

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Klonierungs- und Expressionsversuche dieser Arbeit wurden in folgenden Stämmen von *Escherichia coli* durchgeführt.

- **DH5 α** [®]: Klonierung (Invitrogen)
- **BL21**: IPTG induzierte Expression (Novagen)
- **BL21(DE3)**: IPTG induzierte Expression (Novagen)
- **BL21 Star**[®](DE3): IPTG induzierte Expression (Novagen)

2.1.2 Klonierungsvektoren

- **pDONR**[®]**201**: Gateway System BP-Reaktion, Kan Resistenz (Invitrogen)

2.1.3 Expressionsvektoren

- **pDest**[®]**15**: N-terminal GST-Fusionsvektor, T7 Promotor, Amp Resistenz Gateway System LR-Reaktion (Invitrogen)
- **pDest**[®]**17**: N-terminal 6 x His Fusionsvektor, T7 Promotor, Amp Resistenz Gateway System LR-Reaktion (Invitrogen)
- **pQTEV**: 6 x His Fusionsvektor, T7 Promotor, Amp Resistenz, TEV-Protease Schnittstelle (Proteinstrukturfabrik, Berlin)

2.1.4 Puffer und Lösungen

- **TE Puffer**: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
- **TAE Agarosegelpuffer (20x)**: 484,4 g Tris-HCl, 114 ml Eisessig, 372 g EDTA, ad 5 Liter, pH 7,8
- **Agarose-Gelladepuffer**: Bromphenolblau 0,2 % (w/v), 1 mM EDTA, pH 8,0, Glycerol 50 % (w/v)

- **4x Laemmli Probenpuffer (20ml):** 5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 4 ml Glycerol, 8 ml 10 % SDS, 2 ml 0,1 % Bromphenolblaulösung, 1 ml β -Mercaptoethanol, ad 20 ml
- **Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8
- **Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8
- **SDS-Page Laufpuffer (5x):** 3,25 g Tris-HCl, 14,4 g Glycine, 1 g SDS ad 1 Liter, pH 8,8
- **Coomassie Brilliant blue Färbelösung:** 400 ml Ethanol, 70 ml Essigsäure, 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R 250 ad 1 Liter
- **Entfärbelösung:** 300 ml Ethanol, 70 ml Essigsäure ad 1 Liter

- **His-Aufschlusspuffer :** 20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, $\frac{1}{2}$ Tablette Protease Inhibitor Mix complete[®] EDTA-free (Roche), pH 8. Dieser Aufschlusspuffer (dann ohne Protease-Inhibitor) wurde auch zum Spalten des Fusionsproteins mit Precision[®] Protease verwendet. Je nach Bedarf wurde dem Puffer dann 1-5 mM DTT zugesetzt
- **His-Elutionspuffer :** 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Stufengradient für Imidazol: Endkonzentration 500 mM
- **TEV-Protease Spaltpuffer:** 20 mM Tris-HCL, 500 mM NaCl, pH 8
- **GST- Fusionspuffer A:** 140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 1 mM DTT
- **GST-Fusionspuffer B:** 50 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10 mM reduziertes Glutathion
- **Gelfiltrationspuffer:** Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM
- **NMR-Puffer: 20 mM NaP_i, 150 mM NaCl, 0,02 % NaN₃**
Der pH des NMR Puffers variierte zwischen 5,5 und 7,2 in Abhängigkeit vom pI des jeweils verwendeten Proteins.

2.1.5 Medien

- **Spurenelementlösung (500ml):** 2,5 mg EDTA, 0,25 g FeSO₄, 25 mg ZnCl₂, 5 mg CuSO₄, pH 7,5-7,7
- **M9-Salz (10x Stammlösung):** 80 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 20 g KH₂PO₄, 5 g NaCl
- **LB-Medium:** 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH 7,4, ad 1 Liter, autoklaviert

- **LB-Agarplatten:** 1,5 g Agar auf 100 ml LB-Medium, pH 7,4, autoklaviert
- **Minimalmedium:** 10 ml Spurenelementlösung, 100 ml M9-Salz (10x), 1 ml 1 M MgSO₄, 0,3 ml 1 M CaCl₂, 1,5 ml 1 mg/ml Thiamin-HCl, 1,5 ml 1 mg/ml Biotin, 20 ml 20 % Glukose (10 ml 20 % ¹³C₆-Glukose für ¹³C-markiertes Minimalmedium), 2 ml 1 g / 4 ml NH₄Cl (¹⁵NH₄Cl für ¹⁵N-markiertes Medium), ad 1 Liter H₂O bzw. D₂O (für die deuterierte SEP Probe wurde für die Herstellung der Medienzusätze ebenfalls D₂O verwendet), pH 7,2-7,4, bei Bedarf Antibiotikum zugesetzt
- **Antibiotika und Medienzusätze**

Medienzusatz	Stammlösung	Flüssigmedium	Agarplatten
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml H ₂ O	100 µg/ml H ₂ O
Tetracyclin (Tet)	10 mg/ml EtOH	10 µg/ml EtOH	10 µg/ml EtOH
Kanamycin (Kan)	30 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml H ₂ O	30 µg/ml H ₂ O
IPTG	100 mM H ₂ O	0,1-1,0 mM H ₂ O	

Das Antibiotikum richtet sich nach der vom Vektor kodierten Resistenz.

2.1.6 Synthetische Peptide

Die Ermittlung des NMR-Strukturkomplexes aus der WW-Domäne von *hGas7* (*growth-arrest-specific protein 7*) und dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL erfolgte an synthetisch hergestellten Peptiden und Proteinen. Diese wurden mir freundlicherweise von Dr. Livia Otte aus der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener (Abt. Medizinische Immunologie, Charite, Berlin) und von Dr. Michael Beyermann aus der Arbeitsgruppe Bienert (FMP, Berlin) zur Verfügung gestellt.

- *hGas7* (unmarkiert):
Ac-ILPPGWQSYLSPQGRRYYVNTTTNETTWERPS-NH₂
- Poly-P-Ligand (unmarkiert):
Ac-LIPPPPPL-NH₂
- Poly-P-Ligand (uniform markiert mit ¹⁵N-L-Proline-U-¹³C₅):
Ac-LIPP₄P₆PI-NH₂

2.2 Molekularbiologische Methoden

Für die NMR-Spektroskopie ist es notwendig, Proteinmengen im Milligramm Mengen Maßstab herzustellen. Dazu verwendet man leistungsfähige Expressionssysteme für die rekombinante Proteingewinnung. In dieser Arbeit wurde das Gateway[®] System von Invitrogen (www.invitrogen.com) zur Herstellung von Entryvektoren und Expressionsplasmiden, der zu untersuchenden Proteindomänenkonstrukte, verwendet. Das Gateway[®] System nutzt die sequenzspezifischen Rekombinationsreaktionen des Lambda-Phagen zur Einführung von Genen in die entsprechenden Plasmide anstelle der klassischen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen. Der Vorteil dieses Systems besteht darin, dass es unter Beibehaltung der Orientierung eine direkte Klonierung von Genen aus dem Entryvektor in verschiedene Expressionsvektoren (Destinationsvektoren) ermöglicht. Diese rekombinante Klonierungsstrategie basiert auf der BP- und LR-Reaktion (Gateway[®] Nomenklatur). Dabei wird mit Hilfe des Enzymgemisches Clonase[®] bestehend aus Int (Integrase) und Xis (Excisionase) des Lambda-Phagen und dem *E.coli* Protein IHF (Integration Host Factor) die in vitro Rekombination vollzogen.

Zunächst wurden mittels PCR (polymerase chain reaction) die gewünschten Domänenkonstrukte aus den cDNA-Plasmiden mit den spezifischen Überlappungsenden attB1 und attB2 inklusive einer N-terminalen PreScission Protease-Schnittstelle amplifiziert. Die PCR Produkte wurden über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und mit dem Entryvektor pDONR[®] des Gateway[®] Systems in der BP-Reaktion rekombiniert. Anschließend wurden die Entryvektoren in kompetente DH5 α -Zellen transformiert und auf Selektionsagarplatten mit Kanamycin ausplattiert. Übernacht gewachsene Klone wurden auf das spezifische Insert mit PCR-Koloniescreening überprüft. Positive Klone wurden übertag wachsen gelassen und anschließend einer Plasmidpräparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen) unterzogen.

Die gewonnenen Entryklonplasmide wurden in einer zweiten Rekombinationsreaktion, der LR-Reaktion, in Expressionvektoren mit N-terminalen Fusionsproteinen pDest15[®] (GST) oder pDest17[®] (6xHis) übergeführt. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden dann in kompetente Expressionszellen transformiert und auf Ampicillin enthaltende Selektionsagarplatten ausgestrichen. Übernacht gewachsene Klone wurden in einem Expressionstest mit anschließender SDS-Page-Gelelektrophorese hinsichtlich der Größe, Expressionsstärke und Löslichkeit untersucht. Die Klonierungsreaktionen wurden nach den Protokollen von Invitrogen durchgeführt.

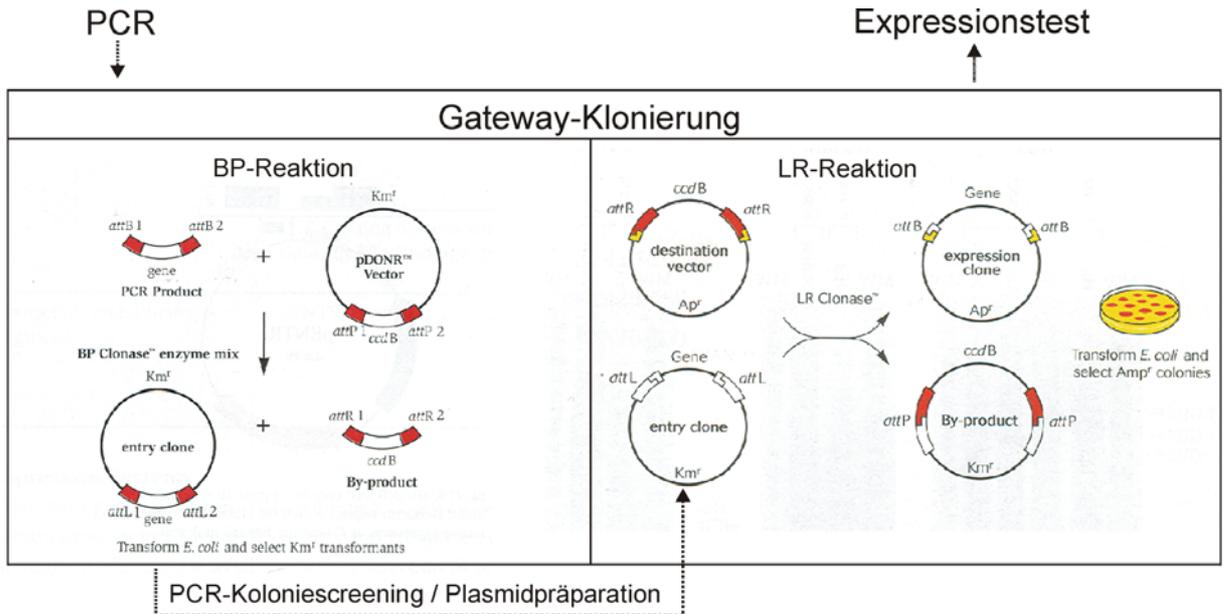


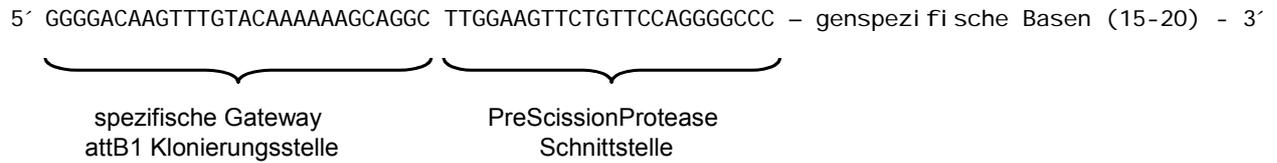
Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der Generierung von Plasmid-Expressionskonstrukten mit Hilfe des Gateway® Systems (siehe invitrogen.com). In der BP-Rekombinations-Reaktion wurden ausgehend vom PCR-Produkt als Hauptprodukt *entry clone* über die spezifischen attB1/attB2 Klonierungsstellen mit dem pDONR® Vektor erzeugt. Nach anschließender Transformation in *E.coli* DH5 α -Zellen und Selektion auf Kan-Antibiotika enthaltenen Agarplatten wurden in der LR-Reaktion die aufgereinigten *entry clone* Plasmide aus der BP-Reaktion mit dem entsprechenden Expressionsplasmiden pDest15® und pDest17® (*destination vector*) über die attL/attR Klonierungsstellen rekombiniert. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden erneut in *E.coli* Expressionszellen transformiert und auf Antibiotika haltigen Amp-Agarplatten selektioniert. Anschließend werden die gewachsenen Kolonien in einem Expressionstest hinsichtlich ihrer Größe, Expressionsstärke und Löslichkeit charakterisiert.

2.2.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

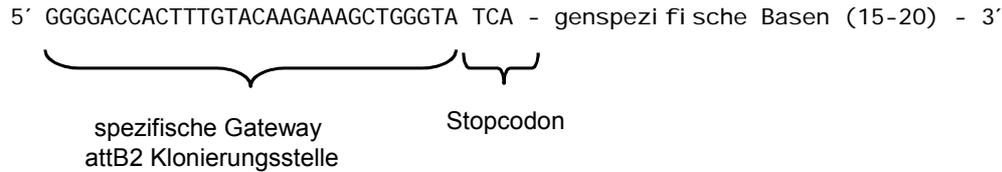
Mit Hilfe der PCR wurden die DNA-Fragmente der RUN-Domänenkonstrukte mit den spezifischen Überlappungsabschnitten attB1 und attB2 für die weitere Verwendung mit dem Gateway® System erzeugt. Der Vorwärtsprimer wurde so konzipiert, dass eine zusätzliche PreScissionProtease (Amersham Biosciences) Schnittstelle am Tag und N-Terminus des Konstruktes eingeführt wird. Nach dem Reinigungsprozeß ist es dadurch möglich nach Abspaltung des Fusionspartners das Proteindomänenkonstrukt isoliert zu untersuchen.

Die Oligonukleotidsequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden wie folgt gewählt:

Vorwärtsprimer



Rückwärtsprimer



Für die PCR-Experimente wurde folgendes Programm verwendet:

Ablauf	Temperatur in °C	Zeitdauer	Zyklenzahl
Heißstart	95	5'	1
Denaturierung	95	30''	30
Annealing	50-67	30''	30
Amplifizierung	72	30''	30
terminale Auffüllreaktion	72	10'	1
Stop	4	∞	1

Die Anlagerungstemperatur (*annealing temperature*) der spezifischen Primerpaare wurde entsprechend den Reaktionsbedingungen für die jeweilige Reaktion modifiziert. Das verwendete Reaktionsvolumen pro Reaktionsansatz betrug 50 µl. Die PCR wurde laut Herstellervorgaben (Invitrogen) durchgeführt mit *proofreading* Polymerasen (Platinum® Pfx DNA Polymerase, Invitrogen; Platinum®Taq DNA Polymerase, Life Technologies). Je nach Verlauf der PCR wurden einzelne Reaktionsparameter des Reaktionsansatzes optimiert hinsichtlich Mg²⁺-Konzentration, Annealingtemperatur und Pufferlösung. Alle Primerlösungen für die PCR wurden auf 30 pmol/µl mit TE-Puffer eingestellt. Jeweils 1 µl des Hin- und Rückprimers wurde zum PCR-Ansatz pipettiert. Als DNA-Matrizen wurden aufgereinigte Plasmide der entsprechenden cDNA verwendet.

Folgende cDNA Plasmide wurden in Form von *E.coli*-Agardauerkulturen vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD, www.rzpd.de) bezogen.

Proteinname	Plasmidbezeichnung
Q9NT69	DKFZ p761D051q3/pSport 1
KIAA1091	Iralp962M2226
KIAA0397	RPCIP704H23125
Q9UF50	DKFZp434A1727
Q96C34	Irakp961N0326/pCMV-Sport 6
BC008078	Iralp962 G2410
NESCA	Iralp962N097/pOTB7
RUFY1	Imagp998JO59736 Imagp998A218605

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Herstellung der Agarosegele wurde die abgewogene Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der aufzutrennenden DNA-Fragmentgröße (Sambrook, 1989). Die noch heiße Agaroselösung wurde in abgedichtete Gelschiffchen mit Probenkamm gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die aufzutrennenden DNA-Proben inklusive Gelladepuffer aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in 1 x TAE-Puffer. Zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Transilluminator der Marke Lumi-Imager F1[®] (Boehringer Mannheim, Mannheim) analysiert. PCR-Produkte und Plasmide wurden bei Bedarf für weitere Klonierungsschritte über Agarosegele aufgereinigt und aus dem Gel isoliert. Dazu wurden die spezifischen Banden aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA-Fragmente mit dem QIAquick PCR Purification[®] (Qiagen) oder Rapid Gel Extraction[®] Kit (Lifetech) aufgefangen.

2.2.3 Transformation der Plasmide in chemisch kompetente Zellen

Die gewonnenen Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren wurden in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (Sambrook, 1989) transformiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA zusammen mit einem Aliquot kompetenter Zellen 10 Minuten auf Eis gestellt. Zur Transformation wurde die Plasmid-Zellmischung 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Nach dem Hitzeschock wurde die Mischung sofort wieder auf Eis gestellt und nach 2 Minuten mit 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikazusatz versetzt. Die Zellen wurden dann bei

37°C eine Stunde lang schüttelnd inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde kurz abzentrifugiert, das Zellpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf Selektionsagarplatten ausgestrichen. Übernachten wurden die LB-Agarplatten bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA für die Herstellung von Klonierungs- und Expressionsvektoren erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit[®] und QIAprep Midi Kit[®] (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.4.1 Photometrische Bestimmung von DNA Präparationen

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA Reinheit und Menge wurde eine 1/10 und eine 1/50 Verdünnung der Ausgangslösung hergestellt. Danach wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (DNA-Absorptionsmaximum) und 280 nm (Proteinanteil) gemessen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde aus beiden Größen der Quotient gebildet. Der erhaltene Wert sollte für eine saubere DNA Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde davon ausgegangen, dass eine Extinktion von 1 bei 260 nm 50 ng Doppelstrang-DNA entspricht.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden durch Messung der Absorption der Proteinlösung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz $A_{280} = c * d * \epsilon$, wurde die unbekannte Proteinkonzentration c [$\text{mol} * \text{l}^{-1}$] berechnet, wobei A die Absorption bei 280 nm, d die Küvettenlänge [cm] und ϵ der molare Extinktionskoeffizient [$\text{l} * \text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$] ist. Der molare Extinktionskoeffizient wurde ermittelt auf Basis der Proteinsequenz mit Hilfe des ProtParam Protokolls (www.expasy.ch).

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) wurde durchgeführt in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Laemmli, 1970). Die Proteinproben wurden mit SDS-haltigen 4x Laemmli Probenpuffer gemischt, bei 95° C für 5' aufgekocht und anschließend in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese lief bei 40 mA für ca. 30'. Darauf wurden die Proteingele nach der Methode von Wilson mit Coomassie Brilliant Blau

Färbelösung für 20' inkubiert (Wilson, 1983). Zum Entfärben wurde das Gel solange mit Entfärbelösung behandelt bis die blaue Hintergrundfarbe ausgewaschen war.

2.3.3 Proteinexpression und Reinigung

Die generierten Expressionsplasmide der Domänenkonstrukte wurden zunächst auf ihr Expressionsverhalten hinsichtlich richtiger Größe, Expressionsstärke und Löslichkeit überprüft. Dazu wurden Testexpressionen tagsüber in LB-Vollmedium im 0,5-3 ml Maßstab im Kulturröhrchen bzw. in 4 x 24 *deep well* Platten durchgeführt bei 20°, 25° und 30° C. Weitere getestete Parameter waren IPTG-Konzentration (0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM), Expressionsdauer (2-6h) und eine weitere Temperatur (16°C) . Die Analyse der Testexpression erfolgte zunächst an Standard SDS-Page-Gelen und später an Hochdurchsatzmethoden im analytischen Maßstab an übergroßen SDS-Page-Gelen mit bis zu 102 Probestaschen. Für das Screening nach geeigneten Expressionskonstrukten wurde versucht, die Zahl der Experimente im 96er Format durchzuführen mit Hilfe von im Handel erhältlichen immobilisierten Gluthathion oder Nickel-chelatierter Scheiben (SwellGel® Discs, Pierce Biotechnology). Diese Einlagen erlauben es 96 Proteinextrakte über Nickelchelate- oder Gluthathionsäulenblöcke aufzureinigen. Lösliche Expressionskonstrukte wurden dann im 2 Liter Maßstab bei den am besten ermittelten Bedingungen in LB- und Minimalmedium exprimiert. Für die Proteinaufreinigung der His- bzw. GST-Fusionsproteine wurden jeweils standardisierte Reinigungsverfahren (GE Healthcare) verwendet.

2.3.3.1 RUN-Konstrukt (1-180) aus dem humanen Protein RUFY 1

Das RUN-Konstrukt aus dem humanen Protein RUFY1 wurde mittels PCR aus dem cDNA Plasmid IMAGp998A218605 amplifiziert erhältlich vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung Berlin (www.rzpd.de). Das Konstrukt setzt sich zusammen aus einem N-Terminalen 6 x His-Tag, der über eine eingeführte PreScissionProtease Schnittstelle von der spezifischen Aminosäuresequenz abgespalten werden kann. Nachfolgend ist die Aminosäuresequenz des RUN-Konstruktes für das humane Protein RUFY 1 aufgeführt:

- **RUN-Konstrukt (1-180)**

```
MMEERANLMHMMKLSIKVLLQSALSLGRILDADHAPLQQFLVMEHCLKHGLKVK  
KSFIGNKNSFFGPLELVEKLCPEASDIATSVRNLPELKTAVGRGRAWLYLALMQKL  
ADYLVKVLIDNKHLLSEFYEPEALMMEEEGMVIVGLLVGLNVLNLDANLCLKGEDLDSQ  
VGVIDFSLYLKD
```

Das RUN-Konstrukt mit den Resten 1-180 aus dem humanen Protein RUFY 1 (Q96T51) wurde ausgehend von einer Glyceroldauerkultur (-80°C) zunächst in einer Übertagkultur mit 3 ml LB Medium angeimpft und bei 30°C, 180 rpm und dem Antibiotikum Ampicillin bis zur erkennbaren Trübung wachsen gelassen. Anschließend erfolgte die Animpfung einer 50 ml Übernachtskultur bei gleichen Bedingungen. Die Expression des RUN-Domänenkonstruktes erfolgte schließlich in 4 x 400 ml Schüttelkolben bei 30°C. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,9 erfolgte die Induktion mit IPTG bei einer Endkonzentration von 0,5 mM. Vor der Induktion wurde die Temperatur auf 16°C reduziert und die Zellsuspension nach einer vier stündigen Induktionszeit bei 6000 rpm, 4°C, für 10' in einer Beckman Zentrifuge abzentrifugiert und mit 0,9 % steriler NaCl Lösung gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 8 ml His-Aufschlusspuffer resuspendiert und 2 x mit einer FrenchPress aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation bei 20000 rpm, 4°C, 30' wurde der Überstand über ein 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺-Chelat-Säule (MC Poros, Applied Biosystems) geladen und mit His-Elutionspuffer eluiert. Nach der Affinitätschromatografie wurden die Proben der einzelnen Fraktionen über 15 % SDS-Page Gele kontrolliert und die Fraktionen mit dem Fusionsprotein vereinigt. Mit Ultrafiltration (Vivaspin, Membran 10 MWCO) gegen den His-Aufschlusspuffer aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde dann über Nacht im Kühlschrank mit der PreScissionProtease inkubiert. Für 1 mg Fusionsprotein wurden 5 U Protease eingesetzt. Nach kontrollierter Abspaltung des His-Tags über SDS-Page wurde die Proteinlösung in einem zweiten Ni²⁺-Chelat- Säulen Affinitätschromatographieschritt aufgereinigt (MC Poros, Applied Biosystems). Die RUN Domänenkonstrukt-Proteinlösung wurde dann gegen den NMR Puffer mit Ultrafiltration umgepuffert und aufkonzentriert.

Die ¹⁵N und die ¹³C/¹⁵N markierten Proben wurden im Silantes Vollmedium OD2N bzw. CN exprimiert. Alle weiteren Expressionen erfolgten in den entsprechenden Medien wie in 2.1.5 beschrieben.

2.3.3.2 SEP-Konstrukte des humanen Protein p47

Die Expressionplasmide pQTEV für die SEP-Konstrukte wurden freundlicherweise im Rahmen der Kollaboration mit der Proteinstrukturfabrik Berlin von Dr. Konrad Büssow zur Verfügung gestellt. Beide Konstrukte wurden aus einer *human foetal brain cDNA library* in den Expressionvektor pQTEV (GenBank Accession No. AY243506) kloniert. Die Konstrukte sind nach folgender Reihenfolge aufgebaut: N-terminaler 6 x His-Tag/TEV-

Protease-Schnittstelle/spezifische Aminosäuresequenz. Die humanen p47 SEP-Domänenkonstrukte (NM 016143) kodieren für folgende Aminosäuresequenzen:

- **Konstrukt 1: human p47 (179-270)**

DVHVVLKLWKSGFSLDNGELRSYQDPSNAQFLESIRRGEVPAELRRLAHG
GQVNLDMEDHRDEDFVKPKGAFKAFTGEGQKLGSTAPQVLST
(entspricht der Domänengrenzen-Vorhersage nach SMART)

- **Konstrukt 2: human p47 (171-270)**

EKRQHSSQDVHVVLKLWKSGFSLDNGELRSYQDPSNAQFLESIRRGEVPAELRR
LAHGGQVNLDMEDHRDEDFVKPKGAFKAFTGEGQKLGSTAPQVLST

Am N-Terminus verbleiben nach Abspaltung des His-Tags die beiden Reste G1-S2 der Proteasenschnittstelle. Die SEP-Konstrukte wurden jeweils in *E. coli* BL21 (DE 3) exprimiert und mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) bei einer OD von $A_{600}=0,5$ induziert. Die Expression verlief anschließend für vier Stunden bei 30°C. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert. Die Biofeuchtmasse wurde einmal mit 0,9% NaCl-Lösung gewaschen, bei – 80°C Schock gefrostet und anschließend im His-Aufschlusspuffer suspendiert. Danach wurden die Zellen mittels French-Press zweimal aufgeschlossen und der lösliche Überstand abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺-Chelat- Säule (MC Poros, Applied Biosystems) geladen und mit His-Elutionspuffer eluiert. Nach der Affinitätschromatographie wurden die Proben der einzelnen Fraktionen über 15 % SDS-Page Gele kontrolliert. Im Anschluß daran wurden die Fraktionen mit dem His-Fusionprotein vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen TEV-Spaltpuffer dialysiert, sowie der His-Tag mit TEV-Protease abgespalten. Der 2. Reinigungsschritt erfolgte über eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule (Amersham Biosciences) zur Abtrennung von ungespaltenem Fusionsprotein und des His-Tags. Die Fraktionen der Endreinigung wurden über Massenspektrometrie und SDS-Page-Gele auf ihre molekulare Masse überprüft, vereinigt, in den NMR-Puffer übergeführt und danach aufkonzentriert.

Die Expression von unmarkiertem, ¹⁵N-markiertem, ¹⁵N/¹³C-markiertem und ¹⁵N-markiertem deuteriertem SEP Protein erfolgte in den unter 2.1.5 aufgeführten Medien.

2.4 NMR-Spektroskopie

2.4.1 WW-Domäne

Für die Resonanzzuordnung des *hGas7* WW-Domänenkomplexes mit dem Liganden LIPPPPPL wurden die von Kurt Wüthrich und Will Gibbons maßgeblich entwickelten klassischen Standardverfahren zur sequenzspezifischen Signalzuordnung verwendet (Gibbons et al., 1972, Wuthrich, 2003, Wüthrich, 1986). Dies erfolgte durch die Aufnahme von 2D-¹H-NMR Experimenten an unmarkierten synthetisierten Peptidproben bei 288 K auf einem 600 MHz Spektrometer (Bruker). Für die Aufnahme der NMR-Spektren des unmarkierten prolinreichen Liganden alleine, wurden 2 mM, und für die *hGas7* WW-Domäne 1 mM Lösungen in NMR-Puffer (pH 6,8) mit 90 % H₂O/10 % D₂O hergestellt. Für NMR-Experimente, die ausschließlich in D₂O erfolgten, wurden die Peptidlösungen nach zweifacher Lyophilisation in 99,95 % D₂O gelöst. Die Datenaufnahme für den WW-Domänen-Ligand Komplex erfolgte in Anwesenheit eines zweifach molaren Überschusses an unmarkierten und spezifisch markierten Liganden. Für die Bestimmung spezifischer intermolekularer ¹H-¹H-NOE Kontakte wurde der Ligand an den Positionen P₄ und P₆ uniform ¹³C-markiert. Eine Übersicht der verwendeten Experimente für die Strukturbestimmung des *hGas7* WW-Domänenkomplexes mit dem markierten und unmarkierten Liganden LIPPPPPL findet sich in Kapitel 5.1, Tabelle 5.1 wieder.

2.4.2 SEP-Domäne

Alle NMR-Spektren für die Resonanzzuordnung der humanen p47 SEP-Domäne wurden auf dem DRX 600 MHz mit Kyroprobenkopf bzw. DMX 750 MHz Spektrometer der Firma Bruker bei 300 K unter Verwendung einer 1 mM ¹³C/¹⁵N und einer 2 mM ¹⁵N uniform markierten Proteinprobe des Konstruktes G1-S2 p47(171-270) aufgenommen. Beide Proteinlösungen lagen im NMR-Puffer (pH 5,6) vor.

Die Bestimmung der vicinalen ³J_{HNH α} Kopplungs und Relaxationsexperimente erfolgte an einer 2 mM ¹⁵N markierten G1-S2 p47(171-270) Proteinprobe vorliegend im NMR-Puffer (pH 5,6) mit 90 % H₂O/10 % D₂O. Diese Messungen erfolgten an einem 750 MHz DMX Spektrometer von Bruker bei einer Temperatur von 300 K. Für die Datenakquisition wurden die Programme PASTE/PAPST verwendet. Die erhaltenen Spektren wurden mit der Software XWINNMR (Bruker Biospin) prozessiert. Die Resonanzzuordnung aller Kerne sowie die Analyse der Relaxationsmessungen erfolgte mit der freiverfügbaren SPARKY Software (Goddard, 2002). Eine Übersicht der verwendeten NMR-Experimente findet sich im Kapitel 4.2.1 Strategie der Resonanzzuordnung, Tabelle 4.1, wieder.

Phi-Torsionswinkel für die humane p47 SEP-Domäne wurden indirekt experimentell ermittelt aus modulierten $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ Kopplungsexperimenten. Dazu wurde eine Serie von 2D J-modulierten ^{15}N - ^1H -COSY Experimenten aufgenommen (Billeter et al., 1992). Die Kopplungskonstante wurde nach Gleichung 2.7 bestimmt, wobei A die Amplitude, J die skalare Kopplungskonstante, τ das Zeitintervall und T_2 die apparente transverse Relaxationszeit ist.

$$I = A \times \cos(\pi \times J \times \tau) \times e^{-\frac{\tau}{T_2}} \quad (2.7)$$

Ausgehend von den initialen Werten für $A = 40000$, $J = 6$ und $1/T_2 = -30$ wurden die erhaltenen experimentellen Intensitäten aus den Spektren der Gleichung 2.7 zu Grunde gelegt und über einen Kurvenfit, durchgeführt mit dem Programm Kaleidagraph. Die entsprechende $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstante wurde aus dem Graph ermittelt. Dabei wurde angenommen, dass die berechneten Werte der Kopplungskonstante $^3J_{\text{HNH}\alpha} > 7$ Hz einem ϕ -Torsionswinkel eines β -Stranges mit dem Standardwert $-135 \pm 30^\circ$ entsprechen. Diese Näherung basiert auf der folgenden Karplus-Gleichung .

$$^3J_{\text{HNH}\alpha} = A \cos 2\phi + B \cos \phi + C \quad (2.8)$$

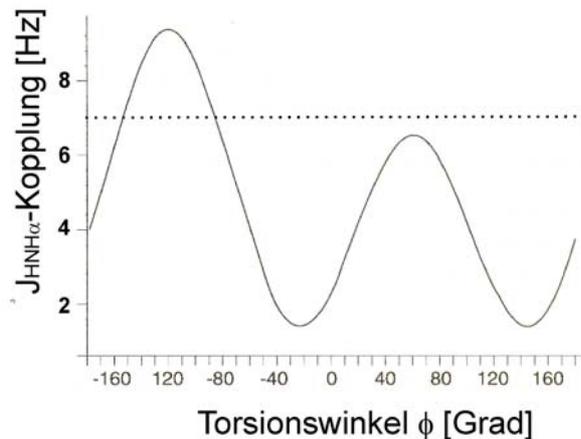


Abbildung 2.2: Die semiempirische Karplus-Beziehung zeigt die Abhängigkeit der $^3J_{\text{HNH}\alpha}$ -Kopplungskonstante vom ϕ -Torsionswinkel.

Kopplungswerte von $^3J_{\text{HNH}\alpha} < 7$ Hz wurden aufgrund der Mehrdeutigkeit der Karplus-Gleichung nicht berücksichtigt.

Für die Bestimmung der longitudinalen T_1 - und transversalen T_2 - ^{15}N -Relaxationszeiten wurden jeweils zwei Serien von 11 ^1H - ^{15}N -HSQC ähnlichen Experimenten (Farrow et al., 1994) mit den Zeitintervallen 12, 52, 102, 152, 202, 302, 402, 602, 902, 2002 und 5002 ms für T_1 Messungen und 6, 10, 18, 26, 34, 42, 82, 122, 162, 202 und 242 ms für T_2

Messungen durchgeführt und anschließend mit dem Programm SPARKY ausgewertet. Die totale Korrelationszeit τ_c wurde berechnet aus den gemittelten Werten für T_1 und T_2 ^{15}N Relaxationszeiten nach folgender Gleichung

$$\tau_c = \frac{\sqrt{[6(T_1/T_2) - 7]/4}}{2\pi \times \Omega_N} \quad (2.9)$$

mit der verwendeten Stickstofffrequenz $\Omega_N = 76,0100069$ MHz. Die *steady state* $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuklearen NOE Intensitäten wurden jeweils zweimal bestimmt (Farrow et al., 1994) und in SPARKY durch Vergleich der Intensitäten zwischen *on and off* - Experimenten aus den gemittelten Werten ausgewertet.

Für die Bestimmung der an der Interaktion zwischen der humanen p47 SEP-Domäne und der Cysteinprotease Cathepsin L beteiligten Aminosäurereste wurde eine deuterierte ^{15}N markierte Probe des Konstruktes G1-S2-p47(171-270) hergestellt, wie unter 2.3.3.2 beschrieben. Dazu wurde das M9-Minimalmedium mit D_2O angesetzt. Nach Abschluß der Expression und der beiden Reinigungsschritte wurde die SEP-Domäne und das humane Cathepsin L getrennt gegen den gleichen Puffer (20 mM NaP_i , 50 mM NaCl, 100 μM MMTS (Methylmethanthiosulfonat), pH 5,6) dialysiert und über Ultrafiltration aufkonzentriert. Die NMR-Probe ($V=330 \mu\text{l}$) für die deuterierte ^{15}N -markierte SEP-Domäne hatte eine Konzentration von 60 μM zu Beginn und lag in 90 % $\text{H}_2\text{O}/10$ % D_2O vor. Alle ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren wurden auf einem 600 MHz Spektrometer von Bruker aufgenommen, ausgestattet mit einem Kryoprobekopf. Für die SEP-Domäne alleine wurden zunächst vier ^1H - ^{15}N HSQC Spektren bei den Temperaturen 298 K, 293 K, 288 K und 278 K bestimmt. Danach wurden der NMR-Probe der SEP-Domäne 100 μl Cathepsin L, vorliegend in einer 30 μM Lösung, zugegeben. Sofort wurde ein ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrum aufgenommen. Das molare Verhältnis betrug in der ersten Titration 5:1. Anschließend wurden zu dem Proteingemisch erneut 100 μL Cathepsin L Lösung dazugegeben und sofort ein zweites ^1H - ^{15}N -HSQC Spektrum bestimmt. Die Spektren wurden danach mit SPARKY ausgewertet.

2.5 Strukturrechnung mit ARIA/CNS

Für die Bestimmung der NMR-Proteinstrukturen der humanen p47 SEP-Domäne und des *hGas7* WW-Domänenkomplexes mit dem prolinreichen Liganden LIPPPPPL wurde das Programm ARIA/CNS Version 1.2 (Brunger et al., 1998, Linge et al., 2003) verwendet. Das Programm ARIA (*Ambiguous Restraints for Iterative Assignment*) automatisiert die Schritte der NOE-Zuordnung und ermöglicht so die Strukturrechnung in CNS (*crystallography and NMR system*) auf Grundlage einer möglichst kompletten Resonanzzuordnung und aus NOESY-Spektren generierten NOE-Peaklisten. Dabei kalibriert ARIA die NOE-Listen separat und führt Strukturrechnungen mit den berechneten Abständen basierend auf einem 8-stufigen iterativen Prozeß durch.

Der Hauptvorteil von ARIA liegt darin, dass es Strukturrechnungen mit mehrdeutig zugeordneten NOE-Listen durchführen kann. Zu Beginn jeder Strukturrechnung unterscheidet ARIA durch Vergleich der Resonanzliste mit den NOE-Listen mehrdeutige und eindeutige Zuordnungen. Während der Iterationen gewichtet ARIA die mehrdeutigen Zuordnungen (*ambiguous distance restraints* (ADR)) neu und ermittelt weitere eindeutige Zuordnungen durch Kalibrierung der Spektren und Entfernen von Rauschen. In die Kalibrierung wurde eine Spindiffusionskorrektur eingebaut, die mit Hilfe der Spektrometerfrequenz und der Mischzeit des NOESY-Spektrums erreicht wird. Der Ausschluss von Rauschsignalen erfolgt durch die Analyse der Verletzungen der *distance restraints* oberhalb eines bestimmten Toleranz-Schwellwertes anhand der *error tolerant target function* (Linge, 2000). Mit Abschluss der Strukturrechnung verfeinert ARIA das erhaltene Strukturensemble durch verschiedene Protokolle wie beispielsweise *water refinement* (Gronwald & Kalbitzer, 2004).

CNS verwendet zur Strukturberechnung Moleküldynamiksimulationen unter Verwendung von *simulated annealing* Protokollen. Dabei wird die Startstruktur mit den empirischen Parametern für eine kurze Zeit auf eine hohe Temperatur aufgeheizt, um in anschließenden Kühlschritten unter Einfluß eines Kraftfeldes auf die energetisch günstigste finale Struktur zu kommen. In der NMR-Spektroskopie erhält man am Ende der Strukturrechnung keine exakt definierte Struktur, sondern eine Strukturfamilie deren Qualität analysiert wird .

2.6 Herstellung der Cysteinproteasen Cathepsin L, B und X

Die humanen Cysteinproteasen Cathepsin L, B und X wurden gänzlich in der Arbeitsgruppe von Dr. Dorit Nägler (Abt. Klinische Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians Universität München) unter nachfolgendem Protokoll hergestellt. Das humane Cathepsin L wurde mir freundlicherweise für NMR-Interaktionsstudien zur Verfügung gestellt.

Die cDNA für das humane Procathepsin L wurde mittels PCR aus einer humanen Plazenta cDNA Bibliothek (BD Biosciences Clontech) mit den genspezifischen Primern amplifiziert:

Vorwärtsprimer:

5' - CCGCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTACTCTAACATTTGATCACAGTTT- 3'

Rückwärtsprimer:

5'- ATTTGCGGCCCGCTCACACACAGTGGGGTAGCTGG – 3'

unter Verwendung von Expand DNA Polymerase (Roche Applied Science). Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pPIC9 Vektor (Invitrogen) kloniert und in der Hefe *Pichia pastoris* als *pre-pro- α -factor fusion construct* unter den empfohlenen Kulturbedingungen von Invitrogen exprimiert. Das Procathepsin L wurde exprimiert und bei etwa 5 mg/L initialem Zellkulturmedium sezerniert. Anschließend wurde die Hefezell-Suspension bei 3000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand mittels Ultrafiltration aufkonzentriert über eine Amicon YM10 Membran. Die konzentrierte Lösung wurde gegen eine 50 mM Na-acetat Lösung (pH 6,5) dialysiert. Das reife Enzym wurde durch eine Absenkung des pH-Wertes auf 5,0 erhalten. Das prozessierte Enzym wurde dann über eine SP-Sepharose Fast Flow Säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) gereinigt und in einer 50 mM Na-acetat Lösung (pH 5,0) equilibriert. Die Elution von der Säule erfolgte mit einer 200-300 mM NaCl-Lösung. Das gereinigte Enzym wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert in einer Lösung die zusätzlich den reversiblen Inhibitor MMTS in einer Konzentration von 100 μ M enthielt.

Die humanen Cathepsine B und X wurden exprimiert und gereinigt wie beschrieben (siehe dazu (Nagler et al., 1997, Nagler et al., 1999).

2.6.1 Enzymkinetische fluorimetrische Messungen mit den Cathepsinen L, B und X

Die Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_i zwischen der humanen p47 SEP-Proteinprobe und den humanen Cathepsinen L, B und X erfolgte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Dr. Dorit K. Nögler am Institut für Klinische Chemie und Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Alle enzymkinetischen Versuche wurden dort durchgeführt und ausgewertet.

Die Gleichgewichtsreaktion $E + I \rightleftharpoons EI$ gilt für kompetitive reversible Inhibitoren unter der Annahme der Bildung eines Komplexes im Verhältnis 1:1 zwischen Enzym (E) und Inhibitor (I) und wird durch die Gleichgewichtskonstante $K_i = [E] \times [I] / [EI]$ charakterisiert. Bei einer schwachen Hemmung liegt der größte Teil des Inhibitors in der freien Form vor und die Konzentration des gebundenen Inhibitors kann vernachlässigt werden.

In diesem Fall gilt die klassische Gleichung für reversible Hemmung nach Dixon:

$$v_i / v_0 = 1 / (1 + I_t / K_{i(\text{app})}) \quad (2.9)$$

v_i : Gleichgewichtsgeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors

v_0 : Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit des Inhibitors

I_t : Gesamtkonzentration des Inhibitors (frei und komplexiert)

$K_{i(\text{app})}$: scheinbare Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes bei einer bestimmten Substratkonzentration

Aus dem zeitlichen Verlauf der Produktkonzentration können die Reaktionsgeschwindigkeiten v_0 und v_i berechnet. Die scheinbare Dissoziationskonstante $K_{i(\text{app})}$ für kompetitive reversible Inhibitoren bei einer bestimmten Substratkonzentration kann durch folgende Gleichung in die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_i umgerechnet werden:

$$K_i = K_{i(\text{app})} / (1 + S / K_m) \quad (3.0)$$

S: Substratkonzentration

K_m : Michaelis-Konstante

K_i : wahre Hemmkonstante

Die fluorimetrischen Messungen erfolgten an einem SPEX FluoroMax Spektralfluorimeter (Jobin Yvon, Edison, NJ) durch Messung des Substratumsatzes von Cbz-FR-MCA (Carbobenzoxy-L-Phenylalanin-4-Methylcoumarinyl-7-amid; Anregung: 380 nm; Emission: 440 nm) nach (Nagler et al., 1997).

Alle kinetischen Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 25°C in Gegenwart eines 50 mM Na-citrat Reaktionspuffers (1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.2 M NaCl und 3% DMSO). Die Bindungsassays für Cathepsin B, L und X wurden bei einem pH-Wert von 5,5 mit den Substraten Cbz-FR-MCA (Cathepsin B/L) und Abz-FR-F(NO₂) (Cathepsin X) durchgeführt. Die in Ihrer inhihierten Form gelagerten Enzyme wurden durch 2 mM DTT im Reaktionspuffer aktiviert. Die Konzentration an aktivem Enzym wurde bestimmt durch die Titrationsmethode mit E-64 (Barrett et al., 1982).

Inhibitionsstudien wurden mit variierenden Konzentrationen [I] (0 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 6 µM und 10 µM) des potentiellen Inhibitors (G1-S2 p47(171-270) durch Messung der *steady-state* Hydrolyserate des Substrates Cbz-FR-MCA (1 µM) in Gegenwart des Enzymes (Cathepsin L :10 pM; Cathepsin B: 0,5 nM; Cathepsin X: 2 nM) durchgeführt.

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_i , sowie die Art der Hemmung wurden nach der klassischen Methode für reversible Inhibitoren nach (Dixon, 1953) bestimmt. Dabei wurden die Dixon-Plots, jeweils bei einer Substratkonzentration von 0,5 µM, 1 µM und 4 µM und einer Enzymkonzentration von 50 pM durchgeführt. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte durch lineare Regression der reziproken Reaktionsrate ($1/v_0$ vs. [I]) für variierende Inhibitor- und Substratkonzentrationen. Die Werte für K_i wurden aus dem Schnittpunkt der Geraden für die drei Substratkonzentrationen ermittelt.

2.7 Weitere Methoden

Die Strukturanalyse des *hGas7* WW-Domänenkomplexes und der humanen p47 SEP-Domäne erfolgte mit den Programmen PROCHECK-NMR (Laskowski et al., 1996) und MOLMOL (Koradi et al., 1996). Der Ramachandran-Plot ist mit dem Programm PROCHECK-NMR erstellt worden und das Programm MOLMOL wurde benutzt, um die gezeigten Strukturabbildungen und Übereinanderlagerungen von Strukturen zu erstellen und RMS-Abweichungen zu berechnen. Alle gezeigten Oberflächendarstellungen wurden mit dem Softwareprogramm SYBYL 6.9 generiert.

2.8 Referenzen

- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982) L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* 201, 189-198
- Billeter, M., Neri, D., Otting, G., Qian, Y. Q. & Wuthrich, K. (1992) Precise vicinal coupling constants $3J_{\text{HN}\alpha}$ in proteins from nonlinear fits of J-modulated $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -COSY experiments. *J Biomol NMR* 2, 257-274
- Brunger, A. T., Adams, P. D., et al. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 5), 905-921
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55, 170-171
- Farrow, N. A., Muhandiram, R., et al. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984-6003
- Gibbons, W. A., Alms, H., Bockman, R. S. & Wyssbrod, H. R. (1972) Homonuclear indor spectroscopy as a means of simplifying and analyzing proton magnetic resonance spectra of peptides and as a basis for determining secondary and tertiary conformations of complex peptides. *Biochemistry* 11, 1721-1725
- Goddard, T. D. a. K., D.G. (2002) In, University of California, San Francisco, CA
- Gronwald, W. & Kalbitzer, H. R. (2004) Automated structure determination of proteins by NMR spectroscopy. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 44, 33-96
- Koradi, R., Billeter, M. & Wuthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics* 14, 51-&
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-&

- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A. C., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of Biomolecular NMR* 8, 477-486
- Linge, J. (2000) New methods for automated NOE assignment and NMR structure calculation. In, EMBL, Heidelberg
- Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. (2003) ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19, 315-316
- Nagler, D. K., Storer, A. C., Portaro, F. C., Carmona, E., Juliano, L. & Menard, R. (1997) Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 36, 12608-12615
- Nagler, D. K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E. O. & Menard, R. (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38, 12648-12654
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2.Auflage*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Wilson, C. M. (1983) Staining of Proteins on Gels - Comparisons of Dyes and Procedures. *Methods in Enzymology* 91, 236-247
- Wuthrich, K. (2003) NMR studies of structure and function of biological macromolecules (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie-International Edition* 42, 3340-3363
- Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley & Sons, New York