• 研究论文 •

MMP-12 蛋白包涵体复性时折叠状态核磁共振图谱与荧光光谱研究

张琳琳^{a,b,c} 冯延叶^{a,b} 蓝文贤^c 曹春阳^c
徐殿胜^a 杨 忠^{*,a,b}

(^a 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

(^b 复旦大学生命科学学院微生物学和微生物工程系 上海 200433)

(^c 中国科学院上海有机化学研究所生命有机国家重点实验室 上海 200032)

摘要 MMP-12 是癌症治疗药物靶标. 为了更好研制新药, 需要大量制备 MMP-12, 但 MMP-12 在大肠杆菌中以包涵体形式表达. 因此如何优化蛋白复性过程是大量获取 MMP-12 蛋白的关键. 采用核磁共振、稳态荧光法、外源性 ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid) 荧光探针三种方法监控 MMP-12 变性蛋白的再折叠过程, 以探究其复性折叠机制. 研究发现 MMP-12 再折叠中点值与对应的尿素浓度几乎相等($C_m \approx 4$, mid-point of transition). 不同尿素浓度中 MMP-12 的二维 ^1H - ^{15}N HSQC (heteronuclear single quantum correlation) 谱图显示, 尿素浓度从 4 mol/L 降低到 3 mol/L 是 MMP-12 蛋白复性折叠的关键步骤. 据此我们将 MMP-12 蛋白复性从常规的梯度透析复性方法改进成等容透析复性法(即确保尿素从 4 mol/L 到 3 mol/L 的浓度变化缓慢), 实现复性收率提高一倍.

关键词 核磁共振; 稳态荧光; ANS 荧光探针; MMP-12; 复性折叠

Investigation on MMP-12 Aggregation State in Urea Contained Solution by NMR and Fluorescence Spectroscopy

Zhang, Linlin^{a,b,c} Feng, Yanyan^{a,b} Lan, Wenxian^c Cao, Chunyang^c
Xu, Diansheng^a Yang, Zhong^{*,a,b}

(^a State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(^b Department of Microbiology and Microbial Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

(^c State Key Laboratory of Bioorganic and Natural Products Chemistry, Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract MMP-12 is a drug target for cancer therapy, but it's over-expressed as inclusion bodies in *E. coli*. To produce it in a large scale, in this paper, NMR, intrinsic tryptophan fluorescence, and ANS (8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid) fluorescence were employed to monitor its aggregation state to improve the refolding yield from inclusion bodies. The midpoint for the refolding ($C_m \approx 4$, mid-point of transition) of MMP-12 obtained from NMR experiments coincides with those from intrinsic tryptophan fluorescence and ANS fluorescence. These data suggest that the urea concentration from 4 mol/L to 3 mol/L is a key step in refolding process of MMP-12. Based on these results, we changed the refolding method from conventional step-wise dialysis to continuous dialysis, thus the refolding yield of MMP-12 from its inclusion bodies was doubled.

Keywords NMR; steady-state fluorescence; ANS; MMP-12; refolding

* E-mail: zhongyang@fudan.edu.cn, 021-55664314

Received September 16, 2011; accepted October 18, 2011.

National Key Basic Research Program of China (No. 2009CB918600).

国家重点基础研究发展计划(973 计划) (No. 2009CB918600)资助项目.

1 引言

胞外基质是组织结构的重要支架, 同时为组织细胞行使功能和迁移提供环境. 基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinases, MMPs)是一族结构相似的能够降解多种细胞外基质成分(包括胶原蛋白、蛋白聚糖、弹性蛋白)的水解蛋白酶^[1]. 它们在组织重塑、伤口愈合、排卵期、着床、子宫修复等生理过程的组织重塑中发挥重要作用^[2,3]. 虽然在这些生理过程中细胞对于 MMP 活性识别还不是很清楚, 但是一系列的细胞因子如, 癌基因、生长因子、荷尔蒙、特定的蛋白抑制剂均参与调控 MMPs 的表达^[4~6]. 而且, 大量研究表明, MMPs 的异常表达可能会导致肿瘤浸润、关节炎、肾小球炎、腹膜炎、组织溃疡等破坏性过程的发生^[7~9].

巨噬细胞金属弹性蛋白酶(Matrix Metal Proteinases-12 Catalytic Domain, MMP-12)是基质金属蛋白酶家族成员之一. 根据 MEROPS 肽酶数据库的分类, MMP-12 是一种金属基质蛋白酶, 属于基质蛋白酶 M10A 亚家族^[10]. 与其他 MMP 家族成员比较, MMP-12 独特之处在于它主要是由巨噬细胞表达的, 所表达的酶原大约 54 kDa, 在纯化过程中容易自动切除前肽和 C 末端类血红素区域而形成的催化区域, 其水解弹性蛋白的比活在基质金属蛋白酶家族中最高^[11]. MMP-12 的主要功能是降解弹性蛋白、纤维连接蛋白、IV 型胶原蛋白、硫酸软骨素、硫酸乙酰肝素等胞外基质成分^[12,13]. 近年来有大量文献报道 MMP-12 和人体内的许多疾病有密切的关系, 主要包括慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、动脉血管粥样硬化和肺气肿(emphysema), 因此, MMP-12 是目前人们比较感兴趣的潜在的药物靶标^[14]. 因此制备和大量获取折叠正常的 MMP-12 蛋白是研制以 MMP-12 为靶标的新药关键一步.

研究发现^[14]MMP-12 蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式表达, 变性与复性一般采用常规的单变性-单复性技术, 复性过程中蛋白损失较多, 使得最终蛋白回收率较低. 我们前期发展了 MMP-12 蛋白包涵体双变复性技术^[15], 实现了蛋白获取效率大幅提升. 为了提高 MMP-12 蛋白复性效率, 在本项研究中我们采用二维核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR) ¹H-¹⁵N HSQC (heteronuclear single quantum correlation)实验、稳态荧光法和 ANS (8-anilinol-naphthalenesulfonic acid)荧光探针法^[16]研究了 MMP-12 折叠过程. 不同尿素浓度中 MMP-12 的 ¹H-¹⁵N HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation)谱图显示, 当尿素浓度大于 4 mol/L 时, 信号重叠严重, 表明蛋白折叠异常; 尿素浓度小于 3

mol/L 时, 信号大量发散, 蛋白折叠良好, 表明 MMP-12 蛋白再折叠(refolding)过程中尿素浓度从 4 mol/L 降低到 3 mol/L 的过程是折叠过程关键步骤, 稳态荧光和 ANS 荧光探针法也得到相似的结果. 该项研究结果使得我们在前期 MMP-12 蛋白复性研究^[15]中, 将常规的梯度透析(逐步减少变性剂浓度)复性方法^[14]改进成等容透析复性法^[15], 即确保从 4 mol/L 到 3 mol/L 脲素浓度缓慢均匀变化进行透析, 从而成功实现 MMP-12 的复性收率从每升 LB 培养基中表达、复性、纯化得到 20 mg 纯蛋白, 改变到 40 mg, 提高了一倍.

2 实验部分

2.1 pET11c-MMP12 表达质粒的构建

将 MMP-12 基因插入到 pET11c 线性表达质粒, 酶切位点为 *Bam*HI 和 *Nde*I. 经 T4 连接酶连接, 得到包含 MMP-12 基因片断的 pET11c-MMP-12 表达质粒, 连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞内, 进行表达筛选, 挑选阳性克隆子基因进行测序验证^[16].

2.2 MMP-12 蛋白包涵体表达

从平板挑取含有 pET11c-MMP-12 表达质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)克隆子接种至含 5 mL 的 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 μ g/mL)的试管中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 取 2 mL 菌液至 100 mL 的 LB 培养基中(含氨苄青霉素 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 在 0.6 左右, 取 20 mL 菌液低速(4000 g)离心 5 min, 弃去上清, 菌体重悬于 1 L LB 培养基或 1 L 包含 ¹⁵NH₄Cl 的 M9 培养基中(含氨苄青霉素 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 0.6~0.8, 加入 IPTG(终浓度 1 mmol/L)诱导, 在 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h.

2.3 MMP-12 包涵体洗涤、变性与纯化

参照文献^[15], 将 M9 或 LB 培养基中培养得到的菌体重悬于 150 mL 的洗菌液(50 mmol/L Tris, pH 8.0)洗涤菌体一次, 离心(10000 g, 4 $^{\circ}$ C, 15 min). 再在 80 mL 的细胞裂解液中(50 mmol/L Tris, pH 8.0)超声破菌. 离心弃上清收集沉淀, 用 150 mL 的包涵体洗涤液(50 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 2% Triton X-100, 1.5 mmol/L β -mercaptoethanol, 1.6 mol/L urea, pH 8.0)洗涤沉淀两次. 将洗涤后的包涵体充分溶解于 5 mL 的提取液 I (50 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -mercaptoethanol, 7 mol/L GdnHCl, pH 8.0)中, 离心收集上清. 快速稀释上清溶液至 200 mL 的梯度稀释液中(50 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -mercaptoethanol, pH 8.0), 离心(10000 g, 4 $^{\circ}$ C, 30 min)收集沉淀. 将收集到的沉淀溶解于 5 mL 的提取

液 II (50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -mercaptoethanol, 8 mol/L urea, pH 8.0)中, 然后上样到预先用缓冲液 A (50 mmol/L Tris, 5 mmol/L β -mercaptoethanol, 8 mol/L Urea, pH 8.0)平衡好的 Sepharose Q (5 mL, G.E.公司)上, 采用缓冲液 B (50 mmol/L Tris, 5 mmol/L β -mercaptoethanol, 8 mol/L Urea, pH 8.0)进行梯度洗脱, 再采用 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白, 收集目的组分。

2.4 MMP-12 核磁共振样品制备

将变性纯化后的 MMP-12 目的蛋白调整蛋白浓度至 0.1 mg/mL, 转移至截留分子量为 3 kDa 的透析袋内, 放入 5 L 的含有变性液的(20 mmol/L Tris, 8 mol/L Urea, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 , 0.2 mmol/L ZnCl_2 , pH 7.5)烧杯 B 内, 将 A 烧杯内的复性液以 2.2 mL/min 的速率连续加入至 B 内, 进行等浓连续透析(图 1), 具体操作请参照本课题组前期研究^[15]。按照公式(1)取样, 采用截留分子量为 3 kDa (Amicon)的超滤浓缩管浓缩。

$$[\text{urea}] = 8e^{-\frac{Ft}{V}} \quad (1)$$

其中, F 代表复性液加入变性液的流速, t 代表取样时间, V 代表复性蛋白所在溶液体积^[17]。

图 1 MMP-12 等容透析复性原理图

Figure 1 The equipment of equal size stepwise dialysis for MMP-12 refolding

2.5 二维 ^1H - ^{15}N HSQC 实验

将浓缩后的在不同脲素浓度下 ^{15}N 标记的 MMP-12 样品, 采用 A280 紫外吸收法($\epsilon=26930 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)测定其蛋白浓度, 将蛋白浓度调整至 0.1 mmol/L, 将 MMP-12 交换于 NMR 缓冲液(20 mmol/L Tris, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl_2 , 0.2 mmol/L ZnCl_2 , 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%\text{D}_2\text{O}$, pH 6.8)中, 体积为 500 μL , 样品离心(10000 g, 4 $^\circ\text{C}$, 30 min), 转移至 5 mm 的核磁管中。在装有 z 轴梯度场的三共振反向探头的 Varian Inova 600 MHz 核磁共振谱仪上于 25 $^\circ\text{C}$ 进行数据采集。 ^{15}N 维中心频率为 120 ppm, 谱宽为 60 ppm; 直接采样 ^1H 维的中心频率为水的化学位移(4.76 ppm), 谱宽为 12 ppm。由于样品浓度低, 每次实验扫描次数为 512。

2.6 稳态荧光实验

将 2.4 节中描述的方法取样, 调整蛋白浓度为 5.5 $\mu\text{mol/L}$, 采用 Cary Eclipse (EL08033542)荧光分光光度计于室温条件下进行荧光吸收测定。将样品离心(10000 g, 4 $^\circ\text{C}$, 30 min), 取离心后的 600 μL 样品于比色皿中进行荧光吸收测定。其中, 激发波长为 295 nm, 发射波段为 300~500 nm, 激发和发射波长狭缝设置为 5 nm/5 nm, 扫描速率为 600 nm/min。在每个脲素浓度下不含蛋白的缓冲液作为空白背景。

2.7 ANS 荧光探针实验

MMP-12 暴露的疏水区域能和荧光探针 ANS (8-氨基-1-萘磺酸)结合。将终浓度为 5.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 MMP-12 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ANS 在 4 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 2 h, 在室温条件下采用荧光酶标仪 SpectraMax M5 (Molecular Devices Inc.)采集数据。其中, 激发波长为 350 nm, 发射波段为 400~600 nm, 激发和发射波长狭缝设置为 5 nm/5 nm, 在每个脲素浓度下不含蛋白的缓冲液作为空白对照。

3 结果与讨论

3.1 二维 ^1H - ^{15}N HSQC 实验

从图 2 可知, 在 8 mol/L 尿素作用下, 有部分信号出现, 证明 MMP-12 在 8 mol/L 尿素条件下仍保留了部分二级结构。这表明在梯度稀释步骤中, MMP-12 快速沉淀过程中可能形成了部分稳定的二级结构, 即折叠核心。随着尿素浓度的梯度降低, 谱图中信号逐渐增多, 证明在尿素缓慢降低的过程中, MMP-12 缓慢折叠。从图 2 中看出在尿素浓度为 3 mol/L 和 4 mol/L 之间信号增加比较明显, 并且在 3 mol/L 脲素浓度下开始出现比较发散的信号, 表明在 3 mol/L 尿素条件下在部分氨基酸残基周围形成局部的正确二级结构, 大部分氨基酸残基的 C_m 值(即: mid-point of transition)是 4.0 mol/L 左右, MMP-12 从变性状态到有活性的折叠正确的状态是高度协同的, MMP-12 复性过程遵从二态模型^[19]。当尿素浓度降低至 0 mol/L 时 NMR 二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱图中绝大部分信号发散, 证明 MMP-12 已经正确折叠, 形成完整均一、稳定的三级结构。

3.2 稳态荧光实验

MMP-12 氨基酸序列中含有三个色氨酸, MMP-12 三维结构显示这三个色氨酸残基都位于内部的疏水区域。从图 3 看出从 4 mol/L 到 5 mol/L 之间最大吸收峰从 327 nm 红移到 355 nm, 证明在 5 mol/L 时色氨酸还暴露于极性的溶液环境中, 当脲素浓度降低至 4 mol/L 时开始部分折叠, 形成疏水区域, 使得色氨酸处于疏水区域

图2 在不同脲素浓度下, 通过信号强度变化监控 MMP-12 折叠过程的 ^1H - ^{15}N HSQC 谱图, 为了观察到尽可能多的信号, 所有信号都是靠近基线处理的

Figure 2 The folding of MMP-12 monitored by signal intensity changes in gradient-enhanced two-dimensional ^1H - ^{15}N HSQC spectra at different concentrations of urea. All spectra are contoured close to the baseline noise level to show as many observable cross peaks as possible

图3 监控 MMP-12 折叠过程的色氨酸荧光发射光谱图. (A) 在不同脲素浓度下色氨酸荧光发射光谱图; (B) 在不同脲素浓度下色氨酸荧光发射光谱最大吸收波长曲线图

Figure 3 The folding of MMP-12 monitored by the intrinsic tryptophan fluorescence. (A) The fluorescence emission intensity of Tyr at different concentrations of urea. (B) The changes in the wavelength at maximum fluorescence of Tyr at different concentrations of urea

中, 并且以这些部分折叠的疏水区域为中心, 随着尿素浓度的缓慢降低, MMP-12 开始正确折叠形成高级结构. 这一点与前面的 ^1H - ^{15}N HSQC 结果基本吻合.

3.3 ANS 荧光探针实验

ANS 作为荧光探针, 能与蛋白中暴露的疏水区域相结合, 经过激发, 可产生强度较大的荧光. 从 ANS 荧光探针发射光谱中(图 4A)看出 MMP-12 复性过程, 随着尿素浓度的降低, ANS 发射光谱最大波长处的荧光逐渐降低, 证明随着尿素浓度的降低 MMP-12 蛋白暴露在溶剂中的疏水区逐步折叠, 在尿素浓度降低到 0 mol/L 时, ANS 荧光发射光谱值达到最低. 从(图 4B) ANS 荧光发射光谱在 510 nm 处的荧光强度比可知在 8 mol/L 尿素中荧光强度值是 0 mol/L 尿素中的 3 倍, 可以看出在 8 mol/L 尿素中几乎全部的疏水区域暴露于水中与 ANS 结合. 另外, 从 B 图中可知 MMP-12 复性折叠过程是高度协同的二态模型, 其 C_m 等于 4 mol/L, 和二维 ^1H - ^{15}N HSQC 谱图所得到的结果是吻合的. 当尿素浓度大于 4 mol/L 时疏水基团大部分暴露于水中; 当尿素浓度低于 4 mol/L 时这些疏水基团逐步折叠, 并且折叠速率较快.

图 4 监控 MMP-12 折叠过程的 ANS 荧光发射光谱图. (A) 在不同尿素浓度下 ANS 荧光光谱最大吸收波长处荧光强度变化图. (B) 在不同尿素浓度下 510 nm 处荧光强度比率(FX/F8)

Figure 4 The folding of MMP-12 monitored by the ANS fluorescence. (A) The relative change in ANS fluorescence emission maximum at different concentrations of urea. (B) Ratio of ANS fluorescence emission intensity at 510 nm (FX/F8)

4 结论

通过以上四种方法对 MMP-12 复性过程研究, 我们发现在尿素浓度大于 4 mol/L 时, 蛋白处于变性状态, 大部分疏水区域暴露于水溶液的极性环境中; 当尿素浓度从 4 mol/L 到 3 mol/L 缓慢降低过程中, 疏水基团逐步折叠, 然后以折叠的疏水区域为中心, MMP-12 整个蛋白逐步正确折叠.

本文用了三种方法考察了 MMP-12 的复性折叠过程. 在 7 mol/L 盐酸胍条件下 MMP-12 处于完全变性状态, HSQC 谱图中无信号出现. 在 8 mol/L 脲素浓度下 MMP-12 有信号出现, 但是信号重叠严重, 证明在梯度稀释过程中 MMP-12 形成了折叠核并且从稳态荧光和 ANS 参数可知在尿素浓度大于 4 mol/L 时 MMP-12 处于变性状态, 当尿素浓度低于 4 mol/L 时 MMP-12 开始复性, 蛋白逐步正确折叠^[18], 表明 MMP-12 的 C_m 值等于 4 mol/L. 在尿素浓度从 4 mol/L 到 3 mol/L 复性过程中, 如果尿素浓度降低速度过快, MMP-12 折叠时会快速形成多种构象, 这些构象容易不可逆地聚集形成聚集体^[19]. 当尿素浓度缓慢降低, 疏水区域正确折叠, 以这些疏水区域为中心, MMP-12 正确折叠. 基于包涵体复性理论研究^[18~20], 我们认为这些疏水区域的形成限制了 MMP-12 的构象种类, 使其正确折叠. 因此, 在 MMP-12 复性过程中, 减慢尿素降低速率, 采用等容梯度透析法复性, 将有利于 MMP-12 折叠复性. 最终我们实现从 1 L LB 培养基表达获得的包涵体中复性得到约 43 mg 的蛋白, 复性收率是文献报道的单变复性方法^[14]的两倍.

虽然国内外有大量文献报道有关蛋白在折叠和去折叠机制的文章^[19~22], 也有不少科研单位研发了包涵体复性筛选体系(iFOLD® Protein Refolding Systems), 但是很少有文献报道根据包涵体折叠状态优化其复性过程; 因此本文创造性地将二者结合起来进行包涵体复性过程优化, 减少了筛选的盲目性. 这为今后包涵体复性过程的优化提供了清晰的思路.

References

- Birkedal-Hansen, H.; Moore, W. G. I.; Bodden, M. K.; Windsor, L. J.; Birkedal-Hansen, B.; DeCarlo, A.; Engler, J. A. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1993**, 4(2), 197.
- Matrisian, L. M. *Trends Genet.* **1990**, 6, 121.
- Hughes, C.; Murphy, G.; Hardingham, T. E. *Biochem. J.* **1991**, 279(Pt 3), 733.
- Sato, H.; Kita, M.; Seiki, M. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(31), 23460.
- Van Wart, H. E.; Birkedal-Hansen, H. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U. S. A.* **1990**, 87(14), 5578.
- 6 Murphy, G.; Docherty, A. J. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **1992**, 7(2), 120.
- 7 Ohnishi, K.; Takagi, M.; Kurokawa, Y.; Satomi, S.; Konttinen, Y. T. *Lab. Invest.* **1998**, 78(9), 1077.
- 8 Kurahara, S.; Shinohara, M.; Ikebe, T.; Nakamura, S.; Beppu, M.; Hiraki, A.; Takeuchi, H.; Shirasuna, K. *Head Neck* **1999**, 21(7), 627.
- 9 Finlay, G. A.; O'Driscoll, L. R.; Russell, K. J. et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **1997**, 156(1), 240.
- 10 Rawlings, N. D.; Tolle, D. P.; Barrett, A. J. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32(Database issue), D160.
- 11 Shapiro, S. D.; Kobayashi, D. K.; Ley, T. J. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(32), 23824.
- 12 Belaaouaj, A.; Shipley, J. M.; Kobayashi, D. K.; Zimonjic, D. B.; Popescu, N.; Silverman, G. A.; Shapiro, S. D. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(24), 14568.
- 13 Mecham, R. P.; Broekelmann, T. J.; Fliszar, C. J.; Shapiro, S. D.; Welgus, H. G.; Senior, R. M. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272(29), 18071.
- 14 Zheng, X.; Ou, L.; Tong, X. et al. *Protein Expr. Purif.* **2007**, 56(2), 160.
- 15 Yang, Z.; Zhang, L.; Zhang, Y. et al. *PLoS One* **2011**, 6(7), e22981.
- 16 Uversky, V. N.; Winter, S.; Lober, G. *Biophys. Chem.* **1996**, 60(3), 79.
- 17 Arai, M.; Kuwajima, K. *Fold Des.* **1996**, 1(4), 275.
- 18 Tsumoto, K.; Arakawa, T.; Chen, L. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2010**, 11(3), 285.
- 19 Onuchic, J. N.; Luthey-Schulten, Z.; Wolynes, P. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1997**, 48, 545-600.
- 20 Garcia, P.; Serrano, L.; Rico, M.; Bruix, M. *Structure* **2002**, 10(9), 1173.
- 21 Bom, A. P.; Freitas, M. S.; Moreira, F. S.; Ferraz, D.; Sanches, D.; Gomes, A. M. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285(4), 2857.
- 22 Egan, D. A.; Logan, T. M.; Liang, H.; Matayoshi, E.; Fesik, S. W.; Holzman, T. F. *Biochemistry* **1993**, 32(8), 1920.

(A1109161 Cheng, B.)