



Evaluierung von *Schizosaccharomyces pombe* als  
Modellorganismus für strukturelle Studien an der  
Tripeptidylpeptidase II

Evaluation of *Schizosaccharomyces pombe* as a model organism  
for structural studies on tripeptidyl peptidase II

# Master-Thesis

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science**

Studiengang Biochemie

Fakultät Chemie

Technische Universität München

vorgelegt von

**Marc Wehmer**

aus

Bad Hersfeld

angefertigt in der Abteilung für

Molekulare Strukturbiologie (Max-Planck-Institut für Biochemie)

unter Anleitung von

Prof. Dr. Wolfgang Baumeister

Martinsried, April 2013

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Masterarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt wurde.

München, den .....

.....

Marc Wehmer

## Zusammenfassung

Tripeptidylpeptidase II (TPPII) ist eine intrazelluläre Serinpeptidase der Subtilisin-Familie. TPPII kommt in fast allen eukaryontischen Organismen vor und ist wahrscheinlich an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie zum Beispiel der Trimmung bestimmter Neuropeptide, der Proteostase oder der Prozessierung von MHC-I Epitopen, beteiligt. TPPII ist ein großer homooligomerer Proteinkomplex mit einer Masse von bis zu 6 MDa. Dieser Komplex wird aus zwei Strängen aus gestapelten Dimeren gebildet, die sich in Form einer Spindel umeinander winden. Bisher ist wenig über Regulation und Interaktionspartner von TPPII bekannt. In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit sich *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*) als Modellorganismus für das Studium von TPPII eignet.

Dafür wurden zuerst die Kultivierungsbedingungen für *S. pombe* und anschließend verschiedene Zellaufschlussmethoden unter Berücksichtigung der *Sp*TPPII-Oligomerverteilung im Rohextrakt untersucht. Danach wurde eine Reinigungsstrategie für *Sp*TPPII entwickelt. Biochemische Eigenschaften von *Sp*TPPII wie Stabilität, Proteinsequenz und Kinetik der Spaltung des unnatürlichen Substrates AAF-AMC wurden analysiert. Zusätzlich wurden vitrifizierte *Sp*TPPII-Partikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop abgebildet und eine 2D-Analyse der Partikelbilder durchgeführt.

Der beste Zeitpunkt für die Ernte einer stationären Flüssigkultur von *S. pombe* 927 h+ war nach 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt war sowohl die Zelldichte am höchsten als auch der TPPII-Gehalt der Zellen am größten. Die beste Zellaufschlussmethode für große Mengen an Zellen war die Verwendung der Glaskugelmühle. Für kleinere Zellmengen eignete sich der enzymatische Verdau der Zellen mit Zymolyase am besten, da hierbei der Anteil an *Sp*TPPII-Spindeln im Rohextrakt am höchsten war. Die Proteinreinigung erfolgte in fünf Schritten durch die Kombination der spezifischen Bindung von *Sp*TPPII an einen Anionenaustauscher und der Größenausschlusschromatographie. Die 2D-Klassifizierung von vitrifizierten *Sp*TPPII-Spindeln ergab, dass die Spindeln aus *S. pombe* länger als die aus *D. melanogaster* und *H. sapiens* sind. Die massenspektroskopische Sequenzanalyse ergab, dass die Aminosäuresequenz des gereinigten *Sp*TPPII-Komplexes kürzer ist als die aufgrund der Gensequenz vorhergesagte Aminosäuresequenz.

In dieser Arbeit konnten wichtige Grundbausteine, für die Verwendung von *S. pombe* als Modellorganismus für TPPII, gelegt werden. Zusätzlich konnten Hinweise gefunden werden, die *Sp*TPPII für strukturelle Untersuchungen interessant machen.

## Abstract

Tripetidylpeptidase II (TPPII) is an intracellular serine peptidase of the subtilisine family. It is found in almost every eukaryotic organism and is proposed to be involved in a variety of cellular pathways, such as degradation of particular neuropeptides, proteostasis or the processing of MHC-I epitopes. TPPII is a large homooligomeric protein complex with a molecular mass of up to 6 MDa. This complex is formed by two strands of stacked dimers which are twisted around each other into a spindle. So far, little is known about the regulation and interaction partners of TPPII. In this study, it was investigated to what extent *Schizosaccharomyces pombe* (*Sp*) can be used as a model organism for the study of TPPII functions.

To this end, the culture conditions of *Schizosaccharomyces pombe* were examined and different cell disruption methods were analyzed in the light of the distribution of *Sp*TPPII oligomers in the crude lysate. A protein purification strategy was developed. Biochemical properties of *Sp*TPPII such as stability, protein sequence and the kinetics of the cleavage of the unnatural substrate AAF-AMC were examined additionally. To investigate the structure of *Sp*TPPII, vitrified particles were imaged with a transmission electron microscope and the particle images were analyzed.

The best harvesting time for a stationary liquid culture of *S. pombe* 927 h+ was 48 hours. At this time point, both the cell density and the cell content of *Sp*TPPII were at the maximum. The best cell disruption method for large quantities of cells was the usage of the glass bead mill. The enzymatic digestion was suited best for small amounts of cells, because here the proportion of spindles in the crude lysate was highest. The protein purification was carried out in five steps by the combination of specific binding of *Sp*TPPII to an anionic exchange column and by size exclusion chromatography. The 2D classification of *Sp*TPPII spindles showed that those of *S. pombe* were longer than those of *D. melanogaster* or *H. sapiens*. Mass spectrometric sequence analysis revealed the amino acid sequence of the purified *Sp*TPPII complex to be shorter than the predicted amino acid sequence based on the gene sequence.

This work, prepares the ground for the use of *S. pombe* as a model organism for TPPII. In addition it shows that *Sp*TPPII is interesting for structural studies.

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>                                 | <b>4</b>  |
| <b>1.1 Peptidasen .....</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>1.2 Tripeptidylpeptidase II .....</b>                  | <b>5</b>  |
| 1.2.1 Eigenschaften und Struktur .....                    | 5         |
| 1.2.2 Physiologische und pathobiologische Bedeutung ..... | 8         |
| <b>1.3 <i>S. pombe</i> als Modellorganismus .....</b>     | <b>11</b> |
| <b>1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....</b>        | <b>12</b> |
| <br>  |           |
| <b>2 MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>                   | <b>13</b> |
| <b>2.1 Materialien.....</b>                               | <b>13</b> |
| 2.1.1 Chemikalien .....                                   | 13        |
| 2.1.2 Puffer und Lösungen .....                           | 14        |
| 2.1.3 Medien.....   | 17        |
| 2.1.4 Stämme.....   | 17        |
| 2.1.5 Enzyme.....   | 17        |
| 2.1.6 Standards .....                                     | 17        |
| 2.1.7 Chromatographiesäulen.....                          | 18        |
| <b>2.2 Methoden .....</b>                                 | <b>19</b> |
| 2.2.1 Zellkultur.....                                     | 19        |
| 2.2.1.1 Anfertigung von Glycerinkulturen.....             | 19        |
| 2.2.1.2 Reisolation von Glycerinkulturen.....             | 19        |
| 2.2.1.3 Anzucht von Flüssigkulturen .....                 | 19        |
| 2.2.1.4 Zellernte.....                                    | 19        |
| 2.2.2 Zellaufschluss.....                                 | 20        |
| 2.2.2.1 Mechanischer Zellaufschluss.....                  | 20        |
| 2.2.2.1.1 Zelmühle .....                                  | 20        |
| 2.2.2.1.2 Zellhomogenisator .....                         | 20        |
| 2.2.2.1.3 Ultra-Zentrifugalmühle .....                    | 21        |
| 2.2.2.2 Enzymatischer Verdau .....                        | 21        |
| 2.2.3 Proteinreinigung .....                              | 22        |
| 2.2.3.1 PEI-Präzipitation .....                           | 22        |
| 2.2.3.2 Chromatographische Methoden.....                  | 22        |
| 2.2.3.2.1 Anionenaustauscher .....                        | 22        |
| 2.2.3.2.2 Kationenaustauscher .....                       | 23        |
| 2.2.3.2.3 Capto <sup>TM</sup> MMC .....                   | 23        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.3.2.4 Affinitätschromatographie mit Cibacron Blue F3G-A.....  | 24        |
| 2.2.3.2.5 Größenausschlusschromatographie.....  | 24        |
| 2.2.4 Analytische Methoden.....   | 25        |
| 2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford .....  | 25        |
| 2.2.4.2 Elektrophoretische Methoden.....  | 26        |
| 2.2.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgele.....  | 26        |
| 2.2.4.2.2 TCA-Fällung.....  | 26        |
| 2.2.4.2.3 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....  | 26        |
| 2.2.4.3 Aktivitätsmessungen.....  | 27        |
| 2.2.5 Biochemische Charakterisierung.....   | 28        |
| 2.2.5.1 Bestimmung enzymkinetischer Parameter.....  | 28        |
| 2.2.5.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität .....   | 29        |
| 2.2.5.3 Stabilitätsuntersuchungen.....  | 29        |
| 2.2.5.4 Sequenzanalyse und Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie .....   | 29        |
| 2.2.6 Elektronenmikroskopie .....   | 30        |
| 2.2.6.1 Probenpräparation mit Schwermetallsalz .....  | 30        |
| 2.2.6.2 Probenpräparation für die Kryoelektronenmikroskopie .....   | 30        |
| 2.2.6.3 Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop.....  | 30        |
| 2.2.7 Bildverarbeitung, Partikelextraktion und 2D-Klassifizierung.....  | 31        |
| <b>3 ERGEBNISSE .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.1 Wachstum und <i>Sp</i>TPPII-Gehalt der <i>S. pombe</i>-Flüssigkultur .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>3.2 Zellaufschluss von <i>S. pombe</i> .....</b>   | <b>33</b> |
| <b>3.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls zur Isolation von <i>Sp</i>TPPII-Spindeln aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>-Rohextrakt .....</b> | <b>37</b> |
| 3.3.1 PEI-Fällung .....   | 37        |
| 3.3.2 Ionenaustauscherchromatographie .....   | 40        |
| 3.3.3 Untersuchung der Reinigung von <i>Sp</i> TPPII in drei Schritten.....   | 42        |
| 3.3.4 Bindung von PFK an Cibacron Blue .....  | 44        |
| 3.3.5 Reinigung von <i>Sp</i> TPPII-Spindeln in fünf Schritten .....  | 45        |
| <b>3.4 Biochemische Charakterisierung.....</b>  | <b>50</b> |
| 3.4.1 Thermische Stabilität von <i>Sp</i> TPPII .....   | 50        |
| 3.4.2 Kinetik der Spaltung von AAF-AMC durch <i>Sp</i> TPPII.....   | 51        |
| 3.4.3 pH-Optimum der Spaltung von AAF-AMC durch <i>Sp</i> TPPII .....   | 52        |
| 3.4.4 Sequenzanalyse von <i>Sp</i> TPPII.....   | 52        |
| <b>3.5 Einzelpartikelanalyse.....</b>   | <b>53</b> |
| 3.5.1 Einzelpartikelanalyse von <i>Sp</i> TPPII-Spindeln.....   | 53        |
| 3.5.2 Größenvergleich von TPPII-Spindel aus verschiedenen Organismen.....   | 55        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4 DISKUSSION .....</b>   | <b>56</b> |
| <b>4.1 Isolation von TPPH aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....</b>      | <b>56</b> |
| 4.1.1. Zellwachstum und <i>Sp</i> TPPH-Aktivität im Rohextrakt.....           | 56        |
| 4.1.2 Zellaufschluss.....   | 56        |
| 4.1.3 Proteinreinigung.....   | 58        |
| <b>4.2 Biochemische Eigenschaften von <i>Sp</i>TPPH.....</b>                  | <b>60</b> |
| 4.2.1 Stabilität von <i>Sp</i> TPPH.....                                      | 60        |
| 4.2.2 Kinetische Parameter der Spaltung von AAF-AMC durch <i>Sp</i> TPPH..... | 61        |
| 4.2.3 N-Terminus von <i>Sp</i> TPPH.....                                      | 61        |
| <b>4.3 Quartärstruktur von <i>Sp</i>TPPH .....</b>                            | <b>62</b> |
| <b>4.4 <i>S. pombe</i> als Modellorganismus für TPPH .....</b>                | <b>63</b> |
| <b>5 REFERENZEN.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>   | <b>69</b> |

## 1 Einleitung

### 1.1 Peptidasen

Als Peptidasen werden Enzyme bezeichnet, die die Hydrolyse einer Peptidbindung katalysieren. Aus historischen Gründen werden Peptidasen, die die Spaltung der Peptidbindung von Proteinen katalysieren, als Proteasen bezeichnet [1]. Peptidasen sind ubiquitäre Enzyme mit einem breiten Spektrum an biologischen Funktionen. Es gibt sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Peptidasen.

Peptidasen können anhand von verschiedenen Kriterien klassifiziert werden. Neben der Spaltspezifität und der Faltung des Proteins, können diese nach der Position der Spaltstelle der Polypeptidkette in Endo- und Exo-Peptidasen unterteilt werden. Exopeptidasen spalten eine definierte Anzahl von Aminosäuren vom N- oder C-Terminus einer Polypeptidkette ab. Endopeptidasen hingegen katalysieren die Spaltung innerhalb der Polypeptidkette. Je nachdem, wie viele Aminosäuren abgespalten werden, werden Exopeptidasen in folgende Klassen unterteilt. Wenn die Freisetzung einer Aminosäure vom N-Terminus des Peptids katalysiert wird, wird die Peptidase als Aminopeptidase bezeichnet. Bei zwei Aminosäuren (Dipeptid) wird sie als Dipeptidyl-Peptidase und bei drei als Tripeptidyl-Peptidase bezeichnet. Ferner kann eine Klassifizierung aufgrund der Aminosäuren welche das aktive Zentrum bilden erfolgen. Unter anderem sind bisher Aspartatpeptidasen, Cysteinpeptidasen, Metallopeptidasen, Serinpeptidasen und Threoninpeptidasen bekannt. [2]. Außerdem wurden Peptidasen mit Glutaminsäure im aktiven Zentrum beschrieben [3]. Neben regulatorischen Aufgaben besteht die Hauptaufgabe von intrazellulären Peptidasen darin, die Proteostase aufrecht zu erhalten. Dafür werden markierte Proteine durch ein ATP-abhängiges proteolytisches System, das 26S-Proteasom, abgebaut. Das Proteasom spaltet ubiquitinylierte Proteine zu Peptiden mit einer Länge von 3 bis 23 Aminosäuren [4]. Die Peptide werden von nachgeschalteten Peptidasen erkannt und weiter gespalten [5]. Abschließend werden die kurzen Peptide von Aminopeptidasen zu einzelnen Aminosäuren verdaut [6], die dann von der Zelle wiederverwendet werden können.

Zusätzlich können extrazelluläre Proteine über das endosomal-lysosomale System abgebaut werden. Dabei werden extrazelluläre Moleküle über Pinocytose in die Zelle aufgenommen. Die Vesikel verschmelzen mit Lysosomen und bilden ein abgegrenztes Kompartiment, in dem Proteine durch spezielle Peptidasen abgebaut werden. Lysosomen sind besondere zelluläre Kompartimente mit einer hohen Konzentration an Peptidasen und einem niedrigen pH-Wert [7]. Ferner sind intrazelluläre Peptidasen, wie zum Beispiel

Caspasen, an zellulären Prozessen wie der Apoptose beteiligt. Funktioniert dieses fein regulierte System nicht korrekt, kann dies zum Tod der Zelle führen [8].

Ebenso wie intrazelluläre Peptidasen nehmen extrazelluläre Peptidasen ein breites Funktionsspektrum ein. So sind im Verdauungstrakt hauptsächlich Peptidasen, wie zum Beispiel Chymotrypsin, für die Spaltung von Eiweißen verantwortlich. Weiterhin sind extrazelluläre Peptidasen ein wichtiger Bestandteil der Homöostase der extrazellulären Matrix. Der Abbau von Kollagen wird beispielsweise durch Matrix-Metalloproteinasen katalysiert [9]. Dieser Prozess ist wiederum von entscheidender Bedeutung bei der Metastasierung von Krebszellen. Maligne Zellen legen im Zuge der Metastasierung teilweise lange Strecken durch die extrazelluläre Matrix zurück und bewerkstelligen dies unter anderem durch die Aktivierung von extrazellulären Peptidasen [10]. Intra- wie extrazelluläre Peptidasen sind, da sie an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sind, ein wichtiges Forschungsgebiet. Auf der einen Seite fördert die Aufklärung der Funktionsweise von Peptidasen das allgemeine Verständnis von zellulären Prozessen, und auf der anderen Seite eröffnen sich dadurch neue Ansätze zur Therapie von Krankheiten wie Krebs, Alzheimer oder AIDS [11].

## 1.2 Tripeptidylpeptidase II

Eine der postproteasomalen intrazellulären Peptidasen ist die Tripeptidylpeptidase II (TPPII; EC 3.4.14.10). TPPII ist eine Serinpeptidase der Subtilisin-Familie und spaltet Peptide hauptsächlich am N-Terminus unter Freisetzung eines Tripeptides. TPPII zählt zu den Exopeptidasen und wird als konstitutives Enzym der eukaryontischen Zellen angesehen [12], [13], [14].

### 1.2.1 Eigenschaften und Struktur

TPPII besteht aus drei Domänen, der N-terminalen, der zentralen und der C-terminalen Domäne (Abb. 1.1). Je nach Organismus können die einzelnen Domänen in ihrer Länge variieren. Die Reste der katalytischen Triade von *Hs*TPPII (Ser-449-His-264-Asp-44) sind in der N-terminalen Domäne lokalisiert. Das während des Katalysemechanismus auftretende Oxyanion wird durch Asn44 stabilisiert [15], [16]. Zwischen Asp44 und His264 liegt ein Einschub von ca. 200 Aminosäuren [17], [18]. Die beiden anderen Domänen sind hauptsächlich an der Ausbildung der Quartärstruktur und Regulation von TPPII beteiligt [19].



**Abbildung 1.1 Schematische Sequenzalignierung von *DmTPPII* und *HsTPPII***

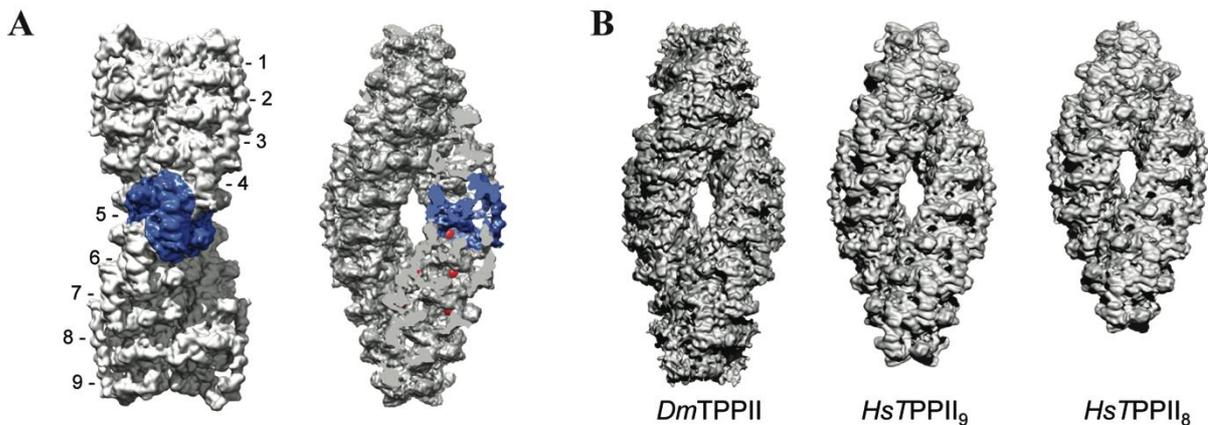
Die Domänen sind farblich wie folgt kodiert: gelb: N-terminale Domäne (Subtilisin-Domäne), orange: Einschub von ca. 200 AS zwischen den katalytischen Asp- und Ser-Resten, grün: zentrale Domäne, blau: C-terminale Domäne, grau: Loops, die nicht in der Kristallstruktur von *DmTPPII*-Dimeren aufgelöst sind. Rote Buchstaben kennzeichnen die Position der katalytischen Reste (Abbildung wurde von B. Rockel bereitgestellt).

Das pH-Optimum von TPPII liegt im neutralen Bereich [12], [20]. Zusätzlich zur Exopeptidaseaktivität wurde eine schwache Trypsin-ähnliche Endopeptidaseaktivität von TPPII beschrieben [21], [22]. Über die Substratspezifität von TPPII ist wenig bekannt, da bisher noch nicht sehr viele Substrate untersucht wurden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass Substrate mit Prolin in P1-Position [23] nicht gespalten und bestimmte Peptide mit Phenylalanin in P1-Position sehr effektiv gespalten werden [20].

TPPII kommt in den meisten eukaryontischen Organismen vor (*S. pombe* [24]; *R. norvegicus* [12]; *M. musculus* [25]; *D. melanogaster* [26]; *A. thaliana* [27]; *H. sapiens* [28]). Je nach Organismus können TPPII-Monomere eine Molekülmasse von 138 kDa (Mensch) bis 153 kDa (Acker-Schmalwand) besitzen. TPPII aus *Schizosaccharomyces pombe* (*SpTPPII*) besitzt eine, von der Gensequenz abgeleitete, Molekülmasse von 143 kDa [29]. Im Genom von *D. melanogaster* wurden zwei Leseraster für *DmTPPII* mit unterschiedlicher Länge gefunden wurden [30]. Das Polypeptid der Isoform A besitzt eine Länge von 1354 Aminosäuren und das der Isoform D eine Länge von 1441 Aminosäuren. Außerdem wurde für *HsTPPII* ein alternatives Startcodon beschrieben [31].

Die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen von negativ kontrastiertem humanem TPPII haben gezeigt, dass sich TPPII zu Einzel- und Doppelbögen anordnet [28]. Die globale Anordnung der Homooligomere wird auch als Spindel bezeichnet. Durch die erste 3D-Rekonstruktion [32] von vitrifizierten TPPII-Komplexen aus *D. melanogaster* konnte die spindelförmige Architektur von TPPII bestätigt werden (Abb. 1.2 B) und durch die Aufklärung der Kristallstruktur eines Dimers konnte die erste Hybridstruktur von *DmTPPII* rekonstruiert werden [19]. Der *DmTPPII*-Komplex (~ 6 MDa) besteht aus zwei Strängen mit jeweils 10 Dimeren, die in Form einer Spindel umeinander gewunden sind. Die 3D-Rekonstruktion der *HsTPPII*-Spindel mittels Einzelpartikelrekonstruktion (Abb. 1.2 A und B) hat ergeben, dass diese sowohl aus acht als auch aus neun Dimeren pro Strang aufgebaut sein kann [33]. Die Anzahl der Dimeruntereinheiten kann somit sowohl innerhalb eines Organismus als auch zwischen zwei verschiedenen Organismen variieren. Für *SpTPPII* existieren bisher noch keine genauen Angaben über die Quartärstruktur. Es

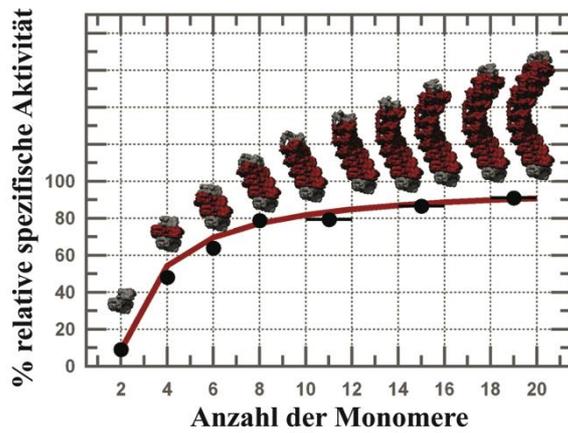
wurde bisher lediglich berichtet, dass die Peptidase Multicorn, welche später als TPPII identifiziert wurde, eine runde Struktur mit einem Durchmesser von 50 bis 55 nm haben soll [34].



**Abbildung 1.2 Quartärstruktur von TPPII**

(A) 3D-Rekonstruktion von *HsTPPII* mit einer Auflösung von 9 Å. Links: Nummerierung der Dimere eines Strangs (ein Dimer wurde blau eingefärbt), rechts: Navette-Ansicht der Spindel. Zur Visualisierung der aktiven Zentren (rot) ist ein Strang aufgeschnitten. (B) 3D-Rekonstruktionen von *DmTPPII* und *HsTPPII* in der Navette-Ansicht zur Darstellung des Spindel-Polymorphismus (Abbildung wurde von B. Rockel bereitgestellt).

Die Assemblierung der Dimere zu Einzelsträngen hat Einfluss auf die Aktivität von TPPII [35]. So besitzen Dimere die niedrigste Aktivität [36] und Spindeln stellen den Oligomerzustand mit höchster Aktivität dar [35]. Der Modellvorstellung nach werden Dimere erst durch die Zusammenlagerung zu Tetrameren aktiviert (Abb. 1.3). Durch die Aktivierung steigt die Aktivität auf 50 % der Gesamtaktivität an. Dann können sich kleine Oligomere und weitere Dimere anlagern, sodass sich Einzelstränge bilden. Dabei nimmt die Aktivität mit dem Oligomerzustand zu (Abb. 1.3). Da die Aktivierung des aktiven Zentrums den Kontakt zwischen zwei Oligomeren benötigt, kann die Assemblierung schneller als die Zunahme der Aktivität sein [35]. Zwei Einzelstränge lagern sich zu einer Spindel zusammen, welche eine fast zehnfach höhere Aktivität als ein Dimer besitzt. Die Spindel wird durch eine Doppelklammer zwischen den terminalen Dimeren stabilisiert [37].

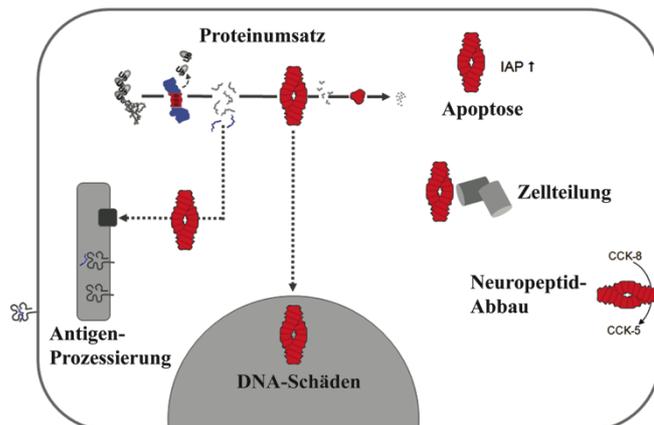


**Abbildung 1.3 Assemblierung und Aktivität von TPPII**

Die relative spezifische Aktivität von TPPII hängt vom Oligomierzustand ab. Je mehr Dimere sich zusammenlagern, desto größer ist die spezifische Aktivität. Aktive Monomere sind in rot und Monomere mit einer Basisaktivität in grau gekennzeichnet (Abbildung wurde von B. Rockel bereitgestellt).

### 1.2.2 Physiologische und pathobiologische Bedeutung

Tripeptidylpeptidase II ist in diverse zelluläre Abläufe involviert. So zeigten Versuche mit einer veränderten *tp2*-Expression in unterschiedlichen Zellsystemen und Organismen, dass TPPII eine Funktion beim Neuropeptidabbau [13], bei der MHC-Klasse-I-Epitop-Prozessierung [38], beim Muskelabbau [39], bei der Apoptose [40], bei DNA-Schäden [41], am Zellzyklus [42] und an der Fettregulation [43] haben kann. Einige der Funktionen von TPPII sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst und werden im Folgenden näher erläutert.



**Abbildung 1.4 Darstellung der zellulären Vorgänge mit denen TPPII in Verbindung gebracht wurde**  
TPPII ist schematisch als rote Spindel dargestellt (Abbildung wurde von B. Rockel bereitgestellt).

## **Proteinumsatz**

Wie bereits beschrieben, gibt es drei Wege für den Proteinabbau in der Zelle (siehe 1.1). Der zytosolische Proteinabbau erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System. Dabei werden ubiquitinylierte Proteine durch das 26S-Proteasom zu Peptiden verdaut, die ihrerseits von nachgeschalteten Peptidasen zerkleinert werden. Eine dieser Peptidasen ist wahrscheinlich TPPII. TPPII katalysiert dabei vermutlich die Abspaltung von Tripeptiden vom N-Terminus von Peptiden, die aus dem Proteasom entlassen werden [44]. TPPII ist jedoch nicht essentiell, da zum Beispiel eine Deletion des Gens in *S. pombe* nicht letal ist [45]. Studien an EL-4-Zellen, in denen das Proteasom inhibiert wurde, lieferten Hinweise darauf, dass TPPII die Funktion des Proteasoms übernehmen kann. In diesen Zellen wurde eine erhöhte TPPII-Aktivität gemessen [46]. Da diese adaptierten Zellen jedoch eine geringe proteasomale Restaktivität zum Überleben benötigen, bleibt diese Hypothese bisher kontrovers diskutiert [47].

## **Antigen-Prozessierung**

Alle Organismen sind ständig den biologischen Einflüssen ihrer Umwelt ausgesetzt und benötigen daher ein Abwehrsystem, um sich gegen pathogene Organismen und Viren zur Wehr zu setzen. Unter anderem werden infizierte Zellen durch patrouillierende Zellen des Immunsystems erkannt. Dies geschieht über die Wechselwirkung von zytotoxischen T-Zellen mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche, wie zum Beispiel dem Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse 1 (MHC-I). Hierfür werden ständig Epitope von intrazellulären Proteinen generiert und durch die MHC-I Rezeptoren nach außen präsentiert. Die Epitope entstehen, indem intrazelluläre Proteine abgebaut werden und einen Komplex mit MHC-I-Rezeptoren bilden. Der Großteil solcher Epitope wird vom Proteasom generiert [48]. Es gibt jedoch auch Epitope, vorwiegend solche mit Lysinresten am C-Terminus, die unabhängig vom Proteasom erzeugt werden. Auf der Suche nach Peptidasen, die diese Epitope prozessieren, wurde TPPII identifiziert. Demnach ist TPPII zum Beispiel an der Trimmung des HIV-1 und Nef 73-82 beteiligt [22]. Es ist bisher nicht geklärt ob TPPII nur für das Kürzen der Peptide verantwortlich ist oder ob die Peptidase die kompletten Epitope erzeugen kann.

## **Neuropeptidabbau**

Cholecystokinine (CCKs) sind Peptidhormone (Neuropeptide) des Magen-Darm-Trakts, die auch im Gehirn eine wichtige Rolle spielen. Sie werden über den sekretorischen Weg durch eine große Zahl von post-translationalen Modifikationen modifiziert. Unter anderem wird das proCCK durch endoproteolytische Spaltung geteilt. Abhängig vom Gewebetyp werden CCKs unterschiedlich prozessiert. Im Gehirn werden hauptsächlich CCK-8-Peptide hergestellt [49]. CCK-8 ist ein wichtiges Hormon für die Regulation der Nahrungsaufnahme [50]. Es wird durch die Abspaltung eines Tripeptids vom N-Terminus in CCK-5 umgewandelt und dadurch die Inaktivierung eingeleitet. Diese Spaltung wird in Mäusen vermutlich durch eine membrangebundene Isoform von TPPII katalysiert [13].

## **Apoptose und Zellteilung**

Ein essentielles Merkmal von malignen Tumorzellen ist, dass diese Zellen unabhängig von natürlichen Regulationsmechanismen, wie dem kontrollierten Zelltod (Apoptose) wachsen können. Zusätzlich besitzen sie das Potential, sich unendlich zu teilen und dadurch unkontrolliert und uneingeschränkt im gesamten Organismus Metastasen zu bilden [10]. Die Apoptose wird unter anderem durch die Aktivierung von Caspasen eingeleitet. Caspasen sind Cys-Peptidasen, die unter anderem durch die Spaltung von Aktin das Zytoskelett der Zelle zerstören. Die Aktivität von Caspasen muss daher streng reguliert sein. Dies wird durch endogene Inhibitoren, den antiapoptotischen Proteinen (IAPs), bewerkstelligt. Wird die Apoptose zum Beispiel über die Cytochrom-C-Ausschüttung aus den Mitochondrien induziert, werden unter anderem IAPs durch das Proteasom abgebaut. Das Fehlen dieser Inhibitoren aktiviert die Caspasen [51]. Das bedeutet, dass entweder eine erhöhte IAP-Expression oder eine verringerte Aktivität des Proteasoms dazu führt, dass eine Tumorzelle resistent gegenüber der Apoptose sein kann. Da bei verringerter Proteasomaktivität der Proteinumsatz sinkt und deswegen nicht genügend Ressourcen für den Metabolismus der Zelle vorhanden sind, kann sich die Proliferationsrate der Zellen verringern. Es wird vermutet, dass manche Tumorzellen dieses Problem durch eine erhöhte TPPII-Expression umgehen können. So ist zum Beispiel in T-Lymphomzellen aus Mäusen (EL-4) die Tripeptidylpeptidase II verstärkt exprimiert. Mit Hilfe des erhöhten TPPII-Levels und zusammen mit deubiquitylierenden Enzymen schaffen es diese Zellen vermutlich, den Proteinabbau bei geringer Aktivität des Proteasoms, aufrecht zu erhalten.

Da TPPII IAPs nicht abbauen kann, haben sich diese Zellen durch die verstärkte TPPII-Expression vermutlich die Eigenschaft angeeignet die Apoptose zu umgehen [40].

### **DNA-Schäden**

Die Beteiligung von TPPII an der Reparatur von nukleären Schäden ist bisher umstritten. Es konnte gezeigt werden, dass TPPII nach der Bestrahlung von Zellen mit Gammastrahlung verstärkt in den Zellkern transportiert wurde und an den ROS-abhängigen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sein soll [41]. Eine andere Studie konnte hingegen nicht bestätigen, dass TPPII in den Zellkern transportiert wird [52]. Weiterhin wird TPPII eine Rolle bei der Expression des Tumorrepressors p53 aufgrund von DNA-Schäden im Zellkern zugesprochen. Auch dies konnte bisher jedoch nicht endgültig bestätigt werden [41].

### **1.3 *S. pombe* als Modellorganismus**

In molekularbiologischen Laboratorien werden Modellorganismen zur Beantwortung verschiedenster Fragestellungen verwendet. Zu den einfachen eukaryontischen Modellorganismen zählen Hefeorganismen wie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* oder die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*. Da diese Organismen im Gegensatz zu höheren Eukaryonten relativ einfach und in großen Mengen zu kultivieren sind, werden sie häufig verwendet. *S. pombe* besitzt eine stabförmige Morphologie mit einer Länge von ca. 10 µm [53]. Die Generationszeit beträgt je nach Temperatur 2 bis 4 Stunden [54].

Ein wichtiges Kriterium für die Verwendung von *S. pombe* als Modellorganismus ist, dass das gesamte Genom sequenziert ist. Das Genom besitzt eine Größe von 13,8 Mio Basenpaaren und 4824 offenen Leseraster (ORFs) [29]. Darunter auch ein proteincodierender Bereich für TPPII. Für *S. cerevisiae* wurde bisher kein *tp2* entdeckt.

Ein weiteres Kriterium eines Modellorganismus ist, dass ausreichend molekularbiologische Techniken etabliert sind, mit denen zum Beispiel die Genexpression kontrolliert werden kann. Für *S. pombe* gibt es diverse Plasmide, die sich sowohl zur Überexpression als auch zum *knockout* von Genen eignen [55].

Strukturuntersuchungen von zellulären Proteinkomplexen mit dem Elektronenmikroskop (EM) stellen besondere Anforderungen an einen Modellorganismus. Zum Beispiel muss die Probe für die Untersuchung speziell präpariert werden, sodass die Struktur der zellulären Strukturen bestmöglich erhalten bleibt. *S. pombe* eignet sich sehr gut zur

Untersuchung mit dem EM, da die Zellen leicht über Filter konzentriert [56] und anschließend mit verschiedenen Reagenzien wie Glutaraldehyd fixiert werden können [57]. Aus den fixierten Zellen können im Anschluss Schnitte angefertigt werden, die unter dem EM untersucht werden können. Ebenso ist es möglich, *S. pombe*-Zellen unter hohem Druck und bei tiefen Temperaturen für die Kryoelektronentomographie einzufrieren [58]. Untersuchungen an zellulären Strukturen mittels Tomographie sind somit möglich.

#### 1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Es gibt viele Fragestellungen bezüglich TPPII, die bisher noch nicht oder nicht ausreichend geklärt werden konnten. So ist zum Beispiel wenig bekannt über die zellulären Interaktionspartner, die Regulation und die zelluläre Lokalisierung von TPPII. Zur Identifizierung von Interaktionspartnern kann beispielsweise mit Hilfe eines Antikörpers gegen TPPII eine Immunopräzipitation durchgeführt werden. Dafür werden jedoch relativ große Mengen an TPPII benötigt. Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Evaluierung von *S. pombe* als Modellorganismus zur Bereitstellung von TPPII. Dafür sollte ein Reinigungskonzept von *Sp*TPPII-Spindeln aus *S. pombe*-Zellen entwickelt werden. Zusätzlich sollten die vorhandenen Zellaufschlussmethoden in Bezug auf ihre Tauglichkeit zur Reinigung von *Sp*TPPII untersucht und bewertet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Quartärstruktur von *Sp*TPPII aufgeklärt werden. Dafür sollten die isolierten *Sp*TPPII-Partikel mit dem Transmissionselektronenmikroskop abgebildet werden und anschließend mit Hilfe von Bildverarbeitungsmethoden analysiert werden. Anhand der Ergebnisse sollte gezeigt werden, ob die *Sp*TPPII-Partikel wie alle bisherigen TPPII-Moleküle aus anderen Organismen eine spindelförmige Architektur besitzen oder ob die Partikel eine andere Quartärstruktur aufweisen, so wie sie zum Beispiel in Untersuchungen von *Sp*TPPII mit dem Rasterkraftmikroskop gefunden wurden [34].

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

| Name   | Hersteller           |
|--|----------------------|
| Adenin Hemisulfat Salz   | Sigma                |
| 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)   | Bachem               |
| Acrylamid Protogel 30 % (w/v)  | National Diagnostics |
| Agarose  | Sigma                |
| Ala-Ala-Phe-AMC (AAF-AMC)  | Bachem               |
| Alluminiumsulfat ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) | Roth                 |
| Ammoniumpersulfat (APS)  | Merck                |
| Ammoniumsulfat (AS)  | Merck                |
| Bacto Casamino Acids   | BD                   |
| Bacto Agar   | Difco                |
| Bacto Trypton  | Difco                |
| Bestatin   | Sigma                |
| Bromphenolblau   | Serva                |
| Coomassie Brilliant Blue G 250 (cbb g259)                                    | Serva                |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | J.T. Baker           |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)   | Merck                |
| Ethanol p.a.   | Sigma                |
| Essigsäure   | Merck                |
| $\alpha$ -D(+) Glucose Monohydrat  | Roth                 |
| Glycin   | Sigma                |
| Glycerin 86 - 88%  | Roth                 |
| Guanidiniumchlorid (GdmCl)   | Merck                |
| Hefeextrakt BioChemica   | AppliChem            |
| L-Histidin   | Roth                 |
| Kaliumhydroxid (KOH)   | Merck                |
| Kaliumdihydrophosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )                           | Merck                |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                       | Roth                 |
| L-Leucin   | Roth                 |
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)                                       | Merck                |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Merck                |
| ortho-Phosphorsäure  | Merck                |
| Polyethyleneimin (PEI)   | Sigma                |
| Salzsäure (HCl)  | Merck                |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS)  | Bio-Rad              |
| Trichloroessigsäure (TCA)  | Merck                |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)                                   | Serva                |
| Uridin   | Alfa Aesar           |
| Uranylacetat (UA)  | Merck                |

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser aus dem Milli-Q Plus Ultrapure Wasseraufbereitungssystem (Millipore; H<sub>2</sub>O<sub>Milli-Q</sub>) hergestellt. Puffer für die Chromatographie wurden mit einem Express<sup>TM</sup> Plus Filter (Millipore) mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert und im Anschluss unter Vakuum für mindestens 10 Minuten entgast.

#### Puffer für den Zellaufschluss

##### Zellaufschlusspuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
10 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

##### Enzymatischer Verdau

60 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

##### Zellaufschlusspuffer II

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

#### Puffer für die Proteinreinigung

##### Resuspensionspuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
10 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

##### SEC-Puffer

80 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

##### ANX-Bindepuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

##### ANX-Elutionspuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
100-400 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

SP-Bindepuffer

80 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 6,0 - 6,5

Blue-Bindepuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

Blue-Elutionspuffer

50 mM KPO<sub>4</sub>  
1,5 M KCl  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 7,5

Capto-Bindepuffer I

50 mM MES  
1 mM DTT  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 6,0

Capto-Bindepuffer II

50 mM MES  
1 mM DTT  
1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 6,4

Capto-Elutionspuffer

50 mM MES  
1 mM DTT  
0 - 500 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
5 % (v/v) Glycerin  
pH 6,4

**Puffer für die Gelelektrophorese**

Anodenpuffer

100 mM Tris  
22,5 mM HCl  
pH 8,9

Kathodenpuffer

100 mM Tris  
100 mM Tricin  
0,1 % (w/v) SDS  
pH 8,25

Puffer B

3 M Tris/HCl  
0,3 % SDS  
Ad 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>Milli-Q</sub>  
pH 8,5

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Probenpuffer (6x)                | Alu-Coomassie-Färbelösung   |
| 50 mM TEA/PO <sub>4</sub>        | 37 mM (Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O) |
| 5 % (w/v) SDS                    | 61 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>  |
| 30 % (v/v) Glycerol              | 10 % (v/v) EtOH   |
| 0,12 % (W/v) Bromphenolblau      | 0,02 % (w/v) Coomassie cbb g259   |
| 50 mM DTT kurz vor der Benutzung |   |
| pH 8,5                           |   |

### **Lösungen und Puffer für biochemische Methoden und EM Präparation**

|   |   |
|---|---|
| Aktivitätsassaymischung (Standard)                    | Aktivitätsassaymischung ( $K_m$ und $v_{max}$ ) |
| 0,2 mM AAF-AMC  | 0,005 - 1 mM AAF-AMC                            |
| 100 mM KPO <sub>4</sub>                               | 100 mM KPO <sub>4</sub>                         |
| 2 % (v/v) DMSO  | 2 % (v/v) DMSO                                  |
| 0,02 mM Bestatin                                      | 0,02 mM Bestatin                                |
| 1 mM DTT  | 1 mM DTT  |
| pH 7,5  | pH 7,5  |
| Aktivitätsassaymischung (pH-Optimum)                  | AMC Standard                                    |
| 0,2 mM AAF-AMC  | 200 mM AMC                                      |
| 100 mM KPO <sub>4</sub>                               | 100 mM Tris/HCl                                 |
| 2 % (v/v) DMSO  | 1 % (v/v) SDS                                   |
| 0,02 mM Bestatin                                      | pH 9,5  |
| 1 mM DTT  |   |
| pH 6,0 - 8,5  |   |
| Stop-Puffer   | Bradford-Puffer                                 |
| 100 mM Tris/HCl                                       | 60 mM KPO <sub>4</sub>                          |
| 1 % (v/v) SDS oder LDS                                | pH 7,5  |
| pH 9,5  |   |
| Grid-Waschpuffer                                      | NS-Färbelösung                                  |
| 50 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2 % (w/v) Uranylacetat                          |
| pH 7,5  |   |

### 2.1.3 Medien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser aus der Milli-Q Plus Ultrapure Reinstwasseranlage (Millipore; H<sub>2</sub>O<sub>Milli-Q</sub>) hergestellt und 20 Minuten lang mit 120 °C heißem Wasserdampf autoklaviert.

#### YES-Medium (flüssig)

30 g/l D-(+)-Glucose  
5 g/l Hefeextrakt  
2 g/l Casamino Acids  
0,1 g/l L-Histidin  
0,1 g/l L-Leucin  
0,1 g/l Uridin  
0,1 g/l Adeninhemisulfat

#### YES-Medium (fest)

YES-Medium  
18 g/l Agar-Agar

#### YES-Glycerin-Medium (flüssig)

YES-Medium  
50 % Glycerin

### 2.1.4 Stämme

*Schizosaccharomyces pombe* 927 h+ Wildtyp

Shravan, M.

(MPI für Biochemie, Martinsried)

### 2.1.5 Enzyme

Zymolyase 100T aus *Arthrobacter luteus*

Biomol (Hamburg)

### 2.1.6 Standards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Fermentas

### 2.1.7 Chromatographiesäulen

Alle vorgepackten Säulen und Säulenmaterialien wurden von GE Healthcare bezogen. Das Säulenvolumen (CV) ist jeweils angegeben.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Affinitätschromatographie       | HiTrap <sup>TM</sup> Blue HP (CV: 1 ml)<br>Blue Sepharose CL-6B (CV: 24 ml)  |
| Ionenaustauscherchromatographie | HiTrap <sup>TM</sup> ANX FF (high sub) (CV: 1 ml)<br>HiTrap <sup>TM</sup> ANX FF (high sub) (CV: 5 ml)<br>HiTrap <sup>TM</sup> SP FF (CV: 1 ml)<br>HiTrap <sup>TM</sup> Capto MMC (CV: 1 ml) |
| Größenausschlusschromatographie | Superose <sup>TM</sup> 6 10/300 GL (CV: 24 ml)<br>Superose <sup>TM</sup> 6 XK 26/70 (CV: 320 ml)   |

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Anfertigung von Glycerinkulturen**

Die Lagerung von *S. pombe*-Zellen erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Dafür wurden die Zellen bei 30 °C in 0,8 ml YES-Medium für 24 Stunden angezogen und mit 0,8 ml YES-Glycerin-Medium in sterilen Kryoröhrchen vermischt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.1.2 Reisolation von Glycerinkulturen**

Die Glycerinkulturen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem sterilen Plastikspatel auf eine Petrischale mit festem YES-Medium (YES-Platte) ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 - 4 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. YES-Platten wurden bei 4 °C für maximal 2 Monate aufbewahrt.

#### **2.2.1.3 Anzucht von Flüssigkulturen**

Alle Vorkulturen wurden in 100 ml Schikanekolben angezogen. Dafür wurden 50 ml YES-Medium mit einer Hefekolonie von einer YES-Platte angeimpft. Die Vorkultur wurde bei 30 °C auf einem horizontalen Schüttler (130 rpm) für 2 - 4 Tage bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) von 5,0 angezogen. 5 ml der Vorkultur wurden in einen 2 l Schikanekolben mit 1 l YES-Medium transferiert. Die Hauptkultur wurde 2 - 4 Tage bei 30 °C auf einem horizontalen Schüttler mit 110 rpm inkubiert.

#### **2.2.1.4 Zellernte**

Die Zellsuspensionen der Flüssigkulturen wurden bei 1000×g (3500 rpm, 4 °C) für 5 Minuten zentrifugiert (Sorvall, JA-10). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit deionisiertem Wasser gewaschen, indem die Zellen resuspendiert und erneut zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde bei - 80 °C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C aufbewahrt.

## **2.2.2 Zellaufschluss**

### **2.2.2.1 Mechanischer Zellaufschluss**

#### **2.2.2.1.1 Zelmühle**

Für den Zellaufschluss mit der Zelmühle, wurde ein Gemisch aus Glaskugeln und Zellsuspension hergestellt. Dafür wurden vier Teile Zellen (Nassgewicht) in einem Teil Zellaufschlusspuffer (w/v) resuspendiert, sodass eine leicht viskose Lösung entstand. Der Metallzylinder der Zelmühle (4 cm Durchmesser, 120 ml Volumen) wurde mit 80 % (v/v) Glaskugeln (0,25 - 0,5 mm; Roth) gefüllt und mit der Zellsuspension überschichtet. Die Glaskugelzellsuspension wurde gründlich durchmischt und der Zylinder solange abwechselnd mit Glaskugeln und Zellsuspension gefüllt, bis ein festes Gemisch, vergleichbar mit feuchtem Sand, entstanden war. Der Aufschluss erfolgte bei 0 °C in einer Vibrogen-Zelmühle Vi4 (Edmund Bühler, Tübingen). Die Anlage wurde 60 Sekunden lang betrieben und anschließend 60 Sekunden lang gekühlt. Diese Prozedur wurde 5 Mal wiederholt. Das Glaskugelzellgemisch wurde anschließend mit 5 ml Aufschlusspuffer aus dem Zylinder gewaschen. Die Trennung von Glaskugeln und Rohextrakt erfolgte über eine Glasfilternutsche (Porengröße 3) unter Vakuum oder in einer Zentrifuge. Zur Zentrifugation wurde das Gemisch in Plastikröhrchen mit Filter (Pierce Centrifuge Columns, Thermo Scientific) überführt und diese in der Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3SR Plus, Thermo Scientific) bei 3500 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in Plastikröhrchen gesammelt. Die Glaskugeln wurden einmal mit 30 ml Zellaufschlusspuffer gewaschen. Das Lysat wurde mit der Waschfraktion vereint und für 30 Minuten bei 43000×g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC-5B, SS-34; RBC). Der Überstand wurde dekantiert und für 60 Minuten bei 200000×g und 4 °C zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, Ti50.2; Beckman Coulters). Der Überstand wurde danach erneut dekantiert, filtriert (0,8 µm und 0,45 µm MCE-Membran Spritzenfilter) und tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Tropfen bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.2.1.2 Zellhomogenisator**

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in eineinhalb Teilen (w/v) Zellaufschlusspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellhomogenisator EmulsiFlex-C5 (Avestin) mit einem Druck von 15 - 35 kPSI zwei bis drei Mal aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 30 Minuten, 4 °C bei 43000×g zentrifugiert

(Sorvall RC-5B, SS-34; RBC). Der Überstand wurde dekantiert und für 60 Minuten, 4 °C bei 200000×g zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, Ti50.2; Beckman Coulters). Der Überstand wurde dekantiert, filtriert (0,8 µm und 0,45 µm MCE-Membran Spritzenfilter) und tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Tropfen bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.2.1.3 Ultra-Zentrifugalmühle**

Für den Zellaufschluss mit der Zentrifugalmühle wurde eine Zellsuspension mit Zellaufschlusspuffer II (5 % Glycerin) hergestellt und in Tropfenform mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Tropfen wurden mit der Ultrazentrifugalmühle (ZM200; Retsch) in flüssigem Stickstoff bei 18000 rpm zermahlen. Das Kryopulver wurde bei - 80 °C aufbewahrt.

Das Kryopulver wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 30 Minuten, 4 °C bei 43000×g zentrifugiert (Sorvall RC-5B, SS-34; RBC). Der Überstand wurde dekantiert und für 60 Minuten, 4 °C bei 200000×g zentrifugiert (Beckman Optima LE-80K, Ti50.2; Beckman Coulters). Der Überstand wurde dekantiert, filtriert (0,8 µm und 0,45 µm MCE-Membran Spritzenfilter) und tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Tropfen bei - 80 °C gelagert.

#### **2.2.2.2 Enzymatischer Verdau**

Der enzymatische Verdau der Hefezellwand erfolgte mit dem bakteriellen Enzym Zymolyase aus *Arthrobacter luteus*. Zuerst wurden die Zellen (Nassgewicht) im Verhältnis eins zu eins (w/v) in Lysepuffer für den enzymatischen Verdau resuspendiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von Zymolyase 100T (10 µg ml<sup>-1</sup> in 60 mM KPO<sub>4</sub> pH 7,5) gestartet. Das Enzym wurde im Verhältnis (w/w) von 1:3000 zum Hefezellegewicht verwendet. Dies entspricht einer Aktivitätseinheit (1 U) pro 30 mg Zellen (Nassgewicht). Als Kontrolle wurde die äquivalente Menge an Puffer verwendet. Der Ansatz wurde bei 35 °C und 400 rpm im Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Da die Zellen während der Inkubation zum Boden des Reaktionsgefäßes absanken, wurde das Gefäß alle 30 Minuten invertiert. Der Verdau wurde über die Änderung der OD<sub>600</sub> verfolgt. Dafür wurde nach 30, 60, 90, 120 und 180 Minuten 1 µl des Ansatzes entnommen, mit Puffer verdünnt und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Zusätzlich wurde die OD<sub>600</sub> des Kontrollansatzes ohne Zymolyase bestimmt. Aus den beiden Werten wurde die prozentuale Abnahme berechnet. Nach

Angaben des Herstellers des Enzyms, sind die Zellen (*Saccharomyces cerevisiae*) vollständig lysiert wenn die OD<sub>800</sub> der Probe um 60 % geringer ist als die OD<sub>800</sub> der Referenz.

Die lysierten Zellen wurden für 25 Minuten, bei 4 °C und 25000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde dekantiert und filtriert (0,8 µm und 0,45 µm MCE-Membran Spritzenfilter).

### **2.2.3 Proteinreinigung**

#### **2.2.3.1 PEI-Präzipitation**

Die Fällung von positiv geladenen Biomolekülen, hauptsächlich Nukleinsäuren, wurde durch die Zugabe von Polyethylenimin (PEI) erreicht. Dafür wurde das Rohextrakt mit PEI versetzt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (V < 10 ml: 20000 rpm, 10 min, 4 °C; Tischzentrifuge; V > 10 ml: 43000×g, 10 min, 4 °C; Sorvall RC-5B, SS-34; RBC). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen. Um die Menge an PEI zu ermitteln, welche nötig ist, um einen möglichst großen Anteil an Biomolekülen zu fällen, wurden verschiedene Fällungen mit unterschiedlicher PEI-Konzentration durchgeführt. Der Anteil an gefällten Biomolekülen wurde über die Änderung der Absorption des Überstands bei 260 nm verfolgt. Zusätzlich wurde die spezifische Aktivität von *SpTPPII* für die Spaltung von AAF-AMC gemessen. Wenn nicht anders angegeben wurde eine PEI-Konzentration von 0,1 % (v/v) verwendet.

#### **2.2.3.2 Chromatographische Methoden**

##### **2.2.3.2.1 Anionenaustauscher**

Für die Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines Anionenaustauschers wurden eine bis zwei HiTrap<sup>TM</sup> ANX FF (high sub) Säulen (CV: 1 ml oder 5 ml) verwendet. Die Säulen wurden vor der Verwendung mit 5 Säulenvolumina ANX-Bindepuffer äquilibriert. Der Auftrag der Proteinlösung erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml min<sup>-1</sup> (CV: 1 ml) oder 1 ml min<sup>-1</sup> (CV: 5 ml). Anschließend wurden die Säulen mit 5 Säulenvolumina ANX-Bindepuffer gewaschen (gleiche Flussrate wie beim Auftrag). Die Salzkonzentration, welche zur Elution von *SpTPPII* notwendig ist, wurde mit Hilfe eines Stufengradienten (100 mM - 400 mM Ammoniumsulfat über 1 CV) aus ANX-Elutionspuffer ermittelt. Im Anschluss an den Gradienten wurde mit 1 CV 400 mM ANX-

Elutionspuffer eluiert. Die Flussgeschwindigkeit bei der Elution betrug  $0,2 \text{ ml min}^{-1}$  (CV: 1 ml) oder  $1 \text{ ml min}^{-1}$  (CV: 5 ml). Die *Sp*TPPII-Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt. Im Allgemeinen erfolgte die Elution anschließend mit 300 mM AS ANX-Elutionspuffer über 2 CV.

#### 2.2.3.2.2 Kationenaustauscher

Für die Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines Kationenaustauschers wurde eine HiTrap<sup>TM</sup> SP FF (CV: 1 ml) Säule verwendet. Die Säule wurde vor der Verwendung mit 5 Säulenvolumina SP-Bindepuffer äquilibriert. Der Auftrag der Proteinlösung erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Anschließend wurde die Säule mit 5 Säulenvolumina SP-Bindepuffer gewaschen ( $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ). Die *Sp*TPPII-Aktivität wurde im Durchfluss und in der Waschfraktion bestimmt.

#### 2.2.3.2.3 Capto<sup>TM</sup> MMC

Das Säulenmaterial der Capto<sup>TM</sup> MMC besitzt einen Liganden mit multimodaler Funktionalität. Dadurch wird eine andere Bindeselektivität als bei herkömmlichen Ionenaustauschern erreicht. Zusätzlich werden unter Hochsalzbedingungen die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand verstärkt [59]. Daher wurde die Säule unter zwei verschiedenen Bedingungen evaluiert. Für den Betrieb unter niedrigen Salzkonzentrationen wurde die HiTrap Capto<sup>TM</sup> MMC Säule (CV: 1 ml) mit 5 CV Capto-Bindepuffer I äquilibriert. Die Proteinlösung wurde bei einem Fluss von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  aufgetragen. Die *Sp*TPPII-Aktivität wurde im Durchfluss bestimmt.

Analog wurde die Säule für die Bedingungen mit hoher Salzkonzentration mit 5 CV Capto-Bindepuffer II äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit einem Fluss von  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$  aufgetragen und anschließend wurde die Säule mit 3 CV Capto-Bindepuffer II gewaschen. Die *Sp*TPPII-Aktivität wurde im Durchfluss und in der Waschfraktion bestimmt. Die Elution erfolgte mit einem Stufengradienten aus Capto-Elutionspuffer mit sinkender Konzentration von Ammoniumsulfat (500-0 mM) über 2,5 CV. Fraktionen mit 0,2 ml Volumen wurden aufgefangen und die *Sp*TPPII-Aktivität bestimmt.

#### 2.2.3.2.4 Affinitätschromatographie mit Cibacron Blue F3G-A

Für die Affinitätschromatographie mit Cibacron Blue wurde eine HiTrap Blue HP Säule (CV: 1 ml) oder eine selbstgepackte Säule mit Blue Sepharose CL-6B (CV: 24 ml) verwendet. Zu Beginn wurde die Säule mit 5 CV Blue-Bindepuffer äquilibriert. Der Auftrag der Proteinlösung erfolgte mit einem Fluss von  $0,1 \text{ ml min}^{-1}$  (CV: 1 ml) oder  $1 \text{ ml min}^{-1}$  (CV: 24 ml). Anschließend wurde die Säule mit 3 CV Blue-Bindepuffer II gewaschen (Waschfraktion). Die *Sp*TPPII-Aktivität wurde im Durchfluss und in der Waschfraktion bestimmt. Die Elution erfolgte mit Blue-Elutionspuffer über 6 CV (Fluss:  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ). Die *Sp*TPPII-Aktivität im Eluat wurde bestimmt.

Nach der Evaluierung der Cibacron Blue Säule (blaue Säule) wurde sofern nicht anders angegeben eine Kombination aus HiTrap ANX FF und HiTrap Blue verwendet. Dafür wurden die Säulen in Reihe betrieben, sodass die Proteinlösung zuerst über die blaue Säule und im Anschluss über die ANX Säule fließen konnte. Nachdem die beiden Säulen mit 3 CV Bindepuffer gewaschen wurden, wurden die Säulen getrennt und die gebundenen Proteine separat eluiert.

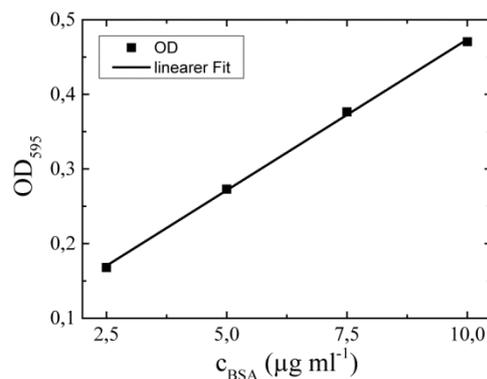
#### 2.2.3.2.5 Größenausschlusschromatographie

Für die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde das Säulenmaterial Superose 6 mit einer Trennleistung von 5 - 5000 kDa verwendet. Je nach Volumen der Proteinlösung wurde eine Superose 6 10/300 GL (maximales Auftragsvolumen: 1 ml) oder eine Superose 6 XK 26/70 (maximales Auftragsvolumen: 10 ml) verwendet. Die Säulen wurden mit einer HPLC (System Gold Modul 125; Beckman) betrieben und vor der Chromatographie mit SEC-Puffer äquilibriert, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$  (bei 10/300 GL) und  $1 \text{ ml min}^{-1}$  (bei XK 26/70). Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarraydetektor (System Gold Modul 168; Beckman) bei 280 nm. Das Eluat wurde fraktioniert und die Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt.

## 2.2.4 Analytische Methoden

### 2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgt mit der Methode nach Bradford [60]. Zur Kalibrierung wurde eine BSA-Standardgerade ermittelt. Dafür wurden verschiedene Lösungen mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen in Bradford-Puffer hergestellt. Die Lösungen wurde mit einem Viertel ihres Volumens mit Bradford-Lösung (Bio-Rad) versetzt (Endvolumen 1 ml), durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Lösung bei 595 nm in Einweg Plastikkuvetten am Photometer (Ultraspec III; Pharmacia) bestimmt. Als Referenz (Blank) wurde die optische Dichte einer Lösung ohne Protein bestimmt. Die Duplikate der OD-Messungen wurden gemittelt und gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Aus dieser Auftragung wurde eine lineare Regressionsgerade berechnet (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1 BSA-Ausgleichsgerade zur Messung der Proteinkonzentration durch die Methode nach Bradford**  
Zur Bestimmung der Standardgeraden, wurden Proteinlösungen in 60 mM  $\text{KPO}_4$  pH 7,5 mit definierter BSA-Konzentration hergestellt. Diese wurden mit Bradford-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Die Messung der  $\text{OD}_{595}$  erfolgte in 1,5 cm-Plastikküvetten. Die Ausgleichsgerade wurde aus der Auftragung der  $\text{OD}_{595}$  gegen die BSA-Konzentration mit Hilfe des Programms OriginPro 9.0 (OriginLab) ermittelt. Geradengleichung:  $\text{OD}_{595} = 0,04044 \times c_{\text{BSA}} + 0,06925$ .

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer beliebigen Lösung erfolgte analog zur Bestimmung der Proteinkonzentration der BSA-Standardlösungen. Dafür wurde nachdem die  $\text{OD}_{595}$  bestimmt wurde, mit Hilfe der umgestellten Formel der Regressionsgeraden (Gleichung 2.1) die Proteinkonzentration berechnet.

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{OD}_{595} - 0,06925}{0,04044} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

## **2.2.4.2 Elektrophoretische Methoden**

### **2.2.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgele**

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen wurden 9 ml 30 % Acrylamidlösung, 10 ml Puffer B, 5 ml Glycerin, 6 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl TEMED und 10 µl 10 % APS vermischt und in die Gelgießkammer gefüllt (ca. 2/3 der Gesamthöhe). Um eine ebene Oberfläche zu erhalten und Blasen zu beseitigen, wurde die Trenngellösung mit einem Butanol-Wasser-Gemisch überschichtet. Die polymerisierte Trenngellösung wurde mit Sammelgellösung (1,5 ml 30 % Acrylamidlösung, 3,1 ml Puffer B, 7,9 ml H<sub>2</sub>O, 15 µl TEMED und 150 µl 10 % APS) überschichtet und der Kamm eingesetzt. Nach Abschluss der Polymerisation des Sammelgels wurden die Gele in Frischhaltefolie im Kühlraum (4 °C) bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **2.2.4.2.2 TCA-Fällung**

Die Proteine aus den Proben mit einem Volumen größer als 15 µl wurden vor der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese gefällt. Dafür wurde die Proteinlösung mit 12 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat abzentrifugiert (25000 rpm, 10 min, 4 °C; Eppendorf Tischzentrifuge) und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 30 µl Probenpuffer aufgenommen.

### **2.2.4.2.3 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proben wurden in Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 75 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in die Kammern des Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte nach Schägger [61] bei 100 V, bis die Bromphenolblaubande am unteren Ende des Gels austrat (ca. 120 - 150 min). Anschließend wurde das Gel für 30 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Wasser wurde währenddessen zweimal ausgetauscht. Die Färbung der Proteine erfolgte 120 min lang in Alu-Coomassie-Färbelösung. Danach wurde das Gel zweimal mit H<sub>2</sub>O gespült und in H<sub>2</sub>O für 120 min entfärbt. Das gefärbte Gel wurde mit einem Flachbettscanner (Epson Expression 1680 Pro) bei 300 dpi digitalisiert.

### 2.2.4.3 Aktivitätsmessungen

Die Aktivität von *Sp*TPPII-Lösungen wurde über die Messung der Fluoreszenz von AMC, welches bei der spezifischen Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII freigesetzt wird, bestimmt [21], [46]. Für den Assay wurden 50 µl Aktivitätsassaymischung (0,2 mM AAF-AMC) mit Proteinlösung versetzt und bei 30 °C inkubiert. Je nach *Sp*TPPII-Aktivität, wurden die Bedingungen so gewählt, dass das Fluoreszenzsignal 150 Einheiten (counts) nicht überschritt. Diese Bedingungen werden im Folgenden in der Form: Probevolumen/Inkubationszeit ( $V_p/t$ ) angegeben. Die Aktivitätsassaymischungen wurden vor der Messung mindestens 10 min bei 30 °C inkubiert. Um eine unspezifische Spaltung des Substrats durch Aminopeptidasen zu verhindern, enthielt die Assaymischung zusätzlich den Inhibitor Bestatin. Die Spaltung wurde durch die Zugabe von 450 µl Stop-Puffer beendet. Die Fluoreszenz der Lösung wurde am Kontron Fluorimeter in Quarzglasküvetten ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 360 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 460 nm) gemessen. Das Gerät wurde so kalibriert, dass 100 Fluoreszenzeinheiten der Fluoreszenz von 0,2 mM freiem AMC entsprachen. Anhand der counts wurde die Aktivität der Lösung mit Hilfe von Gleichung 2.2 berechnet.

$$A = \frac{\text{counts}}{t \times V_p} \times V_{\text{ges}} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

|                  |   |
|------------------|---|
| A                | Aktivität (U)                               |
| counts           | gemessene Fluoreszenzsignaleinheiten        |
| t                | Inkubationszeit (min)                       |
| $V_p$            | eingesetztes Volumen der Proteinlösung (µl) |
| $V_{\text{ges}}$ | Gesamtvolumen der Lösung (µl)               |

Unter Annahme der Michaelis-Menten-Kinetik und der Kenntnis von  $v_{\text{max}}$ , ist der Substratumsatz im linearen Bereich der Progresskurve der Menge an aktivem *Sp*TPPII proportional. Somit kann näherungsweise über Gleichung 2.3 die Konzentration an aktivem *Sp*TPPII berechnet werden. Diese Konzentration ist nicht unbedingt identisch mit der realen Proteinkonzentration von *Sp*TPPII und beruht auf der Annahme, dass *Sp*TPPII-Moleküle komplett aktiv sind. Daher wird die ermittelte Konzentration im Folgenden als ‚aktive Konzentration‘, beziehungsweise die korrespondierende Proteinmenge als ‚aktives *Sp*TPPII‘ bezeichnet.

$$[\text{TPPII}] = \frac{\text{counts} \times V}{\text{spez. Aktivität} \times F} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

|                 |   |
|-----------------|---|
| [TPPII]         | aktive Konzentration ( $\text{mg ml}^{-1}$ )                              |
| counts          | gemessene Fluoreszenzsignaleinheiten                                      |
| V               | Verdünnung  |
| spez. Aktivität | 20625 $\text{pmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei 0,2 mM AAF-AMC |
| F               | Inkubationszeit (sec) $\times V_p$  |

## 2.2.5 Biochemische Charakterisierung

### 2.2.5.1 Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Die Bestimmung von  $K_m$  und  $v_{\max}$  der enzymatischen Spaltung von AAF-AMC durch  $SpTPPII$  erfolgte durch die Messung der spezifischen Aktivität von  $SpTPPII$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Dafür wurden 48  $\mu\text{l}$  AAF-AMC Standards mit verschiedenen Konzentrationen des Substrats hergestellt und für 90 Sekunden bei 30 °C mit 2  $\mu\text{l}$   $SpTPPII$  ( $c_{SpTPPII} = 25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) inkubiert. Die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz betrug 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 450  $\mu\text{l}$  LDS-Stop-Puffer beendet. Anschließend wurde die Fluoreszenz des freien AMCs am Kontron Fluorimeter in Quarzglasküvetten bestimmt ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 360 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 460 nm). Die spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration wurde berechnet. Die Bestimmung von  $K_m$  und  $v_{\max}$  erfolgte über einen nicht-linearen Kurvenfit (Michaelis-Menten) mit Hilfe des Programms OriginPro 9.0 (OriginLab). Mit  $v_{\max}$  und der Enzymkonzentration wurde  $k_{\text{cat}}$  nach Gleichung 2.4 berechnet.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]_0} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

|                  |  |
|------------------|--|
| $k_{\text{cat}}$ | katalytische Konstante ( $\text{s}^{-1}$ )   |
| $v_{\max}$       | maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $\text{pmol } \mu\text{g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) |
| $[E]_0$          | Enzymkonzentration (M)   |

### **2.2.5.2 pH-Abhängigkeit der Aktivität**

Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII wurde in 100 mM Phosphatpuffer bei unterschiedlichen pH-Werten bestimmt. Dafür wurden Aktivitätsassaymischungen mit einem pH-Wert von pH 6,0 bis pH 8,5 hergestellt. Der pH-Wert wurde dabei schrittweise um 0,5 Einheiten durch die Zugabe von KOH eingestellt. Die Messung der Aktivität erfolgte wie beschrieben mit 2 µl Proteinlösung (25 µg/ml), 48 µl Aktivitätsassaymischung und 90 Sekunden Inkubationszeit (siehe 2.2.4.3).

### **2.2.5.3 Stabilitätsuntersuchungen**

Da die spezifische Aktivität von TPPII beim Zerfall des Komplexes abnimmt, wurde die Stabilität von *Sp*TPPII über die Messung der Aktivität bestimmt. Dafür wurde die Probe unterschiedlichen destabilisierenden Bedingungen ausgesetzt. Unter anderem wurde die Proteinlösung unterschiedlich lang bei Raumtemperatur inkubiert. Außerdem wurde die Aktivitätsänderung nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen untersucht. Beide Experimente wurden bei 5 % oder 30 % Glycerin durchgeführt. Alle Versuche wurden in LoBind Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt. Als Maß für die Stabilität wurde die prozentuale Änderung der Aktivität berechnet.

### **2.2.5.4 Sequenzanalyse und Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie**

Alle Untersuchungen mit dem Massenspektrometer wurden von Herrn Dr. Cyril Boulegue aus der Microchemistry Core Facility des Max-Planck-Institutes für Biochemie durchgeführt. Dafür wurden Proteinproben in Form von Gelbanden enzymatisch mit Trypsin verdaut und die Spaltprodukte in einem mircoTOF (BRUKER) analysiert.

## 2.2.6 Elektronenmikroskopie

### 2.2.6.1 Probenpräparation mit Schwermetallsalz

Die Proben wurden, wenn nötig, mit 80 mM  $\text{KPO}_4$  pH 7,5 verdünnt. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung eine Minute lang auf ein hydrophilisiertes kohlebeschichtetes Kupfergrid (Athene Grids, 400  $\times$  400 Maschen) adsorbiert. Danach wurde das Grid abgeblottet und zwei Mal mit 5  $\mu\text{l}$  50 mM Ammoniumsulfatlösung pH 7,5 gewaschen. Die Kontrastierung der Probe erfolgte 45 Sekunden lang mit 5  $\mu\text{l}$  Uranylacetat (2 % in  $\text{H}_2\text{O}$ ). Nachdem das Uranylacetat abgeblottet worden war, wurden die Kupfergrids mindestens eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.6.2 Probenpräparation für die Kryoelektronenmikroskopie

Für die Kryoelektronenmikroskopie wurden Grids mit Lacey-Kohlefilm (200 mesh-Grids S166-2; Athene Grids) verwendet. Diese wurden zusätzlich mit einem 0,2 nm dicken Kohlefilm beschichtet. Die Grids wurden vor dem Auftragen der Probe 10 Sekunden lang mit Plasma hydrophilisiert. 5  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung wurden für eine Minute auf dem Kupfergrid inkubiert und abgeblottet. Anschließend wurde das Grid zwei Mal mit 50 mM AS pH 7,5 gewaschen, abgeblottet und in flüssigem Ethan schockgefroren. Die Grids wurden bis zur Mikroskopie in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### 2.2.6.3 Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop

Negativ kontrastierte und vitrifizierte Proben wurden an einem Philips CM200/FEG Elektronenmikroskop bei 160 kV Beschleunigungsspannung und 69500-facher Vergrößerung betrachtet. Digitale Aufnahmen wurden mit einer TVIPS CCD-Kamera (4096 $\times$ 4096 Pixel) mit einer resultierenden Pixelgröße von 2,16 Å aufgenommen. Der Defokus betrug -2 bis -3  $\mu\text{m}$ .

Bilder für die Einzelpartikelanalyse wurden an einem Tecnai F20 Elektronenmikroskop bei 200 kV, 84270-facher Vergrößerung und einem Defokus von -2,5  $\mu\text{m}$  mit einer FEI Kamera Eagle (CCD Größe: 4096 $\times$ 4096 Pixel) aufgenommen. Die resultierende Pixelgröße betrug hier 1,78 Å.

### **2.2.7 Bildverarbeitung, Partikelextraktion und 2D-Klassifizierung**

Alle elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden vor der Einzelpartikelanalyse auf Drift, Astigmatismus und Sichtbarkeit der Thon Ringe im Powerspektrum überprüft. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Software TOM [62] die Kontrasttransferfunktion bestimmt und die Aufnahmen über Phasenflipping entfaltet.

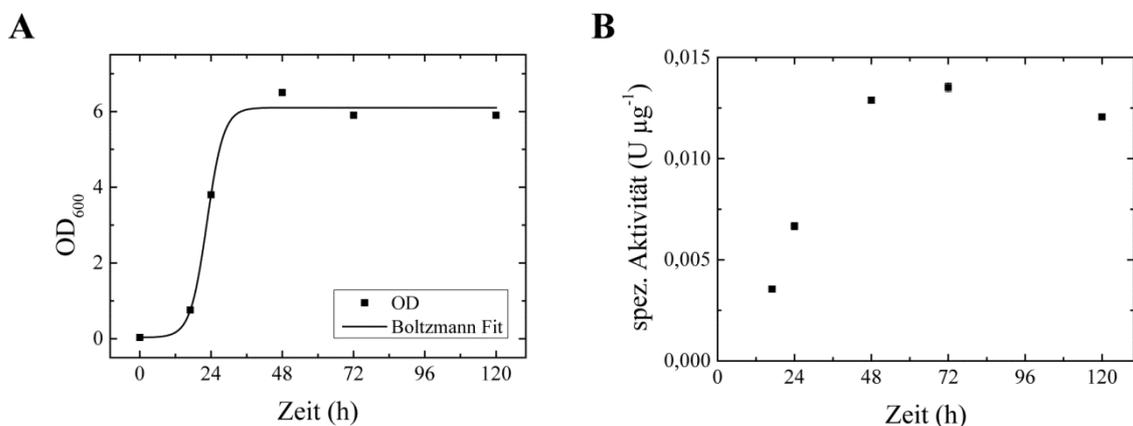
Die Position der Partikel wurde mit der Programm e2boxer aus dem EMAN2-Paket [63] mit Hilfe der manuellen Boxfunktion bestimmt und Partikelbilder mit einer Boxgröße von 400×400 Pixeln extrahiert. Die Partikelbilder wurden entweder mit dem Programm e2refine2d aus dem EMAN2-Paket oder mit dem Programm CL2D aus dem Xmipp 3.0-Paket [64] klassifiziert. Um die Datenmenge zu reduzieren und den Einfluss von Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Partikelbilder einfach komprimiert. Sofern nicht anders angegeben wurden die Standardeinstellungen der Programme verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wachstum und *SpTPPII*-Gehalt der *S. pombe*-Flüssigkultur

Für die Entwicklung einer Reinigungsstrategie von *SpTPPII* aus *Schizosaccharomyces pombe*, wurde zuerst das Wachstum einer stationären Flüssigkultur des Stammes 927 h+ bei 30° C untersucht (Abbildung 3.1 A). Zusätzlich wurde der *SpTPPII*-Proteinanteil in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer bestimmt (Abbildung 3.1 B).

Das Wachstum einer stationären Flüssigkultur kann in die vier Phasen, Anlaufphase, exponentielle Phase, stationäre Phase und Sterbephase unterteilt werden. Für den wildtypischen *S. pombe*-Stamm dauerte die Anlaufphase etwa 12 Stunden. Da zum Zeitpunkt der ersten Messung (18 h) die  $OD_{600}$  bereits um 0,7 Einheiten höher war als zu Beginn der Kultivierung, kann die Dauer der Anlaufphase jedoch nur abgeschätzt werden. Nach 48 Stunden war die Zelldichte am größten. Da ab diesem Zeitpunkt die  $OD_{600}$  nicht weiter zunahm, befand sich die Kultur in der stationären Phase. Nach dem Fit dauerte die exponentielle Phase 24 Stunden. Nach 120 Stunden befand sich die Kultur noch immer in der stationären Phase, sodass nicht bestimmt werden konnte, ab welchem Zeitpunkt die Sterbephase beginnt.



**Abbildung 3.1 Zellwachstum und *SpTPPII*-Gehalt einer *Schizosaccharomyces pombe*-Flüssigkultur**

(A) Wachstumskurve einer stationären *Schizosaccharomyces pombe*-Flüssigkultur bei 30 °C. Die optische Dichte bei 600 nm wurde in 1,5 ml Plastikkuvetten bestimmt. Als Referenz wurde zellfreies Medium verwendet. An die Messpunkte wurde eine Wachstumskurve angepasst (Boltzmann Fit; OriginPro 9).

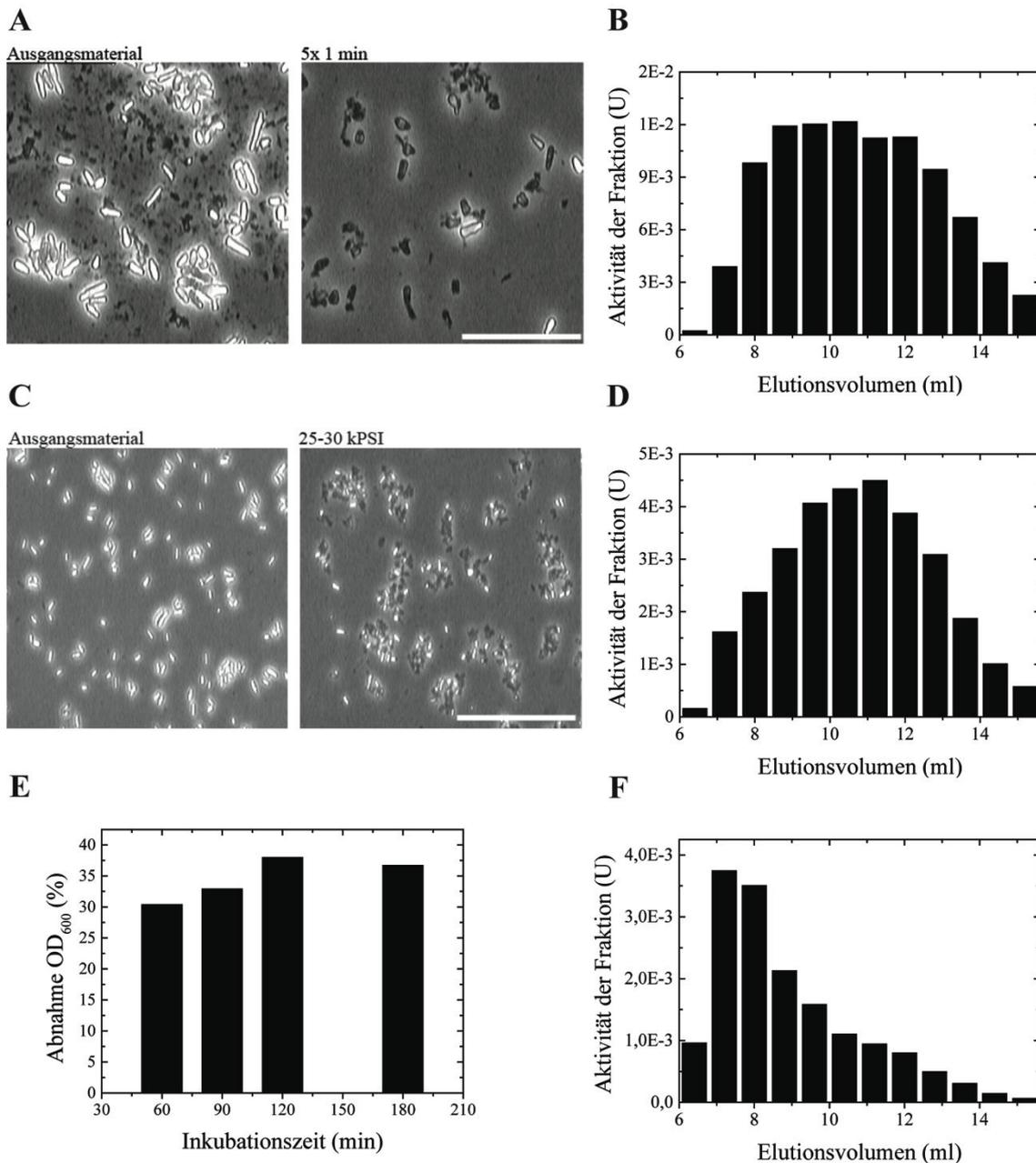
(B) Änderung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Kultivierungszeit. Dafür wurde die Proteinmenge und die *SpTPPII*-Aktivität (Bedingungen der Aktivitätsmessung: 10 µl/5 min) im Überstand der enzymatisch verdauten Zellsuspension zwei Mal bestimmt und gemittelt.

Zur Bestimmung des *SpTPPII*-Anteils am Gesamtproteingehalt der Zellen wurde die spezifische Aktivität im Rohextrakt zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 3.1 B). Diese gibt näherungsweise an, wie groß der Anteil an *SpTPPII* in Bezug auf die Gesamtproteinmenge ist. Aus den Messungen ging hervor, dass die spezifische Aktivität innerhalb der exponentiellen Phase anstieg und nach 72 Stunden am größten war. Innerhalb der stationären Wachstumsphase der Kultur blieb die spezifische Aktivität nahezu konstant.

Aus den OD-Messungen und der Bestimmung der spezifischen Aktivität des Rohextraktes resultierte, dass der optimale Erntezeitpunkt des Wildtyp-Stammes nach 48 Stunden war. Hier hatte die Kultur die stationäre Phase und damit die maximal mögliche Zellmasse erreicht. Zusätzlich war die spezifische Aktivität in dieser Wachstumsphase am höchsten

### **3.2 Zellaufschluss von *S. pombe***

Nachdem der optimale Erntezeitpunkt in Bezug auf den *SpTPPII*-Gehalt und die Zellzahl pro Liter Kultur ermittelt worden war, wurden verschiedenen Methoden des Zellaufschlusses für *S. pombe* evaluiert. Insgesamt wurden die Verwendung der folgenden Geräte untersucht: Ultra-Zentrifugalmühle, Zellhomogenisator und Zelmühle mit Glaskugeln (Glaskugelmühle). Zusätzlich wurde der enzymatische Verdau der Zellen mit Zymolyase untersucht. Für eine optimale Ausbeute ist neben einer möglichst großen Anzahl an aufgeschlossenen Zellen auch die Oligomerverteilung von *SpTPPII* im Rohextrakt von entscheidender Bedeutung. Je größer der Anteil an großen *SpTPPII*-Oligomeren im Rohextrakt, desto besser ist die Methode für die Isolation von *SpTPPII*-Spindeln geeignet. Daher wurde die *SpTPPII*-Oligomerverteilung für jede Methode durch die Auftrennung der Bestandteile des Rohextrakts nach ihrer Größe über eine Superose 6-Säule und anschließende Messung der Aktivität der Fraktionen untersucht (vgl. Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2 Vergleich der Zellaufschlussmethoden für *S. pombe***

**(A) und (B) Glaskugelmühle:** 19,6 g Zellen (Nassgewicht) einer zu Beginn der stationären Phase geernteten *S. pombe*-Flüssigkultur wurden in 5 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und fünf Mal für eine Minute mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen. **(A)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Zellsuspension vor (links) und nach (rechts) dem Zellaufschluss. Für die Aufnahmen wurden 1  $\mu$ l der Zellsuspension 10-fach mit H<sub>2</sub>O verdünnt und unter dem Lichtmikroskop mit 20-facher Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Phasenplatte: PH0, Maßstab 50  $\mu$ m). **(B)** 500  $\mu$ l des aufbereiteten Rohextraktes wurden über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml; 0,8 ml Fraktionsgröße) aufgetrennt. Die Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 10  $\mu$ l/5 min). **(C) und (D) Zellhomogenisator:** 19,8 g Zellen (Nassgewicht) einer zu Beginn der stationären Phase geernteten *S. pombe*-Flüssigkultur wurden in 30 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert und bei 25 - 30 kPSI mit dem Zellhomogenisator aufgeschlossen. **(C)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Zellsuspension vor (links) und nach (rechts) dem Zellaufschluss. Für die Aufnahmen wurden 1  $\mu$ l der Zellsuspension 10-fach mit H<sub>2</sub>O verdünnt und unter dem Lichtmikroskop mit 10-facher Vergrößerung und Phasenkontrast aufgenommen (Phasenplatte: PH0, Maßstab 1000  $\mu$ m). **(D)** 500  $\mu$ l des aufbereiteten Rohextraktes wurden über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml; 0,8 ml Fraktionsgröße) aufgetrennt. Die Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 10  $\mu$ l/5 min). **(E) und (F) enzymatischer Verdau:** 200 mg Zellen (Nassgewicht) einer zu Beginn der stationären Phase geernteten *S. pombe*-Flüssigkultur wurden in 1500  $\mu$ l Zellaufschlusspuffer (enzymatischer Verdau) resuspendiert und mit 70  $\mu$ g Zymolyase 100T enzymatisch verdaut. **(E)** Prozentuale Abnahme der OD<sub>600</sub> während des Verdau. Diese errechnet sich aus dem prozentualen Unterschied der OD<sub>600</sub> des Ansatzes mit Enzym gegenüber der Kontrolle ohne Enzym. **(F)** 500  $\mu$ l des aufbereiteten Rohextraktes wurden über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml; 0,8 ml Fraktionsgröße) aufgetrennt. Die Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 10  $\mu$ l/5 min).

Die erste der untersuchten Zellaufschlussmethoden ist der Aufschluss mit der Glaskugelmühle. Hierbei werden die Zellen in Gegenwart von Glaskugeln zermahlen [65]. Die Menge an *S. pombe*-Zellen, die durch diese Methode aufgeschlossen werden konnte, hing von dem Verhältnis von Glaskugeln zur Zellsuspension ab. Die höchste Ausbeute lieferte ein Verhältnis von 9:1. Die Konsistenz dieser Mischung entsprach in etwa der von feuchtem Sand. Nach einer Mahlzeit von fünf Mal einer Minute waren nahezu alle Zellen zerstört, was an dem Verlust des charakteristischen Leuchtens unter dem Phasenkontrastmikroskop zu erkennen war (Abb. 3.2 A). Zusätzliche Experimente mit einem anderen Verhältnis von Glaskugeln zur Zellsuspension haben gezeigt, dass mit einem geringeren Anteil an Glaskugeln, die Effizienz des Aufschlusses sehr stark abnahm und mit einem größeren Anteil an Glaskugel das Gemisch zu trocken war (Daten nicht gezeigt). Für die Abtrennung des Zelllysats von den Glaskugeln wurden verschiedene Methoden untersucht. Die beste Trennung wurde durch Zentrifugation in einem Zentrifugenbecher mit Filter, um die Glaskugeln zurückzuhalten, erreicht. Die Filtration des Glaskugelzelllysatsgemisches mit Unterdruck über eine Glasfilternutsche war ungeeignet, da eine massive Schaumentwicklung auftrat.

Abschließend wurde die Oligomerverteilung von *SpTPPII* im Rohextrakt bestimmt (Abb. 3.2 B). *SpTPPII*-Oligomere eluierten in einem breiten Peak von 8 - 13 ml Elutionsvolumen. Aus EM-Analysen ist bekannt, dass *SpTPPII*-Spindeln bei einem Elutionsvolumen von ca. 8 - 8,5 ml (siehe 3.3.5) eluieren. Bei größeren Elutionsvolumina (9 bis 14 ml) eluieren *SpTPPII*-Bögen und unterschiedlich große *SpTPPII*-Oligomere (siehe 3.3.5). Eine genaue Analyse der Oligomeranteile jeder einzelnen Fraktion wurde nicht durchgeführt, sodass sich das Verhältnis von *SpTPPII*-Spindeln zu kleineren *SpTPPII*-Oligomeren nur abschätzen lässt. Vermutlich war ein großer Teil der Spindeln zerfallen. Da vermutet wurde, dass die Spindeln aufgrund einer reibungsbedingten Temperaturerhöhung während des Mahlvorgangs zerfallen, wurde die Temperatur innerhalb des Zylinders gemessen. Diese stieg jedoch nicht merklich an und betrug über den gesamten Vorgang zwischen 5 °C und 6 °C.

Ein weiteres Gerät, mit dem Hefezellen aufgeschlossen werden können, ist der Zellhomogenisator [66]. Hierbei werden die Zellen unter hohem Druck durch eine kleine Öffnung gepresst und zerplatzen durch die dabei auftretenden Scherkräfte. Die Effizienz des Aufschlusses korrelierte bei dieser Methode mit dem Druck. Bei 15 - 25 kPSI war der Anteil an zerstörten Zellen relativ gering (Daten nicht gezeigt). Mit 25 - 30 kPSI konnte in

etwa die Hälfte der Zellen aufgeschlossen werden (Abb. 3.2 C). Bei diesem Druck war das obere Limit des Gerätes erreicht, sodass der Anteil an aufgeschlossenen Zellen nicht gesteigert werden konnte. Anhand der Oligomerverteilung von *SpTPPII* im Rohextrakt ist zu erkennen, dass der Anteil an kleineren Oligomeren deutlich größer war als der Anteil an Spindeln (Abb. 3.2 D). Das Maximum des Peaks lag bei ca. 10,5 ml Elutionsvolumen. Aufgrund dieses sehr geringen Spindelanteils ist diese Methode ungeeignet um *SpTPPII*-Spindeln zu reinigen. Der einzige Vorteil des Zellhomogenisators bestand somit darin, dass ein relativ großes Zellsuspensionsvolumen in kurzer Zeit verarbeitet werden konnte.

Eine enzymatische Methode um Hefezellen aufzuschließen, ist der Verdau mit Zymolyase aus *Arthrobacter luteus* [67]. Dabei wird die Zellwand verdaut und anschließend zerplatzen die Zellen aufgrund des osmotischen Drucks, der aus dem Ungleichgewicht der Salzkonzentration innerhalb und außerhalb der Zellen resultiert. Die Effizienz des Aufschlusses wurde bei dieser Methode anhand der prozentualen Abnahme der optischen Dichte in Abhängigkeit der Inkubationszeit beurteilt (Abb. 3.2 E). Nach einer Stunde Inkubation betrug die Abnahme 30 %. In den nächsten 60 Minuten wurde eine zusätzliche Abnahme von ca. 10 % gemessen. Da innerhalb der nächsten 60 Minuten keine zusätzliche Abnahme detektiert werden konnte, war die maximale Abnahme somit bereits nach 120 Minuten Inkubation erreicht. Da die Abnahme der OD nicht unmittelbar dem Anteil an lysierten Zellen entspricht, ist die Effizienz der Methode nur abzuschätzen. Die Angaben des Herstellers bezüglich des Verdau von *S. cerevisiae* mit Zymolyase 100T besagen, dass eine prozentuale Abnahme der OD um 60 % dem vollständigen Verdau der Zellen entsprechen. Daher wurden mit dieser Methode innerhalb von 2 Stunden schätzungsweise 60 % der *S. pombe*-Zellen verdaut.

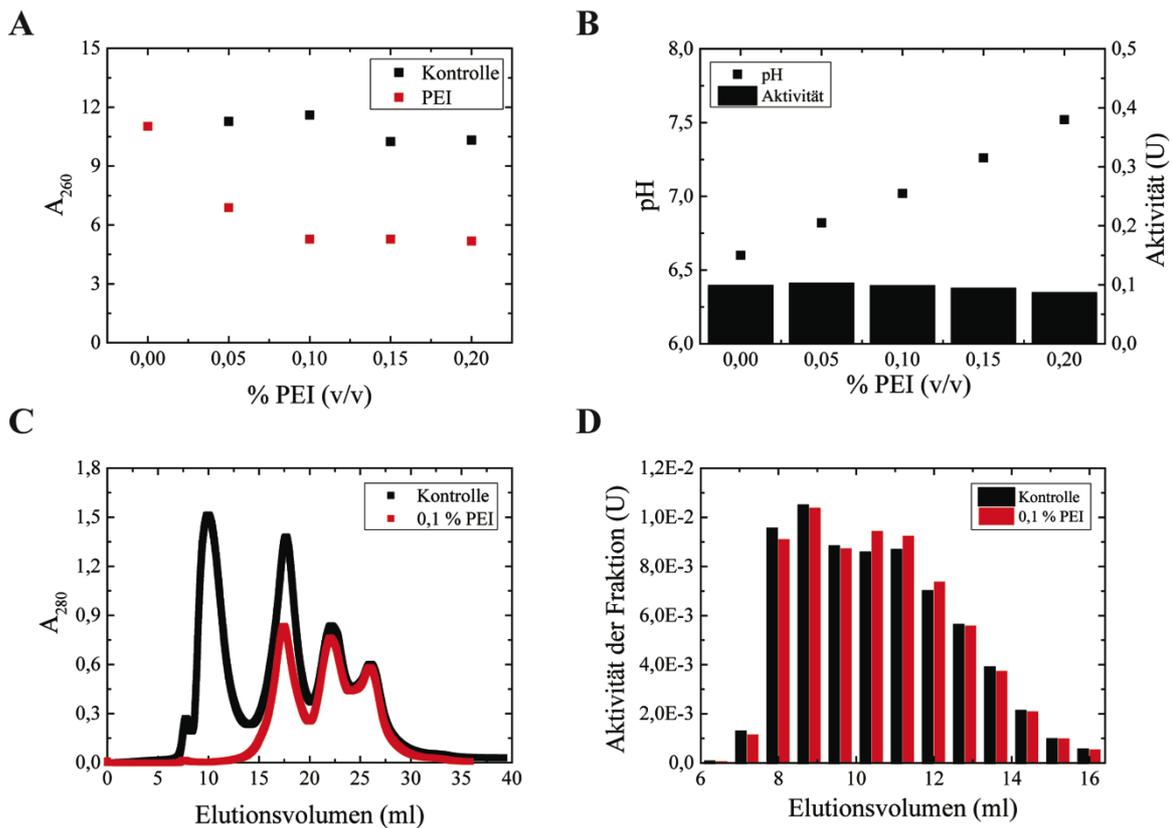
Aus dem Histogramm (Abb. 3.2 F) geht hervor, dass der Hauptteil der *SpTPPII*-Oligomere bei einem niedrigen Elutionsvolumen von 7-8 ml eluierte. Dabei handelte es sich wahrscheinlich hauptsächlich um *SpTPPII*-Spindeln. Der Anteil an kleineren *SpTPPII*-Oligomeren war relativ gering. Damit war der enzymatische Aufschluss die beste der untersuchten Methoden, um intakte Spindeln zu erhalten. Allerdings war eine große Menge Zymolyase pro Zellmasse notwendig um die Zellen zu verdauen. Unter der Annahme, dass 60 % der Zellen verdaut wurden, war 1 µg Enzym in der Lage 2 mg (Nassgewicht) Hefezellen zu verdauen. Das heißt, dass zum Beispiel für einen großen Ansatz mit 100 g Zellen ca. 50 mg Enzym benötigt werden.

Als letztes wurde der Zellaufschluss mit der Ultra-Zentrifugalmühle untersucht. Hier wird eine gefrorene Zellsuspension (Tropfenform) mit Hilfe eines Rotors zu einem Pulver zermahlen. Da sehr wenige Zellen aufgeschlossen wurden, war die Effizienz dieser Methode sehr niedrig (Daten nicht gezeigt). Außerdem entsprach die Verteilung der SpTPPII-Oligomere im Rohextrakt in etwa der Oligomerverteilung des Rohextraktes der Zellen, die mit dem Zellhomogenisator aufgeschlossen wurden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Methode nicht verwendet.

### **3.3 Entwicklung eines Reinigungsprotokolls zur Isolation von SpTPPII-Spindeln aus *Schizosaccharomyces pombe*-Rohextrakt**

#### **3.3.1 PEI-Fällung**

Neben Proteinen machen Nukleinsäuren einen Großteil des Rohextraktes aus. Um Nukleinsäuren abzutrennen, kann eine Fällung mit Polyethylenamin (PEI) durchgeführt werden [68]. Nach der Zugabe von PEI zum Rohextrakt bildete sich ein weißes Präzipitat, welches durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Die PEI-Konzentration, welche notwendig war um einen möglichst großen Anteil an Nukleinsäuren zu fällen, wurde durch die Änderung der Absorption bei 260 nm bestimmt (Abb. 3.3.1 A). Bis zu einer PEI-Konzentration von 0,1 % (v/v) nahm die  $A_{260}$  um maximal die Hälfte des Ausgangswertes ab. Eine weitere Erhöhung der PEI-Konzentration bewirkte keine weitere Abnahme der  $A_{260}$ . Zusätzlich wurde nach jeder Zentrifugation kontrolliert, ob sich ein Pellet im Reaktionsgefäß gebildet hatte. Bis zu einer PEI-Konzentration von 0,1 % (v/v) bildete sich ein Pellet. Nach erneuter Zugabe von 0,05 % PEI zu einer bereits mit 0,1 % PEI-geklärten Lösung, konnte kein Pellet mehr im Reaktionsgefäß detektiert werden. Das spricht dafür, dass bei 0,1 % PEI der maximale Anteil an Nukleinsäuren gefällt wurde.



**Abbildung 3.3.1 PEI-Präzipitation zur Fällung von Nukleinsäuren aus dem Rohextrakt**

Zelltrümmer und Membranen eines *S. pombe*-Rohextrakts (Zellaufschluss mit Glaskugelmühle) wurden durch Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Anschließend wurde der Lösung 0,05 % PEI (v/v) zugesetzt, diese 5 Minuten auf Eis inkubiert und das Präzipitat durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde dekantiert. Die Absorption, der pH-Wert und die Aktivität (Aktivitätsassaymischung; 5  $\mu$ l/1 min) des Überstands wurden bestimmt. Anschließend wurde weiter in 0,05 %-Schritten bis 0,2 % PEI hinzugefügt und die Fällung wiederholt. (A) Änderung der Absorption bei 260 nm in Abhängigkeit der PEI-Konzentration. (B) pH-Wert und Aktivität des Überstands in Abhängigkeit der PEI-Konzentration. (C) 300  $\mu$ l aufbereitetes Rohextrakt wurden einer PEI-Fällung mit 0,1 % PEI unterzogen und anschließend über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml) aufgetrennt. Fraktionen mit einem Volumen von 0,8 ml wurden aufgefangen. Zur Kontrolle wurden 300  $\mu$ l aufbereitetes Rohextrakt ohne PEI-Fällung aufgetrennt. (D) Die Aktivität der Fraktionen aus (C) wurde mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (10  $\mu$ l/5 min).

Da PEI den pH-Wert der Lösung beeinflusst, und die Stabilität von *Sp*TPPII pH-abhängig ist, wurde der pH-Wert und die *Sp*TPPII-Aktivität des Zellysats nach der PEI-Zugabe gemessen (Abb. 3.3.1 B). Der pH-Wert stieg linear mit der PEI-Konzentration an. Bei 0,1 % PEI (v/v), betrug er pH 7,0. In diesem Bereich liegt das pH-Optimum von *Sp*TPPII (siehe 3.4.3), sodass 0,1 % PEI unbedenklich in puncto pH-Änderung waren. Die Aktivität von *Sp*TPPII blieb bis zu einer PEI-Konzentration von 0,1 % konstant und nahm anschließend mit zunehmender PEI-Konzentration leicht ab. Somit konnte eine Konzentration von 0,1 % PEI verwendet werden, ohne dass sich die Aktivität von *Sp*TPPII änderte.

Um den Reinigungseffekt der PEI-Fällung zu zeigen, wurde PEI-geklärtes Rohextrakt über eine Superose 6 chromatographiert (Abb. 3.3.1 C). Zur Kontrolle wurde die äquivalente Menge an Rohextrakt aufgetragen. Der Vergleich der beiden Chromatogramme zeigt, dass

der Peak bei 10 ml Elutionsvolumen im PEI-geklärten Rohextrakt vollständig fehlt. Die Intensität des zweiten Peaks (17,5 ml) ist in etwa um ein Drittel reduziert. Nukleinsäuren eluierten somit hauptsächlich in einem Volumen, in dem auch *SpTPPII* eluierte (Abb. 3.3.1 D). Da die Nukleinsäuren in diesem Elutionsvolumen durch die PEI-Fällung nahezu vollständig abgetrennt werden konnten, hatte die PEI-Fällung in Bezug auf die Reinigung von *SpTPPII* einen sehr großen Nutzen.

Abschließend wurde untersucht, wie sich die PEI-Fällung auf die Größenverteilung der *SpTPPII*-Oligomere auswirkte. Dafür wurde die Aktivität der einzelnen Fraktionen der Chromatographie, welche in Abbildung 3.3.1 C dargestellt ist, bestimmt (Abb. 3.3.1 D). Die Aktivitäten waren nahezu identisch. Daher hatte die PEI-Fällung nahezu keinen Einfluss auf die Verteilung der Oligomere.

Zusammenfassend haben die Experimente ergeben, dass die PEI-Fällung mit 0,1 % (v/v) PEI eine geeignete Methode ist, um Nukleinsäuren aus *S. pombe*-Rohextrakt abzutrennen. Um einen Anhaltspunkt für die notwendige PEI-Konzentration zur Fällung von Nukleinsäuren eines beliebigen Rohextraktes zu haben, wurde aus der  $A_{260}$  des vorliegenden Rohextraktes und der hier bestimmten Konzentration von PEI, welche notwendig war um die Nukleinsäuren zu fällen, eine Gleichung (Gl. 3.1) aufgestellt. Mit dieser kann für jedes Rohextrakt berechnet werden, wie viel Prozent PEI für die PEI-Fällung eingesetzt werden muss.

$$[PEI] (\%) = A_{260} * 0,01 \qquad \text{Gleichung 3.1}$$

### 3.3.2 Ionenaustauscherchromatographie

Die Trennung eines Proteins von den restlichen zellulären Bestandteilen im Rohextrakt, kann aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften erfolgen. Dafür existieren unterschiedliche Säulenmaterialien (stationäre Phase), welche in unterschiedlicher Art und Weise, aufgrund ihrer funktionellen Gruppen, mit den Proteinen interagieren. Um zu testen welche Säulen sich für die Reinigung von *SpTPPII* eignen, wurden verschiedene Säulentypen untersucht. Die Ergebnisse der Experimente sind in Tabelle 3.3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.3.1 Evaluierung der Säulenmaterialien für die *SpTPPII*-Reinigung

| Säulenmaterial | Puffer                           | Bindung | Elution |
|----------------|----------------------------------|---------|---------|
| ANX            | 50 mM KPO <sub>4</sub><br>pH 7,5 | ++      | ++      |
| SP             | 80 mM KPO <sub>4</sub><br>pH 6,5 | --      | n.b.    |
| SP             | 80 mM KPO <sub>4</sub><br>pH 6,0 | -       | n.b.    |
| CaptoMMC       | 50 mM MES<br>pH 6,0              | --      | n.b.    |
| CaptoMMC       | 50 mM MES<br>pH 6,0<br>1 M AS    | ++      | +       |

Für alle Säulen (HiTrap, CV: 1 ml) wurde Zelllysate verwendet das von Zellen stammt, die mittels Glaskugelmühle aufgeschlossen wurden. Alle Chromatographiepuffer enthielten zusätzlich 1 mM DTT und 5 % Glycerin. Die Aktivität des Lysats, des Durchflusses und der Waschfraktion wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 5 µl/2 min). Gebundene Biomoleküle wurden mit Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde in 0,2 ml-Fractionen aufgefangen und anschließend deren Aktivität bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 5 µl/1 min). Legende zur Bewertung der Bindung an die Säule: ++ bindet komplett; + bindet zum größten Teil; - mäßige Bindung; -- keine Bindung. Legende zur Bewertung der Elution: ++ kleines Elutionsvolumen der Fraktionen mit Aktivität; + großes Elutionsvolumen der Fraktionen mit Aktivität; n.b. nicht bestimmt, da keine ausreichende Bindung an die Säule.

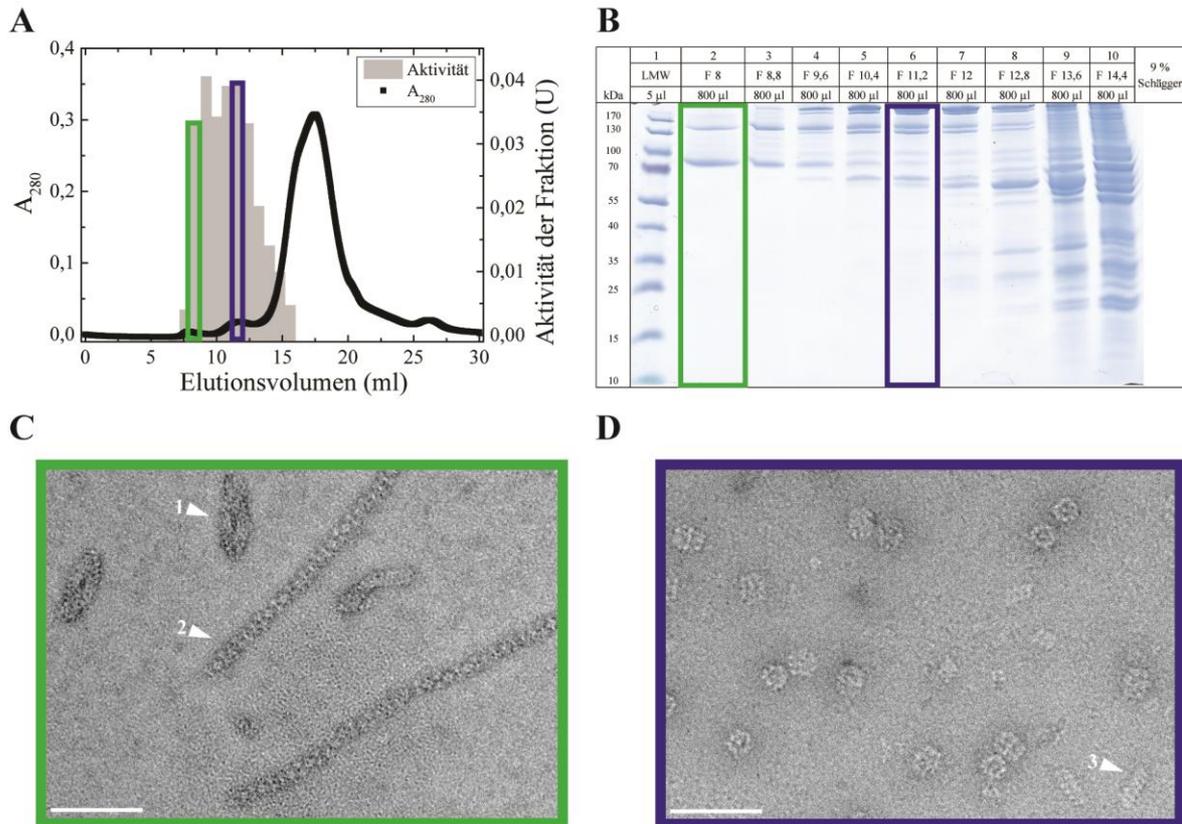
Am besten eignete sich der Anionenaustauscher ANX zur Reinigung von *SpTPPII*. *SpTPPII* konnte vollständig an die Säule gebunden und in einem relativ kleinen Volumen von 0,7 ml eluiert werden. Dadurch konnten Verunreinigungen abgetrennt und *SpTPPII* gleichzeitig konzentriert werden. Aus dem Bindeverhalten von *SpTPPII* bei pH 7,5 an die ANX-Säule lässt sich weiterhin ableiten, dass das Protein bei diesem pH eine negative Nettoladung besitzt. Damit *SpTPPII* an den Kationenaustauscher SP bindet, muss es eine positive Nettoladung besitzen. Um dies zu erreichen, wurde der pH des Rohextraktes auf

pH 6,5, beziehungsweise pH 6,0, gesenkt. Unter beiden pH-Bedingungen war es nicht möglich *SpTPPII* an die SP-Säule zu binden. Das deutet darauf hin, dass *SpTPPII* selbst bei pH 6,0 wahrscheinlich noch immer negativ geladen war. Wenn davon ausgegangen wird, dass über beide Säulen (ANX und SP) jeweils die Verunreinigungen mit einer entgegengesetzten Ladung von *SpTPPII* abgetrennt wurden, ist der Reinigungseffekt beider Säulen in etwa gleich groß. Da *SpTPPII* jedoch über die ANX-Säule konzentriert werden konnte wurde die ANX-Säule verwendet.

Um zu untersuchen, ob das mangelnde Bindevermögen von *SpTPPII* an das Säulenmaterial der SP-Säule möglicherweise durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen verbessert werden kann, wurde eine CaptoMMC-Säule verwendet. Aufgrund des multimodalen Liganden des Säulenmaterials wird eine unterschiedliche Bindeselektivität im Vergleich zu herkömmlichen Ionenaustauschern wie der SP-Säule, erreicht. Wie aus Tabelle 3.3.1 zu entnehmen ist, war es jedoch auch nicht möglich, *SpTPPII* bei pH 6,0 an die Säule zu binden. Um die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Säulenmaterial der CaptoMMC-Säule und *SpTPPII* zu verstärken, wurde die Salzkonzentration im Puffer auf 1 M Ammoniumsulfat erhöht und die Chromatographie wiederholt. Unter diesen Bedingungen konnte *SpTPPII* vollständig an das Säulenmaterial gebunden werden. Die Elution von *SpTPPII* mit einem Gradienten mit sinkender Salzkonzentration stellte sich jedoch als schwierig heraus. Es war nicht möglich die eingesetzte Menge an *SpTPPII* komplett von der Säule zu eluieren. Eventuell wurden hydrophobe Teile des Proteins exponiert, die dann sehr starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial ausbildeten. Diese starken Wechselwirkungen spiegelten sich auch im Elutionsverhalten von *SpTPPII* wider. Die Protease eluierte in einem Volumen von 1,5 ml. Dieses war ca. doppelt so groß wie das Elutionsvolumen der ANX-Säule. Mit der Capto-MMC-Säule konnte *SpTPPII* deshalb nicht so effizient konzentriert werden, wie dies mit der ANX-Säule möglich war. Da im Anschluss an den Reinigungsschritt über einen Ionenaustauscher jedoch eine Größenausschlusschromatographie erfolgen soll, ist ein kleines Elutionsvolumen von Vorteil. Daher wurde die Anionenaustauscherchromatographie über eine ANX-Säule für die Reinigung von *SpTPPII* verwendet.

### 3.3.3 Untersuchung der Reinigung von *Sp*TPPII in drei Schritten

Anhand der bisherigen Erkenntnisse wurde eine Reinigung für *Sp*TPPII-Spindeln durchgeführt. Dafür wurde Rohextrakt von *S. pombe*-Zellen verwendet, die mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen worden waren. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit 0,1 % PEI gefällt und der Überstand über eine ANX-Säule chromatographiert. Das ANX-Eluat wurde danach über eine Superose 6-Säule aufgetrennt (Abb. 3.3.2 A). Um zu erkennen, in welcher der Fraktionen sich *Sp*TPPII befand, wurde die Aktivität bestimmt.



**Abbildung 3.3.2** Reinigung von *Sp*TPPII-Spindeln in drei Schritten

*S. pombe*-Zellen wurden mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen. 2 ml des Zelllysats wurden mit 0,1 % PEI versetzt und eine PEI-Fällung wurde durchgeführt. Der Überstand wurde über eine HiTrap ANX (CV: 1 ml, 0,2 ml-Fractionen) gereinigt. Die Aktivität der ANX-Fractionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 4 µl/0,5 min) und die Fractionen von 0,8 bis 1,4 ml wurden vereinigt. Diese wurden über eine Superose 6 (CV: 24 ml; 0,8 ml Fraktionsgröße) chromatographiert. Die Aktivität der Fractionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 5 µl/5 min) (A) Chromatogramm der SEC und Aktivität der Fractionen. (B) Coomassie-gefärbtes 9%-iges Tris/Tricin-Polyacrylamidgel. Die Bestandteile der Fractionen von 8 bis 15,2 ml wurden mit TCA gefällt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fractionen wurden nach ihrem Anfangselutionsvolumen benannt (z.B. F8 = 8 – 8,8 ml). (C) und (D): Elektronenmikroskopische Aufnahme von negativ kontrastierten Bestandteilen von (C) F 8 (8 - 8,8 ml) und (D) F 11,2 (11,2 - 12 ml). Maßstabsbalken: 100 nm. Pfeile: (1) *Sp*TPPII-Spindel, (2) PFK, (3) großes *Sp*TPPII Oligomer.

Wie anhand der Aktivität der SEC-Fractionen zu erkennen ist, eluierte *Sp*TPPII in einem Volumen von 6,4 bis 15,6 ml in Form eines Doppelpeaks (Maxima: 8,8 und 11,2 ml). Die Verteilung der *Sp*TPPII-Oligomere deckt sich in etwa mit der gemessenen Verteilung im Rohextrakt aus 3.2. In dem Bereich von 6,4 - 15,6 ml eluierten sonst relativ wenige

Proteine, was an der niedrigen Absorption bei 280 nm zu erkennen ist. Der Hauptteil des absorbierenden Materials eluierte bei einem Volumen von 17,5 ml. Das bedeutet, dass mit Hilfe der Superose 6-Säule ein Großteil der Verunreinigungen abgetrennt werden konnte. Um genauer zu überprüfen wie hoch der Anteil an Verunreinigungen in den Fraktionen mit *Sp*TPPII-Aktivität war, wurden diese auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (Abb. 3.3.2 B). Auf dem Gel ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Elutionsvolumen der Anteil an Zellproteinen zunimmt. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Verlauf der Absorption bei 280 nm, welche ebenfalls zunimmt. *Sp*TPPII hat laut der Datenbank GeneDB eine von der Gensequenz abgeleitete Molekülmasse von 142,9 kDa. In der grün markierten Fraktion (Bahn 2) ist neben der *Sp*TPPII-Bande (zwischen 130 und 170 kDa) eine weitere Bande, vermutlich eine Verunreinigung, zwischen 70 und 100 kDa zu sehen.

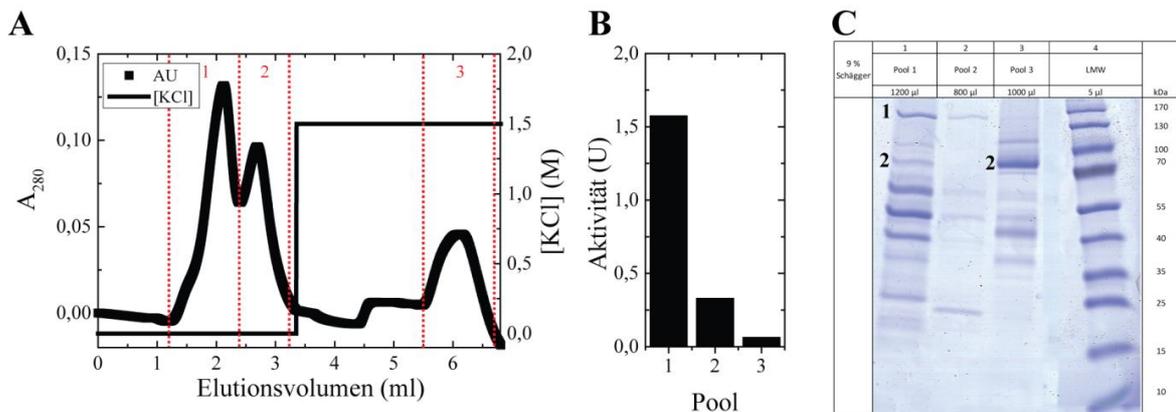
Um zu sehen, in welchem Oligomerzustand *Sp*TPPII aus dieser Fraktion (grün) vorlag und ob es sich bei der zweiten Bande im Gel wirklich um eine Verunreinigung handelte, wurden die Partikel der Fraktion mit dem Elektronenmikroskop abgebildet (Abb. 3.3.2 C). Auf den Aufnahmen ist zu sehen, dass *Sp*TPPII als Spindel vorlag. Die Spindeln haben eine Länge von ca. 85 nm (Abb. 3.3.2 C, 1). Zusätzlich befanden sich Stränge mit unterschiedlicher Länge und einem Durchmesser von 20 nm in dieser Fraktion. Höchstwahrscheinlich handelt es sich dabei um die Verunreinigung, die bereits auf dem Gel zu sehen war. Um diese zu identifizieren, wurde das Protein aus der Gelbande (Abb. 3.3.2 B; Bahn 2 zwischen 70 und 100 kDa) massenspektroskopisch analysiert. Die Analyse ergab, dass es sich dabei um 6-Phosphofruktokinase (PFK) handelte (Sequenzabdeckung 72,4 %; Daten nicht gezeigt). Diese Vermutung konnte dadurch bestätigt werden, dass die Quartärstruktur von PFK aus *S. pombe* mit den Strukturen aus Abbildung 3.3.2 C übereinstimmt [69]. PFK hat eine Molekülmasse von 100 kDa, was nahezu dem apparenten Wert der Verunreinigung auf dem Gel entspricht (Abb. 3.3.2 B).

Da die SEC-Fraktionen mit *Sp*TPPII-Aktivität über ein großes Elutionsvolumen verteilt waren (Abb. 3.3.2 A), lag *Sp*TPPII wahrscheinlich nicht nur als Spindel vor. Um dies zu überprüfen, wurde die Fraktion F11,2 (Abb. 3.3.2 A, blaue Markierung) im Elektronenmikroskop untersucht. Neben nicht identifizierten Verunreinigungen, waren kleinere *Sp*TPPII-Oligomere in der Fraktion enthalten (Abb. 3.3.2 D; 3). *Sp*TPPII lag somit im Rohextrakt nicht nur als Spindel vor, sondern auch in Form von kleineren Oligomeren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Reinigung von Spindeln über drei Schritte bereits ein sehr gutes Resultat lieferte. Bis auf die Verunreinigung durch PFK war die Fraktion F8 mit den *SpTPPII*-Spindeln rein.

### 3.3.4 Bindung von PFK an Cibacron Blue

In Reuter *et al.* [70] wird die Reinigung von PFK aus *S. pombe* über eine Affinitätschromatographie beschrieben. PFK bindet demnach spezifisch an den Farbstoff Cibacron-Blue F3-GA. Um zu überprüfen, ob sich dieser Schritt zur Abtrennung der PFK von *SpTPPII* eignet, wurde eine Affinitätschromatographie mit Rohextrakt durchgeführt, der bereits durch PEI-Fällung und über eine ANX-Chromatographie gereinigt worden war (Abb. 3.3.3, A).



**Abbildung 3.3.3 Abtrennung von PFK über Affinitätschromatographie an Cibacron Blue**

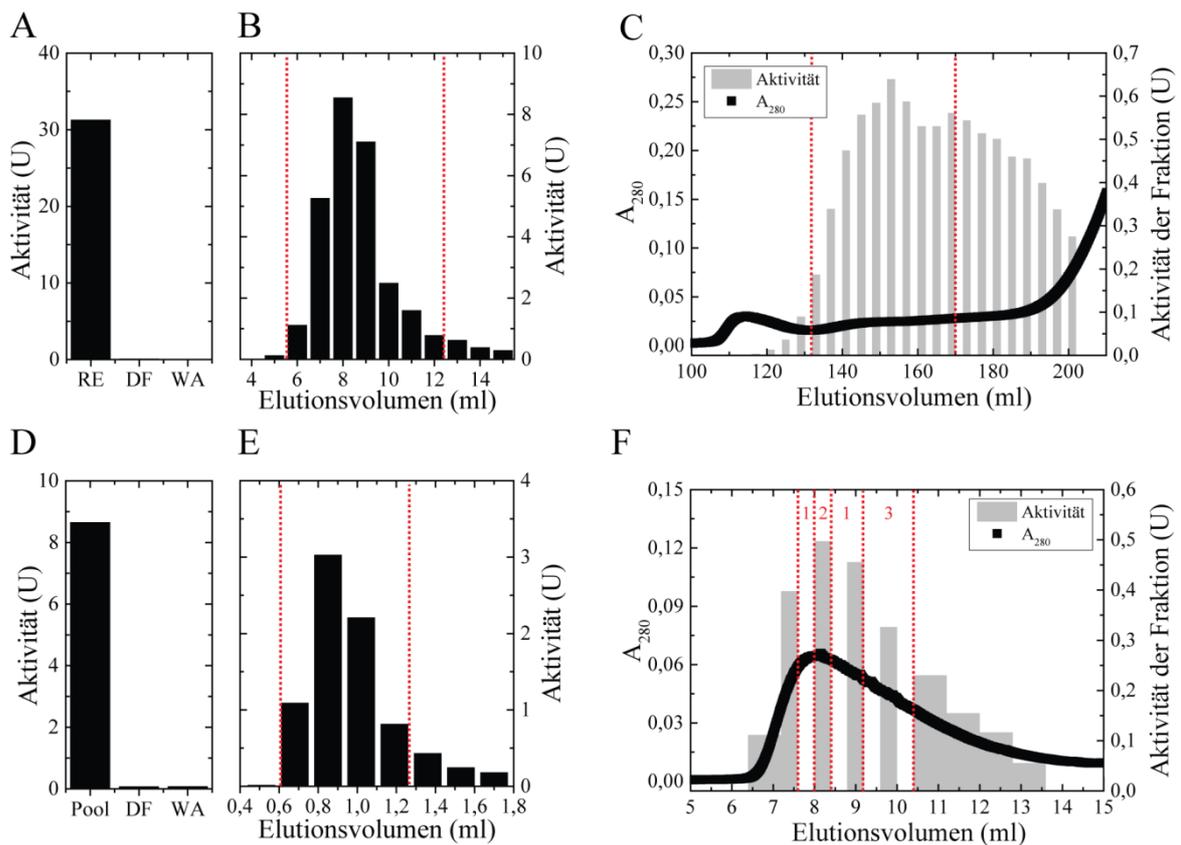
*S. pombe*-Zellen wurden mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen. 2 ml Zelllysate wurden mit 0,1 % PEI versetzt und eine PEI-Fällung wurde durchgeführt. Der Überstand wurde über eine HiTrap ANX (CV: 1 ml, 0,25 ml-Fractionen) gereinigt. Die Aktivität der ANX-Fractionen wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 2 µl/0,5 min) und die Fractionen von 0,8 bis 1,4 ml wurden vereinigt. (A) Die vereinigten Fractionen wurden mit einer HPLC auf eine HiTrap Blue HP-Säule (CV: 1 ml; Auftrag: 0,1 ml min<sup>-1</sup>; Elution: 0,5 ml min<sup>-1</sup>) aufgetragen. Der Durchfluss und das Eluat wurden nach ihrer Absorption bei 280 nm in drei Pools aufgeteilt. Pool 1: 1,2 - 2,4 ml; Pool 2: 2,4 - 3,2 ml; Pool 3: 5,5 - 6,7 ml. (B) Die Aktivität der Pools wurde bestimmt (Aktivitätsassaymischung; 5 µl/5 min). (C) Coomassie-gefärbtes 9%-iges Tris/Tricin-Polyacrylamidgel. Pools 1 - 3 wurden einer TCA-Fällung unterzogen und über SDS-PAGE analysiert (siehe 2.2.4.2.3). Nummerierung der Banden: (1) *SpTPPII*; (2) PFK.

Dem Chromatogramm zufolge bindet der Hauptteil des Materials nicht an die Säule. Es wurden zwei Peaks im Eluat erhalten. Sie wurden getrennt voneinander gesammelt (Pool 1 und 2). Anschließend wurde gebundenes Material mit Kaliumchlorid von der „blauen Säule“ eluiert (Pool 3). Die Messung der *SpTPPII*-Aktivität in den Pools (Abb. 3.3.3 B) hatte ergeben, dass sich *SpTPPII* im Durchfluss befand und nur ein kleiner Teil an die Säule gebunden hatte. Um zu sehen, ob PFK von *SpTPPII* abgetrennt werden konnte, wurden alle drei Pools auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer

Gelelektrophorese unterzogen (Abb. 3.3.3 C). *SpTPPII* befand sich ausschließlich im Durchfluss der Chromatographie (Bahn 1 und 2), was sich auch in den Aktivitätsmessungen widerspiegelte (Abb. 3.3.3 B). Da der Hauptteil der PFK an die Säule gebunden hatte (Abb. 3.3.3 C, Bahn 3), konnte diese Verunreinigung somit fast vollständig von *SpTPPII* abgetrennt werden. Mit einem ausreichend großen Säulenvolumen ist es wahrscheinlich möglich, PFK vollständig von *SpTPPII* abzutrennen. Die „blaue Säule“ wurde daher als Reinigungsschritt in das Reinigungsprotokoll von *SpTPPII*-Spindeln integriert. Um Zeit zu sparen, wurde die „blaue Säule“ direkt mit der ANX-Säule verbunden, sodass Material, das nicht an die Säule gebunden hatte (z.B. *SpTPPII*), direkt über die ANX-Säule fließen konnte. Nach dem Auftrag wurden die Säulen voneinander getrennt und separat eluiert.

### **3.3.5 Reinigung von *SpTPPII*-Spindeln in fünf Schritten**

Nachdem die einzelnen Reinigungsschritte, die zur Reinigung von *SpTPPII*-Spindeln geeignet sind, etabliert worden waren, wurde eine Reinigung von *SpTPPII* aus Rohextrakt durchgeführt. Dafür wurden 100 g Zellen (Nassgewicht) mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen und *SpTPPII*-Spindeln in fünf Schritten gereinigt (Abb. 3.3.4). Nach jedem Reinigungsschritt wurden Aktivität und Proteinmenge bestimmt (Tabelle 3.3.2). In Bezug auf die Aktivität des Rohextraktes (100 %) wurde für jeden Schritt die prozentuale Ausbeute bestimmt (Tabelle 3.3.2, Spalte 4).



#### Abbildung 3.3.4 Reinigung von *SpTPPII*-Spindeln

100 g *S. pombe*-Zellen wurden mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen. 112 ml des Zelllysats wurden mit 0,1 % PEI (v/v) versetzt und eine PEI-Fällung wurde durchgeführt. **(A) und (B):** Der Überstand wurde über eine Blue Sepharose CL-6B (CV: 24 ml) und anschließend auf zwei HiTrap ANX (CV: 5 ml) aufgetragen (Fluss: 1 ml min<sup>-1</sup>). Die ANX-Säulen wurden mit 50 ml ANX-Bindepuffer gewaschen. **(A)** Die Aktivität des Rohextrakts (RE), des Durchflusses (DF) und der Waschfraktion (WA) wurden mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (2 µl/1 min). **(B)** Die Elution von den ANX-Säulen erfolgte mit 300 mM AS ANX-Elutionspuffer über 3 CV. Die Aktivität der 1 ml-Fractionen wurde mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (0,5 µl/0,5 min). Die Fractionen von 6 - 13 ml wurden vereint (innerhalb der gestrichelten Linien). **(C)** Die vereinigten Fractionen wurden mit einer HPLC über eine Superose 6-Säule (CV: 320 ml; Fluss: 1 ml min<sup>-1</sup>) chromatographiert. 2 ml-Fractionen wurden von 110 bis 204 ml Elutionsvolumen aufgefangen und die Aktivität mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (2 µl/2 min). Die Fractionen von 132 - 170 ml wurden vereint (innerhalb der rot gestrichelten Linien). **(D) und (E):** Der SEC-Pool wurde über eine HiTrap Blue HP (CV: 1 ml) und anschließend über eine HiTrap ANX (CV: 1 ml) gereinigt (Fluss: 1 ml min<sup>-1</sup>). Die ANX-Säule wurde mit 6 ml ANX-Bindepuffer gewaschen. **(D)** Die Aktivität des SEC-Pools (Pool), des Durchflusses (DF) und der Waschfraktion (WA) wurde mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (2 µl/1 min). **(E)** Die Elution von der ANX-Säule erfolgte mit 300 mM AS ANX-Elutionspuffer über 2 CV. Die Aktivität der 170 µl-Fractionen wurde mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (0,5 µl/0,25 min). Die Fractionen von 0,6 - 1,28 ml wurden vereint (innerhalb der rot gestrichelten Linien). **(F)** Die vereinigten Fractionen wurden mit einer HPLC über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml; Fluss: 0,4 ml min<sup>-1</sup>) chromatographiert. 0,4 ml-Fractionen wurden von 6,4 bis 13,6 ml Elutionsvolumen aufgefangen und die Aktivität mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (1 µl/1 min). Die Fractionen mit höchster Aktivität und  $A_{280}$  wurden nach folgendem Schema vereint: Pool 1: 7,6 - 8 ml und 8,4 - 9,2 ml; Pool 2: 8 - 8,4 ml; Pool 3: 9,2 - 10,4 ml (siehe rot gestrichelte Bereiche).

Im ersten Schritt wurden Nukleinsäuren mittels PEI-Fällung (0,1 % v/v) abgetrennt. Der Aktivitätsverlust betrug 17 %. Der Überstand wurde danach auf eine „blaue Säule“ (CV: 24 ml) und anschließend auf eine ANX-Säule (CV: 10 ml) aufgetragen. Wie anhand des Histogramms (Abb. 3.3.4 A) zu erkennen ist, konnte *SpTPPII* komplett an diese Säule gebunden werden. Die Elution erfolgte durch ANX-Elutionspuffer mit 300 mM Ammoniumsulfat (Abb. 3.3.4 B). Um das Volumen so klein wie möglich zu halten,

wurden nur Fraktionen mit einer Aktivität größer als 0,75 U vereinigt. Der Aktivitätsverlust dieses Reinigungsschrittes betrug in Bezug auf die Aktivität des PEI-Überstands, 11 %. Die Moleküle der vereinigten Fraktionen des ANX-Eluates (1<sup>st</sup> ANX-Pool) wurden über eine Superose 6-Säule mit einem Säulenvolumen von 320 ml aufgetrennt (Abb. 3.3.4 C). Wie anhand der Aktivität der Fraktionen zu erkennen ist, eluierte *Sp*TPPII in einem Volumen von 120 bis mindestens 202 ml in Form eines Doppelpeaks (Maxima: 153 ml und 169 ml). Aus den Ergebnissen der ersten Reinigung (3.3.3) war bekannt, dass es sich bei dem Material, das bei einem kleineren Volumen eluierte (Peak 1), aller Wahrscheinlichkeit nach um *Sp*TPPII-Spindeln handelte. Daher wurden nur die Fraktionen des ersten Peaks von 132 ml bis zu einem Volumen von 170 ml vereinigt (1<sup>st</sup> SEC-Pool). Der Rest wurde verworfen, was zu einem prozentualen Aktivitätsverlust von 49 % führte. Da das Volumen des SEC-Pools mit 42 ml sehr groß war, sollte es durch den folgenden Reinigungsschritt reduziert werden. Dafür wurde der Pool zuerst auf eine „blaue Säule“ (CV: 1 ml) und im direkten Anschluss auf eine ANX-Säule (CV: 1 ml) aufgetragen. Die Messung der Aktivität zeigte, dass *Sp*TPPII nahezu komplett an die ANX-Säule gebunden hatte (Abb. 3.3.4 D). Das Eluat wurde fraktioniert, und erneut wurden nur die Fraktionen mit einer Aktivität größer als 0,75 U vereinigt (Abb. 3.3.4 E). Das Volumen des SEC-Pools konnte durch diesen Reinigungsschritt um das 60-fache reduziert werden. Zusätzlich konnten letzte Reste der PFK von *Sp*TPPII abgetrennt werden (Abb. 3.3.5, Bahn 7). Der Aktivitätsverlust bei diesem Schritt betrug 3 %. Um die verschiedenen *Sp*TPPII-Oligomere voneinander zu trennen und eine möglichst hohe Reinheit zu erreichen wurde der Pool der ANX (2<sup>nd</sup> ANX-Pool) erneut über eine Superose 6-Säule (CV: 24 ml) aufgetrennt und fraktioniert (Abb. 3.3.4 F). Die Aktivität der Fraktionen wurde bestimmt und dazu verwendet, unterschiedliche Pools zu bilden. Pool 2 (8 - 8,4 ml) bestand aus der Fraktion mit der höchsten Aktivität und der höchsten Absorption bei 280 nm. Pool 1 bestand aus den flankierenden Fraktionen von Pool 2 (7,6 - 8 und 8,4 - 9,2 ml). Pool 3 setzte sich aus den drei Fraktionen von 9,2 - 10,4 ml Elutionsvolumen zusammen. Die Addition der prozentualen Aktivitäten der drei Pools (Tabelle 3.3.2) ergibt eine Gesamtaktivität von 6 % der Ausgangsaktivität. Dies ist für eine Reinigung von TPPII aus nativer Quelle eine typische Ausbeute (J. Peters, unveröffentlichte Daten).

Tabelle 3.3.2 Aktivitätsausbeute der *Sp*TPPII-Reinigung

|                            | Volumen (ml) | Aktivität (U) | Aktivität (%) | spez. Aktivität (U/mg) |
|----------------------------|--------------|---------------|---------------|------------------------|
| Rohextrakt                 | 112,0        | 37,52         | 100           | 0,0163                 |
| PEI-Überstand              | 110,0        | 31,24         | 83            | 0,0161                 |
| 1 <sup>st</sup> ANX-Pool   | 7,0          | 27,13         | 72            | 0,1206                 |
| 1 <sup>st</sup> SEC-Pool   | 42,0         | 8,64          | 23            | 8,2300                 |
| 2 <sup>nd</sup> ANX        | 0,7          | 7,68          | 20            | 16,8346                |
| 2 <sup>nd</sup> SEC-Pool 1 | 1,2          | 1,05          | 3             | n.b.                   |
| 2 <sup>nd</sup> SEC-Pool 2 | 0,4          | 0,50          | 1             | 69,1667                |
| 2 <sup>nd</sup> SEC-Pool 3 | 1,2          | 0,72          | 2             | n.b.                   |

Nach jedem Reinigungsschritt wurde die Aktivität mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (Rohextrakt: 2 µl/1 min; PEI-Überstand: 2 µl/1 min; 1<sup>st</sup> ANX-Pool: 0,5 µl/0,5 min; 1<sup>st</sup> SEC-Pool: 2 µl/2 min; 2<sup>nd</sup> ANX-Pool: 0,5 µl/0,25 min; 2<sup>nd</sup> SEC-Pool 1: 1 µl/1 min; 2<sup>nd</sup> SEC-Pool 2: 1 µl/1 min; 2<sup>nd</sup> SEC-Pool 3: 1 µl/1 min). Die Aktivität des Rohextraktes wurde als maximale Ausbeute (100 %) definiert, und die Aktivitäten der folgenden Reinigungsschritte wurden darauf bezogen. Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt und aus der Aktivität und der Proteinmenge jeder Probe deren spezifische Aktivität berechnet.

Um die Effizienz jedes Reinigungsschrittes zu überprüfen, wurde jeweils ein Aliquot entnommen, das anschließend über SDS-PAGE analysiert wurde (Abb. 3.3.5).

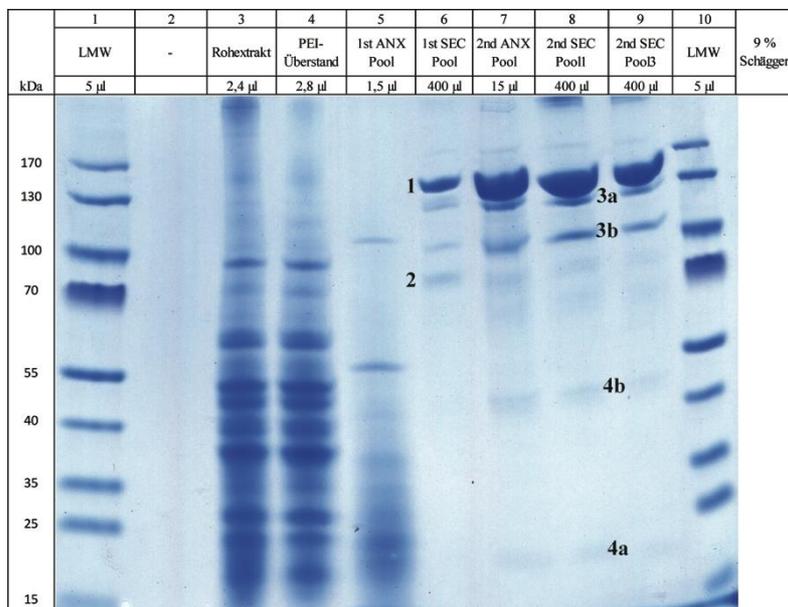
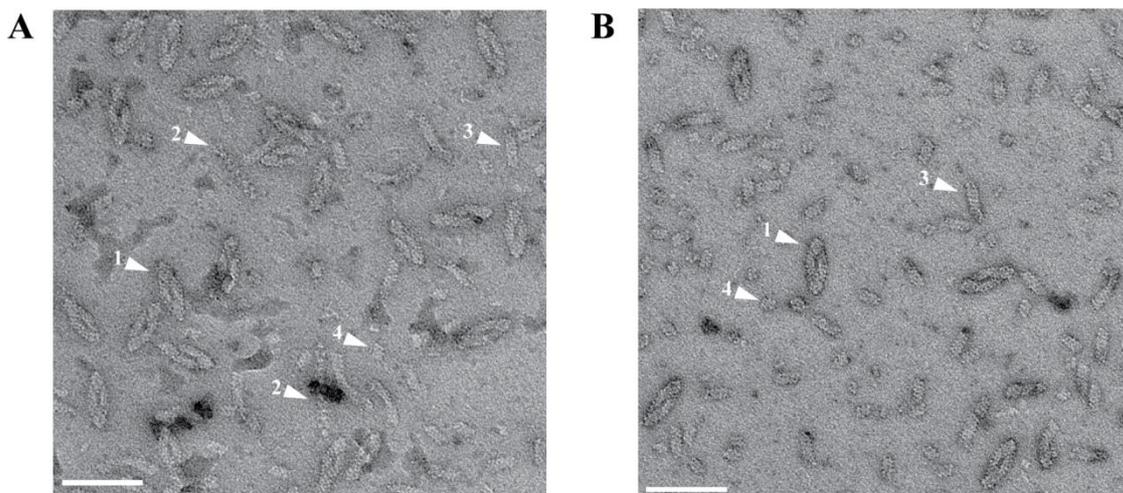


Abbildung 3.3.5 Coomassie-gefärbtes 9%-iges Tris/Tricin-Polyacrylamidgel

Aliquots von jedem Reinigungsschritt (siehe Tabelle 3.3.2) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Dafür wurde auf die Bahnen 3 und 4 50 µg und auf die Bahnen 5 - 9 10 µg Proteinmenge aufgetragen. Die Proteine der Aliquots wurden wenn nötig mit TCA gefällt. Nummerierung der Banden: (1) *Sp*TPPII (2) PFK (3a und b) *Sp*TPPII gespalten (4a und b) korrespondierende Spaltprodukte.

Anhand des Bandenmusters und der Zunahme der spezifischen Aktivität (Tabelle 3.3.2) ist zu erkennen, dass durch jeden Reinigungsschritt eine Anreicherung von *Sp*TPPII (Abb. 3.3.5 Bande 1) erreicht wurde. So wurden durch die ersten drei Schritte fast alle anderen Proteine von *Sp*TPPII abgetrennt (vgl. Bahn 3 und 6). Neben der *Sp*TPPII-Bande enthielt der 1<sup>st</sup> SEC-Pool geringe Mengen an PFK. Diese konnten durch die zweite „blaue Säule“ nahezu vollständig von *Sp*TPPII abgetrennt werden (vgl. Bahn 6 und 7). Am Ende der Reinigung (Bahn 8 und 9) konnten keine weiteren Verunreinigungen neben *Sp*TPPII im Gel detektiert werden. Bei den Banden 3a und 3b handelte es sich, da diese in Bahn 7, 8 und 9 mit der gleichen Intensität vorkommen, aller Wahrscheinlichkeit nach um partiell proteolysiertes *Sp*TPPII. Die korrespondierenden Spaltprodukte sind ebenfalls zu erkennen (Bande 4a und 4b). In den EM-Aufnahmen von Pool 2 und 3 (Abb. 3.3.6) waren neben *Sp*TPPII und PFK keine Molekülkomplexe zu erkennen. Da es außerdem unwahrscheinlich ist, dass in dem Elutionsvolumen von Pool 2 und 3 kleine Moleküle eluierten, die im EM nicht sichtbar sind, wurden die Gelbanden nicht weiter analysiert und als Spaltprodukte angenommen.



**Abbildung 3.3.6 EM-Aufnahme von Pool 2 und Pool 3**

Die Bestandteile von Pool 2 und Pool 3 (Abb. 3.3.4 F) wurden untersucht. Dafür wurden je 5  $\mu$ l mit Uranylacetat kontrastiert und im Elektronenmikroskop betrachtet. Die Aufnahmen wurden mit einer 4k-Kamera aufgenommen. Maßstab: 100 nm. Bekannte Moleküle wurden markiert: (1) *Sp*TPPII-Spindel, (2) PFK-Strang, (3) großes *Sp*TPPII-Oligomer, (4) kleines *Sp*TPPII-Oligomer.

Aus den EM-Aufnahmen (Abb. 3.3.6) ist ebenfalls ersichtlich, dass bei einem niedrigeren Elutionsvolumen hauptsächlich TPPII-Spindeln eluierten. Auf den EM-Aufnahmen von Pool 2 (Abb. 3.3.6 A) sind neben großen *Sp*TPPII-Oligomeren (3), kleinen *Sp*TPPII-Oligomeren (4) und PFK-Strängen (2) hauptsächlich *Sp*TPPII-Spindeln (1) zu erkennen. Mit zunehmendem Elutionsvolumen nahm der Anteil an Spindeln ab und der von kleineren *Sp*TPPII-Oligomeren zu. So sind auf der EM-Aufnahme von Pool 3 (Abb. 3.3.6 B) im

Vergleich zur EM-Aufnahme von Pool 2 nur noch vereinzelt *SpTPPII*-Spindeln (1) und hauptsächlich kleinere *SpTPPII*-Oligomere (3 und 4) zu erkennen.

### 3.4 Biochemische Charakterisierung

#### 3.4.1 Thermische Stabilität von *SpTPPII*

Die Stabilität von *SpTPPII* wurde untersucht, indem die Aktivität der Proteinlösung nach unterschiedlichen destabilisierenden Bedingungen bestimmt wurde. Als Maß für die Stabilität von *SpTPPII*-Spindeln wurde dabei die Aktivitätsänderung von *SpTPPII* verwendet. Da Glycerin eine stabilisierende Wirkung auf Proteine hat [71], wurden die Versuche standardmäßig in Phosphatpuffer mit 5 % Glycerin durchgeführt.

**Tabelle 3.4.1: Thermische Stabilität von *SpTPPII***

| Bedingung               | Restaktivität (%) |               |
|-------------------------|-------------------|---------------|
|                         | 5 % Glycerin      | 30 % Glycerin |
| 0,5 h Inkubation bei RT | 99                | 93            |
| 1 h Inkubation bei RT   | 99                | 100           |
| 2 h Inkubation bei RT   | 96                | 100           |
| 14 h Inkubation bei RT  | 87                | n.b.          |
| Einfrieren und Auftauen | 96                | 100           |

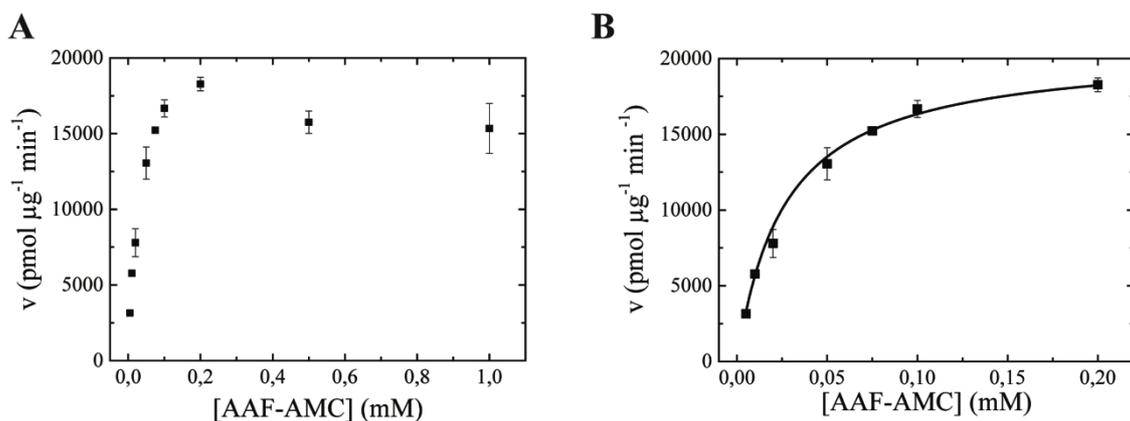
*SpTPPII*-Proteinlösung (Abb. 3.3.4 F, Pool 2) wurde in LoBind-Eppendorf Gefäßen mit 5 % oder 30 % Glycerin bei Raumtemperatur inkubiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei RT aufgetaut. Die Aktivität wurde mit Aktivitätsassaymischung bestimmt (1 µl/1 min).

Zuerst wurde die Stabilität einer *SpTPPII*-Lösung mit 5 % Glycerin bei Raumtemperatur untersucht. Dafür wurde die Lösung bei RT inkubiert und die Aktivität nach unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt (Tabelle 3.4.1). *SpTPPII* war über einen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur relativ stabil (96 % Restaktivität). Nach 14 Stunden betrug die Restaktivität der *SpTPPII*-Proteinlösung noch 87 %. Die Aktivität nahm somit pro Stunde im Durchschnitt um 1 - 2 % ab. Im Gegensatz dazu konnte innerhalb der ersten zwei Stunden keine Abnahme der Aktivität mit 30 % Glycerin gemessen werden. Je mehr Glycerin in der Lösung vorhanden war, desto stabiler war *SpTPPII*. Die Ergebnisse der Einfrier-Versuche bestätigten diese Tendenz. Die *SpTPPII*-Lösung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. In Anwesenheit von 5 % Glycerin nahm die Aktivität durch diese Prozedur um 4 % ab. Bei

30 % Glycerin konnte keine Aktivitätsänderung gemessen werden. Da die Abnahme bei 5 % Glycerin jedoch relativ klein war, kann *SpTPPII* unter den Standardbedingungen (50 - 80 mM  $\text{KPO}_4$ , 1 mM DTT, 5 % Glycerin, pH 7,5) ohne großen Aktivitätsverlust zumindest einmal eingefroren und aufgetaut werden. Zusätzlich erwies sich die Protease bei Raumtemperatur als relativ stabil, sodass eine Inkubation für ein bis zwei Stunden ebenfalls ohne großen Verlust der Aktivität möglich ist.

### 3.4.2 Kinetik der Spaltung von AAF-AMC durch *SpTPPII*

*SpTPPII* wurde standardmäßig über das bei der enzymatischen Spaltung von AAF-AMC freigesetzte AMC nachgewiesen (siehe 2.2.4.3). Nun sollten die kinetischen Parameter dieser Reaktion,  $K_m$  und  $v_{\max}$ , bestimmt werden. Dafür wurde die Reaktionsgeschwindigkeit für unterschiedliche Substratkonzentrationen bei 30 °C bestimmt. Anschließend wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 3.4.1 A).



**Abbildung 3.4.1: Enzymatische Spaltung von AAF-AMC durch *SpTPPII***

(A) Spezifische Aktivität der Spaltung von AAF-AMC durch *SpTPPII* in Abhängigkeit der AAF-AMC-Konzentration. Für alle Substratkonzentrationen wurden drei Messungen angefertigt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden mit OriginPro9 bestimmt. (B) Nicht linearer Kurven Fit (Michaelis Menten; OriginPro 9) der Messwerte von 0,01 - 0,2 mM AAF-AMC aus (A) zur Bestimmung von  $K_m$  ( $26,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ ) und  $v_{\max}$  ( $20625 \pm 304 \text{ pmol } \mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

Die maximale Geschwindigkeit  $v_{\max}$  war oberhalb einer Substratkonzentration von 0,2 mM AAF-AMC erreicht. Bei höheren Konzentrationen nahm die Geschwindigkeit der Reaktion ab, was auf Produkthemmung hinweist. Aus diesem Grund wurden nur die Geschwindigkeiten bis 0,2 mM AAF-AMC zur Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  verwendet (Abb. 3.4.1 B). Pro  $\mu\text{g}$  *SpTPPII* wurden bei 30 °C pro Minute maximal  $20 \pm 0,3 \text{ nmol}$  AAF-AMC umgesetzt.  $K_m$  betrug  $26,3 \pm 0,9 \mu\text{M}$ . Mit Hilfe von  $v_{\max}$  und

$[E]_0$  wurde  $k_{\text{cat}}$  nach Gleichung 2.4 berechnet:  $k_{\text{cat}} = 50 \text{ s}^{-1}$ . Die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) betrug  $1,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### 3.4.3 pH-Optimum der Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII

Um das pH-Optimum der Spaltung von AAF-AMC zu bestimmen, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Die gemessenen Geschwindigkeiten variierten zwischen pH 6,5 und pH 8,0 nur gering. Deswegen konnte das pH-Optimum nicht exakt bestimmt werden. Da die Geschwindigkeiten der Spaltung bei pH 6,0 und pH 8,5 jedoch geringfügig langsamer waren als zum Beispiel bei pH 7,0, liegt das pH-Optimum wahrscheinlich im neutralen pH-Bereich.

### 3.4.4 Sequenzanalyse von *Sp*TPPII

In der Flybase gibt es zwei Isoformen von *Dm*TPPII. Außerdem wird murines TPPII alternativ gespleißt, sodass die aufgrund der Gensequenz vorhergesagte Länge der Polypeptidkette von TPPII nicht der Länge des nativen Proteins entsprechen muss. Um zu klären, ob dies auch für *Sp*TPPII der Fall ist, wurde die Aminosäuresequenz von gereinigtem *Sp*TPPII mit Hilfe eines Massenspektrometers untersucht. Dafür wurde *Sp*TPPII aus einer Gelbande mit Trypsin zu Peptiden verdaut und die Sequenz der Peptide mit dem Massenspektrometer bestimmt. Diese Sequenzen wurden anschließend mit der aufgrund der Gensequenz (GeneDB: SPAP8A3.12c) vorhergesagten Aminosäuresequenz aligniert (Abb. 3.4.2).



**Abbildung 3.4.2: Sequenzabdeckung von *Sp*TPPII**

Zur Bestimmung der TPPII-Sequenz wurde eine Gelbande mittels Massenspektroskopie analysiert (siehe 2.2.5.4). Die Alignierung wurde mit Hilfe des Programms ClustalW2 (EMBL-EBI) ermittelt und grafisch dargestellt, indem die Sequenzabschnitte durch farbige Balken ersetzt wurden. Fehlende Abschnitte wurden durch eine schwarze Linie gekennzeichnet. Die Farbkodierung entspricht der aus Abbildung 1.1.

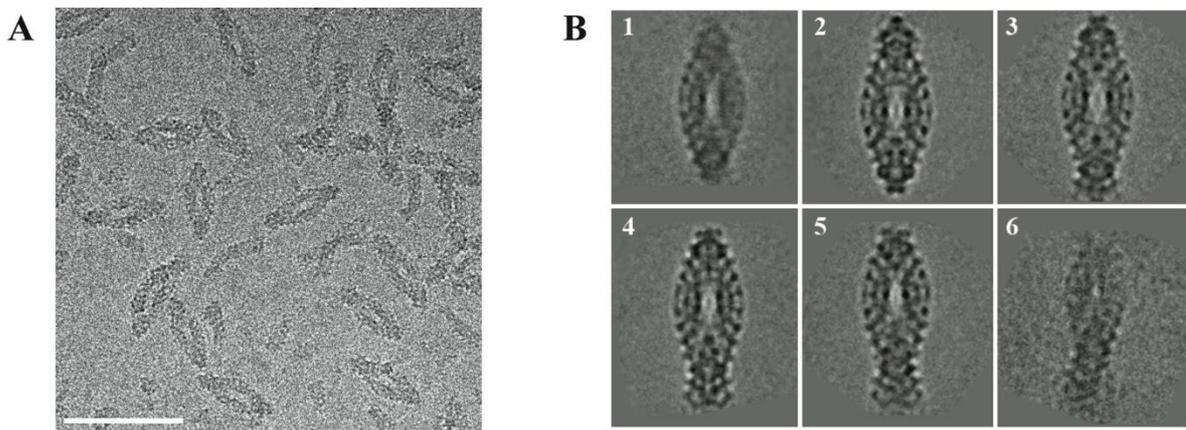
Die Alignierung ergab, dass die Peptidfragmente nur ca. 50 % der Aminosäuresequenz abdeckten. Große Teile der Sequenz aus den N- und C-terminalen Regionen wurden nicht

detektiert. Bei diesen Sequenzen handelte es sich vorwiegend um hydrophobe Abschnitte. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Peptide mit einem Massenspektrometer detektiert werden, ist weil sie wenig tryptische Spaltstellen enthalten und weil relativ große hydrophobe Peptide meist unlöslich sind oder nicht von der Säule eluieren, relativ gering. Für den Fall, dass *SpTPPII* nicht in sehr großem Maß gespleißt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass das Fehlen dieser Sequenzen somit auf die Analysemethode zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu besitzt die fehlende Peptidsequenz des N-Terminus von *SpTPPII* relativ viele geladene Reste. Solche Sequenzen müssten zumindest zu einem Teil im Massenspektrometer detektiert werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Polypeptidkette von *SpTPPII* im nativen Zustand gekürzt vorlag. An welcher Position der N-Terminus von *SpTPPII* beginnt, konnte mit dieser Methode jedoch nicht geklärt werden.

### 3.5 Einzelpartikelanalyse

#### 3.5.1 Einzelpartikelanalyse von *SpTPPII*-Spindeln

Für eine optimale Einzelpartikelrekonstruktion von *SpTPPII*-Spindeln ist eine homogene Verteilung der Ansichten erforderlich. Zusätzlich sind homogene Partikelspezies von Vorteil, da zum Beispiel Bögen und Spindeln in der Aufsicht schlecht voneinander unterschieden werden können. Die ersten Versuche zur Kryomikroskopie von *SpTPPII* wurden auf Kupfergrids mit einem Lacey-Film durchgeführt. Da sich *SpTPPII*-Spindeln vorwiegend am Kohlefilm und nicht im freien Eis befanden, wurden im Anschluss Lacey-Grids mit einem zusätzlichen dünnen Kohlefilm verwendet. Von diesen Grids wurden Daten für eine 2D-Mittelung aufgenommen. Abbildung 3.5.1 A zeigt eine Aufnahme von eiseingebetteten *SpTPPII*-Partikeln, auf der zu erkennen ist, dass die *SpTPPII*-Spindeln sich bevorzugt in der „Navette“-Position orientierten. Neben intakten Spindeln sind Bögen und kleinere *SpTPPII*-Oligomere zu erkennen. Die Verteilung der Oligomere im Eis entspricht in etwa ihrer Verteilung in der schwermetallsalzkontrastierten Probe (vgl. Abb. 3.3.6 A).



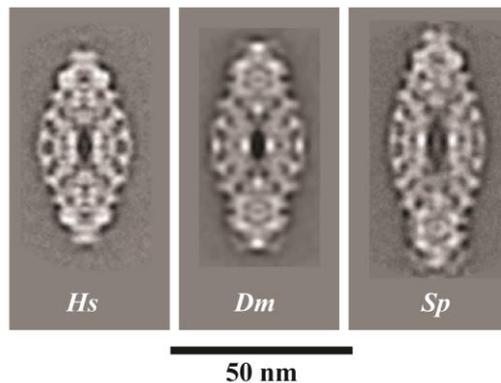
### Abbildung 3.5.1 2D-Klassifizierung von vitrifiziertem *SpTPPII*

(A) Aufnahme von vitrifizierten *SpTPPII*-Spindeln. Dafür wurde Proteinlösung von Pool 2 (siehe 3.3.5) für die Kryoelektronenmikroskopie präpariert (siehe 2.2.6.2) und an einem Tecnai F20 Elektronenmikroskop bei 200 kV abgebildet. Maßstab 100 nm. (B) Ausgewählte Klassenmittelungsbilder. Für die Klassifizierung wurden die Partikelbilder einfach komprimiert und mit dem Programm e2refine2d in 30 Klassen klassifiziert. Klassen mit Projektionen identischer oder ähnlicher Orientierung wurden nicht gezeigt.

Aus 150 2D-Aufnahmen, eiseingebetteter *SpTPPII*-Partikel, wurden interaktiv 2525 Partikelbilder selektiert, extrahiert und klassifiziert (Abb. 3.5.1 B). Aus der Klassifizierung geht hervor, dass fast alle extrahierten Partikel in der Längsansicht orientiert waren. Partikel die eine andere Projektion der Spindel zeigten waren sehr selten vertreten (0,1 %) oder wurden während der Partikelselektion nicht als solche identifiziert. Eine 3D-Rekonstruktion war mit diesem Datensatz nicht möglich, da dafür möglichst viele Klassenmittelungsbilder mit verschiedenen Ansichten der Spindel benötigt werden. Um dies zu erreichen wurden alternative Präparationsbedingungen, wie eine kürzere Inkubation des Grids im Plasma oder eine kürzere Inkubationszeit der Proteinlösung auf dem Grid vor dem Blotten getestet (Daten nicht gezeigt). Dies war bisher jedoch ohne Erfolg.

### 3.5.2 Größenvergleich von TPPII-Spindel aus verschiedenen Organismen

Die Spindeln von *Dm*TPPII und *Hs*TPPII unterscheiden sich in der Anzahl von Dimeren pro Strang und damit auch in ihrer Größe (vgl. Abb. 1.2). Um zu überprüfen ob sich auch die *Sp*TPPII-Spindel von den Spindeln von *Hs*TPPII und *Dm*TPPII unterscheidet, wurden die Klassenmittelungsbilder von TPPII-Spindeln in der Navette-Position gegenübergestellt (Abb. 3.5.2).



**Abbildung 3.5.2 Größenvergleich von TPPII aus verschiedenen Organismen**  
Klassenmittelungsbilder von vitrifizierten TPPII-Spindeln in der Navette-Position.

Die TPPII-Spindel von *S. pombe* ist im Vergleich zu den Spindeln der anderen Organismen die Größte. Die Spindel von *Sp*TPPII ist in dieser Ansicht um ca. 14 nm länger als die Spindel von *Hs*TPPII<sub>9</sub> und um ca. 8 nm länger als die Spindel von *Dm*TPPII. Es ist somit möglich, dass der Größenunterschied von *Sp*TPPII gegenüber den beiden anderen Spindeln ebenfalls, wie bei *Hs*TPPII<sub>9</sub> und *Dm*TPPII, auf eine, beziehungsweise zwei zusätzliche Dimeruntereinheiten pro Strang zurück zu führen ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Isolation von TPPII aus *Schizosaccharomyces pombe*

#### 4.1.1. Zellwachstum und *Sp*TPPII-Aktivität im Rohextrakt

Zuerst wurde das Zellwachstum einer stationären Flüssigkultur bei 30 °C untersucht. Dafür wurde eine Wachstumskurve aufgenommen, indem die OD<sub>600</sub> nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen wurde. Aus den Daten geht hervor, dass die stationäre Wachstumsphase spätestens nach 48 Stunden erreicht war. Da die OD<sub>600</sub> zu diesem Zeitpunkt am größten war, eignet sich eine Kultivierungsdauer von 2 Tagen für die maximale Ausbeute an Biomasse. Der Boltzman-Fit der Daten lässt vermuten, dass die stationäre Phase bereits nach ca. 30 Stunden erreicht war. Diese Vermutung deckt sich mit bereits beschriebenen Wachstumskurven von *S. pombe*, in denen die stationäre Phase nach 28 Stunden erreicht war [72]. Da die spezifische Aktivität von *Sp*TPPII im Rohextrakt jedoch mit zunehmender Kultivierungsdauer anstieg und nach 72 Stunden am größten war, ist es sinnvoller die Kultur mindestens 48 Stunden wachsen zu lassen. Das Phänomen ansteigender spezifischer *Sp*TPPII-Aktivität mit zunehmender Kultivierungsdauer, wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben [34]. Möglicherweise beruht es darauf, dass die Aktivität vieler Enzyme von *S. pombe* während der exponentiellen Wachstumsphase ansteigt [73].

#### 4.1.2 Zellaufschluss

Beim Zellaufschluss von *S. pombe* ist es wichtig, dass ein möglichst großer Anteil an Zellen aufgeschlossen wird. Außerdem sollte durch die Methode die Quartärstruktur von TPPII nicht zerstört werden, da im Anschluss Strukturuntersuchungen oder Pulldowns durchgeführt werden sollten. Um dies zu bewerten, wurde die Verteilung der Aktivität über die Superose-Fractionen und dadurch die Verteilung der *Sp*TPPII-Oligomere gemessen. Je größer der Anteil an Aktivität in Fraktionen mit kleinerem Elutionsvolumen ist, desto größer ist der Anteil an großen Oligomeren im Rohextrakt. Zuletzt ist es von Vorteil, wenn die Methode für eine große Zellmasse relativ schnell durchzuführen ist, da die Aktivität von *Sp*TPPII mit zunehmender Dauer der Reinigungsprozedur abnimmt (siehe 3.4.1).

Beim Zellaufschluss mit der Kugelmühle konnten fast alle Zellen aufgeschlossen werden. Im Vergleich zu den anderen Methoden war diese Methode in puncto Effizienz die Beste. Da das Volumen des Zylinders begrenzt ist, ist diese Art des Aufschlusses für eine große Menge an Zellen (> 100 g) jedoch sehr zeitaufwendig. Außerdem destabilisierten die mechanischen Kräfte, die während des Mahlvorgangs auftraten, die *SpTPPII*-Spindeln, sodass nach dem Zellaufschluss nur noch ca. 50 % der Spindeln vorhanden waren.

Die Zellaufschlussmethode mit dem höchsten Durchsatz ist der Zellhomogenisator. Mit ihm kann in kürzester Zeit ein großes Volumen an Zellsuspension aufgeschlossen werden. Das Problem bei *S. pombe*-Zellen ist, dass deren Zellwand sehr stabil ist und daher ein sehr großer Druck benötigt wird, um diese zu zerstören. Selbst mit dem maximal möglichen Druck von ca. 2000 Bar konnte mit dem Zellhomogenisator nur in etwa die Hälfte der Zellen aufgeschlossen werden. Möglicherweise kann die Effizienz durch eine Wiederholung des Aufschlusses mit einer bereits prozessierten Zellsuspension noch gesteigert werden. Der Verschleiß des Gerätes ist bei einem Druck von 2000 Bar allerdings sehr hoch, was die Verwendung des Zellhomogenisators zusätzlich einschränkt. Der Anteil von *SpTPPII*-Spindeln im Rohextrakt war relativ gering. Das bedeutet, dass die *SpTPPII*-Spindeln während des Zellaufschlusses zerfallen waren. Möglicherweise ist die *SpTPPII*-Spindel scherkraftempfindlich. Der Zellhomogenisator ist somit nicht, beziehungsweise nur eingeschränkt, geeignet um Hefezellen für die Gewinnung von *SpTPPII*-Spindeln aufzuschließen.

Unter der Annahme, dass die Kräfte, die bei den mechanischen Zellaufschlussmethoden auf die *SpTPPII*-Spindeln einwirkten, zu groß waren und diese daher zerfielen, wurde ein enzymatischer Zellaufschluss mit Zymolyase durchgeführt. Der Anteil an verdauten Zellen betrug bei dieser Methode nach 2 Stunden schätzungsweise 60 % und konnte durch eine längere Inkubationszeit nicht gesteigert werden. Womöglich kam es während des Verdaus zur Hemmung des Enzyms durch die Spaltprodukte, sodass eine Ausbeute von 100 % mit der eingesetzten Enzymmenge nicht möglich war. Da Zellen mit beschädigter Zellwand aufgrund des osmotischen Drucks zerplatzen und dabei ebenfalls subzellulären Strukturen mit niedrigem pH-Wert, wie die Vakuole [74], zerstört werden können, kann es zur Verringerung des pH-Wertes im Reaktionsgefäß kommen. Möglicherweise hat diese Änderung ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Zymolyase, sodass mit steigender Anzahl an aufgeschlossenen Zellen die Aktivität des Enzyms sank. Um diese Hypothese zu verifizieren, könnten die Zellen in isotonischem Puffer zu Spheroblasten verdaut werden und anschließend durch einen Pufferwechsel zum Platzen gebracht werden.

Die enzymatische Methode ist, im Gegensatz zu den anderen Methoden, sehr gut geeignet um einen großen Spindelanteil im Rohextrakt zu erreichen. Das bedeutet, dass mit einer schonenden Aufschlussmethode ein Spindelanteil von nahezu 100 % möglich wäre. Da eine nachträgliche Assemblierung von *SpTPPII*-Oligomeren nach dem Zellaufschluss bei der geringen *SpTPPII*-Konzentration nahezu ausgeschlossen ist, liegt *SpTPPII* intrazellulär höchstwahrscheinlich als Spindel vor. Das Problem beim enzymatischen Verdau ist jedoch, dass die Methode, da eine relativ große Menge des Enzyms pro Zellmasse benötigt wird, nicht wirtschaftlich ist. Um 100 g Zellen aufzuschließen wären vermutlich 50 mg Enzym nötig.

#### 4.1.3 Proteinreinigung

Das Ziel eines Reinigungsprotokolls ist es, dass die Verluste bei den einzelnen Schritten möglichst klein sind. Da sich ein N- oder C-terminaler Reinigungstag wie zum Beispiel ein His-Tag nicht für die Reinigung von *DmTPPII*-Spindeln eignete, wurde für *SpTPPII* ebenfalls zuerst ein Reinigungsprotokoll für das native Protein erstellt.

Im ersten Schritt wurden mit Hilfe der PEI-Fällung Nukleinsäuren aus dem Rohextrakt entfernt. Eine PEI-Konzentration von 0,1 % PEI stellte sich dabei als optimal in puncto Ausbeute und *SpTPPII*-Stabilität heraus. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, würden sie an das Säulenmaterial der ANX-Säule binden und somit Bindungsplätze für negativ geladene Protein wie TPPII besetzen. Daher ist die PEI-Fällung sehr nützlich in Bezug auf die Steigerung der Bindekapazität der Anionenaustauschersäule.

Von den Ionenaustauschersäulen ANX, SP und CptoMMC eignete sich die ANX-Säule am besten für die Reinigung von *SpTPPII*. *SpTPPII* besitzt einen theoretischen pI von 6,0. Das bedeutet, dass *SpTPPII* bei pH 7,5 negativ geladen ist, was die Bindung an die ANX-Säule erklärt. Da SP-Säulen Kationentauscher sind, müsste der pH-Wert auf unter pH 6,0 verringert werden, um positiv geladenes *SpTPPII* zu erzeugen, dass an das Säulenmaterial binden kann. Da *SpTPPII* bei pH 6,0 nicht an die Säule gebunden hatte, ist es möglich, dass der isoelektrische Punkt von *SpTPPII* auch unter pH 6,0 liegt. Das Bindeverhalten eines Proteins an das Säulenmaterial eines Ionenaustauschers, hängt jedoch nicht nur von seiner Nettoladung, sondern auch von der Ionenkonzentration der Lösung ab. Es ist daher auch möglich, dass *SpTPPII* bei diesem pH eine positive Nettoladung hatte, ohne dabei an die Säule zu binden. Da unterhalb von pH 6,0 viele Proteine ausfallen, wurde der pH-Wert bei der Reinigung von *SpTPPII* nicht unter pH 6,0 verringert. Vermutlich konnte *SpTPPII* ebenfalls aufgrund einer zu geringen positiven Nettoladung bei pH 6,0 nur unter

Hochsalzbedingungen an die CaptoMMC-Säule gebunden werden. Da die Ausbeute mit dieser Säule jedoch geringer war als mit der ANX-Säule, wurde die CaptoMMC-Säule nicht verwendet.

Wie groß der Anteil an Proteinen war, die über die ANX-Säule von *Sp*TPPII abgetrennt wurde, kann anhand des Vergleichs der Bahnen auf dem SDS-Polyacrylamidgel (vgl., Abb. 3.3.5 Bahn 4 und 5) nicht geklärt werden. Höchstwahrscheinlich kam es in der Probe auf Bahn 5 zu proteolytischem Verdau. Somit konnte bezüglich der Effizienz der ANX-Säule in puncto Trennleistung keine Aussage getroffen werden.

Eine hohe Selektivität wurde hingegen durch die Größenausschlusschromatographie mit einer Superose 6-Säule erreicht. Da die *Sp*TPPII-Spindel ein sehr großer Molekülkomplex ist (ca. 6 MDa) und fast alle zellulären Proteine viel kleiner sind, konnten fast alle Verunreinigungen abgetrennt werden. Die Fraktionen mit *Sp*TPPII-Spindeln enthielten nur noch Polymere aus 6-Phosphofruktokinase mit unterschiedlicher Länge. Zur Abtrennung der PFK wurde ein eher unkonventioneller Ansatz gewählt. Anstatt zu versuchen, *Sp*TPPII an ein Säulenmaterial zu binden, an das PFK nicht bindet, wurde die Tatsache ausgenutzt, dass PFK spezifisch an den Farbstoff Cibacron Blue bindet. Mit Hilfe der „blauen Säule“ konnten die PFK-Stränge erfolgreich von TPPII abgetrennt werden.

Insgesamt konnten *Sp*TPPII-Spindeln aus *S. pombe* Rohextrakt über die fünf Reinigungsschritte: PEI-Fällung, Blue/ANX, Superose 6 (groß), Blue/ANX und Superose 6 (klein), in reiner Form erhalten werden (vgl. Abb. 3.3.5). Wie auf den EM-Aufnahmen (Abb. 3.3.6 A) zu erkennen ist, befanden sich jedoch noch PFK-Stränge in Pool 2. Um diese vollständig von *Sp*TPPII-Spindeln abzutrennen, wäre eine „blaue Säule“ mit einem größeren Volumen nötig. Die Ausbeute der Reinigung betrug 6 %. Um diese zu erhöhen, müssten die einzelnen Schritte optimiert werden. Der Großteil an *Sp*TPPII-Aktivität wurde bei den beiden SEC-Schritten verloren. Hier wurden viele Fraktionen mit TPPII-Aktivität verworfen, da diese entweder Verunreinigungen enthielten oder die Komplexe bei einem zu großen Elutionsvolumen eluierten und damit zu klein für Spindeln waren. Da die Zellen mit der Glaskugelmühle aufgeschlossen wurden und deswegen von vornherein die Hälfte der Spindeln zerfallen war, ist es nicht verwunderlich, dass bei diesem Schritt der Verlust am größten war. Mit einer besser geeigneten Zellaufschlussmethode, wie zum Beispiel dem enzymatischen Verdau, sollte die Ausbeute um ein Vielfaches erhöht werden können. Für die Reinigung von *Sp*TPPII-Spindeln aus 110 ml Rohextrakt wurden ca. 12 Stunden benötigt. Da *Sp*TPPII bei Raumtemperatur nicht über längere Zeit stabil ist, (vgl. 3.4.1) ist es möglich, dass während der Reinigung kontinuierlich *Sp*TPPII-Spindeln zerfallen sind. Um diesen Zerfall zu verhindern, könnte

die Reinigung entweder mit einer höheren Glycerinkonzentration in allen Reinigungspuffern durchgeführt werden oder sie sollte beschleunigt werden. Eine erhöhte Glycerinkonzentration bewirkt eine Erhöhung der Viskosität des Puffers. Damit der Druck während der SEC nicht zu hoch wird, muss deshalb die Flussrate verringert werden. Da eine verringerte Flussrate eine Verlängerung der Chromatographie bewirken würde, ist dieser Ansatz kontraproduktiv. Eine Verkürzung der Reinigungsdauer wäre durch eine standardisierte Reinigung machbar. Da *SpTPPII* während der Reinigung über die Aktivität nachgewiesen wird, wurde ein Hauptteil der benötigten Zeit für die Aktivitätsmessungen verwendet. Da jetzt jedoch bekannt ist, bei welchen Volumina *SpTPPII*-Spindeln eluieren, ist es möglich, die Anzahl der Aktivitätsmessungen zu reduzieren und somit Zeit einzusparen. Das wiederum könnte die Ausbeute erhöhen. Theoretisch ist auch eine Reinigung bei einer niedrigeren Temperatur denkbar. Da die Stabilität von *SpTPPII* jedoch nur bei Raumtemperatur untersucht wurde, ist nicht bekannt wie stabil es bei niedrigen Temperaturen ist.

## 4.2 Biochemische Eigenschaften von *SpTPPII*

### 4.2.1 Stabilität von *SpTPPII*

Um abschätzen zu können, wie stabil *SpTPPII* ist, wurde die Peptidase entweder bei Raumtemperatur inkubiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei Raumtemperatur aufgetaut. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *SpTPPII* die Aktivität über einen kurzen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur nahezu konstant bleibt. An dieser Stelle stellt sich die Frage, in wie weit die *SpTPPII*-Aktivität der Lösung als Maß für die Stabilität von *SpTPPII*-Oligomeren verwendet werden kann. Die Abnahme der Aktivität von *SpTPPII*-Spindeln basiert hauptsächlich auf zwei molekularen Mechanismen. Erstens kann die Aktivität aufgrund der Oxidation von Cysteinresten abnehmen, die für die *SpTPPII*-Aktivität wichtig sind [15]. Da sich dieser Vorgang nicht auf die Quartärstruktur von *SpTPPII* auswirkt und durch die Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT vermindert wird, kann er in Bezug auf die Stabilität der Oligomere vernachlässigt werden. Zweitens kann die Aktivität sinken, wenn Spindeln oder Oligomere zerfallen und sich somit die Anzahl von aktivierten aktiven Zentren reduziert. Dies geschieht bei *DmTPPII*, wenn die Proteinkonzentration geringer als  $0,03 \text{ mg ml}^{-1}$  ist [35]. Der Modellvorstellung nach kann eine Abnahme der Aktivität um wenige Prozent bereits den Unterschied zwischen einem 20mer und einem 14mer ausmachen [35]. Das bedeutet, dass die Aktivitätsänderung annäherungsweise als Maß für den Zerfall von *SpTPPII*-Oligomeren angesehen werden

kann. Da für strukturelle Untersuchungen *Sp*TPPII-Spindeln benötigt werden, muss das Ziel der Reinigung sein, die Abnahme der Aktivität so gering wie möglich zu halten. Je mehr Glycerin in der Lösung war, desto stabiler war *Sp*TPPII. Es ist bekannt, dass Glycerin das Gleichgewicht der Proteinspezies auf die Seite von kompakteren Strukturen verschiebt und deshalb generell eine Stabilisierung von Proteinkomplexen bewirkt [71]. Somit kann zum Beispiel durch eine höhere Glycerinkonzentration im Puffer eine höhere Stabilität erreicht werden. Es ist jedoch abzuwägen, wie sich das auf die Dauer der Größenausschlusschromatographie auswirkt.

Die Einfrier-Versuche haben gezeigt, dass die Aktivität nach dem Auftauen verringert war. Daher sollten Lösungen mit *Sp*TPPII-Spindeln so selten wie möglich eingefroren werden.

#### 4.2.2 Kinetische Parameter der Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII

Die kinetischen Parameter der Spaltung von AAF-AMC durch *Sp*TPPII wurden bei pH 7,5 ermittelt. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratkonzentrationen größer als 0,2 mM ist höchstwahrscheinlich auf eine Produktinhibition zurück zu führen. Ein Vergleich mit TPPII aus anderen Organismen zeigt, dass  $v_{\max}$  von *Sp*TPPII in etwa so groß ist wie  $v_{\max}$  von *Dm*TPPII [35] und um das 1,5-fache größer als  $v_{\max}$  von *Hs*TPPII [20]. Nicht publizierte Daten von A. Schönege (MPI für Biochemie) zeigen jedoch, dass  $v_{\max}$  für *Hs*TPPII ebenfalls im Bereich von 20000 pmol  $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$  liegt. Somit können alle drei TPPII-Varianten die Spaltung von AAF-AMC in etwa mit der gleichen maximalen Geschwindigkeit katalysieren. Die  $K_m$ -Werte unterscheiden sich jedoch deutlich zwischen den Organismen. *Hs*TPPII bindet von den drei Organismen AAF-AMC am stärksten (16  $\mu\text{M}$ ; [20]), dann folgt *Sp*TPPII (26  $\mu\text{M}$ ; siehe 3.4.2) und die schwächste Bindung zeigt *Dm*TPPII mit einem  $K_m$  von 470  $\mu\text{M}$  [35]. Daraus resultiert die höchste katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) für *Hs*TPPII, anschließend folgt *Sp*TPPII, und die niedrigste katalytische Effizienz besitzt *Dm*TPPII.

#### 4.2.3 N-Terminus von *Sp*TPPII

Nativem TPPII aus *D. melanogaster* fehlen ca. 60 Reste am N-Terminus, sodass bisher nur die kurze Isoform gereinigt werden konnte (Peters J, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Sequenzanalyse von nativem *Sp*TPPII hat ergeben, dass aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls ein Abschnitt des N-Terminus fehlt. Eine endgültige Aussage konnte mit den vorliegenden Daten nicht getroffen werden, da die Sequenzabdeckung lediglich 50 %

betrug. Da der fehlende N-terminale Bereich zu einem Großteil aus geladenen Resten bestand, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass am nativen Protein dieser Teil fehlt. Es wurde bereits beschrieben, dass murines TPPII alternativ gespleißt wird [17], oder das *HsTPPII* einen alternativen Startpunkt der Translation besitzt [31]. Daher ist es auch möglich, dass sich die aufgrund der Gensequenz vorhergesagte Aminosäuresequenz des *SpTPPII*s von der Sequenz des nativen Proteins unterscheiden kann. Für den Fall, dass *SpTPPII* ebenfalls zum Beispiel ein alternatives Startcodon besitzt und dies das Codon von Met-57 ist, würde das bedeuten, dass das Protein um 56 Aminosäuren verkürzt ist. Daraus resultiert, dass sich das Molekulargewicht von *SpTPPII*<sub>kurz</sub> auf 135 kDa und der pI auf 5,5 verringern würde. Möglicherweise erklärt ein pI von 5,5 wieso *SpTPPII* bei pH 6,0 nicht an das Säulenmaterial der SP-Säule gebunden hatte (vgl. 3.3.2).

### 4.3 Quartärstruktur von *SpTPPII*

Zur Untersuchung der Quartärstruktur von *SpTPPII* wurden die Proben vitrifiziert und mit dem Transmissionselektronenmikroskop abgebildet. Wie TPPII aus anderen Organismen, besitzt auch *SpTPPII* eine spindelförmige Architektur. *SpTPPII*-Spindeln interagierten bevorzugt mit dem Lacey-Kohlefilm, sodass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem geladenen Film sehr wahrscheinlich sind. Dies ist möglicherweise auch der Grund dafür, dass die Spindeln bevorzugt in der Navette-Ansicht auf dem Film zu liegen kamen. Um die Ladungen zu minimieren und dadurch möglicherweise die Häufigkeit der Partikel mit anderen Ansichten der Spindel zu erhöhen, könnte zum Beispiel der pH-Wert der Lösung verringert werden.

Dennoch wurde eine 2D-Klassifizierung der *SpTPPII*-Spindel durchgeführt. Im Vergleich zu den Spindeln von *HsTPPII* und *DmTPPII* sind *SpTPPII*-Spindeln länger und besitzen wahrscheinlich eine Dimereinheit mehr pro Strang. Ob eine größere Anzahl an Dimeren pro Strang einen besonderen Vorteil für *SpTPPII* hat oder diese lediglich aus den Unterschieden der Primärstruktur resultiert bleibt zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. Möglicherweise würde ein pseudoatomares Modell der *SpTPPII*-Spindel helfen diese Fragestellung zu beantworten.

#### 4.4 *S. pombe* als Modellorganismus für TPPII

In dieser Arbeit konnten einige Befunde gesammelt werden, die *S. pombe* als Modellorganismus für *SpTPPII* interessant machen. Zum Beispiel ist noch ungeklärt an welcher Position der N-Terminus des nativen Proteins beginnt und welche Funktion die Vorläufersequenz hat. Durch eine Sequenzierung des N-Terminus von *SpTPPII* könnte diese Frage geklärt werden. Mutationsstudien könnten anschließend helfen zu verstehen, welche Funktion die Vorläufersequenz hat. Des Weiteren wurden erste Hinweise auf eine neue Variante der TPPII-Spindel gefunden. Eine hochaufgelöste 3D-Struktur einer Spindel mit 11 Dimeren pro Strang könnte neue Erkenntnisse über die Architektur und Regulationsmechanismen von *SpTPPII* liefern. Für die elektronenmikroskopische Bestimmung der Struktur von *SpTPPII* muss eine Gridpräparationsmethode gefunden werden, die zu einer homogenen Verteilung der Projektionsansichten führt. Weiterhin ist eine homogene Probe bei der Partikelextraktion von Vorteil. Es stellte sich heraus, dass *SpTPPII*-Spindeln bei zu großen Kräften während des Zellaufschlusses in kleinere Oligomere zerfallen. Da *S. pombe* eine sehr stabile Zellwand besitzt, wurden jedoch sehr große Kräfte benötigt (z.B. 2000 Bar) um die Zellen zu zerreißen. In dieser Arbeit konnten durch den Vergleich von verschiedenen Zellaufschlussmethoden Bedingungen gefunden werden, bei denen die Spindeln im Rohextrakt nahezu vollständig intakt blieben, sodass sich *S. pombe* durchaus für strukturelle Studien an TPPII-Spindeln eignet.

Mit einem Antikörper gegen *SpTPPII* könnte versucht werden, *SpTPPII* in der Zelle zu lokalisieren und mit den bereits beschriebenen Tomographietechniken [58] ein Tomogramm von *SpTPPII in vivo* aufzunehmen. Zur Herstellung eines Antikörpers werden große Mengen an reinem *SpTPPII* benötigt. Die Reinigung von *SpTPPII*-Spindeln konnte an einem Arbeitstag durchgeführt werden und ist daher für die Reinigung aus nativer Quelle sehr effizient. Die geringe Ausbeute liegt im Rahmen der bisher erreichten Ausbeuten von nativen TPPII-Reinigungen aus *H. sapiens* und *D. melanogaster*. Hier stellt sich die Frage, in wie weit sich *S. pombe* als Organismus zur Bereitstellung von großen *SpTPPII*-Mengen eignet. Bakterielle Organismen wie zum Beispiel *E. coli* können eine kurze Generationszeit von 20 Minuten haben [75] und eignen sich daher besser zur Bereitstellung großer Biomasse in kurzer Zeit als *S. pombe*. Da TPPII jedoch nur in Eukaryonten vorkommt, eignen sich Prokaryonten nicht zur Untersuchung von TPPII in seiner zellulären Umgebung. Außerdem muss TPPII zum Beispiel zur Expression in *E. coli* in einen geeigneten Vektor kloniert werden, was für *SpTPPII* bisher noch nicht gelungen ist. Zusätzlich haben prokaryontische Systeme den Nachteil, dass Proteine nicht glykosyliert werden. Ein alternativer eukaryontischer Organismus zu *S. pombe* ist

beispielsweise *S. cerevisiae*. Dieser Organismus wird im Labor sehr häufig verwendet, eignet sich jedoch für die Untersuchung von TPPII nicht, da er dieses nicht besitzt. Es gibt noch weitere Zellkulturen von höheren Eukaryonten, die im Labor eingesetzt werden, wie zum Beispiel HEK293-Kulturen. Diese eignen sich jedoch in Bezug auf die Bereitstellung von Biomasse nicht so gut wie *S. pombe*, da die Generationszeit länger ist und die Kultivierungsbedingungen aufwendiger sind [76]. *S. pombe* ist deshalb, für einen eukaryontischen Modellorganismus, eine sehr gute Wahl um TPPII in kurzer Zeit in großen Mengen bereit zu stellen.

## 5 Referenzen

1. Barrett, A.J. and J.K. McDonald, *Nomenclature: protease, proteinase and peptidase*. Biochem J, 1986. **237**(3): p. 935.
2. Rawlings, N.D. and A.J. Barrett, *Evolutionary families of peptidases*. Biochem J, 1993. **290** ( Pt 1): p. 205-18.
3. Pillai, B., et al., *Crystal structure of scytalidoglutamic peptidase with its first potent inhibitor provides insights into substrate specificity and catalysis*. J Mol Biol, 2007. **365**(2): p. 343-61.
4. Kisselev, A.F., et al., *The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes - Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(6): p. 3363-3371.
5. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**: p. 425-479.
6. Baumeister, W., et al., *The proteasome: Paradigm of a self-compartmentalizing protease*. Cell, 1998. **92**(3): p. 367-380.
7. Pillay, C.S., E. Elliott, and C. Dennison, *Endolysosomal proteolysis and its regulation*. Biochem J, 2002. **363**(Pt 3): p. 417-29.
8. Danial, N.N. and S.J. Korsmeyer, *Cell death: critical control points*. Cell, 2004. **116**(2): p. 205-19.
9. Hemmann, S., et al., *Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies*. J Hepatol, 2007. **46**(5): p. 955-75.
10. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
11. Docherty, A.J., et al., *Proteases as drug targets*. Biochem Soc Symp, 2003(70): p. 147-61.
12. Balow, R.M., U. Ragnarsson, and O. Zetterqvist, *Tripeptidyl aminopeptidase in the extralysosomal fraction of rat liver*. Journal of Biological Chemistry, 1983. **258**(19): p. 11622-8.
13. Rose, C., et al., *Characterization and Inhibition of a cholecystokinin-inactivating serine peptidase*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 403-409.
14. Tomkinson, B. and A.C. Lindas, *Tripeptidyl-peptidase II: A multi-purpose peptidase*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005. **37**(10): p. 1933-1937.
15. Tomkinson, B., et al., *Active-Site of Tripeptidyl Peptidase-II from Human-Erythrocytes Is of the Subtilisin Type*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(21): p. 7508-7512.
16. Hilbi, H., E. Jozsa, and B. Tomkinson, *Identification of the catalytic triad in tripeptidyl-peptidase II through site-directed mutagenesis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2002. **1601**(2): p. 149-154.
17. Tomkinson, B., *Characterization of cDNA for Murine Tripeptidyl-Peptidase-II Reveals Alternative Splicing*. Biochemical Journal, 1994. **304**: p. 517-523.
18. Siezen, R.J. and J.A.M. Leunissen, *Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases*. Protein Science, 1997. **6**(3): p. 501-523.
19. Chuang, C.K., et al., *Hybrid molecular structure of the giant protease tripeptidyl peptidase II*. Nature Structural & Molecular Biology, 2010. **17**(8): p. 990-996.
20. Balow, R.M., et al., *Purification, Substrate-Specificity, and Classification of Tripeptidyl Peptidase-II*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(5): p. 2409-2417.

21. Geier, E., et al., *A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome*. Science, 1999. **283**(5404): p. 978-981.
22. Seifert, U., et al., *An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope*. Nature Immunology, 2003. **4**(4): p. 375-379.
23. Berger, A. and I. Schechter, *Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1970. **257**(813): p. 249-64.
24. Banbula, A., et al., *Prolyl tripeptidyl peptidase from Porphyromonas gingivalis. A novel enzyme with possible pathological implications for the development of periodontitis*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9246-52.
25. Bermingham, N.A., et al., *The gene encoding tripeptidyl peptidase II maps to chromosome 1 in the mouse*. Mamm Genome, 1996. **7**(5): p. 390.
26. Renn, S.C.P., B. Tomkinson, and P.H. Taghert, *Characterization and cloning of tripeptidyl peptidase II from the fruit fly, Drosophila melanogaster*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(30): p. 19173-19182.
27. Book, A.J., et al., *Tripeptidyl peptidase II. An oligomeric protease complex from Arabidopsis*. Plant Physiology, 2005. **138**(2): p. 1046-1057.
28. Macpherson, E., 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**(1): p. 259-263.
29. Wood, V., et al., *The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe*. Nature, 2002. **415**(6874): p. 871-80.
30. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.
31. Tomkinson, B., *Nucleotide-Sequence of cDNA Covering the N-Terminus of Human Tripeptidyl Peptidase-II*. Biomedica Biochimica Acta, 1991. **50**(4-6): p. 727-729.
32. Rockel, B., et al., *A giant protease with a twist: the TPP II complex from Drosophila studied by electron microscopy*. Embo Journal, 2002. **21**(22): p. 5979-5984.
33. Schoenegge, A.-M., et al., *The Structure of Human Tripeptidyl Peptidase II as Determined by a Hybrid Approach*. Structure, 2012. **20**(4): p. 593-603.
34. Osmulski, P.A. and M. Gaczynska, *A new large proteolytic complex distinct from the proteasome is present in the cytosol of fission yeast*. Curr Biol, 1998. **8**(18): p. 1023-6.
35. Seyit, G., et al., *Size matters for the tripeptidylpeptidase II complex from Drosophila - The 6-MDa spindle form stabilizes the activated state*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(35): p. 25723-25733.
36. Harris, J.R. and B. Tomkinson, *Electron-Microscopic and Biochemical-Studies on the Oligomeric States of Human Erythrocyte Tripeptidyl Peptidase .2*. Micron and Microscopica Acta, 1990. **21**(1-2): p. 77-89.
37. Rockel, B., 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**(29): p. 10135-10140.
38. Reits, E., et al., *A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 495-506.
39. Wray, C.J., et al., *Tripeptidyl-peptidase II expression and activity are increased in skeletal muscle during sepsis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **296**(1): p. 41-47.
40. Hong, X., L. Lei, and R. Glas, *Tumors acquire inhibitor of apoptosis protein (IAP)-mediated apoptosis resistance through altered specificity of cytosolic proteolysis*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(12): p. 1731-1743.

41. Preta, G., R. de Klark, and R. Glas, *A role for nuclear translocation of tripeptidyl-peptidase II in reactive oxygen species-dependent DNA damage responses*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **389**(4): p. 575-579.
42. Stavropoulou, V., et al., *TPPII promotes genetic instability by allowing the escape from apoptosis of cells with activated mitotic checkpoints*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **346**(2): p. 415-425.
43. McKay, R.M., et al., *Tripeptidyl peptidase II promotes fat formation in a conserved fashion*. Embo Reports, 2007. **8**: p. 1183-1189.
44. Tomkinson, B., *Tripeptidyl peptidases: enzymes that count*. Trends in Biochemical Sciences, 1999. **24**(9): p. 355-359.
45. Eriksson, S., et al., *Development, evaluation and application of tripeptidyl-peptidase II sequence signatures*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2009. **484**(1): p. 39-45.
46. Glas, R., et al., *A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 618-622.
47. Princiotta, M.F., et al., *Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(2): p. 513-518.
48. Rock, K.L., I.A. York, and A.L. Goldberg, *Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation*. Nature Immunology, 2004. **5**(7): p. 670-677.
49. Dockray, G.J., et al., *Isolation, structure and biological activity of two cholecystokinin octapeptides from sheep brain*. Nature, 1978. **274**(5672): p. 711-3.
50. MacIntosh, C.G., et al., *Effect of exogenous cholecystokinin (CCK)-8 on food intake and plasma CCK, leptin, and insulin concentrations in older and young adults: evidence for increased CCK activity as a cause of the anorexia of aging*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5830-7.
51. Yang, Y.L. and X.M. Li, *The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities*. Cell Res, 2000. **10**(3): p. 169-77.
52. Firat, E., et al., *Tripeptidyl Peptidase II Plays a Role in the Radiation Response of Selected Primary Cell Types but not Based on Nuclear Translocation and p53 Stabilization*. Cancer Research, 2009. **69**(8): p. 3325-3331.
53. Mitchison, J.M., *The fission yeast, Schizosaccharomyces pombe*. Bioessays, 1990. **12**(4): p. 189-91.
54. Forsburg, S.L., *The yeasts Saccharomyces cerevisiae and Schizosaccharomyces pombe: models for cell biology research*. Gravit Space Biol Bull, 2005. **18**(2): p. 3-9.
55. Siam, R., W.P. Dolan, and S.L. Forsburg, *Choosing and using Schizosaccharomyces pombe plasmids*. Methods, 2004. **33**(3): p. 189-98.
56. McDonald, K., *High-pressure freezing for preservation of high resolution fine structure and antigenicity for immunolabeling*. Methods Mol Biol, 1999. **117**: p. 77-97.
57. Sabatini, D.D., K. Bensch, and R.J. Barnett, *Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 19-58.
58. Tanaka, K. and T. Kanbe, *Mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe as revealed by freeze-substitution electron microscopy*. J Cell Sci, 1986. **80**: p. 253-68.
59. Melander, W. and C. Horvath, *Salt effect on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: an interpretation of the lyotropic series*. Arch Biochem Biophys, 1977. **183**(1): p. 200-15.

60. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
61. Schagger, H., *Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 16-22.
62. Nickell, S., et al., *TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography*. J Struct Biol, 2005. **149**(3): p. 227-34.
63. Tang, G., et al., *EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy*. J Struct Biol, 2007. **157**(1): p. 38-46.
64. Scheres, S.H., et al., *Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 977-90.
65. Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse, *Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Methods Enzymol, 1991. **194**: p. 795-823.
66. Zhou, J.Q., et al., *Schizosaccharomyces pombe pfh1+ encodes an essential 5' to 3' DNA helicase that is a member of the PIF1 subfamily of DNA helicases*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(6): p. 2180-91.
67. Kitamura, K. and Y. Yamamoto, *Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells*. Arch Biochem Biophys, 1972. **153**(1): p. 403-6.
68. Cordes, R.M., W.B. Sims, and C.E. Glatz, *Precipitation of nucleic acids with poly(ethyleneimine)*. Biotechnol Prog, 1990. **6**(4): p. 283-5.
69. Benjamin, S., et al., *Structures of S. pombe phosphofructokinase in the F6P-bound and ATP-bound states*. J Struct Biol, 2007. **159**(3): p. 498-506.
70. Reuter, R., et al., *Purification, molecular and kinetic characterization of phosphofructokinase-1 from the yeast Schizosaccharomyces pombe: evidence for an unusual subunit composition*. Yeast, 2000. **16**(14): p. 1273-85.
71. Vagenende, V., M.G. Yap, and B.L. Trout, *Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol*. Biochemistry, 2009. **48**(46): p. 11084-96.
72. Bonini, B.M., P. Van Dijck, and J.M. Thevelein, *Uncoupling of the glucose growth defect and the deregulation of glycolysis in Saccharomyces cerevisiae Tps1 mutants expressing trehalose-6-phosphate-insensitive hexokinase from Schizosaccharomyces pombe*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1606**(1-3): p. 83-93.
73. Creanor, J. and J.M. Mitchison, *Nucleoside diphosphokinase, an enzyme with step changes in activity during the cell cycle of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. II. Dissociation of the steps from the DNA-division cycle after induction synchronization*. J Cell Sci, 1989. **93** ( Pt 1): p. 185-9.
74. Gachet, Y., et al., *btn1, the Schizosaccharomyces pombe homologue of the human Batten disease gene CLN3, regulates vacuole homeostasis*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 23): p. 5525-36.
75. Cooper, S. and C.E. Helmstetter, *Chromosome replication and the division cycle of Escherichia coli B/r*. J Mol Biol, 1968. **31**(3): p. 519-40.
76. Cervera, L., et al., *Optimization of HEK 293 cell growth by addition of non-animal derived components using design of experiments*. BMC Proc, 2011. **5 Suppl 8**: p. P126.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |                  |                                   |
|------------------|--|------------------|-----------------------------------|
| A <sub>260</sub> | Absorption bei 260 nm                    | NS               | Schwermetallkontrastierung        |
| Abb              | Abbildung                                | OD               | optische Dichte                   |
| Ala              | Alanin                                   | ORF              | offenes Leseraster                |
| AS               | Aminosäure                               | PAGE             | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| Asn              | Asparagin                                | PEI              | Polyethylenimin                   |
| Asp              | Aspartat                                 | PFK              | 6-Phosphofruktokinase             |
| ATP              | Adenosintriphosphat                      | Phe              | Phenylalanin                      |
| BSA              | Rinderalbumin                            | pI               | isoelektrischer Punkt             |
| CCD              | Charge-coupled Device                    | PSI              | Pfund pro Quadratzoll             |
| CCK              | Cholecystokinin                          | RE               | Rohextrakt                        |
| CV               | Säulenvolumen                            | RT               | Raumtemperatur                    |
| Da               | Dalton                                   | ROS              | reaktive Sauerstoffspezies        |
| <i>Dm</i>        | <i>Drosophila melanogaster</i>           | rpm              | Umdrehungen pro Minute            |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure                   | SEC              | Größenausschlusschromatographie   |
| DF               | Durchfluss                               | Ser              | Serin                             |
| dpi              | dots per inch                            | <i>Sp</i>        | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>  |
| EM               | Elektronenmikroskop                      | t                | Zeit                              |
| FEG              | Feldemissionskathode                     | TOF              | Flugzeitmassenspektrometer        |
| Gl               | Gleichung                                | TPPII            | Tripeptidylpeptidase II           |
| HEK              | menschliche embryonale Nierenzelllinie   | v <sub>max</sub> | maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| His              | Histidin                                 | v/v              | Volumen/Volumen                   |
| HPLC             | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie | w/v              | Gewicht/Volumen                   |
| <i>Hs</i>        | <i>Homo sapiens</i>                      | w/w              | Gewicht/Gewicht                   |
| IAP              | Apoptose-Inhibitoren                     | WA               | Waschfraktion                     |
| K <sub>m</sub>   | Michaelis-Menten-Konstante               | YES              | Hefeextrakt mit Zusätzen          |
| LMW              | niedermolekulare Masse                   | λ <sub>em</sub>  | Emissionswellenlänge              |
| MCE              | gemischte Celluloseester                 | λ <sub>ex</sub>  | Extinktionswellenlänge            |

Abkürzungen von Chemikalien siehe 2.1.1

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen November 2012 und April 2013 in der Arbeitsgruppe für Molekulare Strukturbiologie des Max-Planck Institutes für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Baumeister angefertigt. Bei ihm möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Beate Rockel und Jürgen Peters, die stets auf alle Fragen eine hilfreiche Antwort wussten und mich hervorragend betreut haben. Ohne ihre Hilfe wäre das ein oder andere Problem wahrscheinlich bis heute nicht aufgeklärt. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, die mich tatkräftig unterstützt und mir eine angenehme Arbeitsatmosphäre ermöglicht haben. Ein großes Dankeschön geht an Marietta Peters, die mir einen nie enden wollenden Nachschub von „Assaymixes“ bereitgestellt hat und mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Bei Oana Mihalache möchte ich mich für die Betreuung am Elektronenmikroskop und für die Anfertigung einiger EM-Bilder bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden die mich während meines Studiums tatkräftig unterstützt haben.