

University of Groningen

## Structure and evolution of Panulirus interruptus Hemocyanin.

Bak, Hendrikus Jacobus

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1987

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Bak, H. J. (1987). Structure and evolution of Panulirus interruptus Hemocyanin. Groningen: s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## SAMENVATTING

Hemocyanine is een koperbevattend, zuurstoftransporterend eiwit, dat vrij opgelost in de hemolymfe (bloed) van geleedpotigen (arthropoden) en weekdieren (mollusken) voorkomt. Het is een van de drie types zuurstoftransporteurs die in de natuur voorkomen. Van de twee andere ademhalingspigmenten, hemoglobinen en hemerythrinen, is al veel over de structuur en functie bekend. Het hemocyanine-onderzoek in Groningen werd gestart door E.F.J. van Bruggen met elektronenmicroscopisch onderzoek. Later is hieruit een samenwerkingsproject van twee researchgroepen voortgekomen met als doel, de structuur van het relatief eenvoudige hemocyanine van de langoest *Panulirus interruptus* op atomair niveau te beschrijven en met deze kennis de relatie tussen structuur en functie van dit eiwit te bestuderen. In de groep van J. Drenth en W.G.J. Hol wordt door middel van röntgendiffractie de driedimensionale structuur bepaald. Voor een volledige en betrouwbare interpretatie van de elektronendichtheidsverdeling in het eiwitmolecule moet men echter tevens de aminozuurvolgorde kennen, en die wordt opgehelderd in de groep van J.J. Beintema.

Het hemocyanine van *Panulirus interruptus* bestaat uit hexameren die opgebouwd zijn uit drie verschillende typen subeenheden, aangeduid als a, b en c, elk met een molekulgewicht van ongeveer 77.000. Het onderzoek van de aminozuurvolgorde is door J.M. Vereijken gestart met een beperkte splitsing van subeenheid a met trypsine. Deze leverde twee grote fragmenten op, een N-terminaal 18 kDa-fragment en een C-terminaal 55 kDa fragment, en een koolhydraat-bevattend peptide van dertien aminozuren daar tussenin. De aminozuurvolgorde van het 18 kDa-fragment werd bepaald door N.M. Soeter (dissertatie, Rijksuniversiteit Groningen, 1986), en die van het suikerbevattende peptide en de eerste 55 aminozuren van het 55 kDa-fragment door J.M. Vereijken.

De bepaling van de aminozuurvolgorde van de rest van het 55 kDa-fragment, en daarmee tevens van de gehele subeenheid a, staat beschreven in Hoofdstuk 2. Onderzoek van de aminozuurvolgorde van subeenheid b (P.A. Jekel) en c (B. Neuteboom) werd later gestart.

Ondertussen bepaalden W.P.J. Gaykema, W.G.J. Hol en medewerkers de elektronendichtheidsverdeling met een oplossend vermogen van 0.32 nm. In de Inleiding en in Hoofdstuk 3 staat deze structuur schematisch beschre-

ven. De polypeptideketen bestaat uit 657 aminozuren en blijkt opgevouwen te zijn in drie structurele eenheden (domeinen). Het eerste en tweede domein bevatten veel  $\alpha$ -helices, terwijl het grootste deel van het derde domein uit een tonvormige structuur ("barrel") bestaat, die gevormd wordt door zeven antiparallelle  $\beta$ -strengen. Vanuit deze tonstructuur lopen twee lange lussen die de beide andere domeinen als het ware omarmen. Het tweede domein bevat het actieve centrum met de twee koperatomen, die elk geligandeerd worden door drie imidazoolgroepen afkomstig van histidineresten. Twee van de histidines van elk koperatoom komen voor in een -His-X-X-X-His- volgorde gelegen in een  $\alpha$ -helix. Andere binucleaire kopereiwitten, zoals tyrosinase, laccase en ceruloplasmine, bevatten eveneens -His-X-X-X-His- volgordes die mogelijk betrokken zijn bij de koperbinding.

Aminozuurvolgordes zijn niet alleen nuttig voor de bestudering van de relatie tussen structuur en functie, maar kunnen ook gebruikt worden voor onderzoek naar de evolutie van verwante eiwitten. Terwijl de opheldering van de aminozuurvolgorde vorderde werd daarom de, destijds gedeeltelijk bekende, volgorde van subeenheid a vergeleken met die van zes andere hemocyanine-subeenheden van arthropoden, van zowel cheliceraten (spinnen, schorpioenen en degenkrabben) als van een andere crustacee (een zoetwaterkreeft), aan de hand van de driedimensionale structuur van het hemocyanine van *Panulirus interruptus* (Hoofdstuk 3). Later, toen de gehele primaire structuur bekend was geworden en er tevens meer bekend was over de andere twee subeenheden van de langoest, kon er een meer complete vergelijking gemaakt worden (Hoofdstuk 4). Op 17 procent van de posities komt bij alle ketens hetzelfde aminozuur voor. De overeenkomst tussen de hemocyanineketens is, zoals te verwachten viel, het grootst in het tweede domein, dat het actieve centrum bevat. Een frappant verschil in structuur tussen de hemocyaninen van beide genoemde groepen is een 21 aminozuurresten lange insertie in het eerste domein bij de crustaceeën. Uit de overeenkomst tussen de aminozuurvolgordes blijkt dat de algemene architectuur van de polypeptideketens van alle arthropoden-hemocyaninen gelijk is. Daar de cheliceraten en de crustaceeën ongeveer 600 miljoen jaar geleden zijn afgesplitst uit een gemeenschappelijke voorouder, moet deze structuur dus minstens 600 miljoen jaar oud zijn.

Enkele structurele verschillen tussen de subeenheden a, b en c staan beschreven in Hoofdstuk 4 en in Tabel 1 van Hoofdstuk 1. De subeenheden

a en b verschillen slechts een paar procent in aminozuurvolgorde; de posities van de zwavelbruggen zijn gelijk en er zit koolhydraat op dezelfde plaats aangehecht. Dit verklaart waarom er weinig problemen waren met de interpretatie van de elektronendichtheidsverdeling, hoewel die was bepaald met kristallen bestaande uit een mengsel van subeenheid a en b. Anders is het met subeenheid c, waar op 40 procent van de posities een ander aminozuur voorkomt; geen van de drie zwavelbruggen zoals die voorkomen in subeenheid a wordt gevonden in subeenheid c, en er zit koolhydraat op een totaal andere plaats aangehecht.

Met behulp van SDS-polyacrylamidegelelektroforese zijn in het verleden molekuulmassa's bepaald van de drie subeenheden: respectievelijk 94, 90 en 80 kilodalton voor subeenheid a, b en c. Tijdens het onderzoek bleek echter al vrij snel dat deze waarden niet juist zijn. De drie ketens zijn namelijk ongeveer even lang en hebben elk een molekulgewicht van ongeveer 77.000. Het gedeelte van de polypeptideketen dat verantwoordelijk is voor de overschatting op polyacrylamidegels kon gelokaliseerd worden aan het C-uiteinde van de keten, in het 55 kDa-fragment, waarvan het molekulgewicht ook overschat wordt op SDS-polyacrylamidegels. In Hoofdstuk 5 staat een verkennend onderzoek beschreven naar de oorzaken van dit afwijkende gedrag. Het verschil in gedrag tussen de subeenheden a en b kon herleid worden tot de aanwezigheid van een negatief geladen aminozuur op positie 579 in de a-keten. Andere negatief geladen aminozuren blijken verantwoordelijk te zijn voor het verschil tussen subeenheden a en b enerzijds en subeenheid c anderzijds. Mogelijk is een synergistisch effect van over de polypeptideketen verdeelde negatief geladen aminozuren en prolineresten verantwoordelijk voor het afwijkende gedrag van subeenheid a en b op SDS-polyacrylamidegels.

De introductie van een betrekkelijk nieuwe techniek om aminozuurvolgordes volgens de Edman-degradatie met de hand te bepalen, ontwikkeld door J.Y. Chang, heeft het aminozuurvolgorde-onderzoek aanzienlijk versneld. De ervaringen met deze methode en enkele wijzingen in het protocol staan beschreven in Hoofdstuk 6. De aanwezigheid van een specifiek bijproduct kon gebruikt worden om isoleucine van leucine te onderscheiden. Deze twee aminozuren konden namelijk normaal gesproken niet, of moeilijk, met deze methode onderscheiden worden. Verder bleek dat er een nadere, diepgaande analyse nodig is van de chemie van de conversiereactie in de Edman-degradatie.