Strukturelle und funktionelle Charakterisierung neuartiger Transkriptionsmodulatoren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Iris Nee, M.Sc.

aus **Papenburg**

Marburg/Lahn 2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Wibke Diederich

Zweitgutachter: PD Dr. Till Adhikary

Eingereicht am: 02.01.2019

Disputation am: 13.02.2019

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **6**
1.1 Targets in der Wirkstoffforschung 6
1.2 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR) 9
1.2.1 PPARα 11
1.2.2 PPARγ 12
1.2.3 PPARβ/δ 14
1.3 PPARβ/δ als therapeutisches Target 15
1.4 Wirkmechanismus der Transkriptionsregulation durch PPAR 18
1.5 Struktur-basierte Bindungsstudien zwischen PPAR und Ligand 22
1.6 Target-Identifizierung transkriptionsregulierender Modulatoren 26
1.6.1 Studien der Transkriptionsmodulatoren PPARβ/δ-induzierter Gene 26
1.6.2 Mechanismusaufklärung der Transkriptionsregulierung im Hedgehog-Signalweg 30
2. Zielsetzung **33**
3. Ergebnisse und Diskussion **35**
3.1 Strukturelle Studien zum Bindungsmodus inverser Agonisten zu PPARβ/δ 35
3.1.1 Optimierung der Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD 35
3.1.2 Proteinkristallisation der PPARβ/δ-LBD mit dem Agonist GW0742 57
3.1.3 Bindungsstudien der PPARβ/δ-LBD in Komplex mit inversen Agonisten und CoRepressor 58
3.2 Funktionelle Untersuchung von Transkriptionsmodulatoren 66
3.2.1 Studien zur Target-Identifizierung der PPARβ/δ-unabhängigen DG172-beeinflussten Differenzierung myeloider muriner Knochenmarkzellen 66
3.2.2 Aufstellung einer Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) für die Entwicklung neuer potenter Modulatoren des Hedgehog-Signalweges 71
4. Zusammenfassung **81**
5. Summary **83**
6. Ausblick **85**
7. Material und Methoden **88**
7.1 Chemikalien 88
7.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 89
7.3 Kits 90
7.4 Sequenzen und Plasmide 91
7.5 Software 91

7.6 Medium- und Pufferzusammensetzungen 92
7.7 Zelluläre Methoden 93
7.7.1 Passagieren der Zellkultur 94
7.7.2 Auftauen der Zelllinien 94
7.7.3 Einfrieren der Zelllinien 94
7.7.4 Zellzahlbestimmung 95
7.7.5 Untersuchung der Zelllinien in Anwesenheit von neuartigen Substanzen 95
7.7.6 Gewinnung und Untersuchung myeloider muriner Knochenmarkzellen 95
7.8 Biochemische Methoden 97
7.8.1 Proteinisolation und Aufreinigung 97
7.8.2 Dialyse 100
7.8.3 Aufkonzentrieren von Proteinlösung 101
7.8.4 Konzentrationsbestimmung der Proteine 101
7.8.5 Reinheitsbestimmung via SDS Polyacrylamidgelelektrophorese 101
7.8.6 *Homogeneous time resolved fluorescence Assay* (HTRF) 103
7.9. Molekularbiologische Methoden 104
7.9.1 Hitzeschock Transformation 104
7.9.2 Plasmidpräparation 104
7.9.3 RNA-Isolierung 104
7.9.3 cDNA Synthese 104
7.9.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) 105
Literaturverzeichnis **106**
Appendix **114**
Eidesstattliche Erklärung **121**
Abkürzungsverzeichnis **122**
Danksagung **124**
Lebenslauf **126**

1. Einleitung

1.1 Targets in der Wirkstoffforschung

Biologische Prozesse werden in einem Zusammenspiel vieler beteiligter Komponenten direkt oder indirekt (z.B. *feedback*-Regulation) in komplexen Mechanismen reguliert. Eine Beeinträchtigung dieses Systems bedeutet eine Dysfunktion und resultiert meist in Erkrankungen. Die Aktivierung beziehungsweise Inhibierung dieser Proteine oder Protein-Komplexe erfolgt oft über Interaktion mit endogenen Liganden wie Fettsäuren, Hormonen, Peptiden. Daher gelten synthetische Modulatoren, die selektiv an das *protein of interest* binden, als geeignetes Mittel zur Wiederherstellung des Gleichgewichts und werden deshalb als Wirkstoff zur Behandlung der Erkrankung eingesetzt.

Für eine gezielte und effektive Wirkung müssen sowohl die Modulatoren als auch die Proteintargets bestimmte Anforderungen erfüllen. Damit die synthetischen Liganden bioverfügbar sind, werden die Wirkstoff-Kandidaten hinsichtlich ihrer pharmakochemischen Eigenschaften optimiert. Diese *small molecules* unterliegen damit meist der „*LIPINSKI Rule of 5*“ (Molekulargewicht unter 500 Da, nicht mehr als fünf Donatoren und zehn Akzeptoren der Wasserstoffbrückenbindungen, Lipophilie $\log P \leq 5$) [1]. Dementsprechend gelten aber auch Anforderungen an die Beschaffenheit der Proteinbindetasche des Targets, damit die Interaktionen zu den Wirkstoff-Kandidaten ausgebildet werden können und das Protein letztlich als geeignetes Drug Target adressiert werden kann. Die Einschätzung dieser Bindekapazität des Proteins zu einem Wirkstoff (*druggability*) ist sehr dynamisch und hängt dabei immer vom aktuellen Stand der Technik und der Forschung ab [2]. Über Sequenzanalyse können Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Wirkstoff-Targets entdeckt und damit neue potentielle Proteintargets erkannt oder bestätigt werden. Untersuchungen publizierter Proteinstrukturen in der Proteindatenbank können weitere Bindetaschen aufzeigen, die für *small molecules* zugänglich wären. Ein potentielles Target mit einer guten Wirkstoff-Bindekapazität kann bei der Analyse der endogenen Liganden und deren Metabolite bezüglich seiner strukturellen Eignung (Liganden- oder Metabolitendatenbank) sowie bei der Untersuchung von verfügbaren potenten Substanzen identifiziert und bestätigt werden [3].

Von den circa 20.000 – 25.000 Protein-kodierenden Genen im menschlichen Genom [4] werden ungefähr 3.000 Gene mit Proteinen assoziiert, die für einen therapeutischen Ansatz über *small molecules* genutzt werden können. Bisher zugelassene Wirkstoffe sowie noch zu prüfende Kandidaten, die als potente *small molecules* selektiv die Proteinaktivität beeinflussen, weisen häufig strukturelle Ähnlichkeiten zu deren endogenen Liganden auf. Bis zum Jahr 2002 adressieren die zugelassenen Arzneistoffe 399 verschiedene Proteintargets aus insgesamt 130 unterschiedlichen Proteinfamilien, von denen die Hauptvertreter den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) (25%), Proteinkinasen (Serin/Threonin, Tyrosin; 10%), Zink-Metalloproteasen (4%), Serin-proteasen (3%), Kernrezeptoren (3%) sowie Phosphodiesterasen (3%) zugehören (Diagramm 1) [5]. Jedes Jahr werden ungefähr vier neue Drug Targets identifiziert. Unter der Annahme, dass Proteine innerhalb einer Familie ähnliche Ligandenbindungsdomänen oder Bindetaschen haben, müssten wesentlich mehr Proteintargets mit Hilfe von *small molecules* modulierbar sein. Damit könnte die Menge der potentiellen Drug Targets auf ungefähr 3.000 Protein-kodierende Gene erweitert werden, die wiederum eine andere Verteilung der adressierten Proteinfamilien aufweisen [2,5].

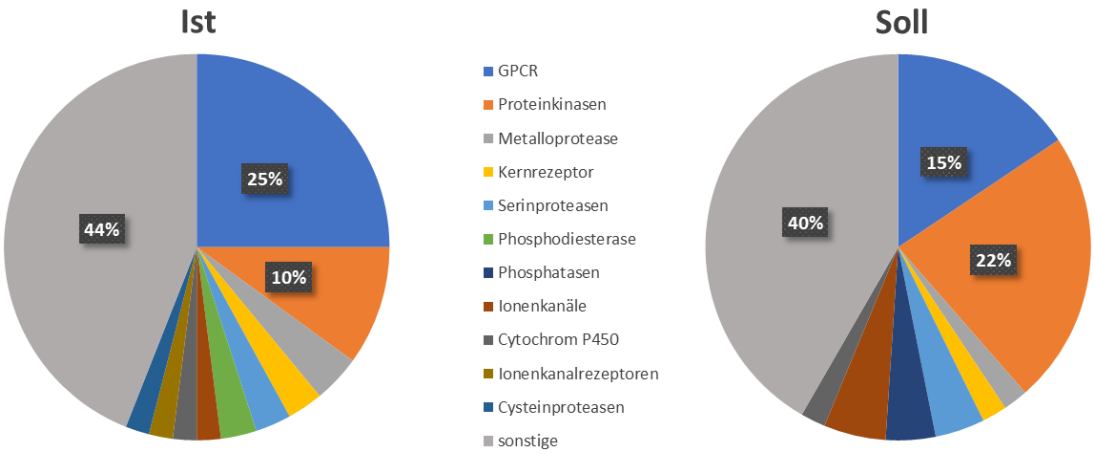


Diagramm 1: Adressierte Proteinfamilien zugelassener Wirkstoffe und Kandidaten in der klinischen Phase (Ist-Zustand 2002), die der LIPINSKI-Regeln unterliegen, sowie die Erweiterung der potentiellen Drug Targets unter Betrachtung der Proteinfamilien (Soll-Zustand). Adaptiert und modifiziert nach Hopkins und Groom [aus 5]. GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor.

Aktuelle Zahlen von 2017 zeigen eine Übereinstimmung mit dem Ist-Zustand in der Verteilung und Art der vorliegenden Proteinfamilien, die von bereits zugelassenen Arzneistoffen als Drug Targets adressiert werden (U.S. amerikanische *food and drug*

administration). Hierbei wird ebenfalls deutlich, dass fast die Hälfte der zugelassenen Wirkstoffe Modulatoren der Proteinfamilien GPCR (12%), Ionenkanäle (19%), Kinasen (10%) und Kernrezeptoren (3%) sind. Allein die zugelassenen *small molecules* gehören zu über 70% dieser Proteinfamilien an (Diagramm 2) [6], von denen der Hauptvertreter die GPCRs sind. Bei dieser Betrachtung fällt auf, dass momentan viele *small molecule* Wirkstoffe für Kernrezeptoren entwickelt wurden und diese damit ein wichtiges Drug Target darstellten.

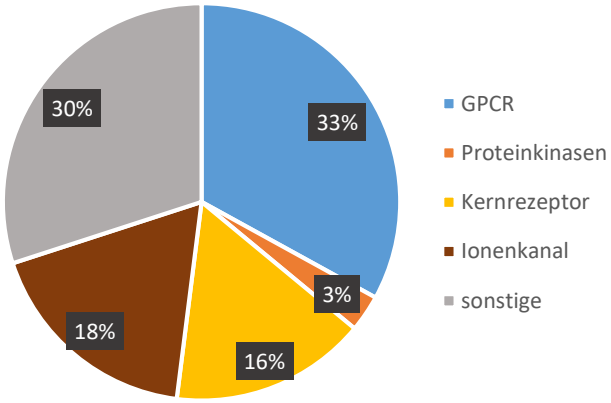


Diagramm 2: Anteil der Proteinfamilien der bis 2017 zugelassenen *small molecule* Wirkstoffe. Adaptiert und modifiziert nach *Santos et al.* [aus 6].

Doch die Gene beziehungsweise Proteine, die mit humanen Krankheiten assoziiert werden, sind nicht zwangsläufig identisch mit der Anzahl an Proteinen, die durch *small molecules* inhibiert oder aktiviert werden können. Folglich kann nicht jede dysfunktionale Proteinreaktion durch synthetische Modulatoren aufgehoben werden. So wird angenommen, dass nur circa 10% der mit Erkrankungen-assoziierten Proteine in ihrer Wirkweise von *small molecules* beeinflusst werden können [5].

Aus diesem Grund ist eine Erweiterung der therapeutischen Strategie wichtig, damit bessere oder auch neue Ansätze zur Behandlung humaner Erkrankungen entwickelt werden können. Zwar ist die Identifizierung neuer Targets sowie weiterer Modulatoren sehr wichtig, aber viele Proteine bilden heterogene Komplexe aus und sind an verschiedenen Mechanismen und vielfältigen Funktionen beteiligt. Folglich würde die Entwicklung neuer Substanzklassen, die zwar dasselbe Protein binden aber abhängig vom

ausgebildeten Komplex zielgerichteter adressieren können, die Möglichkeiten der Wirkstoffforschung steigern.

Eine wichtige Strategie in der Wirkstoffforschung zur Entwicklung neuer Arzneistoffe ist die Beeinflussung der Transkriptionskontrolle durch Modulatoren. Die Regulation der Genexpression ist sehr komplex und Dysfunktionen sind mit vielen unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. Zur Aktivierung oder Repression werden Proteinkomplexe ausgebildet, die teils mit endogenen Liganden wie Lipiden oder Hormonen interagieren. Modulatoren von Transkriptionsfaktoren erwirken keine schnelle Antwort, sondern der Vorteil dieser Expressionsregulation liegt in der langfristigen Veränderung ihrer biologischen Funktion. Durch die differenzielle Adressierung dieser Proteine ist ein neuer Bereich der Wirkstoffforschung möglich.

1.2 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor (PPAR)

Eine Familie der Transkriptionsfaktoren sind die Kernrezeptoren, die aus insgesamt 48 Vertretern bestehend in vier verschiedenen Klassen eingeteilt werden. Die Einteilung erfolgt über die unterschiedliche Dimerisierung der Kernrezeptoren mit Cofaktoren und über die Wechselwirkungen zur DNA sowie zu Liganden. Die erste Kernrezeptorgruppe sind die Steroidrezeptoren wie der Glucocorticoidrezeptor und Östrogenrezeptor, die Homodimere ausbilden und mit palindromischen Erkennungssequenzen der DNA interagieren. Eine weitere Gruppe sind die homodimeren orphan Rezeptoren wie der *hepatocyte nuclear receptor 4* (HNF-4), die ebenfalls als Homodimere vorliegen allerdings über eine nicht-palindromische Erkennungssequenz mit der DNA wechselwirken. Kernrezeptoren wie der *RAR-related orphan receptor* (ROR) gehören zur Klasse der monomeren orphan Rezeptoren und interagieren als Monomere mit der DNA-Erkennungssequenz. Die vierte Klasse der Kernrezeptoren umfasst die Retinoid-X-Rezeptor (RXR) Heterodimere wie beispielsweise der Thyroid Hormonrezeptor (TR). Hierbei entsteht ein Heterodimer mit einem Retinoid-X-Rezeptor, der über eine nicht-palindromische sich wiederholende Erkennungssequenz mit der DNA interagiert [7,8]. Zu dieser letzten Klasse der Kernrezeptoren gehören ebenfalls die um 1990 entdeckten Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR). Diese Unterfamilie der Kernrezeptoren PPAR besteht aus den drei Subtypen PPARα (NR1C1), PPARβ/δ (NR1C2) und PPARγ (NR1C3) und kommen in Säugetieren vor [9]. Die PPAR wirken als liganden-induzierte

Transkriptionsfaktoren und haben damit einen erheblichen Einfluss auf die Genexpression. Die Regulation der Transkription erfolgt über Fettsäuren (Arachidonsäure, Eicosapentaensäure) und Prostaglandine (Prostaglandin I2 PGI_2 auch Prostacyclin genannt) sowie deren Metabolite und zeigt langfristige Effekte [10]. Endogene wie auch synthetische Liganden der PPAR aktivieren oder reprimieren die Genexpression unter Rekrutierung spezifischer Cofaktoren (Kapitel 1.4). So bewirken Agonisten eine Induktion der Transkription nach CoAktivator-Rekrutierung, inverse Agonisten hingegen fungieren als Repressoren der Genexpression nach Anlagerung rekrutierter CoRepressoren an PPAR. In Anwesenheit eines Antagonisten wird die Expression exklusive CoRepressoren sowie die Spontananlagerung von Liganden gehemmt und verbleibt auf dem basalen Level.

Die drei Subtypen weisen eine sehr hohe Sequenz- und Strukturhomologie auf, weswegen der Aufbau der drei PPAR sehr ähnlich zueinander ist. Am N-Terminus befindet sich die Aktivierungsfunktion AF-1 (Abbildung 1), welche Liganden-unabhängig die Transkription reguliert [11]. Die sich anschließende DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist in den drei Subtypen hoch konservativ und weist zwei Zinkfinger-Motive auf. An dieser DBD interagiert der PPAR mit den regulatorischen Elementen der PPAR assoziierten und durch PPAR regulierten Genen der DNA, den sogenannten *peroxisome proliferator response elements* (PPRE), wodurch die Transkription des entsprechenden Gens beeinflusst wird. Nach der DBD folgt der sehr flexible Bereich der *hinge*-Region. Am C-Terminus befindet sich die Ligandenbindungsdomäne (LBD) inklusive der für die Liganden-basierte Transkriptionsregulation essentielle, konservierte Aktivierungs-funktion AF-2 (α-Helix 12) (Kapitel 1.4, 1.5) [7,12]. Die LBD ist unter den Subtypen zu 60% - 70% homolog und bildet eine hydrophobe Y-geformte Bindetasche mit einer enormen Oberfläche von ungefähr 1.300 $Å^3$. Trotz dieser hohen Homologie unterscheidet sich die LBD von PPARβ/δ aufgrund einer zusätzlichen Helix stärker von den Subtypen PPARα und PPARγ [13–16].

Abbildung 1: Allgemeine kodierende Sequenz für Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR). Adaptiert nach Novac und Heinzel [17]; AF: Aktivierungsfunktion, DBD: DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligandenbindungsdomäne.

Diese Liganden-induzierten Transkriptionsfaktoren besitzen zahlreiche, unterschiedliche Funktionen im Organismus wie unter anderem im Lipid- und Glukose-Metabolismus sowie der Immunantwort abhängig vom Zelltyp. Der Wirkmechanismus der PPAR ist sehr komplex und noch nicht vollständig mit allen an der Transkriptionsregulierung beteiligten Proteine und Cofaktoren aufgeklärt. Aufgrund dieser Komplexität sind die PPAR ein sehr interessantes Forschungsgebiet, zudem ist die PPAR-vermittelte Transkriptionsregulierung der entsprechenden Zielgene ein vielversprechender Angriffspunkt in der Wirkstoffentwicklung.

1.2.1 PPARα

Die Hauptfunktion von PPARα ist die Regulation der Energiegewinnung durch den Fettsäurekatabolismus, die Gluconeogenese sowie Ketogenese und daher ist PPARα in metabolisch hochaktiven Zellgeweben wie dem plurivakuolären Fettgewebe, der Leber, den Nieren, dem Herz und der Skelettmuskulatur exprimiert [13,18]. Durch die Interaktion von PPARα mit den endogenen Liganden (Fettsäuren) wird die Transkription der Gene für den Fettsäuremetabolismus reguliert. Diese Regulierung durch Agonisten kann auch pharmakologisch bei der Behandlung der Hyperlipidämie genutzt werden, indem durch die Aktivierung des PPARα die Produktion des Apolipoprotein C-III herabgesetzt wird. Dadurch wird die Triglycerid-Konzentration sowie die Konzentration an *low densitiy lipoproteins* (LDL) unter gleichzeitigem Anstieg der *high density lipoprotein* (HDL) Menge reduziert [10,19]. Dieser Effekt der Abnahme der LDL- und Triglycerid-Konzentration wird von der Wirkstoffklasse der Fibrate (Abbildung 2, blau) wie Fenofibrat, Clofibrat und Gemfibrozil hervorgerufen [18,20].

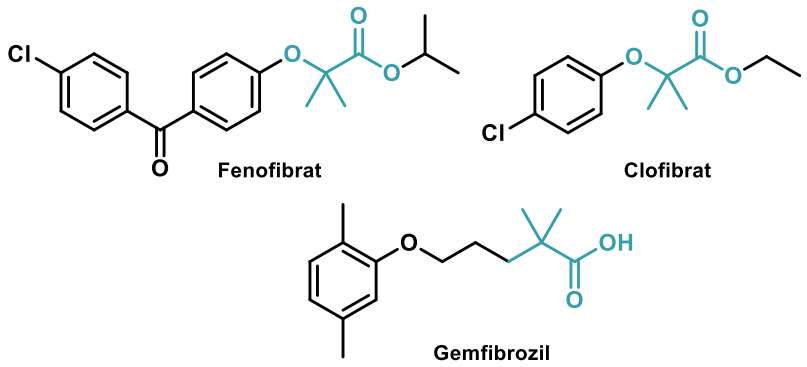


Abbildung 2: Entwickelte Arzneistoffe der PPARα-Agonisten.

Durch die agonistische Wirkung der Fibrate als Lipidsenker wird das kardiovaskuläre Risiko bei Hyperlipidämie verringert, außerdem wird das Fortschreiten von Arteriosklerose gehemmt. Bei der Therapie des Typ II Diabetes werden zwar auch Fibrate eingesetzt, da bei Diabetes auch eine Hyperlipidämie vorliegen kann. Studien über die Verwendung von Fenofibrat bei Typ II Diabetes zeigten eine Abnahme der Schwere der kardiovaskulären Erkrankungen. Jedoch führte weder die Therapie mit Fenofibrat noch eine kombinierte Therapie aus Fibrat und Statin zu einer signifikanten Reduzierung kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich zur herkömmlichen Statin-Therapie [21,22], weshalb Fibrate bei der Behandlung von Typ II Diabetes eher zweitrangig sind. Der erste Vertreter der Fibrate, das Clofibrat, wurde aufgrund schwerer Nebenwirkungen vom Markt genommen [23].

1.2.2 PPARγ

In allen Fettgewebearten des Organismus ist PPARγ exprimiert und einerseits hauptsächlich für die Lipidspeicherung und die Energiegewinnung beziehungsweise Energieumwandlung verantwortlich, andererseits an der Differenzierung der Zellen zu Fettgewebe beteiligt. Außerdem ist PPARγ in Zellen von Herz, Niere, Leber, Skelettmuskulatur und in geringem Maße im Lymphgewebe vorhanden [24]. Darüber hinaus wird durch eine Aktivierung von PPARγ die Insulinsensititivität der Zellen erhöht, sodass folglich synthetische Agonisten im therapeutischen Ansatz zur Behandlung des Typ II Diabetes genutzt werden können [10]. Die identifizierte und verifizierte Wirkstoffklasse sind die Thiazolidindione (Abbildung 3, blau) wie Troglitazon

Rosiglitazon, Pioglitazon, die eine vermehrte Aufnahme von Blutzucker bewirken und damit der Insulinresistenz bei Typ II Diabetes-Patienten entgegenwirken [25].

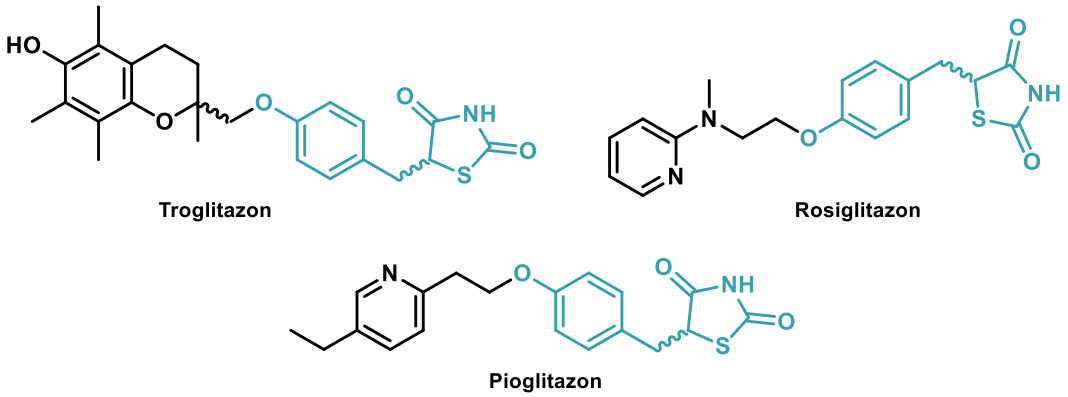
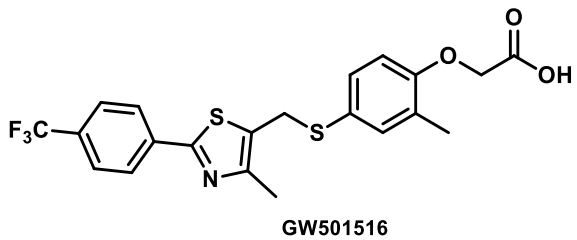


Abbildung 3: Strukturen der als PPARγ-Agonisten entwickelten Arzneistoffe.

Allerdings weisen die Arzneistoffe der Thiazolidindione erhebliche Nebenwirkungen wie beispielsweise Infarkte, Gewichtszunahme und Knochenfrakturen auf. Im Fall von Troglitazon wurde das Medikament zwei Monate nach der Zulassung in Großbritannien im Jahr 2000 vom Markt entfernt (globale Zulassung: insgesamt drei Jahre), da auch eine kurze Therapie mit Troglitazon bei den Diabetes Patienten zu schwerwiegenden Leberschäden bis zu akutem Leberversagen führte [26–28]. Die Marktzulassung von Rosiglitazon wurde wegen eines erhöhten Infarktrisikos 2010 ebenfalls aufgehoben [23]. Zur Zeit ist Pioglitazon für die Behandlung von Typ II Diabetes zugelassen, dennoch sollte hierbei die Behandlung auf maximal zwei Jahren limitiert werden, weil dieses Medikament im Verdacht steht die Entwicklung von Blasenkrebs zu fördern [29,30].

1.2.3 PPARβ/δ

Obwohl die drei PPAR-Subtypen eine hohe Strukturhomologie aufweisen und viele Domänen der Rezeptoren auf Ebene der Aminosäuresequenz konserviert sind, unterscheidet sich PPARβ/δ stärker von den Subtypen PPARα und PPARγ. Überwiegend stark ist PPARβ/δ in den größten Organen, dem Darm und der Haut, exprimiert. Im Gegensatz zu PPARα und PPARγ ist der Kernrezeptor PPARβ/δ allerdings ubiquitär exprimiert [31,32], woraus geschlossen werden kann, dass dieser Subtyp eine essentielle und gesonderte Rolle im Organismus einnimmt. Dementsprechend ist PPARβ/δ an zahlreichen verschiedenen Funktionen im Körper beteiligt und ist ähnlich wie PPARα und PPARγ abhängig vom Expressionslevel des Zelltyps ein entscheidender Regulator im Lipidkatabolismus, Cholesterinmetabolismus, in der Glucohomöostase und in der Immunregulation. Zusätzlich zu diesen Funktionen ist die Mitwirkung von PPARβ/δ in der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose bekannt [33,34]. Sowohl endogene als auch synthetische Liganden beeinflussen die Aktivität von PPARβ/δ und können dadurch als Transkriptionsmodulatoren die Expression ihrer Zielgene regulieren. Als endogene Liganden sind gesättigte und ungesättigte Fettsäuren wie die Arachidonsäure und Eicosapentaensäure sowie Prostaglandin I2 PGI_2 (oder auch Prostacyclin genannt) zu nennen, außerdem konnte der Metabolit der Arachidonsäure, 15-Hydroxyeicosa-tetraensäure, als potenter Ligand identifiziert werden [35]. Zur Zeit ist jedoch kein Wirkstoff vollständig entwickelt, der PPARβ/δ als Targetprotein adressiert (Kapitel 1.3). Der Entwicklung des neuesten Wirkstoff-Kandidaten **GW501516** (Agonist) wurde im Jahre 2007 wegen der *in vivo* beobachteten Krebsentstehung im Mausmodell abgebrochen [36,37].



GW501516

Abbildung 4: Struktur des Wirkstoff-Kandidaten **GW501516**, PPARβ/δ-Agonist, dessen Entwicklung aufgrund seiner karzinogenen Wirkung abgebrochen wurde.

1.3 PPARβ/δ als therapeutisches Target

Die Regulierung biologischer Prozesse kann über Transkriptionskontrolle codierter Zielproteine erfolgen, indem durch synthetische Modulatoren des liganden-induzierten Transkriptionsfaktors PPARβ/δ die Genexpression beeinflusst wird. Die Funktionen von PPARβ/δ sind vielseitig und vom Zelltyp abhängig (Kapitel 1.2.3). Durch Agonisten-vermittelte Expression spezifischer Zielgene des Fettsäure- und Cholesterinmetabolismus in der Skelettmuskulatur wird weniger Apolipoprotein C-III gebildet. Dadurch wird die LDL-, Trigylcerid- und Cholesterin-Konzentration unter steigender HDL-Konzentration im Blut verringert. Als Folge dieses verbesserten Lipid- und Glucosemetabolismus wird das vaskuläre System bei Adipositas durch die von PPARβ/δ-Agonisten induzierte Genexpression geschützt [38,39]. Zusätzlich wird die Insulinsensitivität der Zellen durch Transkriptionsaktivierung verstärkt, was bei Typ 2 Diabetes mit einer Insulinresistenz als Angriffspunkt für eine mögliche Behandlung genutzt werden könnte. Aufgrund der protektiven vaskulären Wirkung von β/δ-Agonisten sowie der Blutdrucksenkung bei Adipositas ist PPARβ/δ ein sehr interessantes Target für die Entwicklung neuer Medikamente gegen das metabolische Syndrom bei Diabetes und Adipositas [39].

Die Beteiligung von PPARβ/δ an der Immunregulation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ein Zusammenhang zwischen diesem Kernrezeptor und der Entzündungsantwort des Körpers zeigt sich jedoch im beobachteten erhöhten Expressionslevel von PPARβ/δ bei der Schuppenflechte (Psoriasis), eine dermatologische Entzündung als Folge einer Autoimmunerkrankung der Haut [40,41]. Anhand von Tierversuchen wurde eine verbesserte Wundheilung durch Gabe von **GW501516** in Mäusen beobachtet [42,43], wohingegen in PPARβ/δ-*knock-out* Mäusen die Wundheilung sowie das Ausbilden der Plazenta nicht mehr vollständig sondern fehlerhaft war [44,45]. Neben der proinflammatorischen Regulierung wirkt PPARβ/δ auch anti-inflammatorisch, was durch die Agonist-induzierte Hemmung des Interleukin 1-Signalweges in Fibroblasten deutlich wird [46–49]. In Makrophagen wurde ebenfalls eine inverse Regulierung beobachtet, bei der die Transkription NFκB-regulierter Zielgene von β/δ-Agonisten reprimiert wird [50].

Interessanterweise ist von den drei Subtyen des Kernrezeptors ausschließlich PPARβ/δ ubiquitär exprimiert und fungiert abweichend zu PPARα und PPARγ zusätzlich als Regulator in der Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose [34]. Wegen dieser

wichtigen Rolle im Zellzyklus ist eine Funktion in der Tumorgenese denkbar, aber bisher ist der Mechanismus der von PPARβ/δ regulierten Genexpression mit all seinen beteiligten Cofaktoren nicht vollständig aufgeklärt. Die Bedeutung des Kernrezeptors PPARβ/δ in der Krebsentstehung und Entwicklung ist bislang umstritten [33] und bedarf weiterer Untersuchungen. Zum einen besteht eine Korrelation zwischen der Überlebensprognose bei Brustkrebs, Gliomen sowie Lungenadenokarzinom zum PPARβ/δ-Expressionslevel, also eine vermehrte PPARβ/δ-Expression bedeutet eine schlechte Prognose [51] oder korreliert in rezidiver Erkrankung [52,53]. Außerdem zeigen synthetische Liganden einen Effekt auf die Tumorgenese und bestätigen diese Assoziation des Kernrezeptors mit Krebs. Der synthetische β/δ-Agonist **GW501516** (Abbildung 4) bewirkt die Tumorentstehung in transgenen Mäusen gegenüber dem Wildtyp abhängig von der *Phosphoinositide-dependent Kinase-1* (PDK1) [54]. Mit Hilfe des inversen Agonisten ST247 wird die *transforming growth factor β* (TGFβ)-induzierte Zellinvasion inhibiert, beobachtet in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 [55]. Dadurch würde die Metastasierung gehemmt. Dennoch liegen widersprüchliche Erkenntnisse in Bezug auf die Funktion von PPARβ/δ in der Krebsentstehung vor [56]. Einerseits bewirkt die Überexpression von PPARβ/δ unter Deletion des Tumorsuppressors *Apc* eine Krebsentwicklung in Mäusen [57], andererseits besteht ein erhöhtes Darmkrebsrisiko bei PPARβ/δ *knock-out* Mäusen trotz Abwesenheit des Tumorsuppressor *Apc* im Gegensatz zum Wildtyp [58]. Daher ist die Entwicklung potenter Subtyp-spezifischer Liganden für die Mechanismusaufklärung der PPARs wichtig, woraus neue Strategien für die Wirkstoffforschung formuliert werden können.

Die Expressionsregulation übt einen langfristigen Eingriff auf die Zielgene aus, weshalb Transkriptionsmodulatoren sehr interessante Werkzeuge zur Darstellung neuer Therapeutika sind. Agonisten von PPARβ/δ gelten als Lipidsenker und Insulinsensitizer und werden als potentielle Wirkstoffe für die Behandlung der Hyperlipidämie, des metabolischen Syndroms oder Typ II Diabetes untersucht und weiterentwickelt. Da die Wirkweise des PPARβ/δ sehr komplex und nicht gänzlich verstanden ist, wurden viele Wirkstoff-Kandidaten wie **GW501516** in der klinischen Phase aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen nicht weiter verfolgt [36,37]. So sind bis zum Jahr 2018 allgemein die drei Arzneistoffe Pioglitazon, Lobeglitazon und Rosiglitazon für die Behandlung von Typ II Diabetes zugelassen, die PPARγ als Agonist oder als dualen Agonisten (α und γ) adressieren, von denen allerdings das Rosiglitazon bereits vom Markt

genommen wurde (Kapitel 1.2.2). Fünf weitere PPAR-spezifische Liganden befinden sich zur Zeit in klinischen Studien zur Behandlung von Diabetes [23]. Im Jahr 2018 werden sieben PPARβ/δ-selektive Wirkstoff-Kandidaten auf ihren Einsatz in verschiedenen Erkrankungen geprüft und befinden sich in unterschiedlichen Stadien der klinischen Phase. Der selektive PPARβ/δ-Agonist HPP 593 bewirkt zum einen die Senkung der LDL- und Triglycerid-Konzentration und zum anderen die Erhöhung der HDL-Konzentration, sodass dieser Kandidat als potentieller Wirkstoff zur Behandlung von Diabetes und Störung des Lipidstoffwechsels in der klinischen Phase II untersucht wird [23,59]. Weitere Kandidaten für die Therapie der Lipidstoffwechselstörung sind der selektive β/δ-Agonist CER-002 (Phase I) [60] und der duale Agonist von PPARβ/δ und PPARα Elafibranor (Phase III) [61]. Neben der beobachteten Wirkung der β/δ-Agonisten in Adipositas, Dyslipidämie und Diabetes zeigten weitere potentielle Wirkstoff-Kanidaten positive Effekte bei anderen Erkrankungen. Für die Behandlung der primären biliären Cholangitis wird der selektive β/δ-Agonist Seladelpar als Cholesterolsenker in Phase III geprüft [62,63]. Der duale Agonist von PPARβ/δ und PPARγ T3D-959 verbessert das Erinnerungs- und Lernvermögen und wird daher in Phase II zur Behandlung von Alzheimer untersucht [64]. Außerdem zeigt der selektive PPARβ/δ-Agonist KD-3010 verbesserte Lipoproteinkonzentrationen bei der Therapie von Adipositas und Dyslipidämie [65], zusätzlich gilt diese Substanz als potentieller Arzneistoff zur Behandlung der Huntington Erkrankung [66] und befindet sich in der klinischen Phase I. Der PPARβ/δ Modulator MA-0211 wird zur Zeit für eine Indikation bei Muskeldystrophie Duchenne in Phase I untersucht [23].

In den letzten Jahren wurden von den entwickelten PPAR-Modulatoren für die Behandlung von Diabetes insgesamt 32 potentielle Wirkstoff-Kandidaten in der klinischen Phase abgebrochen [23]. Am Beispiel der reinen PPARγ-Agonisten Rosiglitazon und Pioglitazon zeigt sich ein Unterschied zwischen diesen beiden Liganden, obwohl beide der Strukturklasse der Thiazolidindione angehören. Durch Rosiglitazon entstehen starke Nebenwirkungen, sodass die Zulassung des Medikamentes entzogen wurde. Der etwas schwächere Agonist Pioglitazon, der ebenfalls die Phosphorylierung von PPARγ inhibiert, ist noch erhältlich. Ein möglicher Grund für diesen Unterschied und für die schwerwiegenden Nebenwirkungen der synthetischen PPAR-Liganden könnte der reine Agonisten-Charakter der Kandidaten sein. Somit wäre die Problematik nicht strukturell bedingt, sondern im Mechanismus der ligand-

induzierten Transkriptionsfaktoren begründet [67]. Daraus wird deutlich, dass der Einfluss der Transkriptionsmodulatoren von PPAR in den biologischen Prozessen untersucht und die Regulationskaskade der Kernrezeptoren im Detail aufgeklärt werden muss. Durch dieses Verständnis können bessere Wirkstrategien der Liganden entwickelt und dadurch neue Therapie-Ansätze entstehen.

1.4 Wirkmechanismus der Transkriptionsregulation durch PPAR

Die Kernrezeptoren PPAR unterliegen Subtyp-unabhängig dem gleichen Wirkmechanismus und fungieren als Regulatoren der Genexpression bestimmter Zielgene, indem diese Kernrezeptoren die Transkription initiieren oder reprimieren. Die Steuerung dieser PPAR-induzierten Transkriptionskontrolle geschieht entweder Liganden-vermittelt oder Ligand-unabhängig und verläuft über eine kanonische aber auch über eine nicht-kanonische Regulierung. Eine PPAR-vermittelte Transkriptionskontrolle der Zielgene verläuft über drei verschiedene Regulationsmechanismen (Tabelle 1), der Liganden-unabhängigen Repression durch PPAR (Typ I), Aktivierung oder Derepression durch PPAR, welche durch Liganden induziert oder begünstigt werden kann (Typ II), und Ligand-unabhängige Aktivierung durch PPAR (Typ III) [56,68]. Hierbei wird ein Heterodimer aus PPAR und Retinoid-X-Rezeptor (RXR) gebildet sowie ein CoRepressor rekrutiert (Abbildung 5). Die Anlagerung des PPARs an die DNA erfolgt über die DNA-Bindungsdomäne (DBD) nach Ausbilden des Heterodimers mit dem Kernrezeptor RXR. Dieser Komplex interagiert mit den regulatorischen Elementen PPAR-regulierter Zielgene an den spezifischen Sequenzen der DNA bestehend aus dem AGGTCA-Motiv, dem PPAR *response element* (PPRE). Diese Erkennungssequenz für PPAR tritt zweifach aneinander gereiht mit einem Basenpaar zwischen den einzelnen Hexameren im PPRE als direkter Wiederholungstyp (DR-1) auf (AGGTCAxAGGTCA). An dieses bestehende Heterodimer bindet der CoRepressor und wechselwirkt mit beiden Komponenten des Komplexes, bei PPAR liegt hierbei eine Interaktion des CoRepressors mit der PPAR-Ligandenbindungsdomäne (LBD) vor. Bei dieser Ligand-unabhängigen Regulation sind bisher die CoRepressoren SMRT (*silencing mediator of retinoid and thyroid receptor*) und NCoR (*nuclear receptor CoRepressor*) identifiziert worden, durch deren Rekrutierung die Transkription der Zielgene reprimiert wird [14,17,69,70].

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Genregulation durch die Kernrezeptoren PPAR über Interaktion mit den PPRE [56]. PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, PPRE: PPAR *response element*.

Zielgene	Definition
Typ I	Repression der Genexpression durch Anlagerung des PPAR:RXR-Heterodimers an PPRE. Expression kann nicht durch Agonisten induziert werden.
Typ II	CoRepressor-gebundener Komplex mit PPAR und RXR bindet liganden-induziert an das PPRE (weist 5'flankierende AAGT-Sequenz auf [68]). Reprimierte Zielgenexpression ist durch Agonisten oder inversen Agonisten induzierbar.
Typ III	Liganden-unabhängige Aktivierung durch PPAR, möglicherweise Interaktion von PPAR zu anderen Transkriptionsfaktoren. Das DNA-Bindungsmotiv zeigt hier eine unvollständige PPRE-ähnliche Erkennungssequenz (AGG statt AGGTCA) auf [68].

Abhängig vom Wirk-Charakter des Liganden wird ein Komplex aus PPAR und spezifischen Cofaktoren gebildet, der mit der DNA interagiert. Modulatoren von PPARβ/δ adressieren hierbei die circa 1.300 $Å^3$ große, hydrophobe Ligandenbindungs-domäne (LBD), welche aus sechs α-Helices und zwei β-Faltblättern aufgebaut und Ypsilon-artig geformt ist [71]. Die LBD lässt sich in drei unterschiedliche Bereiche, Arm I – III, einteilen, die teils zwischen den Subtypen der PPARs variieren. Der polare Arm I ist ein hochkonservierter Bereich der LBD, der die für den Wirkmechanismus essentielle Aktivierungsfunktion Helix 12 enthält [16,72]. Die Bereiche Arm II und III der LBD sind weniger konserviert und in diesen findet die Interaktion zu den hydrophoben Teilen der Liganden statt [12,71,72]. Aufgrund dieser großen Bindungstasche können strukturell divergente Liganden mit PPAR interagieren und abhängig ob Agonist, Antagonist oder inverser Agonist eine unterschiedliche Reaktion hervorrufen.

Die Regulation kanonischer, PPAR-induzierter Typ II Gene findet Liganden-vermittelt statt, indem die Repression der Zielgenexpression durch Agonisten initiiert oder die Affinität der gebundenen CoRepressoren durch inverse Agonisten gesteigert wird (Abbildung 5). Die Anlagerung eines Agonisten resultiert in einer Konformationsänderung der Helix 12, die zur AF-2 der LBD von PPAR gehört. Durch diese Umlagerung der Helix 12 wird die LBD für den CoAktivator zugänglich, sodass dieser unter gleichzeitiger Dissoziation des gebundenen CoRepressors an den PPAR:RXR-Komplex bindet und dadurch die Genexpression aktiviert wird. Der CoAktivator umspannt das Heterodimer und die Bindung des CoAktivators mit der PPAR-LBD erfolgt über das helikale CoAktivator-Motiv LXXLL zwischen den hydrophoben Teilen Arm II und Arm III der LBD. Aufgrund des formierten *charge clamp* aus Helix 3 und Helix 12 wird die Struktur der CoAktivator-Helix stabilisiert [73]. Inverse Agonisten hingegen bewirken eine Umlagerung der Helix 12 um 90°, wodurch die Helix 12 der LBD mit dem CoAktivator kollidieren würde. Folglich dissoziiert der zuvor gebundene CoAktivator, während gleichzeitig eine Interaktion zu einem PPAR-spezifischen CoRepressor an dessen Erkennungssequenz LXXXIXXXL möglich wird und die Transkription folglich reprimiert wird [7].

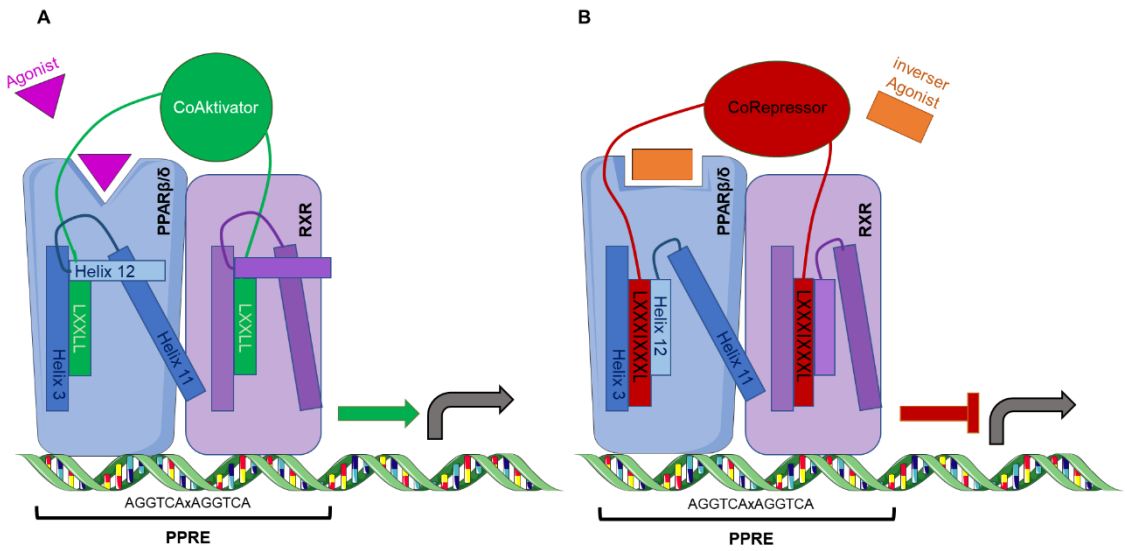


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Komplexformierung zwischen dem Kernrezeptor PPAR, dessen CoAktivatoren beziehungsweise CoRepressoren und dem RXR zur Transkriptionsregulation der Zielgene. **A:** Aktivierung der Transkription durch Anlagerung eines PPAR-Agonisten; **B:** Repression der PPAR-regulierten Zielgene durch Bindung eines inversen Agonisten unter CoRepressor-Rekrutierung. PPAR: Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor, PPRE: PPAR *response element*, RXR: Retinoid-X-Rezeptor. Adaptiert und modifiziert nach Novac und Heinzel [17] und mit Hilfe von Servier *Medical Art*: https://smart.servier.com/ dargestellt.

Die Aktivierung oder Inhibierung von PPAR geschieht über die Konformationsänderung der AF-2 durch die Wechselwirkung von PPAR zu Liganden. Eine weitere These ist, dass ein Gleichgewicht von zahlreichen unterschiedlichen Konformationen der Helix 12 vorliegt und somit die Liganden das Gleichgewicht lediglich verschieben aber nicht komplett aufheben [17]. Neben dem kanonischen Mechanismus der PPAR-regulierten Genexpression ist ebenfalls eine inverse Genexpressionsregulation durch PPAR bekannt, bei der die Transkription durch PPAR-Agonisten reprimiert wird [50,68]. Hierbei erfolgt die Repression dieser Typ III-Gene nicht durch direkte Bindung des PPARs an die DNA, sondern möglicherweise interagiert PPAR oder das Heterodimer mit einem weiteren Transkriptionsfaktor. Ein Hinweis auf die inverse Regulation durch PPAR ist die beobachtete Repression NFκB-regulierter Gene durch PPAR-Agonisten in Makrophagen [50].

Zusammenfassend ist die vorliegende Transkriptionskontrolle der von PPAR adressierten Zielgene vom Zelltyp, vom basalen Expressionslevel der PPARs und der Verfügbarkeit der CoAktivatoren und CoRepressoren abhängig [50,56]. Aufgrund dieser Gen- und Liganden-spezifischen, komplexen Regulationsmechanismen lassen sich die vielfältigen

Funktionen von PPAR in biologischen Prozessen begründen. Die vollständige Aufklärung der Wirkweise des PPAR im Organismus bedarf weiterer Untersuchungen, da unter anderem die beteiligten CoAktivatoren und CoRepressoren unbekannt sind. Anhand einer anschließenden Strukturbestimmung des Kernrezeptors in Komplex mit einem Liganden und den Cofaktoren könnten weitere Einsichten in den Wirkmechanismus von PPAR und der Interaktionen der Liganden erhalten werden.

1.5 Struktur-basierte Bindungsstudien zwischen PPAR und Ligand

Für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe muss die Funktionsweise des Targets vollständig bekannt sein, damit die Modulatoren hinsichtlich ihrer Potenz, der Selektivität und pharmakochemischen Eigenschaften optimiert werden können. Dazu eignet sich ein Struktur-basiertes Wirkstoffdesign, bei dem zunächst der Bindungsmodus der Liganden zum Protein durch Strukturaufklärung bestimmt werden muss. Anhand dieser Visualisierung der Ausrichtung und Wechselwirkungen der Liganden zur Bindetasche werden die essentiellen Interaktionen sowie der chemische Raum für die strukturelle Modifizierung erkennbar. Diese Einsicht in den Bindungsmodus ermöglicht eine zielgerichtete Optimierung der Strukturklasse.

Im Fall der PPAR-regulierten Genexpression sind viele Komponenten an der Transkriptionskontrolle beteiligt. Die Anlagerung eines Liganden bewirkt die Rekrutierung von CoAktivatoren (bei Agonisten) beziehungsweise CoRepressoren (bei inversen Agonisten) an das Heterodimer aus PPAR und RXR (Retinoid-X-Rezeptor). Dieses Zusammenspiel aus Cofaktor, Ligand und Rezeptor ist für die unterschiedliche Wirkweise der Expressionsregulation über Aktivierung oder Repression verantwortlich. Dabei sind Subtyp-selektive Liganden mit unterschiedlicher Affinität besonders interessant, um Unterschiede im Bindungsmodus zwischen den Subtypen beobachten zu können. Für den Struktur-basierten Ansatz der Wirkstoffentwicklung ist die Bestimmung der Proteinstruktur beziehungsweise der Komplex-Struktur aus PPAR und Cofaktor notwendig. Bislang liegt unter anderem die Röntgenkristallstruktur von PPARβ/δ mit dem Agonisten **GW0742** vor (1,95 Å) [14], der eine 300 - 1.000fache Subtyp-Selektivität aufweist. Die Untersuchung dieser Struktur zeigt ein gebundenes **GW0742**, das in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) vorliegt und mit den Armen I und II der PPAR-LBD interagiert. Der hydrophobe Molekülteil des Agonisten wechselwirkt mit dem polaren,

konservierten Arm I, wohingegen eine Interaktion des hydrophoben Parts mit dem Subtyp-divergenten Arm II beobachtet wird. Verglichen mit den publizierten PPARα- beziehungsweise PPARγ-Strukturen in Komplex mit deren selektiven Agonisten ist die Interaktion der hydrophilen Kopfgruppe bei allen drei Subtypen ähnlich (Abbildung 6). Daher wird vermutet, dass wegen dieser polaren Wechselwirkungen des Agonisten zum Protein die Helix 12 der AF-2 stabilisiert wird und somit der CoAktivator rekrutiert werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt der hydrophobe Teil von **GW0742** eine andere Ausrichtung als die Agonisten von PPARα (**GW735**) und PPARγ (Rosiglitazon), indem der hydrophobe Schwanzteil von **GW0742** mit der Anfangssequenz des Arm II und nicht wie bei **GW735** oder Rosiglitazon mit dem Arm III (zwischen Helix 3 und 2) interagiert. Eine weitere Besonderheit bei PPARβ/δ ist der Mittelteil des Liganden. Das Verbindungsstück zwischen der hydrophilen Kopfgruppe und dem hydrophoben Endstück des β/δ-Agonisten **GW0742** ist in Richtung Helix 3 verschoben, und weicht an dieser Stelle stark zur Lage der PPARα- (**GW735**) und PPARγ-Agonisten (Rosiglitazon) ab. Diese Verlagerung des hydrophoben Molekülteils zur Helix 3 stimmt mit der Struktur des Pan-PPAR aktiven Liganden Indeglitazar überein [74]. Grund für diese PPARβ/δ-spezifische Ausrichtung der Liganden könnten die Aminosäuren Val312 und Ile328 sein (Abbildung 6 B), da die beiden anderen Subtypen an dieser Position sterisch anspruchsvollere Reste aufweisen und daher die α- und γ-Agonisten nicht mit dem Arm II der LBD interagieren können. Daraus wird geschlossen, dass die Aminosäuren Val312 und Ile328 bei PPARβ/δ für die Subtyp-Selektivität eines Liganden verantwortlich sein könnten [14]. Außerdem ist die Bindetasche zwischen Arm I und Arm II bei PPARβ/δ wesentlich schmaler als bei PPARα und PPARγ, weswegen die Anforderungen der interagierenden β/δ-Liganden sich zu den Liganden der anderen Subtypen unterscheiden und diese Beschaffenheit ebenfalls die Selektivität begründet.

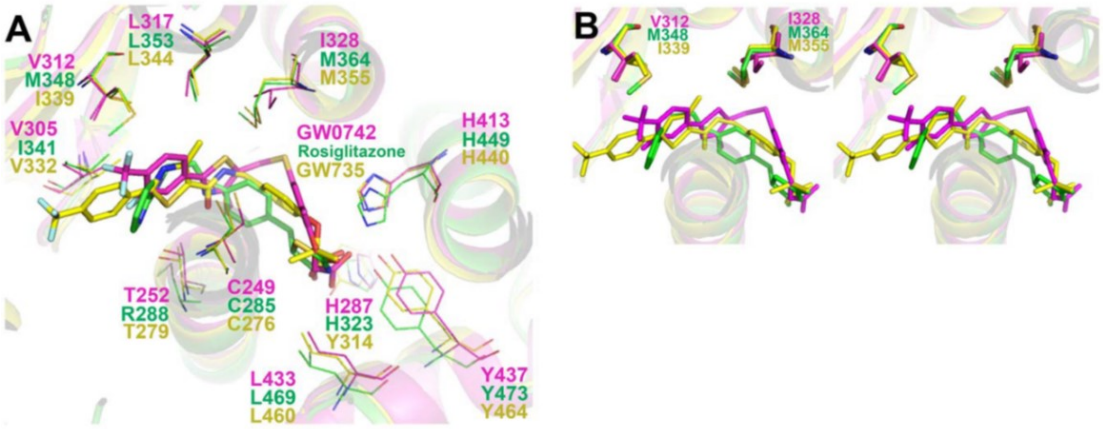


Abbildung 6: Vergleich der drei Proteinstrukturen von PPARα:**GW735** (gelb), PPARβ/δ:**GW0742** (pink) und PPARγ:Rosiglitazon (grün), entnommen aus *Batista et al.* [aus 14].

Die Kristallstrukturen der drei Subtypen mit dem Pan-PPAR-Agonisten Indeglitazar weisen eine hohe Homologie untereinander auf (Abbildung 7) [74]. Daraus wird erkennbar, dass der Mechanismus dieser Kernrezeptoren prinzipiell gleich verläuft. Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Subtypen resultieren in Abweichungen in der dreidimensionalen Struktur (Abbildung 6), wodurch spezifische Wirkweisen und Interaktionen ausgebildet werden. Röntgenkristallstrukturen der Kernrezeptoren PPAR in Komplex mit inversen Agonisten sind bislang nur von PPARα (pdb: 1KKQ) [75] und PPARγ (pdb: 6C5T) [76] nicht jedoch von PPARβ/δ publiziert.

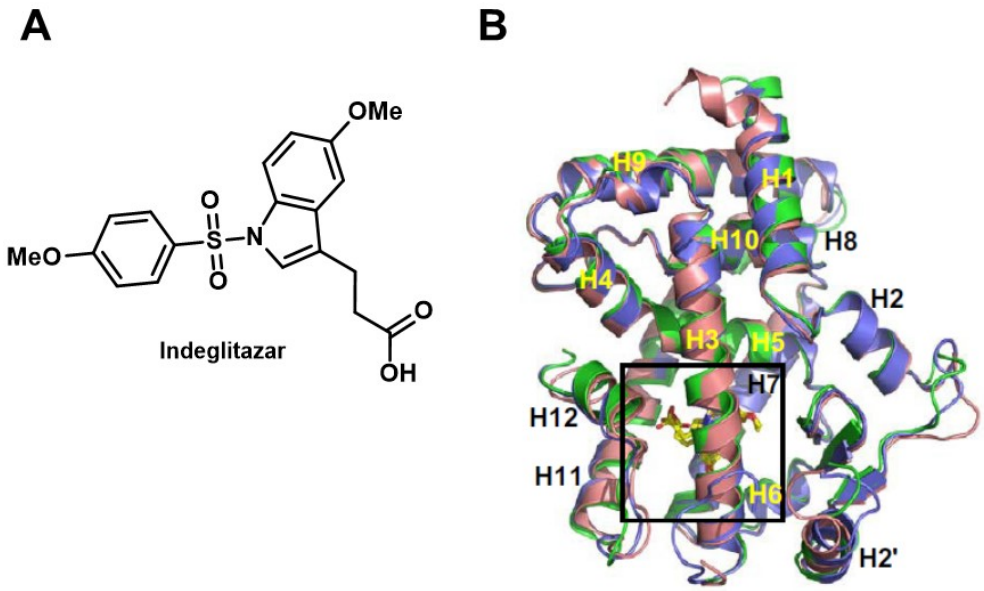


Abbildung 7: Übereinander gelegte PPAR-Strukturen jeweils mit Indeglitazar. Entnommen aus *Artis et al.* [aus 74] Rot: PPARα, blau: PPARβ/δ:, grün: PPARγ.

Wie bereits ausgeführt, verursacht die Interaktion eines inversen Agonisten eine CoRepressor-Rekrutierung während gleichzeitig der eventuell bereits gebundene CoAktivator dissoziiert. Diese Dissoziation des CoAktivators wird durch die Konformationsänderung der Helix 12 der AF-2 hervorgerufen, sodass das helikale LXXLL-Erkennungsmotiv des CoAktivators in der veränderten Proteinkonformation nicht mehr stabilisiert werden kann. Folglich kollidiert nicht die umgelagerte Helix 12 in die Bindetasche des CoAktivators, sondern die *charge clamp* zur Stabilisierung der CoAktivator-Bindung [73] wird wegen der Konformationsänderung der Helix 12 aufgelöst. Das Erkennungsmotiv LXXXIXXXL der CoRepressoren ist nach der Änderung der Proteinkonformation besser stabilisiert als das kürzere Leucin-reichere CoAktivator-Motiv (Abbildung 8). Unter Rekrutierung des CoRepressors wird schließlich die Transkription inhibiert. In der Kristallstruktur von PPARα mit dem Antagonisten **GW6471** wird diese Konformationsänderung deutlich [75]. Durch den Antagonisten wird das CoRepressor-Motiv stabilisiert, das anlehnend an den CoRepressor SMRT als kurzes Peptid zugegeben wurde.

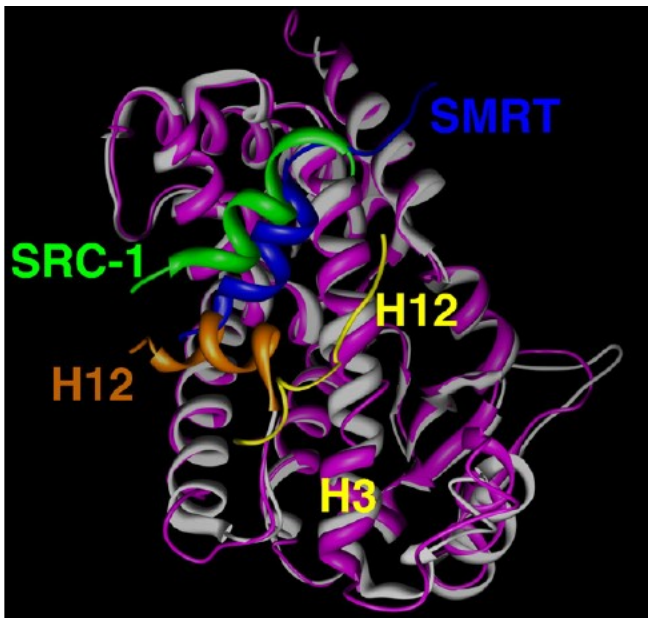


Abbildung 8: Überlagerung der Proteinstrukturen von PPARα zum Vergleich der Helix 12 Konformation bei Interaktion mit einem Agonisten (grau) (pdb: 1K74) beziehungsweise mit einem Antagonisten (magenta) (pdb: 1KKQ). Entnommen aus *Zoete et al.* [12,75,77]. Agonist: grau: PPAR-LBD, orange: Helix 12, grün: CoAktivator SRC-1; Antagonist: magenta: PPAR-LBD, gelb: Helix 12, blau: CoRepressor SMRT.

Für die Optimierung einer Strukturklasse sowie zur Vorhersage der Bindungsaffinität ist die Strukturbestimmung der PPARβ/δ-LBD mit inversem Agonisten von großer Bedeutung. Die bereits bekannten Strukturen der beiden anderen Subtypen dienen als Anhaltspunkt, können aber nicht auf PPARβ/δ übertragen werden, da die AF-2 nicht hochkonserviert ist und Änderungen in der Struktur Auswirkungen auf die Selektivität und die Komplexbildung von PPAR mit dessen Cofaktoren haben könnte. Anhand des Bindungsmodus und der Funktionsweise des PPAR:Ligand-Komplexes kann der Mechanismus dieses Kernrezeptors und dessen Rolle in den vielfältigen Aufgaben weiter aufgeklärt werden.

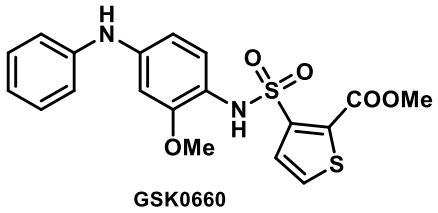
1.6 Target-Identifizierung transkriptionsregulierender Modulatoren

1.6.1 Studien der Transkriptionsmodulatoren PPARβ/δ-induzierter Gene

Der ubiquitär exprimierte Kernrezeptor PPARβ/δ spielt eine entscheidende Rolle in vielen biologischen Prozessen. Abhängig vom vorliegenden Zelltyp, dem basalen Expressionslevel des Rezeptors sowie der PPAR-adressierenden Cofaktoren und dem Regulationsmechanismus werden verschiedene Aufgaben von PPARβ/δ übernommen. Folglich stellt die Transkriptionsregulation durch den Kernrezeptor einen sehr wichtigen Mechanismus zur langfristigen Kontrolle im Organismus dar.

Hauptsächlich bewirkt PPARβ/δ eine Aktivierung oder Inhibierung metabolischer Prozesse, wie dem Metabolismus von Fettsäuren und der Gluconeogenese, und abweichend zu den Funktionen der Subtypen PPARα und PPARγ auch in der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Die Transkriptionsregulation durch PPARβ/δ ist sehr vielseitig wie komplex und erfolgt zum einen über eine kanonische Regulation der PPAR-Zielgene und zum anderen über inverse Regulation, eine nicht durch direkte DNA-Bindung regulierte Genexpression [50]. Bisherige Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen einer Überexpression von PPARβ/δ zu humanen Erkrankungen (Kapitel 1.3) durch metabolische Dysfunktion. Eine durch Liganden vermittelte Beeinflussung der Expression PPARβ/δ-regulierter Zielgene stellt daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz dar. Dazu müssen Subtyp-selektive Agonisten (Aktivierung) und inverse Agonisten (Repression) identifiziert werden. Im initialen primären *in vitro* Hochdurchsatz-Screen wurde der Antagonist **GSK0660** identifiziert (Abbildung 9), der in orthogonalen Assays bestätigt und als selektiver

inverser β/δ-Agonist klassifiziert werden konnte [78]. Allerdings scheiterte **GSK0660** wegen dessen schlechter Bioverfügbarkeit [79].



GSK0660

Abbildung 9: Struktur des Hits **GSK0660** aus dem primären *in vitro* Hochdurchsatz-Screen zur Identifizierung neuer PPARβ/δ-Liganden. Der Hit konnte in sekundärem Assay bestätigt und als selektiver β/δ-Antagonist klassifiziert werden [78].

Zur Optimierung der pharmakochemischen Eigenschaften sowie der Potenz wurde daraufhin die Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) des Antagonisten zu PPARβ/δ in der Gruppe bestimmt. In diesem Liganden-basierten Wirkstoffdesign konnten zwei Strukturklassen bezüglich ihrer Potenz verbessert werden, zum einen die von **GSK0660** abgeleitete Thiophen-Klasse sowie zum anderen die auf den Hit **NSC 636948** des zweiten Screens zurückzuführende Stilben-Klasse [79]. Anhand der SAR-Studie wurden die potentesten Vertreter der inversen PPARβ/δ-Agonisten **PT-S264**, **ST247** und **DG172** entwickelt (Abbildung 10), davon wies **ST247** allerdings eine schlechte Bioverfügbarkeit in Mäusen auf [80,81]. Diese hochaktiven, selektiven inversen Agonisten können zu Bindungsstudien und weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der Subtyp-Selektivität genutzt werden, damit zum einen bessere Vorhersagen zum Bindungscharakter der Liganden getroffen werden können und zum anderen der Bindungsmodus vollständig aufgeklärt werden kann. Bislang sind noch nicht alle CoAktivatoren und CoRepressoren bekannt, durch deren Rekrutierung die PPAR-regulierte Genepression direkt beeinflusst wird. Ebenso wenig sind alle beteiligten Komponenten an der durch PPAR-vermittelten inversen Regulation [50] der Genexpression identifiziert.

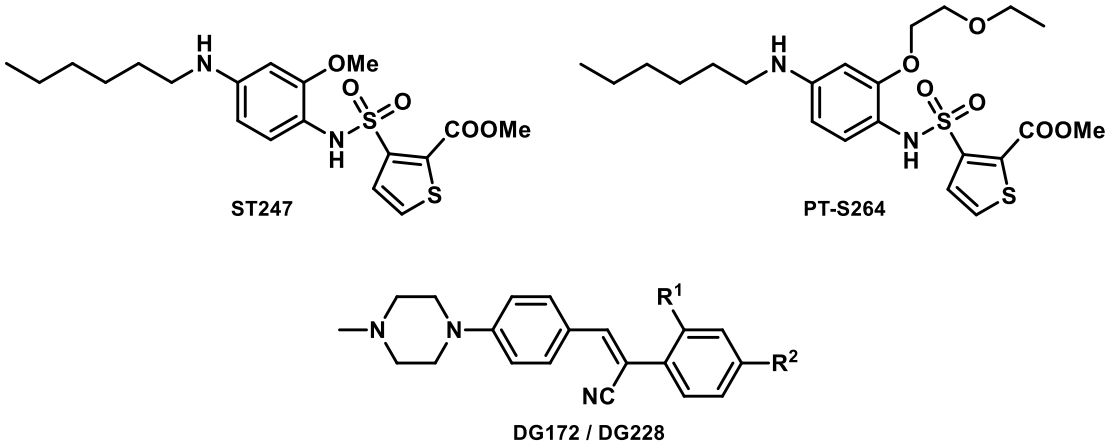


Abbildung 10: Strukturen von **ST247**, **PT-S264**, **DG172** (R^1: Br) und **DG228** (R^2: Cl).

Untersuchungen der Stilben-Strukturklasse zeigten neben der Repression PPAR-assoziierter Zielgene einen weiteren substanzspezifischen Effekt von **DG172**. Bei der Behandlung muriner Knochenmarkzellen wurde in Anwesenheit des inversen PPARβ/δ-Agonisten **DG172** ein Effekt auf die Myelopoese beobachtet [81]. Aus den myeloiden murinen Knochenmarkzellen entsteht in Anwesenheit des Wachstumsfaktors GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) eine gemischte Zellpopulation aus Makrophagen, Neutrophilen und Dendriten. In Gegenwart von **DG172** wird nun die Differenzierung dieser mit GM-CSF behandelten murinen Knochenmarkzellen zugunsten der dendritischen Zellen und zulasten der neutrophilen Granulozyten verschoben. Diese Verschiebung der Differenzierung zu Dendriten wird sowohl in Knochenmarkzellen aus Wildtyp-Mäusen (Abbildung 11 A) als auch in PPAR-deletierten *knock-out* Mäusen (Abbildung 11 B) beobachtet und stellt folglich eine zusätzliche, PPAR-unabhängige Wirkung dieser Substanz dar. Ein weiterer Hinweis darauf, dass diese Beeinflussung der Differenzierung der Zellen durch **DG172** nicht auf dessen PPARβ/δ-Bindung beruht, zeigt die Untersuchung der *para*-substituierten Substanz **DG228**. Durch den Halogensubstituent in *para*-Position (zuvor *ortho*) wird die PPARβ/δ-Aktivität aufgehoben, aber der Differenzierungseffekt bleibt erhalten.

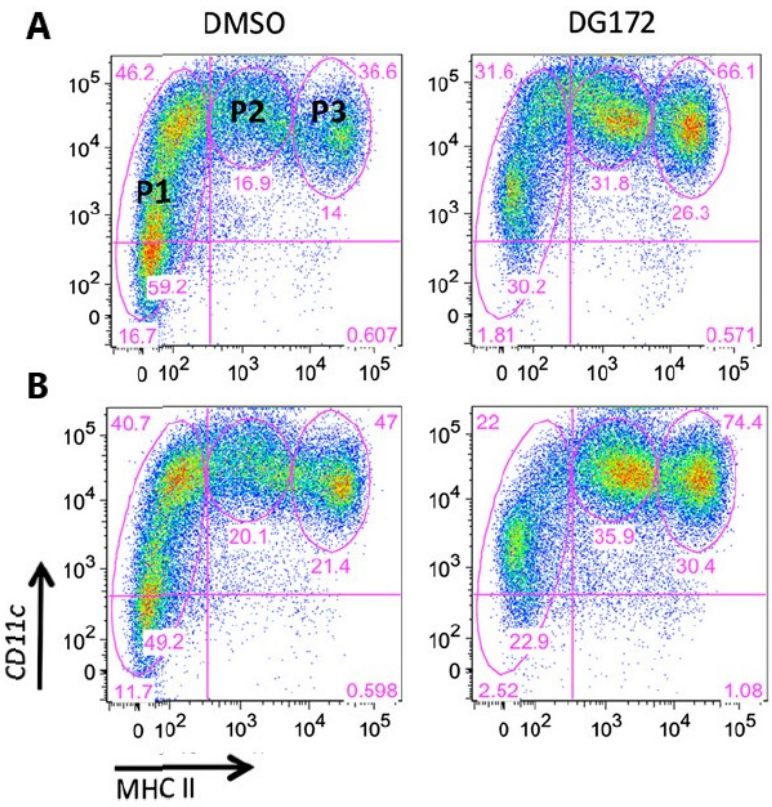


Abbildung 11: Differenzierung muriner Knochenmarkzellen, beschrieben von *Lieber et al.*, nach Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in Anwesenheit von **DG172** (500 nM) im Vergleich zur unbehandelten Probe [81]. **A:** mit Knochenmarkzellen aus Wildtyp-Maus, **B:** Zellen aus *Ppard null* Maus. Bestimmung erfolgte über Oberflächenfärbung mit anti-CD11c und anti-MHC II mit anschließender FACS-Analyse.

Somit erfolgt die Verschiebung der Differenzierung myeloider muriner Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen PPARβ/δ-unabhängig aufgrund einer weiteren Substanz-spezifischen Wirkung der Stilbene **DG172** und **DG228**. Dementsprechend unterliegt dieser Effekt der Stilben-Strukturklasse auf die Differenzierung einem anderen Mechanismus und wird über ein anderes Protein oder einen Proteinkomplex vermittelt. Damit die Funktionsweise und der Mechanismus der Verbindung auf die Differenzierung genauer untersucht werden können, müssen zunächst das Target und mögliche involvierte Cofaktoren identifiziert werden. Diese Erkenntnisse wären ein Zugewinn in dem Verständnis der Zelldifferenzierung. Falls diese beobachtete Beeinflussung der Differenzierung muriner Knochenmarkzellen in humanen Zellen dem gleichen Prinzip folgt, sollten die Modulatoren bezüglich ihres Potentials als neue Wirkstoff-Kandidaten zur Behandlung bei Immunerkrankungen näher untersucht werden.

1.6.2 Mechanismusaufklärung der Transkriptionsregulierung im Hedgehog-Signalweg

Die Morphogenese im embryonalen Stadium erfolgt über den Hedgehog Signalweg, der, abhängig vom Expressionslevel, die Zellproliferation und Differenzierung bestimmt. Damit ist der Hedgehog Signalweg ein essentieller Regulationsmechanismus in der Embryogenese. Obwohl die Hedgehog Signalkaskade sehr komplex ist, so ist der Mechanismus trotzdem in unterschiedlichen Organismen hochkonserviert [82].

Der Hedgehog Signalweg wird durch die Anlagerung der endogenen Liganden (Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog, Indian Hedgehog) an das Transmembranenprotein Ptch1 (*patched 1 protein*) induziert. In Abwesenheit der Liganden liegt Ptch1 in den primären Zilien vor und verhindert dadurch das Eintreten des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Smo (*smoothened*) in das Zilium der Zelle [82], wodurch die Signalkaskade inhibiert wird. Dabei wird Smo vermutlich durch den endogenen Liganden Cholesterol aktiviert, dessen Konzentration möglicherweise von Ptch1 reguliert wird [83]. Ein Hinweis auf eine Smo-Hemmung durch Ptch1 ist der beobachtete Effekt, dass eine Inhibierung von Smo einer Ptch1-Überexpression ähnelt [82]. Nach Anlagerung des Hedgehog (HH) an Ptch1 wird die Inhibierung von Smo aufgehoben, sodass Smo ins Zilium der Zelle gelangt und dort die Signaltransduktion weiterleitet. Durch Anlagerung des CoRepressors SUFU (*suppressor of fused binding*) an die Transkriptionsfaktoren GLI im inaktiven Zustand wird die Genexpression reprimiert [84]. Dieser Komplex wird durch das im Zilium lokalisierte Smo aufgehoben. Der Transkriptionsfaktor GLI1 agiert dabei als Aktivator der Genexpression Hedgehog-induzierter Zielgene, wohingegen GLI2 und GLI3 die Transkription Hedgehog-regulierter Gene reprimieren aber auch initiieren.

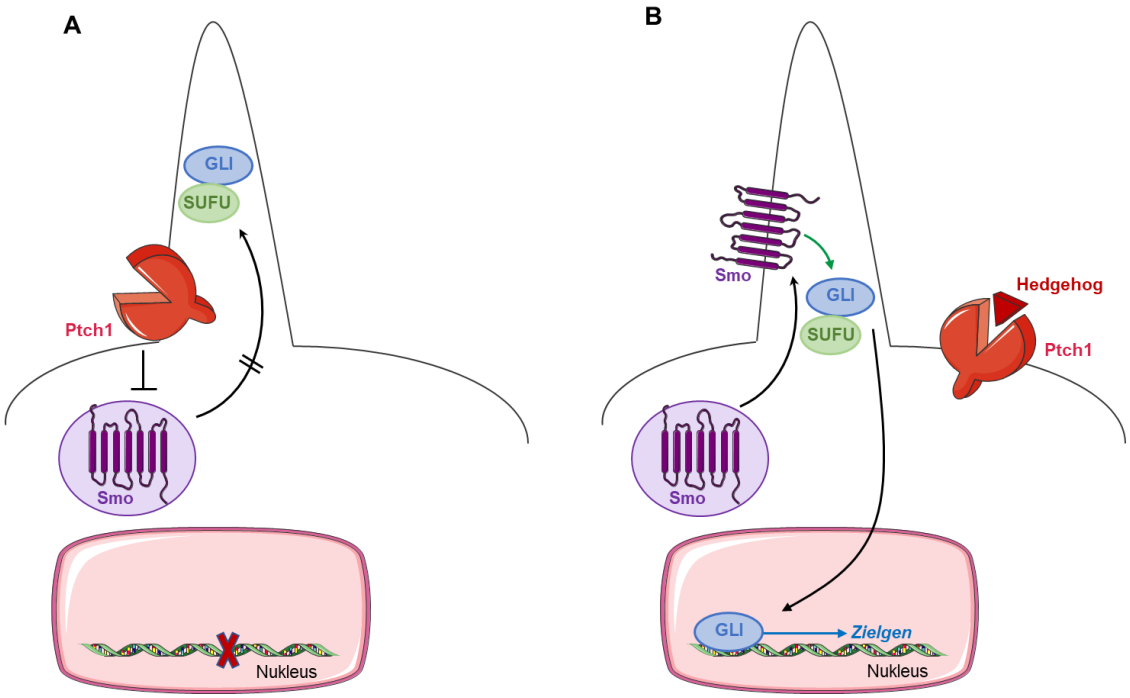


Abbildung 12: Allgemeine Darstellung der Hedgehog-Signaltransduktion. **A:** Inaktiver Zustand in Abwesenheit eines endogenen Hedgehog Liganden; **B:** Aktiver Hedgehog-Signalweg nach Anlagerung des Hedgehog an Ptch1. Ptch1: *patched protein 1*, Smo: *Smoothened*, GLI: Familie von Transkriptionsfaktoren, SUFU: *suppressor of fused binding*. Adaptiert und modifiziert nach *Rubin et al.* und *Scales et al.* [82,84], dargestellt mit Hilfe von Servier *Medical Art*: https://smart.servier.com/.

Die Transkriptionsregulation über die Hedgehog-Signaltransduktion findet überwiegend im embryonalen Stadium statt, im adulten Organismus wird diesem Signalweg weniger Relevanz zuteil [85]. Die essentiellen Funktionen des Hedgehog-Signalweges sind die Proliferation und Differenzierung der Zellen zur Entwicklung des Embryos. Daher resultieren Beeinträchtigungen dieses Systems in Überexpression der Hedgehog-regulierten Zielgene wie beim Gorlin-Syndrom, bei dem eine Mutation im *PTCH1* zu einer dauerhaften Aktivierung führt [85]. Patienten mit dem Gorlin-Syndrom haben daher eine Prädisposition für maligne Krebserkrankungen, überwiegend für Hirntumore oder Hautkrebs [82]. Unter anderem wird die Entstehung maligner Hirntumore wie beispielsweise das Medulloblastom mit einer stark erhöhten Hedgehog-Aktivität durch Mutationen mit resultierender Inaktivität des Ptch1 in Verbindung gebracht. Bei einem Drittel der Patienten mit Medulloblastom wurden Mutationen des *PTCH1* entdeckt [82]. Im Gegensatz zur Krebsentwicklung durch Überexpression oder durch zu hohe Hedgehog-Aktivität wird das Neuroblastom bei Kindern mit einer defekten oder verminderten Hedgehog-induzierten Transkriptionsregulation während der

Embryogenese in Verbindung gebracht. Eine Aktivierung des Hedgehog-Signalweges im Neuroblastom führt zur Zelldifferenzierung der arretierten Neuroblasten zu Neuronen, zur Wachstumshemmung der Krebszellen und letztendlich zur Apoptose [86,87] und könnte daher als neuer Angriffspunkt in der Behandlung genutzt werden. Durch Liganden-induzierte Aktivierung oder Repression der Hedgehog-abhängigen Genexpression werden neue synthetische Modulatoren untersucht, die für eine pharmakologische Nutzung als neue potentielle Wirkstoff-Kandidaten gegen maligne Tumore geeignet sind. Ein weiteres Problem ist die beobachtete Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei den Krebsarten, bei denen eine dysfunktionale Hedgehog-Signaltransduktion auftritt.

Die derzeitigen zugelassenen Wirkstoffe (Vismodegib, Sonidegib) beziehungsweise zu prüfenden Kandidaten (Antifungizid: Itraconazol), inhibieren Smo und beeinflussen dadurch den Hedgehog Signalweg [85]. Bisher sind noch nicht alle an der Hedgehog Signaltransduktion beteiligten Komponenten identifiziert sowie die Aufklärung des gesamten Regulationsmechanismus ist noch unbekannt. Mittels neuer potenter Transkriptionsmodulatoren könnte zum einen der Mechanismus untersucht werden, aber zum anderen auch weitere Zytostatika entwickelt werden.

2. Zielsetzung

Eingriffe in die Transkriptionsregulation haben einen langfristigen Effekt und werden daher als potentielle Targets in der Wirkstoffforschung erforscht. Dafür ist die Entwicklung selektiver, potenter Modulatoren von großer Bedeutung, die im Rahmen dieser Arbeit strukturell sowie funktionell untersucht werden sollten. Hierfür sollten zwei Targets unterschiedlicher Genexpressionsregulation analysiert werden, um den Bindungsmodus sowie die Affinität der Liganden bestimmen und außerdem weitere beteiligte Cofaktoren identifizieren zu können.

Ein Target ist der Kernrezeptor PPARβ/δ, der wichtige Funktionen in metabolischen Prozessen einnimmt. Anhand der Proteinkristallographie sollte der Bindungsmodus der Ligandenbindungsdomäne (LBD) von PPARβ/δ mit den in der Gruppe bereits entwickelten inversen Agonisten **ST247**, **PT-S264** und **DG172** (Abbildung 10) untersucht werden, um die Wechselwirkung und Lage der Verbindungen zum Rezeptor zu identifizieren sowie Vorhersagen zum chemischen Raum und Modifizierbarkeit der Substanzen treffen zu können. Kristallstrukturen von PPARβ/δ in Komplex mit Agonisten sind bekannt [14], diese Bedingungen lassen sich jedoch nicht vollständig auf die Kristallisation mit einem inversen Agonisten übertragen, weswegen ein Kristallisationsscreen am MarXtal-Kristallisationslabor der Philipps-Universität Marburg durchgeführt werden sollte. Aufgrund der bereits erkannten Problematik bei der Proteinaufreinigung und Proteinlöslichkeit der His-getaggten PPARβ/δ-LBD sollte der Herstellungsprozess des Proteins optimiert werden.

Damit der Mechanismus der essentiellen Transkriptionsregulationen gänzlich aufgeklärt werden kann, ist eine Identifizierung aller beteiligter Proteine notwendig. Die Entwicklung von potenten und selektiven Liganden dient zur Bestimmung der strukturellen Voraussetzung für die biologische Aktivität. Anhand der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) der Transkriptionsmodulatoren bei zwei unterschiedlichen Transkriptionsregulationen (durch PPARβ/δ; über den Hedgehog-Signalweg) sollte die Potenz der Liganden optimiert werden. In vorherigen SAR-Studien wurde ein zusätzlicher, PPARβ/δ-unabhängiger Effekt beobachtet [81], der näher untersucht und das bisher unbekannte adressierte Target identifiziert werden sollte. Neben dem Liganden-induzierten Transkriptionsfaktor PPARβ/δ sollte die SAR-Studie eines Liganden des Hedgehog Signalweges begleitet werden, da diese Expressions-

kontrolle während der embryonalen Entwicklung essentiell ist und bislang nur wenige Modulatoren hierfür bekannt sind. Die Erkenntnisse beider SAR-Studien sollten anschließend zur Etablierung von *pull-down* Experimenten für die Target-Identifizierung dieser beiden Transkriptionstargets dienen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturelle Studien zum Bindungsmodus inverser Agonisten zu PPARβ/δ

3.1.1 Optimierung der Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD

Die Expression und Aufreinigung der PPARβ/δ-LBD mit einem His_6-Tag wurden bereits von *Xu et al.* beschrieben [72], jedoch waren die Ausbeuten mit ungefähr 6,6 mg L^{-1} verwendetes Medium [72] für einen Screen nach geeigneten Kristallisationsbedingungen nicht ausreichend. *Sinz et al.* konnten unter Verwendung eines Konstrukts der PPARβ/δ-LBD mit einem Strep-Tag nur 13,0 µg Protein pro g Zellen isolieren [88]. Die Proteinisolierung der HisPPARβ/δ-LBD wurde in der Gruppe von Dr. Frithjof Scheer etabliert und ein erster Kristallisationsscreen wurde daraufhin durchgeführt. Zur Proteinisolierung und Aufreinigung wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung lysiert. Anschließend wurde die HisPPARβ/δ-LBD über Affinitätschromatographie mit Hilfe des angefügten His_6-Tags über eine Ni-Sepharose Säule isoliert. Für eine vollständige Reinheit wurde das Protein durch die Größenausschlusschromatographie über eine Superdex 75 Säule aufgereinigt. Nach den zwei Chromatographieschritten betrug die Proteinausbeute der HisPPARβ/δ-LBD 2 – 4 mg L^{-1} Bakterienkultur [89]. Neben dieser geringen Ausbeute stellte die Löslichkeit des Proteins ein zusätzliches Problem während der Isolierung dar, sodass eine Aufkonzentrierung auf die empfohlene Konzentration von 10 mg mL^{-1} für einen Kristallisationsscreen nicht möglich war und zu Proteinaggregation des PPARs [90] führte. Aufgrund der beobachteten raschen Aggregation der PPARβ/δ-LBD bei den ersten Kristallisationsversuchen in der Gruppe konnte kein Ergebnis erzielt werden [89]. Daher wurde zunächst anstatt des zuvor verwendeten His_6-Tags eine GST-getaggte Variante der PPARβ/δ-LBD exprimiert, welche zwischen dem GST-Tag und dem *protein of interest* die Spaltungssequenz LFQ/GP der *PreScission* Protease zur Abspaltung des Tags aufwies. Die Einführung eines GST-Tags führt meist zur Erhöhung der Löslichkeit [90,91] des Fusionsproteins während der Aufreinigung und sollte vor der Kristallisation abgespalten werden, da dieser sterisch anspruchsvolle Tag mit circa 25,5 kDa möglicherweise Einfluss auf die Wechselwirkung des Komplexes aus PPARβ/δ-LBD, inversem Agonisten und für dessen Stabilisierung essentielles CoRepressor-Peptid (Kapitel 1.5) haben könnte.

Die GST-getaggte PPARβ/δ-LBD wurde in *E.coli* BL21 gold (DE3) Zellen exprimiert (Kapitel 7.8.1) und zur Isolierung des Zielproteins wurden die Zellen nach dem

Zellaufschluss über eine GSTrap FF 5 mL Säule aufgereinigt, sodass die GST-getaggte PPARβ/δ-LBD mit einer Ausbeute von 0,5 – 3,0 mg L^{-1} eingesetzter Bakterienkultur nach der Affinitätschromatographie gewonnen werden konnte. Diese Ausbeute ist jedoch zu gering, um in größeren Mengen Protein für einen Kristallisationsscreen zu gewinnen, und konnte trotz zahlreicher Versuche zur Optimierung der Proteinherstellung, wie Änderung des Mediums, der Temperatur oder des Zellaufschlusssystems, verbessert werden. Überaschenderweise wurden in den Elutionsfraktionen zwei weitere Proteinbanden beobachtet, welche bei einer Höhe von 30 kDa und 25 kDa lagen (Abbildung 13 A, kleine Pfeile). Bei der Überprüfung der Aufreinigung im Western Blot mit den Antikörpern gegen GST (Abbildung 13 B) sowie humanes PPARβ/δ (Abbildung 13 C) wurden jeweils zwei Banden angefärbt, was zum Einen das Fusionsprotein der GST-getaggten PPARβ/δ-LBD mit 54,8 kDa (blauer breiter Pfeil) und zum Anderen die Spaltungsprodukte (kleine Pfeile) der einzelnen Komponenten, der GST-Tag (circa 25,5 kDa) und die PPARβ/δ-LBD (circa 32,6 kDa), darstellte (Abbildung 13 B und C). Folglich ist die *PreScission Site* keine geeignete Spaltungssequenz zur Abtrennung des Tags, da ungefähr an dieser Stelle der GST-Tag völlig unerwartet autoproteolytisch abgespalten wurde und eine erfolgreiche Aufreinigung über Affinitätschromatographie somit nicht möglich war.

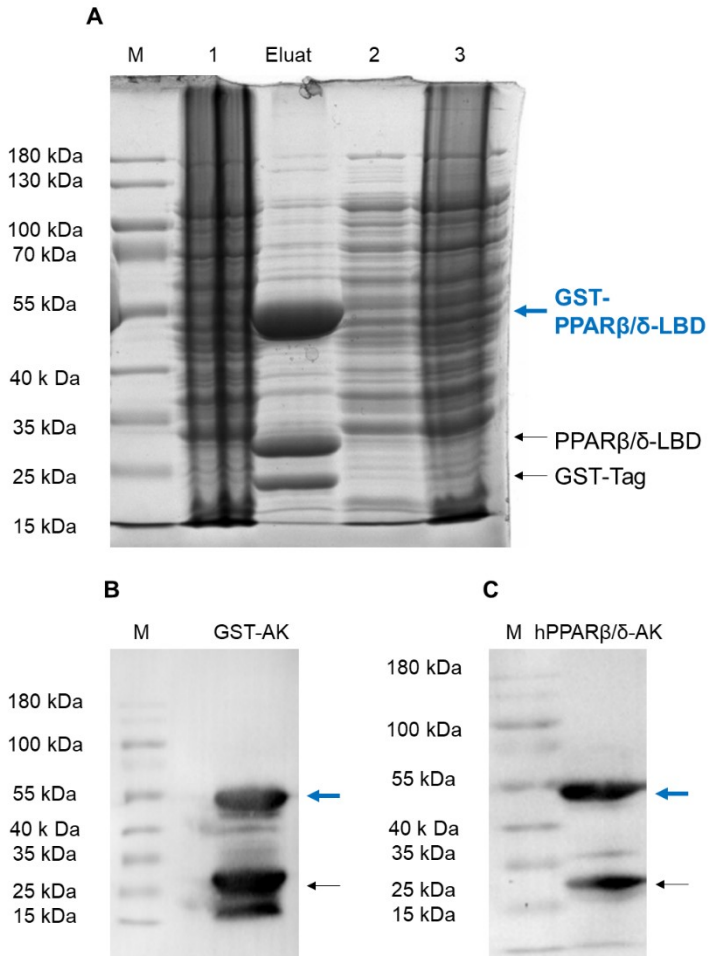


Abbildung 13: Reinheitsprüfung sowie Proteinidentifizierung der Elution der Proteinaufreinigung der GST-PPARβ/δ-LBD via Affinitätschromatographie. **A:** SDS-PAGE der Proteinaufreinigung mit Coomassie-Färbung,12%-iges Gel, 1: zweiter Durchfluss, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 2: erste Waschfraktion, 3: erster Durchfluss; **B:** Western Blot zur Prüfung der Proteinaufreinigung mit GST-Antikörper, 12%-iges Gel, GST-AK (Antikörper) vom Eluat; **C:** Western Blot derselben Aufreinigung mit hPPARβ/δ-Antikörper, 12%-iges Gel, hPPARβ/δ-AK (Antikörper) vom Eluat. M = Proteinstandard.

Aufgrund dieser autoproteolytischen Abspaltung des GST-Tags wurde diese Aufreinigungsstrategie verworfen und erneut die His_6-getaggte PPARβ/δ-LBD verwendet. Diese war bereits in der Gruppe exprimiert worden [89], jedoch traten hierbei Löslichkeitsprobleme der HisPPARβ/δ-LBD auf, sodass keine Aufkonzentrierung des Proteins erfolgen konnte. Die Identifizierung des *protein of interest* durch den Antikörper gegen humanes PPARβ/δ bestätigte die erfolgreiche Proteinherstellung und Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD (Abbildung 14 B). Nach der Affinitätschromatographie via der HisTrap FF 5mL konnte die HisPPARβ/δ-LBD mit einer Ausbeute von 21,2 mg L^{-1} Bakterienkultur (in SLB-Medium) erhalten werden, wobei das erhaltene Eluat jedoch noch sehr stark verunreinigt war (Abbildung 14 A) und eine Verbesserung des

Aufreinigungsprotokolls sowie weitere Aufreinigungsschritte über verschiedene Säulen notwendig waren. Im Vergleich zur GST-getaggten PPARβ/δ-LBD konnte die Proteinausbeute um die siebenfache Menge verbessert werden. Die Ausbeute der ersten Testexpression betrug bereits 50,8 mg Protein aus 2,4 L Bakterienkultur, doch aufgrund der starken Verunreinigung entsprach die erhaltene Ausbeute nicht der exakten Angabe der Proteinmenge der reinen HisPPARβ/δ-LBD. Da für die Proteinkristallisation sehr reines Protein essentiell ist, wurde im Folgenden die Proteinaufreinigung für die Gewinnung der HisPPARβ/δ-LBD optimiert.

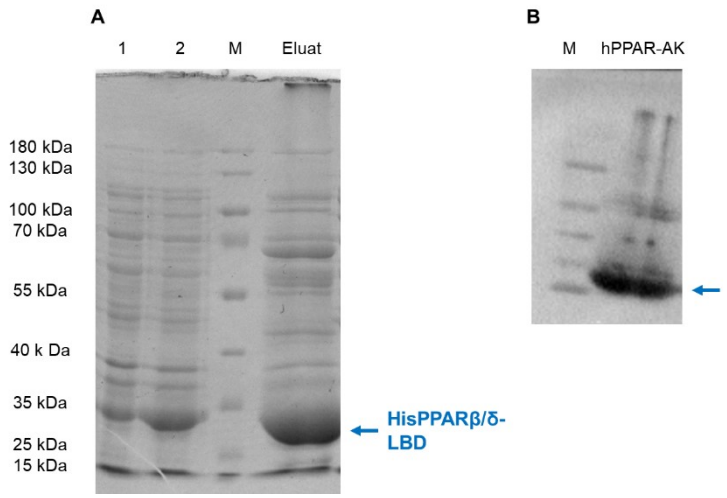


Abbildung 14: Überprüfung der Expression zur Herstellung von HisPPARβ/δ-LBD. **A:** SDS-PAGE der Aufreinigung mit Coomassie-Färbung, 12%-iges Gel, 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen; **B:** Western Blot zur Identifizierung mit hPPARβ/δ-Antikörper, 12%-iges Gel, hPPAR-AK (Antikörper) vom Eluat. M = Proteinstandard.

Zunächst wurde die Proteinherstellung in Gegenwart eines Additivs getestet, da nach *Artis et al.* bekannt war, dass für die erfolgreiche Isolierung der PPARβ/δ-LBD die Zugabe eines Agonisten essentiell ist [92], wodurch die Löslichkeit und folglich die Ausbeute während der Proteinproduktion erhöht wird. Interessant hierbei war die Beobachtung, dass dieses Additiv ausschließlich bei der Expression der PPARβ/δ-LBD notwendig war und bei der Expression der beiden anderen Isoformen keine Problematik beobachtet wurde. Durch die Zugabe dieses Additivs, eines schwachen β/δ-Agonisten (**1**), vor der Induktion [93] konnte die HisPPARβ/δ-LBD zwar nur mit einer halb so großen Menge von 10,9 mg L^{-1} Bakterienkultur im Gegensatz zur Zugabe des sehr potenten β/δ-Agonisten **L165,041** (K_i = 6 nM) [94] isoliert werden, aber dafür war die Reinheit des

protein of interest nach der Affinitätschromatographie erheblich verbessert (Abbildung 15 B). Durch Zugabe des potenten β/δ-Agonisten **L165,041** konnte die Ausbeute von 21,9 mg L^{-1} eingesetzter *E.coli*-Kultur (LB-Medium) im Vergleich zum schwachen Agonisten (**1**) zwar verdoppelt werden, allerdings war das aufgereinigte Protein nach der Affinitätschromatographie noch sehr verunreinigt (Abbildung 15 A) und die effektive Proteinmenge der HisPPARβ/δ-LBD dementsprechend nicht höher und besser als die Ausbeute der Additiv-Kultur.

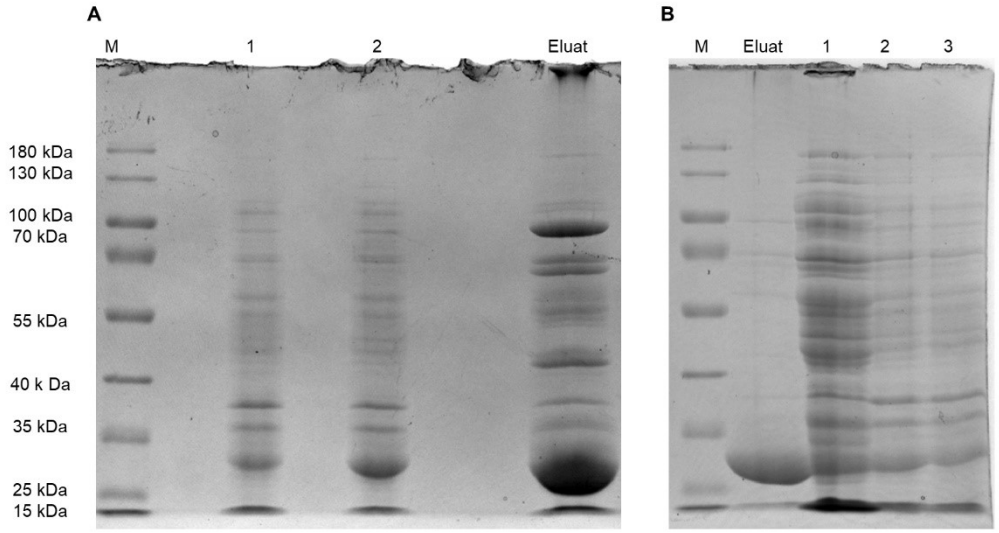


Abbildung 15: Vergleich der Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD nach Zugabe von Agonisten zur Expression über Nacht. **A:** Inkubation mit **L165,041** (1 µM), 12%-iges Gel mit Coomassie angefärbt, 1: vor Induktion, 2: nach Induktion, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen; **B:** Inkubation mit dem schwachen β/δ-Agonisten (**1**) (500 µM), 12%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 1: erste Waschfraktion, 2: nach Induktion, 3: vor Induktion. M = Proteinstandard.

Die Zugabe eines schwachen β/δ-Agonisten während der Proteinproduktion zeigte eine enorme Verbesserung der Reinheit des isolierten Proteins, jedoch war nicht bekannt, ob nach der Aufreinigung das Additiv (**1**) weiterhin mit der HisPPARβ/δ-LBD wechselwirkt und folglich eine Interaktion mit den zu untersuchenden inversen Agonisten **PT-S264**, **ST247** und **DG172** während der Kristallisation verhindert würde. Die biologische Aktivität des schwachen β/δ-Agonisten zu PPARβ/δ ist mit einem IC_{50}-Wert von über 1 mM zwar sehr gering (Appendix, Diagramm 6) und sollte daher wenig Einfluss auf die Wirkung der potenten inversen Agonisten haben. Dies sollte aber dennoch überprüft werden, daher wurde *in vitro* im FRET-Assay (Kapitel 7.3, 7.8.6) die biologische Aktivität sowie die Fähigkeit zur Co-Repressor-Rekrutierung untersucht, indem zu einer

konstanten Konzentration des Additivs (**1**) der selektive und sehr potente inverse Agonist **PT-S264** [IC_{50}(*ANGPTL4*) = 6,43 nM; IC_{50}(*PDK4*) = 9,08 nM] [95] titriert wurde. Für die Titration des **PT-S264** wurde die doppelte Konzentration von 1 mM des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) im Vergleich zur Agonistenkonzentration von 500 µM während der Proteinproduktion eingesetzt, um wirklich eine ausreichend verbleibende Aktivität der zu untersuchenden inversen Agonisten beobachten zu können. Bei der Titration der Verbindung **PT-S264** zum schwachen Agonisten (**1**) wurde eine reduzierte Aktivität der Co-Repressor-Rekrutierung mit einem EC_{50}-Wert von 350,0 nM (Diagramm 3, blau) im Gegensatz zu **PT-S264** allein (grün) mit einem EC_{50} = 17,9 nM beobachtet. Diese Daten beweisen nicht mit abschließender Sicherheit, dass der zugegebene schwache β/δ-Agonist (**1**) durch den potenten inversen Agonisten **PT-S264** verdrängt wird, jedoch ist die Interaktion des inversen Agonisten durch die, wenn auch leicht verschlechterte CoRepressor-Rekrutierung, in Anwesenheit eines großen Überschusses des Agonisten belegt. Darüber hinaus bleibt unklar, ob das Additiv auch nach den Aufreinigungsschritten überhaupt noch mit der HisPPARβ/δ-LBD interagiert oder die Verbindung während der Proteinaufreinigung herausgelöst würde. Daher wurde das Additiv während der Proteinproduktion zur Verbesserung der Löslichkeit des *protein of interests* zugegeben.

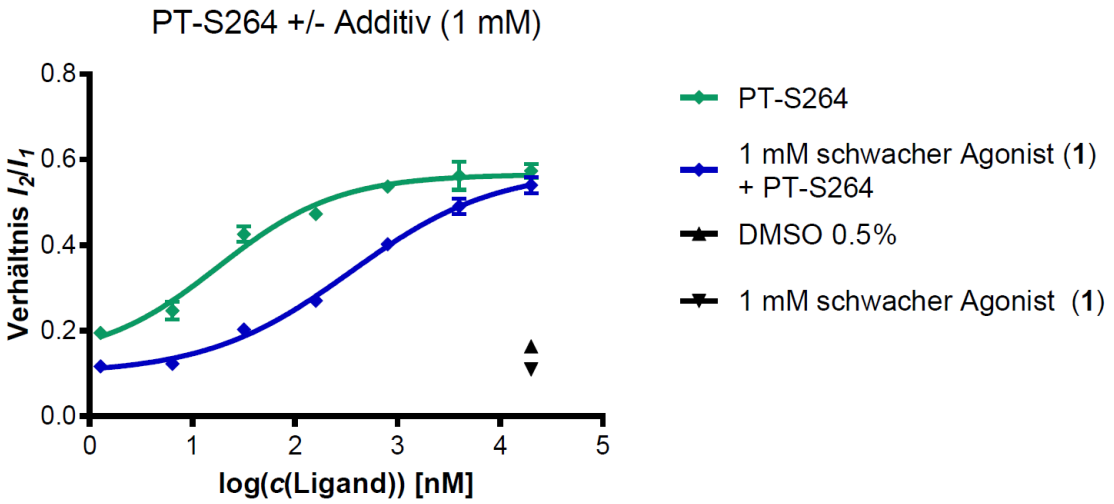


Diagramm 3: Aktivitätsbestimmung der CoRepressor-Rekrutierung des inversen Agonisten **PT-S264** *in vitro* in Anwesenheit des schwachen Agonisten (**1**) (1 mM) (blau) sowie im Vergleich ohne Agonisten (grün). Auftragung der Konzentration *c* [nM] gegen das Verhältnis der Intensitäten bei den Wellenlängen 520 nm (I_2) und 495 nm (I_1). Abgebildet sind der Mittelwert aus dem technischen Triplikat und die zugehörige Standardabweichung.

In bisherigen Veröffentlichungen erfolgte das Zellwachstum bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600\,nm} = 1$ in LB-Medium [14,15,96]. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde das Medium der Proteinproduktion von LB-Medium zu SLB-Medium gewechselt (Kapitel 7.6), welches mehr Pepton und Hefe enthält, um dadurch eine höhere Bakteriendichte (optische Dichte $OD_{600\,nm} = 3\text{-}4$) und folglich mehr Protein erzielen zu können. Problematisch könnte hierbei erneut die Proteinaggregation der PPARβ/δ-LBD sein [90], welche durch Zugabe des Additivs (**1**) verhindert werden sollte. Die Proteinherstellung war in beiden verwendeten Medien erfolgreich, nach Isolierung der HisPPARβ/δ-LBD über Affinitätschromatographie konnte eine eineinhalbfach höhere Ausbeute von 14,4 mg L^{-1} SLB-Medium im Gegensatz zur Ausbeute von 9,6 mg L^{-1} LB-Medium erzielt werden. Die erhaltene Proteinlösung der Expression in LB-Medium erscheint nach der Affinitätschromatographie im Vergleich zur Bedingung in SLB-Medium sauberer. Bei der SLB-Probe sind die Banden zwar klarer zu erkennen (Abbildung 16 B), allerdings wurden bei der LB-Probe ebenfalls diese Verunreinigungen beobachtet (Abbildung 16 A). Dies könnte an der höheren gesamten Bakterienmenge liegen, indem die optische Dichte der Bakterienkultur verdreifacht wurde. Da die Reinheit nach dem ersten Aufreinigungsschritt bei beiden Bedingungen noch nicht ausreichend war, wurde deshalb ein weiterer Chromatographie-Schritt essentiell (Kapitel 3.1.1, Seite 46).

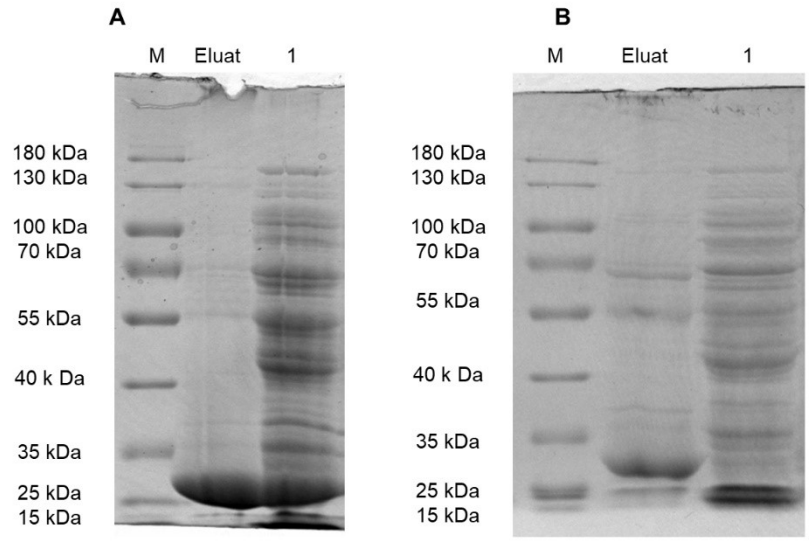


Abbildung 16: Vergleich der Proteinexpression der HisPPARβ/δ-LBD in LB-Medium zu SLB-Medium. **A:** Expression in LB-Medium bei 18 °C, 12%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 1: erste Waschfraktion; **B:** Expression in SLB-Medium bei 18 °C, hier Waschen ohne Imidazol im Waschpuffer, 12%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 1: erste Waschfraktion. M = Proteinstandard.

Zusätzlich zur Steigerung der Proteinausbeute durch den Wechsel zu SLB-Medium bei der Proteinproduktion wurde zunächst die Effizienz verschiedener Zellaufschlusssysteme untersucht und miteinander verglichen. Hierbei wurden jeweils zwei mechanische Aufschlüsse durchgeführt, die Ultraschallbehandlung kombiniert mit dem vorherigen enzymatischen Aufschluss durch Lysozym sowie die Hochdruckhomogenisierung. Das bisherige Verfahren war die Lyse durch Lysozym in Kombination mit Ultraschall, welche ebenfalls (teils mit enzymatischem Aufschluss durch Lysozym) Bestandteil der Proteinisolierung unter anderem nach *Xu et al.* war [14,15,96]. Durch den schonenderen Zellaufschluss via Hochdruckhomogenisierung sollte die Proteinstabilität während der Lyse verbessert sein.

Bei beiden Methoden wurde zuvor die Zellsuspension mit Hilfe des *Dounce Tissue Grinders* homogenisiert, um die Effektivität der Zelllyse zu verbessern, wobei durch dieses Potter-Elvehjem-Verfahren (Dounce-Verfahren) auch Zellen durch die Scherkräfte aufgeschlossen werden können. Auffällig war, dass beim Ultraschallaufschluss mit Lysozym die Ausbeuten aus zwei Aufschlüssen im Bereich zwischen 2,8 – 10,5 mg L^{-1} Medium sehr stark variierten und somit die HisPPARβ/δ-LBD nicht effizient und verlässlich aus *E.coli* isoliert werden konnte. Im Gegensatz dazu war der Zellaufschluss

mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators EmulsiFlex™ C5 wesentlich effektiver, welcher reproduzierbare Ausbeuten aus zwei Aufschlüssen im Bereich von 11,0 – 16,7 mg L^{-1} Medium erzielte, das eine Verbesserung von 150% bis 200% gegenüber dem bisherigen Verfahren darstellte. Der Reinigungserfolg war unabhängig vom Aufschlusssystem noch nicht optimal und bedurfte weiterer Aufreinigungsschritte (Abbildung 17), da die Eluate noch sehr verunreinigt waren und bei beiden Proben eine starke Verunreinigung eines circa 25 kDa großen Proteins zu beobachten war (Abbildung 17, schwarzer Pfeil).

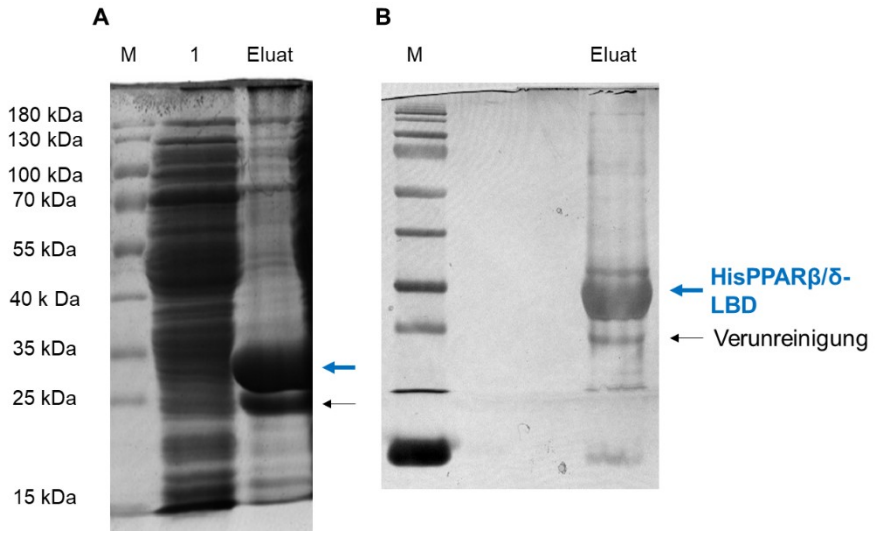


Abbildung 17: Vergleich des Reinheitsgrads und der Ausbeute der Affinitätschromatographie nach unterschiedlicher Zelllyse. **A:** Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex™C5 von Avastin, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, 1: erste Waschfraktion, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen; **B:** Zelllyse durch Ultraschallbehandlung, 15%-iges Gel mit Silberfärbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen. Schwarzer Pfeil: Verunreinigung; M = Proteinstandard.

Zusätzlich zum Aufschlusssystem wurde der Einfluss des Detergens Triton X-100 während der Lyse auf die Löslichkeit des Proteins untersucht, da PPAR bekanntlich in hohen Mengen Aggregate ausbildet [90] und somit bei der Isolierung verloren geht. Die Zugabe von 0,2% (v/v) Triton X-100 könnte eine Aggregation der HisPPARβ/δ-LBD verhindern [97], sodass mehr Protein stabil in Lösung bliebe und gewonnen werden könnte. Der Ultraschallaufschluss wurde ohne vorherige Lysozym-Behandlung durchgeführt, da eine Verbesserung der Zelllyse durch Lysozym nicht beobachtet wurde. Nach der Affinitätschromatographie wurden 8,3 ± 5,4 mg L^{-1} eingesetztem Medium (aus acht Aufschlüssen gemittelt) erhalten, wobei die starke Schwankung in der Ausbeute deutlich zeigte, dass der Ultraschallaufschluss ineffizient war und kein ausreichend

stabiles System zur Isolierung der HisPPARβ/δ-LBD ist. Ebenfalls konnte durch die Zugabe des Detergens keine Erhöhung der Ausbeute im Vergleich zum Aufschluss ohne Triton mit maximal 10,5 mg L^{-1} Medium erreicht werden. Die Ausbeute der Hochdruckhomogenisierung war zwar ebenfalls nicht konstant, diese beobachteten Schwankungen in der Ausbeute waren jedoch im Vergleich zur Ultraschallbehandlung wesentlich geringer, da bei der Hochdruckhomogenisierung eine vollständige Lyse gewährleistet werden kann. Außerdem ist die Hochdruckhomogenisierung für das Zielprotein schonender, da keine Wärme bei der Zelllyse entsteht und somit die Stabilität des Proteins nicht durch die thermische Belastung beeinträchtigt wird. Eine erhebliche Steigerung der Ausbeute konnte hingegen durch die Kombination aus Hochdruckhomogenisation und Solubilisierung mittels Triton X-100 Zugabe erreicht werden, wodurch das *protein of interest* mit einer Ausbeute von 18,7 ± 1,3 mg L^{-1} Medium (aus drei Aufschlüssen) erhalten wurde. Ohne Triton wurden lediglich 13,9± 2,9 mg L^{-1} Medium (aus zwei Aufschlüssen) gewonnen. Folglich konnte die Effektivität des Zellaufschlusses durch diese Kombination aus Hochdruck-homogenisierung und Solubilisierung des Proteins um ungefähr 35% gesteigert werden.

Zur weiteren Erhöhung der Proteinmenge wurde neben der Detergens-Zugabe ebenfalls das Aufreinigungsprotokoll der Affinitätschromatographie genauer untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hier auf den Einfluss des Waschschrittes auf die Reinheit des resultierenden Eluates gelegt, da beobachtet wurde, dass die vereinigten Elutionsfraktionen nach dem Waschen über fünf Säulenvolumina sehr stark mit unspezifisch gebundenen Proteinen verunreinigt waren (Abbildung 18 B, Spur 1), wohingegen der Waschschritt über sieben Säulenvolumina erfolgreich war und die Elutionsprobe nur geringe Verunreinigungen aufwies (Abbildung 18 A, Spur 6). Bei beiden Aufreinigungen wurde in allen Waschfraktionen das Zielprotein HisPPARβ/δ-LBD beobachtet, was darauf hindeutete, dass die Kapazität der His-Säule (5 mL) für die entstandene Proteinmenge nicht ausreichte, sodass nicht die gesamte Proteinmenge an die Säule binden konnte und beim Waschen von der Säule gespült wurde. Außerdem kompetiert das Targetprotein mit den unspezifisch bindenden Proteinen, wodurch sowohl die Ausbeute als auch der Reinigungserfolg dezimiert wurde. Dies zeigte sich in den teils stark verunreinigten Elutionsproben, wobei diese mit der der Gesamtproteinmenge korreliert. Beim Ultraschallaufschluss lag meist weniger Verunreinigung des Eluates vor, da hierbei weniger Zellen aufgeschlossen wurden und daher insgesamt weniger Protein

aufgetragen wurde als bei der deutlich effektiveren Zelllyse durch Hochdruckhomogenisation. Diese Verunreinigungen ließen sich auch nicht durch eine Verlängerung des Waschschrittes reduzieren.

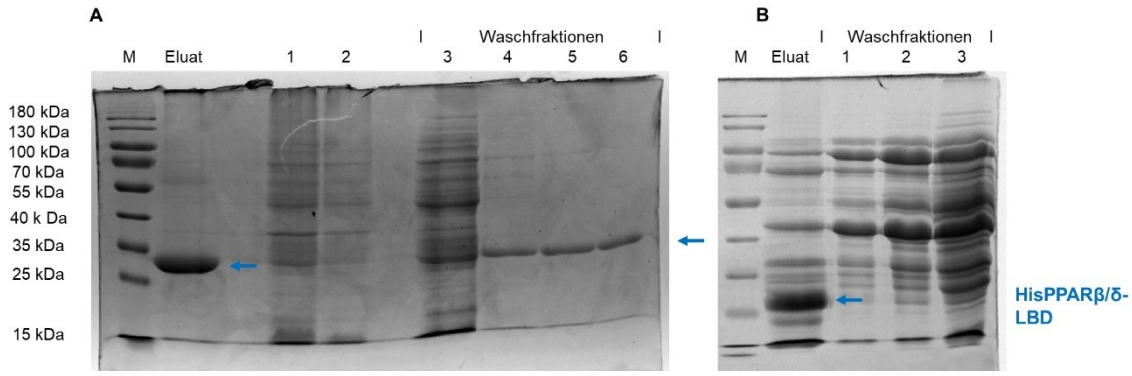


Abbildung 18: Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD über Affinitätschromatographie nach Zugabe von 0,2% (v/v) Triton X-100 zum Lysepuffer sowie der Vergleich der Zellaufschlussarten durch Ultraschall und Hochdruckhomogenisierung. **A:** Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 1: erster Durchfluss, 2: zweiter Durchfluss, 3: erste Waschfraktion, 4: zweite Waschfraktion, 5: dritte Waschfraktion, 6: vierte Waschfraktion; **B:** Aufschluss durch den Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex^{TM}C5, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen, 1: dritte Waschfraktion, 2: zweite Waschfraktion, 3: erste Waschfraktion. M = Proteinstandard.

Aufgrund des hohen Verlustes an exprimierter HisPPARβ/δ-LBD sowie der noch nicht ausreichenden Reinheit des *protein of interest* zur Proteinkristallisation wurde deshalb die Aufreinigungsstrategie optimiert. Dazu wurde zunächst die Konzentration des Elutionsmittels Imidazol im Binde- und Waschpuffer zur Vermeidung unspezifisch bindender Proteine erhöht, da die optimale Imidazol-Konzentration für jedes Protein unterschiedlich ist und ermittelt werden muss. Für die verwendete Säule HisTrap FF wird eine Imidazolkonzentration zwischen 20 mM und 40 mM für einen maximalen Reinigungserfolg empfohlen [98], daher wurde ein stufenweiser Gradient von 20 mM, 40 mM und 60 mM Imidazol gewählt. Der Zellaufschluss erfolgte bei einer Konzentration von 20 mM Imidazol im Bindepuffer. Im Anschluss wurde die beladene Säule unter steigender Konzentration des Elutionsmittels gewaschen, indem die Imidazolkonzentration graduell von 20 mM auf 40 mM und anschließend auf 60 mM erhöht wurde. An den jeweiligen Konzentrationsstufen wurde die HisTrap-Säule über drei Säulenvolumina bei 20 mM sowie bei 40 mM Imidazol gespült und bei 60 mM über

fünf Säulenvolumina mit 1 mL min^{-1} gewaschen (Abbildung 19 A und B). Die anschließende Reinheitsanalyse zeigte, dass beim Waschen mit 20 mM Imidazol zwar viel der unspezifisch bindenden Proteine von der Säule entfernt wurden, in der letzten Waschfraktion mit 20 mM Imidazol jedoch noch immer Verunreinigungen mit anderen Proteinen sowie außerdem das Zielprotein enthalten waren (Abbildung 19 A). Dies könnte an einer Überschreitung der Bindekapazität der Säule liegen, sodass nicht das gesamte Zielprotein an der Säule binden konnte und daher beim Waschen verloren ging, obwohl bereits bekannt war, dass das Zielprotein bei 20 mM Imidazol an der Säule bindet und aufgereinigt werden kann. Beim Waschen mit 40 mM Imidazol wurden die Verunreinigungen von der Säule entfernt, aber das gewünschte Protein HisPPARβ/δ-LBD konnte noch nicht vollständig rein am Ende des Waschschrittes erhalten werden (Abbildung 19 B, Spur 1 und 2), was auch durch die weitere Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 60 mM nicht gelang. Die Waschfraktionen bei 60 mM Imidazol wiesen ebenfalls viele unspezifisch gebundene Proteinen auf, sodass das resultierende eluierte Protein weiterhin stark verunreinigt war (Abbildung 19 B, Spur 3 - 5).

Die Erhöhung der Imidazolkonzentration während des Waschens der Affinitätschromatographie zeigte, dass auch bei beiden höheren Konzentrationen von 40 mM und 60 mM Imidazol das *protein of interest* noch nicht vollständig von der Säule eluiert wurde, sondern ein großer Teil der Proteinmenge während des Waschens über insgesamt acht Säulenvolumina an der HisTrap-Säule verblieb. Nach der Elution wurden 209,1 mg Protein gewonnen, was einer Ausbeute von 28,3 mg L^{-1} Medium entsprach. Aufgrund dieser hohen eluierten Proteinmenge wurde gefolgert, dass die HisPPARβ/δ-LBD nicht durch zu hohe Imidazolkonzentration von der Säule gespült wurde, sondern die Bindekapazität der Säule von ungefähr 200 mg Protein überschritten wurde. Deshalb sollte im Folgenden geprüft werden, ob sich diese Konzentration von 60 mM Imidazol im Bindepuffer ebenfalls zur Proteinaufreinigung eignet. Hierfür wurden unter den gleichen Bedingungen zwei Zellaufschlüsse einmal mit 20 mM und einmal mit 60 mM Imidazol durchgeführt und via Affinitätschromatographie wie zuvor aufgereinigt. Mit den vereinigten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie HisTrap FF wurde eine Kationenaustauschchromatographie mit Hilfe der MonoS 10/100 GL durchgeführt, um die gewünschte HisPPARβ/δ-LBD vollständig sauber aufzureinigen. Im Vergleich des Zellaufschlusses mit 20 mM Imidazol zum Zellaufschluss mit 60 mM Imidazol fiel auf, dass die Elutionsfraktionen nach der Kationenaustauschchromatographie (CIEX) der

Zelllyse und Proteinaufreinigung bei 60 mM Imidazol vollständig sauber waren und die reine HisPPARβ/δ-LBD zeigten (Abbildung 19 C, Spur 1 und 2), wohingegen das Eluat der Kationenaustauschchromatographie nach dem Zellaufschluss und der Aufreinigung bei 20 mM Imidazol eine Verunreinigung mit einem circa 20 kDa großen Proteins aufwies (Abbildung 19 C, Spur 3 und 4, schwarzer Pfeil). Daraus wurde gefolgert, dass 60 mM Imidazol während der Zelllyse und somit während des Säulenbeladens zur vollständigen Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD notwendig war, und nicht durch Konzentrationserhöhung im anschließenden Waschschritt der Affinitätschromatographie erzielt werden konnte.

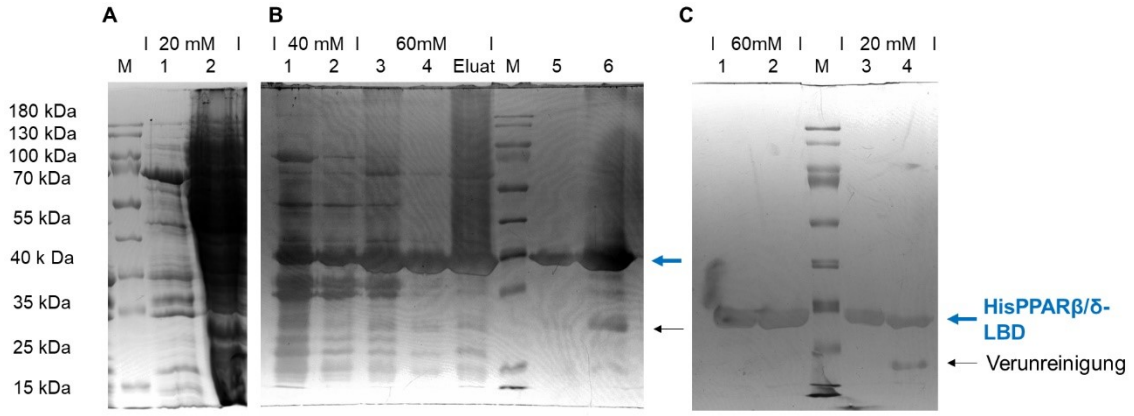


Abbildung 19: Optimierung der Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD hinsichtlich der Konzentration des Elutionsmittels Imidazol zum Binde- und Waschpuffer der Affinitätschromatographie. **A:** Affinitätschromatographische Aufreinigung mit 20 mM Imidazol im Waschpuffer, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, 1: Ende des Waschschrittes (20 mM), 2: erste Waschfraktion (20 mM); **B:** Graduelle Erhöhung der Imidazolkonzentration im Waschpuffer der Affinitätschromatographie von 20 mM Imidazol beim Zellaufschluss auf 40 mM und auf 60 mM sowie Kationenaustauschchromatographie (CIEX), 15%-iges Gel mit Silberfärbung, 1: erste Waschfraktion (40 mM), 2: letzte Waschfraktion (40 mM), 3: erste Waschfraktion (60 mM), 4: letzte Waschfraktion (60 mM), Eluat: von der Affinitätschromatographie bei 60 mM Imidazol, 5: Eluat 1 der CIEX, 6: Eluat 2 der CIEX; **C:** Eluate der CIEX zweier verschiedener Proteinisolierungen der HisPPARβ/δ-LBD mit 20 mM und 60 mM Imidazol in der Affinitätschromatographie, 15%-iges Gel mit Silberfärbung, 1: Eluat 1 der CIEX (60 mM beim Aufschluss), 2: Eluat 2 der CIEX (60 mM beim Aufschluss), 3: Eluat 1 der CIEX (20 mM beim Aufschluss), 4: Eluat 2 der CIEX (20 mM beim Aufschluss); M = Proteinstandard.

Um den Aufreinigungserfolg der Affinitätschromatographie weiter zu optimieren, wurde eine Bakterienkultur auf zwei Chargen aufgeteilt und die geernteten Zellen wurden im Bindepuffer mit zum einen 80 mM Imidazol und zum anderen 100 mM Imidazol

aufgeschlossen und aufgereinigt. Hierbei wurde bereits das Lysat auf zwei miteinander verbundene Säulen beladen, da, wie bereits erwähnt, vorherige Experimente eine zu geringe Bindekapazität der Säule zeigten. Die HisTrap-Säulen wurden einzeln eluiert, um Verunreinigungen effektiv im Waschen von der Säule zu entfernen und nicht auf die nächste Säule zu spülen. Nach der Elution beider Proteinaufreinigungen mit den Imidazolkonzentrationen von 80 mM sowie 100 mM im Binde-und Waschpuffer konnten jedoch leider nur sehr geringe Proteinmengen im Eluat bestimmt werden. Die erste Säule beider Aufreinigungen zeigte während der Elution im Chromatogramm kein Proteinsignal, woraus geschlossen wurde, dass der Zellaufschluss und die Proteinaufreinigung mit mehr als 60 mM Imidazol nicht möglich ist. Zur genaueren Untersuchung der Eluate der ersten Säule wurden jeweils dieselben Fraktionen wie bei der zweiten Säule, bei denen ein Proteinsignal der zweiten Säule zu beobachten war, vereinigt. Anhand der Reinheitsbestimmung wurde im Durchfluss und in allen Waschfraktionen viel vom Zielprotein detektiert (Appendix, Abbildung 32, Abbildung 33). Die Proteinmenge der Aufreinigung mit 80 mM Imidazol betrug 0,2 mg der ersten Säule und 4,9 mg der zweiten Säule, die Menge des *protein of interest* der Aufreinigung mit 100 mM Imidazol lag bei 0,4 mg der ersten Säule und 19,8 mg der zweiten Säule (Tabelle 2). Insgesamt wurde lediglich eine sehr geringe Ausbeute von 1,4 mg L^{-1} Medium mit 80 mM Imidazol und von 5,6 mg L^{-1} Medium mit 100 mM Imidazol im Lysat erzielt, und somit als nicht erfolgreiche Proteinisolierung angesehen. Da vermutet wurde, dass bei diesen hohen Imidazolkonzentrationen die HisPPARβ/δ-LBD nicht vollständig an die Säule binden konnte, wurden die gesamten Proteinlösungen auf 60 mM Imidazol dialysiert und erneut über Affinitätschromatographie aufgereinigt, um einen Verlust an Protein zu reduzieren. Nach Elution dieses Chromatographielaufes wurden insgesamt 51,4 mg sauberes Protein erhalten, jedoch wurde ebenfalls noch viel Protein im Waschschritt verloren (Appendix, Abbildung 34). Dies ließ auf das erreichte Optimum der Proteinaufreinigung unter Verwendung von 60 mM Imidazol schließen, wodurch einerseits nicht nur die Verunreinigungen erfolgreich entfernt sondern andererseits auch die daraus resultierende Proteinausbeute deutlich erhöht werden konnte, da die gewünschte HisPPARβ/δ-LBD nicht mehr mit unspezifisch bindenden Proteinen konkurrierte. Im Vergleich hierzu konnten bei 20 mM Imidazol eine leicht verunreinigte Proteinmenge von insgesamt 131,3 mg isoliert werden (Abbildung 18 B), was einer Ausbeute von 20,5 mg L^{-1} Medium und referenziert auf dieselbe Bakterienkulturmenge wie beim Lysat mit 80 mM Imidazol ungefähr 65,7 mg entsprach. Die Aufreinigung mit

60 mM Imidazol erzielte insgesamt 157,1 mg nach Elution der ersten Säule und 35,1 mg nach der zweiten Säule und konnte die Proteinaufreinigung mit einer Ausbeute von 26,7 mg L^{-1} Medium erheblich verbessern [beziehungsweise zum Vergleich zur Aufreinigung mit 80 mM Imidazol auf dieselbe Menge an Bakterienkultur referenziert: 78,5 mg der ersten und 17,5 mg der zweiten Säule (Tabelle 2)].

Tabelle 2: Gegenüberstellung der erhaltenden Proteinmengen aus den Proteinaufreinigungen mit den verwendeten Imidazolkonzentrationen *c* von 20 mM, 60 mM, 80 mM und 100 mM im Binde-und Waschpuffer der Affinitätschromatographie HisTrap FF 5mL. Proteinherstellung bei 20 °C in SLB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG in Anwesenheit von 500 µM Additiv (**1**), Zellaufschluss durch Hochdruckhomogenisierung. a: Referenziert auf dieselbe Menge an Bakterienkultur.

***c* (Imidazol)**	**HisTrap FF**	**Protein-menge[a]**	**Ausbeute [mg L^{-1} Medium]**	**Reinheit**
20 mM	Säule 1	65,7 mg	20,5	verunreinigt
60 mM	Säule 1	78,5 mg	26,7	sauber
	Säule 2	17,5 mg		leicht verunreinigt
80 mM	Säule 1	0,2 mg	1,4	-
	Säule 2	4,9 mg		-
100 mM	Säule 1	0,4 mg	5,6	-
	Säule 2	19,8 mg		-

Der Reinigungserfolg der Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD wurde durch Zugabe des schwachen Agonisten (**1**) zur Produktion sowie durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 60 mM während der Zelllyse sowie des Binde- und Waschschrittes der Affinitätschromatographie erreicht. Wie bereits gezeigt werden konnte, wurde die Bindekapazität der Affinitätssäule bei der Proteinaufreinigung überschritten, daher wurde das Lysat auf eine Säule beladen und diese dann beim Waschen mit einer weiteren Säule dahinter verbunden, um nicht gebundene HisPPARβ/δ-LBD auf der zweiten Säule aufzufangen. Anschließend wurden beide Säulen einzeln eluiert und analysiert, um den Verlust des Zielproteins durch die überschüssige Proteinmenge bestimmen zu können (Abbildung 20). Das Eluat der ersten Säule wies eine sehr hohe Proteinmenge von 157,1 mg Protein auf und wurde mit einer hohen Reinheit erhalten. Am Ende des Waschschrittes der ersten Säule wurden noch Verunreinigungen beobachtet, also genügte die Länge des Waschens über fünf Säulenvolumina noch nicht

vollständig, sondern sollte auf sieben Säulenvolumina erhöht werden (Abbildung 20, Spur 3 und 4). Die Elution der zweiten Säule zeigte, dass nicht die gesamte Proteinmenge auf die erste Säule binden konnte, sondern überschüssiges Protein beim Waschen von der ersten Säule gespült wurde und auf der zweiten Säule aufgefangen werden konnte. Durch dieses Vorgehen konnten noch 35,1 mg Protein von der zweiten Säule gewonnen werden, die ansonsten ohne das Verbinden zweier Säulen verloren würden. Das Eluat der zweiten Säule zeigte im Gegensatz zum Eluat der ersten Säule eine etwas stärkere Verunreinigung auf, die aber noch sehr gering war im Vergleich zu vorherigen Proteinisolierungen unter Verwendung von 20 mM Imidazol. Zur vollständigen Proteinaufreinigung erfolgte im Anschluss die Kationenaustausch-chromatographie von den jeweiligen getrennten Eluaten, damit die Proteingemische maximal aufgereinigt werden können. Bei der zweistufigen Dialyse fiel ein leichter Protein-Niederschlag aus und die abzentrifugierte Proteinlösung war noch stark verunreinigt (Abbildung 20 B). Diese Verunreinigung konnte nach Elution der erfolgreichen Kationenaustauschchromatographie aber nicht mehr beobachtet werden. Damit das Protein gänzlich aufgereinigt wird, wurde ein Gradient über zwanzig Säulenvolumina verwendet. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Chromatographie konnte das Zielprotein HisPPARβ/δ-LBD vollständig rein isoliert werden. Auffällig bei der graduellen Elution der Kationenaustauschchromatographie waren zwei entstandene Proteinsignale, die aber beide die gewünschte HisPPARβ/δ-LBD beinhalteten, wobei das erste Signal nur 4,2 mg aber dafür absolut reines Protein und das zweite Signal 70,1 mg leicht verunreinigtes Protein enthielt. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass ein geringer Teil nicht an die MonoS-Säule gebunden hatte und dann bei geringerer Salzkonzentration eluiert wurde. Falls auch nach der Kationenaustauschchromatographie die HisPPARβ/δ-LBD noch immer nicht absolut aufgereinigt war, wurde die Proteinlösung erneut über Affinitäts- und Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt.

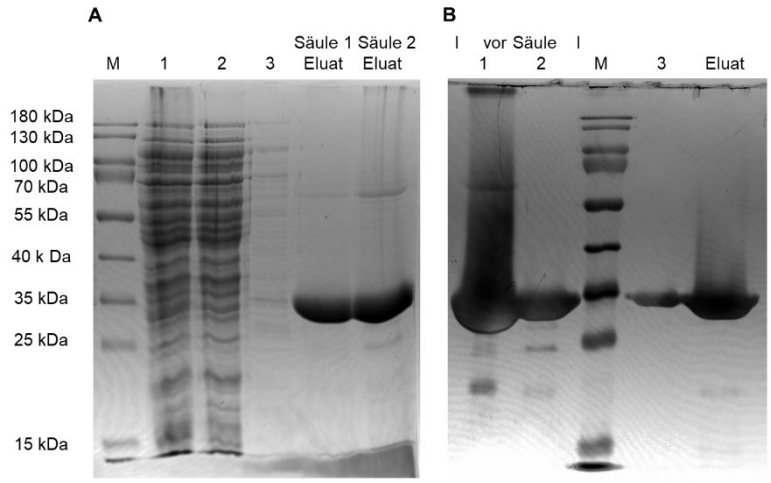


Abbildung 20: Auftragung des Zelllysates auf eine HisTrap FF 5 mL Säule mit anschließendem Waschschritt über zwei hintereinander geschaltete Säulen. **A:** Affinitätschromatographie HisTrap FF 5 mL, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, 1: Durchfluss, 2: erste Waschfraktion (nach 7 mL), 3: Ende des Waschschrittes nach fünf Säulenvolumina, Eluat Säule 1: vereinigte Elutionsfraktionen der ersten Säule, 5: Eluat Säule 2: vereinigte Elutionsfraktionen der zweiten Säule; **B:** Kationenaustauschchromatographie MonoS 10/100 GL der ersten Säule, 15%-iges Gel mit Silberfärbung, 1: nach Dialyse und Zentrifugation vor der ersten Säule, 2: nach Dialyse und Zentrifugation vor der zweiten Säule, 3: erster Peak der Elution, Eluat: vereinigte Eluate der MonoS der ersten Säule. M = Proteinstandard.

Abschließend wurde untersucht, ob das Beladen des Lysates auf zwei miteinander verbundene Affinitätssäulen ausreicht, oder eine dritte Säule verwendet werden muss, um die Bindekapazität zu steigern und den Proteinverlust zu verhindern. Dazu wurde das Lysat unter zirkulierendem Fluss auf zwei Säulen aufgetragen und zum Waschen auf eine dritte Säule erweitert, um die Menge an nicht gebundenem Protein ermitteln zu können, welches dann an die dritte Säule binden sollte. Der Waschschritt wurde auf zehn Säulenvolumina erhöht und zusätzlich vor Beginn der Elution auf enthaltene Proteine geprüft, um sämtliche unspezifisch bindenden Proteine zu entfernen. Damit die genaue Proteinmenge auf den jeweiligen Säulen bestimmt und untersucht werden konnte, wurde das Protein jeweils von den einzelnen Säulen eluiert. Die erste Säule wies 111,0 mg Protein, die zweite Säule 23,0 mg Protein und die dritte Säule noch 11,6 mg auf. Folglich konnte mit Hilfe der dritten Affinitätssäule überschüssiges Protein aufgefangen werden. Jedoch zeigte die Reinheitsbestimmung, dass dieses Eluat der dritten Säule sehr stark mit Proteinen der Größe von ungefähr 25 kDa und 20 kDa verunreinigt war (Abbildung 21, Spur „Säule 3 Eluat“, schwarzer Pfeil). Diese Verunreinigungen wurden in vorherigen Aufreinigungen ebenfalls beobachtet und konnten nicht in der Kationenaustausch-chromatographie abgetrennt werden. Im Gegensatz hierzu waren die Eluate der ersten

sowie zweiten Säule zwar nicht gänzlich rein, hier wurden aber keine Verunreinigungen desselben Proteins bei 20 kDa beobachtet (Abbildung 21, Spuren der Eluate Säule 1 und 2). Durch eine dritte Säule wird zwar der Proteinverlust verringert und dadurch die Ausbeute erhöht, gleichzeitig jedoch auch die Reinheit der HisPPARβ/δ-LBD verschlechtert, weshalb bei künftigen Proteinaufreinigungen das Lysat auf zwei Säulen aufgetragen wurde. Für die optimale Proteinreinheit wurden dann die Säulen wieder einzeln eluiert, da die zweite Säule meist mehr Verunreinigungen aufwies.

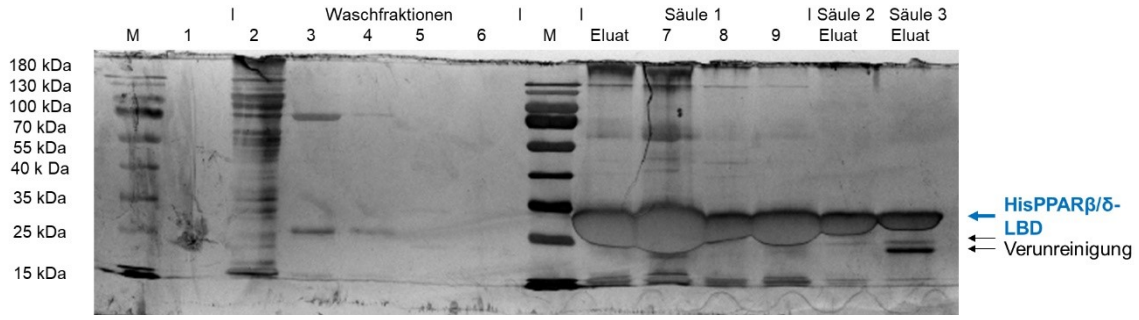


Abbildung 21: Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD über zwei verbundene HisTrap FF 5 mL Säulen und Waschschritt über drei hintereinander geschaltete Säulen mit anschließender einzelner Elution, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung. 1: Elution der dritten Säule, erste Fraktion (2 mL), 2: erste Waschfraktion der drei Säulen (3 mL), 3: achte Waschfraktion der drei Säulen (nach 24 mL), 4: elfte Waschfraktion der drei Säulen (nach 33 mL), 5: 49. Waschfraktion der drei Säulen (nach 147 mL), 6: Waschen der drei Säulen nach 125 mL, Eluat Säule 1: vereinigte Elutionsfraktionen der ersten Säule, 7: dritte Elutionsfraktion der ersten Säule (nach 6 mL), 8: zweite Elutionsfraktion der ersten Säule (nach 4 mL), 9: vierte Elutionsfraktion der ersten Säule (nach 8 mL), Eluat Säule 2: vereinigte Elutionsfraktionen der zweiten Säule, Eluat Säule 3: vereinigte Elutionsfraktionen der dritten Säule. Schwarzer Pfeil: Verunreinigung; M = Proteinstandard.

Nach der Optimierung der Proteinproduktion, der Proteinisolierung und der Aufreinigungsstrategie sollte überprüft werden, ob die Zugabe des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) zur Proteinproduktion wirklich für die bessere Ausbeute sowie Proteinreinheit essentiell ist oder ob der Zusatz des Agonisten durch das Beladen der zwei miteinander verbundenen Säulen in Gegenwart von 60 mM Imidazol überflüssig geworden war. Zum Vergleich erfolgte daher die Proteinherstellung und anschließende Proteinaufreinigung unter den bisherigen Bedingungen exklusive der Zugabe des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) zur Bakterienkultur. Die Proteinaufreinigung erfolgte über zwei Säulen, welche anschließend einzeln eluiert wurden. Auffällig waren hierbei zunächst schon die leicht gelblichen Elutionsfraktionen des Proteinsignals beider Säulen.

Dieses Phänomen wurde auch bei der Proteinaufreinigung in Anwesenheit von 20 mM Imidazol beobachtet (Abbildung 16) und deutet deshalb auf Verunreinigungen unspezifisch bindender Proteine hin. Die Proteinausbeute der Affinitätschromatographie betrug auf der ersten Säule 90,8 mg Protein und 63,3 mg Protein auf der zweiten Säule, was insgesamt einer sehr hohen Ausbeute von 21,4 mg L^{-1} verwendeter Bakterienkultur entsprach. Im Vergleich zur Proteinisolierung mit 60 mM Imidazol und Additiv (**1**) war diese jedoch um 20% geringer. Für die Reinheitsbestimmung wurde das Eluat untersucht. Nach dem Denaturieren der Proteinproben wurde ein Niederschlag in der Elutionsprobe beobachtet, sodass nicht die gesamte Probe aufgetragen werden konnte. Die Untersuchung zeigte, dass beim Waschschritt viele Verunreinigungen von der Säule entfernt werden konnten, jedoch konnte keine klare Aussage über den Reinheitszustand der Eluate getroffen werden (Abbildung 22). Bei der Proteinisolierung mit Additiv und 60 mM Imidazol war das Eluat farblos und die Gelproben waren nach dem Denaturieren klar. Aufgrund der leichten Färbung beider Eluate sowie des Ausbildens eines Niederschlags in der denaturierten Probe wurde gefolgert, dass die Proteinisolierung ohne Zugabe des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) zur Bakterienkultur schlechter verläuft. Als möglicher Grund hierfür könnte eine Verbesserung der Stabilität der HisPPARβ/δ-LBD durch den schwachen Agonisten sein, wodurch eine Proteinaggregation verhindert würde. Die HisPPARβ/δ-LBD konnte in hoher Ausbeute und Reinheit also nur in Gegenwart des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) und 60 mM Imidazol während Lyse und Affinitäts-chromatographie isoliert werden.

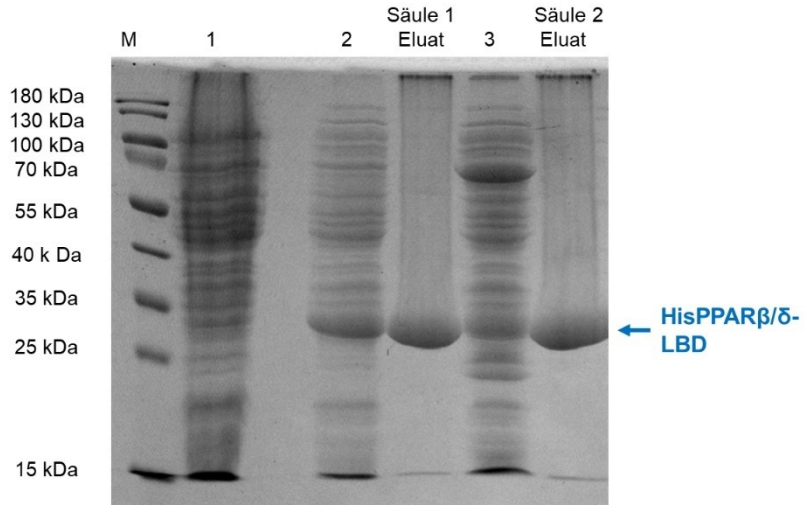


Abbildung 22: Überprüfung der Notwendigkeit der Zugabe des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) während der Proteinproduktion der HisPPARβ/δ-LBD für eine vollständige Proteinaufreinigung via Affinitätschromatographie, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung. 1: Durchfluss, 2: erste Waschfraktion der ersten Säule, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen der ersten Säule, 3: erste Waschfraktion der zweiten Säule, Eluat: vereinigte Elutionsfraktionen der zweiten Säule. M = Proteinstandard.

Eine Gegenüberstellung der Proteinisolierung nach Induktion durch Isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranosid (IPTG) im Vergleich ohne Induktion zeigte erfolgreich, dass die Proteinproduktion durch das Laktose-Analogon IPTG erfolgte. Die Proteinausbeute der HisPPARβ/δ-LBD der Bakterienkultur nach Induktion mittels IPTG betrug 1.482,0 µg g^{-1} Zellpellet nach der Affinitätschromatographie und nach der weiteren Aufreinigung über Kationenaustauschchromatographie 215,0 µg g^{-1} Zellpellet im Hauptsignal sowie 79,0 µg g^{-1} Zellpellet im ersten Proteinsignal. Im Gegensatz hierzu betrug die Ausbeute der Proteinproduktion ohne IPTG-Induktion lediglich 481 µg g^{-1} Zellpellet nach der Affinitätschromatographie, das nur 32,5% der Proteinausbeute nach IPTG-Induktion entsprach. Folglich stellt die indirekte Induktion der Proteinexpression mittels IPTG eine deutliche Steigerung der Proteinproduktion des *protein of interest* dar. Nach der Kationenaustauschchromatographie wurde eine Ausbeute von 172 µg g^{-1} Zellpellet im Hauptsignal und 53 µg g^{-1} Zellpellet im ersten Proteinsignal der Bakterienkultur ohne IPTG-Induktion erhalten. Verglichen mit der Proteinproduktion inklusive IPTG-Induktion war die Ausbeute der Hauptelution der MonoS ohne Induktion nur um 20% und die Ausbeute der Nebenfraktion um ungefähr 33% geringer, was auf die gute Effizienz der Kationenaustauschchromatographie schließen lässt. Die Kombination des Plasmids pET23a (+) mit dem *E.coli* Stamm BL21 gold (DE3) ermöglichte eine indirekte Induktion durch Regulation der T7-Polymerase-Expression. Im Gegensatz zur

indirekten Induktion wurde mit Hilfe des pET28a Plasmids von *Sinz et al.* die Herstellung der PPARβ/δ-LBD direkt über Induktion der Plasmidtranskription initiiert [88,99].

Die in dieser Arbeit etablierte und optimierte Proteinisolierung und Aufreinigungsstrategie sollte abschließend mit der Proteinaufreinigung nach *Sinz et al.* verglichen werden, indem das verbesserte Protokoll (Kapitel 7.8.1) mit dem Konstrukt von *Sinz* [100] durchgeführt wurde, welches freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Kapitel 7.4). Dieses Konstrukt weist ebenfalls die PPARβ/δ-LBD auf, allerdings war das Zielprotein mit einem Strep-Tag II für die Affinitätschromatographie versehen, sodass die Säule auf eine Strep-Tactin® 5mL Säule gewechselt wurde. Dies stellte eine Änderung zum Aufreinigungsprotokoll nach *Sinz* dar, indem zwei miteinander verbundene StrepTrap HP 1mL Säulen verwendet wurden und somit die Bindekapazität geringer als bei einem 5 mL Säulenvolumen war. Das Protokoll der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD nach *Sinz* zeigt viele Unterschiede zur erarbeiteten optimierten Aufreinigungsstrategie der HisPPARβ/δ-LBD auf. So wurden die Zellen enzymatisch durch Lysozym und mechanisch mit anschließender Ultraschallbehandlung lysiert. Wie jedoch bereits gezeigt werden konnte, war die Hochdruckhomogenisierung mit Hilfe des EmulsiFlex™ C5 effizienter und erhöhte die Ausbeute auf das doppelte im Vergleich zur Ultraschallbehandlung (Abbildung 17). Nach der Lyse wurden die Zellbestandteile durch Zentrifugation und anschließender Filtration abgetrennt. Für die Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD wurde die Proteinlösung nicht filtriert, da bei diesem Schritt viel Protein verloren wird. Daher wurde die Filtration nun bei der Isolierung der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD ebenfalls ausgelassen. Im Gegensatz zum Protokoll nach *Sinz* [88], bei dem das Lysat einmal auf die Säule aufgetragen wurde, wurde dieses Mal das Lysat über Nacht unter konstantem Fluss auf die Säule aufgetragen, damit die gesamte Proteinmenge des Zielproteins der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD an die Säule bindet. Nach dem Waschen wurde das *protein of interest* eluiert und hinsichtlich der Reinheit untersucht. Auffällig war bei der Elution der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD, dass kein Proteinsignal beobachtet und somit keine Fraktionen vereinigt werden konnten. Die einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden analysiert und auch hierbei konnte das Zielprotein nur ganz schwach in der Elution identifiziert werden (Abbildung 23 A). In den ersten Waschfraktionen war bereits die gewünschte Strep-getaggte PPARβ/δ-LBD neben den Verunreinigungen enthalten und deren Menge nahm in den weiteren Fraktionen ab, sodass das *protein of interest* nur noch minimal in den Elutionsfraktionen

zu beobachten war. Aufgrund der geringen Menge und auch des fehlenden Proteinsignals während des Chromatographielaufs konnte keine Ausbeute bestimmt werden. Bei der Proteinaufreinigung nach *Sinz* wurden die sauberen Waschfraktionen ab W10 und die Elutionsfraktionen bis E5 vereinigt (Abbildung 23 B) [88], da das Zielprotein ebenfalls während des Waschschrittes bereits eluierte und folglich nicht spezifisch an die Säule gebunden hatte. Dadurch wurde viel des *protein of interest* verloren, weshalb die Aufreinigungsstrategie über Strep-Tag ungeeignet war und daher geändert werden müsste.

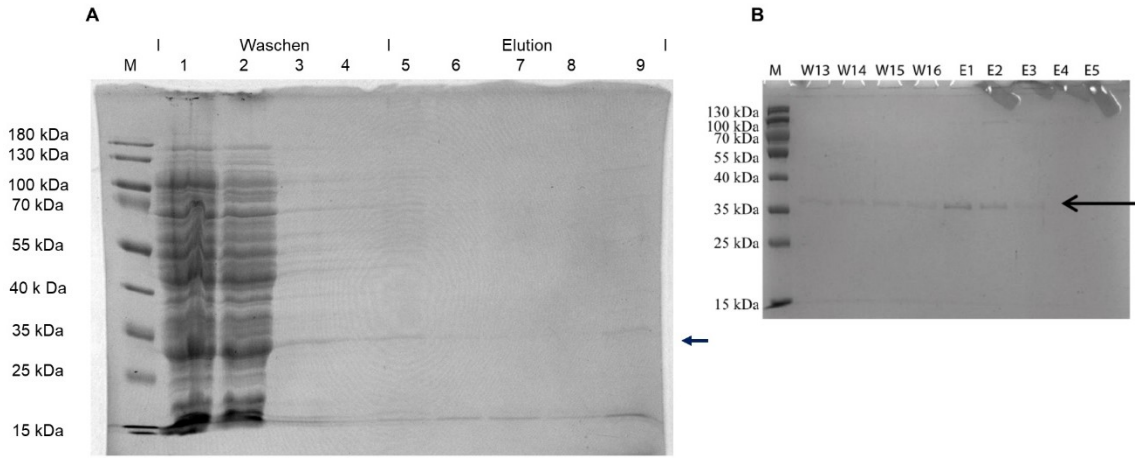


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Proteinisolierung der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD des Konstruktes nach *Sinz et al.* [aus 88] im Vergleich zur optimierten Aufreinigungsstrategie (Kapitel 7.8.1). **A:** Affinitätschromatographie der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD mit übertragenem optimiertem Protokoll, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung. 1: erste Waschfraktion (nach 2 mL), 2: zweite Waschfraktion (nach 4 mL), 3: sechste Waschfraktion (nach 12 mL), 4: zwölfte Waschfraktion (nach 24 mL), 5: erste Elutionssfraktion (nach 2 mL), 6: vierte Elutionsfraktion (nach 8 mL), 7: siebte Elutionsfraktion (nach 14 mL), 8: zehnte Elutionsfraktion (nach 20 mL), 9: elfte Elutionsfraktion (nach 22 mL), **B:** Gelbild der Affinitätschromatographie entnommen aus *Sinz et al.* Adaptiert und modifiziert [aus 88], 12%-iges Gel. W13-W16: Waschfraktionen, E1-E5: Elutionsfraktionen. M = Proteinstandard.

Die Ausbeute der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD nach *Sinz et al.* betrug nur 13,0 µg g^{-1} Zellpellet und war somit um das 110-fache geringer als die erhaltene Proteinausbeute der HisPPARβ/δ-LBD (1.482,0 µg g^{-1} Zellpellet) nach Durchführung des optimierten Protokolls unter Zugabe des schwachen β/δ-Agonisten (**1**) und Aufreinigung mit 60 mM Imidazol. Daraus wurde gefolgert, dass die Aufreinigung der Strep-getaggten PPARβ/δ-LBD nicht erfolgreich verlief und die geringe Ausbeute nicht für das Durchführen eines Kristallisationsscreens genügt. Die Verwendung des Konstrukts mit einer His-getaggten

PPARβ/δ-LBD war wesentlich effizienter, da durch die Optimierung der Proteinproduktion, Isolierung und Proteinaufreinigung eine hohe Ausbeute sowie Proteinreinheit erlangt werden konnte.

3.1.2 Proteinkristallisation der PPARβ/δ-LBD mit dem Agonist GW0742

Um zu überprüfen, ob es sich bei der isolierten HisPPARβ/δ-LBD um das korrekt gefaltete und funktionelle Protein handelt, wurde mangels eines Funktionsassays ein manueller Screen mit dem potenten β/δ-Agonisten **GW0742** (EC_{50} = 3,25 nM) durchgeführt, um die publizierte Kristallisationsbedingung nach *Batista et al.* [14] (pdb: 3TKM) zu reproduzieren. Das Protein wurde mit einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} eingesetzt und 4 h bei 4 °C mit dem Agonisten inkubiert (1:4 Protein zu Ligand, 1% (v/v) DMSO-Gehalt), allerdings entstand eine Trübung der Lösung nach der Zugabe des Liganden. In der Reinheitsbestimmung wurde keine Zersetzung des Proteins beobachtet (Abbildung 24), woraus geschlossen werden konnte, dass der Ligand unter den publizierten Bedingungen [14] im SEC-Puffer (Kapitel 7.6, 20 mM HEPES, 500 mM NH_4OAc, 5 mM DTT, pH 7,5) nicht löslich war und ausfiel.

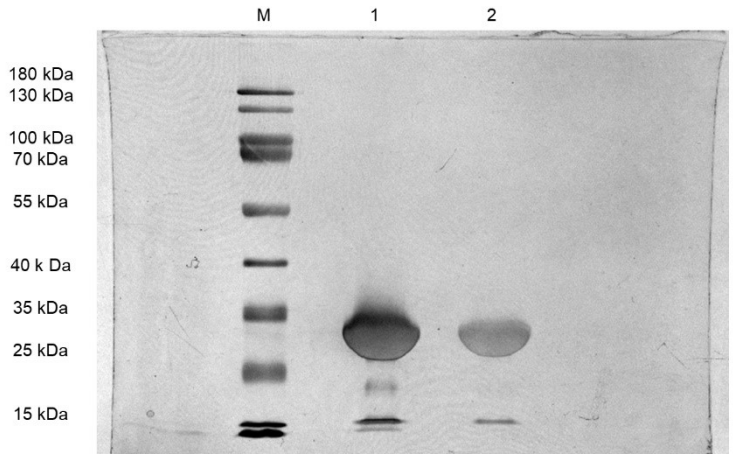


Abbildung 24: Überprüfung der Proteinreinheit für den manuellen Kristallisationsscreen mit dem Agonisten **GW0742** (1:4 Protein:Ligand), 15%-iges Gel, Silberfärbung. 1: vor Zentrifugieren, 2: nach Zentrifugieren vor dem Screen. M = Proteinstandard.

Nach dem Entfernen des Niederschlags wurde die Protein-Ligand-Lösung zum Detergens *n*-Octyl-β-D-thioglucopyranosid (0,5% (w/v), 0,5 µL) sowie zur Reservoirlösung (2,0 µL) gegeben. Im Screen wurden drei verschiedene pH-Werte mit 9,3, 9,5 und 9,7

sowie jeweils fünf unterschiedliche PEG8000-Konzentrationen von 12% bis 20% in enger Anlehnung an die publizierten Bedingungen nach *Batista et al.* (14% PEG8000, pH 9,5) [14] untersucht. Nach 72 Stunden wurde bei der Überprüfung der Kristallisationsscreens mittels Mikroskopie festgestellt, dass sich unter allen Bedingungen Präzipitat gebildet hatte, sodass die Proteinkristallisation bisher nicht reproduziert werden konnte. Ein möglicher Grund hierfür könnte die unzureichende Löslichkeit des Agonisten **GW0742** in der Proteinlösung sein. Im Gegensatz zur Bedingung nach *Batista et al*. [14] wurde der His-Tag vor der Kristallisation nicht abgespalten, da aufgrund der geringen Größe des His-Tags im Vergleich zur PPARβ/δ-LBD keine Beeinträchtigung bezüglich der Kristallisation erwartet wurde [101]. Vor diesem Hintergrund wäre es sinnvoller den Screeningumfang nach geeigneten Bedingungen zu erweitern, um so das Optimum zur Kristallbildung zu ermitteln. Folglich wurde das Scheitern der Kristallisationsversuche des Protein-Ligand-Komplexes aus HisPPARβ/δ-LBD und dem Agonisten **GW0742** nicht als Misserfolg der Proteinexpression gewertet, da das Reproduzieren auf ein natives Protein hingedeutet hätte, ein Fehlschlagen dessen aber nicht den Gegenbeweis darstellt.

3.1.3 Bindungsstudien der PPARβ/δ-LBD in Komplex mit inversen Agonisten und CoRepressor

Bisher ist unter anderem die Kristallisation der PPARβ/δ-LBD in Interaktion mit dem potenten Agonisten **GW0742** (EC_{50} = 3,25 nM) bekannt (pdb: 3TKM) [14]. Diese Kristallisationsbedingung der β/δ-Agonisten-Struktur lässt sich aller Wahrscheinlichkeit nach aber nicht auf die Proteinkristallisation mit einem inversen Agonisten übertragen. Grund hierfür ist die Konformationsänderung der α-Helix 12 der PPARβ/δ-LBD um circa 90° durch die Interaktion mit einem inversen Agonisten (Kapitel 1), wodurch das Aktivierungsmotiv blockiert ist und somit keine Anlagerung des CoAktivators möglich ist. Für die Stabilisierung des Komplexes aus PPARβ/δ-LBD und einem inversen Agonisten ist eine Interaktion mit einem CoRepressor essentiell [75]. Um die Bedingungen zur Proteinkristallisation des Proteinkomplexes aus PPARβ/δ-LBD, inversem Agonisten und CoRepressor zu bestimmen, wurde ein Kristallisationsscreen in Kooperation mit dem MarXtal-Kristallisationslabor der Philipps-Universität Marburg

durchgeführt. Anhand dieser Proteinstruktur könnte der Bindungsmodus der inversen Agonisten **PT-S264**, **ST247** und **DG172** zur PPARβ/δ-LBD untersucht werden.

Für die Proteinkristallisation der PPARα-LBD mit dem α-Antagonisten **GW6471** nach *Xu et al.* (pdb: 1KKQ) wurde das verkürzte CoRepressor-Motiv von SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) zum Protein-Liganden-Gemisch gegeben [75]. Angelehnt an diese Kristallisationsbedingung wurde im initialen Screen dieses vom CoRepressor-Motiv des SMRT abgeleitete verkürzte Peptid (Kapitel 7.4) in der doppelten Menge der PPARβ/δ-Konzentration direkt zur aufkonzentrierten Proteinlösung gegeben und über Nacht mit dem Protein HisPPARβ/δ-LBD und dem Liganden **PT-S264** (zwei Äquivalente zum Zielprotein, 1% (v/v) DMSO) bei 4 °C inkubiert. Bei der PPARα-Antagonisten-Struktur wurde der His-Tag vor der Kristallisation mittels Thrombin abgespalten, doch für die Kristallisation der PPARβ/δ-LBD sollte das Protein inklusive His-Tag kristallisiert werden, da dieser Tag im Verhältnis zum Protein sehr klein ist und damit keinen Einfluss auf die Proteinstruktur hätte [101].

Im Kristallisationsscreen wurden zwei unterschiedliche Proteinkonzentrationen untersucht. Vollständig saubere Proteinchargen (mit Silberfärbung geprüft) wurden vereinigt und auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert, wobei beim Aufkonzentrieren die Proteinlösung permanent durchmischt wurde, um ein Ausfallen des Proteins zu verringern. Zu den jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden der Ligand und der CoRepressor, das SMRT-Peptid, gegeben, weil ungebundene Substanz aufgrund der geringen Größe beim Aufkonzentrieren verloren worden wäre. Da das SMRT-Peptid im verwendeten SEC-Puffer der Proteinlösung (20 mM HEPES, 500 mM NH_4OAc, 5 mM DTT, pH 7,5) unlöslich war, wurde dieses Peptid zunächst im TR-Puffer des *in vitro* FRET-Assays (20 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,9) gelöst und anschließend zum Protein-Liganden-Gemisch gegeben. Nach der Zugabe des CoRepressor-Peptids zum Protein-Liganden-Gemisch wurde eine weiße Trübung der Lösung festgestellt, was möglicherweise auf ein Ausfallen des SMRT-Peptids hindeuten könnte. Das Gemisch wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und der entstandene Niederschlag wurde vor dem Screening abzentrifugiert, um eine Verstopfung des Kristallisationsroboters zu vermeiden. Der Screen wurde mit zwei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von 8 mg mL^{-1} und 10 mg mL^{-1} durchgeführt und die Inkubation der neun

Kristallisationsplatten der HisPPARβ/δ-LBD mit **PT-S264** und SMRT-Peptid erfolgte bei 18 °C. Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden die Screeningplatten mikroskopiert und hinsichtlich der Kristallentstehung untersucht, jedoch konnte bei keiner Kristallisationsbedingung bisher die Entstehung eines Proteinkristalls beobachtet werden. Ein möglicher Grund könnte die Unlöslichkeit des CoRepressors SMRT-Peptid im verwendeten SEC-Puffer sein, sodass auch das vorherige Lösen des SMRT-Peptids im TR-Puffer und anschließendes Hinzugeben zum SEC-Puffer zum Denaturieren des CoRepressor-Peptids geführt haben könnte. Dadurch wurde möglicherweise das SMRT-Peptid beim Zentrifugieren entfernt und könnte somit nicht mit der HisPPARβ/δ-LBD und dem Liganden **PT-S264** den Komplex ausbilden. Folglich fehlte die stabilisierende Funktion des CoRepressors bei der Konformationsänderung der Helix 12, weswegen vermutlich keine Proteinkristalle entstanden sind.

Für einen weiteren Ansatz der Proteinkristallisation muss zunächst ein Puffer identifiziert werden, in dem sowohl das Protein als auch der CoRepressor stabil sind, weil genaue Angaben zur Löslichkeit des verwendeten CoRepressors SMRT-Peptid in den publizierten Bedingungen der Kristallstruktur des PPARα:**GW6471**-Komplexes nach *Xu et al.* [75] fehlten. Zunächst wurde der Puffer der Proteinlösung auf den Tris-haltigen TR-Puffer (mit 0,01% (v/v) Triton X-100) des *in vitro* Assays dialysiert, in dem das CoRepressor-Peptid löslich war. Außerdem wurde das 50:50-Gemisch aus SEC-Puffer und TR-Puffer untersucht, weil im ersten Kristallisationsscreen das SMRT-Peptid im TR-Puffer gelöst und zum Protein gegeben wurde und daraus die Frage entsteht, ob dieses Gemisch einen negativen Effekt auf die Löslichkeit der PPARβ/δ-LBD darstellte. Nach der Dialyse über Nacht wurden beide Proteinlösungen aufkonzentriert und anschließend die Proteinkonzentration vor und nach Entfernen des Niederschlags ermittelt und die Reinheit der Proteinlösungen untersucht. Bei beiden Proteinlösungen konnte nicht die gewünschte Konzentration von 10 mg mL^{-1} erreicht werden, da beim Aufkonzentrieren viel Protein verloren wurde. Vor Entfernen des entstandenen Niederschlags wurde bei der Proteinlösung im TR-Puffer eine Konzentration von 7,8 mg mL^{-1} und nach dem Zentrifugieren eine um circa 60% geringere Konzentration von 3,3 mg mL^{-1} im Überstand bestimmt, woraus geschlossen wurde, dass die HisPPARβ/δ-LBD im TR-Puffer nicht stabil war und dieser Puffer damit ungeeignet für die Proteinkristallisation war. Im Gemisch aus SEC-Puffer und TR-Puffer wurde ebenso eine Abnahme um ungefähr 35% der Proteinkonzentration von 11,8 mg mL^{-1} auf 7,6 mg mL^{-1} nach dem

Zentrifugieren des Niederschlags beobachtet. Die Reinheitsanalyse des Puffertestes bestätigte ebenso die Instabilität der HisPPARβ/δ-LBD in beiden Puffern (Abbildung 25), denn sowohl vor dem Pufferwechsel als auch nach der Dialyse lag eine saubere Proteinlösung vor. Während des Aufkonzentrierens wurde jedoch die Proteinstabilität des Zielproteins herabgesetzt und das Protein denaturierte in beiden Pufferlösungen. Somit war das *protein of intererst* nicht im Puffer-Gemisch aus SEC-Puffer und TR-Puffer löslich, welcher im Kristallisationsscreen vorlag. Dies könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass im Screening keine Kristallbildung beobachtet wurde, jedoch lag beim Screen ein weitaus geringerer Anteil mit circa 4% des TR-Puffers vor.

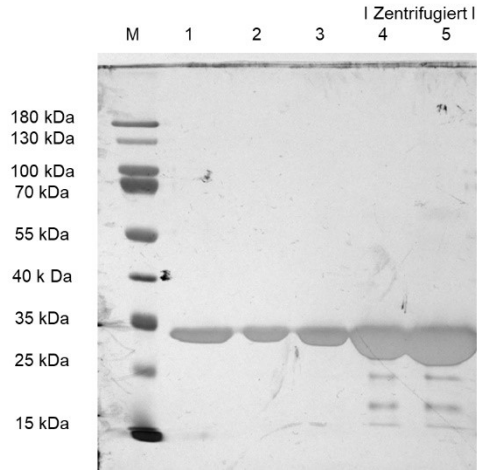


Abbildung 25: Darstellung des Puffertest der HisPPARβ/δ-LBD im TR-Puffer und im 50:50-Gemisch aus SEC-Puffer und TR-Puffer, 15%-iges Gel mit Silberfärbung. 1: vor Dialyse, 2: TR-Puffer nach Dialyse, 3: Puffergemisch (SEC-Puffer:TR-Puffer, 50:50) nach Dialyse, 4: Überstand nach Zentrifuge des TR-Puffers, 5: Überstand nach Zentrifuge des Puffergemisches (SEC-Puffer:TR-Puffer, 50:50). M = Proteinstandard.

Daraufhin wurde die Löslichkeit des CoRepressors SMRT-Peptid in verschiedenen Lösungen getestet, in welcher ebenso die zu untersuchende HisPPARβ/δ-LBD stabil sein musste. Wichtig war hierbei auch, dass das *protein of interest* in diesem Puffer in der gewünschten Konzentration vorliegen konnte. Zum einen wurden die bereits eingesetzten Puffer der PPARβ/δ-Aufreinigung untersucht, da das Zielprotein bekanntlich in diesen stabil war, das Aufkonzentrieren des Proteins müsste dann im Anschluss geprüft werden. Zum anderen wurde die Löslichkeit des CoRepressors in unterschiedlichen Variationen des TR-Puffers des *in vitro* Assays geprüft, welcher bereits im ersten Kristallisationsscreen für das vorherige Lösen des CoRepressor-Peptids verwendet

wurde. Die SMRT-ID2 und die GST-getaggte PPARβ/δ-LBD des FRET-Assays waren zwar in dem TR-Puffer stabil, doch die exprimierte His-getaggte PPARβ/δ-LBD war in diesem Puffer instabil und konnte nicht auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden, sodass die Salzkonzentration, das Puffersystem sowie der pH-Wert variiert wurden. Abweichend zum Assay-Puffer, wurde der Puffer ohne Triton X-100 (0,01% (v/v)) und BSA (1 $\mu g\,mL^{-1}$) hergestellt, da die Konzentration für eine Solubilisierung durch Triton zu gering war und das BSA zum Aufheben unspezifischer Bindungen im FRET-Assay diente und bei der Proteinkristallisation stören würde. Zunächst wurde 1 mg SMRT-Peptid in verschiedenen Puffern gelöst, eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration vor und nach Entfernen des gegebenenfalls gebildeten Niederschlags bestimmt. Wie zu erwarten, entstand im SEC-Puffer keine homogene Lösung mit dem SMRT-Peptid sondern eine sehr trübe Lösung sowie geringe Proteinkonzentration im Überstand (Tabelle 3). Im Ni-Bindepuffer der PPARβ/δ-Aufreinigung wurde ebenfalls eine Trübung der Lösung festgestellt und war damit für die Kristallisation nicht verwendbar. Bei der Probe des SMRT-Peptids im CIEX-Bindepuffer wurde eine klare Lösung ohne Niederschlagbildung beobachtet, die Proteinkonzentration war auch nach der Zentrifugation unverändert, doch die Lösung war sehr zähflüssig und damit für den Pipettierroboter ungeeignet. Der CoRepressor war sowohl in Wasser, als auch im TR-Puffer als auch in dessen Abwandlungen bezüglich pH-Wert und Salzgehalt löslich (TR2-4), doch eine Änderung des Puffersystems auf 20 mM HEPES im Gegensatz zu Tris zeigte eine enorme Verschlechterung der Löslichkeit des SMRT-Peptids (NiB, Ni2). Eine Ausnahme bildete die Kombination aus HEPES und Herabsetzen des pH-Wertes auf 7,5 (Ni3), bei der eine Trübung der Lösung festgestellt wurde, doch die Proteinkonzentration im Vergleich zur vollständig gelösten Lösung um 50% geringer war. Somit konnte für das Lösen des CoRepressors nur ein Tris-Puffer verwendet werden. Für die Proteinkristallisation wurde der TR3-Puffer gewählt, weil die Löslichkeit des SMRT-Peptids in diesem am höchsten war und außerdem der pH-Wert identisch zum pH der Proteinlösung PPARβ/δ (SEC-Puffer) war.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der getesteten Puffer für die Löslichkeitsuntersuchung des CoRepressors SMRT-Peptid (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) zur Verwendung in der Proteinkristallisation mit der exprimierten HisPPARβ/δ-LBD. Geprüft wurden die Puffer der Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD, der TR-Puffer des *in vitro* FRET-Assays und deren veränderte Zusammensetzung. Farbcode: blau: Modifikation; grün: löslich; gelb: weniger löslich; rot: unlöslich, ungeeignet.

		***c* (SMRT) [mg mL^{-1}]**		
Puffer	**Beobachtung**	**Suspension**	**Überstand**	**Puffer-Zusammensetzung**
TR2	klar	18,46	16,16	20 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,9
TR3	klar	22,86	21,35	20 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,5
TR4	klar	21,32	18,75	20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7,9
Ni2	ungelöst	2,46	3,78	20 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,9
Ni3	trüb	12,67	11,78	20 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,5
NiB	trüb	8,97	1,84	20 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7,5
SEC	ungelöst	3,53	2,57	20 mM HEPES, 500 mM NH_4OAc, 5 mM DTT, pH 7,5
CIEX-B	klar, zähflüssig	20,89	23,34	20 mM HEPES, 5 mM DTT, (ohne Salz) pH 7,3
H_2O	klar	14,23	16,82	-

Alle Puffer wurden steril filtriert und das DTT wurde frisch hinzugefügt.

Damit das Ausfallen des CoRepressors SMRT-Peptid verhindert würde, sollte dieses SMRT-Peptid im weiteren Ansatz direkt beim Vorbereiten der Kristallisationsplatten vom Pipettierrobotor hinzugegeben werden. Vollständig aufgereinigte Proteinlösungen wurden vereinigt und deren Puffer durch Dialysieren auf den SEC-Puffer ausgetauscht, da das Protein in diesem Puffer auf die gewünschten Konzentrationen von 10 mg mL^{-1} und 8 mg mL^{-1} konzentriert werden konnte. Insgesamt wurden 64 mg gänzlich reines Protein für die Vorbereitung zum Screen verwendet, von dem nach dem Aufkonzentrieren

und Entfernen des entstandenen Niederschlags noch 20,9 mg sauberes Protein eingesetzt werden konnten (Abbildung 26, Spur 1-4). Die zu testenden inversen Agonisten wurden in doppelter Menge zur HisPPARβ/δ-LBD gegeben (10 mg mL^{-1}: 1% (v/v) DMSO; 8 mg mL^{-1}: 0,5% (v/v) DMSO), wobei die Lösungen eine farbliche Veränderung nach Zugabe der Liganden zeigte. Bei der Zugabe von **PT-S264** zur HisPPARβ/δ-LBD wurde die Lösung leicht gelblich und ein Niederschlag wurde gebildet, mit dem Liganden **ST247** entstand eine weißlich gelbe Suspension mit Niederschlag. Ausschließlich bei der Proteinlösung mit dem inversen Agonisten **DG172** wurde eine homogene gelbe Lösung beobachtet. Trotz des entstandenen Niederschlags waren alle eingesetzten Protein-Liganden-Lösungen sauber (Abbildung 26, Spur 5-8), sodass der gebildete Niederschlag kein denaturiertes Protein sondern ungelöste, überschüssige Substanz war und daher für den Screen verwendet werden konnte.

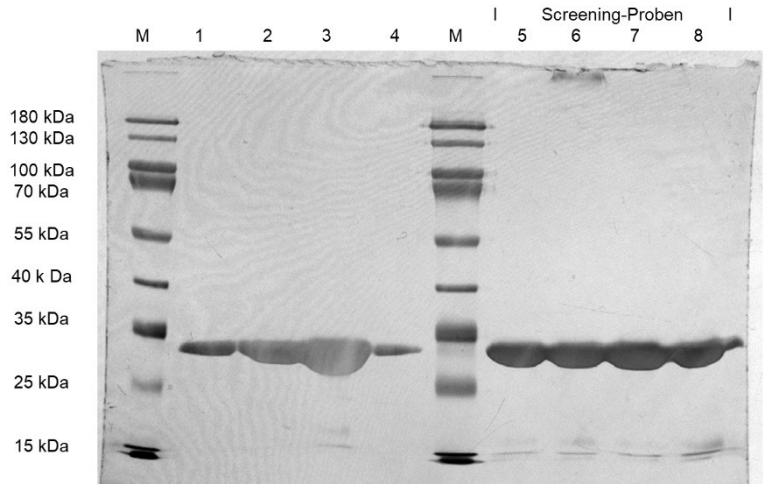


Abbildung 26: Proteinlösungen des Kristallisationsscreens der HisPPARβ/δ-LBD mit den inversen Agonisten **PT-S264**, **ST247** und **DG172** in den zwei Proteinkonzentrationen 10 mg mL^{-1} und 8 mg mL^{-1}, 15%iges Gel mit Silberfärbung. 1: nach der Dialyse vorm Aufkonzentrieren, 2: nach Inkubation über Nacht, 3: nach dem Aufkonzentrieren vor dem Zentrifugieren, 4: nach dem Zentrifugieren, Protein für den Screen, 5: **PT-S264** in 8 mg mL^{-1}, 6: **PT-S264** in 10 mg mL^{-1}, 7: **DG172** in 10 mg mL^{-1}, 8: **DG172** in 8 mg mL^{-1}. M = Proteinstandard.

Das Protein-Liganden-Gemisch (doppelte Menge des Liganden zum Protein) wurde in den jeweiligen Konzentrationen mit **PT-S264**, **ST247** und **DG172** unter ständigem Invertieren über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der entstandene Niederschlag entfernt und der Kristallisationsscreen am MarXtal-Kristallisationslabor der

Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Über den Pipettierrobotor wurde 100 nL SMRT-Peptid-Lösung (gelöst in TR3-Puffer: 20 mM Tris, 100 mM KCl, 5 mM DTT, pH 7,5) zu 200 nL Protein-Liganden-Lösung gegeben, sodass im Tropfen insgesamt die doppelte Menge des CoRepressors SMRT-Peptid zum Protein HisPPARβ/δ-LBD vorlag. Die Reservoir-Lösung wurde zur HisPPARβ/δ-LBD/SMRT-Peptid/Ligand-Lösung im finalen Verhältnis von 50:50 hinzugefügt und bei 18 °C über Dampfdiffusion der *hanging drop*-Methode inkubiert. Für die drei unterschiedlichen Verbindungen wurden jeweils neun Kristallisationsplatten mit je 96 unterschiedlichen Bedingungen in den beiden Proteinkonzentrationen getestet und zur Untersuchung mikroskopiert. Nach einem Monat wurden noch keine Proteinkristalle oder Mikrokristalle beobachtet, doch die Untersuchung der Kristallplatten wird fortgeführt, da auch bei der Proteinkristallisation der PPARα-LBD mit dem Antagonisten **GW6471** die Kristalle erst nach längerer Zeit entstanden [75].

3.2 Funktionelle Untersuchung von Transkriptionsmodulatoren

Die Regulation der Transkription zeigt meist keinen unmittelbaren Effekt und stellt damit keine schnelle Antwort sondern einen langfristigen Eingriff auf der Proteinebene dar. Das System der Transkriptionskontrolle ist meist sehr komplex und besteht aus vielen verschiedenen Komponenten, die wiederum ebenfalls Feedback-Regulierungen unterliegen sowie selbst weitere Proteine oder Transkripte regulieren. Daher ist ein vollständig aufgeklärter Wirkmechanismus entwickelter Modulatoren wichtig, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Im Folgenden werden Ansätze zur Target-Identifizierung bei zwei unterschiedlichen Transkriptionsmodulatoren beschrieben. Zum einen wurde der bereits beobachtete Nebeneffekt einer Strukturklasse der inversen Agonisten des Kernrezeptors PPARβ/δ analysiert (Kapitel 3.2.1), zum anderen wurde Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (*structure activity relationship*, SAR) eines Modulators des Hedgehog-Signalweges begleitet (Kapitel 3.2.2).

3.2.1 Studien zur Target-Identifizierung der PPARβ/δ-unabhängigen DG172-beeinflussten Differenzierung myeloider muriner Knochenmarkzellen

In der Gruppe wurden neue potente inverse PPARβ/δ-Agonisten entwickelt, die Thiophen-Strukturklasse und die Stilben-Strukturklasse. Untersuchungen der Effekte auf die Zelldifferenzierung myeloider muriner Knochenmarkzellen dieser Subtyp-selektiven inversen Agonisten zeigten ausschließlich bei der Stilben-Serie (**DG172**) eine Verschiebung zugunsten dendritischer Zellen (Kapitel 1.6.1) [81]. Dieser Effekt war zudem unabhängig der PPARβ/δ-Expressionsregulierung, da die Förderung der Differenzierung in Richtung dendritischer Zellen auch in Zellen einer PPAR-deletierten Mauslinie beobachtet werden konnte. Die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) verdeutlichte die strukturellen Voraussetzungen zur PPARβ/δ-Aktivität sowie zur Differenzierungsaktivität, weil die Modifizierung des Brom-Substituenten in *ortho*-Position (**DG172**) zu Chlor in *para*-Position (**DG228**) einen Verlust der PPARβ/δ-Aktivität unter Erhalt des Differenzierungseffektes zur Folge hatte. Da dieser Effekt nicht durch die Interaktion des Liganden an PPARβ/δ beziehungsweise durch die PPARβ/δ-vermittelte Transkriptionsregulation erfolgt, ist folglich ein anderes und bisher unbekanntes Protein oder Proteinkomplex für diese Wirkung verantwortlich.

Damit die PPARβ/δ-unabhängige Förderung der Differenzierung zu dendritischen Zellen besser verstanden und aufgeklärt werden kann, wurde von Lukas Dempwolff ein Biotin-verknüpftes DG228-Derivat ohne PPARβ/δ-Aktivität synthetisiert. Mit Hilfe des biotinylierten Liganden **LD253** sollte ein *pull-down* Experiment entwickelt werden, um den gebundenen Target:Ligand$_{(Biotin)}$-Komplex isolieren und identifizieren zu können. Für diesen Ansatz der Target-Identifizierung wurde zunächst die Aktivität der neuen biotinylierten Substanz **LD253** *in vitro* und zellulär getestet. Den Erwartungen entsprechend wurde im *in vitro* Verdrängungs-FRET-Assay (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) keine Aktivität von **LD253** beobachtet (Appendix, Diagramm 7), da an dem Molekülteil, der für die PPARβ/δ-Aktivität essentiell ist, der Biotin-Linker vorliegt. Daraufhin wurde die Wirkung des **LD253** in murinen Knochenmarkzellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen und zur Positivkontrolle mit **DG172** ermittelt. Aufgrund der Biotinylierung wurde das Molekül sterisch anspruchsvoller, sodass die biologische Aktivität verglichen zu **DG172** vermindert sein könnte. Zur Unterscheidung der myeloiden Zelltypen wurde eine Oberflächenmarkierung mit den Antikörpern gegen CD11c, MHC II für die Bestimmung dendritischer Zellen sowie gegen Ly-6B, Ly-6G zur Darstellung neutrophiler Granulozyten durchgeführt und durch FACS-Analyse (*fluorescence-activated cell sorting/scanning*) quantifiziert. Die Analyse der vorliegenden Zelltypen zeigte eine Verschiebung der Differenzierung hinsichtlich dendritischer Zellen durch Behandlung der Zellen mit **LD253**, jedoch war dieser Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt als bei der Referenz **DG172**. Die Auftragung des Zellvolumens (angegeben durch das Vorwärtsstreulicht FSC (forward scatter)) zur Granularität der Zelle (angegeben durch das Seitwärtsstreulich SSC (*side scatter*)) zeigte eine höhere Ähnlichkeit der **LD253**-behandelten Population bezüglich des vorliegenden Zelltyps und Zellmenge zur Negativkontrolle als zur Positivkontrolle mit **DG172** (Abbildung 27). In der unbehandelten Zellpopulation waren sowohl Granulozyten, die wegen ihres größeren Zellvolumens und der geringen Granularität das Licht im flachen Winkel verstärkt beugen (FSC) und deshalb entlang der Abszissenachse dargestellt sind, als auch Dendriten zu beobachten, die stärker das Seitwärtsstreulicht beugen (SSC) und daher entlang der Ordinatenachse dargestellt sind. Die Untersuchung dieser Population der Dendriten auf die dendritischen Oberflächenmarker gegen MHC II und CD11c beziehungsweise die Granulozyten-Population mit deren Markern bestätigte die Zuordnung (Appendix, Diagramm 8). Deutlich zu erkennen war die Verschiebung der Differenzierung hinsichtlich dendritischer Zellen nach der Inkubation mit **DG172**, da im

Vergleich zur unbehandelten Probe keine Zellpopulation neutrophiler Granulozyten beobachtet wurde, wohingegen in Anwesenheit von **LD253** Dendriten und Granulozyten vorlagen.

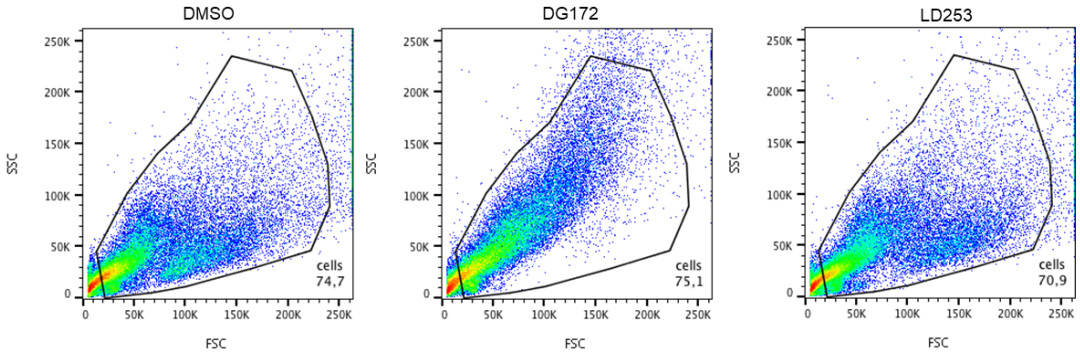


Abbildung 27: FACS-Analyse muriner Knochenmarkzellen nach Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in Anwesenheit von **DG172** (500 nM) und **LD253** (1 µM) zur Prüfung des differenzierenden Effektes. Die Bestimmung erfolgte über die Oberflächenfärbung mit Antikörpern gegen CD11c und MHC II, sowie gegen Ly-6G und Ly-6B; die FACS-Messung wurde zusammen mit Dr. Lieber durchgeführt.

Anhand der Auftragung der dendritischen Marker MHC II zu CD11c wurde bei der **DG172**-behandelten Zellpopulation eine Verschiebung in Richtung dendritischer Differenzierung beobachtet, der bei der DMSO-Kontrolle nicht vorlag (Abbildung 28). Die Differenzierung myeloider Knochenmarkzellen schien eingeleitet worden zu sein, allerdings war diese noch nicht vollständig abgeschlossen. In den vorherigen Analysen konnten beim Betrachten der dendritischen Marker MHC II zu CD11c drei Populationen P1 ($CD11c^{lo}$/MHC II^{-}), P2 ($CD11c^{hi}$/MHC II^{lo}) und P3 ($CD11c^{hi}$/MHC II^{hi}) ermittelt werden (Abbildung 11), diese konnten allerdings bei der Reproduktion nicht klar voneinander getrennt werden. Daher müsste die Inkubationszeit erneut ermittelt werden. Dennoch konnten der Effekt und die Potenz der Substanzen anhand dieser ersten Daten erkannt werden. Die Potenz von **LD253** in Bezug auf diesen Differenzierungseffekt war sehr schwach und zeigte sich anhand der Populationsgröße der ausdifferenzierten Dendriten von 21,3%, die mit der Populationsgröße der Negativkontrolle von 21,9% übereinstimmte. Bei den Knochenmarkzellen in Gegenwart von **DG172** betrug die Populationsgröße ausdifferenzierter dendritischer Zellen 17,6%. Die Differenzierung war noch nicht vollständig abgeschlossen, aber die Verschiebung der Differenzierung in Richtung Dendriten war klar zu erkennen, denn die Populationsgröße der Vorläuferstufe

zu dendritischen Zellen war noch wesentlich größer als die der ausdifferenzierten Dendriten. In Gegenwart von **LD253** war der Populationsanteil der Vorstufe zu Dendriten mit 14,1% wesentlich geringer als die der Referenz **DG172** mit 27,7%, doch die Differenzierung wurde bereits schwach zu den dendritischen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe mit einem Anteil von 8,3% der Vorstufe zu Dendriten verschoben. Gleichzeitig nahm die Population undifferenzierter Zellen von 61,2% bei der Negativkontrolle, zu 58,0% bei **LD253** bis hin zu 49,7% bei **DG172** ab. Diese Population undifferenzierter Zellen ist der deutlichste Hinweis darauf, dass die Differenzierung eingeleitet wurde und berechtigt zu der Annahme, dass die Analyse zu früh erfolgte und weiterer Optimierung bedarf. Dennoch wurde anhand dieser ersten Versuche deutlich, dass der Differenzierungs-fördernde Effekt der biotinylierten Verbindung **LD253** im Vergleich zur Referenz **DG172** sehr schwach war.

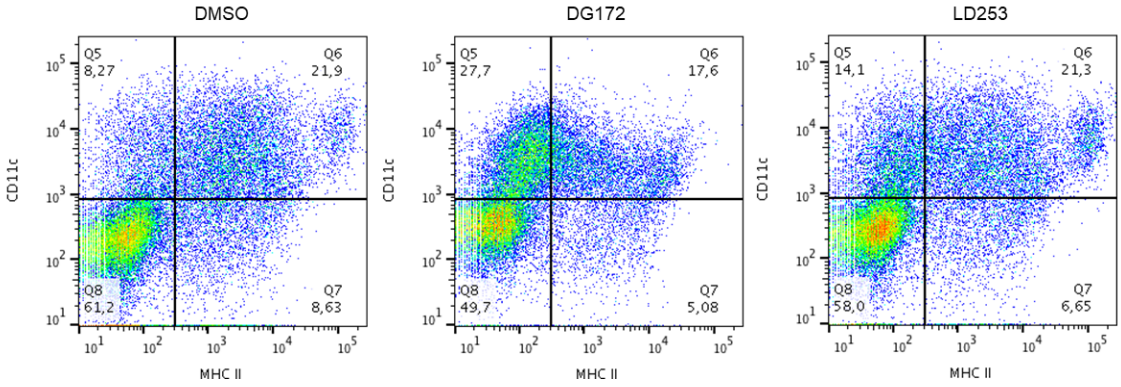


Abbildung 28: Untersuchung der Differenzierung muriner Knochenmarkzellen nach Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in Anwesenheit von **DG172** (500 nM) und **LD253** (1 µM). Auftragung der Oberflächenmarker anti-MHC II zu anti-CD11c; die FACS-Analyse wurde zusammen mit Dr. Lieber durchgeführt.

Die Untersuchung der granulozytären Oberflächenmarker anti-Ly-6B und anti-Ly-6G ergab, dass unter Einfluss der Substanzen eine Abnahme der neutrophilen Granulozyten erfolgt. Die **DG172**-behandelten Zellen zeigten mit 29,5% eine kleinere Granulozyten-Population als die unbehandelte Kontrollpopulation 39,9% (Abbildung 29). Allerdings konnte eine Veränderung der Differenzierung der myeloiden Knochenmarkzellen in Anwesenheit von **LD253** mit 39,3% im Hinblick auf den Granulozyten-Anteil nicht beobachtet werden, da die Populationsgröße identisch zur Negativkontrolle war.

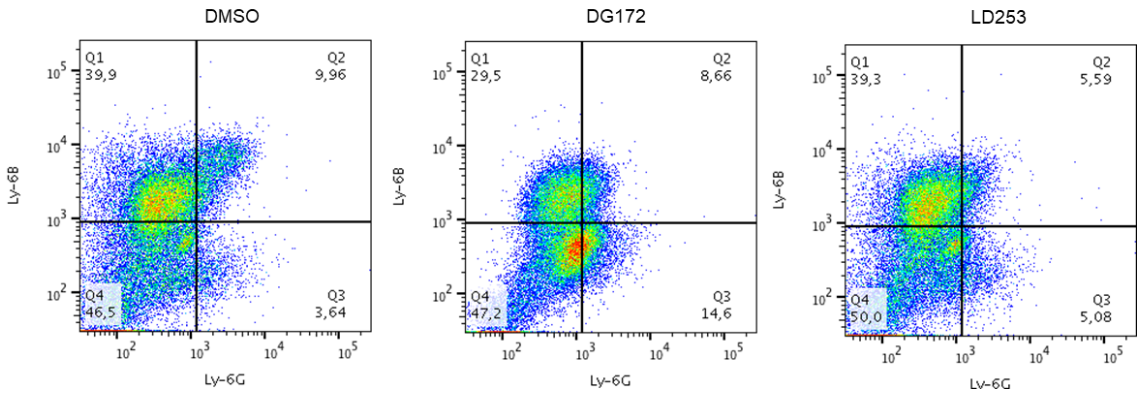


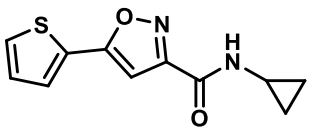
Abbildung 29: Ermittlung des Differenzierungseffektes auf murine Knochenmarkzellen nach Zugabe des Wachstumsfaktors GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in Anwesenheit von **DG172** (500 nM) und **LD253** (1 µM). Auftragung der Oberflächenmarker anti-Ly-6G zu anti-Ly-6B; die FACS-Analyse wurde mit Dr. Lieber durchgeführt.

Der Effekt der Differenzierungsverschiebung durch potente Substanzen konnte bei dem reproduzierten Experiment erneut dargestellt werden, aber die Ausprägung war noch sehr schwach und die zu erwartenden drei Populationen waren nicht deutlich erkennbar. Ein Grund hierfür ist die nicht vollständig abgeschlossene Differenzierung, sodass noch eine große Population undifferenzierter Zellen vorlag. Daher sollte zunächst die optimalen Inkubationszeiten sowie Konzentrationen ermittelt werden, um eine eindeutige Abgrenzung der Zellpopulationen beziehungsweise Verschiebung der Differenzierung erkennen zu können. Außerdem führte die Biotinylierung des DG228-Derivats zu einer deutlichen Abnahme der Aktivität, weswegen die Parameter für eine optimale Darstellung des Effektes bestimmt werden müssten. Der Einfluss des Biotin-Substituenten auf die Affinität der Substanz zum unbekannten Target könnte möglicherweise doch größer als erwartet gewesen sein, wodurch eine Bindung zum Protein eventuell verhindert würde oder nur noch schlecht möglich wäre. Somit muss untersucht werden, ob der gewünschte Effekt nach abgeschlossener Differenzierung beobachtet und deutlich zur unbehandelten Kontrollprobe unterschieden werden kann oder ob der sterisch anspruchsvolle Substituent zur Inaktivität führt. Ein möglicher Grund für die schwache Aktivität des **LD253** wäre eine Beeinträchtigung essentieller Interaktionen des Targets beispielsweise zum Liganden oder weiteren Cofaktoren oder andernfalls eine Blockierung möglicher relevanter Konformations-änderungen durch den eingefügten Biotin-Substituenten. Zur Verbesserung der Potenz der biotinylierten Verbindung **LD253** könnten daher verschiedene Linkerlängen untersucht werden.

Erst wenn die Differenzierung vollständig stattfindet und das Verschieben des Prozesses zur Dendriten-Bildung deutlich wird, könnte mit Hilfe des biotinylierten DG228-Derivates das noch unbekannte Target im anschließenden *pull-down* Ansatz isoliert werden. Damit das Target oder auch zusätzliche essentielle Cofaktoren eines Proteinkomplexes erfolgreich identifiziert werden können, ist eine klare Unterscheidung zur Negativkontrolle essentiell, die bisher noch nicht vorliegt. Durch die Target-Identifizierung könnte die Wirkweise der Liganden zur Förderung der dendritischen Differenzierung aufgeklärt und darauf basierend weitere Modulatoren entwickelt werden, um einen neuen Therapie-Ansatz bei defekten immunregulatorischen Erkrankungen zu entwickeln.

3.2.2 Aufstellung einer Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) für die Entwicklung neuer potenter Modulatoren des Hedgehog-Signalweges

Ein Ansatz zur Entwicklung eines Modulators des Hedgehog-Signalweges ist eine Förderung der Neuroblastendifferenzierung beim Neuroblastom, da diese in der Vorgänger-Stufe arretieren und damit die Differenzierung in die Neuronen des sympathischen Nervensystems nicht abgeschlossen wird. Zur Zeit sind keine Agonisten des Hedgehog-Signalweges bekannt, die in Abwesenheit der Zilien einen Effekt auf das Neuroblastom ausüben. Daher wurde ein primärer zellbasierter Screen von der Gruppe um PD Dr. Matthias Lauth durchgeführt. In diesem Screen wurde das Isoxazol **Ox0** (Abbildung 30) als Hit identifiziert, welches sich ebenfalls in einem sekundären Assay bestätigen ließ.



Ox0

Abbildung 30: Struktur des potenten Hedgehog-Agonisten **Ox0** aus dem primären zellbasierten Screen.

Im ersten Schritt zu Etablierung der SAR wurden zunächst die kommerziell verfügbaren Substanzen **OxA**, **OxB**, **OxC** und **OxD** untersucht (Abbildung 31). Die Verbindungen waren an zwei Stellen im Vergleich zu **Ox0** verändert. Der Thiophenyl-Rest wurde zum einen durch den bioisoteren Phenyl-Rest (**OxB**, **OxD**) zum anderen durch einen deutlich

kleineren Methyl-Rest (**OxC**) ersetzt. Zusätzlich wurde das Cyclopropyl-Amid gegen einen Ethylester (**OxA**, **OxB**, **OxC**) beziehungsweise die freie Carbonsäure **OxD** getauscht. Alle Verbindungen waren inaktiv, somit konnte gezeigt werden, dass die biologische Aktivität des **Ox0** im zellulären Assay spezifisch ist.

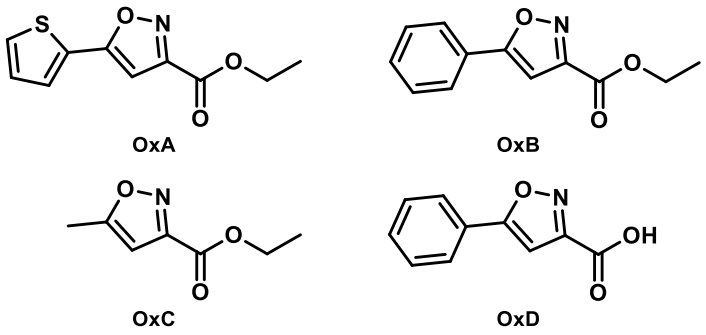
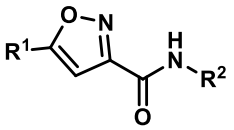
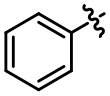
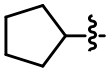
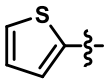
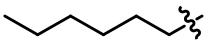
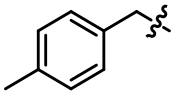
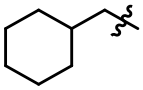
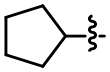
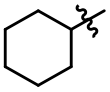


Abbildung 31: Kommerziell verfügbare, getestete Verbindungen zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR).

Zur Verbesserung der Potenz wurden verschiedene Derivate ausgehend von **Ox0** dargestellt und erneut an denselben Stellen R^1 und R^2 des Moleküls verändert (Tabelle 4, Tabelle 5), um den chemischen Raum der Bindetasche hinsichtlich des räumlichen Anspruchs sowie der Polarität zu analysieren. Die Verbindungen wurden von Lukas Dempwolff (AG Diederich) synthetisiert und in der Gruppe von PD Dr. Matthias Lauth im zellbasierten Assay (Kapitel 7.7.5) getestet. Anhand einer systematischen Modifizierung der Substituenten des Isoxazols konnte die Struktur-Wirkungsbeziehung (*structure activity relationship*, SAR) der Substanzklasse erarbeitet und dadurch essentielle, strukturelle Eigenschaften des Liganden identifiziert werden, welche für die Wechselwirkung zum noch unbekannten Target relevant sind. Die Verbindungen wurden im Hinblick auf deren Potenz als inaktiv (rot), im Vergleich zur Referenz **Ox0** schwach aktiv (orange), aktiv (gelb) und ähnlich stark aktiv wie die Positivkontrolle **Ox0** (grün) klassifiziert.

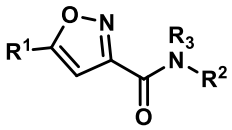
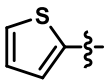
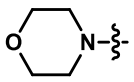
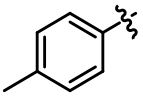
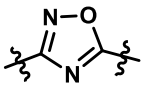
Tabelle 4: Strukturelle Gegenüberstellung der Aktivitätsbestimmung im zellulären Assay nach 48 h Inkubation in Pa-Tu-8988T-Zellen. Farblegende ist bezogen auf die prozentuale Aktivität im Vergleich zu **Ox0**, grün: hohe Aktivität, gelb: aktiv, orange: schwache Aktivität, rot: inaktiv.

	R^1	R^2
Ox01		
Ox02		
Ox10	s.o.	
Ox03		
Ox19	s.o.	PEG_3-N_3
Ox04	s.o.	
Ox17	s.o.	
Ox11	s.o.	
Ox18	s.o.	
Ox15	s.o.	
Ox16	s.o.	

Synthese: Lukas Dempwolff, AG Diederich; Assay-Durchführung: Dr. Pavan Kumar Dhanyamraju und PD Dr. Matthias Lauth, AG Lauth.

Neben dem Einfluss der Substituenten an den R^1- und R^2- Positionen wurde die Relevanz des Amids (**Ox14**) sowie des Isoxazols als Grundgerüst (**Ox21**) untersucht (Tabelle 5). Beide Verbindungen waren inaktiv, sodass folglich die strukturellen Voraussetzungen des Amids beziehungsweise des Isoxazols bestätigt werden konnten.

Tabelle 5: Strukturelle Gegenüberstellung der Aktivitätsbestimmung im zellulären Assay nach 48 h Inkubation in Pa-Tu-8988T-Zellen. Farblegende ist bezogen auf die prozentuale Aktivität im Vergleich zu **Ox0**, grün: hohe Aktivität, orange: mittlere Aktivität, rot: inaktiv.

	**R¹**	**R²**	**R³**
Ox14			-
Ox21			H; Kern: 

Synthese: Lukas Dempwolff, AG Diederich; Assay-Durchführung: Dr. Pavan Kumar Dhanyamraju und PD Dr. Matthias Lauth, AG Lauth.

In den vorherigen Untersuchungen von Dr. Pavan Kumar Dhanyamraju und PD Dr. Matthias Lauth (AG Lauth) wurden die fünf aktiven Liganden **Ox02**, **Ox03**, **Ox10**, **Ox11** und **Ox19** identifiziert. Die ermittelte Aktivität der neuen getesteten Substanzen wurde auf die Positivkontrolle **Ox0** bezogen und als prozentuale Aktivität dieser neuen Liganden zur Kontrolle dargestellt (Diagramm 4). Eine erhebliche Verbesserung um 36% zum ersten Screening-Hit **Ox0** zeigte sich bei **Ox02**, welches den bioisosteren Phenyl-Rest anstelle des Tiophenyls enthielt (Tabelle 4). Durch den Vergleich der zyklischen Amine cPropyl bei **Ox02** zu cPentyl bei **Ox10** an der R^2-Position wurde eine Abnahme von 40% der Aktivität in Relation zu **Ox0** beobachtet. Ähnlich zu diesen Verbindungen war **Ox11** aufgebaut, welches sowohl den Thiophenyl-Rest an R^1 als auch das cPentyl an R^2 enthielt und eine gute relative Aktivität ähnlich wie **Ox10** zeigte. Im Gegensatz dazu war das cHexyl-substituierte **Ox18**, das Ethylcyclohexan **Ox17** sowie das Methylbenzyl-Derivat **Ox04** inaktiv, sodass folglich der chemische Raum an dieser Position limitiert ist. Aus den Ergebnissen und dem Vergleich der getesteten Verbindungen konnte gefolgert werden, dass an der R^1- und der R^2-Position die Substituenten zu geringfügig sterisch anspruchsvollen Resten (Thiophenyl zu Phenyl; cPropyl zu cPentyl) ohne starke Aktivitätsminderung ausgetauscht werden konnten, jedoch größere Substituenten zu absolutem Aktivitätsverlust führten.

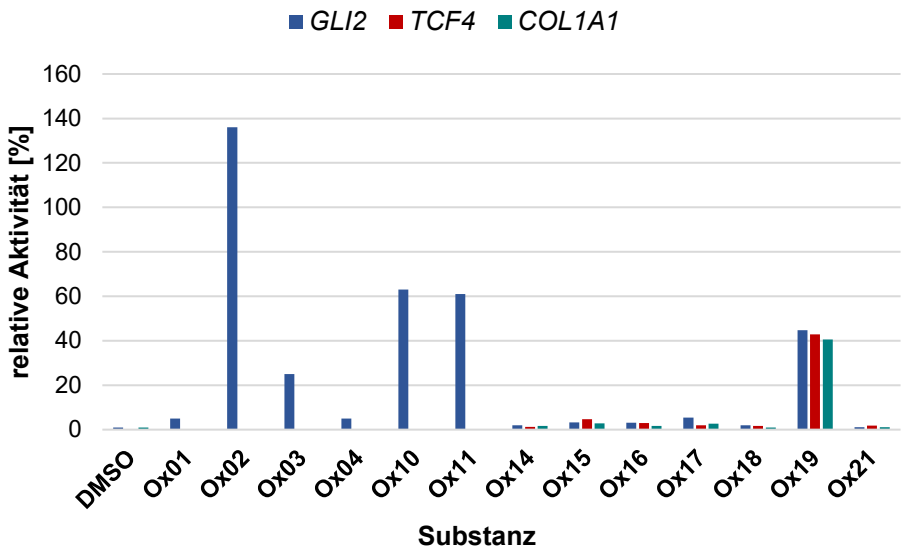
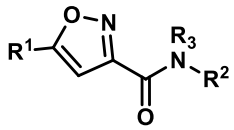
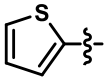
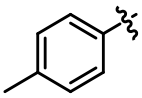
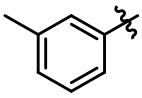
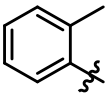
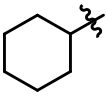
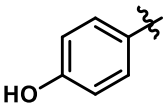
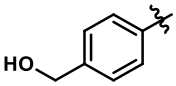
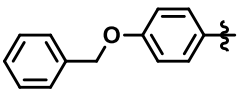
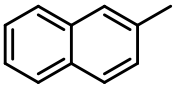


Diagramm 4: Vorherige Ergebnisse der getesteten Verbindungen der Ox-Serie im zellbasierten Assay zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR). Relative Aktivität im Vergleich zu **Ox0** (auf 100% gesetzt). Überprüfung der mRNA-Expression von *GLI2* (nur bis Ox11), *TCF4* und *COL1A1* mittels qRT-PCR nach 48 h Inkubation mit einer Konzentration *c*(Substanz) = 20 µM in der Pankreas-Zelllinie Pa-Tu-8988T. Angegeben ist die Aktivierung der Genexpression (*fold change*) gegenüber der Negativkontrolle DMSO, die Normalisierung der C_T-Werte erfolgte über die endogene Kontrolle P_0, gemessen wurde im technischen Duplikat. Die vorherigen Untersuchungen wurden von Dr. Pavan Kumar Dhanyamraju und PD Dr. Matthias Lauth durchgeführt.

Basierend aus den Erkenntnissen der ersten SAR-Studie wurden weitere Verbindungen von Lukas Dempwolff entwickelt (Tabelle 6), bei denen einerseits die R^1-Position variiert wurde, um die optimale Substituentengröße zu finden und die SAR-Studie zu erweitern. Eine weitere Strategie war das Einfügen eines Biotinlinkers für ein *pull-down* Experiment an der R^2-Position anlehnend an die Referenz **Ox0**. Da bisher das Target unbekannt ist, sollte mit Hilfe des Biotins am Liganden das Zielprotein über eine Strep-getaggte Matrix isoliert und anschließend identifiziert werden können. In den vorherigen Untersuchungen wurde beobachtet, dass **Ox03** mit einer *n*-Hexylkette in R^2-Position eine verbleibende Aktivität von 25% im Vergleich zur Positivkontrolle **Ox0** aufwies (Diagramm 4), deshalb wurde an der R^2-Position der Linker aus Polyethylenglykol PEG_3 eingefügt (**Ox19**). Der Linker enthielt außerdem ein Azid, welches für die anschließende Kupplungsreaktion mit dem Biotin notwendig war. Aufgrund eines angefügten PEG_x-Linkers wurde eine reduzierte relative Aktivität von **Ox19** (PEG_3) im Vergleich zu **Ox0** erwartet, wobei die verbleibende Aktivität von **Ox19** noch 40% betrug und daher diese R^2-Position für die Biotinlyierung der Ox-Serie geeignet war.

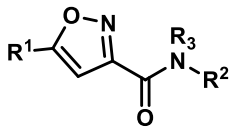
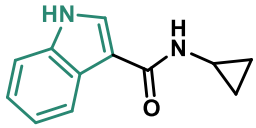
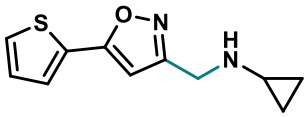
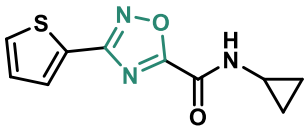
Tabelle 6: Untersuchte Liganden zur Verbesserung der Aktivität im zellulären Assay nach 48 h in Pa-Tu-8988T-Zellen. Farblegende ist bezogen auf die prozentuale Aktivität im Vergleich zu Ox0, grün: hohe Aktivität, gelb: aktiv, orange: schwache Aktivität, rot: inaktiv.

	**R1**	**R2**	**R3**
Ox22		H	
Ox27	s.o.	Methyl	s.o.
Ox23	s.o.	H	Ethyl-PEG$_3$NHBiotin
Ox33	s.o.	H	Propyl-PEG$_3$NHBiotin
Ox35	s.o.	H	Ethyl-PEG$_5$NHBiotin
Ox25		H	s.o.
Ox37		H	s.o.
Ox36		H	s.o.
Ox38		H	s.o.
Ox31		H	s.o.
Ox32		H	s.o.
Ox29 (ausgefallen)		H	s.o.
Ox26		H	s.o.

Synthese: Lukas Dempwolff, AG Diederich.

Zwei bereits getestete Substanzen wurden zum Reproduzieren des Assays erneut gemessen, die aktive Substanz **Ox19** sowie die inaktive Verbindung **Ox21**, und sind zur Vollständigkeit aufgeführt Die neuen Verbindungen wurden in zwei Konzentrationen 20 µM (Diagramm 5) und 5 µM (Appendix, Diagramm 9) über 48 h bei 37 °C in Pa-Tu-8988T-Zellen inkubiert, damit die Verbindungen hinsichtlich ihrer Potenz klassifiziert werden konnten. Zur Untersuchung ihrer relativen Aktivität im Vergleich zur Positivkontrolle **Ox0** wurde die mRNA-Expression von drei humanen Genen *GLI2*, *COL1A1* und *TCF4* quantifiziert. Die Änderung im Grundgerüst zum Indol (**Ox20**) (Tabelle 7) bewirkte eine starke Reduzierung der relativen Aktivität auf 20% des *GLI2*-Expressionslevels und eine vollständige Repression der beiden anderen Genexpressionen. Die Änderung des Kernmotivs Isoxazol zu 1,2,4-Oxadiazol (**Ox28**, **Ox21**) führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust, wodurch die enorme Bedeutung des Isoxazols als Kernmotiv zur Entwicklung neuartiger Transkriptionsmodulatoren erneut bestätigt werden konnte. Außerdem waren sowohl das sekundäre Amin des **Ox24** als auch die tertiären Amide **Ox27** und das Morpholin-Derivat **Ox14** inaktiv (Tabelle 5, Tabelle 6), woraus gefolgert wurde, dass das sekundäre Amid als Wasserstoffbrückenbindungs-Donator und -Akzeptor für die Proteininteraktion essentiell ist. Aus diesen Erkenntnissen wurde das Grundgerüst des **Ox0** mit Isoxazol und sekundärem Amid verifiziert und zur weiteren Steigerung der Potenz an den Positionen R^1 und R^2 variiert.

Tabelle 7: Untersuchte Liganden zur Verifizierung des Kernmotivs der untersuchten Strukturklasse. Die Aktivität wurde im zellulären Assay nach 48 h in Pa-Tu-8988T-Zellen untersucht. Farblegende ist bezogen auf die prozentuale Aktivität im Vergleich zu Ox0, grün: hohe Aktivität, gelb: aktiv, orange: schwache Aktivität, rot: inaktiv.

	
Ox20	
Ox24	
Ox28	

Synthese: Lukas Dempwolff, AG Diederich.

Für die weitere SAR-Studie wurde an der R^2-Position der cPropyl-Rest zu einem Ethyl (**Ox22**) unter Erhaltung der relativen Aktivität in allen drei untersuchten Genen gewechselt, wohingegen beim Isopropyl-Rest (**Ox15**) und *tert*-Butyl-Substituent (**Ox16**) keine Aktivität vorlag. Ein Grund könnte der Winkel oder die freie Drehbarkeit dieser Substituenten sein, denn die cPentyl-Derivate **Ox10** und **Ox11** zeigten eine hohe Aktivität mit 60%, wohingegen der cHexyl-Substituent **Ox18** zur Inaktivität führte. Interessant hierbei war, dass das *n*-Hexyl-Derivat mit einer relativen Aktivität von 25% noch schwach aktiv war. Eine Steigerung der Potenz durch Modifizierung an der R^1-Stelle konnte nur durch den Austausch zu einem Phenyl-Rest (**Ox02**) erzielt werden, das Einbringen einer Methylgruppe an diesem Aromaten führte jedoch unabhängig von *ortho*-, *meta*- oder *para*-Position (**Ox36**, **Ox37**, **Ox25**) zum Verlust der Aktivität. Außerdem wurde die Aktivität nicht durch Einfügen eines Wasserstoffbrückenbindungs-Akzeptors wie Phenol an R^1-Position (**Ox31**, **Ox32**) erhalten. Bei **Ox31** war eine schwache Erhöhung des *GLI2*-Expressionslevels zu beobachten, dieser lag jedoch bei der Wiederholung des Experimentes nicht mehr vor. Die erhöhte *TCF4*-Expression wurde ebenfalls als Ausreißer gewertet, da die beiden anderen mRNA-Level nicht erhöht waren. Für die Bindung zum Targetprotein war folglich die planare Anordnung durch ein

Thiophenyl beziehungsweise Phenyl an der R^1-Position essentiell, weil das **Ox38** mit einem cHexyl-Substituenten an dieser Position inaktiv war. Allerdings waren sterisch anspruchsvollere Liganden mit einem Phenoxybenzyl- (**Ox29**, ausgefallen) oder Naphthyl-Substituenten (**Ox26**) inaktiv, woraus geschlossen wurde, dass der chemische Raum der Bindetasche an dieser Stelle begrenzt sein könnte.

Neben der SAR-Studie wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, indem ein Biotin für ein *pull-down* Ansatz an der R^2-Position angehängt wurde. Wie bereits erwähnt, war die Substanz **Ox03** mit einem *n*-Hexyl-Substituent an dieser Stelle schwach aktiv, weshalb diese Position für das Anbringen des Biotinlinkers gewählt wurde. Die Verbindung **Ox19** mit dem PEG_3-Linker zeigte im ersten Versuch eine relative Aktivität von 40% und bei der Wiederholung eine höhere relative Aktivität mit 78% (*GLI2*), 68% (*TCF4*) sowie 32% (*COL1A1*). Da die Länge des Linkers Auswirkungen auf die Aktivität des Liganden haben könnte, wurde die Linkerlänge variiert und vollständig gekuppelt mit Biotin untersucht (**Ox23**, **Ox33** und **Ox35**) (Diagramm 5). Durch das zusätzliche Biotin wurde eine weitere Abnahme der Aktivität erwartet, weil der Ligand dadurch an der R^2-Position nochmals verlängert und sterisch anspruchsvoller wurde. Die Substanz **Ox23** mit PEG_3-NHBiotin wies eine schwache Aktivität von 13% (*GLI2*) in Relation zur Positivkontrolle **Ox0** auf, weswegen die Konzentration dieser Verbindung im *pull-down* Experiment erhöht werden muss, um genügend Zielprotein binden und isolieren zu können. Eine weitere Verlängerung des Liganden mit einem PEG_5-NHBiotin bei **Ox35** führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust bei 20 µM, somit zeigte die Substanz eine geringere Aktivität als **Ox0** bei 5 µM (Diagramm 9), daher wurde der PEG_3-Linker dem PEG_5 vorgezogen. Allerdings war bei **Ox33** eine Verbesserung der relativen Aktivität bei einer Konzentration von 20 µM zu beobachten, die mit 35% (*GLI2*) und 12% (*TCF4*) höher lag als bei **Ox23**. In der Konzentration von 5 µM war **Ox33** sehr aktiv, weswegen die Aktivität nochmal geprüft werden müsste. Da sowohl bei **Ox23** als auch bei **Ox33** die gewünschte Phänotypsveränderung beobachtet wurde, wurden beide Verbindungen als aktiv eingestuft. Beide Substanzen unterschieden sich durch einem Propyl- (**Ox33**) beziehungsweise Ethyl-Substituenten (**Ox23**), der am Anfang und am Ende des PEG_3-Linkers lokalisiert ist, wodurch der Linker gering verlängert und dadurch möglicherweise die Limitierung der Bindetasche umgangen wurde.

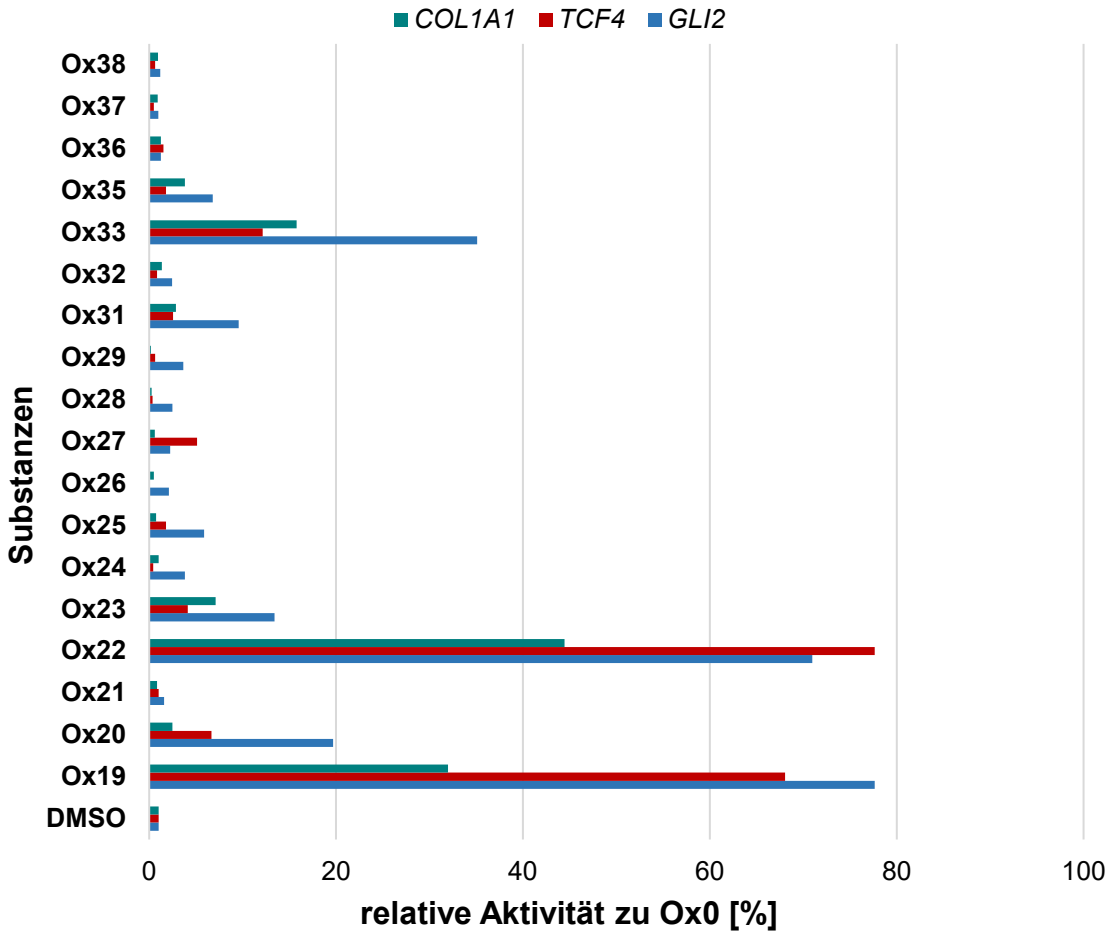


Diagramm 5: Aktivität der getesteten Verbindungen im zellbasierten Assay in Relation zu **Ox0** (auf 100% gesetzt) zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR). Überprüfung der mRNA-Expression von *GLI2*, *TCF4* und *COL1A1* mit Hilfe der qRT-PCR nach 48 h Inkubation mit einer Konzentration *c*(Substanz) = 20 µM in der Pankreas-Zelllinie Pa-Tu-8988T. Angegeben ist die Aktivierung der Genexpression (*fold change*) gegenüber der Negativkontrolle DMSO, welche prozentual auf die der **Ox0**-Aktivierung bezogen wurden. Als endogene Kontrolle zur Normalisierung der C_T-Werte diente P_0, gemessen wurde im technischen Duplikat.

Aus den Ergebnissen konnte die Struktur-Wirkungsbeziehung der Modulatoren zum unbekannten Target abgeleitet werden. Für eine biologische Aktivität war das Kernmotiv des Isoxazol sowie das sekundäre Amid essentiell. Eine Wirkung des Liganden konnte ermittelt werden, wenn an der R^1-Position ein Thiophenyl- oder Phenyl-Rest und an der R^2-Stelle ein cPropyl oder eine lange Alkylkette vorlag. Eine Steigerung der Aktivität im Vergleich zur Ausgangssubstanz **Ox0** konnte durch die Kombination aus Phenyl (R^1) und cPropyl (R^2) **Ox02** erzielt werden. Weiterhin wurden die Verbindungen **Ox23** und **Ox33** mit einem Biotin-PEG_3-Linker entwickelt, damit das Target im *pull-down* Ansatz über massenspektrometrische Analyse identifiziert werden kann.

4. Zusammenfassung

Für die Wirkstoffforschung ist eine vollständig aufgeklärte Wirkweise eines Targets inklusive bekanntem Bindungsmodus essentiell, damit dessen Modulatoren unter anderem besser hinsichtlich ihrer Potenz, der Selektivität und der Pharmakodynamik optimiert werden können. Deshalb ist für die Mechanismusaufklärung die Entwicklung selektiver und potenter Substanzen wichtig, wodurch die beteiligten Komponenten identifiziert und die Interaktionen dieser Proteine und Cofaktoren untersucht werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die Target-Identifizierung und Mechanismusaufklärung bei zwei verschiedenen Transkriptionsregulations-Prozessen untersucht. Für die Entwicklung neuer potenter Modulatoren des Hedgehog-Signalweges wurde die Struktur-Wirkungsbeziehung in einem zell-basierten Assay untersucht, um die identifizierte Strukturklasse durch Modifizierungen der Substituenten bezüglich ihrer Potenz zu verbessern. Anhand dieser strukturellen Erkenntnisse konnte eine biotinylierte Substanz entwickelt werden, mit der in einem *pull-down* Experiment das unbekannte Target isoliert und anschließend über massenspektrometrische Analyse identifiziert werden könnte. Zum anderen wurde die zuvor beobachtete Differenzierungsförderung bei myeloiden Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen durch Vertreter der Stilben-Strukturklasse (**DG172**) näher untersucht, die einem anderen Genexpressions-regulationsmechanismus zugrunde liegen. Bei vorherigen Untersuchungen dieser Substanzklasse auf die Differenzierung wurde ein PPARβ/δ-unabhäniger Effekt beobachtet, dessen Entstehung und Target vollkommen unbekannt sind. Daher wurde ein entwickeltes biotinyliertes PPARβ/δ-inaktives Derivat hinsichtlich der Potenz auf die Differenzierungsverschiebung zur Bildung der Dendriten geprüft, um anschließend das Targetprotein oder den Komplex isolieren und identifizieren zu können. Die Analyse erfolgte über die Oberflächenmarkierung mittels anti-MHC II und anti-CD11c sowie anti-Ly-6B und anti-Ly-6G Antikörpern zur Bestimmung des Anteils an dendritischen Zellen beziehungsweise neutrophilen Granulozyten über FACS-Analyse. Die biotinylierte Verbindung **LD253** war sehr schwach aktiv und die Zelldifferenzierung daher sehr wahrscheinlich noch nicht vollständig abgeschlossen. Deshalb bedarf das Experiment weiterer Optimierung, um einen klaren Effekt der Verschiebung der Zelldifferenzierung beobachten und daraufhin das Target erfolgreich identifizieren zu können.

Neben der Target-Identifizierung und der Begleitung des Liganden-basierten Wirkstoffdesigns wurde der Bindungsmodus zwischen Transkriptionsmodulatoren und dem Target PPARβ/δ untersucht. Zur Zeit existiert keine Proteinstruktur in Komplex mit inversen Agonisten, weshalb die Bedingungen für eine optimale Generierung von Proteinkristallen untersucht wurden. Das Herstellungsprotokoll für die PPARβ/δ-LBD konnte erfolgreich auf eine Ausbeute von 26,7 mg L^{-1}eingesetztem Medium beziehungsweise 1.482,0 µg g^{-1} Zellen nach der Affinitätschromatographie optimiert werden, sodass nun eine ausreichende Proteinmenge für ein Kristallisationsscreening zur Verfügung gestellt werden konnte. Dies entspricht einer fünffachen Verbesserung zu den bisherigen publizierten Protokollen beziehungsweise einer 110fachen Steigerung der Ausbeute im Vergleich zu Gruppe um *Sinz*. Bei der Kristallisation wurden zwei Ansätze verfolgt, einerseits die Co-Kristallisation mit dem für die Stabilisierung essentiellen CoRepressor und andererseits die direkte Zugabe des CoRepressors beim Screen. In beiden Ansätzen wurde bisher noch kein Proteinkristall der PPARβ/δ-LBD im Komplex mit den potenten inversen β/δ-Agonisten **ST247**, **PT-S264** oder **DG172** erhalten, aber die Platten werden weiterhin inkubiert und beobachtet.

Zusammenfassend wurden durch funktionelle Studien sowie Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung die Strategien zur Target-Identifizierung geprüft und validiert, um anschließend das Zielprotein und die Cofaktoren bestimmen zu können. Basierend auf diesen Studien wurden Substanzen entwickelt, mit denen das Target isoliert werden könnte. Weiterhin wurde versucht den Bindungsmodus zwischen dem Liganden-induzierten Transkriptionsfaktor PPARβ/δ-LBD und selektiven inversen Agonisten verschiedener Strukturklassen über Proteinkristallographie visualisieren zu können, um in einem Struktur-basierten Ligandendesign den Wirkstoff-Kandidaten weiter optimieren zu können. Dafür konnte ein stabiler Herstellungsprozess für die PPARβ/δ-LBD etabliert und bezüglich der Ausbeute optimiert werden, sodass nun in großen Mengen sehr sauberes Protein isoliert werden konnte. Diese gewonnenen Ergebnisse bieten einen tieferen Einblick in den vielschichtigen Prozess der Transkriptionsregulation, mit dem Ziel durch Einsatz potenter Modulatoren dieses gezielt zu regulieren und somit als Angriffspunkt und damit einen weiteren Bereich in der Wirkstoffforschung zu eröffnen.

5. Summary

Structural and functional characterisation of novel modulators of transcription

To facilitate the development of potent protein modulators in drug discovery, the exact mechanism of action must be elucidated. As biological processes in organisms are very complex and many different components are involved, the identification of these is of outmost importance for the efficient optimisation of the selectivity and potency of the respective modulators.

The transcriptional regulation of target gene expression is a very important mechanism to regulate in many biological functions and therefore the mode of action of several modulators was analysed in this thesis. The hedgehog signalling pathway is the essential process in the embryogenesis, but the exact mechanism and the cofactors being involved in this complex transcriptional regulation are still not completely understood. An identified and validated structural class of ligands of the hedgehog signalling pathway was analysed and the structure activity relationship of this class was further determined, to improve the potency of these novel modulators of the hedgehog signalling pathway. Based on the established structure activity relationship, new biotinylated substances bearing different linkers were developed in order to isolate the target in a pull down experiment, to enable target identification via mass spectrometry.

Besides the hedgehog signalling pathway, the mode of action of the nuclear receptor PPARβ/δ was analysed, which acts as a ligand-induced transcription factor. Previous work has shown, that one compound (**DG172**) of the identified structural class, bearing a stilbene moiety, promotes differentiation of myeloic cells from murine bone marrow cells, an effect that was not PPARβ/δ related. In the presence of the substance, a higher amount of mature and fully differentiated dendritic cells was observed, which was determined via FACS analysis utilizing the antibodies against MHC II, CD11c, Ly-6B and Ly-6G. The PPAR-inactive substance **LD253** with a biotinylated substituent at the PPAR-essential part of the molecule was tested and was shown to be less active than the substance **DG172**. As the differentiation into dendritic cells was not fully stimulated by **LD253**, the experiment must be further optimised to allow for the isolation of the target.

DG172 is one of the most potent PPARβ/δ inverse agonists besides two other potent ligands **ST247** and **PT-S264** that were identified and optimised in a ligand-based

approach for generating novel potential drug candidates. Up to date, the X-ray structure of the PPARβ/δ-ligand binding domain was published in complex with an agonist [14] but the structure with an inverse agonist has still not been elucidated so far. As specific corepressors, which in both cases lead to a stabilisation of the respective complexes, are recruited to the PPARβ/δ-complex with an inverse agonist compared to the essential coactivator recruitment to the PPARβ/δ:agonist-complex, the whole transfer of the published crystallisation conditions will most likely not be successful. In order to find suitable crystallisation conditions, protein crystallisation screenings were either by co-crystallising the three substances with a corepressor peptide, or by directly adding this corepressor peptide during the screening. The protocol of protein isolation and purification was optimised to 26.7 mg L^{-1} medium or 1482.0 mg g^{-1} cells after affinity chromatography, because a huge protein amount is needed for performing the crystallisation screening. Unfortunately, no crystals formed so far.

In summary, different modulators of gene expression were studied to get more insights into the mechanism and mode of action of these essential regulation processes. Based on the results of the performed structure-activity relationship study, selective substances were developed for identifying the target. Furthermore, a robust and reproducible protein isolation method was established, and protein purification and yield were substantially improved which allows for high-throughput screening for crystallisation conditions.

6. Ausblick

Im Gegensatz zu den beiden anderen Subtypen PPARα und PPARγ konnte noch keine Kristallstruktur der PPARβ/δ-LBD in Komplex mit einem inversen Agonisten bestimmt werden. Die Bestimmung der Kristallstruktur bietet viele Informationen über die Bindetasche des Proteins und relevante Interaktionen des Liganden mit dem Proteintarget, wodurch Aussagen über den chemischen Raum und die Anforderungen an diese Wechselwirkungen getroffen werden können. Entsprechend der Kristallisation nach *Batista et al.* [14], könnte ein Kristallisationsscreen der PPARβ/δ-LBD nach Abspaltung des His-Tags durchgeführt werden. Der His-Tag ist zwar sehr klein und sollte daher keinen negativen Effekt auf die Proteinkristallisation und Löslichkeit ausüben, um dies aber auszuschließen, könnte ein Screen mit diesen Bedingungen angesetzt werden. Außerdem wurden die verschiedenen zu testenden Kristallisationsbedingungen bisher nur bei 18 °C inkubiert. Eine Senkung der Inkubationstemperatur könnte das Entstehen der Proteinkristalle begünstigen, was zu prüfen gilt. Jedoch sind diese Strategien nicht sehr vielversprechend, um Proteinkristalle zu erhalten. Ausschlaggebend für die Kristallentwicklung könnten wichtige Additive oder Detergentien sein. Anlehnend an die erhaltenen Proteinkristalle sowohl im Komplex mit β/δ-Agonisten nach *Batista et al.* [14] als auch mit inversen α-Agonisten nach *Xu et al.* [75], sollte die Zugabe eines Detergens die Kristallisation begünstigen. Untersuchungen von *McPherson et al.* ergaben, dass die Proteinkristallisation von Proteinkomplexen in Anwesenheit des Detergens *n*-Octyl-β-D-thioglucopyranosid positiv beeinflusst wird [102], deshalb sollten in einem weiteren Ansatz verschiedene Detergens-Konzentrationen getestet werden. Allerdings könnte eine mögliche Interaktion des Detergens mit der AF-2 die Kristallisation verhindern.

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung des Bindungsmodus zwischen Ligand und Protein ist eine Markierung der Modulatoren mit einer photoaktiven Gruppe, damit unter Einwirkung von Licht der modifizierte Ligand kovalent in der vorliegenden Konformation an das Target bindet. Nach anschließendem tryptischen Verdau kann die Aminosäuresequenz ermittelt werden, an die der Ligand bindet und dadurch Rückschlüsse auf die Lokalisierung des Liganden in der Bindetasche getroffen werden. Für die Untersuchung des Bindungsmodus zwischen PPARβ/δ und dessen potenten Liganden wäre die Photoaffinitätsmarkierung geeignet, da aufgrund der großen Bindetasche des Kernrezeptors die Bestimmung der Ligandenposition ein enormer

Erkenntnisgewinn wäre. Aufgrund dieser großen Bindetasche wäre eine Modifizierung der Modulatoren mit sterisch anspruchsvolleren Substituenten unter Erhalt der Aktivität vermutlich möglich. Außerdem könnten die Lage der Agonisten und inversen Agonisten sowie die Position der unterschiedlichen Strukturklassen in der Ligandenbindungsdomäne von PPARβ/δ miteinander verglichen werden. Problematisch könnten die Toxizität der benötigten UV-Strahlung für das Protein oder die Instabilität der modifizierten Liganden sein.

Zur Target-Identifizierung der Transkriptionsmodulatoren wurden biotinylierte Derivate von Lukas Dempwolff synthetisiert, mit denen über eine Strep-getaggte Matrix das Target isoliert werden könnte. Nach Etablierung dieses *pull-down* Experimentes könnte über massenspektrometrische Analyse das gebundene und isolierte Protein sowohl beim PPARβ/δ-unabhängigen Effekt des DG172 als auch beim Hedgehog Signalweg identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Target-Identifizierung ist die neuere Technik ChemSeq (*chemical affinity capture and massively parallel DNAsequencing*) [103], die zusätzlich mit der ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation DNA-sequencing*) kombiniert werden kann. Für die Durchführung des ChemSeq ist die Entwicklung potenter Transkriptionsmodulatoren und eine Bestimmung der Struktur-Wirkungsbeziehung essentiell, damit eine Modifizierung dieser Modulatoren ohne Aktivitätsverlust möglich ist und dadurch das Target isoliert werden kann. Die Target-Identifizierung über das ChemSeq erfolgt, indem gebundene DNA-Bereiche über Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert werden. Dies kann zur Bestimmung der Zielgene und möglicherweise über Sequenzmotive indirekt zur Target-Identifizierung genutzt werden. Hierfür werden potente Modulatoren der zu untersuchenden Transkriptionsregulation mit einem Biotin-Tag modifiziert, damit diese wegen des Biotins über eine Streptavidin-angereicherte Matrix nach der Anlagerung an ihr Target isoliert werden können. Anschließend werden die Gensequenzen dieser gebundenen isolierten Proteine und Proteinkomplexe sequenziert, sodass dadurch Erkenntnisse über die Lokalisierung und Identität der adressierten Proteine erhalten werden. Mittels dieser neuen Technik kann die Interaktion der Transkriptionsmodulatoren mit DNA oder DNA-bindenden Proteinen untersucht werden. Diese Methode ist sehr vielversprechend und bietet einen hohen und sehr interessanten Erkenntnisgewinn in der Untersuchung der Transkriptionsregulation. Trotz der hohen Anwendbarkeit und dem enormen Informationsgehalt liegen zur Zeit nur wenige Publikationen vor, in denen Ergebnisse

durch ChemSeq gewonnen werden konnten. Nur wenige Arbeitsgruppen arbeiten mit dieser innovativen Technik, was bedeuten könnte, dass diese Analyse nicht stabil verläuft und eine Etablierung problematisch ist. Dieser Ansatz könnte sowohl zur Bestimmung des Proteintargets der Liganden-induzierten Beeinflussung der Differenzierung myeloider Knochenmarkzellen zugunsten dendritischer Zellen, als auch zur Target-Identifizierung beim Hedgehog Signalweg dienen. Da bei dem Modulator **DG172** eine PPARβ/δ-unabhängige Verschiebung auf die Differenzierung in Richtung dendritischer Zellen beobachtet wurde, könnte der Vergleich zwischen den beiden Effekten auf transkriptionaler Ebene das potentielle unbekannte Target dieses Effektes über RNA-Sequenzierung bestimmt werden. Durch Ausschluss der Ergebnisse bei PPARβ/δ-Aktivität ließe sich dieses weitere Target der Stilbenstrukturklasse identifizieren.

7. Material und Methoden

7.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Absolute qPCR SYBRgreen Mix	Thermo Scientific
Acryl- & Bisacrylamidlösung (37,5:1)	Carl Roth®
Ammoniumacetat (NH_4OAc)	Carl Roth®
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem GmbH
Ampicillin (Amp)	Fisher Scientific
Benzonase® Nuclease	Novagen, Merck
Bovines Serumalbumin	Carl Roth®
Dimethylsulfoxid (DMSO), *cell culture grade*	AppliChem GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Fluorochem
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen
Essigsäure (AcOH)	Carl Roth®
Ethanol (EtOH)	Carl Roth®
Ethylendiamintetraessigsäure (Na_2EDTA)	Carl Roth®
Formaldehyd, 37% (w/v)	Carl Roth®
Fötales Kälberserum, *fetal bovine serum* (FBS)	Gibco®
Glutathion (GSH)	Gibco®
Glycerin, 99,5%	Gerbu
Hefeextrakt	Carl Roth®
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH
Imidazol	Sigma Aldrich®, Merck
Immobilon® Forte Western HRP Substrat	Merck KGaA
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth®
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth®
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Merck KGaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth®
Natriumacetat (NaOAc)	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth®
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth®

Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth®
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth®
Natriumthiosulfat Pentahydrat ($Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O)	Merck KGaA
Nickel(II)sulfat Hexahydrat ($NiSO_4$ x 6 H_2O)	Carl Roth®
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
Pepton aus Casein	Carl Roth®
RNA freies Wasser	Sigma Aldrich, Merck
Salzsäure (HCl)	VWR™
Silbernitrat ($AgNO_3$)	Merck KGaA
Tetramethylendiamin (TEMED)	Carl Roth®
Tris-HCl	Carl Roth®
Triton™ X-100	Sigma Aldrich
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories

7.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	**Hersteller**
96*well* Platte, randlos, weiß (72.1978.232)	Sarstedt AG & Co. KG
6well Platte, Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG
1420 *Multilabel Counter* VICTOR^3™V	Perkin Elmer
Accu-Block™ Digital dry bath	LabMet Internat. Inc.
AJ-112, Brutschrank	Infors AG
ÄKTA pure	GE Healthcare
Amicon® Ultra-15 *centrifugal filters*, Ultracel®-10K	Merck KGaA
Avanti *Centrifuge* J-26XP	Beckman Coulter
Blotting Paper, 0,4 mm	FineARt GmbH
Cellometer	Nexcelom Bioscience
ChemiDoc™MP Imaging System	Bio-Rad Laboratories GmbH
Chromatographie-Säulen	GE Healthcare
HisTrap FF 5 mL	GE Healthcare
MonoS 10/100 GL, 8 mL	GE Healthcare
HiLoad 26/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare

CLS 3676, 384*well*, schwarz, *round bottom, no lid*	Corning Incorporated
Cryotubes	Thermo Scientific
Dounce Tissue Grinder, 100 mL	Th. Geyer GmbH & Co. KG
EmulsiFlex™ C5	Avastin Inc.
Falcon Tubes, 15 mL, 50 mL	Sarstedt AG & Co. KG
Filter Pipettenspitzen (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	STARLAB GmbH
HERAEUS Pico17 *Centrifuge*	Thermo Scientific
INTAS Science Imaging	INTAS
Intelli-Mixer^{IMX}, RM-2L	Labortechnik GmbH & Co. KG
J-6M/E *Centrifuge*	Beckman
Klebefolie, optisch klar (95.1994)	Sarstedt AG & Co.KG
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific
Multifuge 3L-R, HERAEUS	Thermo Scientific
Mx 3000p bzw. MX3005p qPCR systems	Agilent
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
Oak Ridge Centrifuge Tube, PC, 30 mL (3118-0030)	Thermo Scientific
Optima™ MAX-XP *Ultracentrifuge*	Beckman Coulter
Pump P-1	GE Healthcare
(PTC-200) Peltier Thermal Cycler	MJ Research
RS-RD20	Phoenix Instruments
Sonifier Sonoplus UW 2200	Bandelin Electronic GmbH
Sonifier Sonoplus HD 2200 Max Power	Bandelin Electronic GmbH
Vortex	Heidolph Instruments®

7.3 Kits

Produktname	**Hersteller**
iScript™ cDNA Synthese Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH
NucleoBond XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
LanthaScreen™ TR-FRET PPARδ *Competitive Binding* Assay Kit, goat	Thermo Scientific

7.4 Sequenzen und Plasmide

Name	Ursprung	Sequenz	Hersteller
pET23a(+)		Insert: HisPPARβ/δ-LBD	Novagen
SMRT-Peptid	human	TNMGLEAIIRKALMGKYDQWEE	NovoPep, Auftragssynthese
Humane qPCR-Primer, für Untersuchung des Hedgehog-Signalweges			
P_0	fw: CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA		Sigma Aldrich,
	rv: CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC		Auftragssynthese
GLI2	fw: TGGCCGCTTCAGATGACAGATGTTG		Sigma Aldrich,
	rv: CGTTAGCCGAATGTCAGCCGTGAAG		Auftragssynthese
TCF4	fw: TGACGAGGGTGATGAGAACCTGCAA		Sigma Aldrich,
	rv: TCCTTCTCACGCTCTGCCTTCTGCT		Auftragssynthese
COL1A1	fw: TCAGCAAGAACCCCAAGGACAAGAGG		Sigma Aldrich,
	rv: AGGAAGGTCAGCTGGATGGCCACAT		Auftragssynthese

HisPPARβ/δ-LBD:

MGHHHHHHGSQYNPQVADLKAFSKHIYNAYLKNFNMTKKKARSILTGKASHT
APFVIHDIETLWQAEKGLVWKQLVNGLPPYKEISVHVFYRCQCTTVETVRELTE
FAKSIPSFSSLFLNDQVTLLKYGVHEAIFAMLASIVNKDGLLVANGSGFVTREFL
RSLRKPFSDIIEPKFEFAVKFNALELDDSDLALFIAAIILCGDRPGLMNVPRVEAI
QDTILRALEFHLQANHPDAQYLFPKLLQKMADLRQLVTEHAQMMQRIKKTETE
TSLHPLLQEIYKDMY

7.5 Software

Programm	Anbieter
ApE Plasmid Editor	M. Wayne Davis
GraphPad Prism 7	GraphPad Software
Image J	Wayne Rasband
PyMol	DeLano Scientific
Unicorn 6	GE Healthcare

7.6 Medium- und Pufferzusammensetzungen

Verwendung	Lösung	Zusammensetzung
Medium für Bakterienkulturen	LB-Medium	10 g L^{-1} Pepton, 5 g L^{-1} Hefeextrakt, 5 g L^{-1} NaCl
	SLB-Medium	25 g L^{-1} Pepton, 15 g L^{-1} Hefeextrakt, 5 g L^{-1} NaCl
Proteinaufreinigung HisPPARß/δ-LBD	Lysepuffer	20 mM HEPES pH = 7,5, 250 mM NaCl, 60 mM Imidazol, 0,2% (v/v) Triton X-100, 5 mM DTT
	Ni-Bindepuffer	20 mM HEPES pH = 7,5, 250 mM NaCl, 60 mM Imidazol, 5 mM DTT
	Ni-Elutionspuffer	20 mM HEPES pH = 7,5, 250 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 mM DTT
	CIEX-Bindepuffer	20 mM HEPES, pH = 7,3, 5 mM DTT
	CIEX-Elutionspuffer	20 mM HEPES, pH = 7,3, 1 M NH_4OAc, 5 mM DTT
	SEC-Puffer	20 mM HEPES, pH = 7,5, 500 mM NH_4OAc, 5 mM DTT
Proteinaufreinigung GST-PPARß/δ-LBD	PBS-Puffer	10 mM Na_2HPO_4, 1 mM $K_2H_2PO_4$ pH = 7,3, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM DTT
	GST-Elutionspuffer	50 mM Tris pH = 8,0, 10 mM GSH, 5 mM DTT
FRET-Assay	TR-Puffer	20 mM Tris pH = 7,9, 100 mM KCl, 0,01% Triton X-100, 1 µg mL^{-1} BSA, 5 mM DTT (kompetitiver Assay) bzw. 1 mM DTT (CoRepressor Assay)
SDS-PAGE	SDS-Probenpuffer	50 mM Tris pH = 6,8, 50 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau

	SDS-Laufpuffer	100 mM Tris pH = 8,3, 380 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
	Trenngel	375 mM Tris, pH = 8,9, 20% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 1% (w/v) SDS
	Sammelgel	125 mM Tris, pH = 6,8, 4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 1% (w/v) SDS
Coomassie-Färbung	Coomassie-Färbelösung	40% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH, 0,1% (w/v) Coomassie
	Entfärbelösung	20% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH
Silberfärbung	Fixierlösung	40% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH
	Sensibilisierungslösung	30% (v/v) EtOH, 2 g L^{-1} $Na_2S_2O_3$ x 5 H_2O, 68 g L^{-1} NaOAc
	Silberlösung	0,25% (w/v) $AgNO_3$ (dunkel lagern)
	Entwicklungslösung	2,5% (w/v) Na_2CO_3, 400 µL L^{-1} Formaldehyd
	EDTA-Lösung	14,6 g L^{-1} EDTA x 2 H_2O
Western Blot	TBST	50 mM Tris pH = 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20

Die Medien für die Bakterienkultur wurden autoklaviert und das Antibiotikum frisch hinzugegeben. Alle verwendeten Puffer zur Proteinaufreinigung wurden steril filtriert, entgast und anschließend gekühlt gelagert. DTT wurde immer frisch zum Puffer gegeben.

7.7 Zelluläre Methoden

Für die Kultivierung eukaryotischer Zelllinien wurde steriles Medium mit zugesetztem steril gefiltertem Antibiotikum sowie fötales Kälberserum FBS Gold verwendet (Tabelle 8). Alle eingesetzten Lösungen wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C temperiert und unter der Sterilbank eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Anbieter	Medium
Pa-Tu-8988T	*Homo sapiens* Pankreatisches Adenokarzinom	DSMZ	DMEM, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Knochenmarkzellen	*Mus Musculus*	Wildtyp-Linie[a] C57BL/6J	RPMI1640, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 25 mM HEPES

a: Die Mäuse waren bereits von der AG Stiewe getötet und für einen anderen Versuch genutzt worden. Lediglich die Zellen wurden isoliert.

7.7.1 Passagieren der Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37 °C im Zellkulturinkubator inkubiert und bei Konfluenz passagiert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen ein Mal mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Trypsin bei 37 °C abgelöst. Durch mikroskopische Untersuchung wurde das Ablösen geprüft und anschließend die Proteolyse durch Zugabe von frischem Medium beendet. Die abgelösten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und ein Teil der Zellen wurde in der benötigten Zellverdünnung in frischem Medium ausgesät.

7.7.2 Auftauen der Zelllinien

Eingefrorene Zellen wurden im 37 °C temperierten Wasserbad aufgetaut und direkt im Anschluss in 50 mL vorgewärmtem Medium vorsichtig resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm bei 4 °C wurde der Überstand entfernt und die Zellen in frischem, temperiertem Medium aufgenommen, in eine Kulturschale überführt und bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

7.7.3 Einfrieren der Zelllinien

Die Zellen wurden ein Mal mit PBS gewaschen und danach mit 1 mL Trypsin bei 37 °C abgelöst. Zu der Zellsuspension wurde 3 - 5 mL Medium gegeben und die Zellen in einem sterilen Gefäß bei 4 °C bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Zellpellet in 1 mL Cryo-Medium (Kapitel 7.6) resuspendiert und anschließend in einem Gefrierbehälter eingefroren. Die eingefrorenen Zellen wurden

bei -80 °C beziehungsweise für langfristige Aufbewahrung im flüssigen Stickstoff eingelagert.

7.7.4 Zellzahlbestimmung

Nach dem Ablösen der Zellen wurden 20 µL der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe des *Nexcelom Cellometer* gezählt und die Zellviabilität ermittelt. Aus diesem Wert wurde die notwendige Verdünnung hergestellt, um die gewünschte Zellzahl im Assay zu erreichen.

7.7.5 Untersuchung der Zelllinien in Anwesenheit von neuartigen Substanzen

In eine 6*well* Platte wurden 100.000 Pa-Tu-8988T-Zellen (Tabelle 8) pro *well* ausgesät und in 2 mL frischem Medium für 4 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, bis die Zellen adhärent waren. Nach dem Absetzen der Zellen wurde das Medium entfernt und frisches Medium mit 0,5% FBS mit den gelösten zu testenden Substanzen in einer finalen Konzentration von 20 µM und 5 µM bei einem Gehalt von 0,1% DMSO hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde DMSO bei 0,5% Gehalt und als Positivkontrolle wurde Ox0 in den selben Konzentrationen eingesetzt. Die Zellen wurden über 48 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert und währenddessen mikroskopisch hinsichtlich phänotypischer Veränderungen untersucht. Im Anschluss wurde das Medium entnommen und die Zellen mit 1 mL PBS gewaschen. Das PBS wurde nahezu vollständig entfernt und anschließend entweder die RNA aus den Proben isoliert oder die Platte bei -80 °C bis zur Aufarbeitung zwischengelagert.

7.7.6 Gewinnung und Untersuchung myeloider muriner Knochenmarkzellen

Die Gewinnung myeloider muriner Knochenmarkzellen erfolgte aus Wildtyp-Mäusen der Linie C57BL/6J. Die verwendeten Mäuse stammen von der AG Stiewe und waren bereits für einen anderen Versuch getötet worden, sodass nur die Zellen der bereits toten Maus isoliert wurden. Nach der Präparation der Oberschenkel und Unterschenkel aus der Maus wurden die erhaltenen unversehrten, gewebefreien Knochen für eine Minute in 70%igem EtOH inkubiert um die Sterilität zu gewährleisten. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen am Condylus beziehungsweise oberhalb des Wadenbeins geöffnet und die Knochenmarkzellen mit PBS in eine 10 cm Zellkultur-Schale gespült. Zellen aus einer

Maus wurden in einer Schale vereinigt, resuspendiert und anschließend 2 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Filtration der Zellsuspension undifferenzierter Zellen aus dem Überstand, um Gewebeteile und Knochenreste zu entfernen, wurde das PBS nach Zentrifugation bei 300xg für 10 min bei Raumtemperatur vorsichtig entfernt und die Zellen anschließend vorsichtig in frischem vortemperiertem Medium resuspendiert. In PRIMARIA-Schalen wurden $4 \cdot 10^6$ Zellen pro 6*well* ausgesät und mit einer finalen Konzentration von 20 ng mL^{-1} mrGM-CSF (gelöst in PBS mit 0,1% BSA) über Nacht bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Verbindungen mit einer finalen Konzentration von 500 nM und einem DMSO-Gehalt von 0,1% zum Medium gegeben. Bei **LD253** wurde aufgrund des vorliegenden 1:1 E/Z-Gemischs der Verbindung eine Konzentration von 1 µM gewählt, da bei **DG172** der vorherigen Untersuchungen ein höheres E/Z-Gemisch vorlag. Nach insgesamt 72 h nach dem Ausplattieren erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel durch Ernte der undifferenzierten Zellen aus dem Überstand mit erneuter Zugabe der zu untersuchenden Verbindungen und dem Wachstumsfaktor mrGM-CSF. Die Quantifizierung der entstandenen Zellpopulation wurde mittels FACS-Analyse nach 6 d Inkubation in Anwesenheit der Substanzen die Zellen über Oberflächenmarkierung mit den Antikörpern gegen CD11c, MHC II zur Analyse dendritischer Zellen sowie gegen Ly-6B, Ly-6G zur Bestimmung neutrophiler Granulozyten durchgeführt. Dazu wurde die Zellpopulation zunächst auf $1 \cdot 10^6$ Zellen pro FACS-Röhrchen geteilt und zusätzlich ein Drittel jeder Bedingung in einem Röhrchen vereinigt (Ansätze für die Isotypenfärbung und Neagtivkontrolle ohne jegliche Färbung). Die Zellen wurden mit 1 mL PBS gewaschen und zwischen den Waschschritten 5 min bei 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde über Dekantieren entfernt und zu der verbleibenden Lösung wurde TruStain mit einer finalen Konzentration von 10 µg mL^{-1} gegeben und 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper mit 1 µL pro Bedingung gegeben und 30 min dunkel auf Eis inkubiert, die ungebundenen Antikörper wurden mit 1 mL PBS über Zentrifugation entfernt. Das Zellpellet wurde in 400 µL PBS resuspendiert und die Zellpopulationen konnten am FACS quantifiziert werden und über FlowJo ausgewertet. Die FACS-Analyse und die anschließende Auswertung wurde zusammen mit Dr. Sonja Lieber durchgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Antikörper und Reagenzien

Reagenz	Anbieter
Anti-mouse CD11c PE Cyanine 7	BD BioSciences
PE/Cy7 armenian hamster IgG, Isotype ctrl	BD BioSciences
Anti-mouse MHCII (I-A/I-E) APC	BD BioSciences
APS rat IgG2b, k Isotype control	BD BioSciences
Ly6G Pacific Blue™ anti-mouse	BD BioSciences
Pacific Blue Rat IgG2a,x, Isotype Ctrl	BD BioSciences
Rat anti MS Ly-6B.2 FITC	BD BioSciences
FITC Rat IgG2a, k Isotype Control	BD BioSciences
TruStain	BD BioSciences

7.8 Biochemische Methoden

7.8.1 Proteinisolation und Aufreinigung

7.8.1.1 Proteinproduktion über rekombinante heterologe Expression

In 250 mL LB-Medium (Kapitel 7.6) wurde Ampicillin als Selektionsmarker mit einer finalen Konzentration von 100 µg mL^{-1} hinzugefügt und Zellen einer vereinzelten Kolonie einer Agarplatte oder vom Glycerol-Stock der transformierten Zellen unter sterilen Bedingungen gegeben (Tabelle 10). Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C bei 140 rpm geschüttelt, um am nächsten Tag die Hauptkultur anzuimpfen. Zu 900 mL SLB-Medium der Hauptkultur (Kapitel 7.6) wurde ebenfalls Ampicillin derselben Konzentration eingesetzt und mit 25 mL der Vorkultur unter sterilen Bedingungen versetzt. Die Bakterienkultur wurde bei 37 °C bei 120 rpm bis zu einer optischen Dichte OD_{600nm} 3 – 4 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde ein schwacher β/δ-Agonist (**1**) mit einer finalen Konzentration von 500 µM mit einem finalen DMSO-Gehalt von 0,1% zur Zellkultur gegeben, eine Stunde inkubiert und währenddessen auf 20 °C gekühlt. Anschließend wurde zur 20 °C temperierten Lösung 1 mM IPTG gegeben und dadurch die Proteinexpression indirekt durch Expressionsregulation der T7-Polymerase induziert und über Nacht bei 20 °C und 120 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde erneut die optische Dichte zur Aufzeichnung gemessen und anschließend die *E.coli* Zellen durch Zentrifugation bei 6.000 g bei 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde entweder zur

Lagerung bei -20 °C eingefroren oder direkt in dem jeweiligen Lysepuffer (Kapitel 7.6) resuspendiert und aufgeschlossen.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Zellen.

Zellen	Plasmid	Insert	Resistenz	Konzentration
BL21 gold (DE3)	pET23a(+)	HisPPARβ/δ-LBD	Ampicillin	100 µg mL^{-1}
BL21 gold (DE3)	pET28 a(+)[1]	StrepPPARβ/δ-LBD	Kanamycin	30 µg mL^{-1}
BL21 gold (DE3)	pGEX-6P-1	GST-PPARβ/δ-LBD[2]	Ampicillin	100 µg mL^{-1}

1: klonierten Vektor freundlicherweise von AG Sinz erhalten.

2: Insert hergestellt von Eurofins Genomics.

7.8.1.2 Zellaufschluss

Das Zelllysat sowie die Proteinlösungen wurden permanent auf Eis gelagert, um ein Denaturieren des Proteins zu verhindern. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet zuerst im Lysepuffer (Kapitel 7.6) vorsichtig resuspendiert und danach mit einer Tablette des Protease Inhibitor Cocktails und 1 µL Benzonase für 30 min auf Eis inkubiert. Um eine komplette homogene Suspension und somit erfolgreiche Zelllyse zu gewährleisten, wurde die Zellsuspension mittels dem *Dounce Tissue Grinder* jeweils mit Pistill A für eine erste Zerkleinerung der Zellbrocken und Pistill B für die vollständige Homogenisierung für 10 min auf Eis behandelt.

7.8.1.2.1 EmulsiFlex

Zunächst wurde der EmulsiFlex™ C5 mit Wasser unter Gegendruck gewaschen, um das Ethanol zu entfernen, sowie mit dem verwendeten Lysepuffer gewaschen. Der Probenbehälter wurde mit der homogenisierten Zellsuspension befüllt und bei einem stetig wechselnden frequentierten Gegendruck von 15.000 psi beziehungsweise 1000 bar wurde die Suspension 10 – 15 min lysiert. Damit ein Denaturieren der Proteine während der Lyse verhindert wird, wurde das System gekühlt.

7.8.1.2.2 Ultraschallaufschluss

Die homogene Zellsuspension wurde in 50 mL Fraktionen auf Eis sonifiziert, damit der Ultraschall die gesamte Probe durchdringen kann und die Zellen lysiert werden. Das Ultraschallgerät wurde in die Lösung gehalten und jede Fraktion wurde jeweils fünf Mal bei 20% Leistung für 90 s auf Eis sonifiziert. Im Anschluss wurden die festen Zellbestandteile durch Ultrazentrifugation bei 20.000 g bei 4 °C für 60 min abgetrennt und der Überstand konnte nach vorsichtigem Isolieren für die chromatographische Proteinaufreinigung verwendet werden.

7.8.1.3.1 Proteinaufreinigung von HisPPARβ/δ-LBD

Die His-getaggte PPARβ/δ-LBD wurde säulenchromatographisch mit Hilfe der *Fast protein liquid chromatography* (FPLC) ÄKTA pure bei 4 °C isoliert und aufgereinigt. Alle verwendeten Puffer wurden steril filtriert, entgast und auf 4 °C gekühlt. In der Affinitätschromatographie wurden bei großen Bakterienkulturmengen zwei Ni-Säulen miteinander verbunden, damit die gesamte Menge des *protein of interest* an die Säule bindet und ein Verlust durch Überschreiten der Bindekapazität reduziert wird.

Über eine Peristaltikpumpe wurde das Lysat im Rückflusskreislauf bei 4 °C mit 0,5 mL min^{-1} über Nacht auf die HisTrap FF 5 mL gegeben, danach wurden die nicht spezifisch bindenden Proteine über die FPLC über sieben Säulenvolumina bei 1 mL min^{-1} von der Säule gewaschen. Die Elution der Affinitätschromatographie erfolgte über 100% des Elutionspuffers bei 2 mL min^{-1} über sieben Säulenvolumina und der Proteingehalt wurde über die Unicorn 6.3 Software der FPLC-Systems im Chromatogramm angezeigt. Die Fraktionen des Proteinsignals wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt und über Gelelektrophorese (Kapitel 7.8.5) auf Reinheit geprüft. Nach Pufferaustausch (Kapitel 7.8.2) der Elutionslösung in den CIEX-Bindepuffer und anschließendem Abzentrifugieren der Proteinlösung wurde das Zielprotein weiter mittels der Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt und mit 2 mL min^{-1} auf die MonoS geladen. Über fünf Säulenvolumina wurde die Säule bei 2 mL min^{-1} gewaschen und danach wurden die gebundenen Proteine mit steigender Salzkonzentration mit einem Gradienten über 10 Säulenvolumina von 0% auf 100% CIEX-Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen gesammelt. Die Elutionsfraktionen des Proteinsignals wurden vereinigt und dessen Proteinkonzentration sowie dessen Reinheit bestimmt. Für die Größenausschlusschromatographie wurde der Puffer durch Dialyse (Kapitel 7.8.2) zum SEC-Puffer (Kapitel 7.6) gewechselt und anschließend maximal auf ein Probenvolumen

von 5 – 12 mL aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde für 90 min bei 9.000 g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit 1 mL min^{-1} auf die HiLoad 26/600 Superdex 75 pg Säule gegeben. Durch eine isokratische Trennung über 1,5 Säulenvolumina bei 2 mL min^{-1} wurde das Protein aufgereinigt und die Elution in Fraktionen aufgenommen. Die Fraktionen des Proteinsignals wurden vereinigt und davon wurde die Reinheit sowie Konzentration bestimmt. Vollständig aufgereinigte Proteinlösungen wurden auf die gewünschte Konzentration aufkonzentriert und mit 5% (v/v) Glycerolgehalt schockgefroren bei -80 °C eingelagert.

7.8.1.3.2 Proteinaufreinigung von GST-getaggter PPARβ/δ-LBD

Die Proteinherstellung sowie der Zellaufschluss erfolgte größtenteils gemäß der Aufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD (Kapitel 7.8.1), abgesehen davon, dass zur Proteinproduktion kein Additiv (schwacher β/δ-Agonist (**1**)) gegeben wurde und die geernteten Zellen in PBS-Puffer resuspendiert wurden. Zur Isolierung der GST-getaggten PPARβ/δ-LBD wurde das Zelllysat mit 0,5 mL min^{-1} auf die GSTrap FF 5 mL beladen und die Säule anschließend mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL min^{-1} über fünf Säulenvolumina gewaschen. Die Elution des *protein of interest* erfolgte in Fraktionen bei 2 mL min^{-1} über sieben Säulenvolumina bei 100% GST-Elutionspuffer und wurde anschließend vereinigt und auf Reinheit geprüft.

7.8.2 Dialyse

Ein Wechsel des Puffersystems der Proteinlösungen erfolgte durch die Dialyse bei 4 °C. Nach dem Waschen des Dialyseschlauches in demineralisiertem Wasser für 30 min, wurde der Dialyseschlauch mit der Proteinlösung befüllt, mit Dialyseklammern verschlossen und dieser befüllte Dialyseschlauch in dem Puffer über Nacht bei 4 °C unter vorsichtigem leichtem Rühren inkubiert. Um einen vollständigen Pufferaustausch zu gewährleisten wurde mindestens das 200fache Volumen der zu dialysierenden Proteinlösung als Dialysepuffer verwendet sowie der Puffer nach 4 h ausgewechselt und über Nacht in frischem Puffer inkubiert. Bei starker Veränderung der Pufferzusammensetzung wurde ein Pufferaustausch in zwei Stufen gewählt, damit das Protein vorsichtig behandelt wird und nicht denaturiert. Hierfür wurde zunächst das Protein im Dialyseschlauch für 4 h bei 4 °C im ersten Puffer und dann über Nacht in den

zweiten Puffer gegeben und vorsichtig gerührt. Der *cut off* des Dialyseschlauchs lag bei der exprimierten HisPPARβ/δ-LBD bei 12 – 14 kDa.

7.8.3 Aufkonzentrieren von Proteinlösung

Zum Kristallisieren des Proteins muss eine bestimmte Proteinkonzentration vorliegen, welche durch Zentrifugation in 15 mL Amicons Filtereinheiten erreicht wurde. Für die exprimierte HisPPARβ/δ-LBD wurde ein *cut off* von 10 kDa verwendet und nach Äquilibrieren im jeweils verwendeten Puffer bei 4.000 g, 4 °C für 15 min bis zur gewünschten Konzentration eingestellt. Nach jeder Zentrifugation wurde die Lösung vorsichtig durchmischt, um ein Ausfällen des Proteins zu verhindern.

7.8.4 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration sowie der RNA-Konzentration erfolgte in 1 µL der Probe am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Über ProtParam wurde der molare Extinktionskoeffizient ε und das Molekulargewicht des Targetproteins ermittelt und zum Berechnen der Proteinkonzentration verwendet. Das Molekulargewicht der His-getaggten PPARβ/δ-LBD beträgt 32.633,82 Da und der Extinktionskoeffizient ε 24.410 L mol^{-1} cm^{-1}, (Abs. 0,1% = 0,748).

7.8.5 Reinheitsbestimmung via SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die isolierten Eluate der chromatographischen Aufreinigung wurden mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Reinheit geprüft, indem das Proteingemisch nach dessen Molekulargewicht aufgetrennt wird. Zur optimalen Auftrennung der Proteinbanden wurde ein 12%iges oder 15%iges Trenngel in der Gelkammer hergestellt und darüber ein 4%iges Sammelgel mit dem Probenkamm für die Geltaschen eingesetzt (Kapitel 7.6). Die zu untersuchenden Proteinproben wurden mit dem SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Befüllen der Gelelektrophoresekammer mit dem SDS-Laufpuffer und dem anschließenden Befüllen der Geltaschen des Sammelgels wurde eine Spannung von 30 mA pro Gel angelegt. Bevor die Lauffront aus dem Gel trat wurde die Elektrophorese beendet und die aufgetrennten Proteinbanden des Gels wurden durch Coomassie- oder Silberfärbung

erkennbar (Kapitel 7.7.5.1 und 7.7.5.2). Nach dem jeweiligen Färbeverfahren wurde das Gel zur Dokumentation mittels des Imagers ChemiDoc™ MP eingescannt.

7.8.5.1 Coomassie-Färbung

Zur Färbung der aufgetrennten Proteinbanden wurde das Gel zwei Mal 5 min in Wasser gewaschen und im Anschluss ungefähr 20 min in der Coomassie-Lösung unter Schwenken bis zu einer intensiven Blaufärbung des Gels inkubiert. Danach wurde das Gel in der Entfärbelösung geschwenkt bis die einzelnen Banden sichtbar wurden und das Gel nicht mehr blau gefärbt war.

7.8.5.2 Silberfärbung

Zur genaueren Reinheitsprüfung der Proteinfraktionen wurde die sensitivere Silberfärbung gewählt. Das Gel wurde zwei Mal für 5 min mit Wasser unter Schwenken gewaschen und danach zwei Mal für mindestens 15 min in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 30 – 60 min in der Sensibilisierungslösung geschwenkt und vier Mal für jeweils 5 min mit Wasser gewaschen. Unter Lichtausschluss erfolgte die Inkubation in der Silberlösung für 20 min, die überschüssigen Silberionen wurden danach durch zweifaches Waschen mit Wasser für 1 min entfernt. Für die Entwicklung der Proteinbanden wurde das Gel 5 – 10 min in der Entwicklungslösung unterm Abzug geschwenkt, bis die Banden erkennbar waren. Damit eine weitere Reaktion unterbunden wird, wurde die Färbung durch EDTA-Lösung für 10 min gestoppt und drei Mal 5 min mit Wasser gewaschen.

7.8.5.3 Western Blot

Das SDS-Gel wurde auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran durch 90 min bei 100 mA übertragen und anschließend 2 h in 5% Milchpulver in TBST-Puffer bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Tabelle 11) bei 4 °C geschwenkt, am nächsten Tag 3 Mal für 5 min mit TBST gewaschen und danach 2 h mit dem sekundären Antikörper (Tabelle 11) inkubiert. Nach 2 Mal waschen mit TBST für jeweils 15 min und 2 Mal waschen mit TBS für 10 min konnte die Membran mit Luminata Forte HRP Substrat ausgewertet werden und zur Dokumentation wurde mit Hilfe des ChemiDoc™ MP Imaging System ein Bild der Membran aufgenommen.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Antikörper und die verwendete Konzentration.

Antikörper	Konzentration	
	primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
GST-AK	1:5.000 in 5% Milchpulver in TBST	1:10.000 in TBST
hPPARβ	1:500 in TBST	1:5.000 in TBST

7.8.6 Homogeneous time resolved fluorescence Assay (HTRF)

In einer schwarzen 384*well* Platte Corning wurden 10 µL des vorbereiteten Mastermixes vorgelegt, welcher die GST-getaggte PPARβ/δ-LBD mit einer finalen Konzentration von 5 nM, den Terbium-markierten anti-GST-Antikörper mit final 5 nM und den Fluorophor PanPPARgreen mit 20 nM im TR -Puffer enthielt. Die zu untersuchenden Verbindungen wurden im kompetitiven Assay beginnend von 2 µM in einer 1:3 Verdünnung in DMSO über sieben Stufen getestet (insgesamt acht Konzentrationen), indem zu den jeweiligen *wells* mit dem Reaktionsgemisch 10 µL der Substanzlösung in TR-Puffer mit einem finalen DMSO-Gehalt von 0,5% (v/v) hinzugegeben wurde. Nach 30 min und nach 60 min Inkubation unter Ausschluss von Licht wurde das Fluoreszenzsignal nach dem Einstrahlen von 340 nm bei 495 nm beziehungsweise 520 nm Extinktion gemessen und durch den Quotienten des Signals I_2/I_1 die Aktivität der Substanzen miteinander verglichen. Um die Verbindungen als Agonisten, inversen Agonisten oder Antagonisten klassifizieren zu können, wurde anstelle des PanPPARgreens das Fluoreszenz-markierte CoRepressor-Peptid SMRT-ID2 mit einer finalen Konzentration von 100 nM eingesetzt und der TR-Puffer mit 1 mM DTT anstatt 5 mM versetzt (Kapitel 7.6). In diesem CoRepressor-Assay wurden die Verbindungen bei 10 µM in einer 1:5 Verdünnung in DMSO über sechs Stufen gemessen (insgesamt sieben Konzentrationen).
Die Negativkontrolle war die DMSO-Kontrolle in der selben Konzentration und für die Positivkontrolle des Experimentes diente der Inhibitor **GW501516** mit einer Konzentration von final 300 nM. Um eine Verbesserung der Substanzen zu erkennen beziehungsweise als Referenz für die Wirkungsklassen Agonist, inverser Agonist oder Antagonist, wurde PT-S264 beziehungsweise eine Verbindung derselben Strukturklasse als Vergleich simultan als Referenz gemessen. Alle Messungen erfolgten im technischen Triplikat und die IC_{50}-Werte wurden mit Hilfe der Software *GraphPad Prism 7* bestimmt.

7.9. Molekularbiologische Methoden

7.9.1 Hitzeschock Transformation

Zu 50 µL der vorsichtig aufgetauten kompetenten Zellen wurden 50 ng Plasmid gegeben und 30 min auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden 90 s bei 42 °C im Heizblock inkubiert und danach erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zugabe von 950 µL LB-Medium (Kapitel 7.6) wurde die Zellsuspension für 30 min bei 37 °C geschwenkt, danach 3 min bei 7.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µL Medium vorsichtig resuspendiert und unter sterilen Bedingungen auf der mit entsprechendem Antibiotikum versetzten Agarplatte ausgestrichen (Kapitel 7.6). Zum Wachsen der transformierten Bakterien wurde die Agarplatte über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

7.9.2 Plasmidpräparation

Das Plasmid wurde aus 100 mL Bakterienkultur mit Selektionsmarker unter Verwendung des *NucleoBond Xtra Midi* Kits von MACHEREY-NAGEL isoliert (Kapitel 7.3).

7.9.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den zellulären Proben erfolgte mit Filterpipettenspitzen nach dem Protokoll des verwendeten Kits NucleoSpin RNAII® Kit von MACHEREY-NAGEL. Die RNA-Konzentration und die Reinheit wurden mit Hilfe des Nanodrops ermittelt.

7.9.3 cDNA Synthese

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde 1 µg RNA eingesetzt und das Protokoll (Tabelle 12) des iScript™ cDNA Synthese Kits im (PTC-200) Peltier Thermal Cycler durchgeführt. Nach der abgeschlossenen Synthese wurden die Proben 1:3 in Wasser verdünnt und in der quantitativen Polymerasekettenreaktion (Kapitel 7.9.4) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12: Protokoll für die cDNA Synthese des iScript™ cDNA Synthese Kits von Biorad.

Zeit *t* [min]	Temperatur *T* [°C]
5 min	25
30 min	42
5 min	85
∞	4

7.9.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Als Template wurde 1 µL beziehungsweise circa 330 ng cDNA (Kapitel 7.9.3) umgesetzt und durch *absolute qPCR SYBRgreen Mix* quantitativ über 40 Zyklen nach dem Herstellerprotokoll (Tabelle 13) bestimmt. Die Primer (Kapitel 7.4) wurden in einer finalen Konzentration von 250 nM in einem Assayvolumen von 10 µL eingesetzt. Jede Messung erfolgte im technischen Triplikat in den Geräten Mx3000p oder Mx3005p *qPCR systems*. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde die relative mRNA Expression $2^{-\Delta C_t}$ ermittelt und die Werte mit der Software *GraphPad Prism 7* graphisch dargestellt.

Tabelle 13: Protokoll der qRT-PCR.

	Temperatur *T* [°C]	Zeit *t*	Anzahl
Hot Start	95	15 min	1x
Denaturieren	95	15 s	
Annealing	60	20 s	40x
Elongation	72	15 s	

Literaturverzeichnis

1. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Develop ment Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **23,** 3–25 (1997).
2. Russ, A. P. & Lampel, S. The druggable genome: An update. *Drug Discov. Today* **10,** 1607–1610 (2005).
3. Campbell, S. J. *et al.* Visualizing the drug target landscape. *Drug Discov. Today* **15,** 3–15 (2010).
4. Lander, E. Finishing the euchromatic sequence of the human genome International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* **431,** 931–945 (2004).
5. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1,** 727–730 (2002).
6. Santos, R. *et al.* A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16,** 19–34 (2016).
7. Rastinejad, F., Ollendorff, V. & Polikarpov, I. Nuclear receptor full-length architectures: Confronting myth and illusion with high resolution. *Trends Biochem. Sci.* **40,** 16–24 (2015).
8. Mangelsdorf, D. *et al.* The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* **83,** 835–839 (1995).
9. Schoonjans, K., Staels, B. & Auwerx, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* **37,** 907–25 (1996).
10. Pirat, C. *et al.* Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Development of modulators. *J. Med. Chem.* **55,** 4027–4061 (2012).
11. Wärnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P. H. & Gustafsson, J.-Å. Activation Functions 1 and 2 of Nuclear Receptors: Molecular Strategies for Transcriptional Activation. *Mol. Endocrinol.* **17,** 1901–1909 (2003).
12. Zoete, V., Grosdidier, A. & Michielin, O. Peroxisome proliferator-activated receptor structures: Ligand specificity, molecular switch and interactions with regulators. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771,** 915–925 (2007).
13. Grygiel-Górniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications - A review. *Nutr. J.* **13,** 1–10 (2014).
14. Batista, F. A. H. *et al.* Structural insights into human peroxisome proliferator

activated receptor delta (PPAR-delta) selective ligand binding. *PLoS One* **7,** 1–7 (2012).

15. Xu, H. E. *et al.* Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* **3,** 397–403 (1999).
16. Fyffe, S. A. *et al.* Recombinant human PPAR-β/δ ligand-binding domain is locked in an activated conformation by endogenous fatty acids. *J. Mol. Biol.* **356,** 1005–1013 (2006).
17. Novac, N. & Heinzel, T. Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Curr. Drug Target -Inflammation Allergy* **3,** 335–346 (2004).
18. Kliewer, S. a *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 4318–4323 (1997).
19. Taniguchi, A. *et al.* Effects of bezafibrate on insulin sensitivity and insulin secretion in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism.* **50,** 477–480 (2001).
20. Rubins, H. B. *et al.* Gemfibrozil for the Secondary Prevention of Coronary Heart Disease in Men with Low Levels of High-Density Lipoprotein Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **341,** 410–418 (1999).
21. Reasner, C. A. Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in people with type 2 diabetes mellitus. *Curr. Atheroscler. Rep.* **8,** 261–262 (2006).
22. Moses, J. W. *et al.* Effects of combination lipid therapy in Type 2 Diabetes Mellitus. *New Engl. J. Med.* **362,** 1315–1323 (2003).
23. Hong, F., Xu, P. & Zhai, Y. The opportunities and challenges of peroxisome proliferator-activated receptors ligands in clinical drug discovery and development. *Int. J. Mol. Sci.* **19,** (2018).
24. Lehrke, M. & Lazar, M. A. The many faces of PPARγ. *Cell* **123,** 993–999 (2005).
25. Li, Y. *et al.* Molecular recognition of nitrated fatty acids by PPARγ. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15,** 865–867 (2008).
26. Smith, M. T. Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **16,** 679–687 (2003).
27. Chojkier, M. Troglitazone and liver injury: In search of answers. *Hepatology* **41,** 237–346 (2005).
28. Masubuchi, Y. Metabolic and Non-Metabolic Factors Determining Troglitazone Hepatotoxicity: A Review. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **21,** 347–356 (2006).

29. Levin, D. *et al.* Pioglitazone and bladder cancer risk: a multipopulation pooled, cumulative exposure analysis. *Diabetologia* **58,** 493–504 (2014).
30. Lewis, J. D. *et al.* Pioglitazone use and risk of bladder cancer and other common cancers in persons with diabetes. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **314,** 265–277 (2015).
31. Escher, P. Rat PPARs: Quantitative Analysis in Adult Rat Tissues and Regulation in Fasting and Refeeding. *Endocrinology* **142,** 4195–4202 (2001).
32. Braissant, O. Differential expression of PPAR: tissue distribution of PPARa,b and c in the adult rat. *Endocrinology* **137,** (1996).
33. Müller, R., Kömhoff, M., Peters, J. M. & Müller-Brüsselbach, S. A role for PPARβ/δ in tumor stroma and tumorigenesis. *PPAR Res.* (2008).
34. Müller, R., Rieck, M. & Müller-Brüsselbach, S. Regulation of cell proliferation and differentiation by PPAR β / δ. *PPAR Res.* **2008,** (2008).
35. Naruhn, S. *et al.* 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Is a Preferential Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta/Delta Agonist. *Mol. Pharmacol.* **77,** 171–84 (2010).
36. Zhou, D., Jin, J., Liu, Q., Shi, J. & Hou, Y. PPARδ agonist enhances colitis-associated colorectal cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **842,** 248–254 (2019).
37. Gupta, R. A. *et al.* Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-δ accelerates intestinal adenoma growth. *Nat. Med.* **10,** 245–247 (2004).
38. Jimenez, R. *et al.* The Role of Nrf2 Signaling in PPARβ/δ-Mediated Vascular Protection against Hyperglycemia-Induced Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018,** 1–12 (2018).
39. Toral, M. *et al.* Chronic peroxisome proliferator-activated receptorβ/δ agonist GW0742 prevents hypertension, vascular inflammatory and oxidative status, and endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *J. Hypertens.* **33,** 1831–1844 (2015).
40. Westergaard, M. *et al.* Expression and Localization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Nuclear Factor κB in Normal and Lesional Psoriatic Skin. *J. Invest. Dermatol.* **121,** 1104–1117 (2003).
41. Romanowska, M., Reilly, L., Palmer, C. N. A., Gustafsson, M. C. U. & Foerster, J. Activation of PPARβ/δ causes a psoriasis-like skin disease in vivo. *PLoS One* **5,** (2010).
42. Schmuth, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-β/δ

stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **122,** 971–983 (2004).

43. Kostadinova, R., Wahli, W. & Michalik, L. PPARs in Diseases: Control Mechanisms of Inflammation. *Curr. Med. Chem.* **12,** 2995–3009 (2005).
44. Barak, Y. *et al.* Effects of peroxisome proliferator-activated receptor on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99,** 303–308 (2002).
45. Michalik, L. *et al.* Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)α and PPARβ mutant mice. *J. Cell Biol.* **154,** 799–814 (2001).
46. Chong, H. C. *et al.* Regulation of epithelial-mesenchymal IL-1 signaling by PPARβ/δ is essential for skin homeostasis and wound healing. *J. Cell Biol.* **184,** 817–831 (2009).
47. Kaddatz, K. *et al.* Transcriptional profiling identifies functional interactions of TGFβ and PPARβ/δ signaling: Synergistic induction of ANGPTL4 transcription. *J. Biol. Chem.* **285,** 29469–29479 (2010).
48. Stockert, J. *et al.* Reverse crosstalk of TGFβ and PPARβ/δ signaling identified by transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* **39,** 119–131 (2011).
49. Stockert, J. *et al.* Regulation of TAK1/TAB1-Mediated IL-1β Signaling by Cytoplasmic PPARβ/δ. *PLoS One* **8,** (2013).
50. Adhikary, T. *et al.* The transcriptional PPARβ/δ network in human macrophages defines a unique agonist-induced activation state. *Nucleic Acids Res.* **43,** 5033–5051 (2015).
51. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21,** 938–945 (2015).
52. Győrffy, B. *et al.* Online Survival Analysis Software to Assess the Prognostic Value of Biomarkers Using Transcriptomic Data in Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS One* **8,** e82241 (2013).
53. Györffy, B. *et al.* An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **123,** 725–731 (2010).
54. Pollock, C. B. *et al.* PPARδ activation acts cooperatively with 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 to enhance mammary tumorigenesis. *PLoS One* **6,** (2011).

55. Adhikary, T. *et al.* Inverse PPARβ/δ agonists suppress oncogenic signaling to the ANGPTL4 gene and inhibit cancer cell invasion. *Oncogene* **32,** 5241–5252 (2013).
56. Müller, R. PPARβ/δ in human cancer. *Biochimie* **136,** 90–99 (2017).
57. Zuo, X. *et al.* Potentiation of colon cancer susceptibility in mice by colonic epithelial PPAR-δ/β overexpression. *J. Natl. Cancer Inst.* **106,** (2014).
58. Reed, K. R. *et al.* PPARδ status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine. *Oncogene* **23,** 8992–8996 (2004).
59. Fedorova, L. V. *et al.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Agonist, HPP593, Prevents Renal Necrosis under Chronic Ischemia. *PLoS One* **8,** (2013).
60. von Eckardstein, A. & Kardassis, D. *High Density Lipoproteins*. *Handbook of Experimental Pharmacology* **224,** (2015).
61. Tølbøl, K. S. *et al.* Metabolic and hepatic effects of liraglutide, obeticholic acid and elafibranor in diet-induced obese mouse models of biopsy-confirmed nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol.* **24,** 179–194 (2018).
62. Haczeyni, F. *et al.* The selective peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist seladelpar reverses nonalcoholic steatohepatitis pathology by abrogating lipotoxicity in diabetic obese mice. *Hepatol. Commun.* **1,** 663–674 (2017).
63. Bays, H. E. *et al.* MBX-8025, a novel peroxisome proliferator receptor-δagonist: Lipid and other metabolic effects in dyslipidemic overweight patients treated with and without atorvastatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96,** 2889–2897 (2011).
64. Tong, M. & Dominguez, C. Targeting Alzheimer's Disease Neuro-Metabolic Dysfunction with a Small Molecule Nuclear Receptor Agonist (T3D-959) Reverses Dise ase Pathologies. *J. Alzheimer's Dis. Park.* **6,** 1–19 (2016).
65. Iwaisako, K. *et al.* Protection from liver fibrosis by a peroxisome proliferator-activated receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109,** E1369–E1376 (2012).
66. Crunkhorn, S. Huntington disease: Boosting PPARδ blocks neurodegeneration. *Nat. Rev. Drug Discov.* **15,** 83–83 (2016).
67. Jones, D. Potential remains for PPAR-targeted drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9,** 668–669 (2010).
68. Adhikary, T. *et al.* Genomewide analyses define different modes of transcriptional regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-β/δ (PPARβ/δ). *PLoS One* **6,** (2011).
69. Milburn, M. V *et al.* Ligand biding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-γ. *Nature* **395,** 137–143 (1998).

70. Dj, M. & Rm, E. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83,** 841–50 (1995).
71. Wu, C.-C. *et al.* Structural basis for specific ligation of the peroxisome proliferator-activated receptor δ. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114,** E2563–E2570 (2017).
72. Xu, H. E. *et al.* Molecular Recognition of Fatty Acids By Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Mol. Cell* **3,** 397–403 (1999).
73. Wu, Y., Chin, W. W., Wang, Y. & Burris, T. P. Ligand and coactivator identity determines the requirement of the charge clamp for coactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ *J. Biol. Chem.* **278,** 8637–8644 (2003).
74. Artis, D. R. *et al.* Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106,** 262–267 (2009).
75. Xu, H. E. *et al.* Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARα. *Nature* **415,** 813–817 (2002).
76. Frkic, R. L. *et al.* PPARγ in Complex with an Antagonist and Inverse Agonist : a Tumble and Trap Mechanism of the Activation Helix PPAR g in Complex with an Antagonist and Inverse Agonist : a Tumble and Trap Mechanism of the Activation Helix. *ISCIENCE* **5,** 69–79 (2018).
77. Xu, H. E. *et al.* Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98,** 13919–13924 (2001).
78. Naruhn, S. *et al.* High-affinity peroxisome proliferator-activated receptor β/δ-specific ligands with pure antagonistic or inverse agonistic properties. *Mol. Pharmacol.* **80,** 828–38 (2011).
79. Lieber, S. *et al.* (Z)-2-(2-Bromophenyl)-3-{[4-(1-methyl-piperazine)amino] phenyl}- acrylonitrile (DG172): An Orally Bioavailable PPARβ/δ-Selective Ligand with Inverse Agonistic Properties. *J. Med. Chem.* **55,** 2858–2568 (2012).
80. Toth, P. M. *et al.* Development of improved PPARβ/δ inhibitors. *ChemMedChem* **7,** 159–170 (2012).
81. Lieber, S. *et al.* The Inverse Agonist DG172 Triggers a PPARβ/δ-independent Myeloid Lineage Shift and Promotes GM-CSF/IL-4-induced Dendritic Cell Differentiation. *Mol. Pharmacol.* 162–173 (2014).
82. Rubin, L. L. & de Sauvage, F. J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5,** 1026–1033 (2006).
83. Huang, P. *et al.* Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothened in Hedgehog

Signaling. *Cell* **166,** 1176–1187.e14 (2016).

84. Scales, S. J. & de Sauvage, F. J. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **30,** 303–312 (2009).
85. Lin, T. L. & Matsui, W. Hedgehog pathway as a drug target: Smoothened inhibitors in development. *Onco. Targets. Ther.* **5,** 47–58 (2012).
86. Schneider, J. W. *et al.* Small-molecule activation of neuronal cell fate. *Nat. Chem. Biol.* **4,** 408–410 (2008).
87. Souzaki, R. *et al.* Hedgehog signaling pathway in neuroblastoma differentiation. *J. Pediatr. Surg.* **45,** 2299–2304 (2010).
88. Schwarz, R. Massenspektrometrische Untersuchungen zur Struktur der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren- α und - β / δ. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2017).
89. Scheer, F. Entwicklung neuer selektiver inverser Agonisten für PPARβ/δ. (Philipps-Universität Marburg, 2013).
90. Rieck, M., Wedeken, L., Müller-Brüsselbach, S., Meissner, W. & Müller, R. Expression level and agonist-binding affect the turnover, ubiquitination and complex formation of peroxisome proliferator activated receptor β. *FEBS J.* **274,** 5068–5076 (2007).
91. Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., Mcgrath, W. J., Listwan, P. & Kobe, B. Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Sci.* **12,** 1313–1322 (2003).
92. Artis, D. R. *et al.* Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *PNAS* **106,** 262–267 (2009).
93. Persönliche Mitteilung von Dr. Benjamin Powell, Plexxikon Inc., Berkeley, California, U.S.A.
94. Berger, J. *et al.* Novel Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ and PPARδ Ligands Produce Distinct Biological Effects. *J. Biol. Chem.* **274,** 6718–6725 (1999).
95. Toth, P. M. *et al.* Design and Synthesis of Highly Active Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) β/δ Inverse Agonists with Prolonged Cellular Activity. *ChemMedChem* **11,** 488–496 (2016).
96. Wu, C.-C. *et al.* Structural basis for specific ligation of the peroxisome proliferator-activated receptor δ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114,** (2017).
97. Bao, R. M., Yang, H. M., Yu, C. M., Zhang, W. F. & Tang, J. B. An efficient

protocol to enhance the extracellular production of recombinant protein from Escherichia coli by the synergistic effects of sucrose, glycine, and Triton X-100. *Protein Expr. Purif.* **126,** 9–15 (2016).

98. GE Healthcare, HisTrap^{TM} FF, 1mL, 5 mL. *User Man.* 1–24 (2004).
99. Schwarz, R. *et al.* Monitoring conformational changes in peroxisome proliferator-activated receptor α by a genetically encoded photoamino acid, cross-linking, and mass spectrometry. *J. Med. Chem.* **56,** 4252–4263 (2013).
100. Schwarz, R., Tänzler, D., Ihling, C. H. & Sinz, A. Monitoring solution structures of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ upon ligand binding. *PLoS One* **11,** 1–20 (2016).
101. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C. & DeLucas, L. J. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **63,** 295–301 (2007).
102. McPherson, A. *et al.* An experiment regarding crystallization of soluble proteins in the presence of β-octyl glucoside. *J. Biol. Chem.* **261,** 1969–1975 (1986).
103. Anders, L. *et al.* Genome-wide determination of drug localization. **32,** 92–96 (2014).

Appendix

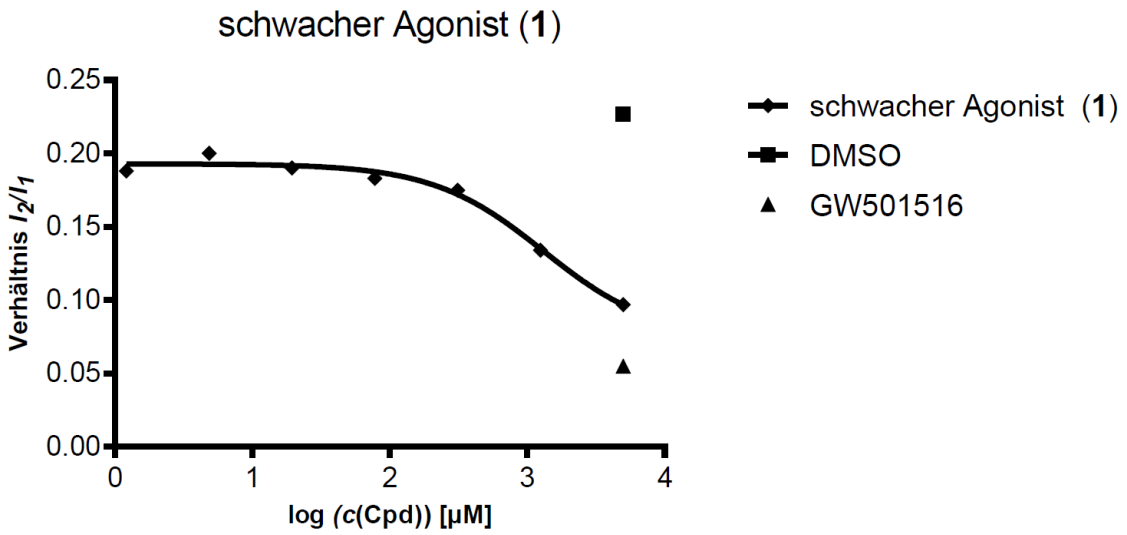


Diagramm 6: Untersuchung der biologischen Aktivität im *in vitro* Verdrängungs-FRET-Assay in einer Dosis-Abhängigkeit in acht Konzentrationen ausgehend von 2 µM mit einer 1:3-Verdünnung in DMSO (finaler Gehalt: 0,5%). Angegeben ist der Mittelwert aus dem technischen Triplikat und die Standardabweichung.

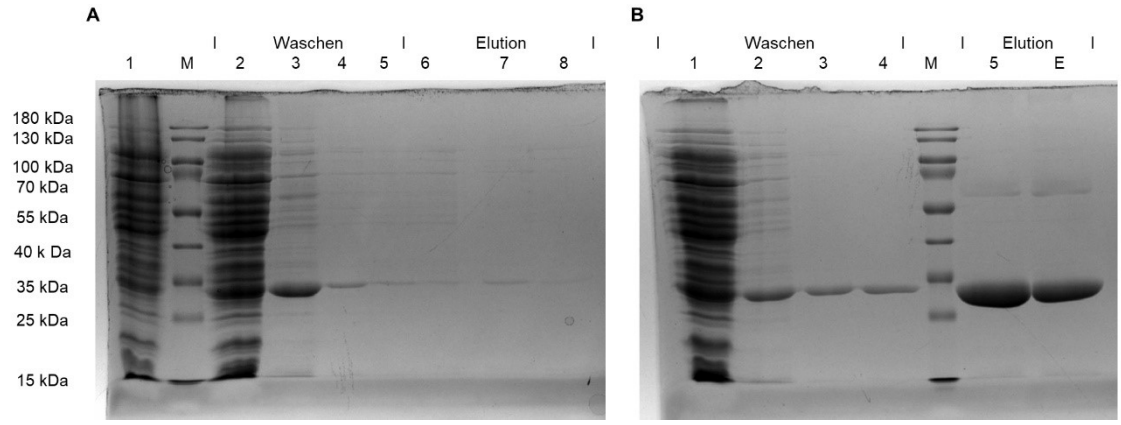


Abbildung 32: Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD in Gegenwart von 80 mM Imidazol während der Lyse und Aufreinigung. **A:** Erste Säule der affinitätschromatographischen Aufreinigung mit 80 mM Imidazol im Binde- und Waschpuffer, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, 1: Durchfluss, 2: erste Waschfraktion (nach 3 mL), 3: dritte Waschfraktion (nach 9 mL), 4: sechste Waschfraktion (nach 18 mL), 5: zehnte Waschfraktion (nach 30 mL), 6: Proteinsignal (sehr schwach), 7: zehnte Elutionsfraktion (nach 20 mL), 8: fünfte Elutionsfraktion (nach 10 mL); **B:** Zweite Säule der Aufreinigung bei 80 mM Imidazol, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung, 1: erste Waschfraktion (nach 3 mL), 2: dritte Waschfraktion (nach 9 mL), 4: sechste Waschfraktion (nach 18 mL), 5: zehnte Waschfraktion (nach 30 mL), E: Eluat. M = Proteinstandard.

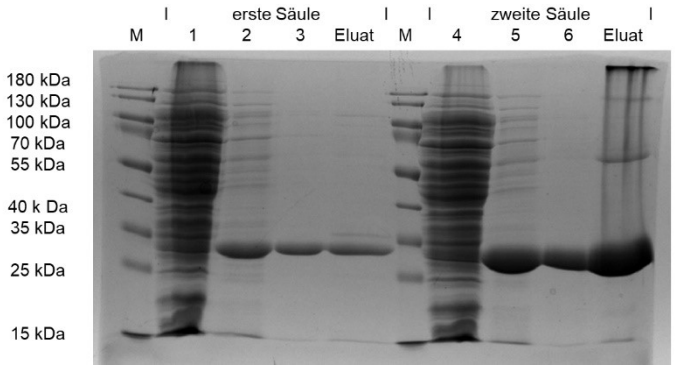


Abbildung 33: Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD in Anwesenheit von 100 mM Imidazol während der Zelllyse und Affinitätschromatographie, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung. 1-3: erste Säule, 1: erste Fraktion (nach 3 mL), 2: dritte Fraktion (nach 9 mL), 3: achte Fraktion (nach 24 mL), 4-6: zweite Säule, 4: erste Fraktion (nach 3 mL), 5: dritte Fraktion (nach 9 mL), 6: achte Fraktion (nach 24 mL). M = Proteinstandard.

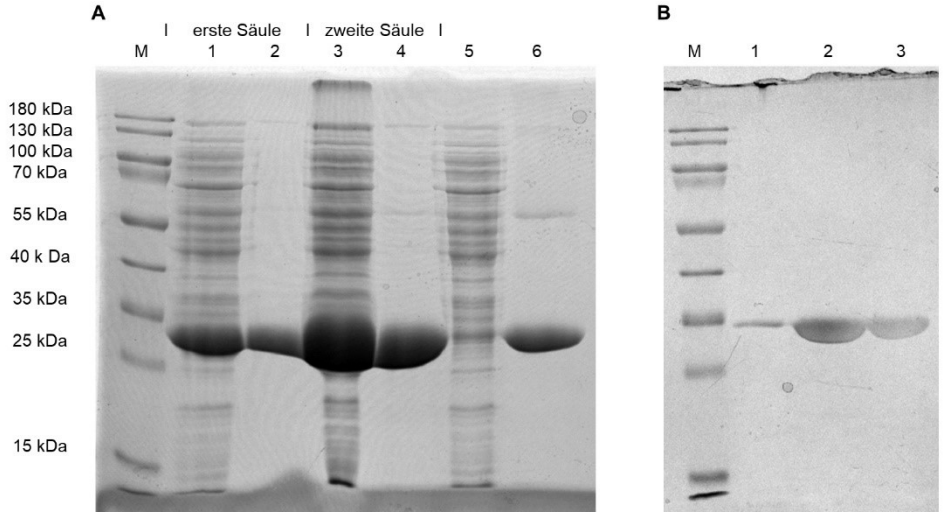


Abbildung 34: Erneute Proteinaufreinigung der HisPPARβ/δ-LBD bei 60 mM Imidazol während der Affinitätschromatographie nach gescheiterter Isolierung und Aufreinigung bei 80 mM und 100 mM. **A:** Affinitätschromatographie nach Dialyse aller gesammelten Fraktionen und Lösungen der gescheiterten Aufreinigung (80 mM, 100 mM Imidazol) auf 60 mM Imidazol, 15%-iges Gel mit Coomassie-Färbung. 1: erste Waschfraktion der ersten Säule, 2: Eluat der ersten Säule, 3: erste Waschfraktion der zweiten Säule, 4: Eluat der zweiten Säule, 5: erste Waschfraktion nach Wiederholung der ersten Säule, 6: Eluat der wiederholten Säule. **B:** Kationenaustauschchromatographie der wiederholten Aufreinigung von 80 mM, 100 mM bei 60 mM Imidazol, 15%-iges Gel mit Silberfärbung. 1: dritte Elutionsfraktion, 2: Eluat, 3: Elutionsfraktion 49. M = Proteinstandard.

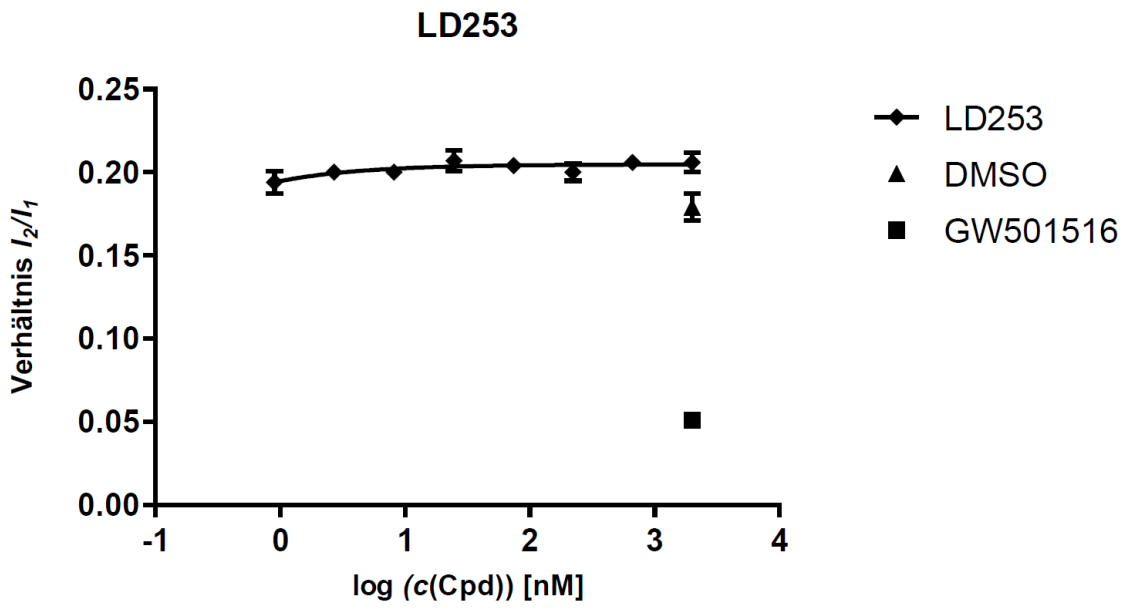


Diagramm 7: Untersuchung der biologischen Aktivität im *in vitro* Verdrängungs-FRET-Assay in einer Dosis-Abhängigkeit in acht Konzentrationen ausgehend von 2 µM mit einer 1:3-Verdünnung in DMSO (finaler Gehalt: 0,5%). Angegeben ist der Mittelwert aus dem technischen Triplikat und die Standardabweichung.

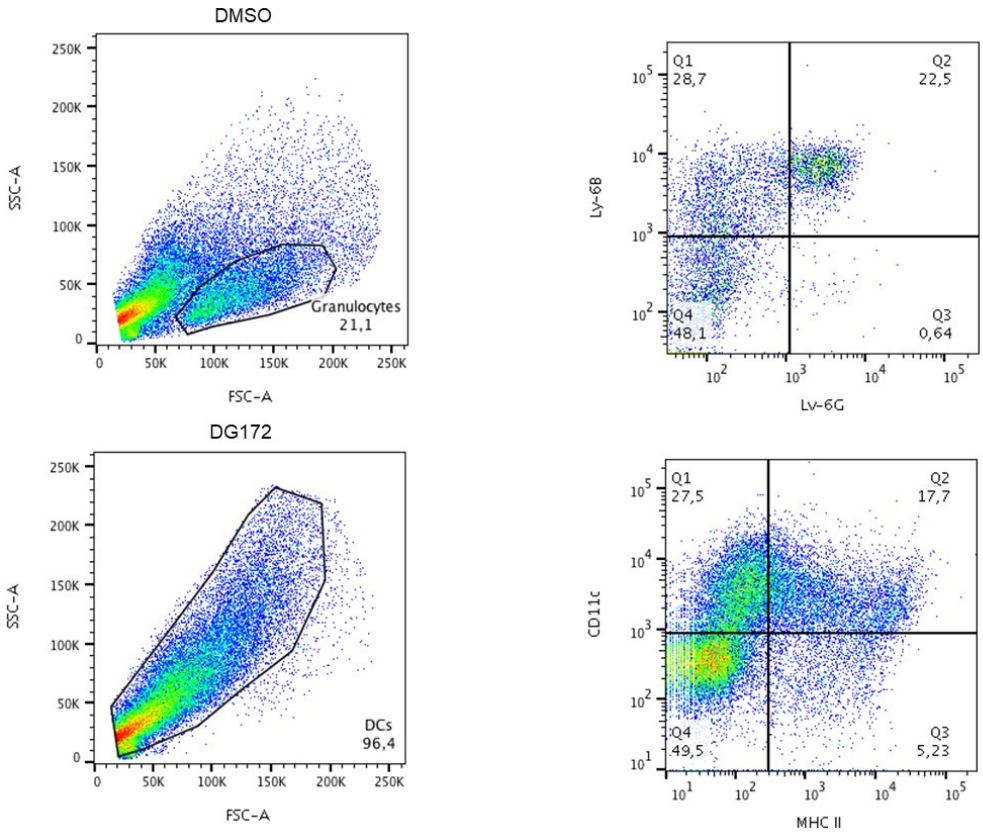


Diagramm 8: Zuordnung der Zellpopulationen der FACS-Analyse myeloider muriner Knochenmarkzellen nach Zugabe des Wachstumsfaktor GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) in Anwesenheit von **DG172** (500 nM). Bestimmung erfolgte über Oberflächenfärbung mit anti-CD11c und anti-MHC II, sowie anti-Ly-6G und anti-Ly-6B; die FACS-Messung wurde zusammen mit Dr. Lieber durchgeführt.

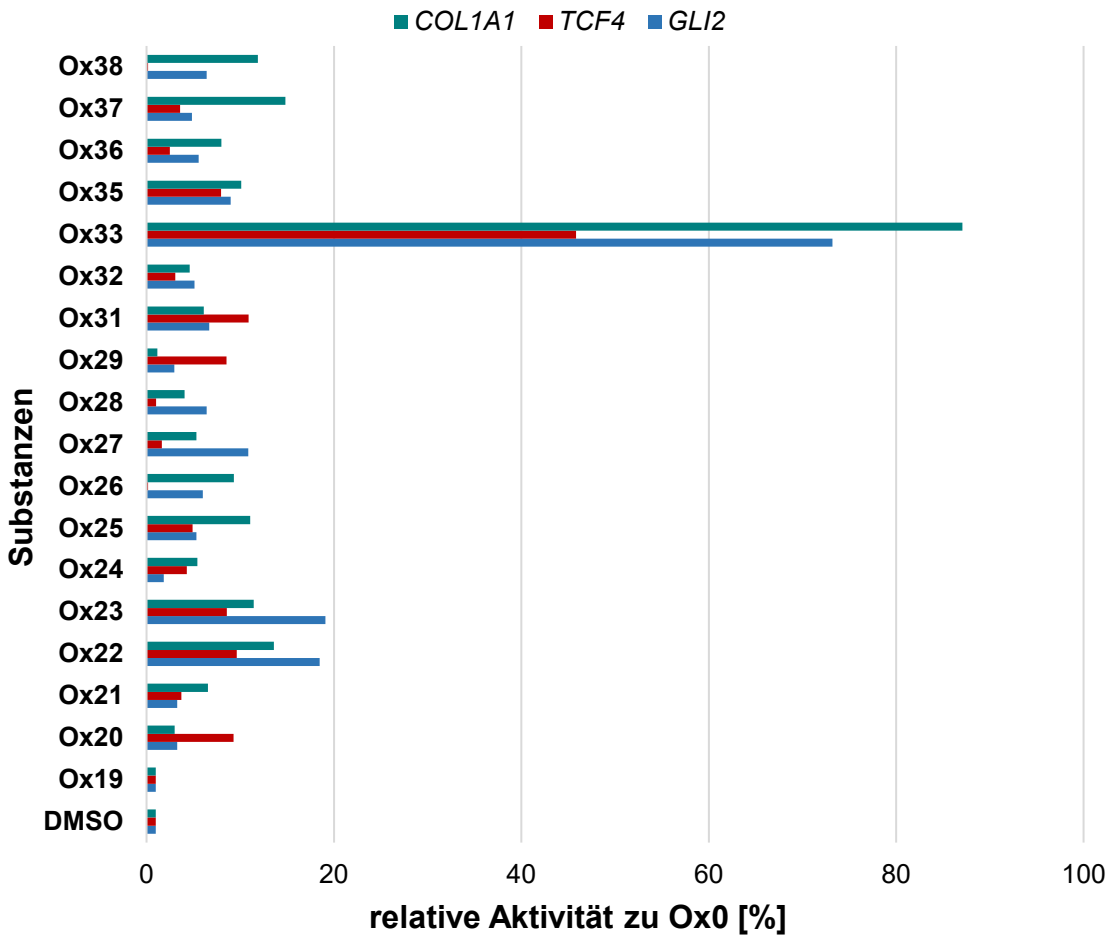


Diagramm 9: Relative Aktivität der getesteten Verbindungen im zellbasierten Assay zur Ausgangssubstanz **Ox0** (auf 100% gesetzt) zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR). Quantifizierung des mRNA-Expressionslevel von *GLI2*, *TCF4* und *COL1A1* mittels qRT-PCR nach 48 h Inkubation mit einer Konzentration *c*(Substanz) = 5 µM in Pa-Tu-8988T-Zellen. Die Aktivierung der Genexpression (*fold change*) wurde gegen die Negativkontrolle DMSO bezogen, welche prozentual auf die der **Ox0**-Aktivierung referenziert wurde. Als endogene Kontrolle zur Normalisierung der C_T-Werte diente der P_0, gemessen wurde im technischen Duplikat.

Sequenzierung: HisPPARβ/δ-LBD

```
# bin/lalign36 -E 10.0 -f -12 -g -2 ./wwwtmp/lalign26547.1.seq
./wwwtmp/lalign26547.2.seq -J -K 3
LALIGN finds non-overlapping local alignments
 version 36.3.5e Nov, 2012(preload8)
Please cite:
 X. Huang and W. Miller (1991) Adv. Appl. Math. 12:373-381

Parameters not available for: +5/-4: -12/-2
Query: ./wwwtmp/lalign26547.1.seq
  1>>>PPAR His 954 bp - 954 nt
Library: ./wwwtmp/lalign26547.2.seq
     1002 residues in     1 sequences

Statistics: (shuffled [500]) MLE statistics: Lambda= 0.0579;  K=0.00164
 statistics sampled from 1 (1) to 500 sequences
Threshold: E() < 10 score: 87
Algorithm: Smith-Waterman (SSE2, Michael Farrar 2006) (7.2 Nov 2010)
Parameters: +5/-4 matrix (5:-4), open/ext: -12/-2
```

```
 Scan time:  0.170

>>unmutiert 1002 bp                                          (1002 nt)
 Waterman-Eggert score: 4742;  405.1 bits; E(1) <  1.1e-116
99.8% identity (99.8% similar) in 954 nt overlap (2-954:1-954)

              10         20        30        40        50        60
PPAR   AATAATTTTGTTTA-CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGGCACCATCACCATCACCAC
       :::::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGGGCACCATCACCATCACCAC
               10        20        30        40        50        60

               70        80        90       100       110       120
PPAR   GGGAGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGTGGCCGACCTGAAGGCCTTCTCCAAGCACATCTAC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GGGAGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCGTGGCCGACCTGAAGGCCTTCTCCAAGCACATCTAC
               70        80        90       100       110       120

              130       140       150       160       170       180
PPAR   AATGCCTACCTGAAAAACTTCAACATGACCAAAAAGAAGGCCCGCAGCATCCTCACCGGC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti AATGCCTACCTGAAAAACTTCAACATGACCAAAAAGAAGGCCCGCAGCATCCTCACCGGC
              130       140       150       160       170       180

              190       200       210       220       230       240
PPAR   AAAGCCAGCCACACGGCGCCCTTTGTGATCCACGACATCGAGACATTGTGGCAGGCAGAG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti AAAGCCAGCCACACGGCGCCCTTTGTGATCCACGACATCGAGACATTGTGGCAGGCAGAG
              190       200       210       220       230       240

              250       260       270       280       290       300
PPAR   AAGGGGCTGGTGTGGAAGCAGTTGGTGAATGGCCTGCCTCCCTACAAGGAGATCAGCGTG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti AAGGGGCTGGTGTGGAAGCAGTTGGTGAATGGCCTGCCTCCCTACAAGGAGATCAGCGTG
              250       260       270       280       290       300

              310       320       330       340       350       360
PPAR   CACGTCTTCTACCGCTGCCAGTGCACCACAGTGGAGACCGTGCGGGAGCTCACTGAGTTC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti CACGTCTTCTACCGCTGCCAGTGCACCACAGTGGAGACCGTGCGGGAGCTCACTGAGTTC
              310       320       330       340       350       360

              370       380       390       400       410       420
PPAR   GCCAAGAGCATCCCCAGCTTCAGCAGCCTCTTCCTCAACGACCAGGTTACCCTTCTCAAG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GCCAAGAGCATCCCCAGCTTCAGCAGCCTCTTCCTCAACGACCAGGTTACCCTTCTCAAG
              370       380       390       400       410       420

              430       440       450       460       470       480
PPAR   TATGGCGTGCACGAGGCCATCTTCGCCATGCTGGCCTCTATCGTCAACAAGGACGGGCTG
       :::::::::::: ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti TATGGCGTGCACTAGGCCATCTTCGCCATGCTGGCCTCTATCGTCAACAAGGACGGGCTG
              430       440       450       460       470       480

              490       500       510       520       530       540
PPAR   CTGGTAGCCAACGGCAGTGGCTTTGTCACCCGTGAGTTCCTGCGCAGCCTCCGCAAACCC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti CTGGTAGCCAACGGCAGTGGCTTTGTCACCCGTGAGTTCCTGCGCAGCCTCCGCAAACCC
              490       500       510       520       530       540

              550       560       570       580       590       600
PPAR   TTCAGTGATATCATTGAGCCTAAGTTTGAATTTGCTGTCAAGTTCAACGCCCTGGAACTT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti TTCAGTGATATCATTGAGCCTAAGTTTGAATTTGCTGTCAAGTTCAACGCCCTGGAACTT
              550       560       570       580       590       600

              610       620       630       640       650       660
PPAR   GATGACAGTGACCTGGCCCTATTCATTGCGGCCATCATTCTGTGTGGAGACCGGCCAGGC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GATGACAGTGACCTGGCCCTATTCATTGCGGCCATCATTCTGTGTGGAGACCGGCCAGGC
              610       620       630       640       650       660

              670       680       690       700       710       720
PPAR   CTCATGAACGTTCCACGGGTGGAGGCTATCCAGGACACCATCCTGCGTGCCCTCGAATTT
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti CTCATGAACGTTCCACGGGTGGAGGCTATCCAGGACACCATCCTGCGTGCCCTCGAATTT
              670       680       690       700       710       720
```

```
              730       740       750       760       770       780
PPAR   CACCTGCAGGCCAACCACCCTGATGCCCAGTACCTCTTCCCCAAGCTGCTGCAGAAGATG
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti CACCTGCAGGCCAACCACCCTGATGCCCAGTACCTCTTCCCCAAGCTGCTGCAGAAGATG
              730       740       750       760       770       780

              790       800       810       820       830       840
PPAR   GCTGACCTGCGGCAACTGGTCACCGAGCACGCCCAGATGATGCAGCGGATCAAGAAGACC
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GCTGACCTGCGGCAACTGGTCACCGAGCACGCCCAGATGATGCAGCGGATCAAGAAGACC
              790       800       810       820       830       840

              850       860       870       880       890       900
PPAR   GAAACCGAGACCTCGCTGCACCCTCTGCTCCAGGAGATCTACAAGGACATGTACTAATAA
       ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GAAACCGAGACCTCGCTGCACCCTCTGCTCCAGGAGATCTACAAGGACATGTACTAATAA
              850       860       870       880       890       900

              910       920       930       940       950
PPAR   GGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCA
       :::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
unmuti GGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCA
              910       920       930       940       950
```

Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Strukturelle und funktionelle Charakterisierung neuartiger Transkriptionsmodulatoren“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 02.01.2019

_____

(Unterschrift Iris Nee)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	Ångström
BSA	Bovines Serumalbumnin (*bovine serum albumin*)
bzw.	beziehungsweise
c	zyklisch
c	Konzentration *c*
C	Celsius
d	Tag
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, englisch: *deoxyribonucleic acid*
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
etc.	*et cetera*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales bovines Serum
fw	Vorwärtsgerichtet (*forward*)
g	Gramm
h	Stunde (*hour*)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC_{50}	Konzentration der halbmaximalen Inhibierung (*inhibitory concentration*)
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
k	kilo
L	Liter
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
M	mol L^{-1}
m	milli

µ	mikro
min	Minute
NR	Nuklear-Rezeptor
OAc	Acetat
OD	optische Dichte
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Pinicillin Streptomycin
pH	*Potentia hydrogenii*
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	*PPAR response element*
Ptch1	*Patched protein 1*
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*)
R	Rest
RNA	Ribonukleinsäure
rv	Rückwärtsgerichtet (*reversed*)
s	Sekunde
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung (*structure activity relationship*)
sek.	sekundär
Smo	smoothened
s.o.	siehe oben
t	tert-
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (*weight per volume*)

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde im Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg angefertigt. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wibke Diederich für die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis, für dieses interessante Promotionsthema und ihre ausgezeichnete Unterstützung durch die vielen Diskussionen und hilfreichen Denkanstöße. In dieser Zeit konnte ich wichtige Erfahrungen sammeln und mich durch internationalen Wissensaustausch weiterentwickeln.

Insbesondere danke ich PD Dr. Till Adhikary für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die hervorragende Betreuung und Unterstützung durch zahlreiche gute Gespräche und Anregungen. Außerdem danke ich für die Hilfe bei der Klonierung und vor allem für die norddeutsche Verstärkung im Labor.

Prof. Dr. Klaus Reuter danke ich für die Übernahme des dritten Gutachtens und Prof. Dr. Carsten Culmsee für die Bereitschaft den Vorsitz der Prüfungskommission zu übernehmen.

Außerdem danke ich Dr. Vasundara Srinivasan und Ralf Pöschke vom MarXtal Kristallisationslabor der Philipps-Universität für das zügige Durchführen der Kristallisationsscreens sowie für die hilfreichen fachlichen Ideen zur Umsetzung und Planung der Experimente.

Für die schöne Zusammenarbeit, gute Einführung und tolle Unterstützung bei der Isolierung und FACS-Analyse der Knochenmarkzellen möchte ich mich besonders bei Dr. Sonja Lieber bedanken. Vielen Dank, dass du dir immer Zeit für meine Fragen genommen hast.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Wibke Diederich, PD Dr. Till Adhikary, PD Dr. Matthias Lauth, Dr. Sonja Lieber, Dr. Annika Unger, Nathalie Legrand und Kevin Kusmierek, dass ihr euch die Zeit genommen habt und unermüdlich meine Arbeit Korrektur gelesen habt. Den Vertiefungspraktikanten während meiner Promotion, Matthias Franz und Ngaha Ngaha Sandrine Armel, möchte ich mich für die gute Mitarbeit und ihren fleißigen Einsatz bedanken. Ein großer Dank gebührt Phil Hochban für seine unerschütterliche Motivation und tatkräftige Unterstützung im Labor. Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der AG Diederich, AG Müller, AG Lauth, AG Pogge, AG Reinartz und AG Klebe für die unzähligen fachlichen Ideen und Gespräche und das Aushelfen mit Gerätschaften und Reagenzien, vor allem Lukas Dempwollf für die gute Zusammenarbeit bei unserem Projekt. Außerdem danke ich Christian Sohn für seinen tatkräftigen und

ausdauernden Einsatz, um ein zickiges Gerät wieder zum Laufen zu bringen. Ein herzlicher Dank gilt dem wahren Chef des Labors Bernhard Wilke, der immer für jedes Problem eine hervorragende Lösung parat hat und ohne dem nichts läuft. Vielen Dank für die stete Hilfsbereitschaft im Labor sowie den fachlichen Rat und die nützlichen Anregungen.

Für die sehr angenehme und heitere Arbeitsatmosphäre möchte ich mich herzlichst bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Diederich Michael Daude, Kerstin Mark, William Scanlan, Lukas Heyder, Lukas Dempwolff, Lukas Eberhart, Andreas Schmidt, Magdalena Lauer, Claudia Heerklotz sowie meinen Laborkollegen Nathalie Legrand, Bernhard Wilke, Dr. Till Adhikary und Dr. Annika Unger bedanken. Insbesondere danke ich für die vielen angeregten (nicht-)fachlichen Diskussionen, besonders die grandiosen Freitagsgespräche werden mir immer in Erinnerung bleiben!

Ein herzliches Dankeschön an meine Familie und Freunde, die immer ein offenes Ohr für mich haben, an Kevin für dein Verständnis, deine Unterstützung als mein Ruhepol und deine Liebe. Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich stets unterstützen und immer an mich glauben. Ich hab‘ euch lieb!

Danke euch allen!

Lebenslauf

Iris Nee

Die Seite 126 des Lebenslaufs enthält persönliche Daten und ist daher nicht Bestandteil der Veröffentlichung.