

University of Groningen

**P-hydroxybenzoate hydroxylase. Determination of the amino acid sequence and its integration with the crystal structure.**

Hofsteenge, Jan

**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:*  
1981

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

*Citation for published version (APA):*

Hofsteenge, J. (1981). P-hydroxybenzoate hydroxylase. Determination of the amino acid sequence and its integration with the crystal structure. 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).

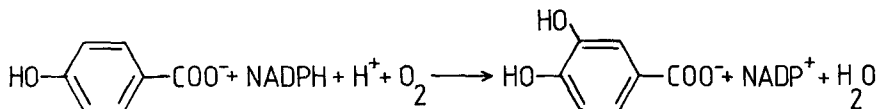
**Take-down policy**

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

Het enzym p-hydroxybenzooat hydroxylase katalyseert een belangrijke reactie in de metabolische weg voor de afbraak van aromatische verbindingen ( $\beta$ -ketoadipaat route):



Het enzym bevat flavine adenine dinucleotide (FAD). De flavine wordt tijdens de reactie gereduceerd door NADPH, waarna het een covalent complex vormt met zuurstof. Eén van de zuurstofatomen wordt overgedragen aan het substraat, terwijl het andere wordt afgesplitst in de vorm van water.

De opheldering van de primaire structuur van dit enzym, waarvan een gedeelte in dit proefschrift is beschreven, is ons aandeel in een samenwerkingsproject met twee andere Nederlandse researchgroepen: De groep van F. Müller (Landbouw Hogeschool Wageningen) bestudeert het enzym met behulp van fysisch-chemische technieken en heeft een efficiënte isolatieprocedure voor dit eiwit ontwikkeld. De kristalstructuur van het geoxideerde enzym-substraat complex werd door R.K. Wierenga in de groep van J. Drenth en W.G.J. Hol bepaald tot een oplossend vermogen van 0.25 nm.

Voor de volledige interpretatie van de elektronendichtheidsverdeling, is kennis van de aminozuurvolgorde een vereiste. Aan de andere kant is bij de opheldering van de primaire structuur, veel gebruik gemaakt van informatie uit de elektronendichtheid. Dit resulteerde in de nauwe en zeer stimulerende samenwerking tussen de twee groepen onderzoekers.

*Aminozuurvolgorde.*

De polypeptideketen werd met behulp van cyaanbromide gesplitst in zeven fragmenten, variërend in lengte van 1 tot 167 aminozuren. De bepaling van de aminozuurvolgorde van het

N-terminale deel van het eiwit (residu 1-138) werd uitgevoerd in nauwe samenwerking met J.M. Vereijken en H.J. Bak, die van het C-terminale deel (residu 278-395) samen met P.A. Jekel. De opheldering van de aminozuurvolgorde van het tussenliggende gedeelte is het promotieonderzoek van W.J. Weijer.

Bij de bepaling van de primaire structuur van de CNBr peptiden werd gebruik gemaakt van klassieke methoden van volgordebepaling: verdere vertering met een protease met beperkte substraatspecificiteit (voornamelijk trypsine, chymotrypsine, proteïnase van *Staphylococcus aureus* V8 en thermolysine), fractionering van het mengsel van peptiden en bepaling van de aminozuurvolgorde van de verkregen peptiden door middel van automatische en manuele Edman degradatie.

De onderlinge rangschikking van de CNBr fragmenten kon worden vastgesteld op grond van de elektronendichtheidsverdeling. Dit resulteerde in de (nu nagenoeg) complete aminozuurvolgorde van het eiwit. De lengte van de polypeptideketen (395 aminozuren) is in goede overeenstemming met het molekuulgewicht, zoals dat werd bepaald met andere methoden (circa 44000). De aminozuurvolgorde van de CNBr peptiden past opmerkelijk goed in de elektronendichtheidsverdeling. Dit verhoogt de betrouwbaarheid van de resultaten van zowel de aminozuurvolgordebepaling als de röntgenanalyse aanmerkelijk. Er waren slechts geringe wijzigingen in de originele interpretatie van de elektronendichtheid, of in de aminozuurvolgorde noodzakelijk.

#### *De binding van FAD en Substraat.*

Het adenosine gedeelte van de FAD is gebonden aan een zogenaamde " $\beta\alpha\beta$ -unit". Voor een ander FAD bevattend enzym, D-aminozuur oxidase, kon een soortgelijke structuur worden voorspeld, op grond van de vergelijking van de aminozuurvolgorde in het N-terminale gebied met die van p-hydroxybenzoesaat hydroxylase.

De negatieve lading van de pyrofosfaat groep van de FAD

wordt gecompenseerd door twee arginine residuen en door het dipoolmoment van een  $\alpha$ -helix. De ribitylgroep en de isoalloxazine ring maken meerdere waterstofbruggen met hoofd- en zijketen atomen. De isoalloxazine ring is gebonden in een hydrofobe holte, met het pyrimidine gedeelte begraven in het eiwit. In deze holte wordt ook het substraat gebonden. Een arginine, serine and tyrosine binden de carboxylgroep van het substraat, terwijl twee tyrosine residuen betrokken zijn bij de binding van de hydroxylgroep. Hoewel op grond van modificatiestudies een histidine in de buurt van de hydroxylgroep van het substraat werd verondersteld, werd, althans in het geoxideerde enzym-substraat complex, geen histidine in het actieve centrum gevonden.

*Interakties tussen de monomeren.*

Het enzym komt zowel in oplossing als in het kristal voor als een dimeer, dat is opgebouwd uit identieke subeenheden. De aminozuren die de kontakten tussen de monomeren vormen zijn voornamelijk hydrofoob. In totaal zijn 14 aromatische aminozuren betrokken bij deze hydrofobe interakties. Daarnaast wordt het dimeer gestabiliseerd door twee ionparen en een aantal waterstofbruggen.