m/z 744,57 bewiesen. Das ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Produktionenspektrum der Spezies [M + PG + 2H]<sup>2+</sup> in Abbildung 3.11 B zeigt eine nahezu vollständige Fragmentierung des mit Glycylprolin modifizierten Peptids. Besonders hervorzuheben ist die zielgerichtete Analyse der Cross-Linking-Produkte mittels MS/MS-Daten zur einfachen Bestimmung des Cross-Linking-Typs anhand des charakteristischen Neutralverlustes und der MS<sup>3</sup>-Daten zur Sequenzierung der modifizierten Peptide.

Ein weiteres Lysozym-Peptid der Aminosäuresequenz 6–14 ist mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert (Abbildung Anhang A.3). Die mehrfachen H<sub>2</sub>O-Verluste des Vorläuferions von m/z 703,15 werden vermutlich durch das Peptid selbst und nicht durch den Cross-Linker verursacht. Das intensitätsstärkste Fragmention bei m/z 602,43 zeigt einen Neutralverlust von 202 u für hydrolysierte Cross-Linker. CID-MS<sup>3</sup>-Experimente ergaben eine nahezu vollständige Sequenzierung des Peptides. Die Modifikation von Lys-13 wurde anhand des verbliebenen Glycylprolin-Restes eindeutig bestätigt.

#### 3.4.3 Fragmentierungsverhalten des Thioharnstoff-Reagenzes

#### Struktur des Thioharnstoff-Reagenzes

Das "Edman"-Reagenz demonstriert die Möglichkeit, quervernetzte Peptide anhand ihres Fragmentierungsverhaltens in der Gasphase eindeutig von unmodifizierten Peptiden zu unterscheiden. Nachteilig ist zu erwähnen, daß die Synthese des "Edman"-Reagenzes sehr aufwändig und kostenintensiv ist. Auch die hohe *Spacer*-Länge von 16,7 Å reduziert die Wahrscheinlichkeit, aussagekräftige Cross-Links für die Strukturuntersuchung von Proteinen zu identifizieren.

Das Auftreten einer zweiten Fragmentierungsstelle im "Edman"-Reagenz beiderseits der Thiocarbonylgruppe gab den Ausschlag, ein einfacher zu synthetisierendes, kürzeres Thioharnstoffreagenz zu entwickeln. Dieses neue Konzept sollte eine Alternative zur labilen Glycylprolin-Einheit darstellen. Der neuentwickelte, symmetrische Cross-Linker wurde asymmetrisch aus  $\gamma$ -Aminobuttersäuremethylester **4** und 4-Isothiocyanatobuttersäuremethylester **5** aufgebaut (Synthese: Frank Dreiocker, Syntheseschema in Anhang A.4). Er besteht aus einer zentralen Thioharnstoffgruppe (Tu), die von zwei Buttersäuregruppen (Bu) und zwei aminreaktiven NHS-Estern flankiert wird (Abbildung 3.12).

Die Reaktivität des Thioharnstoff-Reagenzes mit Lysinen oder freien N-Termini von Proteinen ist mit den klassischen NHS-Estern BS<sup>3</sup> und BS<sup>2</sup>G vergleichbar (Abbildung 1.14). Laut Reaktionsschema in Abbildung 3.13 reagieren sowohl die intrapeptidalen



Abbildung 3.12: Vergleich der Strukturen des "Edman"-Reagenzes BuTuGPG (links) und des neuen Thioharnstoff-Reagenzes BuTuBu (rechts). Die mittels CID spaltbaren Bindungen sind grün markiert.



Abbildung 3.13: Reaktionen des aminreaktiven Thioharnstoff-Reagenzes BuTuBu.

Cross-Links als auch die hydrolysierten/amidierten Cross-Linker folgendermaßen weiter: Durch einen nucleophilen Angriff des Thiocarbonyl-Schwefels an eine endständige Carbonylgruppe entsteht ein siebengliedriges 2-Alkylylimino-[1,3]thiazepan-7-on. Dieses hat eine formale Masse von  $[M + H + 212 u]^+$  und könnte auch aus der Umlagerung eines intrapeptidalen Cross-Link entstehen. Daher sind beide Spezies massenspektrometrisch betrachtet isobar. Eine CID-induzierte Umlagerung dieser Spezies führt zur Bildung eines weiteren siebengliedrigen 7-Alkylylimino-[1,3]oxazepan-2-thions mit der formalen Masse von  $[M + H + 127 u]^+$ . Dabei wird ein  $\gamma$ -Lactam als Neutralverlust (CNL) von 85 u abgespalten. Dieser Neutralverlust von 85 u vereinfacht die Identifizierung quervernetzter Peptide aus komplexen Mischungen.

#### Cross-Linking mit Substanz P und LHRH

Als Vergleichsstudie zum "Edman"-Reagenz wurden Substanz P und LHRH als Modellpeptide verwendet. Die Cross-Linking-Produkte wurden mittels MALDI-TOF/TOF-MS und Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert (Abbildung 3.14). Zum Vergleich sind die Spektren mit Buchstaben (A für MALDI-MS, B für ESI-MS) und Zahlen (1: Massenspektren der intakten Cross-Linking-Produkte; 2: MS/MS-Daten; 3: (Pseudo-)MS<sup>3</sup>-Daten) bezeichnet.

Das MALDI-Massenspektrum in Abbildung 3.14 A1 zeigt Modifikationen von Substanz P mit dem Thioharnstoff-Reagenz: Es ist hieraus nicht erkennbar, ob der *N*-Terminus oder Lys-3 des Peptids modifiziert sind. Das Signal bei m/z 1559,834 entspricht formal dem Reaktionsprodukt [M + H + 212 u]<sup>+</sup>, während das Signal bei m/z 1581,827 das Natrium-Addukt [M + Na + 212 u]<sup>+</sup> darstellt. Laut Reaktionsschema (Abbildung 3.13) könnte es sich um einen intrapeptidalen Cross-Link zwischen dem *N*-Terminus und Lys-3 handeln. Alternativ könnte das Reaktionsprodukt auch durch eine intramolekulare Cyclisierung eines hydrolysierten Cross-Linkers entstanden sein.

Das Signal bei m/z 1559,834 wurde isoliert und mittels LID im MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer fragmentiert (Abbildung 3.14 A2). Das mit großem Abstand intensitätsstärkste Signal bei m/z 1474,7 entsteht durch Abspaltung eines  $\gamma$ -Lactams mit einem Neutralverlust von 85 u. Weniger abundante Fragmentionen mit relativen Signalintensitäten von maximal 5% entsprechen den Fragmentierungen des Peptidrückgrates. Aus diesen Daten ist noch nicht erkennbar, ob der *N*-Terminus oder Lys-3 modifiziert wurden, da Peptidbindungsbrüche zwischen Arg-1/Pro-2 sowie Pro-2/Lys-3 nicht detektiert wurden.

Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden manuelle Pseudo- $MS^3$ -Experimente mit dem Signal  $[M + BuTu + H]^+$  bei m/z 1474,7 durchgeführt (Abbildung 3.14 A3). Die Signalintensitäten sind nun höher, jedoch verschlechtert sich die Massengenauigkeit.

Mit MALDI-TOF/TOF-MS/MS entstehen hauptsächlich interne Fragmente und b-Fragmentionen, die keine weiteren Indizien liefern, ob es sich um einen Typ-0- oder Typ-1-Cross-Link handelt.



**Abbildung 3.14:** MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse (**A**) und ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analyse (**B**) von Substanz P nach der Cross-Linking-Reaktion mit dem Thioharnstoff-Reagenz. (**A1**) Übersichtsmassenspektrum; die nicht annotierten Signale entsprechen Verunreinigungen von Substanz P.  $M_{ox}$ : oxidiertes Met-11. (**A2**) MS/MS-Daten von [M+BuTuBu+H]<sup>+</sup> (m/z 1559,834). Die Kästen zeigen die möglichen Strukturen der Cross-Linking-Produkte. (**A3**) Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten von [M+BuTu+H]<sup>+</sup> (m/z 1474,8). \$: Signal nicht zugeordnet. (**B1**) Übersichtsmassenspektrum. \$: Verunreinigung durch Siloxane, die im Massenspektrometer LTQ-Orbitrap-XL häufig beobachtet werden. (**B2**) CID-MS/MS-Daten von Substanz P, die mit BuTuBu (m/z 780,407) modifiziert ist. (**B3**) CID-MS<sup>3</sup>-Daten von [b<sub>10</sub>+BuTuBu]<sup>2+</sup> (m/z 706,37).

Möglicherweise entstand eine Mischpopulation beider Cross-Linking-Typen.

Vergleichend wurden die gleichen Cross-Linking-Reaktionsgemische mittels Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert (Abbildung 2.2 A). Das Übersichtsmassenspektrum in Abbildung 3.14 B1 zeigt den Basispeak bei m/z 780,407, der einem doppelt geladenen [M + BuTuBu + 2H]<sup>2+</sup>-Ion entspricht; Substanz P ist also mit dem intakten Thioharnstoff-Reagenz BuTuBu modifiziert. Dieses Signal wird von Natrium- und Kalium-Addukten begleitet, welche auch als dreifach geladene Spezies vorkommen. Selbst Peptid-Spezies mit einfach und doppelt oxidiertem Met-11 wurden detektiert.

Wie in den MALDI-Experimenten zeigen auch hier die MS/MS-Daten einen Neutralverlust von 85 u (Abbildung 3.14 B2). Nun wurden auch Fragmentierungen zwischen Arg-1 und Lys-3 nachgewiesen: Die Fragmentionen  $[b_1+BuTuBu]^+$ , y<sub>9</sub> und  $[y_{10}-NH_3]^+$ zeigen eindeutig, daß der *N*-Terminus von Substanz P modifiziert ist und Lys-3 keine Modifikation trägt. Dies wäre ein Indiz, daß aus dem Thioharnstoff-Reagenz in der Gasphase das siebengliedrige 7-Alkylylimino-[1,3]oxazepan-2-thion entstanden ist.

Für MS<sup>3</sup>-Experimente war das Signal  $[M + BuTu + 2H]^{2+}$  bei m/z 737,88 zu wenig abundant. Stattdessen wurde der Basispeak  $[b_{10}+BuTuBu]^{2+}$  fragmentiert (Abbildung 3.14 B3). Es entstanden interessante Pärchen korrespondierender a- und b-Fragmentionen. Trotz der nahezu vollständigen Interpretierung aller Signale gaben die Daten keine zusätzliche Information und erfüllen daher eher einen ästhetischen Anspruch.

Zum Studium von Nebenreaktionen des Cross-Linkers mit Hydroxylgruppen in Serin, Threonin und Tyrosin wurde erneut das Peptid LHRH verwendet. Der Basispeak entsprach dem unmodifizierten Peptid bei m/z 1183,576. Ein kleineres Signal bei m/z 1395,682 resultierte durch eine charakteristische Massenverschiebung um 212 u. In MS/MS-Experimenten, die sowohl per MALDI-TOF/TOF- als auch per Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie durchgeführt wurden, entsprachen die Basispeaks einem typischen Neutralverlust von 85 u für Thioharnstoff-Reagenz-modifizierte Peptide (keine Daten gezeigt).

#### Cross-Linking-Experimente mit Lysozym

Das 14,3 kDa große Protein Lysozym diente erneut als Modellprotein, um die Reaktivität des neuen Thioharnstoff-Reagenzes zu evaluieren. Sämtliche Cross-Linking- und MS-Experimente entsprachen denen des "Edman"-Reagenzes (siehe Kapitel 3.4.2).

MALDI-TOF-MS im linearen Meßmodus resultierte je nach Reaktionszeit und molarem Überschuß an Thioharnstoff-Reagenz in sechs, möglicherweise auch sieben Modifikationen (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15:** MALDI-TOF-MS von Lysozym mit 50- 100- und 200-fachen molaren Überschüssen des Thioharnstoff-Reagenzes und Reaktionszeiten von 5, 30, 60 und 120 Minuten. Das berechnete Durchschnitts-Molekulargewicht des Lysozyms von 14313 Da stimmt mit dem Signal bei m/z 14313 überein.

Wie bereits bei der Verwendung des "Edman"-Reagenzes wurde Lysozym *in Lösung* tryptisch gespalten. Zum Studium des Fragmentierungsverhaltens wurde erneut das Peptid der Aminosäuresequenz 115–125 von Lysozym betrachtet. Dieses ist an Lys-116 modifiziert und möglicherweise intrapeptidal mit Thr-118 quervernetzt. Das MALDI-TOF-Massenspektrum in Abbildung 3.16 A1 zeigt eine charakteristische Massenverschiebung von 212 u (Signal bei m/z 1545,740). Dazu gehört ein um 85 u kleineres ISD-Fragment bei m/z 1460,661, das dem Neutralverlust eines  $\gamma$ -Lactams entspricht. Weiterhin ist ein unmodifiziertes Lysozym-Peptid (Aminosäuresequenz 97–114) bei m/z 2073,947 zu sehen. Das Signal bei m/z 1471,762 repräsentiert ein ISD-Fragment des Signals [M + BuTuBu + H]<sup>+</sup> bei m/z 1545,740. Die Massendifferenz von 74 u entspricht formal einem Neutralverlust von SOCN, jedoch ist der Fragmentierungsmechanismus Gegenstand weiterer Diskussionen. Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten bestätigten zwar die Aminosäuresequenz dieser Spezies, jedoch ergaben sie keine zusätzliche Information über das Thioharnstoff-Reagenz-Fragment.

Die MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten ergaben wie schon bei der Studie an Substanz P ein hochabundantes, um 85 u verringertes Signal für  $[M + BuTu + H]^+$  bei m/z1460,661 (Abbildung 3.16 A2). Es ist nicht eindeutig zu klären, ob das hierbei gebildete 2-Alkylylimino-[1,3]thiazepan-7-on durch Umlagerung eines intrapeptidalen Cross-Links oder durch die Cyclisierung des mit Cross-Linker modifizierten Peptides entstanden ist. Die y<sub>8</sub>- und y<sub>9</sub>-Fragmentionen bestätigen, daß hier Lys-116 mit dem Thioharnstoff-Reagenz-Fragment BuTu modifiziert ist, während Thr-118 unmodifiziert ist.

Die ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Daten bestätigen diese Beobachtungen (Abbildung 3.16 B1–B3). Das Massenspektrum enthält neben Siloxan-Verunreinigungen ausschließlich das modifizierte Lysozympeptid der Aminosäuresequenz 115–125 (Abbildung 3.16 B1). Der dem y<sub>9</sub>-Fragmention entsprechende Basispeak bei m/z 1045,54 verifizierte, daß allein Lys-116 modifiziert ist. Die Isolation mehrfach geladener Fragmentionen für MS<sup>3</sup>-Daten wurde bevorzugt, jedoch war das Signal der Spezies [M + BuTu + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 730,84 zu intensitätsschwach, um aussagekräftige Daten zu erhalten. Daher wurden MS<sup>3</sup>-Experimente am [M + BuTuBu  $-H_2O + 2H$ ]<sup>2+</sup>-Fragment bei m/z 764,36 durchgeführt.



**Abbildung 3.16:** Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse **(A)** und Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS-Analyse **(B)** nach der Cross-Linking-Reaktion mit dem Thioharnstoff-Reagenz. **(A1)** MALDI-TOF-Massenspektrum einer Nano-HPLC-Fraktion, die das tryptische Lysozym-Peptid 115–125 enthält. Cys-115 ist carbamidomethyliert. Durch einen CNL von 85 u entstand aus  $[M + BuTuBu + H]^+$  bei m/z 1545,740 die Spezies  $[M + BuTu + H]^+$  (m/z 1460,661). **(A2)** MS/MS-Daten des modifizierten Peptids bei m/z1545,740. **(A3)** Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten von  $[M + BuTu + H]^+$  bei m/z 1460,661. **(B1)** Nano-ESI-LTQ-Orbitrap Massenspektrum einer Nano-HPLC-Fraktion. Das Signal bei m/z 773,369 entspricht dem modifizierten Peptid  $[M + BuTuBu + 2H]^{2+}$ , Sequenz 115–125. **(B2)** CID-MS/MS-Daten des Signals bei m/z 773,369. **(B3)** CID-MS<sup>3</sup>-Daten der Spezies  $[M + BuTuBu - H_2O + 2H]^{2+}$  bei m/z 764,36. \$: Signale entsprechen Siloxanen.

Letztendlich wurde auch ein intrapeptidaler Cross-Link zwischen dem *N*-Terminus und Lys-97 in Lysozym identifiziert (Abbildung 3.17). Anhand der Lysozym-Kristallstruktur (pdb-Eintrag: 193L) sind die beiden quervernetzten Amino-Stickstoffe 23, 2 Å voneinander entfernt. Durch die hohe Flexibilität des *N*-Terminus und der Lys-Seitenkette ist es möglich, diese Distanz mit dem 12, 5 Å langen Thioharnstoff-Reagenz zu überbrücken. In einer früheren Studie war dieses Vernetzungsprodukt bereits bestätigt worden [183].

Die MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten des Signals bei m/z 2144,023 in Abbildung



**Abbildung 3.17:** Interpeptidales Cross-Linking-Produkt in Lysozym mit dem Thioharnstoff-Reagenz. **(A)** MALDI-TOF-Massenspektrum einer Nano-HPLC-Fraktion, die den interpeptidalen Cross-Link (Typ 2) enthält. Der *N*-Terminus von Lys-1 ist mit Lys-97 des Peptids 97–112 quervernetzt (m/z 2144,023). Weitere Lysozym-Peptide wurden ebenfalls in dieser Nano-HPLC-Fraktion identifiziert. **(B)** MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten des Cross-Linking-Produktes [ $\alpha$  + BuTuBu +  $\beta$  + H]<sup>+</sup> bei m/z 2144,023. **(C)** Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Daten des Cross-Linking-Produktes [ $\alpha$  + BuTuBu +  $\beta$  + 3H]<sup>3+</sup> bei m/z 715,68.

3.17 B zeigen eine Serie von y-Fragmentionen, die jedoch keine Modifikation enthalten. Dagegen enthalten die in der Orbitrap analysierten ESI-LTQ-MS/MS-Daten in Abbildung 3.17 C fünf b-Fragmentionen, die die beiden miteinander quervernetzten Lysine beinhalten. Lys-1 entsteht als proteolytisches Fragment, da dessen Seitenkette unmodifiziert ist und Trypsin so noch Lys-1 spalten kann. Es ist bekannt, daß primäre Amine von N-Termini eine höhere Nucleophilie besitzen als primäre Amine von Lys-Seitenketten [133].

Anhand dieses Cross-Linkers wurde gezeigt, daß Thioharnstoffstrukturen eine effiziente Sollbruchstelle in MS-spaltbaren Cross-Linkern darstellen. Allerdings ist es mit der enthaltenen Partialstruktur BuTuBu (Abbildung 3.12) nicht möglich, zwischen hydrolysierten Cross-Linkern und intrapeptidalen Cross-Links zu unterscheiden.

#### 3.4.4 Harnstoff-Reagenz

#### Struktur des Harnstoff-Reagenzes

Um die zentrale Rolle des Thioharnstoff-Schwefels bei der Fragmentierung unter CID-Bedingungen zu verifizieren, wurde ein Harnstoff-Analogon von Frank Dreiocker synthetisiert. Dieses wurde aus  $\gamma$ -Aminobuttersäure **3** und Triphosgen **18** symmetrisch aufgebaut und in lediglich zwei Stufen hergestellt (Reaktionsschema Anhang A.7). Dieser neue Cross-Linker besteht aus einer zentralen Harnstoffgruppe (Ur), die wie das Thioharnstoff-Reagenz von zwei Buttersäuregruppen (Bu) und zwei aminreaktiven NHS-Estern flankiert ist (Abbildung 3.18).

Der Fragmentierungsmechanismus des Harnstoff-Reagenzes unter CID-Bedingungen (Abbildung 3.19) weicht von dem des Thioharnstoff-Reagenzes ab. Je nach Cross-Linking-Typ werden verschieden große Cross-Linker-Fragmente als Neutralverluste (CNL) abgespalten.

Generell wird die Fragmentierung von einem Sauerstoffatom einer der beiden randständigen Carbonylgruppen des *Spacers* initiiert. Dieses greift am zentralen Carbonyl-Kohlenstoff des Harnstoffes nucleophil an und führt zur Spaltung einer der beiden Harnstoff-Amidbindungen. Hydrolysierte Cross-Linker zeigen zwei charakteristische Neutralverluste, je nachdem, von welcher Seite die Harnstoff-Carbonylgruppe nucleophil angegriffen wird. Erfolgt der Angriff vom Sauerstoffatom der endständigen Carbonylgruppe des Cross-Linkers, wird ein siebengliedriges 1,3-Oxazepan-2,4-dion abgespalten, was in einem Neutralverlust von 129 u resultiert; es verbleibt ein Peptid, das mit einem Buttersäurerest (Bu) modifiziert ist ( $[M + H + 85 u]^+$ ).

Erfolgt der nucleophile Angriff dagegen von der Seite der peptidständigen Cross-Linker-Carbonylgruppe, wird  $\gamma$ -Aminobuttersäure entsprechend eines Neutralverlustes von 103 u abgespalten, während das Peptid mit 1,3-Oxazepan-2-on modifiziert bleibt ([M + H + 111 u]<sup>+</sup>; Abbildung 3.19 A). Da beide Fragmentierungs-Szenarien mit ähnlich großer Wahrscheinlichkeit auftreten, zeigen die CID-MS/MS-Daten ein charakteristisches "26 u-Dublett". Die Neutralverluste weisen eine Masseneinheit weniger auf, wenn der Typ-0-Cross-Linker amidiert ist. In diesem Fall erfolgt ein Neutralverlust von 102 u, wenn  $\gamma$ -Aminobuttersäureamid abgespalten wird. Bei einem Neutralverlust von 128 u verbleibt die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu) als Peptidmodifikation. Die hydrolysierten Spezies wurden bereits mittels Nano-RP-HPLC von amidierten Spezies getrennt. Für ein Peptid mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 Da differierte die Elutionszeit um etwa 30 Sekunden.

Intrapeptidale Cross-Links zeichnen sich durch die Abspaltung eines Pyrolidinons (CNL 85 u) aus. Da diese Spaltung asymmetrisch verläuft, verbleibt an jeder der beiden quervernetzten Aminosäuren entweder ein Buttersäure-Rest (85 u) oder ein 1,3-Oxazepan-2-on-Rest (111 u; Abbildung 3.19 B).



Abbildung 3.18: Struktur des Harnstoff-Reagenzes. Die mittels CID spaltbaren Bindungen sind grün markiert.



Abbildung 3.19: Fragmentierungsmechanismus des aminreaktiven Harnstoff-Reagenzes unter CID-Bedingungen eines (A) Peptids, das mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifiziert ist (Typ 0);
(B) intrapeptidalen Cross-Links (Typ 1); (C) interpeptidalen Cross-Links (Typ 2).

Interpeptidale Cross-links zeigen das gleiche Fragmentierungsverhalten, das in komplementären Fragmentionen-Paaren resultiert. Sowohl das  $\alpha$ -Peptid als auch das  $\beta$ -Peptid des Cross-Linking-Produktes werden entweder mit dem Buttersäure-Rest (85 u) oder dem 1,3-Oxazepan-2-on-Rest (111 u) modifiziert, wodurch ein "Dublett zweier 26 u-Dubletts" entsteht (Abbildung 3.19 C).

#### Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektrometrie

Zur experimentellen Bestätigung des Fragmentierungsverhaltens des Harnstoff-Reagenzes wurde ein vom Munc13-1-Protein abgeleitetes Peptid verwendet (Aminosäuresequenz Abbildung 2.1). Dieses wurde von Olaf Jahn (MPI Göttingen) synthetisiert und wird in unserem Arbeitskreis zur Untersuchung der Calmodulin/Munc13-Interaktionen verwendet [140]. Das Peptid enthält drei primäre Amine (*N*-Terminus, Lys-4 und Lys-13), die durch vier Arginine voneinander getrennt sind. Daher stellt das Munc13-1-Peptid ein ideales Modell für anschließende tryptische Spaltungen dar. Als größeres Protein wurde PPAR $\alpha$  verwendet.

Die proteolytischen Peptidgemische wurden mittels Nano-HPLC getrennt und online mittels Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS analysiert (Abbildung 2.2 B1 in Kapitel 2.4.3). Desweiteren wurde erfolgreich eine Neutralverlustmethode verwendet (Abbildung 2.2 B2). Hierbei wurden zielorientiert nur dann MS<sup>3</sup>-Daten in der linearen Ionenfalle detektiert, wenn die entsprechenden Vorläuferionen einen dem Harnstoff-Reagenz charakteristischen Neutralverlust aufwiesen. Es resultierte eine Liste an MS<sup>3</sup>-Daten von Peptiden, die mit hydrolysierten/amidierten oder intrapeptidalen Cross-Links modifiziert waren. Da interpeptidale Cross-Links keine charakteristischen Neutralverluste aufweisen, eignete sich hierfür lediglich die klassische Methode, die jeweils drei abundantesten Spezies zu fragmentieren (Abbildung 2.2 B1). Der Neutralverlustmethode verblieb jedoch eine ergänzende Funktion. Da sich das Fragmentierungsverhalten des Harnstoff-Reagenzes nun deutlich je nach Typ der Quervernetzung unterscheidet, werden die folgenden Ergebnisse für jeden Cross-Linking-Typ einzeln betrachtet. Mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifizierte Peptide (Typ 0) — Abbildung 3.20 zeigt eine Nano-HPLC-Fraktion der tryptischen Spaltprodukte von PPAR $\alpha$ nach einem Cross-Linking-Experiment mit dem Harnstoff-Reagenz. Die ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten des mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierten PPAR $\alpha$ -Peptids (Aminosäuren 258–271) des doppelt geladenen Ions bei m/z877,97 beweisen, daß das Harnstoff-Reagenz bevorzugt gespalten wurde (Abb. 3.20 A).



**Abbildung 3.20:** (A) ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten eines PPAR $\alpha$ -Peptids (Aminosäuren 258–271) [M + BuUrBu-OH + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 877,97, das mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert ist. (B) ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten von [M + Bu + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 813,95 und (C) [M + BuUr + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 826,94.

Die Basispeaks entsprechen den Fragmenten  $[M + Bu + 2H]^{2+}$  (m/z 813,95; CNL 129 u) und  $[M + BuUr + 2H]^{2+}$  (m/z 826,94; CNL 103 u). Die Fragmentionen des Peptidrückgrates haben geringere relative Intensitäten bis maximal 30 %. Die beiden höchstabundanten Signale wurden in der LTQ isoliert, erneut per CID fragmentiert und in der LTQ analysiert. Die Sequenz des modifizierten Peptids wurde bestätigt und bewies, daß Lys-266 auf der hochflexiblen  $\Omega$ -Schlaufe modifiziert ist (Abbildung 3.20 B und C).

Das tryptische Munc13-1-Peptid AKANWLR zeigt das gleiche Fragmentierungsverhalten (Abbildung Anhang A.5). Das Signal bei m/z 1072,60 entspricht einer Modifikation von Lys-4 mit einem hydrolysierten Cross-Linker [M + BuUrBu-OH + H]<sup>+</sup>. Die ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten enthalten nur Fragmente des Cross-Linkers – das Peptid bleibt intakt (Abbildung A.5 A). Das Fragmention bei m/z 943,55 wurde durch einen Neutralverlust von 129 u; das bei m/z 969,53 durch einen Neutralverlust von 103 u gebildet. Beide Signale bilden ein "Dublett" von 26 u (Abbildung 3.19). Die ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten dieser Spezies weisen Fragmentionen des Peptidrückgrates auf, wobei das Peptidrückgrat des Munc13-1-Peptides mit einer 1,3-Oxazepan-2-on-Modifikation wesentlich effizienter fragmentiert wird (Abbildung A.5 C).

Intrapeptidale Cross-Linking-Produkte (Typ 1) — Das Fragmentierungsverhalten intrapeptidal quervernetzter Cross-Linking-Produkte unterscheidet sich deutlich von dem der hydrolysierten Cross-Linker. Die ESI-LTQ-Orbitrap-CID-Fragmentionenspektren des tryptischen PPAR $\alpha$ -Peptides (Aminosäuren 195–209) bei m/z 945,47 ([M + BuUrBu + 2H]<sup>2+</sup>) zeigen einen Basispeak bei m/z 902,9. Dieser entspricht einem Neutralverlust von 85 u, da in diesem Fall ein Pyrolidinon freigesetzt ist (Abb. 3.21 A).

Die ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten weisen eine hohe Anzahl an Fragmentionen des Peptidrückgrates auf und bestätigen, daß Lys-204 mit Lys-208 des PPAR $\alpha$  quervernetzt wurde. Im Gegensatz zum konventionellen, nicht-spaltbaren Cross-Linker BS<sup>3</sup> (intrapeptidaler Cross-Link in Anhang A.1 B) werden Fragmentierungen zwischen den quervernetzten Lysinen detektiert: Das Fragmention  $[b_{11} + BuUr]^{2+}$  enthält das mit 1,3-Oxazepan-2-on modifizierte Lys-204. Das Fragmention  $[y_5 + BuUr]^+$  beweist, daß auch Lys-208



Abbildung 3.21: (A) ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten des intrapeptidal quervernetzten PPAR $\alpha$ -Peptids (Aminosäuren 195–209) [M + BuUrBu + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 945,47. (B) ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten von [M + BuUr + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 902,94. \$: Siloxan-Signale.

modifiziert sein kann. Das intrapeptidal quervernetzte Harnstoff-Reagenz fragmentiert also asymmetrisch unter Abspaltung eines Neutralteilchens (85 u) und erleichtert die Identifizierung der vernetzten Aminosäuren.

Interpeptidale Cross-Linking-Produkte (Typ 2) — Das Fragmentierungsverhalten interpeptidal quervernetzter Peptide unter CID-Bedingungen unterscheidet sich am deutlichsten von den Modifikation der Typen 0 und 1. Es werden keine Neutralverluste beobachtet, sondern zwei charakteristische "26 u-Dubletts". Die ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten in Abbildung 3.22 zeigen eindeutig, daß die tryptischen Spaltprodukte des Munc13-1-Peptides (Aminosäuren 3–9 und 10–15) quervernetzt wurden: Lys-4 ist mit Lys-13 kovalent verknüpft. Sowohl das  $\alpha$ -Peptid als auch das  $\beta$ -Peptid des Cross-Linking-Produktes sind entweder mit einem Aminobuttersäure-Fragment (Bu) oder einem 1,3-Oxazepan-2-on-Fragment (BuUr) modifiziert und wurden als einfach oder doppelt geladene Spezies detektiert (Abbildung 3.22 A). Jedoch wurden auch Fragmentierungen des Peptidrückgrates detektiert. Die ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten des modifizierten  $\alpha$ -Peptids [ $\alpha$  + Bu + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 463,76 (Abbildung 3.22 B) und des  $\beta$ -Peptids [ $\beta$  + Bu + H]<sup>+</sup> bei m/z 819,48 (Abbildung 3.22 C) bestätigen deren Aminosäuresequenzen.

Das Cross-Linking-Experiment mit PPAR $\alpha$  resultierte in einem Cross-Link zwischen Lys-208 und Lys-216, der in früheren Studien nicht identifiziert wurde (Abbildung Anhang A.6). Eine vollständige Liste aller mit ESI-LTQ-Orbitrap-MS identifizierten Cross-Links befindet sich in Anhang A.2.



**Abbildung 3.22:** (A) ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten des dreifach geladenen Signals eines Cross-Linking-Produktes des Munc13-1-Peptides bei m/z 597,01. Lys-4 ist mit Lys-14 quervernetzt. (B) ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten des modifizierten  $\alpha$ -Peptids [ $\alpha$  + Bu + 2H]<sup>2+</sup> bei m/z 463,76. (C) ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>3</sup>-Daten des modifizierten  $\beta$ -Peptids [ $\beta$  + Bu + H]<sup>+</sup> bei m/z 819,48.

#### Offline-Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie

Um eine breite massenspektrometrische Anwendbarkeit des Harnstoff-Reagenzes zu gewährleisten, wurden die Peptidgemische aus Munc13-1 und PPAR $\alpha$  auch per Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS analysiert. Im Gegensatz zu den niederenergetischen Fragmentierungsexperimenten mittels CID in der linearen Ionenfalle des LTQ-Orbitrap-Massenspektrometers wurde nun das Fragmentierungsverhalten in einem höherenergetischen Umfeld untersucht. Die kinetische Energie des Vorläuferions in CID-MS/MS-Experimenten liegt bei ungefähr 1 eV [99]; die kinetische Energie des Vorläuferions bei TOF/TOF-MS ist mit ungefähr 1 keV 1000 mal höher [184].

Mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifizierte Peptide (Typ 0) — Generell unterscheidet sich der Fragmentierungsmechanismus des Harnstoff-Reagenzes in MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Experimenten nicht von dem zuvor beschriebenen in ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Experimenten. Allerdings ist eine deutlichere Trennung zwischen den MS/MS- und den MS<sup>3</sup>-Daten sichtbar. Abbildung 3.23 zeigt das PPAR $\alpha$ -Peptid (Aminosäuren 259–272), das an Lys-267 mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert ist. Die MS/MS-Daten werden von den Signalen [M + Bu + H]<sup>+</sup> (m/z 1626,1) und [M + BuUr + H]<sup>+</sup> (m/z 1652,1) dominiert. Diese haben untereinander einen Abstand von 26 u (Abbildung 3.23 A).

Zusätzlich sind kleine Signale der Fragmentionen des Peptidrückgrates zu sehen – vor allem y-Fragmentionen. Interessant ist das Auftreten von internen Fragmenten: Das y<sub>10</sub>-Fragmention ist mit den drei möglichen Cross-Linker-Fragmenten  $\gamma$ -Aminobuttersäure (Bu, m/z 1228,5), 1,3-Oxazepan-2-on (BuUr, m/z 1254,5) und dem intakten Harnstoff-Reagenz (BuUrBu, m/z 1357,5) modifiziert. Die Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten der beiden höchsten Signale verifizieren die Peptidsequenz (Abbildungen 3.23 B und C).

Das mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifizierte tryptische Munc13-1-Spaltpeptid AKANWLR zeigte das gleiche Fragmentierungsverhalten (Anhang A.8).



Abbildung 3.23: (A) MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten des PPAR $\alpha$ -Peptides (Aminosäuren 259–272), das mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert ist. Die Basispeaks sind durch Neutralverluste von 103 u (m/z 1651,1) und 129 u (m/z 1626,1) aus dem Vorläuferion bei m/z 1754,9 entstanden. Die Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten dieser beiden Fragmente bestätigen die Aminosäuresequenzen der modifizierten Peptide (B) [M + Bu + H]<sup>+</sup> und (C) [M + BuUr + H]<sup>+</sup>.

Intrapeptidale Cross-Linking-Produkte (Typ 1) — Das intrapeptidal quervernetzte N-terminale PPAR $\alpha$ -Peptid (Aminosäuren 195–208,  $(m/z \ 1733,8)$  demonstriert deutlich den Vorteil des spaltbaren Harnstoff-Reagenzes gegenüber dem nicht spaltbaren Cross-Linker BS<sup>3</sup> (Abbildung 3.24). Der Basispeak bei m/z 1648,8 resultiert aus einem Neutralverlust von 85 u. Die Fragmentionen außerhalb des Cross-Links sind mit dem intakten Cross-Linker BuTuBu modifiziert (b<sub>10</sub>-b<sub>13</sub>). Innerhalb des Cross-Links (N-Terminus mit Lys-204) sind die Fragmentionen entweder mit einem Buttersäurefragment (Bu) oder einem 1,3-Oxazepan-2-on-Fragment (BuUr) modifiziert, die untereinander einen Massenabstand von 26 u aufweisen. In diesem Peptid wurden sechs "26 u-Dubletts" identifiziert (y<sub>5</sub>-y<sub>9</sub> und y<sub>11</sub>).



**Abbildung 3.24:** MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten eines intrapeptidal quervernetzten PPAR $\alpha$ -Peptids. Das *N*-terminale PPAR $\alpha$ -Peptid (Aminosäuresequenz 195–208) ist intrapeptidal mit dem Harnstoff-Reagenz quervernetzt. Der Basispeak bei m/z 1648,8 entstand durch einen charakteristischen Neutralverlust von 85 u aus dem Vorläuferion bei m/z 1733,8. Innerhalb des Cross-Links (*N*-Terminus mit Lys-204) sind die Fragmentionen entweder mit einem Buttersäurefragment (Bu) oder einem 1,3-Oxazepan-2-on-Fragment (BuUr) modifiziert, die untereinander einen Massenabstand von 26 u aufweisen.

Interpeptidale Cross-Linking-Produkte (Typ 2) — Die MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten zeigen eindrucksvoll anhand zweier "26 u-Dubletts", daß das Harnstoff-Reagenz bevorzugt gegenüber dem Peptidrückgrad gespalten wird. In Abbildung 3.25 A wird dies anhand zweier quervernetzter, tryptischer Munc13-1-Spaltpeptide bei m/z 1789,2 demonstriert. Fragmentionen des Peptidrückgrates sind nur in geringen relativen Intensitäten < 5% vorhanden. Die Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten verifizieren die Peptidsequenzen (Abbildungen 3.25 B und C).

Abbildung A.9 A (Anhang) zeigt ein Vernetzungsprodukt zwischen zwei Peptiden des PPAR $\alpha$ , in dem Lys-208 mit Lys-216 quervernetzt ist. Das "Signaldublett" mit 26 u der modifizierten  $\alpha$ -Peptide hat zwar niedrigere Intensitäten im Vergleich zu den  $\beta$ -Peptiden, jedoch liefert es aussagekräftige Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten (Abbildungen A.9 B und C). Eine vollständige Liste aller mit MALDI-TOF/TOF-MS/MS identifizierten Cross-Linking-Produkte befindet sich in Tabelle Anhang A.3.

#### Vom Cross-Linking-Typ abhängige Fragmente des Harnstoff-Reagenzes

Das Zusammenspiel von Neutralverlusten und charakteristischen Fragmentionen der quervernetzten Peptide erleichtert die automatische Identifizierung des Cross-Linking-Typs ganz wesentlich (Tabelle 3.4). Die Anzahl der "26 u-Dubletts" unterstützt die automatisierte Analyse – eine Verwechslung mit peptidtypischen Neutralverlusten wie zum Beispiel NH<sub>3</sub> (17 u), H<sub>2</sub>O (18 u) oder CO (28 u) ist ausgeschlossen. Die MS<sup>3</sup>-Daten bestätigen die Sequenzen der modifizierten Peptide.

Tabelle3.4:ZusammenfassungdercharakteristischenNeutralverluste(CNLs)undFragmentionen-Massenverschiebungen bei Verwendung des Harnstoff-Reagenzes zur Unterscheidung der verschiedenen Cross-Linking-Typen (sowohl in ESI-CID-MS/MS als auch MALDI-TOF/TOF-MS/MS).

Cross-Link	Hydrolysiert	Amidiert	Intrapeptidal	Interpeptidal
Тур	Typ 0	Typ 0	Typ 1	Typ 2
CNL	103 und 129 u	102  und  128  u	85 u	_
Anz. der 26 u-Dubletts	1	1	—	2



**Abbildung 3.25:** (A) MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten der quervernetzten tryptischen Spaltpeptide von Munc13-1 (Aminosäuren 3–9 und 10–15) bei m/z 1789,2. Die Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten bestätigen die Sequenzen der am Cross-Link beteiligten Peptide. (B1) Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\beta$ -Peptids [M + Bu + H]<sup>+</sup> bei m/z 819,4. (B2) Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\beta$ -Peptids [M + BuUr + H]<sup>+</sup> bei m/z 845,5. (C1) Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\alpha$ -Peptids [M + Bu + H]<sup>+</sup> bei m/z 943,5. (C2) Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\alpha$ -Peptids [M + BuUr + H]<sup>+</sup> bei m/z 969,5.

## 3.5 Cross-Linking mit der photoreaktiven Aminosäure Benzoylphenylalanin

In den in dieser Arbeit durchgeführten Cross-Linking-Studien wurden Ligandeninduzierte Konformationswechsel im PPAR $\alpha$  analysiert (Kapitel 3.3). Der Agonist YS81 schien PPAR $\alpha$  in einem anderen Modus als der Antagonist GW6471 zu binden. Es ist nicht auszuschließen, daß YS81 nicht mit der Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\alpha$  interagierte. Direkte intermolekulare Cross-Links zwischen dem Protein und dem Liganden würden detailliertere Informationen über deren Interaktion geben. Da die potentiellen PPAR $\alpha$ -Agonisten keine primären Amine enthalten, sind aminreaktive Cross-Linker wie NHS-Ester für diese Studien ungeeignet. Photoreaktive Cross-Linker stellen eine vielversprechende Alternative dar, da sie in C-H- und N-H-Bindungen inkorporiert werden [135] [137]. Allerdings steigt damit die Komplexität der Reaktionsgemische enorm an; die Identifizierung von intermolekularen Cross-Links würde durch eine hohe Falsch-Positiv-Rate erschwert werden. Um die Komplexität einzuschränken, wurde die photoreaktive Aminosäure Benzoylphenylalanin (Bpa) verwendet, die während der PPAR $\alpha$ -Expression an spezifischen Stellen inkorporiert wurde.

Hierzu wurden für eine ortsspezifische Mutagenese Primer synthetisiert, die das Codon der ursprünglichen Aminosäure des PPAR $\alpha$ -Plasmids in ein Amber-Stop-Codon TGA mutieren (Kapitel 2.1.7). Je PPAR $\alpha$ -Mutante wurde jeweils nur eine Aminosäure spezifisch gegen Bpa ausgetauscht. Es wurden bevorzugt hydrophobe Aminosäuren zu Bpa mutiert; besonders geeignet waren Phenylalanin und Leucin. Es wurde darauf geachtet, daß die Mutationen an der Oberfläche der hydrophoben Ligandenbindungstasche durchgeführt wurden. Tryptophan und Isoleucin kamen ebenfalls in Betracht, jedoch befand sich keine dieser Aminosäuren in dieser Region des PPAR $\alpha$ . Eine vielversprechende Mutation wurde mit Leu-258 durchgeführt, das sich auf der flexiblen  $\Omega$ -Schlaufe befindet (Abbildung 3.26). Um die Rolle der Aktivierungsfunktionshelix AF2 in Wechselwirkung mit potentiellen Agonisten zu untersuchen, wurden Leu-459 und Leu-460 zu einem Amber-Stop-Codon mutiert. Die Aminsäuren Phe-273 und Phe-318 wurden ebenfalls mutiert, da sie direkt auf der Oberfläche der Ligandenbindungstasche liegen. Die Mutationen von Lys-266, Lys-448 und Lys-449 sind kritisch zu betrachten, da die Oberflächenladung von PPAR $\alpha$  verändert wird.



**Abbildung 3.26:** Benzoylphenylalanin (Bpa)-Mutanten von PPARα. Aminosäuren, die gegen Bpa ausgetauscht wurden, sind magenta (Leu), rot (Phe) und blau (Lys) markiert. Es wurde jeweils nur eine Aminosäure ausgetauscht. Die Helices H3, H5, H7, H11 und AF2 flankieren die Ligandenbindungstasche (weißes Kugelmodell) und sind gelb gefärbt.

Ein PPARα-Plasmid mit der gewünschten Stop-Codon-Mutation wurde zusammen mit dem Plasmid pEvol-pBpF in *E. coli* BL21(DE3) cotransformiert (Kapitel 2.1.8). Der ursprünglich verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup> RIL wurde nicht verwendet, da dieser zur Selektion wie das pEvol-pBpF-Plasmid ein Chloramphenicol-Resistenzgen enthält.

Die Expressionsbedingungen des Wildtyps von PPAR $\alpha$  (Kapitel 2.3.1) wurden hierzu leicht variiert: Es wurde eine 2 mM Bpa-Stammlösung in MilliQ-H<sub>2</sub>O durch Aufkochen in der Mikrowelle hergestellt, da die Stabilität von Bpa nach dem Autoklavieren nicht gewährleistet ist. Das TB-Medium wurde doppelt konzentriert autoklaviert und anschließend im Verhältnis 1:1 (v/v) mit der Bpa-Stammlösung vereinigt.

Erste Expressionstests der PPAR $\alpha$ -Mutanten L258Bpa, F273Bpa (Abbildung 3.27) und F318Bpa, die einen *C*-terminalen His-Tag enthalten (Kapitel 2.3.2), ergaben nur



**Abbildung 3.27:** Expressionstest der Mutante CHis-PPARαF273Bpa in *E. coli* BL21(DE3). Es wurden 1ml-Fraktionen nach 2, 18, 22 und 25 h entnommen und aufgearbeitet. M: Molekulargewichtsmarker; T: Totallysat; I: Einschlußkörper (*Inclusion Bodies*); S: Überstand (*Supernatant*). Die Fraktionen wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE (links) und Western Blots unter Verwendung eines Anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers (rechts) analysiert.

unlösliches PPAR $\alpha$  als Einschlußkörper (*Inclusion bodies*). Jedoch wurde gezeigt, daß Bpa erfolgreich an der Position der Stop-Codons inkorporiert wurde, da jede PPAR $\alpha$ -Mutante in voller Länge (Molekulargewicht 32 kDa) exprimiert wurde. Die Analytik erfolgte mittels eindimensionaler SDS-PAGE sowie Western-Blots unter Verwendung eines Anti-His<sub>6</sub>-Antikörpers (Abbildung 3.27). Massenspektrometrische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt, da der Aufwand der Probenvorbereitung und Meßzeit nur für die Analytik löslicher PPAR $\alpha$ -Fraktionen sinnvoll gewesen wäre.

# 4 Diskussion und Ausblick

# 4.1 Expression und Reinigung der Ligandenbindungsdomäne von PPARα

Zu Beginn eines *in vitro* durchgeführten chemischen Cross-Linking-Experimentes ist es bedeutend, die zu untersuchenden Protein/Protein- oder Protein/Ligand-Komplexe in möglichst reiner Form vorzulegen. Erste Expressionsversuche der Ligandenbindungsdomäne von PPAR $\alpha$  in *E. coli* BL21(DE3) für 3–6 Stunden bei 24 °C führten jedoch hauptsächlich zu unlöslichen Einschlußkörpern (*Inclusion bodies*) [32]. Daher wurden einige Schritte des Expressionsprotokolls optimiert, um eine höhere Ausbeute an löslichem PPAR $\alpha$  zu erhalten: Es wurde das reichhaltigere, auf pH 7,5 gepufferte TB-Medium anstelle des ungepufferten LB-Mediums verwendet, um eine höhere optische Dichte der *E. coli*-Kulturen zu erreichen. Bei längeren Expressionszeiten in LB-Medium sinkt der pH-Wert ab, wodurch die Expression von Proteinen stark verzögert oder sogar beendet wird.

Statt *E. coli* BL21(DE3) wurde der optimierte Stamm *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup> RIL verwendet. Das PPAR $\alpha$ -Insert, das auf dem Plasmid pCMV-PPAR $\alpha$  zur Verfügung gestellt wurde, enthielt zwölf humane Codons, die von *E. coli* nur selten verwendet werden. Während der Genexpression wäre es mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation gekommen [185]. Der in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup> RIL codiert zusätzliche tRNAs für die humanen Codons der Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Leucin, die von *E. coli* sonst selten erkannt werden. Die Verwendung des *E. coli* BL21(DE3) CodonPlus<sup>®</sup> RIL resultierte in höheren Ausbeuten an löslichem Protein als die Verwendung von E. coli BL21(DE3).

Da die Proteinfaltung den kinetisch limitierenden Schritt der Genexpression darstellt, wurden Bedingungen gewählt, die einen langsamen Induktionsstart und niedrige Translationsgeschwindigkeiten ermöglichen. Die *E. coli*-Kulturen wurden nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,9 auf 18 °C gekühlt; die Endkonzentration des IPTG wurde auf 0,1 mM verringert. Die Expressionstemperatur wurde auf 18 °C verringert und ausgleichend die Dauer der Kultivierung auf 20 h erhöht. Diese Strategie erwies sich als sehr erfolgreich: Die Feuchtmasse der anschließend isolierten Zellen erhöhte sich von 5 g/L Kultur auf 15 g/L Kultur.

Zur Lyse der Zellen wurden möglichst schonende Bedingungen gewählt, damit das löslich exprimierte PPAR $\alpha$  nicht präzipitiert. Eine vorangehende enzymatische Lyse bei 4 °C in Gegenwart von Lysozym, das die Zellwände von *E. coli* lysiert, und Benzonase<sup>®</sup>, die Nukleinsäuren spaltet, reduzierte die Dauer des anschließend durchgeführten Ultraschallaufschlusses auf 30 Sekunden.

Die chromatographische Reinigung von PPAR $\alpha$  mittels Ni-Affinitätschromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie führte nach einer Kontrolle mittels SDS-PAGE zu mehr als 95 % reinem Protein. Der pH-Wert des HEPES-Puffers, in dem das Protein am Ende der Reinigung vorlag, wurde auf einen Wert von 8,0 eingestellt. Tris-Puffer war wegen der anschließend geplanten Cross-Linking-Experimente mit aminreaktiven NHS-Estern nicht geeignet, da Tris selbst primäre Amine enthält. Zusätzlich enthielt der verwendete Puffer 150 mM NaCl, um die Löslichkeit von PPAR $\alpha$  zu erhöhen. PPARs sind nukleäre Proteine, die unter reduzierenden Bedingungen aktiv sind. Daher wurden alle Reinigungsschritte in Gegenwart von 1 mM TCEP durchgeführt. Die Zugabe von 10 % Glycerol verhinderte die Aggregation der Ligandenbindungsdomänen von PPAR $\alpha$ , die durch die fehlende DNA-bindende Domäne begünstigt wird.

Durch diese optimierten Bedingungen wurden 50 mg/l Kultur lösliches PPAR $\alpha$  exprimiert und gereinigt – ca. fünf mal mehr als in einem früheren Protokoll [32].

Ein anderer Ansatz für die Expression und Reinigung von PPAR $\alpha$  wird von Velkov *et al.* beschrieben: Die Ausbeute löslichen Proteins wurde weiter erhöht, indem die *E. coli*-Kultur in Gegenwart des PPAR $\alpha$ -Agonisten Fenofibrat durchgeführt wurde, der die Struktur des Proteins stabilisiert und die Bildung nichtlöslicher Einschlußkörper reduziert [186]. Da jedoch in den anschließenden Cross-Linking-Studien auch freies PPAR $\alpha$ als Negativkontrolle eingesetzt wird und eine vollständige Abtrennung des Liganden nicht gewährleistet werden kann, kam dieses Protokoll in dieser Arbeit nicht zur Anwendung.

### 4.2 Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Chemisches Cross-Linking in Kombination mit hochauflösender Massenspektrometrie etablierte sich in den vergangenen zehn Jahren als alternative Methode zu NMR-Spektroskopie und Kristallographie zur Strukturaufklärung von Protein-Protein- und Protein-Liganden-Komplexen. Die daraus experimentell ermittelten Distanzbeschränkungen zwischen funktionellen Gruppen der interagierenden Proteine dienten als Grundlage für strukturelle Modellberechnungen, beispielsweise des Calmodulin/Adenylatcyclase 8-Komplexes [147] [148]. Die Technik des chemischen Cross-Linkings eignet sich zudem zur Konformationsanalyse von Membranproteinen, z. B. Rhodopsin (*Rind*) [187]. Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie erfährt diese Methode keine Größenlimitierung. Beispielsweise wurden die mehr als 100 kDa großen Komplexe der *N*-terminalen Laminin- $\beta$ 1und - $\gamma$ 1-Domänen [188] und die Quartärstruktur des Annexin A2/S100A10(p11) charakterisiert [189]. Der aus 15 Untereinheiten bestehende, 670 kDa große Komplex zwischen der RNA-Polymerase-II und dem Transkriptionsinitiationsfaktor TFIIF stellt das bisher größte untersuchte Proteinsystem dar [129].

Die bisherigen Cross-Linking-Studien charakterisierten Protein-Protein- oder Protein-Nukleinsäure-Komplexe [190]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sich diese Technik auch zur Untersuchung der Interaktionen zwischen Proteinen und kleinen Molekülen, z. B. Arzneistoffen, eignet.

Zur Etablierung der chemischen Bedingungen der Cross-Linking-Experimente wurde ein pH-Wert von 8,0 eingestellt, der den optimalen Lagerungsbedingungen des nukleären Proteins PPAR $\alpha$  entspricht [32] [33]. Auch wenn der pH-Wert im Nukleus bei ungefähr 7,4 liegt, sind stoffwechselbedingte Schwankungen nicht ungewöhnlich [191]. Daher wurde der pH-Wert von 8,0 beibehalten, da unter leicht basischen Bedingungen mehr Cross-Linking-Produkte mit NHS-Estern zu erwarten sind [130] [131]. Als Reaktionszeit erwiesen sich 60 Minuten als optimal; ein 100-facher molarer Überschuß der eingesetzten Cross-Linking-Reagenzien resultierte in einer aussagekräftigen Anzahl quervernetzter Aminosäuren, ohne die Proteolysebedingungen mit Trypsin durch eine zu hohe Anzahl modifizierter Lysine einzuschränken. Zusätzlich wurde die Endoproteinase AspN verwendet, die *N*-terminal an Asparaginsäure- und Glutaminsäureresten schneidet, um Spaltpeptide von 500 bis 4000 Da zu erhalten. Die zu untersuchenden Liganden (Antagonist GW6471 und potentieller Agonist YS81, Abbildung 3.4) waren im millimolaren Bereich nicht in  $H_2O$  löslich. Daher wurden für jeden Liganden 1000-fach konzentrierte Stammlösungen in DMSO hergestellt, die für die Cross-Linking-Experimente eingesetzt wurden.

Es wurden die weitverbreiteten aminreaktiven NHS-Ester BS<sup>3</sup> (Spacer-Länge 11, 4 Å) und BS<sup>2</sup>G (Spacer-Länge 7, 7 Å) als Cross-Linking-Reagenzien verwendet (Tabelle 1.1). Der äquimolare Einsatz der nicht-deuterierten ( $D_0$ ) und vierfach-deuterierten ( $D_4$ ) Reagenzien resultierte in charakteristischen 4-amu-Abständen in den Massenspektren. Dadurch ließen sich quervernetzte Peptide aus komplexen Mischungen herausfiltern und gezielt analysieren.

Erste massenspektrometrische Untersuchungen der proteolytischen Spaltpeptide wurden mittels Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Trotz der  $D_0/D_4$ -Isotopenmarkierung der quervernetzten Peptide enthielten die Listen potentieller Cross-Linking-Produkte einen hohen Anteil falscher positiver Identifizierungen. Mathematisch betrachtet ist dies nicht ungewöhnlich: Ein theoretisches Cross-Linking-Experiment von Lysozym (Molekulargewicht 14, 3 kDa ohne *N*-terminales Signalpeptid) mit BS<sup>3</sup> resultierte in fünf verschiedenen Vorschlägen für ein protoniertes Molekül der Masse 2791, 340 u, darunter vier mögliche Cross-Linking-Produkte und eine mögliche Modifikation mit hydrolysiertem BS<sup>3</sup>, siehe Tabelle 4.1.

Folglich lassen sich die korrekten Cross-Linking-Produkte trotz des Einsatzes isotopenmarkierter Cross-Linker nur anhand qualitativ hochwertiger MS/MS-Daten zuordnen. Die Qualität der MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten wirkte limitierend, da durch

**Tabelle 4.1:** Theoretisches Cross-Linking-Experiment mit Lysozym und BS<sup>3</sup>, das mit der Software GPMAW durchgeführt wurde [125]. Für ein Signal bei m/z 2791,340 werden fünf verschiedene Modifikationen mit BS<sup>3</sup> vorgeschlagen. Der *N*-Terminus von Lysozym wird durch die Aminosäure Lys-1 repräsentiert. Wird das *N*-terminale primäre Amin modifiziert, wobei die Seitenkette von Lys-1 unmodifiziert bleibt, ist eine tryptische Spaltung *C*-terminal von Lys-1 möglich.

$\left[\mathrm{M}+\mathrm{H}\right]^{+}_{\mathrm{theor}}$	Sequenz 1	Sequenz 2	Cross-Linking-Typ
2791,340	102 - 119	97–101	interpeptidal
2791,340	97 - 119		hydrolysiert
2791,340	113–119	97 - 112	interpeptidal
2791,340	115–119	97–114	interpeptidal
2791,340	1–1	98–119	interpeptidal

Lysin-Modifikationen potentielle Träger positiver Ladungen verlorengingen. Die Laserinduzierte Dissoziation-(LID)-MS/MS-Daten interpeptidaler Cross-Linking-Produkte resultierten häufig in einer Abspaltung der y<sub>1</sub>-Fragmentionen beider quervernetzter Peptide; weitere Spaltpeptide waren aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses nicht analysierbar. Seltener gelang es, interpretierbare LID-MS/MS-Daten zu erzeugen, wenn ein großes  $\alpha$ -Peptid durch ein wesentlich kleineres  $\beta$ -Peptid modifiziert wurde. Hier war es immerhin möglich, die Sequenz des  $\alpha$ -Peptides zu ermitteln. Die MALDI-TOF/TOF-Tandem-Massenspektrometrie eignet sich daher hervorragend für die Analytik von Proteinmodifikationen (beispielsweise durch hydrolysierte Cross-Linker modifizierte Peptide), jedoch weniger für die Sequenzierung quervernetzter Peptide.

Aus diesem Grunde wurde die Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS zur Analytik quervernetzter Peptide angewendet. Jedem hochaufgelösten Massenspektrum (R = 60 000, analysiert in der Orbitrap) folgten CID-MS/MS-Experimente der drei höchstabundanten Ionen, die in der LTQ fragmentiert und in der Orbitrap (R = 15 000) analysiert wurden. Diese Methode ermöglichte kleine Arbeitszyklen (*Duty Cycles*) von zwei Sekunden und einen hohen dynamischen Bereich bis  $1 \cdot 10^5$ , um auch die niederabundanten Signale der quervernetzten Peptide zu analysieren. Dank der hohen Massengenauigkeit von maximal 3 ppm (Tabellen 3.2 und 3.3) reduzierte sich die Liste möglicher Cross-Linking-Daten, jedoch verblieb die manuelle Kontrolle der MS/MS-Daten sehr zeitaufwendig.

Die Cross-Linking-Studien des PPAR $\alpha$ /Antagonist-Komplexes resultierten in zwei relativ großen überbrückten Distanzen zwischen  $N_{\epsilon}$ -Atomen der Lysine (ca. 32 und 36 Å der Röntgenstruktur), an denen hochflexible Bereiche des PPAR $\alpha$  ( $\Omega$ -Schlaufe und Aktivierungsfunktionshelix AF2, Abbildung 3.6) involviert waren. Diese Daten bestätigten die Annahme, daß Antagonisten im Falle einer Bindung die "geschlossene Proteinkonformation" stabilisieren: Die AF2 und die  $\Omega$ -Schlaufe verschließen den Eingang der Ligandenbindungstasche [186]. Dieser Befund wird auch durch NMR-Studien gestützt [192].

Im Gegensatz dazu zeigten die Cross-Linking-Experimente in Gegenwart des potentiellen PPAR a-Agonisten YS81, einem Pyrinixinsäurederivat, keine Konformationsänderung in der flexiblen  $\Omega$ -Schlaufe und der Helix AF2. Möglicherweise weist der Agonist YS81 ein anderes Bindungsverhalten als die klassischen Agonisten aus der Stoffklasse der Fibrate auf. Die geringere Anzahl an quervernetzten Lysinen läßt auf eine weniger stabile Konformation von PPAR $\alpha$  schließen. Die Daten ähneln sich dem Quervernetzungsmuster des freien PPAR $\alpha$ . Röntgenkristallographische Studien legen die Vermutung nahe, daß die Ligandenbindungstasche sowohl in freiem PPAR $\alpha$  als auch im PPAR $\alpha$ /Agonist-Komplex eine ähnlich stabile Konformation einnimmt [32]. Auch in Abwesenheit eines Liganden scheint eine gewisse PPAR-Basalaktivität zu gewährleisten, daß die Helix AF2 übergangsweise einen stabilen Konformationszustand einnimmt [193]. Da keine spezifischen Cross-Linking-Produkte innerhalb von PPAR $\alpha$  in Gegenwart des Agonisten gefunden wurden, ist nicht auszuschließen, daß PPAR $\alpha$  nach Bindung eines Agonisten eine andere Konformation als nach Bindung eines Antagonisten einnimmt. Es kann spekuliert werden, ob PPAR $\alpha$  nach Bindung des Agonisten eine definierte Struktur aufweist oder ob sich PPAR $\alpha$  in einem Gleichgewicht mehrerer Konformationen befindet.

Sämtliche bisher beschriebenen Studien wurden mit einer PPAR $\alpha$ -Variante durchgeführt, die einen *C*-terminalen His-Tag enthält. Diese Experimente wurden mit der *N*terminal durch einen His-Tag markierten PPAR $\alpha$ -Variante wiederholt. Die Daten beider Experimente stimmten überein und bestätigten, daß der His-Tag keinen Einfluß auf die Aktivität der Akivierungsfunktionshelix AF2 nimmt.

Wie hier gezeigt werden konnte, bietet sich chemisches Cross-Linking und eine anschließende massenspektrometrische Analyse als vielversprechende Alternative zu Konformationsstudien von Protein-Ligand-Komplexen im Femtomol-Maßstab an, die weder mittels Röntgenkristallographie noch mittels NMR-Methoden charakterisiert werden können. Ein Screening des unterschiedlichen Bindungsverhaltens einer Ligandenbibliothek auf ein bestimmtes Zielprotein scheint durchführbar. In Zukunft sind weitere Optimierungsschritte im Cross-Linker-Design und in der zur MS-Datenanalyse verwendeten Software unumgänglich, um ein Screening von Protein-Ligand-Komplexen im Hochdurchsatz-Maßstab zu ermöglichen.

### 4.3 Entwicklung MS-spaltbarer Cross-Linker

### 4.3.1 "Edman"-Reagenz

Als Alternative zu den bislang am häufigsten verwendeten isotopenmarkierten Cross-Linking-Reagenzien wurden MS-spaltbare Reagenzien entwickelt, die eine gezielte und automatisierbare  $LC/MS^n$ -Analyse anhand von spezifischen Neutralteilchen-Verlusten der Cross-Linking-Reagenzien ermöglichen.

Das Fragmentierungsverhalten des "Edman"-Reagenzes zeigte, daß spezifische Neutralverluste durch die labile Glycylprolin-Peptidbindung des Reagenzes den Typ der Quervernetzung definieren (Kapitel 3.4.2). Hydrolysierte Cross-Linker ließen sich durch einen Neutralverlust von 172 u bzw. 202 u (je nach Orientierung des Linkers) eindeutig von intrapepidalen Cross-Links mit einem Neutralverlust von 184 u unterscheiden. Die Fragmentionen des Peptidrückgrades wiesen geringere Intensitäten auf, erlaubten aber die Bestätigung der Aminosäuresequenzen anhand von MS<sup>3</sup>-Daten.

Theoretisch betrachtet weisen ein intrapeptidaler Cross-Link (CNL 184 u) und ein hydrolysierter Cross-Link mit anschließender Wasser-Abspaltung dieselben Neutralteilchenverluste auf (CNL 202 u - 18 u führt zu CNL 184 u). Dies würde jedoch bedeuten, daß der hydrolysierte Cross-Linker in der zweiten möglichen Orientierung (CNL 172 u) ebenfalls einen Wasserverlust aufweisen sollte, sodaß auch ein Neutralverlust von 154 u beobachtet werden sollte. In sämtlichen MS/MS-Daten intrapeptidal quervernetzter Peptide wurde jedoch nie ein Neutralverlust von 154 u beobachtet, was somit die eindeutige Unterscheidung von intrapeptidalen und hydrolysierten Cross-Links erlaubt.

#### 4.3.2 Thioharnstoff-Reagenz

Durch die große *Spacer*-Länge des "Edman"-Reagenzes von 16,7 Å verringerte sich die Wahrscheinlichkeit, interpeptidale Cross-Links zu identifizieren. In den unter Kapitel 3.4.2 beschriebenen Untersuchungen wurden im "Edman"-Reagenz zwei weitere Fragmentierungsstellen an der Thioharnstoff-Funktionalität identifiziert, die den Ausschlagspunkt gaben, ein kürzeres, wesentlich einfacher zu synthetisierendes Thioharnstoff-Reagenz zu entwickeln.

Fragmentierungs-Experimente mittels MALDI-TOF/TOF-MS/MS am Peptid Substanz P und dem Protein Lysozym zeigten, daß das Thioharnstoff-Reagenz zu beiden Seiten der zentralen Thiocarbonylgruppe bevorzugt gespalten wird (Kapitel 3.4.3). Allerdings gelang es nicht, eindeutig zwischen hydrolysierten Cross-Links und intrapeptidalen Cross-Links zu unterscheiden. Es ließ sich nicht ausschließen, daß durch die hohe Nucleophilie des Thioharnstoff-Schwefels beide Cross-Linking-Produkte zu einem 2-Alkylylimino-[1,3]thiazepan-7-on (212 u) umgelagert werden. Durch die Symmetrie des Reagenzes ließen sich im Gegensatz zum "Edman"-Reagenz keine Kontrollanalysen anhand der Orientierung des Reagenzes durchführen.

Die MALDI-TOF-Massenspektren zeigten einen weiteren Neutralverlust von 74 u, der vermutlich während des MALDI-Prozesses in der Ionenquelle auftrat. Unterstützend spricht hierfür, daß diese Signale mit einem Neutralverlust von 74 u grundsätzlich in der gleichen HPLC-Fraktion detektiert wurden wie die Peptidmodifikationen mit einem intakten Thioharnstoff-Reagenz. Die MS/MS-Daten beider Spezies bestätigten, daß es sich um die gleichen Peptide mit unterschiedlichen Modifikationen handelte. Durch die Massengenauigkeit der MS/MS-Daten von ca. 0,5 amu war es allerdings nicht möglich,
eine exakte Summenformel des Neutralverlustes von 74 u zu bestimmen.

In den ESI-LTQ-Orbitrap-Massenspektren wurde der Neutralteilchenverlust von 74 u nicht beobachtet. Im Gegensatz zum "Edman"-Reagenz ist es hier gelungen, zwischen den MS/MS-Daten (nur Fragmentierung des Thioharnstoff-Reagenzes) und den MS<sup>3</sup>-Daten (Fragmentierung des Peptidrückgrades) zu unterscheiden (Kapitel 3.4.3). Die Analyse des Lysozym-Peptides der Aminosäuresequenz 6–14 (CELAAAMKR) offenbarte, daß hydrolysierte Cross-Linker ein Fragmentierungsverhalten analog zu dem intrapeptidaler Cross-Links zeigen können. In diesem Fall kommt allein Lys-13 in Betracht, mit einem hydrolysierten Cross-Linker modifiziert zu werden. Eine intrapeptidale Quervernetzung dieses Peptides ist nicht möglich, da allein die Seitenkette des Lys-13 von aminreaktiven NHS-Estern, wie dem Thioharnstoff-Reagenz, modifiziert werden kann.

Sowohl per MALDI-TOF/TOF- als auch per ESI-LTQ-Orbitrap-Tandemmassenspektrometrie wurde bestätigt, daß der *N*-Terminus von Lysozym mit Lys-97 quervernetzt ist. Jedoch wurden keine Signale identifiziert, die auf eine spezifische Fragmentierung des Thioharnstoff-Reagenzes schließen lassen. Daher ist es nötig, das Reagenz an den Buttersäuregruppen so zu derivatisieren, daß die hohe Nucleophilie des Thioharnstoff-Schwefels abgeschwächt wird, um das Fragmentierungsverhalten des Cross-Linking-Reagenzes in der Gasphase zu steuern.

#### 4.3.3 Harnstoff-Reagenz

Zum besseren Verständnis der zentralen Thioharnstoffgruppe des Thioharnstoff-Reagenzes wurde ein analoges Harnstoff-Derivat synthetisiert. Die Analyse des synthetischen Munc13-1-Peptides, das mit dem Harnstoff-Reagenz modifiziert und anschließend mit Trypsin gespalten wurde, zeigte die hohe Komplexität der tryptischen Spaltprodukte dieses einfachen Systems nach dem Cross-Linking-Experiment (Kapitel 3.4.4). Nach einer Nano-HPLC-Trennung und nachfolgender Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS<sup>n</sup>-Analyse wurden 120 verschiedene Spaltprodukte des modifizierten Munc13-1-Peptides identifiziert.

Die MS/MS-Daten erlaubten nun eine eindeutige Zuordnung des Typs der Querver-

netzung: Hydrolysierte Cross-Linker wiesen charakteristische Neutralverluste von 103 u bzw. 129 u auf, was sich im Auftreten von "Dublett"-Signalen mit einem Massenabstand von 26 u in den Fragmentionenmassenspektren manifestierte. Intrapeptidale Cross-Links hingegen waren durch einen Neutralverlust von 85 u gekennzeichnet. Interpeptidale Cross-Links zeigten keine charakteristischen Neutralverluste (Tabelle 3.4). Die Anzahl der "26 u-Dubletts" verifizierte die Analytik des Quervernetzungstyps. Die Sequenzen der modifizierten Peptide wurden anhand niederabundanter Fragmentionen in den Tandemmassenspektren zugeordnet und mit MS<sup>3</sup>-Daten bestätigt.

Sämtliche Fragmentierungen wurden mittels CID in der linearen Ionenfalle (LTQ) durchgeführt; die Fragmentionen wurden wahlweise in der LTQ oder in der Orbitrap detektiert. Zur Optimierung der Kollisionsenergie der MS/MS-Experimente wurden die relativen Kollisionsenergien in 5%-Schritten von 5% bis 50% variiert. Für eine bevorzugte Spaltung des Harnstoff-Reagenzes aller modifizierten Peptide genügte eine relative Kollisionsenergie von 20%. Alternativ wurde eine HCD-Fragmentierung in dem der C-Trap nachgeschalteten Octapol im gleichen Bereich dieser Kollisionsenergien untersucht; diese Fragmentierungstechnik brachte jedoch bis auf eine etwas bevorzugte Bildung kleinerer Fragmentionen keine Vorteile.

Da die Basispeaks in den Fragmentionenspektren durch bevorzugte Fragmentierungen des Harnstoff-Reagenzes entstanden, während die Peptidsequenzen dieser Spaltprodukte intakt blieben, war es nun möglich, eine zielorientierte MS<sup>n</sup>-Methode zu entwickeln (Kapitel 2.4.3, Abbildung 2.2 B2). Um den Arbeitszyklus so kurz wie möglich zu halten, wurden die MS/MS-Daten in der Orbitrap detektiert und parallel dazu die MS<sup>3</sup>-Daten in der linearen Ionenfalle detektiert. Die Orbitrap eignete sich wegen der eingeschränkten Sensitivität nicht für die Detektion der MS<sup>3</sup>-Daten – die LTQ-Detektion ist ca. zehnmal sensitiver [105].

Die charakteristischen Neutralverluste ermöglichten eine bevorzugte  $MS^3$ -Fragmentierung der Cross-Linking-Produkte, während hochabundante, unmodifizierte Peptide ausgeschlossen wurden. Da interpeptidal quervernetzte Peptide keine Neutralverluste aufweisen, wurden sie mittels dieser  $MS^n$ -Methode kaum fragmentiert. Da die charakteristischen Neutralverluste in den Fragmentionenspektren aller verschiedener Quervernetzungs-Typen von einer unterschiedlichen Anzahl an "26 u-Dubletts" begleitet werden, wäre es sinnvoll, diese "Dubletts" zur bevorzugten MS<sup>3</sup>-Fragmentierung zu nutzen.

Die MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten zeigten im Gegensatz zu den ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS-Daten eine schärfere Trennung zwischen der Fragmentierung des Harnstoff-Reagenzes (MS/MS-Daten) und der Fragmentierung des Peptidrückgrades (Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten). Besonders hervorzuheben ist die insgesamt effizientere Fragmentierung intrapeptidal quervernetzter Peptide im Vergleich zum nicht-spaltbaren Cross-Linker BS<sup>3</sup>. Alle internen Fragmente – sowohl das Harnstoff-Reagenz als auch das Peptid wurden zwischen den überbrückten Aminosäuren gespalten – weisen Massenabstände von 26 u auf und erleichtern die Sequenzierung intrapeptidal quervernetzter Peptide mit dem Harnstoff-Reagenz.

Die MS/MS-Daten interpeptidal quervernetzter Peptide sind durch zwei "26 u-Dubletts" des  $\alpha$ -Peptids sowie des  $\beta$ -Peptids gekennzeichnet. So ist es nun möglich, die Molekulargewichte beider quervernetzter Peptide zu bestimmen.

Die MS-spaltbaren Reagenzien ermöglichen somit eine automatisierte Identifizierung der Cross-Linking-Produkte und reduzieren das Auftreten falsch-positiver Zuordnungen.

### 4.4 Inkorporation photoreaktiver Aminosäuren in PPAR $\alpha$

Bisherige PPAR $\alpha$ /Liganden-Interaktionsstudien mittels chemischen Cross-Linkings unter Verwendung aminreaktiver NHS-Ester und einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse ergaben keine direkten Quervernetzungen zwischen Protein und Ligand, da die verfügbaren PPAR $\alpha$ -Agonisten keine primären Amin-Funktionalitäten aufweisen. Daher wurden PPAR $\alpha$ -Varianten entwickelt, die eine photoreaktive Aminosäure enthalten. Pro PPAR $\alpha$ -Variante wurde lediglich eine Aminosäure zu Benzoylphenylalanin (Bpa) mutiert, um die Komplexität der erhaltenen Photo-Cross-Linking-Produktgemische mit potentiellen Agonisten einzugrenzen.

Es wurden acht verschiedene Expressionsplasmide hergestellt (Kapitel 2.1.8), die je ein

Amber-Stop-Codon zum Einbau von Bpa enthalten [141]. Als Grundlage der Mutationen diente das Plasmid pMM CHisPPAR $\alpha$ WT (Kapitel 2.1.8), das einen *C*-terminalen His-Tag enthält. Die ersten Expressionstests (Kapitel 3.5) wurden mittels eindimensionaler SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse dokumentiert und bewiesen, daß das Bpa erfolgreich in PPAR $\alpha$  inkorporiert wurde. Andernfalls wäre die Expression an der Stelle des Amber-Stop-Codons vorzeitig abgebrochen, was im Auftreten kürzerer PPAR $\alpha$ -Varianten resultiert hätte. Durch den *C*-terminalen His-Tag wurde gewährleistet, daß anschließend nur vollständig exprimiertes PPAR $\alpha$  affinitätschromatographisch gereinigt wurde.

Unter den bisherigen Expressionsbedingungen (Kapitel 2.3.2) wurden im Vergleich zum PPAR $\alpha$ -Wildtyp geringere Ausbeuten an unlöslichem Bpa-PPAR $\alpha$  erzielt. Einen limitierenden Faktor stellte die schlechte Löslichkeit des Bpa im TB-Medium dar, das zur Kultivierung von *E. coli* verwendet wurde. Löslichkeitstests ergaben, daß statt einer wäßrigen Lösung eine Bpa-Stammlösung in 200 mM NaOH verwendet werden sollte, um eine bessere Zugänglichkeit des Bpa während der Translation zu gewährleisten.

Weiterhin ist geplant, das Expressionsplasmid zu verändern, um eine Abspaltung des His-Tags zu ermöglichen. Die PPAR $\alpha$ -Variante mit dem *C*-terminalen His-Tag enthält keine Erkennungssequenz (z. B. Thrombin- oder TEV-Protease-Schnittstelle), um den His-Tag proteolytisch abzuspalten. Es wurde bereits PPAR $\alpha$  mit einem *N*-terminalen His-Tag und einer Thrombin-Schnittstelle hergestellt (Plasmid pMM NHisPPAR $\alpha$ WT), jedoch gelang die Abspaltung des His-Tags mit Thrombin weder bei 4 °C noch bei Raumtemperatur.

Eine Subklonierung der PPAR $\alpha$ Bpa-Inserts von pMM CHisPPAR $\alpha$ WT nach pET-15b (Kapitel 2.1.8) würde einen *N*-terminalen His-Tag anfügen, der mit rekombinant hergestellter TEV-Protease (Plasmid pTH-24 [170]) abspaltbar ist. Somit könnten Photo-Cross-Linking-Reaktionen mit PPAR $\alpha$ -Varianten durchgeführt werden, die außer der Bpa-Mutation keine weiteren Aminosäuren tragen, die sie von der PPAR $\alpha$ -Aminosäuresequenz unterscheiden.

### 4.5 Ausblick

Chemisches Cross-Linking mit anschließender hochauflösender Massenspektrometrie in Kombination weiterer Techniken (Elektronenmikroskopie, Computational Modeling) stellt in der Strukturaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen zunehmend eine Alternative zu den etablierten Techniken wie NMR und der Röntgenkristallographie dar. Hochauflösende Massenspektrometer werden in Zukunft mit höheren Auflösungen, höheren dynamischen Breiten und kürzeren Arbeitszyklen die Analytik quervernetzter Peptide erleichtern. Durch hohe Massengenauigkeiten allein sind bereits Grenzen erreicht, sodaß MS-spaltbare Cross-Linking-Reagenzien mit erweiterten Funktionalitäten (thiolreaktiv, photoreaktiv) in Betracht kommen. Eine angepaßte Software wird eine datenabhängige Analytik quervernetzter Peptide erleichtern, sodaß sich neben bereits automatisierten Methoden der qualitativen und quantitativen Proteomik auch automatisierte Methoden der strukturellen Proteomik etablieren werden.





**Abbildung A.1:** (A) CID-MS/MS-Daten des doppelt geladenen hydrolysierten  $D_0$ -BS<sup>2</sup>G-Cross-Linking-Produktes (m/z 451,76) von PPAR $\alpha$  (Aminosäuresequenz 251–257) in Gegenwart des Antagonisten GW6471, die in der LTQ akquiriert und analysiert wurden. Das auf der  $\Omega$ -Schlaufe liegende Lys-252 wurde modifiziert. (B) CID-MS/MS-Daten des doppelt geladenen intrapeptidalen  $D_4$ -BS<sup>3</sup>-Cross-Linking-Produktes (m/z536,84) von PPAR $\alpha$  (Aminosäuresequenz 202–209) in Gegenwart des Antagonisten GW6471. Die auf der *N*-terminalen Helix 1 liegenden Lys-204 und Lys-208 wurden quervernetzt.

[M + TT]+	[] M   TT]+		Time 1	VI	С	A
$[M + H]_{exp}$	$[M + H]_{theor}$	ppm	Ligand	XL	Sequenz	Aminosäuren
$930,\!5504$	$930,\!5506$	$^{0,2}$	-	$BS^3$	DLKSLAK	204
930,5474	$930,\!5506$	$^{3,2}$	GW6471	$BS^3$	DLKSLAK	204
930,5474	930,5506	3,4	YS81	$BS^3$	DLKSLAK	204
730,4456	730,4458	0,3	_	$BS^3$	SLAKR	208
730,4452	730,4458	$^{0,8}$	GW6471	$BS^3$	SLAKR	208
730,4460	730,4458	$^{0,3}$	YS81	$BS^3$	SLAKR	208
1086,6510	1086,6517	$0,\!6$	_	$BS^3$	DLKSLAKR	204, 208
$1086,\!6506$	1086,6517	$1,\!0$	GW6471	$BS^3$	DLKSLAKR	204, 208
629,3978	629,3981	0,5	_	$BS^3$	VKAR	224
629,3975	629,3981	1,0	GW6471	$BS^3$	VKAR	224
629,3978	629,3981	$^{0,5}$	YS81	$BS^3$	VKAR	224
1848,0379	1848,0378	0,1	GW6471	$BS^3$	VILSGKASNNPPFVIH	232
944,5659	944,5663	0,4	_	$BS^3$	EKTLVAK	252
944,5630	944,5663	$^{3,5}$	GW6471	$BS^3$	EKTLVAK	252
944,5658	944,5663	$^{0,5}$	YS81	$BS^3$	EKTLVAK	252
1112,6299	1112,6310	1,0	_	$BS^3$	LVANGIQNK	266
1112,6291	1112,6310	1,7	GW6471	$BS^3$	LVANGIQNK	266
$1112,\!6299$	1112,6310	$1,\!0$	YS81	$BS^3$	LVANGIQNK	266
1454,7778	1454,7778	0,0	_	$BS^3$	DQVTLLKYGVY	310
1454,7774	1454,7778	0,3	GW6471	$BS^3$	DQVTLLKYGVY	310
1048,6030	1048,6037	0,7	_	$BS^3$	EFLKSLR	345
1048,6030	1048,6037	0,7	GW6471	$BS^3$	EFLKSLR	345
$1048,\!6030$	1048,6037	$^{0,7}$	YS81	$BS^3$	EFLKSLR	345
707,3432	707,3433	0,1	_	$BS^3$	KPFC	349
707,3430	707,3433	$^{0,4}$	GW6471	$BS^3$	KPFC	349
707,3430	707,3433	$^{0,4}$	YS81	$BS^3$	KPFC	349
676,3551	676,3552	0,1	_	$BS^3$	EPKF	358
676,3549	676, 3552	$^{0,4}$	GW6471	$BS^3$	EPKF	358
676,3550	676,3552	0,3	YS81	$BS^3$	EPKF	358
1904,1223	1904,1225	0,1	GW6471	$BS^3$	QLVTEHAQLVQIIKK	448
620,3130	620,3137	$^{1,1}$	_	$BS^3$	KTES	449
620,3131	620,3137	$^{1,0}$	GW6471	$BS^3$	KTES	449
620,3135	620,3137	$^{0,3}$	YS81	$BS^3$	KTES	449
888,5036	888,5036	0,0	_	$\rm BS^2G$	DLKSLAK	204

**Tabelle A.1:** Hydrolysierte Cross-Linking-Produkte in ligandenfreiem PPAR $\alpha$  und den PPAR $\alpha$ /GW6471- bzw.PPAR $\alpha$ /YS81-Komplexen mit den aminreaktiven Cross-Linkern BS<sup>3</sup> und BS<sup>2</sup>G

888,5037	888,5036	0,1	GW6471	$BS^2G$	DLKSLAK	204
888,5004	888,5036	3,6	Y S81	BS <sup>2</sup> G	DLKSLAK	204
688,3986	$688,\!3988$	$^{0,3}$	-	$BS^2G$	SLAKR	208
688,3984	$688,\!3988$	$^{1,6}$	GW6471	$\rm BS^2G$	SLAKR	208
688,3983	688,3988	1,7	YS81	$\rm BS^2G$	SLAKR	208
1777,8477	1777,8465	0,7	-	$\rm BS^2G$	IYEAYLKNFNMoxNK	216
2303,3093	2303,3092	$^{0,1}$	_	$BS^2G$	VKARVILSGKASNNPPFVIH	224
1449,7191	1449,7155	$^{2,5}$	YS81	BS <sup>2</sup> G	NFNMNKVKAR	222, 224
1806,9755	1806,9749	$^{0,3}$	_	$BS^2G$	VILSGKASNNPPFVIH	232
1806,9752	1806,9749	$^{0,2}$	GW6471	BS <sup>2</sup> G	VILSGKASNNPPFVIH	232
1806,9754	1806,9749	$0,\!3$	YS81	BS <sup>2</sup> G	VILSGKASNNPPFVIH	232
902,5190	902,5193	$^{0,3}$	GW6471	$BS^2G$	EKTLVAK	252
902,5191	902,5193	$^{0,2}$	YS81	$BS^2G$	EKTLVAK	252
1582,9159	1582,9163	$^{0,3}$	_	$BS^2G$	TLVAKLVANGIQNK	257
1582,9159	1582, 9163	$^{0,3}$	GW6471	$\rm BS^2G$	TLVAKLVANGIQNK	257
1582,9161	1582,9163	0,1	YS81	$BS^2G$	TLVAKLVANGIQNK	257
1270,6581	1270,6638	$^{4,5}$	_	$BS^2G$	LVANGIQNKEA	266
$1270,\!6633$	$1270,\!6638$	$^{0,4}$	GW6471	$BS^2G$	LVANGIQNKEA	266
$1270,\!6574$	1270,6638	$^{5,0}$	YS81	$\rm BS^2G$	LVANGIQNKEA	266
1412,7309	1412,7308	$^{0,1}$	_	$BS^2G$	DQVTLLKYGVY	310
1412,7310	1412,7308	$^{0,1}$	GW6471	$\rm BS^2G$	DQVTLLKYGVY	310
1412,7309	1412,7308	$^{0,1}$	YS81	$BS^2G$	DQVTLLKYGVY	310
1006,5560	$1006,\!5567$	1,7	_	$\rm BS^2G$	EFLKSLR	345
1006,5561	$1006,\!5567$	$^{1,6}$	GW6471	$BS^2G$	EFLKSLR	345
1006,5541	1006,5567	$^{2,6}$	YS81	$BS^2G$	EFLKSLR	345
665,2962	665,2963	$^{0,2}$	_	$BS^2G$	KPFC	349
665, 2962	$665,\!2963$	$^{0,2}$	GW6471	$BS^2G$	KPFC	349
665,2961	665,2963	$^{0,2}$	YS81	$BS^2G$	KPFC	349
634,3082	634,3083	$^{0,2}$	_	$BS^2G$	EPKF	358
634,3082	634,3083	$^{0,2}$	YS81	$BS^2G$	EPKF	358
1820,9068	1820,9069	$^{0,1}$	GW6471	$\rm BS^2G$	DRPGLLNVGHIEKMQ	399
1590,8781	1590,8783	$^{0,1}$	GW6471	$\rm BS^2G$	DDIFLFPKLLQK	425
817,4488	817,4489	$^{0,1}$	_	$\rm BS^2G$	LLQKMA	429
$817,\!4495$	$817,\!4489$	$^{0,7}$	GW6471	$\rm BS^2G$	LLQKMA	429
817,4487	817,4489	$^{0,1}$	YS81	$BS^2G$	LLQKMA	429
1862,0679	1862,0746	$^{3,6}$	-	$\rm BS^2G$	QLVTEHAQLVQIIKK	448
1862,0739	1862,0746	$^{0,4}$	GW6471	$\rm BS^2G$	QLVTEHAQLVQIIKK	448
1862,0735	1862,0746	$0,\!6$	YS81	$BS^2G$	QLVTEHAQLVQIIKK	448



Abbildung A.2: Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren "Edman"-Reagenzes.



**Abbildung A.3:** Modifikationen von Lysozym mit mit einem hydrolysierten "Edman"-Reagenz, hier am Beispiel des Lysozym-Peptids der Aminosäuresequenz 6–14. Die Analyse der Cross-Linking-Produkte erfolgte per Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. **(A)** MS/MS-CID-Produktionenspektrum von  $[M+BuTuGPG-OH + 2H]^{2+}$  bei m/z 703,15. **(B)** MS<sup>3</sup>-CID-Produktionenspektrum von  $[M+PG + 2H]^{2+}$  bei m/z 602,43.



Abbildung A.4: Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren Thioharnstoff-Reagenzes.



**Abbildung A.5: (A)** ESI-LTQ-Orbitrap-CID-MS/MS-Daten des tryptischen Munc13-1-Peptids AKANWLR, das mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz als  $[M + BuUrBu-OH + H]^+$  (m/z 1072,60) modifiziert ist. **(B)** ESI-LTQ-MS<sup>3</sup>-Daten von  $[M + Bu + H]^+$  bei m/z 943,55 und **(C)** von  $[M + BuUr + H]^+$  bei m/z 969,53.



**Abbildung A.6:** (A) ESI-LTQ-CID-MS/MS-Daten des vierfach geladenen Signals bei m/z 605,32: Die Peptide 210–224 und 205–209 sind quervernetzt. (B) ESI-LTQ-MS<sup>3</sup>-Daten des modifizierten  $\alpha$ -Peptids  $[\alpha + Bu + 2H]^{2+}$  bei m/z 867,44. (C) ESI-LTQ-MS<sup>3</sup>-Daten des modifizierten  $\beta$ -Peptids  $[\beta + Bu + H]^+$  bei m/z 659,42.



Abbildung A.7: Synthese des aminreaktiven, MS-spaltbaren Harnstoff-Reagenzes.



**Abbildung A.8:** MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten des mit einem hydrolysierten Harnstoff-Reagenz modifizierten Munc13-1-Peptids (Aminosäuren 3–9)  $[M + BuUrBu-OH + H]^+$  bei m/z 1072,6.



**Abbildung A.9: (A)** MALDI-TOF/TOF-MS/MS-Daten quervernetzter PPAR $\alpha$  Peptide (Aminosäuresequenzen 210–224 und 205–209). **(B)** Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\alpha$ -Peptids  $[\alpha + Bu]^+$  bei m/z 1732,6. **(C)** Pseudo-MS<sup>3</sup>-Daten des  $\beta$ -Peptids  $[\beta + Bu]^+$  bei m/z 659,3.

$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{exp}}$	$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{theor}}$	ppm	Тур	Sequenz	Aminosäuren
788,4626	788,4625	0	0	SLAKR	K208
$873,\!5398$	$873{,}5404$	1	0	KTLVAK	K252
$873,\!5405$	$873,\!5404$	0	0	LKSLAK	K204
$977,\!5775$	$977,\!5778$	0	0	FLKSLR	K235
$1160,\!6519$	$1160,\!6521$	0	0	TADLKSLAK	K204
$1208,\!6095$	$1208,\!6092$	0	0	NFNMNKVK	K222
$1299,\!6908$	$1299,\!6903$	0	0	LVANGIQNKE	K266
1301,7260	1301,7246	1	0	LLQKMADLR	K429
1316,7534	1316,7532	0	0	TADLKSLAKR	K204
$1391,\!8370$	$1391,\!8369$	0	0	HAQLVQIIKK	K448
1456,7250	1456,7253	0	0	AYLKNFNMNK	K216
1478,7027	1478,7018	1	0	KPFCDIMEPK	K349
$1523,\!8362$	$1523,\!8363$	0	0	KMQEGIVHVLR	K399
1546,7258	1546,7246	1	0	FDFAMKFNALE	K364
$1578,\!8227$	$1578,\!8230$	0	0	TLCMAEKTLVAK	K252
$1621,\!9284$	1621,9272	1	0	HAQLVQIIKKTE	K448
$1682,\!9809$	1682,9800	1	0	TLVAKLVANGIQNK	K257
$1754,\!9356$	$1754,\!9395$	2	0	LVANGIQNKEAEVR	K266
$1765,\!8976$	$1765,\!8967$	1	0	KTESDAALHPLLQE	K449
$1834,\!9220$	1834,9190	2	0	SLRKPFCDIMEPK	K349
$1861,\!9146$	1861, 9153	0	0	IYEAYLKNFNMNK	K216
2089,0740	2089,0787	2	0	IYEAYLKNFNMNKVK	K216
$2198,\!1377$	$2198,\!1452$	3	0	KTESDAALHPLLQEIYR	K449
$2218,\!0448$	$2218,\!0381$	3	0	KPFCDIMEPKFDFAMK	K349
1298,7434	1298,7427	1	1	TADLKSLAKR	K204, K208
1603, 9159	1603, 9166	0	1	HAQLVQIIKKTE	K448, K449
1665, 8766	1665,8781	1	1	AYLKNFNMNKVK	K216, K222
1920,0149	1920,0073	4	1	SETADLKSLAKRIYE	K204, K208
$2205,\!1565$	2205, 1559	0	1	FLKSLRKPFCDIMEPK	K345, K349
2298,2071	2298,2063	0	1	IYEAYLKNFNMNKVKAR	K216, K222
2334,1981	2334,1985	0	1	EFLKSLRKPFCDIMEPK	K345, K349
2778,5110	2778,5149	1	1	HAQLVQIIKKTESDAALHPLLQE	K448, K449
1242 7646	1242 7641	0	2	VKAB   SLAKB	K224 K208
1212,7010 1859,9357	1859 9345	1	2	KTESD   LVANGIONKE	K449 K266
1000,0007 1011 0257	1011 0269	1	2	VKAB AVLKNENMNK	K224 K216
2012 0733	2012 07/6	1	2	SLAKB   AVLKNENMNK	K208 K216
2012,0100	2012,0140	1	2	ELKSLB   KPECDIMEPK	K345 K340
2220,1009	2225,1005	1 9	2	VKAR   IVEAVLKNENMNK	K994 K916
2010,2102	2010,2109	2	2	SLAKB   IVEAVLKNFNMNK	K208 K216
2736 4490	2736 4502	0	2	VKAB   VILSCKASNNPPFVIHDME	K294 K239
2150,4490	2150,4502	0	4	VITTO VITOURUUUUU VIIIDME	11224, 11202

TabelleA.2:MittelsNano-HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MassenspektrometrieidentifizierteCross-Linking-ProduktedesPPAR $\alpha$ /GW6471-KomplexesmitdemHarnstoff-Reagenz.DieCross-Linking-Produkte wurdeninLösungmitTrypsinundGluCgespalten.

$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{exp}}$	$[\mathrm{M}+\mathrm{H}]^+_{\mathrm{theor}}$	ppm	Тур	Sequenz	Aminosäuren
873,544	873,540	5	0	LKSLAK	K204
$977,\!590$	$977,\!578$	13	0	FLKSLR	K345
$1106,\!635$	$1106,\!620$	13	0	EFLKSLR	K345
$1160,\!653$	$1160,\!652$	1	0	TADLKSLAK	K204
$1208,\!614$	$1208,\!609$	4	0	NFNMNKVK	K222
1301,732	1301,725	5	0	LLQKMADLR	K429
1316,764	1316,753	8	0	TADLKSLAKR	K204
$1391,\!830$	$1391,\!837$	5	0	HAQLVQIIKK	K448
1435,746	1435,747	1	0	NFNMNKVKAR	K224
1456,724	1456,725	1	0	AYLKNFNMNK	K216
1478,707	1478,702	3	0	KPFCDIMEPK	K349
$1523,\!825$	$1523,\!836$	7	0	KMQEGIVHVLR	K399
$1683,\!877$	$1683,\!889$	7	0	AYLKNFNMNKVK	K216
$1754,\!947$	$1754,\!940$	4	0	LVANGIQNKEAEVR	K266
$1765,\!895$	$1765,\!897$	1	0	KTESDAALHPLLQE	K449
1834,910	$1834,\!919$	5	0	SLRKPFCDIMEPK	K349
1872,015	1872,026	6	0	LLQKMADLRQLVTE	K429
$2198,\!159$	$2198,\!145$	6	0	KTESDAALHPLLQEIYR	K449
1298,752	1298,743	7	1	TADLKSLAKR	K204, K208
1417,751	1417,737	10	1	NFNMNKVKAR	K222, K224
2249,274	2249,261	6	1	TLVAKLVANGIQNKEAEVR	K257, K266
2298,215	2298,206	4	1	IYEAYLKNFNMNKVKAR	K216, K222
2399,274	2399,254	8	1	SLAKRIYEAYLKNFNMNK	K208, K216
1911.049	1911.027	11	2	AYLKNFNMNK   VKAR	K216, K224
2012,066	2012,075	4	2	AYLKNFNMNK   SLAKR	K216, K208
$2175,\!152$	2175,232	37	2	LLQKMADLR   EFLKSLR	K429, K345
2223,168	2223,166	1	2	KPFCDIMEPK   FLKSLR	K349, K345
2316,191	2316,217	11	2	IYEAYLKNFNMNK   VKAR	K216, K224
$2417,\!259$	2417,265	2	2	IYEAYLKNFNMNK   SLAKR	K216, K208

**Tabelle A.3:** Mittels offline-Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie identifizierte Cross-<br/>Linking-Produkte des PPAR $\alpha$ /GW6471-Komplexes mit dem Harnstoff-Reagenz. Die Cross-Linking-Produkte<br/>wurden in Lösung mit Trypsin und GluC gespalten.

### Literaturverzeichnis

- L. Michalik, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions, Curr Opin Biotechnol 1999, 10(6), 564–70.
- [2] N. Marx, P. Libby, J. Plutzky, 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.
- [3] B. P. Neve, J. C. Fruchart, B. Staels, Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis, *Biochem Pharmacol* 2000, 60(8), 1245–50.
- [4] J. Plutzky, The potential role of peroxisome proliferator-activated receptors on inflammation in type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis, Am J Cardiol 2003, 92(4A), 34J-41J.
- [5] R. M. Evans, G. D. Barish, Y.-X. Wang, PPARs and the complex journey to obesity, *Nat Med* 2004, 10(4), 355–61, DOI 10.1038/nm1025.
- [6] I. Issemann, R. A. Prince, J. D. Tugwood, S. Green, The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs, J Mol Endocrinol 1993, 11(1), 37–47.
- [7] I. Issemann, S. Green, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* 1990, 347(6294), 645–50, DOI 10.1038/347645a0.
- [8] J. M. Lehmann, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, S. A. Kliewer, An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), J Biol Chem 1995, 270(22), 12953–6.
- [9] W. R. Oliver, Jr, J. L. Shenk, M. R. Snaith, C. S. Russell, K. D. Plunket, N. L. Bodkin, M. C. Lewis, D. A. Winegar, M. L. Sznaidman, M. H. Lambert, H. E. Xu, D. D. Sternbach, S. A. Kliewer, B. C. Hansen, T. M. Willson, A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(9), 5306–11, DOI 10.1073/pnas.091021198.
- [10] S. A. Kliewer, K. Umesono, D. J. Noonan, R. A. Heyman, R. M. Evans, Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors, *Nature* 1992, 358 (6389), 771–4, DOI 10.1038/358771a0.
- B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr Rev* 1999, 20(5), 649–88.
- [12] J. K. Reddy, T. Hashimoto, Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system, Annu Rev Nutr 2001, 21, 193–230, DOI 10.1146/annurev.nutr.21.1. 193.
- [13] S. Kersten, J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne, W. Wahli, Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting, *J Clin Invest* 1999, 103(11), 1489–98, DOI 10.1172/JCI6223.
- [14] J. Plutzky, Emerging concepts in metabolic abnormalities associated with coronary artery disease, Curr Opin Cardiol 2000, 15(6), 416–21.
- [15] M. F. Linton, S. Fazio, Re-emergence of fibrates in the management of dyslipidemia and cardiovascular risk, *Curr Atheroscler Rep* 2000, 2(1), 29–35.
- [16] N. Vu-Dac, K. Schoonjans, B. Laine, J. C. Fruchart, J. Auwerx, B. Staels, Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element, J Biol Chem 1994, 269(49), 31012–8.
- [17] N. Vu-Dac, K. Schoonjans, V. Kosykh, J. Dallongeville, J. C. Fruchart, B. Staels, J. Auwerx, Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor, J Clin Invest 1995, 96(2), 741–50, DOI 10.1172/JCI118118.
- [18] H. Bays, E. A. Stein, Pharmacotherapy for dyslipidaemia-current therapies and future agents, Expert Opin Pharmacother 2003, 4(11), 1901–38, DOI 10.1517/14656566.4.11.1901.

- [19] B. Staels, W. Koenig, A. Habib, R. Merval, M. Lebret, I. P. Torra, P. Delerive, A. Fadel, G. Chinetti, J. C. Fruchart, J. Najib, J. Maclouf, A. Tedgui, Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators, *Nature* 1998, 393(6687), 790–3, DOI 10.1038/31701.
- [20] F. Martin-Nizard, C. Furman, P. Delerive, A. Kandoussi, J. C. Fruchart, B. Staels, P. Duriez, Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells, J Cardiovasc Pharmacol 2002, 40(6), 822–31.
- [21] J. Plutzky, Peroxisome proliferator-activated receptors in endothelial cell biology, Curr Opin Lipidol 2001, 12(5), 511-8.
- [22] V. Pasceri, J. S. Cheng, J. T. Willerson, E. T. Yeh, J. Chang, Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs, *Circulation* 2001, 103(21), 2531–4.
- [23] H. Shu, B. Wong, G. Zhou, Y. Li, J. Berger, J. W. Woods, S. D. Wright, T. Q. Cai, Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells, *Biochem Biophys Res Commun* **2000**, 267(1), 345–9, DOI 10.1006/bbrc.1999.1968.
- [24] B. P. Neve, D. Corseaux, G. Chinetti, C. Zawadzki, J. C. Fruchart, P. Duriez, B. Staels, B. Jude, PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages, *Circulation* 2001, 103(2), 207–12.
- [25] G. Chinetti, F. G. Gbaguidi, S. Griglio, Z. Mallat, M. Antonucci, P. Poulain, J. Chapman, J. C. Fruchart, A. Tedgui, J. Najib-Fruchart, B. Staels, CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors, *Circulation* 2000, 101(20), 2411–7.
- [26] G. Chinetti, S. Lestavel, V. Bocher, A. T. Remaley, B. Neve, I. P. Torra, E. Teissier, A. Minnich, M. Jaye, N. Duverger, H. B. Brewer, J. C. Fruchart, V. Clavey, B. Staels, PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway, *Nat Med* **2001**, 7(1), 53–8, DOI 10.1038/83348.
- [27] H. E. Xu, T. B. Stanley, V. G. Montana, M. H. Lambert, B. G. Shearer, J. E. Cobb, D. D. McKee, C. M. Galardi, K. D. Plunket, R. T. Nolte, D. J. Parks, J. T. Moore, S. A. Kliewer, T. M. Willson, J. B. Stimmel, Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha, *Nature* 2002, 415(6873), 813–7, DOI 10.1038/415813a.
- [28] H. E. Xu, M. H. Lambert, V. G. Montana, D. J. Parks, S. G. Blanchard, P. J. Brown, D. D. Sternbach, J. M. Lehmann, G. B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. V. Milburn, Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors, *Mol Cell* **1999**, 3(3), 397–403.
- [29] R. T. Nolte, G. B. Wisely, S. Westin, J. E. Cobb, M. H. Lambert, R. Kurokawa, M. G. Rosenfeld, T. M. Willson, C. K. Glass, M. V. Milburn, Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferatoractivated receptor-gamma, *Nature* 1998, 395(6698), 137–43, DOI 10.1038/25931.
- [30] J. Uppenberg, C. Svensson, M. Jaki, G. Bertilsson, L. Jendeberg, A. Berkenstam, Crystal structure of the ligand binding domain of the human nuclear receptor PPARgamma, J Biol Chem 1998, 273(47), 31108–12.
- [31] R. T. Gampe, Jr, V. G. Montana, M. H. Lambert, A. B. Miller, R. K. Bledsoe, M. V. Milburn, S. A. Kliewer, T. M. Willson, H. E. Xu, Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors, *Mol Cell* 2000, 5(3), 545–55.
- [32] H. E. Xu, M. H. Lambert, V. G. Montana, K. D. Plunket, L. B. Moore, J. L. Collins, J. A. Oplinger, S. A. Kliewer, R. T. Gampe, Jr, D. D. McKee, J. T. Moore, T. M. Willson, Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98 (24), 13919–24, DOI 10.1073/pnas.241410198.
- [33] P. Cronet, J. F. Petersen, R. Folmer, N. Blomberg, K. Sjöblom, U. Karlsson, E. L. Lindstedt, K. Bamberg, Structure of the PPARalpha 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.
- [34] W. Bourguet, M. Ruff, P. Chambon, H. Gronemeyer, D. Moras, Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha, *Nature* 1995, 375 (6530), 377–82, DOI 10.1038/375377a0.
- [35] P. Dowell, V. J. Peterson, T. M. Zabriskie, M. Leid, Ligand-induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha conformational change, J Biol Chem 1997, 272(3), 2013–20.
- [36] H. B. Rubins, S. J. Robins, D. Collins, D. B. Nelson, M. B. Elam, E. J. Schaefer, F. H. Faas, J. W. Anderson, Diabetes, plasma insulin, and cardiovascular disease: subgroup analysis from the Department of Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial (VA-HIT), Arch Intern Med 2002, 162(22), 2597–604.

- [37] Z. Israelian-Konaraki, P. D. Reaven, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and atherosclerosis: from basic mechanisms to clinical implications, *Cardiology* 2005, 103(1), 1–9, DOI 10.1159/000081845.
- [38] H. Koyama, D. J. Miller, J. K. Boueres, R. C. Desai, A. B. Jones, J. P. Berger, K. L. MacNaul, L. J. Kelly, T. W. Doebber, M. S. Wu, G. Zhou, P.-r. Wang, M. C. Ippolito, Y.-S. Chao, A. K. Agrawal, R. Franklin, J. V. Heck, S. D. Wright, D. E. Moller, S. P. Sahoo, (2R)-2-ethylchromane-2-carboxylic acids: discovery of novel PPARalpha/gamma dual agonists as antihyperglycemic and hypolipidemic agents, J Med Chem 2004, 47(12), 3255–63, DOI 10.1021/jm030621d.
- [39] P. Mohanty, A. Aljada, H. Ghanim, D. Hofmeyer, D. Tripathy, T. Syed, W. Al-Haddad, S. Dhindsa, P. Dandona, Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone, *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(6), 2728–35, DOI 10.1210/jc.2003-032103.
- [40] P. S. Gillies, C. J. Dunn, Pioglitazone, Drugs 2000, 60(2), 333-43; discussion 344-5.
- [41] T. W. Doebber, L. J. Kelly, G. Zhou, R. Meurer, C. Biswas, Y. Li, M. S. Wu, M. C. Ippolito, Y.-S. Chao, P.-R. Wang, S. D. Wright, D. E. Moller, J. P. Berger, MK-0767, a novel dual PPARalpha/gamma agonist, displays robust antihyperglycemic and hypolipidemic activities, *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 318(2), 323–8, DOI 10.1016/j.bbrc.2004.04.032.
- [42] G. M. Reaven, Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease, Diabetes 1988, 37(12), 1595–607.
- [43] S. E. Nissen, K. Wolski, E. J. Topol, Effect of muraglitazar on death and major adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus, JAMA 2005, 294 (20), 2581–6, DOI 10.1001/jama.294.20. joc50147.
- [44] P. Balakumar, M. Rose, S. S. Ganti, P. Krishan, M. Singh, PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box?, *Pharmacol Res* 2007, 56(2), 91–8, DOI 10.1016/j.phrs.2007.03.002.
- [45] A. Tenenbaum, M. Motro, E. Z. Z. Fisman, Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons, *Cardiovasc Diabetol* 2005, 4, 14, DOI 10.1186/ 1475-2840-4-14.
- [46] A. Tenenbaum, E. Z. Fisman, V. Boyko, M. Benderly, D. Tanne, M. Haim, Z. Matas, M. Motro, S. Behar, Attenuation of progression of insulin resistance in patients with coronary artery disease by bezafibrate, Arch Intern Med 2006, 166(7), 737–41, DOI 10.1001/archinte.166.7.737.
- [47] F. J. Vastola, R. O. Mumma, Analysis of organic salts by laser ionization, Org Mass Spectrom 1970, 3(1), 101–104.
- [48] M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules, Anal Chem 1985, 57(14), 2935–2939.
- [49] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp, Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds, Int J Mass Spectrom Ion Proc 1987, 78, 53–68.
- [50] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons, Anal Chem 1988, 60(20), 2299–301.
- [51] M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, F. Hillenkamp, Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Proteins of Mass 100 000 to 250 000 Dalton, Angew Chem Int Ed Engl 1989, 28(6), 760–761.
- [52] E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, Matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared, *Rapid Commun Mass Spectrom* **1992**, 6(12), 771–6, DOI 10.1002/rcm.1290061212.
- [53] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry, Mass Spectrom Rev 1998, 17, 337–366.
- [54] R. Knochenmuss, R. Zenobi, MALDI ionization: the role of in-plume processes, Chem Rev 2003, 103(2), 441–52, DOI 10.1021/cr0103773.
- [55] M. Karas, A. Ingendoh, U. Bahr, F. Hillenkamp, Ultraviolet-laser desorption/ionization mass spectrometry of femtomolar amounts of large proteins, *Biomed Environ Mass Spectrom* 1989, 18(9), 841–843.
- [56] R. C. Beavis, B. T. Chait, Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins, *Rapid Commun Mass Spectrom* 1989, 3(12), 432–5, DOI 10.1002/rcm.1290031207.

- [57] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp, 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption ionization mass spectrometry, Int J Mass Spectrom Ion Proc 1991, 111, 89–102.
- [58] F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis, B. T. Chait, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers, Anal Chem 1991, 63(24), 1193A–1203A.
- [59] R. C. Beavis, T. Chaudhary, B. T. Chait, Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrixassisted laser desorption mass spectromtry, Org Mass Spectrom 1991, 27(2), 156–158.
- [60] T. W. Jaskolla, W.-D. Lehmann, M. Karas, 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix, Proc Natl Acad Sci U S A 2008, 105(34), 12200–5, DOI 10.1073/pnas. 0803056105.
- [61] T. W. Jaskolla, D. G. Papasotiriou, M. Karas, Comparison between the matrices alpha-cyano-4hydroxycinnamic acid and 4-chloro-alpha-cyanocinnamic acid for trypsin, chymotrypsin, and pepsin digestions by MALDI-TOF mass spectrometry, J Proteome Res 2009, 8(7), 3588–97, DOI 10.1021/pr900274s.
- [62] O. Vorm, M. Mann, Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides, J Am Soc Mass Spectrom 1994, 5(11), 955–958.
- [63] M. Schürenberg, J. Franzen, US patent 6,287,872.
- [64] E. Nordhoff, M. Schürenberg, G. Thiele, C. Lübbert, K. D. Kloeppel, D. Theiss, H. Lehrach, J. Gobom, Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports, Int J Mass Spectrom 2003, 226(1), 163–180.
- [65] W. E. Stephens, A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, Phys Rev 1946, 69, 691.
- [66] R. J. Cotter, Laser mass spectrometry: an overview of techniques, instruments and applications, Anal Chim Acta 1987, 195, 45–59.
- [67] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin, The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution, Sov Phys JETP 1973, 37, 45–48.
- [68] B. A. Mamyrin, Laser assisted reflectron time-of-flight mass spectrometry, Int J Mass Spectrom Ion Proc 1994, 131, 1–19.
- [69] R. J. Cotter, Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules, Anal Chem 1992, 64 (21), 1027A–1039A.
- [70] M. Guilhaus, Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts, J Mass Spectrom 1995, 30(11), 1519–1532.
- [71] B. A. Mamyrin, Time-of-flight mass spectrometry (concepts, achievements, and prospects), Int J Mass Spectrom 2001, 206(3), 251–266.
- [72] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* 1995, 9(11), 1044–1050.
- [73] R. S. Brown, J. J. Lennon, Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer, Anal Chem 1995, 67(13), 1998–2003.
- [74] R. M. Whittal, L. Li, High-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization in a linear time-of-flight mass spectrometer, Anal Chem 1995, 67(13), 1950–4.
- [75] E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, Wiley and Sons Ltd, 2007.
- [76] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, Anal Bioanal Chem 2003, 376(7), 952–65, DOI 10.1007/ s00216-003-2057-0.
- [77] D. C. Reiber, T. A. Grover, R. S. Brown, Anal Chem 1998, 70, 673–683.
- [78] E. C. Horning, M. G. Horning, D. I. Carroll, R. Dzidic, N. Stillwell, New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure, Anal Chem 1973, 45(6), 936–943.
- [79] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, Molecular Beams of Macroions, J Chem Phys 1968, 49(5), 2240–2249.

- [80] M. Yamashita, J. B. Fenn, Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, J Phys Chem 1984, 88 (20), 4451–4459.
- [81] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science* 1989, 246 (4926), 64–71.
- [82] M. S. Wilm, M. Mann, Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?, Int J Mass Spectrom Ion Proc 1994, 136(2-3), 167–180.
- [83] M. Wilm, M. Mann, Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, Anal Chem 1996, 68(1), 1–8.
- [84] J. Zeleny, Instability of Electrified Liquid Surfaces, Phys Rev 1917, 10, 1-7.
- [85] G. I. Taylor, Disintegration of Water Drops in an Electric Field, Proc Royal Soc London A 1964, 280, 383–397.
- [86] Photograph by Robert Lamberts at The New Zealand Institute for Plant and Food Research Ltd, 2008.
- [87] A. Gomez, K. Tang, Charge and fission of droplets in electrostatic sprays, Phys Fluids 1994, 6(1), 404-414.
- [88] L. Raleigh, On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses Charged With Electricity, London, Edinburgh, Dublin Phil Mag J Sci 1882, 14, 184–186.
- [89] P. Kebarle, L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase the mechanism of electrospray mass spectrometry, Anal Chem 1993, 65(22), 972A–986A.
- [90] R. B. Cole, Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry, J Mass Spectrom 2000, 35(7), 763–772.
- [91] D. Duft, T. Achtzehn, R. Müller, B. A. Huber, T. Leisner, Coulomb fission: Rayleigh jets from levitated microdroplets, *Nature* 2003, 421 (6919), 128, DOI 10.1038/421128a.
- [92] L. Konermann, A minimalist model for exploring conformational effects on the electrospray charge state distribution of proteins, J Phys Chem B 2007, 111(23), 6534–43, DOI 10.1021/jp070720t.
- [93] L. Konermann, A simple model for the disintegration of highly charged solvent droplets during electrospray ionization, J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20(3), 496–506, DOI 10.1016/j.jasms.2008.11.007.
- [94] B. E. Winger, K. J. Light-Wahl, R. R. Ogorzalek Loo, H. R. Udseth, R. D. Smith, Observation and implications of high mass-to-charge ratio ions from electrospray ionization mass spectrometry, J Am Soc Mass Spectrom 1993, 4(7), 536–545.
- [95] J. V. Iribarne, B. A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, J Chem Phys 1976, 64, 2287.
- [96] B. A. Thomson, J. V. Iribarne, Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure, J Chem Phys 1979, 71, 4451.
- [97] J. A. Loo, C. G. Edmonds, H. R. Udseth, R. D. Smith, Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra, Anal Chem 1990, 62(7), 693–8.
- [98] S. K. Chowdhury, V. Katta, B. T. Chait, Probing conformational changes in proteins by mass spectrometry, J Am Chem Soc 1990, 112(24), 9012–9013.
- [99] J. C. Schwartz, M. W. Senko, J. E. P. Syka, A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer, J Am Soc Mass Spectrom 2002, 13(6), 659–69.
- [100] D. J. Douglas, A. J. Frank, D. Mao, Linear ion traps in mass spectrometry, Mass Spectrom Rev 2005, 24(1), 1–29, DOI 10.1002/mas.20004.
- [101] J. C. Schwartz, X. G. Zhou, M. E. Bier, U.S. Patent 5,572,022.
- [102] K. H. Kingdon, A Method for the Neutralization of Electron Space Charge by Positive Ionization at Very Low Gas Pressures, Phys Rev 1923, 21, 408–418.
- [103] A. A. Makarov, U.S. Patent 5,886,346 1999.

- [104] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis, Anal Chem 2000, 72(6), 1156–62.
- [105] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, Anal Chem 2006, 78(7), 2113–20, DOI 10.1021/ac0518811.
- [106] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, R. Graham Cooks, The Orbitrap: a new mass spectrometer, J Mass Spectrom 2005, 40(4), 430–43, DOI 10.1002/jms.856.
- [107] J. V. Olsen, L. M. F. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann, Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap, *Mol Cell Proteomics* 2005, 4(12), 2010–21, DOI 10.1074/mcp.T500030-MCP200.
- [108] R. G. Cooks, Collision-induced dissociation: Readings and commentary, J Mass Spectrom 1995, 30(9), 1215–1221.
- [109] J. V. Olsen, B. Macek, O. Lange, A. Makarov, S. Horning, M. Mann, Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis, *Nat Methods* 2007, 4(9), 709–12, DOI 10.1038/nmeth1060.
- [110] A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer, J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20(8), 1391–6, DOI 10.1016/j.jasms.2009.01.005.
- [111] A. Makarov, O. Lange, E. Denisov, W. Balschun, in 9th European FTMS Workshop, S. 24.
- [112] D. A. Benson, M. S. Boguski, D. J. Lipman, J. Ostell, B. F. Ouellette, B. A. Rapp, D. L. Wheeler, GenBank, Nucleic Acids Res 1999, 27(1), 12–7.
- [113] H. Hegyi, M. Gerstein, The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome, J Mol Biol 1999, 288(1), 147–64, DOI 10.1006/jmbi.1999.2661.
- [114] K. Wüthrich, NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel lecture), Angew Chem Int Ed Engl 2003, 42(29), 3340–63, DOI 10.1002/anie.200300595.
- [115] M. F. Perutz, Relation between structure and sequence of haemoglobin, Nature 1962, 194, 914-7.
- [116] M. M. Young, N. Tang, J. C. Hempel, C. M. Oshiro, E. W. Taylor, I. D. Kuntz, B. W. Gibson, G. Dollinger, High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(11), 5802–6, DOI 10.1073/pnas. 090099097.
- [117] A. Sinz, Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes., J Mass Spectrom 2003, 38(12), 1225–1237, DOI 10.1002/jms.559.
- [118] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*, Academic Press, San Diego, CA, **1996**.
- [119] A. J. Lomant, G. Fairbanks, Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate), J Mol Biol 1976, 104(1), 243–61.
- [120] J. W. Back, L. de Jong, A. O. Muijsers, C. G. de Koster, Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling, J Mol Biol 2003, 331(2), 303–13.
- [121] J. Xie, P. G. Schultz, A chemical toolkit for proteins-an expanded genetic code, Nat Rev Mol Cell Biol 2006, 7(10), 775–82, DOI 10.1038/nrm2005.
- [122] A. Sinz, Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions., Mass Spectrom Rev 2006, 25, 663–682, DOI 10.1002/mas.20082.
- [123] P. Roepstorff, J. Fohlman, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed Mass Spectrom* 1984, 11(11), 601.
- [124] B. Schilling, R. H. Row, B. W. Gibson, X. Guo, M. M. Young, MS2Assign, automated assignment and nomenclature of tandem mass spectra of chemically crosslinked peptides, *J Am Soc Mass Spectrom* 2003, 14 (8), 834–50.
- [125] S. Peri, H. Steen, A. Pandey, GPMAW-a software tool for analyzing proteins and peptides, Trends Biochem Sci 2001, 26(11), 687–9.

- [126] L. J. de Koning, P. T. Kasper, J. W. Back, M. A. Nessen, F. Vanrobaeys, J. Van Beeumen, E. Gherardi, C. G. de Koster, L. de Jong, Computer-assisted mass spectrometric analysis of naturally occurring and artificially introduced cross-links in proteins and protein complexes, *FEBS J* 2006, 273(2), 281–91, DOI 10.1111/j.1742-4658.2005.05053.x.
- [127] M. Q. Müller, A. Sinz, Chemical Cross-Linking and High-Resolution Mass Spectrometry to Study Protein-Drug Interactions., *Methods Mol Biol* 2010, in press.
- [128] P. Cuatrecasas, I. Parikh, Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose, *Biochemistry* 1972, 11(12), 2291–9.
- [129] Z. A. Chen, A. Jawhari, L. Fischer, C. Buchen, S. Tahir, T. Kamenski, M. Rasmussen, L. Lariviere, J.-C. Bukowski-Wills, M. Nilges, P. Cramer, J. Rappsilber, Architecture of the RNA polymerase II-TFIIF complex revealed by cross-linking and mass spectrometry, *EMBO J* 2010, 29(4), 717–26, DOI 10.1038/emboj.2009.401.
- [130] S. Kalkhof, A. Sinz, Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters., Anal Bioanal Chem 2008, 392(1-2), 305–312.
- [131] S. Mädler, C. Bich, D. Touboul, R. Zenobi, Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities, J Mass Spectrom 2009, 44(5), 694–706, DOI 10.1002/jms.1544.
- [132] C. L. Swaim, J. B. Smith, D. L. Smith, Unexpected products from the reaction of the synthetic cross-linker 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate), DTSSP with peptides, J Am Soc Mass Spectrom 2004, 15(5), 736–49, DOI 10.1016/j.jasms.2004.01.011.
- [133] M. D. Leavell, P. Novak, C. R. Behrens, J. S. Schoeniger, G. H. Kruppa, Strategy for selective chemical cross-linking of tyrosine and lysine residues, J Am Soc Mass Spectrom 2004, 15(11), 1604–11, DOI 10. 1016/j.jasms.2004.07.018.
- [134] C. Bich, S. Maedler, K. Chiesa, F. DeGiacomo, N. Bogliotti, R. Zenobi, Reactivity and applications of new amine reactive cross-linkers for mass spectrometric detection of protein-protein complexes, Anal Chem 2010, 82(1), 172–9, DOI 10.1021/ac901651r.
- [135] M. Suchanek, A. Radzikowska, C. Thiele, Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells, *Nat Methods* 2005, 2(4), 261–7, DOI 10.1038/nmeth752.
- [136] J. Brunner, New photolabeling and crosslinking methods, Annu Rev Biochem 1993, 62, 483–514, DOI 10.1146/annurev.bi.62.070193.002411.
- [137] G. Dormán, G. D. Prestwich, Benzophenone photophores in biochemistry, Biochemistry 1994, 33(19), 5661–73.
- [138] G. F. Egnaczyk, K. D. Greis, E. R. Stimson, J. E. Maggio, Photoaffinity cross-linking of Alzheimer's disease amyloid fibrils reveals interstrand contact regions between assembled beta-amyloid peptide subunits, *Biochemistry* 2001, 40(39), 11706–14.
- [139] A. Wittelsberger, B. E. Thomas, D. F. Mierke, M. Rosenblatt, Methionine acts as a "magnetin photoaffinity crosslinking experiments, *FEBS Lett* 2006, 580(7), 1872–6, DOI 10.1016/j.febslet.2006.02.050.
- [140] K. Dimova, S. Kalkhof, I. Pottratz, C. Ihling, F. Rodriguez-Castaneda, T. Liepold, C. Griesinger, N. Brose, A. Sinz, O. Jahn, Structural insights into the calmodulin-Munc13 interaction obtained by cross-linking and mass spectrometry, *Biochemistry* 2009, 48(25), 5908–21, DOI 10.1021/bi900300r.
- [141] Y. Ryu, P. G. Schultz, Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli, Nat Methods 2006, 3(4), 263–5, DOI 10.1038/nmeth864.
- [142] J. W. Back, V. Notenboom, L. J. de Koning, A. O. Muijsers, T. K. Sixma, C. G. de Koster, L. de Jong, Identification of cross-linked peptides for protein interaction studies using mass spectrometry and 18O labeling, Anal Chem 2002, 74 (17), 4417–22.
- [143] B. X. Huang, H.-Y. Kim, C. Dass, Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, J Am Soc Mass Spectrom 2004, 15(8), 1237–47, DOI 10.1016/j.jasms. 2004.05.004.
- [144] C. J. Collins, B. Schilling, M. Young, G. Dollinger, R. K. Guy, Isotopically labeled crosslinking reagents: resolution of mass degeneracy in the identification of crosslinked peptides, *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13(22), 4023–6.

- [145] D. R. Müller, P. Schindler, H. Towbin, U. Wirth, H. Voshol, S. Hoving, M. O. Steinmetz, Isotope-tagged cross-linking reagents. A new tool in mass spectrometric protein interaction analysis, Anal Chem 2001, 73(9), 1927–34.
- [146] K. M. Pearson, L. K. Pannell, H. M. Fales, Intramolecular cross-linking experiments on cytochrome c and ribonuclease A using an isotope multiplet method, *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002, 16(3), 149–59, DOI 10.1002/rcm.554.
- [147] A. Schmidt, S. Kalkhof, C. Ihling, D. M. F. Cooper, A. Sinz, Mapping protein interfaces by chemical crosslinking and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: application to a calmodulin / adenylyl cyclase 8 peptide complex., Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) 2005, 11(5), 525–534, DOI 10.1255/ejms.748.
- [148] C. Ihling, A. Schmidt, S. Kalkhof, D. M. Schulz, C. Stingl, K. Mechtler, M. Haack, A. G. Beck-Sickinger, D. M. F. Cooper, A. Sinz, Isotope-labeled cross-linkers and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structural analysis of a protein/peptide complex., J Am Soc Mass Spectrom 2006, 17(8), 1100–1113, DOI 10.1016/j.jasms.2006.04.020.
- [149] A. H. Iglesias, L. F. A. Santos, F. C. Gozzo, Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan, Anal Chem 2010, 82(3), 909–16, DOI 10.1021/ac902051q.
- [150] L. S. Park, D. Friend, S. Gillis, D. L. Urdal, Characterization of the cell surface receptor for a multi-lineage colony-stimulating factor (CSF-2 alpha), J Biol Chem 1986, 261(1), 205–10.
- [151] P. T. Kasper, J. W. Back, M. Vitale, A. F. Hartog, W. Roseboom, L. J. de Koning, J. H. van Maarseveen, A. O. Muijsers, C. G. de Koster, L. de Jong, An aptly positioned azido group in the spacer of a protein cross-linker for facile mapping of lysines in close proximity, *Chembiochem* 2007, 8(11), 1281–92, DOI 10.1002/cbic.200700150.
- [152] J. Browning, A. Ribolini, Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor lines, J Immunol 1989, 143(6), 1859–67.
- [153] E. J. Soderblom, B. G. Bobay, J. Cavanagh, M. B. Goshe, Tandem mass spectrometry acquisition approaches to enhance identification of protein-protein interactions using low-energy collision-induced dissociative chemical crosslinking reagents, *Rapid Commun Mass Spectrom* 2007, 21(21), 3395–408, DOI 10.1002/rcm.3213.
- [154] E. J. Soderblom, M. B. Goshe, Collision-induced dissociative chemical cross-linking reagents and methodology: Applications to protein structural characterization using tandem mass spectrometry analysis, Anal Chem 2006, 78(23), 8059–68, DOI 10.1021/ac0613840.
- [155] P. M. Abdella, P. K. Smith, G. P. Royer, A new cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins, *Biochem Biophys Res Commun* 1979, 87(3), 734–42.
- [156] E. V. Petrotchenko, V. K. Olkhovik, C. H. Borchers, Isotopically coded cleavable cross-linker for studying protein-protein interaction and protein complexes, *Mol Cell Proteomics* 2005, 4(8), 1167–79, DOI 10.1074/ mcp.T400016-MCP200.
- [157] P. D. Bragg, C. Hou, Subunit composition, function, and spatial arrangement in the Ca2+-and Mg2+activated adenosine triphosphatases of Escherichia coli and Salmonella typhimurium, Arch Biochem Biophys 1975, 167(1), 311-21.
- [158] K. L. Bennett, M. Kussmann, P. Björk, M. Godzwon, M. Mikkelsen, P. Sørensen, P. Roepstorff, Chemical cross-linking with thiol-cleavable reagents combined with differential mass spectrometric peptide mapping–a novel approach to assess intermolecular protein contacts, *Protein Sci* 2000, 9(8), 1503–18, DOI 10.1110/ ps.9.8.1503.
- [159] G. J. King, A. Jones, B. Kobe, T. Huber, D. Mouradov, D. A. Hume, I. L. Ross, Identification of disulfidecontaining chemical cross-links in proteins using MALDI-TOF/TOF-mass spectrometry, Anal Chem 2008, 80(13), 5036–43, DOI 10.1021/ac702277q.
- [160] J. W. Back, A. F. Hartog, H. L. Dekker, A. O. Muijsers, L. J. de Koning, L. de Jong, A new crosslinker for mass spectrometric analysis of the quaternary structure of protein complexes, J Am Soc Mass Spectrom 2001, 12(2), 222–7.
- [161] J. W. Back, M. A. Sanz, L. De Jong, L. J. De Koning, L. G. J. Nijtmans, C. G. De Koster, L. A. Grivell, H. Van Der Spek, A. O. Muijsers, A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry, *Protein Sci* 2002, 11(10), 2471–8, DOI 10. 1110/ps.0212602.

- [162] R. Rink, Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedr Lett* 1987, 28(33), 3787–3790.
- [163] X. Tang, G. R. Munske, W. F. Siems, J. E. Bruce, Mass spectrometry identifiable cross-linking strategy for studying protein-protein interactions, Anal Chem 2005, 77(1), 311–8, DOI 10.1021/ac0488762.
- [164] S. M. Chowdhury, G. R. Munske, X. Tang, J. E. Bruce, Collisionally activated dissociation and electron capture dissociation of several mass spectrometry-identifiable chemical cross-linkers, Anal Chem 2006, 78(24), 8183–93, DOI 10.1021/ac060789h.
- [165] H. Zhang, X. Tang, G. R. Munske, N. Zakharova, L. Yang, C. Zheng, M. A. Wolff, N. Tolic, G. A. Anderson, L. Shi, M. J. Marshall, J. K. Fredrickson, J. E. Bruce, In vivo identification of the outer membrane protein OmcA-MtrC interaction network in Shewanella oneidensis MR-1 cells using novel hydrophobic chemical cross-linkers, J Proteome Res 2008, 7(4), 1712–20, DOI 10.1021/pr7007658.
- [166] H. Zhang, X. Tang, G. R. Munske, N. Tolic, G. A. Anderson, J. E. Bruce, Identification of protein-protein interactions and topologies in living cells with chemical cross-linking and mass spectrometry, *Mol Cell Proteomics* **2009**, 8(3), 409–20, DOI 10.1074/mcp.M800232-MCP200.
- [167] L. Yang, X. Tang, C. R. Weisbrod, G. R. Munske, J. K. Eng, P. D. von Haller, N. K. Kaiser, J. E. Bruce, A photocleavable and mass spectrometry identifiable cross-linker for protein interaction studies, *Anal Chem* 2010, 82(9), 3556–66, DOI 10.1021/ac902615g.
- [168] X. Tang, J. E. Bruce, A new cross-linking strategy: protein interaction reporter (PIR) technology for protein-protein interaction studies, *Mol Biosyst* 2010, 6(6), 939–47, DOI 10.1039/b920876c.
- [169] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids, Gene 1990, 96(1), 23–8.
- [170] S. van den Berg, P.-A. Löfdahl, T. Härd, H. Berglund, Improved solubility of TEV protease by directed evolution, J Biotechnol 2006, 121(3), 291–8, DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.08.006.
- [171] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, 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, DOI 10.1002/elps.1150090603.
- [172] Schrödinger, The PyMOL Molecular Graphics System Version 1.3, DeLano Scientific LLC, 2006, http://www.pymol.org.
- [173] J. M. Clark, Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases, *Nucleic Acids Res* 1988, 16(20), 9677–86.
- [174] O. Rau, Y. Syha, H. Zettl, M. Kock, A. Bock, M. Schubert-Zsilavecz, Alpha-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma, Arch Pharm (Weinheim) 2008, 341(3), 191–5, DOI 10.1002/ardp.200700209.
- [175] P. Edman, A method for the determination of amino acid sequence in peptides., Arch Biochem 1949, 22(3), 475.
- [176] P. Edman, G. Begg, A protein sequenator, Eur J Biochem 1967, 1(1), 80–91.
- [177] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. Kent, Protein ladder sequencing, Science 1993, 262(5130), 89–92.
- [178] S. G. Summerfield, M. S. Bolgar, S. J. Gaskell, Promotion and stabilization of b1 ions in peptide phenythiocarbamoyl derivatives : Analogies with condensed-phase chemistry, J Mass Spectrom 1997, 32(2), 225–231.
- [179] S. G. Summerfield, H. Steen, M. O'Malley, S. J. Gaskell, Phenyl thiocarbamoyl and related derivatives of peptides: Edman chemistry in the gas phase3, Int J Mass Spectrom 1999, 188(1), 95–103.
- [180] J. F. Sanz-Cervera, E. M. Stocking, T. Usui, H. Osada, R. M. Williams, Synthesis and evaluation of microtubule assembly inhibition and cytotoxicity of prenylated derivatives of cyclo-L-Trp-L-Pro, *Bioorg* Med Chem 2000, 8(10), 2407–15.
- [181] R. E. Canfield, The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme, J Biol Chem 1963, 238, 2698–2707.
- [182] K. Kurachi, L. C. Sieker, L. H. Jensen, Structures of triclinic mono- and di-N-acetylglucosamine: lysozyme complexes-a crystallographic study, J Mol Biol 1976, 101(1), 11–24.

- [183] G. H. Dihazi, A. Sinz, Mapping low-resolution three-dimensional protein structures using chemical crosslinking and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry., *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, 17(17), 2005–2014, DOI 10.1002/rcm.1144.
- [184] K. F. Medzihradszky, J. M. Campbell, M. A. Baldwin, A. M. Falick, P. Juhasz, M. L. Vestal, A. L. Burlingame, The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer, Anal Chem 2000, 72(3), 552–8.
- [185] M. Weiner, C. Anderson, S. Wells, B. Johnson-Browne, Studier pET system vectors and hosts, *Strategies* 1994, 7(2), 41–43.
- [186] T. Velkov, K. A. Rimmer, S. J. Headey, Ligand-enhanced expression and in-cell assay of human peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand binding domain, *Protein Expr Purif* 2010, 70(2), 260–9, DOI 10.1016/j.pep.2009.09.012.
- [187] P. Novak, W. E. Haskins, M. J. Ayson, R. B. Jacobsen, J. S. Schoeniger, M. D. Leavell, M. M. Young, G. H. Kruppa, Unambiguous assignment of intramolecular chemical cross-links in modified mammalian membrane proteins by Fourier transform-tandem mass spectrometry, Anal Chem 2005, 77(16), 5101–6, DOI 10.1021/ac040194r.
- [188] S. Kalkhof, S. Haehn, M. Paulsson, N. Smyth, J. Meiler, A. Sinz, Computational Modeling of Laminin N-Terminal Domains Using Sparse Distance Constraints from Disulfide Bonds and Chemical Cross-Linking, Proteins 2010, in press.
- [189] D. M. Schulz, S. Kalkhof, A. Schmidt, C. Ihling, C. Stingl, K. Mechtler, O. Zschornig, A. Sinz, Annexin A2/P11 interaction: new insights into annexin A2 tetramer structure by chemical crosslinking, high-resolution mass spectrometry, and computational modeling., *Proteins* 2007, 69(2), 254–269, DOI 10.1002/prot.21445.
- [190] E. Kühn-Hölsken, C. Lenz, A. Dickmanns, H.-H. Hsiao, F. M. Richter, B. Kastner, R. Ficner, H. Urlaub, Mapping the binding site of snurportin 1 on native U1 snRNP by cross-linking and mass spectrometry, *Nucleic Acids Res* 2010, 38(16), 5581–93, DOI 10.1093/nar/gkq272.
- [191] W. A. Bickmore, H. G. E. Sutherland, Addressing protein localization within the nucleus, EMBO J 2002, 21(6), 1248–54, DOI 10.1093/emboj/21.6.1248.
- [192] L. Michalik, V. Zoete, G. Krey, A. Grosdidier, L. Gelman, P. Chodanowski, J. N. Feige, B. Desvergne, W. Wahli, O. Michielin, 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, DOI 10.1074/jbc.M610523200.
- [193] V. Zoete, A. Grosdidier, O. Michielin, Peroxisome proliferator-activated receptor structures: ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators, *Biochim Biophys Acta* 2007, 1771(8), 915–25, DOI 10.1016/j.bbalip.2007.01.007.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Sinz für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, in der sie meine Begeisterung für die vielseitige Welt der Massenspektrometrie weckte. Es war mir eine große Freude, unter diesen exzellenten Arbeitsbedingungen, den zahlreichen motivierenden Diskussionen und ihrem großen Vertrauen für das selbständige wissenschaftliche Arbeiten zu forschen.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der AG Sinz, insbesondere Daniela, Christian, Stefan und Andreas für die schöne Zeit in Leipzig bedanken. Halle war eine (tägliche) Reise wert, wofür ich mich bei Knut, dem großen und dem kleinen Jens, Fabian, Romy, Sabine, Konny, Simone, Bärbel & Bärbel und Michael bedanke.

Ich danke herzlich Prof. Peter Imming und Prof. Dr. Jasna Peter-Katalinić für die Übernahme der Zweit- und Drittgutachten.

Für die technische Unterstützung und wertvollen Tips im Gebiet der Genexpression und Proteinreinigung bedanke ich mich herzlich bei Christian Roth und Prof. Dr. Norbert Sträter an der Universität Leipzig. Ohne die Unterstützung von Dr. Sven Pfeifer und Andreas Hoffmann der Innoprofile-Nachwuchsgruppe "Künstliche Bindeproteine" wäre eine erfolgreiche Fortsetzung dieser Arbeit in Halle nicht möglich gewesen.

Dem Graduiertenkolleg 1026 "Conformational Transitions in Macromolecular Interactions"danke ich für die wundervolle, diskussionsfreudige Zeit in Halle. Vielen Dank für Alles, Mechtild!

Für die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Ausrichtung der 43. DGMS-Jahrestagung in Halle danke ich allen Mitstreitern der Uni Halle und des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie.

Es war eine fantastische Zeit an der Universiteit van Amsterdam. Dafür danke ich Dr. Leo de Koning und Prof. Dr. Chris de Koster. Eine Datenanalyse ohne die CoolToolBox wäre undenkbar gewesen. Ein großer Dank gilt Michael Götze für die Entwicklung der Software StavroX, wodurch sich auch MS/MS-Daten elegant interpretieren ließen.

Andreas Schmidt und Karl Mechtler vom IMP-IMBA in Wien danke ich für die erfolgreiche Kooperation und Einführung in die Ära der ESI-LTQ-Orbitrap-MS. Wie sich aus einem kleinen Nebenprojekt meinerseits etwas Großartiges entwickeln kann, verdanke ich unserer ausgezeichneten Kooperation mit Dr. Frank Dreiocker und Dr. Mathias Schäfer der Universität zu Köln. Für den technischen Support danke ich Johannes Zeiser und Prof. Dr. Andreas Pich von der Medizinischen Hochschule Hannover.

Reichlich neun Jahre Leipzig gingen schnell vorüber. Für das besondere LE-Lebensgefühl der "Nullerjahre" danke ich sehr dem Leipziger Chemie11erRat und dem Filmteam der Nürni 44 – insbesondere Benni, Rammi, Binni, LAT<sub>E</sub>X, HG, CII, Lothar, Paulchen und Gregor, und auch meinen insgesamt neun Leipziger MitbewohnerInnen.

Davor und Stefanie, ich danke Euch für den exzellenten Start in Bremen!

Ein besonders großer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern für die langjährige Unterstützung meiner studentischen Zeit in Halleipzig. Vielen Dank für Euer Verständnis und Vertrauen und die nötige Ablenkung von der Arbeit!

# Publikationen und Tagungsbeiträge

#### Originalarbeiten

- M. Q. Müller, C. Roth, N. Sträter, A. Sinz, Expression and purification of the ligand-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα). Protein Expr Purif 2008, 62, 185–189, 2008 Impact Factor: 1.621
- M. Q. Müller, L. de Koning, A. Schmidt, C. Ihling, Y. Syha, O. Rau, K. Mechtler, M. Schubert-Zsilavecz, A. Sinz, An Innovative Method to Study Target Protein-Drug Interactions by Mass Spectrometry. J Med Chem 2009, 52, 2875–2879, 2009 Impact Factor: 4.802
- F. Dreiocker\*, M. Q. Müller\*, A. Sinz, M. Schäfer, Collision-Induced Dissociative Chemical Cross-Linking Reagent for Protein Structure Characterization: Applied Edman Chemistry in the Gas Phase. J Mass Spectrom 2010, 45, 178–189, 2009 Impact Factor: 3.411
  \*both authors contributed equally to this work
- A. Hoffmann, M. Q. Müller, M. Gloser, A. Sinz, R. Rudolph, S. Pfeifer, Recombinant Production of Bioactive Human TNFα by SUMO-fusion System – High Yields from Shake-flask Culture. Protein Expr Purif 2010, 72, 238–243, 2009 Impact Factor: 1.563
- M. Q. Müller, F. Dreiocker, C. Ihling, M. Schäfer, A. Sinz, Fragmentation Behavior of a Thiourea-Based Reagent for Protein Structure Analysis by Collision-Induced Dissociative Chemical Cross-Linking. J Mass Spectrom 2010, 45, 880–891, 2009 Impact Factor: 3.411
- M. Q. Müller, F. Dreiocker, C. H. Ihling, M. Schäfer, A. Sinz, A Novel Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis: Reliable Identification of Cross-Linking Products by Tandem MS. Anal Chem 2010, 82, 6958–6968, 2009 Impact Factor: 5.214
- S. Kalkhof, K. Witte, C. H. Ihling, M. Q. Müller, M. Keller, S. Haehn, N. Smyth, M. Paulsson, A. Sinz,
  A Novel Disulfide Pattern in Laminin-Type Epidermal Growth Factor-Like (LE) Modules of Laminin β1 and γ1 Chains. Biochemistry 2010, 49, 8359–8366, 2009 Impact Factor: 3.226
- M. Q. Müller, J. J. Zeiser, F. Dreiocker, M. Schäfer, A. Pich, A. Sinz, A Universal MALDI Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011, 25, 155–161, 2009 Impact Factor: 2.695

 M. Q. Müller, A. Sinz, Chemical Cross-Linking and High-Resolution Mass Spectrometry to Study Protein-Drug Interactions.

Methods Mol Biol, in press

#### Poster

- M. Q. Müller, O. Rau, M. Schubert-Zsilavecz, A. Sinz, Expression and Purification of the Ligand-binding Domain of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPARα), 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Bremen 2007
- M. Q. Müller, L. de Koning, A. Schmidt, C. Ihling, Y. Syha, O. Rau, K. Mechtler, M. Schubert-Zsilavecz, A. Sinz, An Innovative Method To Study Target Protein-Drug Interactions by Mass Spectrometry. First International Meeting GRK 1026 "Conformational transitions in macromolecular interactions", Halle 2008
- 3. M. Q. Müller, L. J. de Koning, R. Aardema, H. L. Dekker, Y. Syha, O. Rau, M. Schubert-Zsilavecz, C. G. de Koster, A. Sinz, Interactions of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPARα) with Ligands Analyzed by Chemical Cross-Linking and Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS and HPLC/ESI-FTICR-MS. 56th ASMS Conference (American Society of Mass Spectrometry), Denver 2008
- M. Q. Müller, L. de Koning, A. Schmidt, C. Ihling, Y. Syha, O. Rau, K. Mechtler, M. Schubert-Zsilavecz, A. Sinz, An Innovative Method To Study Target Protein-Drug Interactions by Mass Spectrometry. DFG-Berichtskolloquium GRK 1026, Halle 2009
- 5. **M. Q. Müller**, L. J. de Koning, A. Schmidt, Y. Syha, M. Schubert-Zsilavecz, K. Mechtler and A. Sinz, Structure Analysis of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR $\alpha$ )/Ligand Complexes by Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, 18th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Bremen 2009
- M. Q. Müller, F. Dreiocker, M. Schäfer, A. Sinz, A Novel Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis – Constant Neutral Losses Simplify Identification of Cross-Linking Products, 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Halle 2010

### Vorträge

- 1. Interaction Studies between the Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and Low Molecular Weight Ligands, Fall Meeting GRK 1026, Lutherstadt Wittenberg 2007
- 2. Structures of PPAR $\alpha$  Analyzed by Chemical Cross-Linking Combined with Nano-HPLC/MALDI-TOF/TOF-MS and HPLC/ESI-FTICR-MS, 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Gießen 2008

- 3. Interaction Studies Between the Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) and Low Molecular Weight Ligands, Fall Meeting GRK 1026, Dresden 2008
- 4. Structure analysis of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ )/ligand complexes by Nano-HPLC/Nano-ESI-LTQ-Orbitrap-MS, 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Konstanz 2009
- 5. Analyzing *in vivo* Protein-Protein Interactions by Incorporation of Unnatural Amino Acids and Photo-Cross-Linking, GRK 1026 Spring Meeting, Oppurg 2009
- 6. Protein-Ligand Interaction Mapping Using Amine-Reactive Cross-Linkers and Photoreactive Amino Acids, 18th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), Bremen 2009
- 7. Shift from Aesthetics Towards Functionality Novel Cross-linkers for Protein Structure Analysis, Fall Meeting GRK 1026, Dessau 2009
- 8. Protein-Ligand Interaction Mapping Using Amine-Reactive Cross-Linkers and Photoreactive Amino Acids, Thermo-Workshop, Halle 2009
- Structure Analysis of Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha (PPARα) Complexes by High Resolution Mass Spectrometry. Internationale Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Pichlarn (Österreich) 2009
- A Novel Cleavable Cross-Linker for Protein Structure Analysis Constant Neutral Losses Simplify Identification of Cross-Linking Products. Spring Meeting GRK 1026, Halle 2010

# Lebenslauf

Name	Mathias Q. Müller
Geburtsdatum	2. November 1981
Geburtsort	Weißenfels
Schulbildung	
Aug. 1992–Juli 2000	Abitur, Melanchthon-Gymnasium Lutherstadt Wittenberg
Studium	
Okt. 2001–Juni 2006	Diplomstudium Chemie an der Universität Leipzig
Nov. 2005–Juni 2006	Diplomarbeit zum Thema "Expression und Reinigung der Ligandenbindungsdomäne des Peroxisom-Proliferator- aktivierten Rezeptors alpha" bei PD Dr. Andrea Sinz (Be- treuerin) und Prof. Dr. Norbert Sträter
Dez. 2005–März 2006	Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. Manfred Schubert- Zsilavecz und Prof. Dr. Volker Dötsch, Goethe-Universität Frankfurt
Juli 2006–Aug. 2006	Praktikumsbetreuung "Quant. Analytik für Biochemiker"
Sept. 2006–Jan. 2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Andrea Sinz, Universität Leipzig
Promotion	
Feb. 2007–Sept. 2010	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Institutsbereich Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Betreuung: Prof. Dr. Andrea Sinz
April 2007–Sept. 2010	Assoziiertes Mitglied des DFG-geförderten Graduiertenkol- legs 1026 "Conformational Transitions in Macromolecular Interactions"
Okt. 2007–Dez. 2007	Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. Chris de Koster, Swam- merdam Instituut voor Levenswetenschapen, Universiteit van Amsterdam

06.07.2011 Verteidigung der Dissertation

XXXI
## Selbständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen genutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, bei der Herstellung des Manuskripts, sowie bei der geistigen Herstellung der vorgelegten Arbeit waren keine anderen Personen beteiligt. Insbesondere wurde weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Halle (Saale), den 21.01.2011

Mathias Q. Müller

XXXIII