

University of Groningen

Structure of panulirus interruptus hemocyanin and evolution of arthropod hemocyanin

Soeter, Petronella Maria

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:

1986

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

Citation for published version (APA):

Soeter, P. M. (1986). *Structure of panulirus interruptus hemocyanin and evolution of arthropod hemocyanin*. 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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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 voorkomt in de hemolymfe van arthropoden (geleedpotigen) en mollusken (weekdieren). Van de andere twee groepen van ademhalingspigmenten, hemoglobinen en hemerythrinen, is de structuur al geruime tijd bekend. Dit proefschrift handelt over de structuurbepaling van een hemocyanine. Het hemocyanine-onderzoek in Groningen werd gestart door E.F.J. van Bruggen met een elektronenmicroscopisch onderzoek. Hieruit is een samenwerkingsproject van twee researchgroepen voortgekomen, met als doel de structuur van het betrekkelijk eenvoudige hemocyanine van de langoest *Panulirus interruptus* te beschrijven op atomair niveau en het verband tussen structuur en functie van dit ademhalingspigment te bestuderen. In de groep van J. Drenth en W.G.J. Hol wordt de driedimensionale structuur van het eiwit bestudeerd door middel van röntgendiffractie. Voor de volledige interpretatie van de elektronendichtheidsverdeling is echter tevens kennis van de aminozuurvolgorde nodig. Deze volgorde wordt bepaald in de groep van J.J. Beintema.

Hemocyanine van *Panulirus interruptus* bestaat uit hexameren die opgebouwd zijn uit drie verschillende typen subeenheden, a, b en c genaamd. De drie ketens hebben elk een molecuulgewicht van ongeveer 75.000. In Hoofdstuk 2 wordt beschreven hoe de bepaling van de aminozuurvolgorde van de a-keten werd gestart door de natieve keten onder milde omstandigheden te splitsen met trypsine. Deze behandeling levert twee grote fragmenten op, een N-terminaal 18K-fragment en een C-terminaal 55K-fragment, en een suikerbevattend peptide van dertien aminozuren. De zuivering en karakterisering van deze fragmenten wordt beschreven.

De bepaling van de primaire structuur van het 18K-fragment is onderdeel van Hoofdstuk 3. Een deel van de aminozuurvolgorde van het 55K-fragment werd bepaald door J.M. Vereijken. Opheldering van de aminozuurvolgorde van het resterende deel van dit fragment is het onderwerp van het promotie-onderzoek van H.J. Bak.

Terwijl de bepaling van de primaire structuur vorderde, slaagden W.P.J. Gaykema en W.G.J. Hol erin de kristalstructuur te bepalen met een oplossend vermogen van 3.2 Å. In Hoofdstuk 4 is de structuur met

... van een deel van de aminozuurvolgorde van de a-keten in de elektronendichtheidsverdeling beschreven. Elk van de zes ketens van het hexameer bevat ongeveer 660 aminozuren en blijkt opgevouwen te zijn in drie domeinen van ongeveer gelijke grootte. Het eerste en tweede domein bevatten veel alfa-helices, maar het grootste deel van het derde domein wordt gevormd door zeven beta-strengen die samen een tonvormige structuur ("barrel") vormen; van hieruit lopen twee lange lussen die de andere twee domeinen als het ware omarmen. In het midden van het tweede domein ligt het actieve centrum. De twee koperionen worden elk geligandeerd door drie histidineresten. Twee van de histidines van elk koperion komen voor in een -His-X-X-X-His- volgorde gelegen in een helix. In de reeds bekende volgordes van andere binucleaire kopereiwitten, zoals tyrosinase, ceruloplasmine en laccase, liet zich nu eveneens een -His-X-X-X-His- volgorde aanwijzen; mogelijk zijn ook deze histidines betrokken bij het actieve centrum. In Hoofdstuk 3 wordt de tertiaire structuur van het eerste domein, dat het 18K-fragment en het korte suikerpeptide bevat, meer gedetailleerd bekeken in het licht van de primaire structuur. Cys-93 en Cys-98 vormen samen een disulfidebrug. Suiker is covalent gebonden aan Asn-167.

Niet alleen komt men uit de aminozuurvolgordes meer te weten over het verband tussen structuur en functie, ook kan men op grond hiervan uitspraken doen over de evolutie van eiwitten, in dit geval van hemocyanines van arthropoden. Daartoe werd de volgorde van de a-keten van *Panulirus interruptus* vergeleken met de aminozuurvolgorde van zes andere hemocyanine subunits, en wel van crustaceeën en cheliceraten (spinnen, degenkrabben, schorpioenen) in het licht van de driedimensionale structuur van hemocyanine van *Panulirus* (Hoofdstuk 5). Op 17 procent van de posities komt in alle ketens hetzelfde aminozuur voor. Dit geldt bijvoorbeeld voor het merendeel van de glycines. De overeenkomst tussen de hemocyanineketens is, zoals verwacht, het grootst in het tweede domein, dat de zes koperliganderende histidines bevat. Uit de overeenkomst in aminozuurvolgorde blijkt de opvouwing van de polypeptideketen dezelfde te zijn in alle hemocyanines van arthropoden. Deze structuur moet dus op zijn minst 600 miljoen jaar oud zijn, daar het zo lang geleden is dat de crustaceeën en cheliceraten divergeerden. De meeste verschillen tussen de crustaceeën en cheliceraten worden gevonden in het eerste domein. Naast een N-terminale verlenging met vijf

aminozuren hebben de crustaceeën Panulirus interruptus en Astacus leptodactylus, een rivierkreeft, een 21 aminozuurresten lange lus gemeen, van Tyr-22 tot Asp-42, die helix 1.2 bevat. Deze lus ontbreekt in de cheliceraten. In Hoofdstuk 3 wordt een mogelijke verbinding van de polypeptideketen tussen helix 1.1 en helix 1.3 in de cheliceraten voorgesteld, waarbij de rest van de driedimensionale structuur gelijk kan blijven aan die in de crustaceeën.

Teneinde een vergelijking te kunnen maken tussen de drie ketens van hemocyanine van Panulirus interruptus, werd getracht op een snelle manier informatie over de aminozuurvolgorde van subeenheid b en c te verkrijgen (Hoofdstukken 6 en 7).

In Hoofdstuk 6 is de bepaling van de aminozuurvolgorde van ongeveer tweederde deel van de b-keten van hemocyanine van Panulirus interruptus beschreven. Het verschil in aminozuurvolgorde tussen de a- en de b-keten blijkt minder dan vijf procent te zijn. Suiker is aanwezig op dezelfde plaats in de polypeptideketen en hetzelfde geldt voor de drie S-S bruggen. Dit geringe verschil verklaart waarom er geen ernstige problemen waren bij de bepaling van de driedimensionale structuur, ondanks het feit dat daarbij kristallen gebruikt werden, bestaande uit een mengsel van a- en b-keten. In Hoofdstuk 3 is aandacht gegeven aan het inpassen in de elektronendichtheidsverdeling van de aminozuren, voorkomend in het eerste domein, die verschillen in de twee ketens. De meest ingrijpende verandering die tot nu toe is gevonden is die op positie 163, waar een glutaminerest in de a-keten is vervangen door een prolinerest in de b-keten.

In Hoofdstuk 7 wordt na een korte samenvatting van eerdere onderzoeksresultaten betreffende hemocyanine van Panulirus interruptus een vergelijking gemaakt tussen de aminozuurvolgordes van de drie ketens a, b en c onderling. Vervolgens worden deze drie ketens vergeleken met de b-keten van Astacus leptodactylus. En tot slot worden in dit hoofdstuk, in aanvulling op Hoofdstuk 5, de aminozuurvolgordes van de hemocyanines van de crustaceeën nogmaals vergeleken met die van de cheliceraten, maar nu met een volledige a-keten en met informatie over de b- en de c-keten van hemocyanine van Panulirus interruptus.

Hoofdstuk 8 is een gepopulariseerde versie van Hoofdstuk 5 in het Nederlands. Dit hoofdstuk kan gelezen worden als een uitbreiding van deze samenvatting.

3483
1281