



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi

Biomedicinska analytikerprogrammet

Examensarbete 15 hp, vt 2012

Expression and Purification of Murine Tripeptidyl Peptidase II

Sofia Gustafsson

Handledare: Birgitta Tomkinson
Institutionen för Medicinsk Biokemi och Mikrobiologi
Uppsala Universitet

ABSTRACT

Tripeptidyl peptidase II (TPPII) is an exopeptidase which cleaves tripeptides from the N-terminus of peptides. The exact functional role of TPPII is still a matter of investigation. It is believed that the enzyme is primarily involved in intracellular protein degradation, where it cooperates with the proteasome and other peptidases to degrade proteins into free amino acids. These amino acids can subsequently be used in the production of new proteins. The aim of this work was to express murine wild type TPPII using *E. coli* and thereafter purify the enzyme from the bacterial lysate. Methods used for the purification included protein and nucleic acid precipitation, anion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. The presence of TPPII was determined using activity assay, western blot and SDS-PAGE. Despite the fact that some modification is still needed, the purification yielded a total of 34µg TPPII with a purity of approximately 60%. This purified enzyme can be used for future functional characterization.

Keywords

E. coli expression

Anion exchange chromatography

Hydrophobic interaction chromatography

Gel filtration

Steady state kinetics

INTRODUKTION

Enzymer är en grupp proteiner som är oumbärliga för vår överlevnad. Ett enzyms huvudfunktion är att öka en reaktions hastighet, utan detta skulle reaktionen inte ske i tillräckligt stor utsträckning för att vara livsuppehållande. Enzym katalyserar tusentals biokemiska reaktioner och berör många viktiga processer såsom energiproduktion, syntes och reparation av DNA samt omsättning av kroppens byggstenar. Studien av enzymer är ett stort område inom biokemisk forskning. Att få vetskap om ett enzyms uppbyggnad, lokalisation och funktion kan hjälpa oss att förstå processer i kroppen. Detta kan i sin tur leda till nya behandlings- och diagnostiseringsmetoder för många sjukliga tillstånd.

Peptidaser, även kallade proteaser, är en grupp enzymer som behövs för proteinnedbrytning, proteolys. Proteolys behövs av många olika anledningar, till exempel nedbrytning av protein i matspjälkningssystemet för att möjliggöra upptag från födan, aktivering av koagulationssystemet, nedbrytning av hormoner för att stoppa signalering och degradering av protein som är gamla eller felveckade till nya byggstenar. Peptidaser behövs för inaktivering av enzym men även för klyvning av inaktiva prekursorer till aktiva enzym. En annan viktig uppgift hos dessa enzym är att generera peptider för antigenpresentation, som är en essentiell komponent vid reglering av vårt immunsystem. Det finns två huvudgrupper av peptidasverkan; exopeptidasaktivitet och endopeptidasaktivitet. Exopeptidaser klyver bort terminala aminosyror medan endopeptidaser klyver peptidbindningar mitt i en peptidkedja. Peptidaser delas in i olika huvudgrupper baserat på vilka viktiga aminosyror som ingår i dess aktiva yta, det vill säga de aminosyror som ansvarar för katalysförmågan. Dessa grupper är serinpeptidaser, cysteinpeptidaser, aspartatpeptidaser och metallopeptidaser [1].

Serinpeptidaser är främst endopeptidaser, som klyver peptidbindningar med hjälp av aminosyran serin i sin aktiva yta. Den katalytiska funktionen hos dessa enzym beror till största del på den ”katalytiska triaden” som är lokaliserad i dess aktiva yta. Denna triad ser likadan ut hos alla serinpeptidaser och består av tre nyckelaminosyror, serin, histidin och aspartat, som alla tre har en varsin bestämd uppgift vid klyvningen. Serinet, som har den centrala rollen vid klyvningen, utför en nukleofil attack mot karbonylkolet i substratets peptidbindning med hjälp av sin hydroxylgrupp. Serinpeptidaser kan ytterligare delas in i grupper baserat på deras struktur, de två största grupperna är kymotrypsin-liknande och subtilisin-liknande.

För att nya proteiner ska få en möjlighet att bildas behövs byggstenar i form av fria aminosyror. Dessa utvinns från födan såväl som från felaktiga och gamla proteiner, som bryts ned till dessa enstaka beståndsdelar. Proteinnedbrytningen sker dels lysosomalt, av peptidaser

med ett lågt pH-optimum, och dels i cytosolen. I cytosolen är det först och främst ubiquitin-proteasomsystemet som ansvarar för initieringen av proteindegradationen. En proteasom är ett stort ATP-beroende komplex bestående av proteolytiska enzym. Komplexet är format som en cylinder där insidan har flera aktiva ytor, där peptidkedjor kan klyvas. Proteinerna måste därför ta sig in i proteasomen för att kunna brytas ned och dessa måste även markeras med ubiquitinkedjor för att kännas igen av proteasomen. Oligopeptiderna som bildats när proteasomen har kluvit proteinerna kan i sin tur brytas ned till enstaka aminosyror av olika peptidaser såsom aminopeptidaser, dipeptidylpeptidaser och tripeptidylpeptidaser.

Tripeptidylpeptidas II (TPPII) är ett enzym som främst är känt för sin exopeptidasfunktion, där det klyver bort tripeptider från den N-terminala änden på peptider. Enzymet upptäcktes först i lever hos råttor. Förutom dess klyvningsfunktion upptäcktes det även att enzymet hade en anmärkningsvärt hög molekylvikt [2]. Senare har det visat sig att TPPII förekommer i flera olika vävnader såsom erythrocyter [3] och hjärna [4] och även hos många olika organismer, däribland människa, bananflugor (*Drosophila melanogaster*), råttor och mus [5]. Dock finns det skillnader mellan bananflugans TPPII jämfört med TPPII från däggdjur. Murint och humant TPPII har 96% likhet i sin aminosyrasekvens, vilket bör innebära att deras egenskaper är nästintill identiska, medan TPPII från bananflugor endast har 37% likhet med TPPII från däggdjur [6]. Det finns även homologer till TPPII i andra organismer [5]. Huvudparten av enzymet befinner sig fritt i cellens cytosol. Men det finns även en membranbunden form, som bland annat har påvisats med hjälp av immunhistokemisk färgning av nervvävnad från råttor [4].

Genom att studera humant TPPII från erythrocyter med elektronmikroskopi kunde det konstateras att enzymet bildar ett stort komplex bestående av repetitiva strukturer och att detta komplex behövs för full aktivitet. Dissociation av komplexet till mindre subenheter medför att enzymets aktivitet minskar [7]. Senare studier utförda på TPPII från bananflugor har uppenbarligen att komplexet består av två proteinkedjor som är tvinnade kring varandra. Varje kedja består i sin tur av tio segment som tros vara TPPII-dimerer [8]. Komplexet har en massa på över 4MDa och subenheterna har en massa på 138kDa hos däggdjur [6] respektive 150kDa hos bananflugor [8]. När komplexet dissocierar till dimerer förlorar det sin aktivitet med 90% [5] men komplexet kan återassociera spontant och på så sätt reaktiveras. Denna mekanism skulle kunna vara sättet som enzymets aktivitet regleras på [9]. Det har föreslagits att när två dimerer staplas på varandra sker en förändring i positionen av en nyckelaminosyra i enzymets aktiva yta, vilket leder till aktivering [10]. De dimerer som sitter längst ut på en kedja har kontakt med de terminala dimererna på den andra kedjan, detta gör att komplexet kan hållas

stabil [8,10]. TPPII klassas som ett serinpeptidas av subtilisintyp eftersom enzymet har samma katalytiska triad i sin aktiva yta, aspartat, histidin och serin, och en liknande aminosyrasekvens kring dessa [6,10]. Studier av komplexets och dimerens struktur har påvisat att komplexet innehåller ett kavitetssystem och att subenheternas aktiva yta sannolikt är belägen inne i detta system [10,11]. Den aktiva ytans placering medför att den isoleras från den cytosoliska miljön och detta innebär i sin tur att peptider måste ta sig in i dessa håligheter för att kunna klyvas. Denna transport innebär ett begränsat tillträde till den aktiva ytan, på så sätt kan endast oveckade peptidkedjor klyvas av komplexet [10]. Studier har även påvisat att det är subenhetens N-terminala del som utgör den katalytiska domänen [10,12] medan dess C-terminala del tros delta vid bildandet av komplexet [10]. En annan viktig detalj i enzymets struktur är två negativt laddade glutamater i den aktiva ytan som interagerar med den positiva N-terminalen på substratet, vilket är essentiellt för enzymets substrataffinitet [10,13].

Den fysiologiska funktionen hos TPPII är fortfarande inte helt klargjord, enzymet har visat sig delta i många olika sammanhang och kallas därför för ett ”multifunktionspeptidas” [5]. Som tidigare nämnts så är enzymets huvudfunktion att klyva tripeptider från peptiders N-terminala del [2]. Det har också visat sig att enzymet även har en låg endopeptidasaktivitet [14,15] men den är bara någon bråkdel av dess exopeptidasaktivitet [16]. Det är ännu inte uppkärlat vilka substrat TPPII kan klyva, men enzymet verkar ha en bred substratspecificitet [5]. Dock vet man att enzymet föredrar att klyva efter hydrofoba aminosyror och att det inte kan klyva före eller efter prolin [14,15]. Utöver detta har det hittills bara rapporterats om att TPPII endast kan klyva oveckade peptider [12]. Enzymets huvudroll är förmodligen att delta i omsättningen av proteiner, där det samarbetar med ubiquitin-proteasomsystemet och andra peptidaser för att generera fria aminosyror. Proteasomen bryter ned proteiner till oligopeptider som peptidaser, till exempel TPPII, kan använda som substrat för att generera kortare peptider såsom tripeptider. Dessa peptider kan sedan brytas ned av aminopeptidaser till fria aminosyror. Den nedbrytning som TPPII ansvarar för är således ett viktigt delmål vid nedbrytningen av peptider till fria aminosyror [16]. Det har rapporterats om att peptider som är längre än 15 aminosyror är exklusivt beroende av TPPII för sin nedbrytning [12,17]. Det finns bevis som tyder på att TPPII och proteasomen har överlappande funktioner. Det har påvisats att celler kan anpassa sig till en hämmad proteasomfunktion genom att öka TPPII-aktiviteten. En ökad TPPII-aktivitet kompenserar för den hämmade proteasomen så att cellen kan överleva [14,18]. TPPII verkar också spela en roll vid vissa sjukdomstillstånd. Enzymets aktivitet och expression uppreglas vid muskelförtvinning som inträffar under sepsis och cancerkakexi. Under denna katabola respons samarbetar TPPII med proteasomen

för att bryta ned muskulaturen [19,20]. Samband har hittats mellan en ökad TPPII-aktivitet och en påverkan på cancercellers tillväxt och apoptosresistens vid vissa typer av lymfom [12]. Den membranbundna formen av TPPII har visat sig bryta ned och på så sätt inaktivera hormonetolecystokinin (CCK), som är ett mättnadshormon. Detta väcker frågan om inhibering av TPPII kan öka mättnadskänslan och om man då potentiellt kan använda denna mekanism för behandling av övervikt [4,5]. Det finns även studier som visar att TPPII deltar vid alstringen av epitop för antigenpresentation av MHC klass I [21]. Upptäckten av TPPIIs mekanismer väcker hoppet om att enzymet kan vara ett potentiellt läkemedelsmål [5].

En metod som användes kontinuerligt under hela reningen var aktivitetsmätning. Aktivitetsmätning är ett sätt att synliggöra och kvantifiera förekomsten av aktivt TPPII. Mätningen baserar sig på ”steady state” kinetik, där enzymets initialhastighet mäts med ett överskott av substrat vilket innebär att produktkoncentrationen ökar linjärt över tid. Substratet som används för mätningen består av tre aminosyror bundet till molekylen para-nitroanilin, alanin-alanin-fenylalanin-pNA (AAF-pNA). Eftersom TPPII klyver efter tre aminosyror klyvs bindningen mellan fenylalanin och pNA, på så sätt frigörs pNA som en gul produkt. Produkten detekteras kontinuerligt under 30 minuter med hjälp av absorbansmätning. Produktens ökning över tid motsvarar aktiviteten hos TPPII. Eftersom provet inte är rent, innehåller det förutom TPPII även andra proteiner, såsom aminopeptidaser. Dessa aminopeptidaser kan också klyva substratet och på så sätt ge ett falskt för högt värde. På grund av detta inkuberas provet med bestatin, en kompetitiv inhibitor som hämmar aminopeptidaser.

Alla buffertar som användes under reningen innehöll DTT (ditiotreitoll) och glycerol för att bevara aktiviteten hos enzymet. DTT håller enzymet reducerat så att det behåller sin morfologiska form [11] och glycerol stabiliserar enzymkomplexet [7]. För att behålla enzymets aktivitet måste all hantering ske på is eller i kylrum och det förvaras antingen i kyl eller i -80°C.

Syftet med detta arbete var att uttrycka och rena fram murint tripeptidylpeptidas II av vildtyp. Målet var att framställa så mycket rent aktivt TPPII som möjligt, eftersom ett rent enzym är essentiellt för att ytterligare kunna karakterisera enzymet. Reningen baserades till stor del på det protokoll som utformats av S Eklund *et al* [6]. Det murina vildtypsenzymet uttrycktes i *Escherichia coli* och renades fram med hjälp av proteinfällning, anjonbyteskromatografi, HIC (hydrophobic interaction chromatography) och gelfiltering. Alternativet att rena fram enzymet

med hjälp av histidin-tag uteslöts på grund av tidigare undermåliga resultat [13]. Förekomsten av TPPII visualiserades med hjälp av aktivitetsmätning, western blot och SDS-PAGE med efterföljande färgning.

MATERIAL OCH METOD

Expression av murint TPPII av vildtyp

Etisk prövning behövdes ej för att genomföra detta arbete. Kompetenta rosetta DE3 *Escherichia coli* (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland) användes för expressionen av murint TPPII av vildtyp. Genen som kodar för proteinet var infogad i en pET30b(+) vektor (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), framställningen av detta konstrukt beskrivs ingående av S Eklund *et al* [6]. Bakterierna transformerades genom värmeshock och inkuberades därefter i SOC-medium (super optimal broth with catabolite repression) (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland). De rekombinanta bakterierna odlades ut på en platta med LB-medium innehållande 34µg/ml kloramfenikol och 50µg/ml kanamycin för selektionstryck. Ett antal kolonier valdes ut och analyserades med PCR. En av kolonierna, som innehöll vektorn med TPPII-genen, användes för att starta en övernattningskultur. Kolonin odlades i TB-medium med samma antibiotikakoncentration som tidigare i 37°C och 250rpm över natt. Kulturen skalades sedan upp i TB-medium med 30µg/ml kanamycin och odlades under samma förhållanden. När turbiditeten vid 600nm var 1,8 inducerades kulturen med IPTG (isopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosid) till en slutkoncentration av 0,1mM. Dessutom tillsattes ytterligare 15µg/ml kanamycin till en totalkoncentration av 45µg/ml. Kulturen fick sedan växa i 25°C och 250rpm över natt. På denna odling gjordes sedan ett smålysats för att se om det fanns någon produktion av TPPII hos bakterierna och om detta hade aktivitet. När det visade sig att bakterierna uttryckte aktivt TPPII startades en storskalig kultur, med volymen två liter, från vilken proteinet sedan renades fram. Denna kultur framställdes från den utvalda kolonin, med samma procedur som beskrivs ovan. Av en liten andel av denna kultur gjordes smålysats, för att se att det fanns aktivt TPPII innan reningen startades.

Koloni-PCR och agarosgelelektrofores

PCR utfördes på några utvalda kolonier för att klargöra om de innehöll bakterier som hade tagit upp vektorn vid transformeringen. Ett fragment av TPPII-genen amplifierades med hjälp av en forward primer (5'-TGA AGC AGT ATG GAA GCA TA-3') och en reverse primer (5'-CTA AAT GAA GCT GAA GGG-3'). Amplifieringen utfördes utan föreliggande extraktionssteg genom att en ytterst liten mängd koloni tillsattes till mastermixen.

Mastermixen bestod av RNas-fritt vatten, 0,15µM av vardera primer och Premix Taq (Takara Bio Inc, Otsu, Japan). Som positiv kontroll användes samma konstrukt som användes för transformation. PCR utfördes med UnoCycler termocykler (VWR international, Radnor, USA) under följande förhållanden: initiering 95°C i 1min; 30 cykler 95°C i 30s, 48°C i 30s och 72°C i 1min; och ett avslutande steg 72°C i 10min. PCR-produkterna separerades och visualiserades med hjälp av agarosgelelektrofores med en 1% agarosgel och 1×GelRed (Biotium, Hayward, USA) med spänningen 70V i 60min.

Smålysats

15ml kultur skördades genom centrifugering vid 3000g och 4°C i 20min. Bakteriepelleten suspenderades i 50mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 5% (w/v) glycerol och 5mM DTT och lyserades 2×1min med Vibra-cell sonikator (Sonics & Materials Inc, Newtown, USA) med 50% amplitud och 2s pulser. Sonikatet centrifugerades vid 16000g och 4°C i 30min. På lysatets supernatant utfördes sedan aktivitetsmätning och western blot.

Rening

Den storskaliga kulturen skördades genom centrifugering vid 3000g och 4°C i 30min. Pelletarna frystes in i -80°C tills dess att de skulle användas. Pelletarna tinades på is och löstes upp i två till tre volymer 50mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 5% (w/v) glycerol och 5mM DTT. Bakteriesuspensionen lyserades sedan en gång med Zplus series cell disruptor (Constant Systems Ltd, Northants, Storbritannien). Lysatet centrifugerades vid 30000g och 4°C i 15min. För fällning av nukleinsyror tillsattes 3% PEI (polyetylenimin) till supernatanten, till en slutkoncentration av 0,6%. Därefter tillsattes 4M (NH₄)₂SO₄ till en koncentration av 0,2M för fällning av oönskade proteiner. Fällningen centrifugerades ned vid 19000g och 4°C i 5min. Därefter fälldes proteinet i PEI-supernatanten ut genom tillsats av en volym 4M (NH₄)₂SO₄. Fällningen skedde i kyl under omrörning i 30min. Det fällda proteinet pelleterades vid 75000g och 4°C i 30min. Proteinpelleten suspenderades i totalt 15ml 10mM

kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT. Suspensionen dialyserades sedan över natt i kyl under omrörning mot 20 volymer av samma buffert.

Det dialyserade provet applicerades på en 150ml DE-52 anjonbyteskolonn (Whatman Ltd, Maidstone, Storbritannien) jämviktad med 10mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT. Kolonnen tvättades med 200ml 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT. Proteinet eluerades med 200ml 200mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT med flödet 2ml/min. Aktivitet mättes på alla fraktioner och proteinkoncentrationen bestämdes med NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Absorbansen mättes vid 280 och 260nm, därefter beräknades proteinkoncentrationen mg/ml med ekvationen $1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$. De fraktioner som visade högst aktivitet poolades ihop.

Proteinet i poolen fälldes ut över natt i kyl under omrörning med fast $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ till en koncentration av 2,5M. Den fällda anjonpoolen centrifugerades vid 75000g och 4°C i 30min. Pelletarna slammades upp i 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,45 med 30% (w/v) glycerol, 0,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ och 1mM DTT. Pelletsuspensionen applicerades på en 40ml Butyl Sepharose High Performance HIC-kolonn (GE healthcare, Uppsala, Sverige) jämviktad med 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,45 med 30% (w/v) glycerol, 0,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ och 1mM DTT. Kolonnen tvättades med en kolonnvolym 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol, 0,1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ och 1mM DTT och sedan med en kolonnvolym 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT.

Proteinet eluerades med 10mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT med flödet 1ml/min. Fraktioner med högst aktivitet poolades ihop och koncentrerades genom centrifugering vid 4000g med Amicon Ultra centrifugal filter unit 50kDa cut off (Millipore, Billerica, USA). Koncentratet applicerades på en 72ml 1cm Ø Sepharose CL 4B gelfiltreringskolonn (GE Healthcare, Uppsala, Sverige) jämviktad med 100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT. Proteinet eluerades med samma buffert med flödet 0,1ml/min. Fraktioner med hög aktivitet analyserades med SDS-PAGE och de fraktioner med högst renhet poolades och koncentrerades på samma sätt som tidigare.

SDS-PAGE och Western blot

Två delar prov blandades med en del laddningsbuffert till en slutkoncentration av 10% (w/v) glycerol, 2,3% (w/v) SDS, 0,1% bromfenolblått och 5% (v/v) merkaptoetanol i 62,5mM Tris-HCl buffert pH6,8 och kokades 5min i 95°C. Proverna separerades med SDS-PAGE enligt Laemmli med en 8% polyakrylamidgel och spänningen 200V i 60min. Som standard användes Prestained SDS-PAGE standards, broad range (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) och som positiv kontroll användes samma TPPII som vid aktivitetsmätningen.

Proteinbanden överfördes till ett PVDF-membran med spänningen 100V och 0,35A i 60min. Som transferbuffert användes 20mM tris-150mM glycinbuffert, pH8,3 med 20% (v/v) metanol och 0,01% SDS. Membranet blockades med Odyssey Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) spädd 1:5 med PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH₂PO₄, 8,1mM Na₂HPO₄, pH7,4). Därefter inkuberades membranet med en primär hönsantikropp riktad mot humant TPPII, vars framställning beskrivs av B Tomkinson *et al* [22] med modifieringen att antikroppen endast var enkelaffinitetsrenad. Antikroppen späddes 1:200 med Odyssey Blocking Buffer spädd 1:5 i PBS och 0,1% Tween-20. Inkubationen skedde på rullning över natt i 4°C.

Därefter tvättades membranet med TBS-T (20mM tris, 137mM NaCl pH7,6 med 0,1% Tween-20) och inkuberades 60min i rumstemperatur med sekundära IRDye 800CW Donkey anti-chicken antikroppar (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA). De sekundära antikropparna var spädda 1:5000 med Odyssey Blocking Buffer spädd 1:5 i PBS och 0,01% Tween-20. Efter inkubationen tvättades membranet och scannades med Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

Aktivitetsmätning

Prov späddes med spädningsbuffert (100mM kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 30% (w/v) glycerol och 1mM DTT), så att produktens koncentration ökade linjärt under aktivitetsmätningen. Som positiv kontroll användes humant TPPII framrenat från erythrocyter [3]. Två delar prov blandades med en del inkuberingsbuffert (0,2M kaliumfosfatbuffert, pH7,5 med 8mM DTT och 400µM bestatin) i en 96-hålsplatta som sedan värmdes till 37°C. Därefter tillsattes en del 0,8mM AAF-pNA (Bachem, Bubendorf, Schweiz) till en slutkoncentration av 200µM. Produktens koncentrationsändring mättes i Tecan Infinite M200 plattläsare (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) vid 405nm och 37°C i 30min. Rådatan $\Delta A/\text{min}$ omvandlades till aktiviteten $\Delta A/\text{min/ml}$ ospädd prov. För att kunna räkna ut den specifika aktiviteten, $\Delta A/\text{min/mg}$ protein, mättes proteinkoncentrationen i provet med

Bradfordmetoden (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) enligt tillverkarens instruktioner.

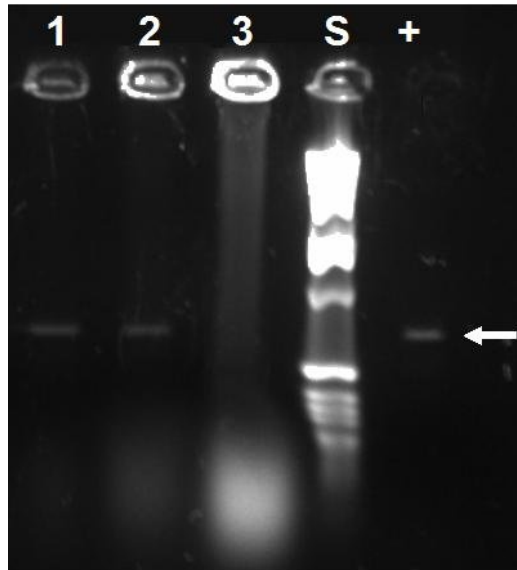
Bestämning av K_m och V_{max}

K_m (Michaelis konstant) och V_{max} (enzymets maxhastighet) hos det framrenade enzymet bestämdes genom mätning av enzymaktiviteten vid olika koncentrationer av substratet AAF-pNA. Aktivitetsmätningen utfördes som beskrivs ovan, med sex olika substratkoncentrationer som sträcktes mellan 400 och 12,5 μ M. K_m och V_{max} beräknades sedan med hjälp av regressionsanalys med programmet GraFit (Erithacus Software Ltd, West Sussex, Storbritannien). V_{max} uttrycktes i nmol/min/mg protein, för att omvandla aktiviteten $\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ protein till denna enhet användes produktens molära absorptionskoefficient 9,6/mM/cm och ytarean hos en brunn i 96-hålsplattan 0,385cm².

RESULTAT

Koloni-PCR och agarosgelelektrofores

Rosetta *E. coli* transformerades med en pET30b(+) vektor innehållande genen som kodar för murint TPPII av vildtyp. De transformerade bakterierna odlades ut och tio kolonier valdes för fortsatt analys med PCR för att klargöra om de innehöll vektorn. Ett fragment av TPPII-genen amplifierades och PCR-produkterna separerades med hjälp av agarosgelelektrofores med en 1% agarosgel. Banden visualiserades med GelRed och UV-ljus. Ett representativt resultat från koloni-PCR visas i figur 1. Ett fragment med en storlek på 700 baspar erhöles, vilket också var det som förväntades av amplifieringen. Endast en av de tio kolonier som analyserades saknade TPPII-genen. Två av de positiva kolonierna, som benämns A och B, valdes ut för fortsatt odling. Dessa kolonier valdes på grund av att de hade ett starkt produktband samtidigt som de hade få andra nukleinsyror, vilket innebär att kolonierna hade många kopior av genen.

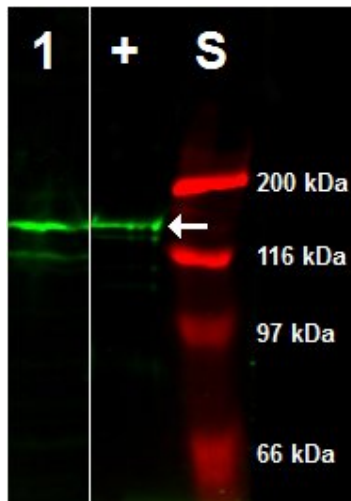


Figur 1. PCR-analys på utvalda kolonier från transformering. Brunn 1 och 2: positiva kolonier, 3: negativ koloni, S: standard, +: positiv TPPII-kontroll. Pilen anger var produktbandet med storleken 700 baspar finns.

Smålysats

Smålysats 1

En mindre kultur på 50ml gjordes av koloni A. Kulturen odlades i TB-medium med tillsats av antibiotika och inducerades sedan med hjälp av IPTG. Av denna kultur gjordes ett smålysats för att klargöra om bakterierna uttryckte TPPII och om detta var aktivt. Aktiviteten i lysatets supernatant var $9,5\Delta A/\text{min}/\text{ml}$ och den specifika aktiviteten var $1,15\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ protein. För att säkerställa att aktiviteten tillhörde TPPII analyserades smålysatsen med western blot, resultatet från denna visas i figur 2. Det förekom TPPII i smålysatsen, detta kunde konstateras eftersom proteinbandet dels reagerade med antikropparna riktade mot TPPII och dels för att bandet hade samma storlek som den positiva kontrollen. Det fanns även band som utgör nedbrytningsprodukter av enzymet, som också de reagerade med antikropparna. Nedbrytningsprodukterna visas som smalare band under TPPII-bandet. Med hjälp av resultatet från western blot kunde det fastställas att aktiviteten härstammade från TPPII.



Figur 2. Visualisering av TPPII i smålysat med western blot. Brunn 1: supernatant av lyserad kultur från koloni A, +: positiv TPPII-kontroll, S: standard. Pilen anger var TPPII-bandet finns.

Smålysat 2

När det var fastställt att bakterierna uttryckte aktivt TPPII startades två storskaliga kulturer från koloni A och B. Totalvolymen på respektive kultur var två liter. På en liten del av dessa kulturer gjordes smålysat, för att se att det uttrycktes aktivt TPPII innan reningen startades. Aktiviteten hos kultur härstammande från koloni A var 1,74 Δ A/min/ml och den specifika aktiviteten var 0,37 Δ A/min/mg protein. Aktiviteten hos koloni B var 2,1 Δ A/min/ml och den specifika aktiviteten var 0,43 Δ A/min/mg protein. Bakterierna i de båda storskaliga kultureerna uttryckte således aktivt TPPII och detta innebar att framrening av enzymet kunde påbörjas.

Rening

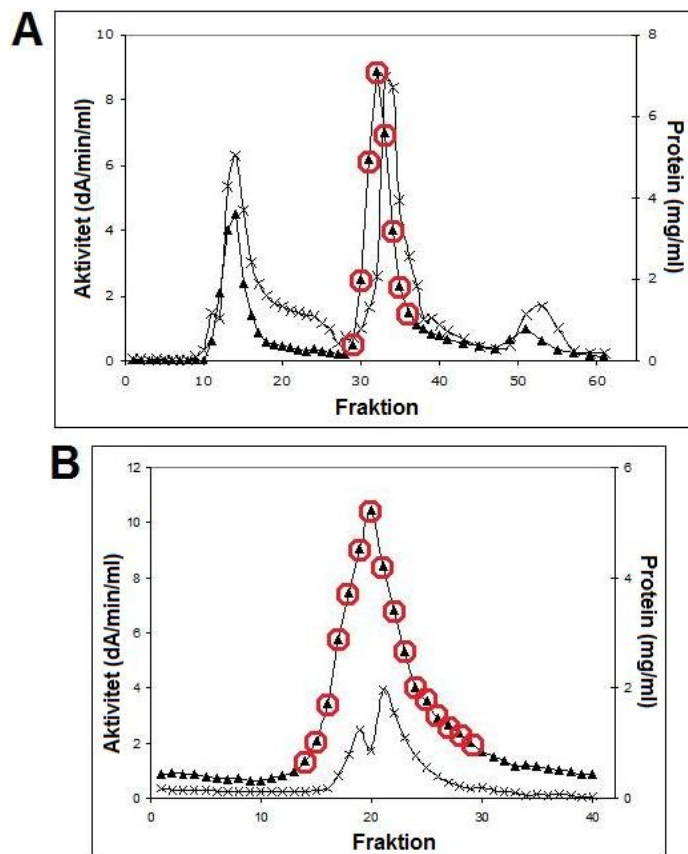
Reningens första steg till och med HIC utfördes i två omgångar där kultur från koloni A och B renades separat. Därefter renades de två HIC-poolerna tillsammans vid gelfiltreringssteget. Reningen av kultur härstammande från koloni A benämns som rening A och reningen av kultur härstammande från koloni B benämns som rening B.

Fällning, anjonbyteskromatografi och HIC

Den storskaliga kulturen skördades och lyserades. I rålysatets supernatant fälldes nukleinsyror ut med PEI och oönskade proteiner fälldes ut med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Proteinerna i PEI-supernatanten fälldes ut med en högre koncentration av $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pelleten suspenderades i buffert och dialyserades därefter. Dialysatet applicerades på en anjonbyteskolonn. Ett

kromatogram från anjonbyteskromatografen vid rening B visas i figur 3A. Vid båda reningsomgångarna eluerades TPPII ut vid tre olika tillfällen under kromatografen, detta uppenbarade sig som tre aktivitetstoppar. Dessa tre aktivitetstoppar var tätt följda av en varsin proteintopp. Den första aktivitetstoppen kom ut vid tvättsteget, därefter kom den andra toppen vid elueringen. Till sist kom även en liten topp vid eftertvätten. Vid rening A var tvätttoppen större än elueringstoppen, det vill säga mer enzym kom ut vid tvätten än vid elueringen.

De fraktioner i elueringstoppen som hade högst aktivitet poolades ihop. Proteinet i anjonpoolen fälldes ut med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Den fällda anjonpoolen suspenderades och suspensionen applicerades på en HIC-kolonn. Ett kromatogram från HIC-reningen vid rening B visas i figur 3B. Här kom endast en bred aktivitetstopp samtidigt med två sammanfogade proteintoppar. De fraktioner som hade högst aktivitet poolades ihop.



Figur 3. Kromatografier: rening av kultur härstammande från koloni B. **A:** Kromatogram från anjonbyteskromatografi. Proteinkoncentration mg/ml (×) och aktivitet $\Delta A/\text{min}/\text{ml}$ (▲) mot fraktionsnummer. Fraktion 1-20: 100mM kaliumfosfatbuffert = tvätt, fraktion 21-40: 200mM kaliumfosfatbuffert = eluering, fraktion 41-60: eftertvätt. De fraktioner som poolades ihop är inringade. **B:** Kromatogram från HIC, elueringsfraktioner.

Under hela reningsprocessen utfördes aktivitetsmätning och proteinbestämning på de olika reningsstegen, resultaten från rening A och B visas i tabell 1. Steg som saknade aktivitet, såsom 'flow trough' och supernatant från $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -fällning, visas ej i tabellen. Stegen från rålysat till PEI supernatant hade lägre total aktivitet jämfört med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pelleten, därför ökade även utbytet. Det förlorades mycket TPPII i HIC-tvättarna vid båda reningsomgångarna. Vid rening B var det till och med högre total aktivitet och utbyte i tvätt 1 jämfört med HIC poolen. Den generella trenden var att den specifika aktiviteten och reningsfaktorn ökade för varje reningssteg vilket innebär att mer och mer skräpprotein försvann. Samtidigt minskade den totala aktiviteten och därför också utbytet.

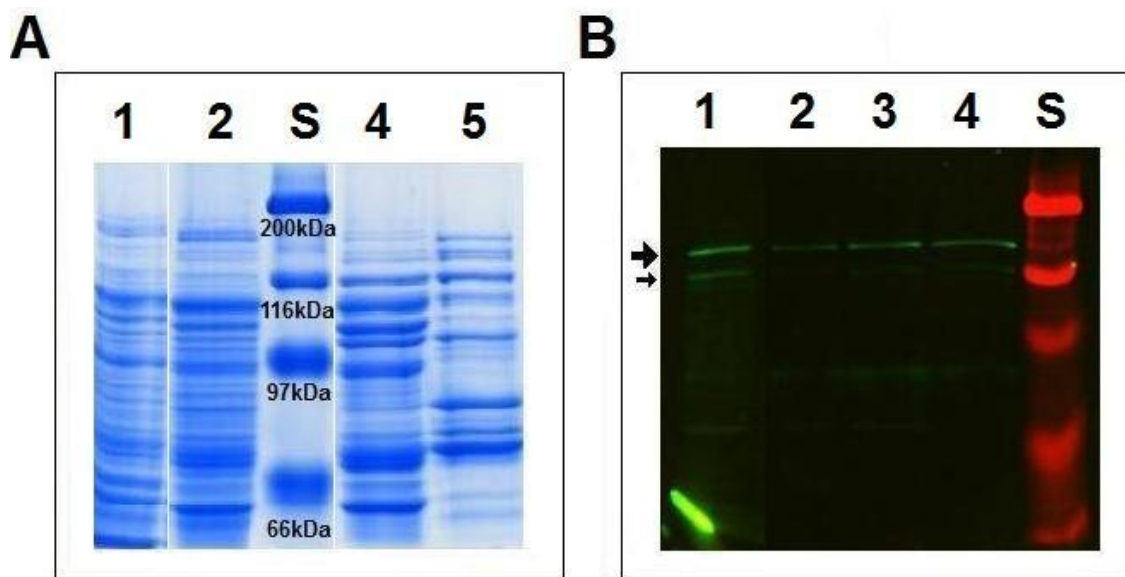
Tabell 1. Reningstabell rening A och B

Reningssteg	Rening A				Rening B			
	Total aktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	Utbyte (%)	Specifik aktivitet ($\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Reningsfaktor	Total aktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	Utbyte (%)	Specifik aktivitet ($\Delta A/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Reningsfaktor
Rålysat	600	100	0,26	1	995,5	100	0,415	1
Supernatant lysat	678	113	0,36	1,38	769	77	0,38	0,9
PEI supernatant	475	79	0,22	0,85	690	69	0,47	1,1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pellet	1000	167	1,14	4,4	1393	140	1,76	4,2
Dialysat	862	144	1,12	4,3	1130	114	1,14	2,75
Pool anjonbyte	238	40	1,12	4,3	479	48	1,66	4
Tvätt I HIC	10	1,7	2,2	8,5	183	18,4	1,13	2,72
Tvätt II HIC	25	4,2	6,8	26	40	4	4,17	10
Pool HIC	37	6	4,8	18,5	79,5	8	9	21,6

Sammanfattande tabell för reningssteg från rening A och B. Aktivitetsmätning och proteinbestämning utfördes på alla reningssteg. Med hjälp av aktivitet, volym och proteinkoncentration beräknades total aktivitet, utbyte, specifik aktivitet och reningsfaktor.

Reningsstegen analyserades även med SDS-PAGE med kolloidal coomassiefärgning, för att följa förändringen i renhet efter varje reningssteg och med western blot, för att utreda vilka proteinband som innehöll TPPII. Exempel på resultat visas i figur 4 som visar resultaten från rening B. I figur 4A går det att urskilja att proteinbanden förändrades efter varje reningssteg, proteinbanden blev färre och vissa band blev även förstärkta. Detta är mest påtagligt om

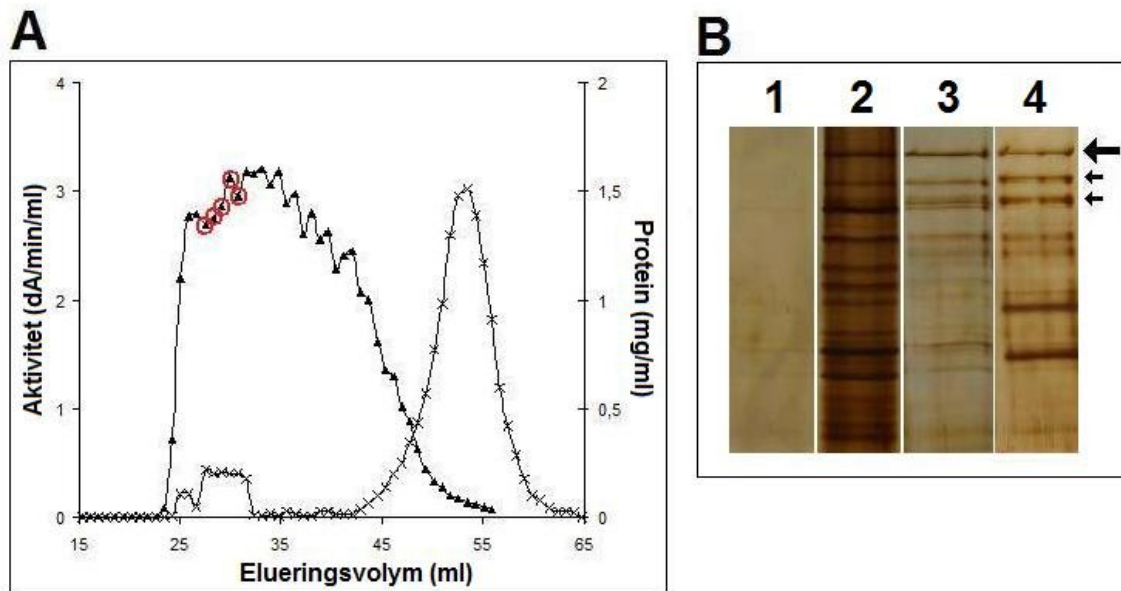
proteinmönstret hos rålysatet jämförs med HIC-poolens proteinmönster. Genom att studera figur 4B kan man konstatera att det fanns TPPII i alla brunnar. De smalare banden under TPPII-bandet var nedbrytningsprodukter av TPPII. Dessa försvann mer och mer för varje reningssteg, vilket innebar att det hade renats bort allt eftersom reningen fortskred.



Figur 4. Analys av reningssteg från reining B med SDS-PAGE och western blot. **A:** SDS-PAGE med kolloidal coomassiefärgning. Brunn 1: rålysat, 2: dialysat, S: standard, 4: anjonpool, 5: HIC pool. Provolymen anpassades så att proteinmängden var $10\mu\text{g}$ per brunn. **B:** Western blot. Brunn 1: supernatant rålysat, 2: dialysat, 3: anjonpool, 4: HIC pool, S: standard. Provolymen anpassades så att aktiviteten var $7 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$ per brunn. Stor pil indikerar var TPPII-bandet är lokaliserat (storlek 150kDa) och liten pil indikerar var nedbrytningsprodukter av TPPII finns.

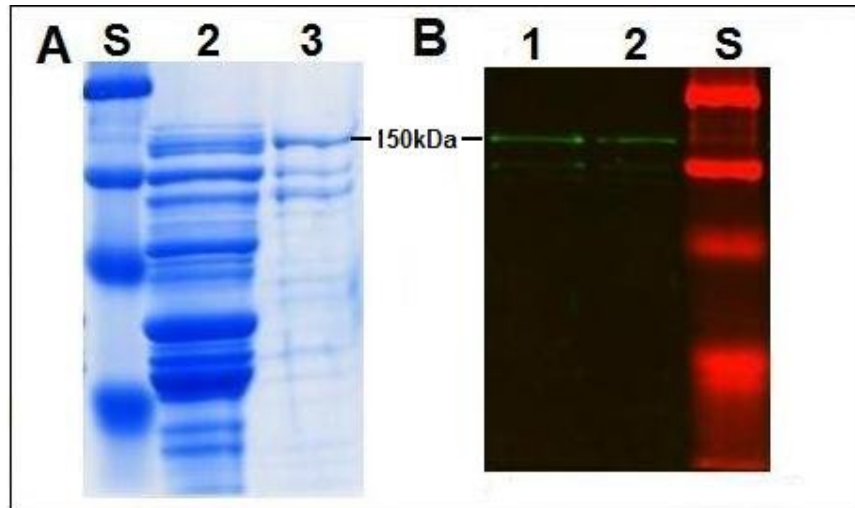
Gelfiltrering

De båda HIC-poolerna fördes samman och koncentrerades. Koncentratet applicerades på en gelfiltreringskolonn. Kromatogrammet från gelfiltreringen visas i figur 5A. I kromatogrammet ses en bred aktivitetstopp tillsammans med två små sammanfogade proteintoppar följt av en tredje större proteintopp. Ett antal fraktioner valdes ut och analyserades med SDS-PAGE med silverfärgning för att uppskatta renheten hos dem. Resultatet visas i figur 5B. De fraktioner som visade sig ha högst renhet, det vill säga de fraktioner som hade starka TPPII-band och färre andra proteinband, poolades ihop. Denna gelfiltreringspool koncentrerades sedan.



Figur 5. Kromatogram och SDS-PAGE med silverfärgning gelfiltreringsfraktioner. **A:** Kromatogram från gelfiltrering. Aktivitet $\Delta A/\text{min/ml}$ (\blacktriangle) och proteinkoncentration mg/ml (\times) mot elueringsvolym. De poolade fraktionerna är inringade, dessa motsvarade elueringsvolymen 27,5–31,5ml. **B:** SDS-PAGE med silverfärgning av gelfiltreringsfraktioner. Brunn 1: fraktion utan TPPII-aktivitet, 2: oren fraktion innan pool, 3: en av de poolade fraktionerna, 4: oren fraktion efter pool. Stor pil indikerar var TPPII-bandet är lokaliserat (storlek 150kDa) och små pilar indikerar var nedbrytningsprodukter av TPPII finns.

Även i detta stadiet av reningen analyserades reningsstegen med SDS-PAGE med kolloidal coomassiefärgning. Resultatet visas i figur 6A. Den koncentrerade gelfiltreringspoolen hade starka TPPII-band, dock även några andra svaga proteinband. Renheten i denna pool skiljde sig markant från den koncentrerade HIC-poolen. Resultatet från western blot visas i figur 6B. Western blot utfördes för att fastställa om de band som antogs vara TPPII-band också var det. De band som reagerade med antikropparna innehöll TPPII, som antingen var helt eller i nedbruten form. Tre band som fanns i både coomassiegelen och western blot visade sig innehålla TPPII. Baserat på dess R_f -värde hade de tre banden en storlek på 150, 140 respektive 130kDa. Volymen hos dessa tre band motsvarade 68% av alla band i brunnen, som motsvarar den koncentrerade gelfiltreringspoolen. Detta skulle då innebära att provet var 68% rent. Men det nedersta bandet var bredare i coomassiegelen jämfört med respektive band i western blot. Detta innebar att bandet egentligen bestod av två sammanfogade band, som det ena innehåller TPPII-fragment och det andra innehåller ett annat oidentifierat protein med ungefär samma storlek. Med hänsyn till detta uppskattades renheten till cirka 60%.



Figur 6. Analys av reningssteg från gelfiltrering med SDS-PAGE och western blot. **A:** SDS-PAGE med coomassiefärgning. S: Standard, brunn 2: koncentrerad HIC pool (15µg protein), 3: koncentrerad gelfiltreringspool (1,2µg). I figuren anges TPPII-bandets storlek och position. **B:** Western blot. Brunn 1: koncentrerad HIC pool, 2: koncentrerad gelfiltreringspool, S: standard. Vardera brunn motsvarade en aktivitet på $7 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$.

Aktivitetera för reningsstegen från och med den koncentrerade HIC-poolen visas i tabell 3. Det slutgiltiga utbytet blev 0,78% av den sammanlagda totala aktiviteten i rålysaten från kultur A och B. Preparationen blev 647 gånger renare jämfört med rålysaten. Den koncentrerade gelfiltreringspoolen som var slutsteget i reningen från totalt fyra liter kultur innehöll då totalt 34µg TPPII, beräknat utifrån att TPPII utgör 60% av den totala proteinmängden i provet. Detta motsvarar 8,5µg rent TPPII per liter kultur.

Tabell 3. Reningstabell gelfiltrering

Reningssteg	Aktivitet ($\Delta A/\text{min/ml}$)	volym (ml)	Total aktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	Utbyte (%)	Protein- koncentration (mg/ml)	Specifik aktivitet ($\Delta A/\text{min/mg}$ protein)	Renings- faktor
HIC pool koncentrerad	55,4	1,3	72	4,5	8,9	6,25	18,4
Filtrat HIC pool	0,3	23	7,2	0,5	0,615	5	14,7
Gelfiltreringspool	2,46	5	12,3	0,77	0,012	205	603
Gelfiltreringspool konc.	17,8	0,7	12,5	0,78	0,081	220	647
Filtrat gelfiltreringspool	0,45	4	1,8	0,1	0,006	75,3	221,5

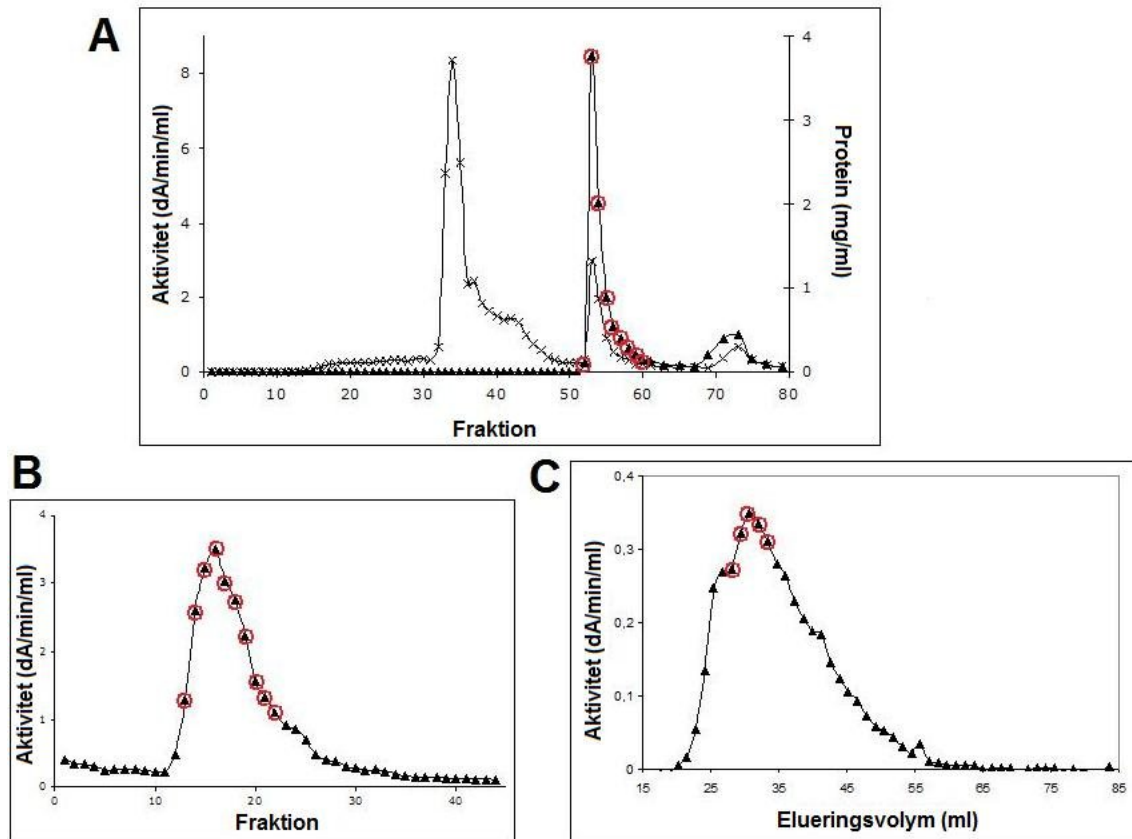
Rening av HIC-pooler från de två reningsomgångarna med gelfiltrering. Utbytet och reningsfaktorn är baserade på ett medeltal från rålysaten från rening 1 och 2. Med hjälp av aktivitet, volym och proteinkoncentration beräknades total aktivitet, utbyte, specifik aktivitet och reningsfaktor.

Rekromatografi

Eftersom mycket enzym förlorades i tvätttopparna vid de två anjonbyteskromatografierna utfördes en framrening av TPPII från dessa. Fraktioner med högst aktivitet poolades ihop och poolen späddes med 30% glycerol för att sänka jonstyrkan istället för att dialysera den över natt. Poolen renades sedan på samma sätt som tidigare reningar. Ett kromatogram för anjonbyteskromatografien visas i figur 7A. Här kom endast två toppar, en stor elueringsstopp och en liten topp i eftertvätten. Det kom inte ut något TPPII i tvätten som vid de tidigare anjonbytena.

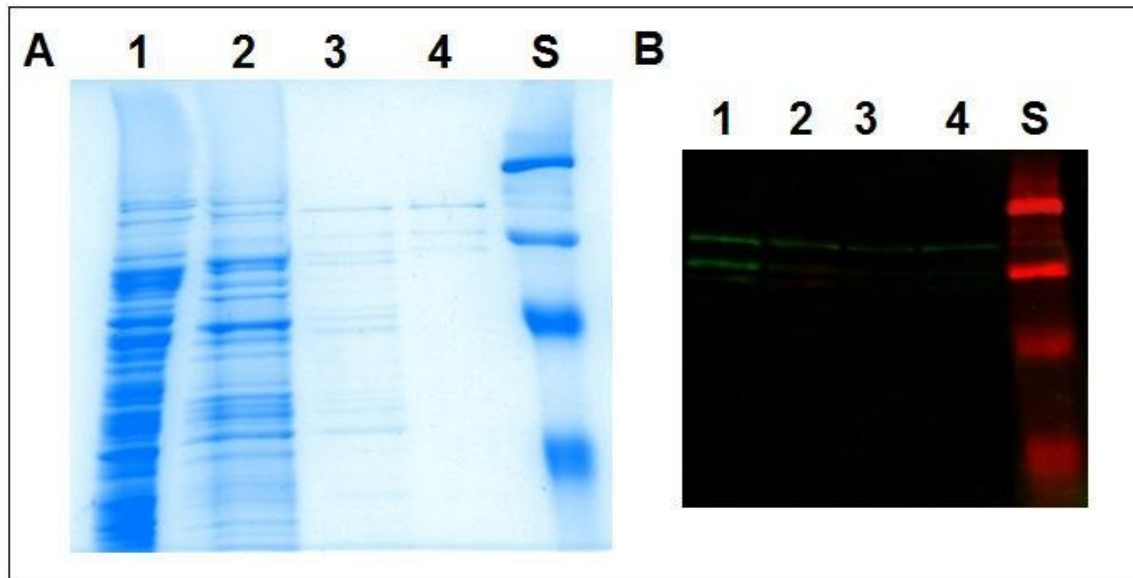
Proteinet i anjonpoolen fälldes ut med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Den fällda anjonpoolen centrifugerades, men på grund av att det ej bildades en tillräckligt stor pellet resuspenderades provet och applicerades direkt på HIC-kolonnen. Ett kromatogram för HIC visas i figur 7B. Här kom endast en topp, precis som vid de tidigare HIC-reningarna. Proteinkoncentrationen befann sig under detektionsgränsen och kunde därför ej bestämmas.

HIC-poolen koncentrerades och applicerades på en gelfiltreringskolonn. Ett kromatogram för gelfiltreringen visas i figur 7C. Här kom en topp, som var något smalare än vid den föregående gelfiltreringen. Fraktioner, som hade motsvarande position i aktivitetstoppen som de fraktioner som poolades vid den tidigare gelfiltreringen, poolades ihop. Denna gelfiltreringspool koncentrerades sedan.



Figur 7. Kromatografier från rekromatografiexperimentet. **A:** Kromatogram från anjonbyteskromatografi. Proteinkoncentration mg/ml (×) och aktivitet $\Delta A/\text{min/ml}$ (▲) mot fraktionsnummer. Fraktion 1-20: 'flow trough', 21-40: 100mM kaliumfosfatbuffert = tvätt, 41-60: 200mM kaliumfosfatbuffert = eluering, 61-80: eftertvätt. De fraktioner som poolades är inringade. **B:** Kromatogram från HIC. Aktivitet $\Delta A/\text{min/ml}$ (▲) mot fraktionsnummer. **C:** Kromatogram från gelfiltrering. Aktivitet $\Delta A/\text{min/ml}$ (▲) mot elueringvolym. De fraktioner som poolades motsvarar elueringvolym 28-33,3 ml.

Reningsstegen från rekromatografien analyserades med SDS-PAGE med kolloidal coomassiefärgning och western blot, resultaten visas i figur 8A respektive 8B. Den koncentrerade gelfiltreringspoolen i coomassiegelen innehöll endast tre band med storlekarna 150, 140 respektive 130kDa. Alla tre band reagerade med antikropparna. Att endast dessa tre band förekom borde innebära att provet var 100% rent men även här förekom det annat protein i det nedersta bandet, därför uppskattades renheten till cirka 90%.



Figur 8. Analys av reningssteg från rekromatografi med SDS-PAGE och western blot.
A: SDS-PAGE med kolloidal coomassiefärgning. Brunn 1: pool tvättoppar från anjonbyteskromatografi (6,5 μ g protein), 2: anjonpool rekromatografi (5,2 μ g), 3: HIC-pool rekromatografi (1,5 μ g), 4: koncentrerad gelfiltreringspool (1,2 μ g), S: standard.
B: Western blot. Brunn 1: pool anjontopp 1 ($5 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$), 2: anjonpool rekromatografi ($5 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$), 3: HIC-pool rekromatografi ($4,3 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$), 4: koncentrerad gelfiltreringspool ($4,4 \cdot 10^{-3} \Delta A/\text{min}$), S: standard.

En sammanfattande reningstabell för rekromatografin visas i tabell 4. Utbytet i den koncentrerade gelfiltreringspoolen var endast 0,016% av den totala aktiviteten och reningsfaktorn var 118. Den koncentrerade gelfiltreringspoolen, som var slutsteget i rekromatografin, innehöll totalt 8 μ g TPPII, beräknat utifrån att TPPII utgör 90% av den totala proteinmängden i provet.

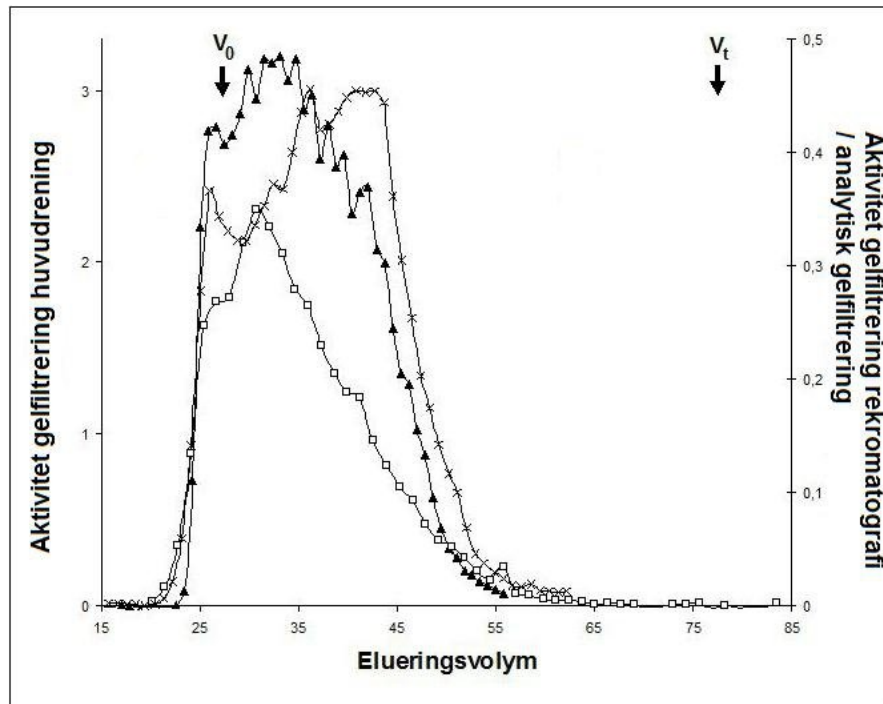
Tabell 4. Reningstabell rekromatografi

Reningssteg	Aktivitet ($\Delta A/\text{min/ml}$)	volym (ml)	Total aktivitet ($\Delta A/\text{min}$)	Utbyte (%)	Protein- koncentration (mg/ml)	Specifik aktivitet ($\Delta A/\text{min/mg}$ protein)	Renings- faktor
Pool för rekromatografi	3,78	85	321	40	3,24	1,17	3,4
Pool anjonbyte	2,5	80	200	7,8	0,31	8,06	20
Tvätt I HIC	0,96	35	33,6	1,3	0,174	5,5	14
Tvätt II HIC	1	35	35	1,4	0,065	15,4	39
Pool HIC	2,14	7,5	16,05	0,63	0,073	29,3	73,5
HIC pool koncentrerad	22	0,5	11	0,43	0,9	24,4	61,5
Filtrat HIC pool	0,166	7	1,16	0,046	0,01	16,6	42
Gelfiltreringspool	0,0993	6,6	0,66	0,025	0,0018	55,2	139
Gelfiltreringspool koncentrerad	3,4	0,12	0,408	0,016	0,073	46,6	118
Filtrat gelfiltreringspool	0,02	6,4	0,13	0,005	0,0581	0,34	0,9

Sammanfattande tabell för reningssteg från rekromatografi. Fraktioner från anjonbytenas tvätttoppar poolades och renades. Aktivitetsmätning och proteinbestämning utfördes på alla reningssteg. Med hjälp av aktivitet, volym och proteinkoncentration beräknades total aktivitet, utbyte, specifik aktivitet och reningsfaktor.

Analytisk gelfiltrering och bestämning av K_m och V_{max}

Eftersom det kom ut TPPII i eftertvätten vid alla tre anjonbyetskromatografier väcktes frågan om detta TPPII skiljer sig åt jämfört med det TPPII som kom ut i elueringsstoppen. En fraktion från anjonbytet eftertvätt från rekromatografin analyserades med gelfiltrering för att fastställa om detta TPPII hade samma storlek som det TPPII som renats i de två tidigare gelfiltreringarna. En jämförelse av elueringsvolymen från de tre gelfiltreringarna visas i figur 9. I jämförelsen ser man att det första TPPII som eluerades ut eluerades ut vid samma volym vid alla tre gelfiltreringar, den största varianten av TPPII-komplexet hade alltså samma storlek i alla tre prover. Därefter minskade storleken av TPPII-komplexet med ökad elueringsvolym, komplexet blev alltså mer och mer dissocierat. Med detta sagt kan man se att provet från huvudreningen och provet från den analytiska gelfiltreringen innehöll en större andel dissocierat TPPII jämfört med provet från rekromatografin.



Figur 9. Jämförelse elueringsvolym. Gelfiltrering huvudrening (▲), gelfiltrering rekromatografi (□) och analytisk gelfiltrering (aktivitet multiplicerat med 10) (×) mot elueringsvolym. Voidvolym (V_0) och totalvolym (V_t) anges i figuren.

Värden för K_m och V_{max} bestämdes för TPPII i den koncentrerade gelfiltreringspoolen från huvudreningen och för det TPPII som motsvarade samma elueringsvolym vid den analytiska gelfiltreringen. Resultaten från denna bestämning visas i tabell 5. När standardavvikelsen togs med i övervägandet kunde ingen skillnad i K_m -värde fastställas. Dock hade TPPII i den koncentrerade gelfiltreringspoolen från huvudreningen ett högre V_{max} än TPPII från den analytiska gelfiltreringen. Även värdet för k_{cat} bestämdes för TPPII i den koncentrerade gelfiltreringspoolen från huvudreningen, k_{cat} är en konstant som beskriver enzymets katalysförmåga. På grund av avsaknad av renhetsgrad hos provet från den analytiska gelfiltreringen kunde inte TPPII-koncentrationen fastställas och därmed kunde inte värdet för k_{cat} för denna bestämmas.

Tabell 5. Bestämning av K_m och V_{max}

Prov	K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	k_{cat} (s^{-1})
Koncentrerad gelfiltreringspool rening	30,4 \pm 3,7	8820	33,8
Analytisk gelfiltrering	28,7 \pm 3	60	EB

Bestämningen utfördes på TPPII i den koncentrerade gelfiltreringspoolen från huvudreningen och på det TPPII som motsvarade samma elueringsvolym vid den analytiska gelfiltreringen. K_m -värden anges med standardavvikelse. EB (ej bestämd) På grund av avsaknad av renhetsgrad hos provet från den analytiska gelfiltreringen kunde inte TPPII-koncentrationen fastställas och därmed kunde inte värdet för k_{cat} för denna bestämmas.

DISKUSSION

Syftet med detta arbete var att uttrycka och rena fram murint tripeptidylpeptidas II av vildtyp. Enzymet uttrycktes i *E. coli* och renades fram med hjälp av proteinfällning, anjonbyteskromatografi, HIC och gelfiltrering. Detta resulterade i 34 μg enzym, vilket motsvarar 8,5 μg per liter bakteriekultur. Det framrenade enzymet hade en uppskattad renhet på 60%. Nedbrytningsprodukter av TPPII räknades med i denna uppskattning eftersom de fortfarande förmodas ha enzymaktivitet. Ytterligare 8 μg TPPII renades fram vid rekromatografen, detta var omkring 90% rent. Det anmärkningsvärda var att provet från rekromatografen hade en reningsfaktor på endast 118, trots att det hade en högre renhet än huvudreningen. Detta kan förklaras med att fraktionerna som användes för rekromatografen stod orörda i ett par veckor innan reningen påbörjades. Detta medförde att enzymaktiviteten sjönk, dels på grund av tidsaspekten och dels på grund av proteolys. Den minskade enzymaktiviteten påverkade då den specifika aktiviteten som i sin tur påverkade reningsfaktorn.

Enligt storleksbestämning med hjälp av R_f -värde hade TPPII-monomeren en storlek på cirka 150kDa, dock bör denna ha en storleken 138kDa. Denna felaktighet förklaras med att ett mätfel på ett par millimeter förekommer. Om detta inte hade varit fallet skulle det berott på att fel enzym uttryckts. Det mest troliga hade då varit att det var *Drosophila*-TPPII som uttryckts istället för murint, eftersom dess monomer har storleken 150kDa. Ett annat argument som talar emot att fel TPPII hade uttryckts är att det TPPII som uttrycktes hade samma storlek som den mammala positiva TPPII-kontrollen.

I syfte att fastställa den exakta rollen hos TPPII i de cellulära processer där man har sett att enzymet verkar, behövs ytterligare karakterisering. Framförallt måste enzymets substratspecificitet utredas ytterligare. Detta är viktigt för klarläggandet av enzymets roll vid tumörprogression, som i sin tur kan leda till utveckling av nya läkemedel för cancerbehandling. En känd substratspecificitet kan även klargöra TPPIIs roll i cellens proteinnedbrytning. Hittills har endast kristallstrukturen hos TPPII från bananflugan fastställts. Det är därför viktigt att fördjupa kunskapen om strukturen hos mammaliskt TPPII, bland annat genom just kristallisering. För dessa karakteriseringar behövs rent TPPII och för att åstadkomma detta behövs en optimerad reningsmetod.

Graden av transformation var hög, endast en av tio kolonier som analyserades saknade genen. Expression av TPPII har tidigare utförts i mammala celler [23-25], men eftersom enzymets inte tycks utsättas för posttranslationell processning [5] kunde bakterier användas för uttryck. De celler som använts tidigare för expression, HEK293-celler (human embryonic kidney), har endogen produktion av TPPII [25] vilket skulle kunna påverka karakteriseringen av murint TPPII. Denna endogena produktion stör analysen av muterat TPPII som uttrycks i dessa celler [13]. Däremot har det ej kunnat påvisas någon endogen TPPII-aktivitet hos *E. coli* [26]. En fördel med bakterieodling är även att den är mindre tidskrävande eftersom bakterier har högre tillväxthastighet. Bakterier är även mindre känsliga för kontamination jämfört med en mammalisk cellkultur och de kräver endast ett enklare medium och tillväxtmiljö för att växa.

De två använda bakteriekulturerna uttryckte aktivt TPPII, vilket påvisades genom en kombination av aktivitetsmätning och western blot på smålysats. Att det uttrycktes aktivt enzym innebär att reningen kunde påbörjas.

Eftersom ett bakterielysats är ett väldigt orent startmaterial, behövs det mer än ett reningssteg för att nå den renhet som önskas. Enzymet måste separeras från bakteriernas andra lösliga molekyler såsom lipider, proteiner och nukleinsyror. I detta arbete har en reningsstrategi använts som är baserad på tre steg, vilket är en vanlig strategi vid proteinrening. Genom att använda en kombination av tre olika kromatografier utnyttjas tre olika egenskaper hos enzymet; dess negativa nettoladdning, hydrofobicitet och storlek. På så sätt är det mindre chans att något annat protein skulle besitta exakt samma egenskaper. Ett protein som har samma laddning som enzymet men olika storlek renas bort vid gelfiltreringen, medan ett protein som har samma laddning men olika hydrofoba egenskaper renas bort med hjälp av HIC.

Som ett förberedande steg användes protein- och nukleinsyreutfällning. Fällningen av protein och nukleinsyror innebär både för- och nackdelar för anjonbytet. Utan fällningen skulle kolonnen bli fullständigt överladdad, på grund av nukleinsyror och andra protein, på så sätt skulle ingenting kunna binda in. Samtidigt medför fällningen att provet får en väldigt hög jonstyrka, vilket i sig gör att provet ej binder till anjonbyteskolonnen. Det är därför nödvändigt med dialys för att avlägsna så mycket joner som möjligt från provet, innan det appliceras på kolonnen.

Vid PEI-fällningen förlorades i genomsnitt 15% av den totala mängden TPPII. Dock gav fällningen ingen märkbar skillnad i renhet om reningsfaktorn och resultaten från SDS-PAGE betraktas. Den andra $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -fällningen medförde inte någon förlust av TPPII, vilket kan fastställas eftersom supernatanten från fällningen saknade aktivitet. I detta steg blev preparationen fyra gånger renare jämfört med PEI-supernatanten, enligt reningsfaktorn, men det syntes ej i SDS-PAGE.

Den totala aktiviteten var högre i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -pelleten än i rålysatsen, samma sak bevitnas vid reningen utförd av S Eklund *et al* [6]. Orsaken till detta är att något i rålysatsen hämmar eller bryter ned TPPII och på så sätt får provet lägre aktivitet. Men detta hämmande/nedbrytande element renas sedan bort i efterkommande steg, därigenom återfås den fulla aktiviteten. Detta påverkar värdet på både utbyte och reningsfaktor.

Reningens första kromatografisteg var anjonbyteskromatografi, här var syftet främst att fånga upp så mycket TPPII som möjligt. Eftersom det tidigare har rapporterats att enzymet är känsligt för endogena peptidaser [11] är det viktigt att avlägsna skadliga proteiner som skulle kunna hämma eller bryta ned enzymet. Kravet på renhet är mindre angeläget i detta steg jämfört med de efterkommande.

Ett problem som uppstod vid reningen var att TPPII eluerades ut i tre olika toppar under kromatografien. Det var menat att enzymet endast skulle elueras ut i elueringssteget, vilket hade resulterat i endast en aktivitetstopp. Detta medförde en förlust av totalt TPPII på 60-70%. Att det eluerades ut TPPII i förtvätten antas förorsakats av en av två orsaker, eller en kombination av dessa. En förklaring är att det dialyserade provet hade för hög jonstyrka när det applicerades på kolonnen, vilket medförde att en stor del av provet vandrade rakt igenom kolonnen istället för att binda in. En lösning på detta är att dialysera den upplösta pelleten mot en större volym buffert. En annan möjlig lösning är att späda provet innan applicering för att sänka jonstyrkan. En tredje och mer tidskrävande lösning är att avsalta provet med hjälp av

gelfiltrering. Den andra förklaringen till denna aktivitetstopp är att kolonnens kapacitet överskreds eftersom provet innehöll för mycket nukleinsyror som tog upp plats på kolonnen, så att allt TPPII inte kunde binda in. En lösning på detta är att fälla ut provet med ännu mer PEI eller att bryta ned kvarvarande nukleinsyra med hjälp av endonukleas. Anjonbytet vid rekromatografin saknade denna topp. Detta kan dels bero på att provet som applicerades hade en lägre konduktivitet än dialysatet från rening 1 och 2 (data visas ej) och dels på att nukleinsyrakoncentrationen var lägre i detta prov (data visas ej) eftersom det redan hade gått igenom kolonnen en gång. Eftersom slutsteget vid rekromatografin var 30% renare än huvudreningens slutsteg kan man spekulera om en dubbelrening med anjonbyteskromatografi kan vara en möjlighet för att öka renheten.

Sammanfattningsvis kan det konstateras att provet inte blev nämnvärt renare av anjonbyteskromatografin. Dock ses en lätt skillnad med SDS-PAGE. Vissa proteinband blev mer koncentrerade medan andra blev försvagade eller försvann helt. Anjonbyteskromatografin medförde därmed en annan sammansättning av protein i provet.

Det andra kromatografisteget var HIC, vars princip är komplementär till anjonbyteskromatografin. Här var syftet att få bort så mycket andra proteiner som möjligt. Innan anjonpoolen applicerades på kolonnen fälldes proteinet ut med $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Detta medförde att provets jonstyrka höjdes, vilket är optimalt för HIC eftersom det krävs en hög jonstyrka för att provet ska kunna binda in till kolonnen.

I detta steg förlorades cirka 80% av den totala aktiviteten jämfört med anjonpoolen. Dock blev preparationen fem gånger renare. Denna skillnad i renhet syntes vid SDS-PAGE genom färre proteinband. Även i detta reningssteg var tvätten bekymret. Det förlorades mycket TPPII i tvättarna, speciellt vid rening B då den totala aktiviteten var högre i tvättarna än i HIC-poolen. Några exempel på orsaker till detta kan vara att kolonnen var dåligt jämviktad, att tvättbufferten hade för låg jonstyrka eller att kolonnen blev överladdad. Det sistnämnda skulle kunna åtgärdas genom att antingen använda mer stationär fas i kolonnen eller att dela upp provet på två reningsomgångar.

Kromatografisteg tre var gelfiltrering. Här var syftet att få bort de sista orenheterna så att reningens slutsteg blev så rent som möjligt. Detta steg medförde även att enzymet hamnade i en lämplig buffert för förvaring. I detta skede är det viktigt med hög upplösning hos kromatografin för att enzymet ska kunna skiljas från de andra proteinerna.

I detta steg var förlusten av TPPII störst, den motsvarade cirka 80-90% av den totala aktiviteten hos den koncentrerade HIC-poolen. Men detta steg medförde samtidigt att enzymet blev trettio gånger renare. Det fanns nästan bara TPPII-band kvar vid analys med SDS-PAGE. Förlusten berodde helt och hållet på att endast fraktioner som hade få andra proteinband förutom TPPII-banden poolades, för att få en så ren pool som möjligt. Man ville även bara poola fraktionerna i början av aktivitetstoppen eftersom det är det stora komplexet som eftersträvas. Trots hög aktivitet hos de fraktioner som inte poolades, offerades dessa i mån för hög renhet.

Om utbyte och reningsfaktor studeras så var anjonbytet det minst effektiva steget när det kom till rening. Samtidigt medförde detta steg minst förlust av total aktivitet. Anjonbytet är därför ett bra första reningssteg. Gelfiltreringen var det bästa steget för att få ett rent enzym, den hade ungefär samma förlust som HIC men var ett mycket mer effektivt reningssteg. Fällningen gav ej bra renhet, men var väldigt viktig för att något skulle kunna binda till anjonpelaren. Trots stor förlust av enzym behövdes alla dessa reningssteg för att få en ren preparation. Dock kan det diskuteras om denna ordning av kromatografierna är optimal. Att använda gelfiltrering som ett första steg är ej ett alternativ eftersom provvolymen är för stor för att appliceras på kolonnen. Däremot skulle HIC kunna användas innan anjonbyteskromatografien. Detta skulle vara ett bra alternativ eftersom jonstyrkan i provet är hög på grund av fällningen, vilket skulle undanröja behovet av dialys innan applicering på kolonnen. Eftersom elueringen vid HIC sker med en buffert med låg jonstyrka skulle eluatet kunna appliceras direkt på anjonbyteskolonnen.

Varje steg i reningen handlar om en kompromiss mellan att behålla den totala enzymaktiviteten och att få provet så rent som möjligt. För varje reningssteg som läggs till ju renare blir proteinet, men desto mer enzym förloras. Målet är att använda så få reningssteg som möjligt för att uppnå önskad renhet. När det gäller renhet kan man även skilja mellan kontaminerande proteiner som är skadliga eller störande för enzymet, som måste tas bort, och ofarliga proteiner som kan accepteras vid en viss mängd. Hur rent enzymet måste vara beror helt och hållet på vad det ska användas till. Vid kristallisering behövs en renhet på minst 90%, vilket innebär att enzymet som renats fram i detta arbete inte kan användas för detta ändamål. Utöver en icke adekvat reningsgrad är även utbytet för lågt, för att utveckla en kristalliseringsmetod behövs minst 10mg enzym. För en K_m -bestämning av TPPII räcker det om enzymet är 60% rent. Dock ska man vara medveten om att när det finns andra proteiner i

provet, kan de påverka karakteriseringen av enzymet. Därför behövs det kontroller för att vara säker på att det bara är det önskade enzymets aktivitet som mäts.

Bestämningen i detta arbete gav ett K_m -värde på $30\mu\text{M}$, dock bör värdet ligga runt $17,8\mu\text{M}$ [6]. Men det går inte att utifrån dessa resultat dra slutsatsen att det TPPII som renades fram i detta arbete har lägre substrataffinitet. Skillnaden kan helt eller delvis förklaras med att substratkoncentrationen antagligen inte var exakt, för att vara säker på att rätt substratkoncentration används för bestämningen behövs aminosyreanalys.

Vid alla tre jonbyteskromatografier som utfördes förekom en tredje aktivitetstopp vid eftertvätten. Som eftertvätt användes en buffert med högre jonstyrka än elueringsbufferten, för att allt som satt kvar bundet i kolonnen skulle lossna. På grund av detta kan det antas att det TPPII som kom ut i topp tre satt hårdare bundet än det TPPII som kom ut i topp två. Om orsaken skulle vara att elueringsvolymen var för liten, skulle topp två plana av långsammare och aldrig nå bakgrundsaktiviteten. Men detta är inte fallet eftersom det istället blev en välavgränsad tredje topp. Detta skulle kunna bero på att detta TPPII hade en annan konformation vilket påverkar bindingsstyrkan till kolonnen. Jämförelsen av elueringsvolym mellan den analytiska gelfiltreringen och gelfiltreringarna från huvudreningen och rekromatografen kunde ej ge en giltig förklaring till varför just detta TPPII band in hårdare. Ingen avgörande skillnad kunde heller påvisas av K_m -bestämningen, vilket innebär att TPPII i de båda proven hade samma substrataffinitet. Dock varierade V_{\max} , TPPII i den koncentrerade gelfiltreringspoolen från huvudreningen hade ett högre V_{\max} men från detta kan inga slutsatser dras. För att kunna jämföra dessa aktiviteter måste de omvandlas till k_{cat} . För denna omvandling måste koncentrationen av TPPII i de två proverna bestämmas och eftersom detta endast var möjligt hos ett av proverna kunde ingen jämförelse genomföras. k_{cat} -värdet för TPPII hos huvudreningens slutsteg bestämdes och resultatet var $33,8\text{s}^{-1}$ detta kan jämföras med värdet som erhöles av S Eklund *et al* där k_{cat} var 96s^{-1} vid pH 7,6 [6]. Detta tyder på att TPPII som renats fram i detta arbete har lägre katalytisk förmåga. Men värdet som erhöles är osäkert på grund av att koncentrationen av TPPII i provet bara var en grov uppskattning. För att ta reda på den exakta koncentrationen av TPPII måste den bestämmas genom titrering av dess aktiva ytor [27].

Det kan konstateras att reningen har dålig repeterbarhet eftersom så pass olika resultat erhålls vid olika reningsomgångar. Dels förekom det skillnader mellan reningsomgångarna i detta arbete och dels så erhöles olika resultat jämfört med reningen som utförts av S Eklund *et al*.

Rening B hade bäst utbyte och reningsfaktor i detta arbete och vid denna reningsomgång förlorades mest TPPII i HIC-tvätten. Vid rening A förlorades mest TPPII i anjon tvätten. Reningen som utförts av S Eklund *et al*, hade ett lägre utbyte men ett betydligt renare enzym på cirka 80%. Förlusten av TPPII vid den reningen är cirka 80% vid varje reningssteg [6] medan förlusten i detta arbete varierade mellan 60 och 90%. De stora förlusterna av TPPII sker alltså vid olika tillfällen i reningen och i olika utsträckning. Det erhöles även olika renhet vid samma reningssteg trots att samma reningsprotokoll har använts. Dessa skillnader antas bero på att reningens effektivitet är känslig för små variationer hos provmaterialet såsom nukleinsyrakoncentration, proteinkoncentration och jonstyrka och att enzymet har en förmåga att variera sitt beteende, vilket försvårar bindning till kolonnen.

B Rockel *et al* renade fram TPPII från *Drosophila*-ägg, med en liknande trestegsrening som använts i detta arbete. Dock används gelfiltrering som ett första reningssteg, därefter anjonbyteskromatografi och till sist HIC. Detta resulterar i en 900 gångers rening. Vid analys med SDS-PAGE kunde två band påvisas, ett 150kDa TPPII-band och ett band som bestod av nedbrytningsprodukter av TPPII [11]. Detta innebär att denna preparation är renare än preparationen i detta arbete, där flera andra band förekom som inte innehöll TPPII. Då kan man spekulera om denna skillnad i renhet beror på att det är lättare att rena fram TPPII från dessa ägg jämfört med rening från bakterielysat eller om det blir renare av att använda gelfiltrering som förstasteg.

På grund av problematiken med endogen produktion av TPPII i HEK293-celler använde Lindås *et al* jästceller av arten *Pichia pastoris* för att uttrycka murint TPPII. Här utnyttjades ett histidin-taggat enzym, vilket innebär att en modifiering introduceras i enzymets gen som medför att en polyhistidinkedja fogas på enzymet. Denna tag används sedan vid rening med IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) där histidinet binder med jonbindning till metalljoner, i detta fall nickel, på den stationära fasen. Nyttjandet av jästceller resulterade i ett högre uttryck av TPPII jämfört med mammala celler, samtidigt som problemet med endogen TPPII-produktion löstes. Utbytet slutade på cirka 10%, medan preparationen endast blev åtta gånger renare [13]. Detta kan jämföras med reningen i detta arbete, vilken hade ett lägre utbyte men en preparation som blev 600 gånger renare än rålysatet. Författarna drog slutsatsen att rening med denna histidin-tag inte var särskilt effektiv. Orsaken till detta tros vara att histidin-taggen gömde sig inne i enzymkomplexet och på så sätt inte kom i kontakt med nickeljonerna i kolonnen [13].

G Seyit *et al* uttryckte *Drosophila* TPPII med hjälp av *E. coli* under liknande förhållanden som i detta arbete och de renade enzymet med fällning och gelfiltrering. Detta resulterade i 15–20mg renat TPPII per liter odlingsmedium [28]. Detta motsvarar ett cirka 2000 gånger högre utbyte än reningen av murint TPPII i detta arbete. Andelen TPPII av den totala proteinmängden i bakterielysatet måste därför vara mycket större vid uttryck av *Drosophila* TPPII, vilket då innebär att det är svårare att uttrycka murint TPPII.

Det expressions- och reningsprotokoll som här presenteras i detta arbete och av S Eklund *et al* [6] har hittills visat sig vara den bästa proceduren för att erhålla ett rent murint enzym, vars analyser ej störs av endogen produktion. Dock är utbytet lågt, så som fortsättning behövs optimering för att minska förlusterna av enzym. Det renades fram totalt 34µg TPPII med en uppskattad renhet på 60%. Detta enzym kan komma till användning vid framtida karakterisering av enzymets funktion.

REFERENSER

- [1] ND Rawling och AJ Barrett. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 1993;290:205-18
- [2] RM Bålöv, U Ragnarsson och Ö Zetterqvist. Tripeptidyl aminopeptidase in the extralysosomal fraction of rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983;258:11622-8
- [3] RM Bålöv *et al.* Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *The Journal of Biological Chemistry*. 1986;261:2409-17
- [4] C Rose *et al.* Characterization and inhibition of a cholecystokinin-inactivating serine peptidase. *Nature*. 1996;380:403-9
- [5] B Tomkinson och AC Lindås. Tripeptidyl-peptidase II: a multi-purpose peptidase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37:1933-7
- [6] S Eklund *et al.* Exploring the active site of tripeptidyl-peptidase II through studies of pH dependence of reaction kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1824:561-70
- [7] E Macpherson *et al.* Supramolecular structure of tripeptidyl peptidase II from human erythrocytes as studied by electron microscopy, and its correlation to enzyme activity. *Biochemical Journal*. 1987;248:259-63
- [8] B Rockel *et al.* Molecular architecture and assembly mechanism of drosophila tripeptidyl peptidase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:10135-40
- [9] B Tomkinson. Association and dissociation of the tripeptidyl-peptidase II complex as a way of regulating the enzyme activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2000;376:275-80
- [10] CK Chuang *et al.* Hybrid molecular structure of the giant protease tripeptidyl peptidase II. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2010;17:990-6
- [11] B Rockel *et al.* A giant protease with a twist: the TPP II complex from *Drosophila* studied by electron microscopy. *The EMBO Journal*. 2002;21:5979-84
- [12] B Rockel *et al.* Structure and function of tripeptidyl peptidase II, a giant cytosolic protease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012;1824:237-45
- [13] AC Lindås *et al.* Investigation of a role for glu-331 and glu-305 in substrate binding of tripeptidyl-peptidase II. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008;1784:1899-1907
- [14] E Geier *et al.* A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*. 1999;283:978-81
- [15] U Seifert *et al.* An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nature Immunology*. 2003;4:375-9

- [16] B Tomkinson. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999;24:355-9
- [17] E Reits *et al.* A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 2004;20:495–506
- [18] EW Wang *et al.* Integration of the ubiquitin-proteasome pathway with a cytosolic oligopeptidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:9990–5
- [19] CJ Wray *et al.* Tripeptidyl-peptidase II expression and activity are increased in skeletal muscle during sepsis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002;296:41-7
- [20] A Chand, SM Wyke och MJ Tisdale. Effect of cancer cachexia on the activity of tripeptidyl-peptidase II in skeletal muscle. *Cancer Letters*. 2005;218:215-22
- [21] PM Kloetzel. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nature Immunology*. 2004;5:661-9
- [22] B Tomkinson och Ö Zetterqvist. Immunological cross-reactivity between human tripeptidyl peptidase II and fibronectin. *Biochemical Journal*. 1990;267:149–54
- [23] H Hilbi, E Jozsa och B Tomkinson. Identification of the catalytic triad in tripeptidyl-peptidase II through site-directed mutagenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002;1601:149-54
- [24] B Tomkinson, B Ní Laoi och K Wellington. The insert within the catalytic domain of tripeptidyl-peptidase II is important for the formation of the active complex. *European Journal of Biochemistry*. 2002;269:1438-43
- [25] B Tomkinson, M Hansen och WF Cheung. Structure-function studies of recombinant murine tripeptidyl-peptidase II: the extra domain which is subject to alternative splicing is involved in complex formation. *FEBS Letters*. 1997;405:277-80
- [26] RM Bålów och I Eriksson. Tripeptidyl peptidase II in haemolysates and liver homogenates of various species. *Biochemical Journal*. 1987;241:75-80
- [27] JJ Bechet, M Houadjeto och A d'Albis. Active-site titration of enzymes at high concentration: application to myosin ATPase. *European Journal of Biochemistry*. 1986;161:343-9
- [28] G Seyit *et al.* Size matters for the tripeptidylpeptidase II complex from *drosophila*: the 6-MDa spindle form stabilizes the activated state. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:25723–33