

## II MATERIAL UND METHODEN

### 1 Herstellung der LBP – Mutanten

Zur Herstellung der LBP-Mutanten wurden mit der sogenannten „Site-Directed-Mutagenesis“-Methode Mutationen der DNA des Wildtyp-LBP geschaffen. Die cDNA von Wildtyp-LBP war im Labor von Prof. Dr. Ralf R. Schumann vorhanden und von Dr. Eicke Latz bereits in den Vektor "pcDNA3.1" (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kloniert worden. Dieser Vektor ist ein zirkuläres Plasmid mit einer Länge von 5428 Basenpaaren. Neben einem Ampicillinresistenzgen für die DNA-Replikation in Bakterien enthält der Vektor auch Gensequenzen für die Proteinexpression in Säugetierzellen: einen Promoter aus dem Zytomegalievirus und eine BGH-Polyadenylierungssequenz, außerdem ein Resistenzgen für Neomycin zwischen einem Promoter und einem Polyadenylierungssignal aus dem SV40-Virus. Die cDNA des Wildtyp-LBP befindet sich in der Multiple-Cloning-Site des Vektors zwischen den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRV. Es wurden mit Hilfe der „Site-Directed-Mutagenesis“-Methode insgesamt 5 Mutationen des LBP-Gens durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 5 Oligonukleotide, welche jeweils die beabsichtigten Mutationen enthielten, gestaltet und erworben (Eurogentec, Seraing, Belgium). Bei der „Site-Directed-Mutagenesis“-Methode wird das wtLBP-Vektor-Konstrukt zusammen mit dem jeweiligen Oligonukleotid, einem Gemisch aus Nukleotiden und einer DNA-Polymerase im PCR-Verfahren auf 95 °C erhitzt. Dadurch lösen sich die DNA-Doppelstränge und es entstehen Einzelstränge. Dann senkt man die Temperatur auf 55 °C, um den Oligonukleotiden zu ermöglichen, an die Wildtyp-LBP-DNA zu binden. Bei der nachfolgenden Erwärmung auf 68 °C füllt die Polymerase einen neuen DNA-Strang auf, wobei sie das Oligonukleotid als Primer benutzt. Der neu entstandene Einzelstrang enthält dann die gewünschte Mutation. Dieser Vorgang wird in einem PCR-Cycler mehrmals wiederholt zur Amplifikation. Danach wird die nichtmutierte, methylierte DNA durch das Restriktionsenzym DpnI verdaut. Die Mutagenese wurde mit dem „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) durchgeführt. Nach Transformation der mutierten DNA in Zellen von

*Escherichia coli* und Inkubation über Nacht wurde die DNA präpariert mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit (250)“ (Qiagen Genomics Inc., Washington, USA). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Einfügen oder Auslassen von Erkennungsregionen für Restriktionsenzyme mit anschließendem Restriktionsverdau und Elektrophorese in 1%igem Agarosegel überprüft. Zusätzlich wurde das Vorhandensein der Mutationen durch Sequenzierung (MWG-Biotech, Ebersberg) bestätigt.

### 1.1 Mutante 188 (L=>W)

Bei der Mutante 188 wurde Leucin gegen Tryptophan ausgetauscht.

Sequenz des Oligonukleotids:

DNA:           5´-C GAA ATG ATC CAG AAA TCG GTG AGC TCC-  
 Protein:           E    M    I    Q    K    S    V    S    S -

-GAT TGG CAG CCT TAT CTC CAA ACT CTG C -3´  
 - D W    Q    P    Y    L    Q    T    L

Sequenz des Wildtyps:

DNA:           5´-C GAA ATG ATC CAG AAA TCG GTG TCC TCC-  
 Protein:           E    M    I    Q    K    S    V    S    S -

-GAT CTA CAG CCT TAT CTC CAA ACT CTG C -3´  
 - D L    Q    P    Y    L    Q    T    L

Das Oligonukleotid reicht von Position 611 bis Position 666. Das Triplet CTA auf der Wildtyp-LBP-DNA beginnt an Position 642 und codiert für Leucin (L). Es wurde auf dem Oligonukleotid umgeändert in TGG für Tryptophan (W). Außerdem wurde das Triplet TCC, welches an der Position 616 beginnt und für Serin (S) codiert, als „stille Mutation“ in das Triplet AGC umgewandelt, welches ebenfalls für Serin codiert. Dadurch verschwand eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SacI, ohne daß sich die Aminosäuresequenz an dieser Stelle änderte.

### 1.2 Mutante 272 (Y=>F)

Für die Mutante 272 wurde Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht.

#### Sequenz des Oligonukleotids:

DNA: 5' - CC AGC CTG GTT TTC CAT GAG GAA-  
 Protein: S L V F H E E -

-GGT TAT CTG AAC TTC TCC -3'  
 -G Y L N F S

#### Sequenz des Wildtyps:

DNA: 5' - CC AGC CTG GTT TAT CAT GAG GAA-  
 Protein: S L V Y H E E -

-GGA TAT CTG AAC TTC TCC -3'  
 -G Y L N F S

Es erstreckt sich von Position 883 bis Position 923. An der Position 894 beginnt das Triplet TAT auf der Wildtyp-LBP-DNA. Es codiert für Tyrosin (Y). Auf dem Oligonukleotid wurde es umgeändert in TTC, das für Phenylalanin (F) codiert. Zusätzlich wurde auch hier eine sogenannte „stille Mutation“ durchgeführt, indem das Triplet GGA, welches für Glycin (G) codiert und an der Position 906 beginnt, in das Triplet GGT umgewandelt wurde, welches auch für Glycin steht. Dabei wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV entfernt ohne Veränderung der Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins.

### 1.3 Mutante 277 (Y=>F)

Ein Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin wurde bei der Mutante 277 durchgeführt.

#### Sequenz des Oligonukleotids:

DNA: 5' - AT CAT GAG GAA GGA TTT CTG AAC-  
 Protein: H E E G F L N -

-TTC TCC A -3'  
 - F S

Sequenz des Wildtyps:

DNA:           5´ - AT CAT GAG GAA GGA TAT CTG AAC-  
 Protein:                   H    E    E    G Y    L    N -

-TTC TCC A -3´  
 - F    S

Das Oligonukleotid geht von Position 895 bis Position 924. Das gewählte Tyrosin (Y) wird hier durch das Triplet TAT verschlüsselt, es beginnt an Position 909. Auf dem Oligonukleotid wurde es ausgetauscht gegen TTT für Phenylalanin (F). Auf diesem Weg verschwand auch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV.

**1.4 Mutante 278 (L=>W)**

Bei der Mutante schließlich 278 wurde Leucin in Tryptophan geändert.

Sequenz des Oligonukleotids:

DNA:           5´ - G GTT TAT CAT GAG GAA GGA TAT TGG AAC-  
 Protein:                   V    Y    H    E    E    G    Y W    N -

-TTC TCC ATC ACA GAT GAC ATG -3´  
 - F    S    I    T    D    D    M

Sequenz des Wildtyps:

DNA:           5´ - G GTT TAT CAT GAG GAA GGA TAT CTG AAC-  
 Protein:                   V    Y    H    E    E    G    Y L    N -

-TTC TCC ATC ACA GAT GAC ATG -3´  
 - F    S    I    T    D    D    M

Das Oligonukleotid erstreckt sich von Position 890 bis Position 938. Das Triplet CTG auf der Wildtyp-LBP-DNA beginnt an Position 912 und codiert für Leucin (L). Beim Austausch in die Aminosäure Tryptophan (W) durch Änderung der DNA-Sequenz in TGG an dieser Stelle wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV entfernt.

### 1.5 Mutante 457 (Y=>F)

Ein Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin wurde bei der Mutante 277 durchgeführt.

#### Sequenz des Oligonukleotids:

DNA: 5' - C CTG TTC TTG GGT GCC AAT GTC  
 Protein: L F L G A N V -

-CAA TTC ATG AGA GTT TAA G -3'  
 - Q F M R V STOP

#### Sequenz des Wildtyps:

DNA: 5' - C CTG TTC TTG GGT GCC AAT GTC-  
 Protein: L F L G A N V -

-CAA TAC ATG AGA GTT TAA G -3'  
 - Q Y M R V STOP

Das Oligonukleotid beginnt bei Position 1424 und endet bei Position 1464. Tyrosin (Y) wird an der Position 1449 durch das Triplet TAC verschlüsselt. Es wurde auf dem Oligonukleotid umgeändert in TTC für Phenylalanin (F), wobei eine neue Schnittstelle für das Restriktionsenzym BspHI entstand.

## 2 Transfektion von CHO-K1-Zellen mit LBP-Mutanten, Wildtyp-LBP und unkloniertem Vektor

CHO-K1-Zellen („Chinese hamster ovary cells“; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) wurden in 6-well-Zellkulturplatten in unterschiedlicher Dichte ausgesät. Als Zellkulturmedium diente MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma, St. Louis, MO, USA) mit 5 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälber-Serum (FCS, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), Natrium-Pyruvat (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), Glutamin (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Germany), den Antibiotika Streptomycin und Penicillin (Sigma) und den Aminosäuren Asparagin und Prolin (Sigma). Nach etwa 24 h wurden die Zellen nach der Calcium-Phosphat-Methode mit dem „CalPhos Mammalian Transfection Kit (Clontech

Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) mit der DNA des wt-LBP-Vektor-Konstruktes transfiziert. Zelldichte und DNA-Menge wurden variiert, um die Transfektion zu optimieren. Die Transfektionslösung wurde nach 12 h abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Zellkulturmedium bedeckt. Nach weiteren etwa 6 h wurde das Medium wieder entfernt, die Zellen wieder mit PBS gewaschen und in CHO-S-SFM-II-Medium (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) kultiviert, mit den gleichen Zusätzen wie für MEM, aber ohne Serum. Etwa 2 Tage später wurde der LBP-Gehalt im Überstand mittels LBP-ELISA gemessen als Maß für die Transfektions-Effizienz. Es zeigte sich, daß  $10^5$  Zellen pro Vertiefung und 5 µg DNA pro Vertiefung die größte Proteinsekretion bewirkten. Mit diesen Werten wurden dann die Transfektionen für die LBP-Mutanten und den unklonierten Vektor durchgeführt.

### **3 Herstellung stabiler Klone der transfizierten CHO-K1-Zellen**

Das Gen für die Neomycin-Resistenz auf dem verwendeten Expressionsvektor ermöglichte die Selektion stabiler Zellklone durch den Zusatz von Gentamicin (PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria). Variierung der Konzentration ergab, daß 400 µg/ml Gentamicin einen ausreichenden Selektionsdruck auf die Zellen bildete. Um monoklonale Zellen zu erhalten, wurden die transfizierten CHO-K1-Zellen durch Trypsinierung vom Boden abgelöst und in einer Dichte von 0,5 Zellen pro Vertiefung auf 96-well-Platten ausgesät. Kolonien wurden unter dem Mikroskop auffindig gemacht und der LBP-Gehalt des Überstandes im LBP-ELISA gemessen. Diejenige Kolonie jeder Mutante und des Wildtyps, die am meisten LBP produzierte, wurde weiter kultiviert und schließlich in Zellkulturflaschen (Nunc GmbH&Co.KG, Wiesbaden, Germany) überführt. Um das exprimierte LBP zu ernten, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in serumfreiem CHO-S-SFM-Medium inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurden die Überstände abgenommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Konzentration des LBP wurde durch LBP-ELISA bestimmt.

#### **4 Messung der LBP-Konzentration im Zellkulturüberstand durch ELISA**

MaxiSorp-96-well-Platten (Nunc GmbH&Co.KG, Wiesbaden, Germany) wurden mit 50 µl pro Vertiefung Rb-anti-hLBP-Antikörper (XOMA, Berkeley) beschichtet. Der Antikörper war in einer Konzentration von 2 µg/ml in 100mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2 gelöst. Nach Abdeckung der Platten mit Klebefolie wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Alle weiteren Inkubationen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Platten wurden dreimal mit 200 µl pro Vertiefung PBS, 0,05% Tween 20 gewaschen, daraufhin wurden freie Bindungsstellen mit 200 µl pro Vertiefung PBS, 1% BSA, 5% Saccharose für 1 h blockiert. Nach einmaligem Waschen wurden 100 µl pro Vertiefung Kulturüberstände, unterschiedlich verdünnt in PBS, 1% BSA, und die im gleichen Puffer verdünnte Standardreihe aus rekombinantem humanen LBP (XOMA, Berkeley, CA, USA) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nun wurde viermal gewaschen, 100 µl pro Vertiefung zweiter Antikörper, den der biotinylierte erste Antikörper bildet, verdünnt auf 635 ng/ml in PBS, 1% BSA, auf die Platte gegeben und 1 h inkubiert. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl pro Vertiefung Streptavidin-Peroxidase (Sigma), 500 ng/ml in PBS, 1% BSA, mit Inkubation für 30 min. Für die Farbreaktion nach weiterem viermaligem Waschen wurde 100 µl pro Vertiefung eines o-Phenylenediamin-Dihydrochlorid-Substrates (Sigma) verwendet. Die Farbentwicklung geschah lichtgeschützt und wurde nach etwa 15 min. mit 50 µl pro Vertiefung 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Daraufhin wurde die Optische Dichte bei 492 nm bestimmt in einem „SPECTRA-Fluor-Plus“-Plattenlesegerät (Tecan GmbH, Crailsheim, Germany).

#### **5 Transfer von BODIPY-LPS an CD14 und Phosphatidyl-Ethanolamin durch LBP**

LPS liegt aufgrund seiner amphiphilen Struktur in wässriger Lösung in Mizellen vor. Die an dem LPS gebundenen Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffes „BODIPY“ sind daher ebenfalls dicht gedrängt, ihre Fluoreszenz löscht sich gegenseitig aus, was als „Quenching“ bezeichnet wird. Dadurch ist nur eine geringe Fluoreszenz meßbar. Löst man nun einzelne BODIPY-LPS-Moleküle aus den Mizellen, so kommt es zu

einem „Dequenching“ und die gemessene Fluoreszenz wird größer. Der Anstieg der Fluoreszenz ist also ein Maß für die Monomerisierung des LPS. In den hier durchgeführten Versuchen wurde BODIPY-LPS durch LBP entweder an den Akzeptor CD14 (Biometec, Greifswald) oder an Phospholipidvesikel transferiert. Als Akzeptor für diesen Versuch besonders geeignetes Phospholipid hatte sich Phosphatidylethanolamin (Sigma) erwiesen. Das BODIPY-LPS wurde freundlicherweise von Dr. Douglas T. Golenbock (Boston University, Boston, MA, USA) zur Verfügung gestellt, es handelt sich dabei um Lipopolysaccharid von *Salmonella minnesota* Re595, markiert mit Boron Dipyrrromethen Difluorid (BODIPY FL).

Die Durchführung des Versuches mit CD14 als Akzeptor folgte mit kleinen Änderungen einem bereits an anderer Stelle veröffentlichten Protokoll (Yu et al., 1995): Es wurden LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP auf die gleiche Konzentration in Mock-Medium bzw. verdünnt. Auf einer LumiNunc 96-well-Platte (Nunc GmbH & Co. KG) wurden CD14 und jeweils gleiche Volumina an LBP-Mutanten, wt-LBP oder Mock-Medium so gemischt, daß die LBP-Konzentration 50 ng/ml und die CD14-Konzentration 5 µg/ml im Gesamtvolumen betrug. CD14 wurde in PBS verdünnt. Falls erforderlich, wurden einzelne Vertiefungen mit PBS auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dann wurden 50 µl BODIPY-LPS, in PBS verdünnt auf eine Konzentration von 50 ng/ml (im Gesamtvolumen), möglichst schnell mit einer Multipipette in jede Vertiefung dazugegeben und sofort die Messung gestartet in einem „SPECTRA-Fluor-Plus“-Plattenlesegerät (Tecan). Das BODIPY wurde excitiert mit einer Wellenlänge von 485 nm und die Emission wurde bei 520 nm gemessen. Bei jedem Versuch wurden 300 Zyklen im kürzest möglichen Intervall gemessen, was eine Gesamtmeßdauer von fast 30 Minuten ergab.

Die Messung des Transfers von BODIPY-LPS an Phosphatidyl-Ethanolamin orientierte sich an einer schon publizierten Versuchsbeschreibung (Wurfel und Wright, 1997): Der Akzeptor Phosphatidyl-Ethanolamin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS verdünnt und sonifiziert. Je nach Versuch erfolgte die Verdünnung von Wildtyp-LBP oder von käuflich erworbenem rekombinanten LBP (XOMA) entweder in PBS, Mock-Medium oder in CHO-S-



SFM-II-Medium auf eine Endkonzentration von 150 ng/ml. Das BODIPY-LPS wurde in PBS auf 100 ng/ml verdünnt. Die Durchführung und Messung des Versuchs erfolgte wie es bereits für den Akzeptor CD14 weiter oben beschrieben ist.

## 6 LPS- und Phospholipid-Bindungs-Versuche

Für diese Versuche wurde entweder LPS von *Salmonella minnesota* Re595 (Sigma), LPS von *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma) oder Lipid A (Sigma) verwendet. An Phospholipiden wurden Phosphatidyl-Ethanolamin, -Inositol und -Serin (Sigma) benutzt. Je nach Versuch wurde eine dieser Substanzen auf 30 µg/ml verdünnt in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 20 mM EDTA, pH 9,6. Davon wurden 100 µl in jede Vertiefung von MaxiSorp-96-well-Platten (Nunc GmbH&Co.KG) gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Alle weiteren Inkubationen wurden bei 37 °C durchgeführt. Dann wurden die Platten mit 200 µl pro Vertiefung destilliertem Wasser dreimal gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit 200 µl pro Vertiefung 0,05 M HEPES, 0,15 M NaCl, 10 mg/ml BSA, pH 7,4 für 30 min. blockiert. LBP-Mutanten und Wildtyp-LBP wurden in mock-Medium auf 200 ng/ml verdünnt und jeweils 100 µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben. Weitere Verdünnungen wurden in Inkubationspuffer (0,05 M HEPES, 0,15 M NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7,4) durchgeführt und die Platten wurden für 2 h inkubiert. Nach dreimaliger Waschung der Platten mit 200 µl Inkubationspuffer pro Vertiefung wurde biotinylierter Rb-anti-hLBP-Antikörper (XOMA, Berkeley) auf 635 ng/ml in Inkubationspuffer verdünnt, davon 100 µl in jede Vertiefung gegeben und für 1 h inkubiert. Daraufhin wurde noch dreimal gewaschen wie beschrieben und es wurden 100 µl pro Vertiefung Streptavidin-Peroxidase (Sigma), verdünnt in Inkubationspuffer auf 500 ng/ml, zugegeben, mit Inkubation für 30 min. Für die Farbreaktion nach weiterem dreimaligen Waschen wurde 100 µl pro Vertiefung eines o-Phenylenediamin-Dihydrochlorid-Substrates (Sigma) verwendet. Die Farbentwicklung vollzog sich unter Lichtabschluß und wurde nach etwa 15 min. mit 50 µl pro Vertiefung 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Daraufhin wurde die Optische Dichte bei 492 nm gemessen. Sie stellt ein Maß dar für die Menge des LBP, welches an LPS gebunden ist.

## 7 Aufreinigung der LBP-Mutanten durch Ionen-Austausch-Chromatographie

Für die Aufreinigung durch Ionen-Austausch-Chromatographie wurde als Matrix entweder SP-Sepharose oder Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) benutzt.

Folgende Pufferlösungen fanden dabei Verwendung:

**Puffer A (1x):** 10 mM HEPES, 10 % Glycerol, 0,25 % D-PBS (w/o Ca, Mg), pH 7,5

**Puffer A (2x):** 20 mM HEPES, 20 % Glycerol, 0,5 % D-PBS (w/o Ca, Mg), pH 7,5

**Puffer B** (=Puffer A + NaCl): 10 mM HEPES, 10 % Glycerol, 0,25 % D-PBS (w/o Ca, Mg), pH 7,5, NaCl in einer Konzentration zwischen 0,2 und 1,2 M

Das gewünschte Volumen an Sepharose wurde in ein Falconröhrchen (50 ml) gefüllt und zentrifugiert bei 1500 rpm für 3 Minuten. Danach wurde der oben schwimmende Alkohol dekantiert, die Sepharose wurde mit dem 5-10fachen Volumen Aqua dest. aufgefüllt und erneut zentrifugiert und dekantiert. Dann wurde mit dem 5-10fachen Volumen Puffer A (1x) aufgefüllt, zentrifugiert und dekantiert und dann noch einmal mit dem 5-10fachen Volumen Puffer B aufgefüllt. Es folgte eine Lagerung für 30 min. auf Eis mit gelegentlichem Schütteln, damit die Suspension erhalten bleibt.

Anschließend wurden 5 x folgende Schritte durchgeführt:

- zentrifugieren bei 1500 rpm, 3 min.
- Überstand dekantieren/abpipettieren
- 10 x Volumen Puffer A (1x) zugeben und resuspendieren

Der pH-Wert der letzten Waschung wurde auf 7,5 eingestellt, dann wurde nochmals zentrifugiert, dekantiert und Puffer A (1x) im Verhältnis 1:1 zugeben, was eine 50 %ige Suspension ergab.

Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt und es wurde eine gekühlte Zentrifuge verwendet:

Zum LBP-Überstand wurde im Verhältnis 1:1 Volumen Puffer A (2x) und 0,4 Volumen der Suspension zugeben. Anschließend erfolgte ein Durchmischung für 60

min. am Rotator (niedrige Geschwindigkeit) im Kühlraum. Nach Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes wurde zweimal gewaschen mit Puffer A (1x) und mit Puffer B aufgefüllt je nach gewünschter Konzentrierung (mindestens doppeltes Volumen des Resins) und 10 min. auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugierung wurde das Eluat sterilfiltriert, aliquottiert und eingefroren. Die Messung der Protein-Konzentration im Eluat erfolgte durch eine photometrische Messung mit einer Wellenlänge von 280 nm.

### **8 Software für die Auswertung**

Die Meßwerte der einzelnen Versuche wurden in einem „SPECTRA-Fluor-Plus“-Plattenlesegerät (Tecan GmbH, Crailsheim, Germany) bestimmt und von der dazugehörigen Software „Magellan“ berechnet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation). Die Programme „Swiss-PdbViewer v3.7b2“ (Guex und Peitsch, 1996) und Microsoft Word 1997 (Microsoft Corporation) wurden verwendet zur Darstellung der räumlichen Struktur der Proteine.