

University of Groningen

Electron microscopic studies on structure and function of arthropod hemocyanins

de Haas, Felix

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:

1993

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

Citation for published version (APA):

de Haas, F. (1993). *Electron microscopic studies on structure and function of arthropod hemocyanins*. 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

In bepaalde invertebraten (ongewervelde dieren) behorende tot de arthropoden (geleedpotigen) en de mollusken (weekdieren) komt in het bloed hemocyanine (Hc) voor, een eiwit dat dezelfde functie heeft als hemoglobine (Hb) bij andere diersoorten. Hc zorgt voor transport van zuurstof naar de weefsels en van afvalprodukten, zoals koolzuurgas, van de weefsels. Hc geeft het bloed een blauwe kleur, wanneer zuurstof wordt gebonden. Hieraan heeft het zijn naam te danken. Het bloed wordt weer kleurloos, als het zuurstof heeft afgegeven. De blauwe kleur wordt veroorzaakt door het complex dat zuurstof met twee koper ionen vormt. Net als bij Hb is de zuurstofbinding bij Hc vaak coöperatief. Na binding van de eerste zuurstof wordt de affiniteit voor verdere binding van zuurstof verhoogd. Hc kan onder invloed van uitwendige factoren, zoals de zuurstofconcentratie, in verschillende structuren met een hogere of lagere affiniteit voor zuurstof voorkomen. De mogelijkheid om de affiniteit voor zuurstof te kunnen regelen is belangrijk voor het opnemen van zuurstof in de ademhalingsorganen en het afgeven ervan in de weefsels.

Arthropood Hc ziet er anders uit dan mollusk Hc. Mollusk Hc van bijvoorbeeld *Octopus vulgaris* (een inktvis) heeft ongeveer de vorm van een holle cilinder met een diameter van 33 nm en een hoogte van 19 nm. Als dit Hc gesplitst wordt blijkt het opgebouwd te zijn uit 10 monomeren. Daarentegen heeft arthropood Hc van bijvoorbeeld *Panulirus interruptus* (een langoest) de vorm van een zeszijdig prisma met een diameter van 12 nm en een hoogte van 10 nm. Dit zeszijdig prisma is opgebouwd uit zes boonvormige monomeren die onderling kleine verschillen kunnen vertonen in hun structuur. De zes monomeren vormen twee trimeren, die onderling geroteerd over 60° met de ruggen tegen elkaar liggen. Uit Röntgendiffractie onderzoek blijkt dat de structuur van een monomeer kan worden verdeeld in 3 domeinen (domein 1, 2 en 3). Voor verschillende arthropood Hcs blijkt de globale structuur van het hexameer behouden te blijven. Deze dient als bouwsteen voor de grotere arthropood Hcs, die dus een multihexamere structuur bezitten.

In dit proefschrift passeren verschillende onderzoeken van arthropood Hc de revue. Hierbij wordt gekeken naar de structurele veranderingen onder invloed van zuurstof, naar de immunogene eigenschappen en naar de verschillen in organisatie van multihexamere Hcs.

Onlangs zijn veranderingen in de structuur van Hc aangetoond met Röntgendiffractie (Hazes *et al.*, 1993) en Röntgenverstrooiing (Decker, 1991). Er zijn nu op atomair niveau

drie structuren bekend: twee structuren van sube met en zonder zuurstof verschillen zijn gevond

In het tweede h beeldverwerking versch oplossing van het eiwit in zuurstof (deoxy-aanzich aanzichten geanalyseerd drietallige as. Vergelijk projectie berekend op bas zien. Zo blijken zes klein met bepaalde α -helices i

Na classificatie van van het aantal oxy-aanzic verschilt. Deze verschill de structuur van het mor gaan waar de drie domei zien dat meer kleuringsm aanzichten. Het zou kunr van de domeinen 2 en 3 (de monomeren ontstaat. H de trimeren is te klein onvoldoende.

De Röntgenstructuur toestand met een hoge aff de aanzichten, gesimuleer uit de beeldverwerking gee wij aannemen dat het de dec met cryo-EM, indien moge omstandigheden (variëren van een verklaring voor de oxy- en deoxy-preparaten een kantelserie van 2-D kri cilinderstructuren) tot de m

Van de immunogene medisch testen van het im

drie structuren bekend: de structuur van *Panulirus interruptus* Hc zonder zuurstof en twee structuren van subeenheid II van *Limulus polyphemus* (degenkrab) Hc respectievelijk met en zonder zuurstof. Beide *Limulus* structuren lijken veel op elkaar. De grootste verschillen zijn gevonden tussen *Limulus* Hc en *Panulirus* Hc.

In het tweede hoofdstuk is getracht met elektronenmicroscopie (EM) en beeldverwerking verschillen in de structuur van *Panulirus* Hc aan te tonen door een oplossing van het eiwit in aanwezigheid van zuurstof (oxy-aanzicht) of afwezigheid van zuurstof (deoxy-aanzicht) te prepareren. Daarbij zijn voorlopig alleen de zeshoekige aanzichten geanalyseerd. In dit aanzicht kijkt men naar een projectie van Hc langs de drietallige as. Vergelijking van de uit beeldverwerking verkregen aanzichten met een projectie berekend op basis van de Röntgenstructuur laat karakteristieke overeenkomsten zien. Zo blijken zes kleine uitstulpingen aan de rand van de zeshoek overeen te komen met bepaalde α -helices in de atomaire structuur.

Na classificatie van de zeshoekige aanzichten in zes klassen blijkt dat de verhouding van het aantal oxy-aanzichten tot het totaal aantal oxy- + deoxy-aanzichten per klasse verschilt. Deze verschillen worden waarschijnlijk veroorzaakt door veranderingen in de structuur van het monomeer. Door vergelijking met de Röntgenstructuur is na te gaan waar de drie domeinen zich in de zeshoekige aanzichten bevinden. Verder is te zien dat meer kleuringsmiddel aanwezig is bij de klasse met de laagste fractie oxy-aanzichten. Het zou kunnen dat er door de $7,5^\circ$ draaiing van domein 1 ten opzichte van de domeinen 2 en 3 (Hazes *et al.*, 1993) meer ruimte voor kleuringsmiddel tussen de monomeren ontstaat. Het gevonden verschil van 3° in de onderlinge oriëntatie van de trimeren is te klein om in de aanzichten waar te nemen, daarvoor is de resolutie onvoldoende.

De Röntgenstructuur van *Panulirus* Hc correspondeert vermoedelijk met de deoxy-R toestand met een hoge affiniteit voor zuurstof (Hazes *et al.*, 1993). Vergelijking van de aanzichten, gesimuleerd op basis van deze *Panulirus* structuur, met de aanzichten uit de beeldverwerking geeft echter een grotere overeenkomst met het aanzicht waarvan wij aannemen dat het de deoxy-T toestand (met lage affiniteit voor zuurstof) is. Onderzoek met cryo-EM, indien mogelijk aan 2-D kristallen, van *Panulirus* Hc onder verschillende omstandigheden (variëren van pH, Cl⁻, O₂, enz.) zal kunnen bijdragen aan het vinden van een verklaring voor deze tegenstrijdige resultaten. Verder behoren cryo-EM aan oxy- en deoxy-preparaten van multihexamere arthropood Hcs (3-D reconstructie via een kantelserie van 2-D kristallen) en van mollusk Hcs (3-D reconstructie via helische cilinderstructuren) tot de mogelijkheden voor verder onderzoek.

Van de immunogene eigenschappen van Hc wordt vaak gebruik gemaakt bij het medisch testen van het immuunsysteem. In hoofdstuk 3 gaat het om lokalisatie en

karakterisering van die gebieden op het oppervlak van *Panulirus* Hc, waar de produkten van het immuunsysteem, de antilichamen, binden. De bedoeling is om deze kennis te gebruiken voor het rationeel ontwerpen van vaccins met specifieke eigenschappen.

Via EM van Hc/antilichaam complexen zijn voor twee monoclonale antilichamen deze bindingsplaatsen, epitopen genoemd, op het hexameer gelokaliseerd. Voor de lokalisatie is tevens gebruik gemaakt van aanwijzingen verkregen uit biochemische experimenten met complexen van deze monoclonale antilichamen en fragmenten van het monomere Hc. De twee antilichamen bleken te binden aan twee verschillende elkaar niet overlappende epitopen, respectievelijk gelegen op domein 1 en op domein 3. Verder onderzoek voor nadere karakterisering van de epitopen zal nodig zijn. De beperkte resolutie van de beelden laat het niet toe de Hc/antilichaam-interactie op aminozuurniveau te bestuderen. Wel kon met behulp van de bekende *Panulirus* structuur een aanwijzing worden verkregen, welke gedeelten van de eiwitketen mogelijk betrokken zijn bij deze interactie. In beide gevallen blijken dit lussen te zijn met een hoog percentage aan geladen aminozuren.

Zoals reeds vermeld kunnen arthropood Hcs uit meer dan één hexameer bestaan. De architectuur van deze multihexamere Hcs blijkt van soort tot soort te verschillen. Binnen een soort is de opbouw van een multihexameer uit hexameren meestal gelijk. In hoofdstuk 4 zijn twee 2x6-mere Hcs onderzocht van *Cancer pagurus* (Noordzee krab, een crustacea) en van *Eurypelma californicum* (vogelspin, een cheliceraat). Door combinatie van EM met gegevens uit de Röntgendiffractie (de structuur van *Panulirus* Hc) is de quaternaire structuur van beide 2x6 Hcs bepaald. De interhexamere contacten zijn gekarakteriseerd op domeinniveau. Zo is gevonden dat de drietallige rotatie-assen van beide hexameren niet alleen loodrecht op elkaar staan, maar ook ongeveer loodrecht staan op de lichaamsas, die de centra van beide hexameren verbindt. Het verschil wordt gevormd door de onderlinge stand van één der tweetallige symmetrieassen van elk der beide hexameren. Deze staan in *Cancer* Hc ongeveer parallel aan de lichaamsas en in *Eurypelma* Hc loodrecht op de lichaamsas. Verder blijkt in *Cancer* Hc hoofdzakelijk domein 3 betrokken te zijn bij de interactie tussen beide hexameren, terwijl in *Eurypelma* half Hc zowel domein 1 als domein 3 hierbij een rol spelen. De oriëntatieverschillen kunnen aannemelijk gemaakt worden door te kijken naar verschillen in aminozuurvolgorde tussen crustacea Hc en cheliceraat Hc. Op bepaalde plaatsen in de eiwitketens van cheliceraat Hc ontbreken volgordes die wel op vergelijkbare plaatsen in crustacea Hcs aanwezig zijn (Linzen, 1985). Deze stukken polypeptideketen vormen waarschijnlijk in *Cancer* Hc een sterische belemmering voor de hexameren om een zelfde 2x6-mere architectuur aan te nemen als in *Eurypelma* Hc, omdat ze juist in het interhexamere contactvlak gelokaliseerd zijn.

Hoofdstuk 5 gaat over de structuur van Hc. Hc komt in het bloed voor in verschillende vormen. Modellen worden gemaakt voor de analyse van de gemiddelde structuren "Flip" en "Flop". Hierbij worden contactvlakken gevonden op het oppervlak van vier hexameren voor F. De betrouwbaarheid van de modellen wordt elektronendichtheid in de beelden getoetst. Deze lage dichtheid heeft tot het ontbreken van de eiwitketen. Kennelijk zijn de Hcs, waarbij hun positie niet bekend is, wordt.

Tevens verklaart de structuur van Hc aan het oppervlak van *Panulirus* Hc het onderzoek van de *Eurypelma* Hc van deze koolhydraatketen. Inderdaad zijn er verschillen in *Eurypelma* Hc.

Een ander interessant aspect is de vorming van twee parallele α -helices via een kleine rotatie van de structurele veranderingen bij de binding van zuurstof. De opening van de acetylcholinesterase van 5 parallele α -helices wordt.

Vergelijking van de structuur van *Eurypelma* half Hc met die van *Panulirus* Hc van 20° tot 40° in de oriëntatie. Dit wijst op een behoorlijke structuur. Of dit van functioneel belang is, kan variëren onder invloed van de persoonlijke communicatie.

Het interdodecamere contactvlak. Het blijkt dat een gebied van de eiwitketen met daarin domein 3, bij de binding van de dan de vorige. Deze inter-

Hoofdstuk 5 gaat dieper in op de interhexamere contacten in *Eurypelma* Hc. Dit Hc komt in het bloed voor als 4x6-meer, waarbij twee 2x6-meren tezamen een 4x6-meer vormen. Modellen worden afgeleid voor twee quaternaire structuren op basis van de analyse van de gemiddelde beelden van twee verschillende bovenaanzichten genaamd "Flip" en "Flop". Hierbij worden identieke aminozuurcontacten op de intradodecamere contactvlakken gevonden, hoewel de parameters voor de oriëntatie en positie van de vier hexameren voor Flop1 en Flip2 verschillen. Dit verschaft enig inzicht in de betrouwbaarheid van de uitkomsten. Het is opvallend dat juist gebieden met lage elektronendichtheid in de Röntgenstructuur betrokken zijn bij deze interhexamere contacten. Deze lage dichtheid heeft vaak te maken met een hoge flexibiliteit van dat gedeelte van de eiwitketen. Kennelijk spelen zulke gebieden een rol bij de formatie van multihexamere Hcs, waarbij hun positie door electrostatische en hydrofobe interacties gestabiliseerd wordt.

Tevens verklaart de aanwezigheid van een koolhydraatketen op een bepaalde plaats aan het oppervlak van *Panulirus* Hc waarom dit eiwit geen multihexameren vormt. Uit het onderzoek van de *Eurypelma* 4x6-meer blijkt namelijk dat de bindingplaats plaats van deze koolhydraatketen midden in een belangrijk intradodecameer contact terecht komt. Inderdaad zijn er geen aanwijzingen voor de aanwezigheid van koolhydraat in *Eurypelma* Hc.

Een ander interessant intradodecameer contact, tussen subeenheden *b* en *c*, wordt gevormd door twee parallel georiënteerde helixparen uit domein 1. Beide subeenheden vormen een domein 1 - domein 1 contact. Het idee is nu geopperd dat deze vier parallelle helices via een kleine rotatie rond de lokaal aanwezige pseudo-tweetallige symmetrie als de structurele veranderingen doorgeven, die samenhangen met het coöperatieve gedrag bij de binding van zuurstof. Dit mechanisme doet denken aan het mechanisme voor de opening van de acetylcholine receptor, zoals voorgesteld door Unwin (1993), waarbij 5 parallelle α -helices betrokken zijn.

Vergelijking van de onderlinge oriëntatie van de hexameren binnen een dodecameer van *Eurypelma* half Hc en heel Hc (hoofdstukken 4 en 5) toont aan, dat er een verschil van 20° tot 40° in de onderlinge stand van de drietallige symmetrieassen gemeten is. Dit wijst op een behoorlijke flexibiliteit langs de lange lichaamsas van de dodecameer. Of dit van functioneel belang is valt te betwijfelen. Het is bekend dat deze hoek kan variëren onder invloed van oppervlakte spanningen tijdens het prepareren voor EM (Boisset, persoonlijke communicatie).

Het interdodecamere contactvlak is groter dan verwacht uit eerdere modelbouw. Het blijkt dat een gebied vanaf het centrum van het hexameer (domein 2) tot de rand, met daarin domein 3, bij dit contact betrokken is. Deze waarneming is minder betrouwbaar dan de vorige. Deze interdodecamere contacten blijken namelijk nogal te verschillen

voor de geanalyseerde Flop en Flip structuren. Dit kan ook een gevolg zijn van het prepareren. Daarom is dit contactgebied niet in meer detail geanalyseerd.

Voor het verminderen van structurele deformaties als gevolg van de preparatie methode lijkt het zeer snel invriezen van een oplossing met het te bestuderen molecuul in zijn native omgeving in combinatie met cryo-EM een beter alternatief.

Deze studie geeft aan dat door een combinatie van lage resolutie informatie uit EM plus beeldverwerking met hoge resolutie informatie uit Röntgendiffractie een vrij gedetailleerd beeld verkregen kan worden omtrent de interacties tussen de monomeren in een multimeer macromolecuul.

Referenties

- Decker, H. (1991). Nested allostery in arthropod hemocyanins. In *Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers* (Vinogradov, S.N. & Kapp, O.H., eds.) pp. 89-98, Springer Verlag, Berlin.
- Hazes, B., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K.H. & Hol, W.G.J. (1993). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Science* **2**, 597-619.
- Linzen, B., Soeter, M.N., Riggs, A.F., Schneider, H.J., Schartau, W., Moore, M.D., Yokata, E., Behrens, P.Q., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., Vereijken, J.M., Bak, H.J., Beintema, J.J., Volbeda, A., Gaykema, W.P.J. & Hol, W.G.J. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science* **229**, 519-524.
- Unwin, N. (1993). Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **229**, 1101-1124.

93024588