



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The relation between dynamics and activity of phospholipase A/acyltransferase homologs

Chatterjee, S.D.

Citation

Chatterjee, S. D. (2022, March 2). *The relation between dynamics and activity of phospholipase A/acyltransferase homologs*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3277998>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3277998>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Fosfolipase A / acyltransferasen (PLAAT's) spelen een belangrijke rol in levende organismen. Het zijn tumoronderdrukkers, ze reguleren obesitas en produceren belangrijke bioactieve lipiden. Nieuwe facetten van deze enzymen worden nog steeds ontdekt en veel van de interne werking van deze enzymen is nog onbekend.

In **hoofdstuk 1** wordt de PLAAT-familie geïntroduceerd, samen met de kennis die de afgelopen twee decennia is opgedaan. PLAAT's zijn een vijfledige familie van enzymen die een gemeenschappelijke secundaire structuur en een sterk geconserveerde sequentie NCEHFV delen. De sequentie bevat het katalytische triade-lid cysteïne, dat fungeert als het nucleofiel tijdens de katalyse. Met uitzondering van PLAAT5 hebben alle PLAAT's een N-terminaal katalytisch domein en een C-terminaal membraanverankerdomoien. De PLAAT's katalyseren de eerste reactiestap die leidt tot de vorming van N-acylethanolamines (NAE's), een belangrijke klasse van bioactieve lipiden die verschillende rollen spelen, zoals ontstekingsremming, katabolisme van vet, anti-apoptotische activiteit, het fungeren als liganden voor endocannabinoïde receptoren, enz. PLAAT3 en PLAAT4 zijn homologen, maar vertonen duidelijke verschillen in hun activiteit en specificiteit. Voor PLAAT3 is het C-terminale domein cruciaal voor PLA_{1/2}-activiteit, terwijl hetzelfde domein niet kritisch is voor deze functie in PLAAT4. Bovendien is het N-terminale domein van PLAAT4 een actiever fosfolipase dat sneller acyl-eiwit-tussenproducten hydrolyseert dan PLAAT3. Fysiologisch reguleert PLAAT3 het triglyceridenmetabolisme in vetweefsel, terwijl PLAAT4 een cruciale rol speelt bij de onderdrukking van tumoren, vooral bij metastase en invasie. Het bestuderen van deze twee eiwitten op moleculair niveau, vormde het doel van dit proefschrift. De twee methoden - NMR-spectroscopie en MD-simulaties, die werden gebruikt om de verschillen op te helderen, worden beschreven in dit hoofdstuk.

In **hoofdstuk 2** worden de inzichten verkregen uit thermostabiliteit, NMR-dynamica-experimenten en zoutbrughanalyse geschetst. PLAAT3 vertoont een hogere thermostabiliteit dan PLAAT4 dankzij de compacte structuur met een goed verspreid netwerk van zoutbruggen, die in PLAAT4 minder zijn en beperkt zijn tot bepaalde regio's. Residu-specifieke snelle (ps) en langzame (ms) tijdschaaldynamica werden bestudeerd met behulp van NMR-spectroscopie, waarbij duidelijk verschillen werden gevonden. Afgezien van de zeer wanordelijke lus L1 in beide enzymen, behoudt PLAAT3 grotendeels een rigide structuur en

vertoont de actieve site geen significante dynamiek. Dit is echter niet het geval bij PLAAT4, dat over het algemeen flexibeler is dan PLAAT3 en waarin de actieve site veel mobieler is. Dit werd afgeleid uit de lage ordeparameters voor residuen die onmiddellijk voorafgaan aan het katalytische nucleofiel C113. De afwezigheid van resonanties voor residuen rond de actieve site duidde op verbreding als gevolg van chemische uitwisseling. Milliseconde tijdschaal-dynamica-experimenten identificeerden ook een dynamisch actief site-gebied met actieve site-residuen. Zo'n dynamische patch wordt niet waargenomen in PLAAT3. We speculeerden dat het verschil in dynamiek de waargenomen activiteitsverschillen PLAAT3 en PLAAT4 kan verklaren. De NTD van PLAAT3 vertoont mogelijk weinig activiteit ten opzichte van zijn substraat vanwege een gebrek aan actieve site-dynamiek, terwijl de dynamiek van PLAAT4 zijn activiteit mogelijk maakt.

Om een model te ontwikkelen van wat de dynamica van PLAAT4 zou inhouden, werden moleculaire dynamica-simulaties gebruikt, waarvan de bevindingen worden gepresenteerd in **hoofdstuk 3**. Waargenomen werd dat de globale RMSD van PLAAT4 hoger was dan PLAAT3, wat suggereert dat de eerste conformationele fluctuaties ondergaat tijdens de simulaties, wat wordt ondersteund door een grotere traagheidsstraal dan die van PLAAT3. Analyse van hoofdcomponenten om essentiële dynamica te bestuderen, toont aan dat PLAAT3 grotendeels een starre conformatie behoudt, vooral een geordende secundaire structuur. In PLAAT4 werden meer gecoördineerde bewegingen waargenomen, vooral in en rond de actieve site. Afgezien van de flexibele lus L1 vertoonden lus L2(B6) en C113S_γ gecorreleerde bewegingen. Een significante herschikking werd waargenomen in L2(B6) en aangezien de α -helix A3, waarvan C113 een onderdeel is, verbonden is met deze lus, maakte de herschikking de actieve site behoorlijk mobiel. De interactie tussen het cysteïne van de katalytische triade en de histidineringsring werd ook tijdens elk van de twee runs verstoord.

De significantie van de lus L2(B6) bij het moduleren van de activiteit werd verder bestudeerd in **hoofdstuk 4**. *In-vitro* en *in-silico* mutagenese werden uitgevoerd om de lus L2(B6) te verwisselen tussen PLAAT3 en PLAAT4. L2(B6)₄-mutatie in PLAAT3 resulteerde in een hogere fosfolipase-activiteit dan in wild-type PLAAT3, door een grotere dynamiek rond de actieve site te introduceren, wat de toegankelijkheid van het substraat vergroot. Als L2(B6)₃ in PLAAT4 wordt geïntroduceerd, neemt echter ook daar de activiteit ook toe. Door MD-simulaties op de L2(B6)-mutanten werd de rol van deze lussen in de algehele dynamiek bestudeerd, wat geen duidelijke verschillen in dynamiek opleverde tussen de wild-type en mutanteiwitten. Levensduuranalyse van zoutbruggen toonde aan dat de introductie van

PLAAT4 L2(B6) in PLAAT3 ervoor zorgde dat 50% van de bestaande zoutbruggen verdwenen. De extra mobiliteit door het ontbreken van zoutbruggen kan cruciaal zijn voor een betere toegankelijkheid van kleine moleculen. Een vergelijkbaar effect werd waargenomen in PLAAT4_L2(B6)₃, waar 50% van de bestaande zoutbruggen in PLAAT4 verdwenen, wat suggereert dat het omwisselen van L2(B6) de chemische omgeving en bestaande zoutbrugnetwerken in zowel PLAAT3 als PLAAT4 verandert. Deze waarneming, samen met de gegevens van de fosfolipase-analyse, ondersteunt sterk onze hypothese dat de L2(B6)-mutatie in PLAAT3 de zoutbruggen herstructureerde en een grotere dynamiek introduceerde rond de actieve site, waardoor de toegankelijkheid voor het substraat werd vergroot.

Hoofdstuk 5 beschrijft een project uitgevoerd met dr. Hugo van Ingen en dat zich richtte op het verwijderen van artefacten bij lage pulsfrequenties in ¹⁵N CPMG-relaxatiedispersie-experimenten geïntroduceerd door gebruik van één enkele ¹H-ontkoppelingsmethode bij alle frequenties. Het langzaam pulserende artefact werd in detail geanalyseerd en er werd aangetoond dat het artefact kan worden onderdrukt door het gebruik van samengestelde pulsontkoppeling (CPD). De prestaties van verschillende CPD-schema's worden gerapporteerd en er werd aangetoond dat CPD-ontkoppeling op basis van het 90x–240y–90x element resulteert in hoogwaardige dispersiekrommen zonder artefacten, zelfs voor amiden met een hoge ¹H offset.

Hoofdstuk 6 beschrijft de algemene discussie over de uitkomsten en inzichten gegenereerd in dit proefschrift.