



Universiteit
Leiden

The Netherlands

New chemical tools to illuminate N-acylphosphatidylethanolamine biosynthesis

Wendel, T.J.

Citation

Wendel, T. J. (2023, March 23). *New chemical tools to illuminate N-acylphosphatidylethanolamine biosynthesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3576707>

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/1887/3576707>

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

Samenvatting

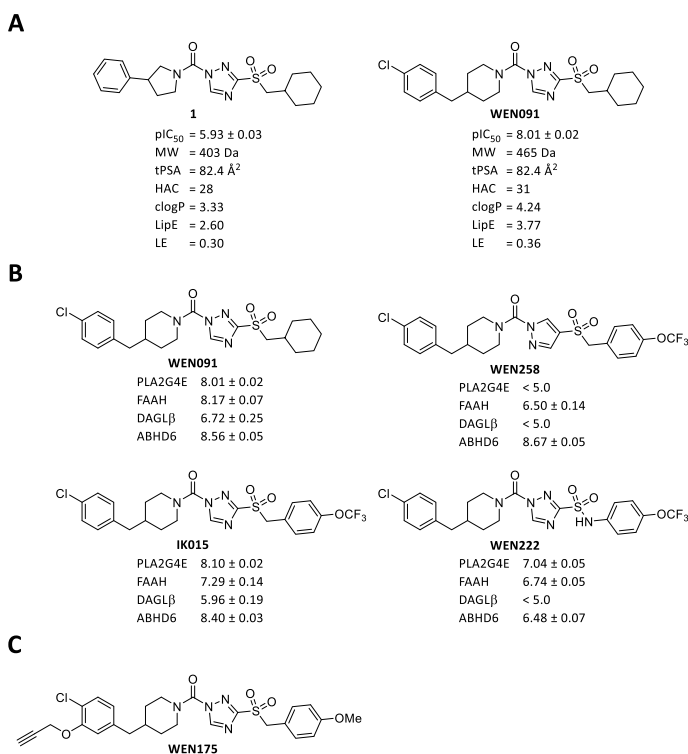
N-acylphosphatidylethanolamines (NAPE's) zijn een veelzijdige lipidenfamilie met uiteenlopende biologische functies, maar ze zijn relatief weinig onderzocht.^{1,2} Van Fosfolipase A2 Groep IV E (PLA2G4E) is recentelijk aangetoond dat het in staat is tot calcium-afhankelijke productie van NAPE's in cellen.^{3,4} PLA2G4E is lid van de PLA2G4-familie, die uit zes serinehydrolases bestaat (PLA2G4A-F).⁵ Deze enzymen worden gekenmerkt door een Ser-Asp katalytische dyade en een N-terminaal, calcium-afhankelijk lipidenbindend C2-domein.^{5,6} PLA2G4E heeft daarnaast een C-terminaal, polybasisch gebied dat betrokken is bij de subcellulaire lokalisatie.⁷ Er is gerapporteerd dat het voornamelijk een *N*-acyltransferase is die in staat is op een calcium-afhankelijke manier NAPE's te synthetiseren.³ Het komt voornamelijk tot expressie in de hersenen, testikelen, skeletspieren en het hart, en er zijn verbanden gelegd tussen het expressieniveau en de ziekte van Alzheimer en paniekstoornissen.^{3,8,9} Daarnaast is gebleken dat het betrokken is bij het terugvoeren van vracht vanuit het clathrine-onafhankelijke endocytosesysteem naar de plasmamembraan.⁷ Het is nog onduidelijk of NAPE's betrokken zijn bij deze functies.

Vooralsnog zijn er geen remmers van PLA2G4E gepubliceerd. PLA2G4E-remmers zouden van pas kunnen komen om de fysiologische rol van dit enzym in NAPE-biologie op te helderen door middel van acute modulatie. Selectieve remmers zijn ook vereist om het therapeutisch potentieel van PLA2G4E-remming vast te stellen. Het overkoepelende doel van dit proefschrift was daarom het ontwikkelen van cellulair actieve remmers van PLA2G4E.

Hoofdstuk 1 geeft een bondig overzicht van de huidige kennis over de biologie van NAPE's en PLA2G4E. NAPE's zijn glycerofosfolipiden met drie vetzuurstaarten. Wanneer die ingebed zitten in lipidenmembranen, kunnen NAPE's betrokken zijn bij de regulatie van membraandynamiek, zoals membraanbuiging, -fusie en interacties met membraan-geassocieerde eiwitten.¹⁰⁻¹⁴ NAPE's kunnen ook dienen als signaalmoleculen. Er zijn hypofage werkingen aan ze toegeschreven, hoewel betwist wordt dat de gerapporteerde effecten daadwerkelijk specifiek voor NAPE's zijn.^{15,16} Hun niveaus zijn opvallend verhoogd in beschadigd weefsel, een effect dat gezien is in bijvoorbeeld hartinfarcten, ischemisch hersenweefsel en ontstoken testikelen.¹⁷⁻¹⁹ Ook zijn ze verhoogd in modellen van neurodegeneratie en is een beschermende rol tegen de ziekte van Parkinson gesuggereerd.^{14,20-22} Daarnaast spelen de biosynthese en het metabolisme van NAPE's een belangrijke rol in de homeostase van andere structuur- en signaallipiden. Ze worden geproduceerd uit fosfatidylethanolamine (PE) en fosfatidylcholine (PC)^{3,23}, lipiden waarvan de niveaus ook gerelateerd zijn aan neurodegeneratieve ziekten.²⁴⁻²⁶ Er zijn vier routes beschreven voor de omzetting van NAPE's in *N*-acylethanolamines (NAE's), waarbij verschillende klassen van belangrijke metabolieten vrijkomen, waaronder fosfatidezuur (PA), lysofosfatidezuur (LPA) en vrije vetzuren (FFA's).²⁷ Afhankelijk van hun structuur oefenen NAE's verschillende signaalfuncties uit door middel van activatie van verscheidene receptoren, wat leidt tot onder meer verzadigings-, anti-inflammatoire, pijnstillende,

antiverslavings- of angstverlagende effecten.^{28–34} NAE's worden afgebroken door *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), wat hun biologische activiteit stopt.

In **Hoofdstuk 2** wordt de ontwikkeling van nieuwe PLA2G4E-remmers besproken. Eerder is er een competitieve *activity-based protein profiling* ("op activiteit gebaseerde eiwitprofilering", ABPP)-assay ontwikkeld om de activiteit van PLA2G4E te meten.³⁵ Het screenen van een gerichte bibliotheek van lipaseremmers heeft geleid tot de identificatie van 1,2,4-triazoolurea als remmers van PLA2G4E. Verbinding **1** is geselecteerd als startpunt voor hitoptimalisatie, vanwege haar potentie, lipofiele efficiëntie (LipE) en ligandefficiëntie (LE) (Figuur 7.1A). Er zijn 26 analogen gesynthetiseerd en getest op hun remmende activiteit, met als doel structuur-activiteitsrelaties (SAR's) te bepalen en de potentie te verbeteren. Het vergroten van het sterisch volume en het vergroten van de afstand tussen



Figuur 7.1. Structuren en eigenschappen van PLA2G4E-remmers 1–WEN175. A) Potentie en fysicochemische eigenschappen van hit **1** en remmer **WEN091**. Potentie op PLA2G4E bepaald met behulp van gel-gebaseerde ABPP op HEK293T-overexpressiecellysaat (pIC₅₀ ± SEM, N ≥ 2). Moleculair gewicht (MW) en topologische polaire oppervlakte (tPSA) berekend met ChemDraw Professional 16.0; HAC = aantal zware atomen; Lipofiele efficiëntie LipE = pIC₅₀ – clogP (DataWarrior 5.0.0); Ligandefficiëntie LE = 1.4pIC₅₀/HAC. B) Remmende activiteit van remmers **WEN091–WEN222** (pIC₅₀ ± SEM) bepaald met behulp van gel-gebaseerde ABPP op overexpressiecellysaat (PLA2G4E) of Neuro-2a-cellen (FAAH, DAGLβ, ABHD6) (N ≥ 2). C) Chemische structuur van PLA2G4E-probe **WEN175**.

de fenyl in de aminegroep en het reactieve ureum resulteerden in verhoogde potentie, wat leidde tot de identificatie van een 4-benzylpiperidinegroep die een potentieverbetering van tien keer veroorzaakte. *Ortho*- en *meta*-substituties op deze benzylring waren toegestaan, maar *para*-substituties hadden de voorkeur. 4-(4-Chlorobenzyl)piperidine-bevattende verbinding **WEN091** is geïdentificeerd als de meest potente PLA2G4E-remmer ($pIC_{50} = 8.01 \pm 0.02$). **WEN091** liet zo'n honderdvoud potentietoename zien ten opzichte van **1** en een verbeterde LipE en LE (Figuur 7.1A).

WEN091 is verder biochemisch gekarakteriseerd in **Hoofdstuk 3**. De activiteit op PLA2G4E is getest in een natuurlijksubstraatconversieassay gebaseerd op vloeistofchromatografie-massaspectrometrieanalyse (LC-MS). **WEN091** remde dosisafhankelijk de vorming van NAPE uit exogeen PC en PE, zowel in overexpressielysaat van humaan en muizen-PLA2G4E als in muizenbreinhomogenaat ($pIC_{50} = 6.9-7.1$). De verbinding had een selectiviteit van meer dan twintigvoud over PLA2G4B-D en minstens tienvoud over de calciumafhankelijke NAPE-biosynthetiserende enzymen fosfolipase A/acyltransferase (PLAAT) 2-5. De verbinding was niet actief op NAPE-specifieke fosfolipase D (NAPE-PLD) of de cannabinoïdenreceptoren ($CB_{1/2}$). ABPP-profilering van de selectiviteit in muizenbreinproteoom en levende cellen liet remming van verschillende serinehydrolases zien, waaronder ABHD6, DAGL α en FAAH. **WEN091** verlaagde endogene cellulaire niveaus van NAPE's, lyso-NAPE's en glycerofosfo-palmitoylethanolamine, maar de negatievecontroleanalogue **WEN258** (zie hieronder) deed dit niet. Beide verbindingen lieten cellulaire activiteit op FAAH zien, maar alleen behandeling met **WEN258** had effect op de NAE-niveaus, wat suggereert dat *steady-state* NAE-niveaus in deze cellen gereguleerd worden door PLA2G4E en FAAH. *N*-22:6 lyso-NAPE-niveaus waren niet verhoogd door overexpressie, maar wel na behandeling met **WEN091** of **WEN258**, wat tot de hypothese heeft geleid dat deze lipiden op een PLA2G4E- en ABHD4-onafhankelijke manier gesynthetiseerd worden. Beide remmers verlaagden de niveaus van endocannabinoïde 2-arachidonoylglycerol (2-AG), maar alleen **WEN091** liet remming zien van het biosynthetische enzym DAGL β . Dit suggereert dat ABHD6 mogelijk verantwoordelijk is voor de tonische productie van 2-AG in deze cellen, wat in lijn is met eerdere bevindingen.³⁶ Concluderend, **WEN091** is een potente PLA2G4E-remmer met selectiviteit voor de calciumafhankelijke NAPE-biosynthese *in vitro* die in staat was PLA2G4E-gemedieerde NAPE-vorming te verminderen in Neuro-2a-cellen.

In **Hoofdstuk 4** is de SAR-studie van PLA2G4E-remmers uitgebreid met 38 analogen van **WEN091** om hun selectiviteit over FAAH te verbeteren. Geconcludeerd werd dat de sulfon belangrijk was voor de activiteit op PLA2G4E, maar niet op FAAH. Deze sulfon veranderen in een sulfonamide verlaagde de activiteit op beide enzymen en leidde tot lagere selectiviteit. Grote substituenten op de vertrekkende triazolylgroep zorgden voor hogere selectiviteit over FAAH, wat leidde tot de identificatie van 4-trifluoromethoxybenzyl-bevattende verbinding **IK015** als potente PLA2G4E-remmer ($pIC_{50} = 8.01 \pm 0.02$) met meer

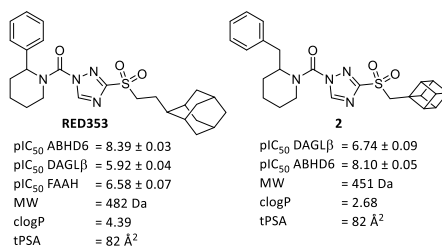
dan 800-voud selectiviteit over FAAH *in vitro* (Figuur 7.1B). Verder onderzoek naar de sterische en elektronische eigenschappen van deze benzylgroep verhoogde de potentie of selectiviteit niet. Analogen van het piperidinedeel verlaagden de activiteit op PLA2G4E.

IK015 en sulfonamideanaloog **WEN222** (Figuur 7.1B) zijn geselecteerd voor verdere biologische karakterisatie. De verbindingen waren selectief over PLA2G4B-D, NAPE-PLD en de CB₁- en CB₂-receptoren. Daarnaast lieten **IK015** en **WEN222** minstens tienvoud selectiviteit zien over PLAAT2-5 en meer dan dertigvoud selectiviteit over de meeste serinehydrolases die in muizenbreinproteoom gekarakteriseerd konden worden, maar de selectiviteit over ABHD6 was beperkt (viervoud). In Neuro-2a-cellen remde **IK015** enkele enzymen op 1 μ M, waaronder ABHD6, ABHD12 en FAAH. **WEN222** was minder actief op de meeste enzymen, wat zou kunnen duiden op beperkte membraanpermeabiliteit. Net als **WEN091** lieten deze verbindingen verhoogde activiteit zien op FAAH in de cellulaire assay. Alles tezamen zijn **IK015** en **WEN222** potente en selectieve PLA2G4E-remmers *in vitro* met een verbeterd selectiviteitsprofiel ten opzichte van **WEN091**, maar lieten ze remming van andere serinehydrolases zien bij hogere concentraties. Pyrazoolureum **WEN258** is geïdentificeerd als structuuranaloog met een vergelijkbaar off-targetprofiel met **WEN091**, **IK015** en **WEN222**, maar zonder activiteit op PLA2G4E (Figuur 7.1B).

Om het bewijs van de cellulaire activiteit van **WEN091** op PLA2G4E te ondersteunen, is in **Hoofdstuk 5** een *activity-based probe* ("activiteitsgebaseerde sonde", ABP) ontwikkeld om intracellulaire *target engagement* ("doelwitbinding") te visualiseren. Het ontwerp van *probe WEN175* (Figuur 7.1C) was gebaseerd op PLA2G4E-remmers die geïdentificeerd waren in **Hoofdstukken 2** en **4**. Er wordt verondersteld dat de triazoolurea de katalytische serine van PLA2G4E covalent modificeren door de vorming van een carbamoyladduct, wat het mogelijk zou moeten maken actief enzym irreversibel te labelen. Daarom werd de carbamoylerende "blijvende groep" uitgerust met een alkyn, waaraan na cellyse een fluorofoor geconjugeerd kan worden door middel van koper-gekatalyseerde alkyn-azide cycloadditie (CuAAC). Deze tweestapslabelingbenadering omzeilde de celpermeabiliteitsproblemen waarmee grote, geladen fluoroforen gepaard gaan.^{37,38} *Probe WEN175* was in staat PLA2G4E die tot overexpressie gebracht was in Neuro-2a-cellen dosisafhankelijk te labelen, wat zijn toepasbaarheid als cellulair actieve PLA2G4E-*probe* aantoonde. **WEN175** labelde geen PLA2G4E-mutanten waarin de katalytische serine vervangen was voor een alanine (S412A) of waarin het C2-domein (Δ C2) of polybasisch domein (Δ PB) verwijderd was, waarmee het belang van dit aminozuur en deze motieven onderstreept werd.³⁹ Voorbehandeling met **WEN091** remde de labeling van PLA2G4E door **WEN175** op een dosisafhankelijke manier, wat de cellulaire *target engagement* van **WEN091** met PLA2G4E aantoonde. Ondanks de laag-nanomolair IC₅₀ van **WEN091** *in vitro* waren hoge concentraties (10 μ M) nodig om volledige *in situ target engagement* te bewerkstelligen, wat overeenkomt met de resultaten uit de gerichte lipidomicsexperimenten van **Hoofdstuk 3**. Dat deze hoge cellulaire concentraties van **WEN091** nodig waren, kan waarschijnlijk verklaard worden door beperkte celpermeabiliteit en/of hoge niveaus van

competerende substraten. De gespecialiseerde ABP **WEN175** is een waardevol chemisch hulpmiddel om het ontwerp van nieuwe PLA2G4E-remmers met verbeterde cellulaire activiteit te sturen.

Gekooide koolwaterstoffen zijn polycyclische chemische structuren met unieke fysicochemische eigenschappen, maar worden niet algemeen toegepast in medicinale chemie. In **Hoofdstuk 6** zijn negen 1,2,4-triazoolurea gesubstitueerd met gekooide koolwaterstoffen en getest als remmers van ABHD6, ABHD16a en DAGL α/β om het effect van gekooide koolwaterstoffen op de activiteit van de remmers te onderzoeken. Alle verbindingen remden hun primaire doelwit met submicromolaire IC₅₀-waarden in een ABPP-assay op muizenbreinproteoom. Adamant-2-ylethyleenbevattende ABHD6-remmer **RED353** en cubaanmethyleenbevattende DAGL-remmer **2** zijn verder geprofileerd in cellulaire experimenten (Figuur 7.2). De activiteit van **2** op DAGL β in Neuro-2a-cellen was lager dan haar activiteit op DAGL α *in vitro*, maar **RED353** remde ABHD6 met pIC₅₀ = 8.39 ± 0.03 en liet bijna 300-voud selectiviteit zien over DAGL β en 60-voud over FAAH. **RED353** remde ook de ABHD6-gemedieerde omzetting van fluorogeen substraat in een orthogonale assay en verlaagde de cellulaire niveaus van 2-AG, maar niet van anandamide, waarmee het de veelgebruikte ABHD6-remmer KT182 overtrof.⁴⁰ Deze resultaten bevestigen en borduren voort op de eerdere observatie dat ABHD6 verantwoordelijk is voor de tonische productie van 2-AG in Neuro-2a-cellen.³⁶



Figuur 7.2. Structuur en eigenschappen van ABHD6-remmers RED353 en 2. Activiteit bepaald met behulp van gelgebaseerde ABPP op Neuro-2a-cellen (pIC₅₀ ± SEM, N = 3). Moleculair gewicht (MW) en topologische polaire oppervlakte (tPSA) berekend met ChemDraw Professional 16.0, octanol/water-partitiecöefficient (clogP) berekend met DataWarrior 5.0.0.

Vervolgstudies

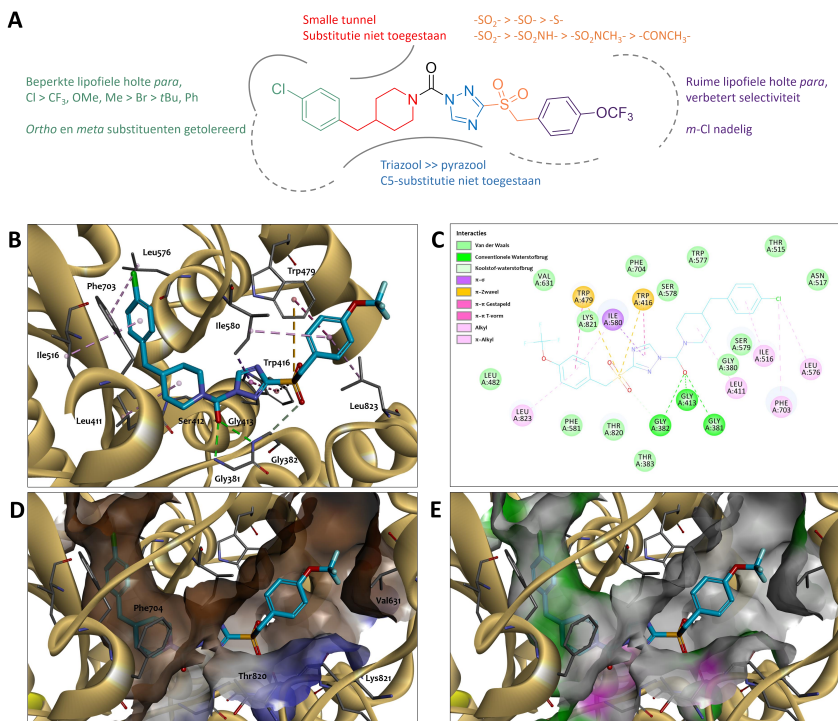
Richting verbeterde PLA2G4E- en ABHD6-remmers

Triazoolurea zijn eerder succesvol toegepast als chemisch hulpmiddel om meerdere serinehydrolases in de hersenen, zoals ABHD6, ABHD16a en DAGL α/β , *in vivo* te bestuderen^{40–43}, wat het toekomstig potentieel van de PLA2G4E-remmers beschreven in dit proefschrift schetst. PLA2G4E-remmer **WEN091** heeft hoge potentie, cellulaire *target engagement* en werkzaamheid in het verlagen van cellulaire NAPE-niveaus laten zien, maar remde daarnaast enkele serinehydrolases in Neuro-2a-cellen. **IK015** heeft een verbeterd

in vitro-selectiviteitsprofiel ten opzichte van **WEN091** en lagere off-targetactiviteit in Neuro-2a-cellen. Verdere karakterisatie van deze remmer door het onderzoeken van *in situ target engagement*, inhibitie van NAPE-vorming en activiteit op andere enzymen die betrokken zijn bij NAPE-metabolisme (ABHD4, PLAAT1–5) is nodig om te bepalen of **IK015** een betere *lead*-kandidaat is voor *in vivo* PLA2G4E-remming dan **WEN091**. **IK015** liet wel remming van FAAH en ABHD6 zien bij concentraties onder de 1 μM in een cellulaire omgeving en heeft een relatief grote topische polaire oppervlakte (tPSA), wat de hersenpenetratie kan beperken. Verdere optimalisatie van de selectiviteit en fysicochemische eigenschappen van dit chemotype zouden daarom nodig kunnen zijn.

Structuurgebaseerd medicijndontwerp zou het ontwerp van de volgende serie PLA2G4E-remmers kunnen sturen. Op dit moment zijn er geen kristalstructuren van PLA2G4E beschikbaar. **IK015** is daarom geplaatst in een digitaal homologiemodel van PLA2G4E dat gebouwd is op basis van de kristalstructuur van PLA2G4D.⁴⁴ De voorspelde bindingspose lijkt te duiden op de aanwezigheid van een nauwe holte die bekleed is met hydrofobe residuen, beperkte ruimte rondom het chlooratoom en een grotere holte rondom de trifluoromethoxysubstituent, in overeenstemming met de SAR-resultaten uit **Hoofdstukken 2 en 4** (Figuur 7.3). De SAR suggereert dat substituenten die nieuwe interacties met de *active site* aan kunnen gaan, geïntroduceerd zouden kunnen worden op de *ortho*- of *meta*-positie van de piperidylbenzylgroep of op de *para*-positie van de sulfonylbenzylgroep. Deze substituenten kunnen mogelijk de affiniteit van de remmer voor PLA2G4E en zijn selectiviteit over andere doelwitten verhogen. Het verbeteren van de potentie van de remmer zou de mogelijkheid kunnen bieden heteroatomen te verwijderen om de tPSA te verlagen. Men moet echter altijd de gevolgen die modificaties hebben op andere fysicochemische eigenschappen, zoals de lipofiliciteit en moleculair gewicht, in ogenschouw nemen. Mogelijk is een combinatie van modificaties vereist om een optimale balans te verkrijgen. Het in kaart brengen van de farmacokinetische eigenschappen van de remmers zal nodig zijn om hun *in vivo*-toepasbaarheid te bepalen. Resultaten uit deze studies nopen mogelijk tot verdere optimalisatie van bijvoorbeeld metabole stabiliteit, plasmaeiwitbinding of hersenpenetratie.

De brede reactiviteit van triazoolurea ten opzichte van serinehydrolases maakt het uitdagend om hoge selectiviteit te verkrijgen, en veel eerder gepubliceerde triazoolureum-gebaseerde remmers hebben dan ook kruisreactiviteit laten zien met *off-targets* bij hogere concentraties.^{40,41,43} Naast (nadelige) off-targeteffecten kan dit leiden tot beperkte metabole stabiliteit van de verbinding door snelle enzymatische hydrolyse.^{45,46} Het verhogen van de niet-covalente bindingsaffiniteit van de PLA2G4E-remmers voor PLA2G4E zou de mogelijkheid kunnen bieden de intrinsieke reactiviteit van de ureumwarhead te verlagen, wat zou kunnen leiden tot verbeterde selectiviteit over ander serinehydrolases. Echter, minder promiscue chemotypen zijn wellicht meer geschikt voor specifieke PLA2G4E-remming en hoge *in vivo*-stabiliteit.



Figuur 7.3. SAR-overzicht en dockingsresultaten van IK015. A) Samenvatting van observaties betreffende de potentie en selectiviteit van gesynthetiseerde PLA2G4E-remmers uit de SAR-studies in Hoofdstukken 2 en 4. B–E) **IK015** (cyan- en groenkleurige koolstofatomen) is covalent gedockt aan Ser⁴¹² (binding niet getoond) in een homologiemodel van hPLA2G4E (zandkleurig lint), gebaseerd op hPLA2G4D.⁴⁴ Enkele aminozuren die interageren met **IK015** zijn weergegeven in elementkleuren. B) Hoogstgerangschikte dockingspose van **IK015** in het hPLA2G4E-model met voorspelde enzym-remmerinteracties aangegeven. Interagerende aminozuren zijn geannoteerd. C) 2D-weergave van de voorspelde interacties van **IK015** met hPLA2G4E, corresponderend met de dockingspose in (B). D) Dockingspose met holteoppervlak weergegeven. Hydrofoob oppervlak is weergegeven in het bruin, hydrofiel in blauw. E) Dockingspose met holteoppervlak dat gekleurd is naar voorspeld waterstofdonerend (magenta) en -accepterend (groen) karakter.

ABHD6-remmer **RED353** toonde hoge potentie en een gunstig selectiviteitsprofiel in Neuro-2a-cellen. Hij liet lagere activiteit zien op FAAH dan KT182, maar was actiever op DAGL α en β . Eerdere studies naar DAGL- en ABHD6-remmers hebben verbeterde selectiviteit voor ABHD6 aangetoond wanneer polaire groepen geïntroduceerd werden op de piperidine of de vertrekkendegroeps substituent.^{40,47,48} Nieuwe derivaten van **RED353** met polaire substituenten die de selectiviteit voor ABHD6 zouden kunnen verbeteren, zouden daarom onderzocht kunnen worden. Deze kunnen gebruikt worden om de bijdrage van ABHD6 aan 2-AG-productie te onderzoeken in andere celtypen en onder andere omstandigheden.

PLA2G4E-remmers kunnen mogelijk PLA2G4E- en NAPE-biologie ophelderen

PLA2G4A is uitgebreid geëxploiteerd voor de ontwikkeling van medicijnen tegen inflammatoire aandoeningen, en enkele PLA2G4A-remmers zijn tot in klinische tests onderzocht.^{49,50} Ook zijn er meerdere remmers van enzymen die betrokken zijn bij het endocannabinoïdensysteem ontwikkeld om het therapeutisch potentieel van hun doelwitten in ontstekingspijn, angst of metabool syndroom te bestuderen.⁵¹⁻⁵⁴ *In vivo*-actieve en selectieve PLA2G4E-remmers zouden waardevolle hulpmiddelen zijn om de rol van PLA2G4E en NAPE's in (patho)fysiologische processen te bestuderen. Ze kunnen gebruikt worden om de rol van dit enzym te bestuderen in de homeostase van NAPE's en hun precursors PE en PC. Acute inhibitie van PLA2G4E maakt het mogelijk zijn belang in de ontwikkeling van neurodegeneratieve ziekten te onderzoeken^{8,14,24} en kan de functies van NAPE's tijdens ischemie, cytotoxiciteit en ontsteking belichten.^{17,19,21} Bovendien zou remming van NAPE-biosynthese kunnen helpen bij het verduidelijken van de mogelijke rol van NAPE's als verzadigingshormoon.^{15,16} Omdat gerapporteerd is dat PLA2G4E gelokaliseerd is bij het endocytosesysteem⁷, zouden remmers gebruikt kunnen worden om de functie van PLA2G4E in endocytische recycling op te helderen, alsmede de rol van NAPE's of andere substraten en producten van PLA2G4E in dit proces. Dit kan ook onze kennis uitbreiden over de betrokkenheid van het endocannabinoïdensysteem bij intercellulaire signaaltransductie. In deze studies kunnen eerder gepubliceerde NAPE-PLD-remmers gebruikt worden om onderscheid te maken tussen de effecten van NAPE's en NAE's.⁵⁴ Daarnaast kunnen PLAAT-remmers in combinatie met PLA2G4E-remmers gebruikt worden om de regulatie van de twee routes voor NAPE-biosynthese te bestuderen, waaronder hun substraatvoorkeuren en spatiotemporele activiteit.^{55,56}

Een PLA2G4E-probe die in staat is endogene activiteit zichtbaar te maken, zou gebruikt kunnen worden om de relatie tussen de enzymatische activiteit en subcellulaire lokalisatie te onderzoeken. Bovendien zou deze de PLA2G4E-activiteit en -lokalisatie in verschillende celtypen en hersenregio's kunnen laten zien. Onlangs is aangetoond dat de expressie van (lyso)-NAPE-hydrolase ABHD4 strak gereguleerd is in ontwikkelende neuronen.⁵⁷ Het zichtbaar maken van PLA2G4E-activiteit in neuronale cellen in verschillende stadia van ontwikkeling kan helpen op te helderen welke metaboliëten betrokken zijn bij neuronale maturatie, differentiatie en bestemming.

Tot slot

Selectieve en cellulair actieve remmers zijn nuttig om de (patho)fysiologische functies van enzymen te bestuderen. In dit proefschrift zijn verbindingen **WEN091–WEN222** gepresenteerd als de eerste chemische instrumenten in hun klasse om de biologie van PLA2G4E te bestuderen. Deze remmers en *activity-based probe* zullen waardevol zijn in het ophelderen van het belang van PLA2G4E in NAPE-biosynthese in verschillende cellen, weefsels en onder verschillende omstandigheden. In combinatie met eerder gerapporteerde remmers van PLAAT1–5 en NAPE-PLD kunnen deze verbindingen gebruikt

worden om de functies en rollen van NAFÉ's in homeostase en ziekte te bestuderen. De chemische hulpmiddelen die in dit proefschrift ontwikkeld zijn, kunnen mogelijk helpen bij het ontdekken van nieuwe therapeutische mogelijkheden om aandoeningen waarbij neurodegeneratie, ontstekingen en voeding betrokken zijn te behandelen.

Dankwoord

Olivier Béquignon en Gerard van Westen worden hartelijk bedankt voor het bouwen van het homologiemodel en het uitvoeren van de computationele experimenten.

Experimentele procedures

Computationale chemie

Het homologiestructuurmodel van humaan PLA2G4E is met behulp van SWISS-MODEL gegenereerd uit de röntgenstructuur van hPLA2G4D (5IXC⁴⁴, verkregen uit The Protein Data Bank), die 47% sequentie-identiteit deelt met hPLA2G4E. De verkregen structuur is voorbehandeld met Schrödinger Protein Preparation Wizard met standaardparameters. **IK015** is voorbehandeld met Schrödinger LigPrep met standaardparameters. **IK015** is vervolgens in het PLA2G4E-model geplaatst met behulp van CovDock, waarbij Ser⁴¹² geselecteerd is als het reactieve residu dat een nucleofiele aanval uitvoert op een dubbele band, in *thorough sampling mode*. Dockingsresultaten zijn visueel geanalyseerd en afbeeldingen zijn gecreëerd in BIOVIA Discovery Studio 2016, waarbij de covalente binding tussen het eiwit en ligand verwijderd is om praktische redenen.

Referenties

1. Coulon, D., Faure, L., Salmon, M., Wattelet, V. & Bessoule, J. J. Occurrence, biosynthesis and functions of *N*-acylphosphatidylethanolamines (NAPE): Not just precursors of *N*-acylethanolamines (NAE). *Biochimie* **94**, 75–85 (2012).
2. Wellner, N., Diep, T. A., Janfelt, C. & Hansen, H. S. *N*-acylation of phosphatidylethanolamine and its biological functions in mammals. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1831**, 652–662 (2013).
3. Ogura, Y., Parsons, W. H., Kamat, S. S. & Cravatt, B. F. A calcium-dependent acyltransferase that produces *N*-Acyl phosphatidylethanolamines. *Nat. Chem. Biol.* **12**, 669–671 (2016).
4. Hussain, Z. *et al.* Phosphatidylserine-stimulated production of *N*-acyl-phosphatidylethanolamines by Ca²⁺-dependent *N*-acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1863**, 493–502 (2018).
5. Leslie, C. C. Cytosolic phospholipase A₂: Physiological function and role in disease. *J. Lipid Res.* **56**, 1386–1402 (2015).
6. Ghosh, M., Tucker, D. E., Burchett, S. A. & Leslie, C. C. Properties of the Group IV phospholipase A₂ family. *Prog. Lipid Res.* **45**, 487–510 (2006).
7. Capestrano, M. *et al.* Cytosolic phospholipase A₂ε drives recycling through the clathrin-independent endocytic route. *J. Cell Sci.* **127**, 977–993 (2014).
8. Pérez-González, M. *et al.* PLA2G4E, a candidate gene for resilience in Alzheimer’s disease and a new target for dementia treatment. *Prog. Neurobiol.* **191**, (2020).
9. Morimoto, Y. *et al.* Whole-exome sequencing and gene-based rare variant association tests suggest that PLA2G4E might be a risk gene for panic disorder. *Transl. Psychiatry* **8**, (2018).
10. Lee, Y. C., Zheng, Y. O., Taraschi, T. F. & Janes, N. Hydrophobic alkyl headgroups strongly promote membrane curvature and violate the headgroup volume correlation due to ‘headgroup’ insertion. *Biochemistry* **35**, 3677–3684 (1996).
11. Domingo, J. C., Mora, M. & de Madariaga, M. A. The influence of *N*-acyl chain length on the phase behaviour of natural and synthetic *N*-acylethanolamine phospholipids. *Chem. Phys. Lipids* **75**, 15–25 (1995).
12. Shangguan, T., Pak, C. C., Ali, S., Janoff, A. S. & Meers, P. Cation-dependent fusogenicity of an *N*-acyl phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**, 171–183 (1998).
13. Mora, M., Mir, F., Madariaga, M. A. de & Sagrista, M. L. Aggregation and fusion of vesicles composed of *N*-palmitoyl derivatives of membrane phospholipids. *Lipids* **35**, 513–524 (2000).
14. Palese, F., Pontis, S., Realini, N. & Piomelli, D. NAPE-specific phospholipase D regulates LRRK2 association with neuronal membranes. in *Advances in Pharmacology* **90**, 217–238 (Academic Press Inc., 2021).
15. Wellner, N. *et al.* Studies on the anorectic effect of *N*-acylphosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine in mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1811**, 508–512 (2011).
16. Gillum, M. P. *et al.* *N*-acylphosphatidylethanolamine, a Gut-Derived Circulating Factor Induced by Fat Ingestion, Inhibits Food Intake. *Cell* **135**, 813–824 (2008).
17. Epps, D. E., Natarajan, V., Schmid, P. C. & Schmid, H. H. O. Accumulation of *N*-acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **618**, 420–430 (1980).

18. Hansen, H. H., Hansen, S. H., Schousboe, A. & Hansen, H. S. Determination of the phospholipid precursor of anandamide and other *N*-acylethanolamine phospholipids before and after sodium azide-induced toxicity in cultured neocortical neurons. *J. Neurochem.* **75**, 861–871 (2000).
19. Kondo, S. *et al.* Accumulation of various *N*-acylethanolamines including *N*-arachidonylethanolamine (anandamide) in cadmium chloride-administered rat testis. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 303–310 (1998).
20. Hansen, H. S., Lauritzen, L., Strand, A. M., Moesgaard, B. & Frandsen, A. Glutamate stimulates the formation of *N*-acylphosphatidylethanolamine and *N*-acylphosphatidylethanolamine in cortical neurons in culture. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1258**, 303–308 (1995).
21. Palese, F., Pontis, S., Realini, N. & Piomelli, D. A protective role for *N*-acylphosphatidylethanolamine phospholipase D in 6-OHDA-induced neurodegeneration. *Sci. Rep.* **9**, 1–16 (2019).
22. Basit, A., Pontis, S., Piomelli, D. & Armirotti, A. Ion mobility mass spectrometry enhances low-abundance species detection in untargeted lipidomics. *Metabolomics* **12**, 1–10 (2016).
23. Uyama, T. *et al.* Generation of *N*-acylphosphatidylethanolamine by members of the phospholipase A/acyltransferase (PLA/AT) family. *J. Biol. Chem.* **287**, 31905–31919 (2012).
24. Vaz, F. M. *et al.* Mutations in PCYT2 disrupt etherlipid biosynthesis and cause a complex hereditary spastic paraplegia. *Brain* **142**, 3382–3397 (2019).
25. Ross, B. M., Mamalias, N., Moszczynska, A., Rajput, A. H. & Kish, S. J. Elevated activity of phospholipid biosynthetic enzymes in substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience* **102**, 899–904 (2001).
26. Wang, S. *et al.* Phosphatidylethanolamine deficiency disrupts α -synuclein homeostasis in yeast and worm models of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E3976–E3985 (2014).
27. Hussain, Z., Uyama, T., Tsuboi, K. & Ueda, N. Mammalian enzymes responsible for the biosynthesis of *N*-acylethanolamines. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1546–1561 (2017).
28. Fu, J., Kim, J., Oveisi, F., Astarita, G. & Piomelli, D. Targeted enhancement of oleoylethanolamide production in proximal small intestine induces across-meal satiety in rats. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, 45–50 (2008).
29. Provensi, G. *et al.* Satiety factor oleoylethanolamide recruits the brain histaminergic system to inhibit food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 11527–11532 (2014).
30. González-Aparicio, R. & Moratalla, R. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **62**, 416–425 (2014).
31. Hohmann, A. G. *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature* **435**, 1108–1112 (2005).
32. Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R. & Hillard, C. J. The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 705–718 (2015).
33. Walter, L. & Stella, N. Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 775–785 (2004).
34. Meijerink, J. *et al.* Inhibition of COX-2-mediated eicosanoid production plays a major role in the anti-inflammatory effects of the endocannabinoid *N*-docosaheptaenoylethanolamine (DHEA) in macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 24–37 (2015).
35. Zhou, J. Development of a PLA2G4E Assay and Subsequent Application in Hit Identification. *Inhibitor Discovery of Phospholipase and N-Acyltransferase* (Leiden University, 2020).
36. van Esbroeck, A. C. M. *et al.* Identification of α , β -Hydrolase Domain Containing Protein 6 as a Diacylglycerol Lipase in Neuro-2a Cells. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).

37. Speers, A. E., Adam, G. C. & Cravatt, B. F. Activity-Based Protein Profiling *in Vivo* Using a Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4686–4687 (2003).
38. Gillet, L. C. J. *et al.* In-cell selectivity profiling of serine protease inhibitors by activity-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 1241–1253 (2008).
39. Binte Mustafiz, S. S. *et al.* The role of intracellular anionic phospholipids in the production of *N*-acyl-phosphatidylethanolamines by cytosolic phospholipase A2 ϵ . *J. Biochem.* **165**, 343–352 (2019).
40. Hsu, K. L. *et al.* Discovery and optimization of piperidyl-1,2,3-triazole ureas as potent, selective, and *in vivo*-active inhibitors of α/β -hydrolase domain containing 6 (ABHD6). *J. Med. Chem.* **56**, 8270–8279 (2013).
41. Deng, H. *et al.* Triazole Ureas Act as Diacylglycerol Lipase Inhibitors and Prevent Fasting-Induced Refeeding. *J. Med. Chem.* **60**, 428–440 (2017).
42. Hsu, K. L. *et al.* Development and optimization of piperidyl-1,2,3-triazole ureas as selective chemical probes of endocannabinoid biosynthesis. *J. Med. Chem.* **56**, 8257–8269 (2013).
43. Janssen, F. J. Discovery of 1,2,4-triazole sulfonamide ureas as *in vivo* active α/β hydrolase domain type 16A inhibitors. *Discovery of novel inhibitors to investigate diacylglycerol lipases and α/β hydrolase domain 16A* (Leiden University, 2016).
44. Wang, H. *et al.* Structure of Human GIVD Cytosolic Phospholipase A₂ Reveals Insights into Substrate Recognition. *J. Mol. Biol.* **428**, 2769–2779 (2016).
45. Kaur, G. *et al.* Synthesis, structure–activity relationship, and p210bcr-abl protein tyrosine kinase activity of novel AG 957 analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 1749–1761 (2005).
46. Gehringer, M. & Laufer, S. A. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *Journal of Medicinal Chemistry* **62**, 5673–5724 (2019).
47. Deng, H. *et al.* Chiral disubstituted piperidinyl ureas: a class of dual diacylglycerol lipase- α and ABHD6 inhibitors. *Medchemcomm* **8**, 982–988 (2017).
48. Janssen, A. P. A. Hit-to-Lead Optimization of Triazole Sulfonamide DAGL- α inhibitors. *Inhibitor Selectivity: Profiling and Prediction* (Leiden University, 2019).
49. Duvernavy, M. T., Matafonov, A., Lindsley, C. W. & Hamm, H. E. Platelet Lipidomic Profiling: Novel Insight into Cytosolic Phospholipase A₂ α Activity and Its Role in Human Platelet Activation. *Biochemistry* **54**, 5578–5588 (2015).
50. Lee, K. L. *et al.* Discovery of ecopladib, an indole inhibitor of cytosolic phospholipase A₂ α . *J. Med. Chem.* **50**, 1380–1400 (2007).
51. Ogasawara, D. *et al.* Selective blockade of the lyso-PS lipase ABHD12 stimulates immune responses *in vivo*. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 1099–1108 (2018).
52. Johnson, D. S. *et al.* Discovery of PF-04457845: A Highly Potent, Orally Bioavailable, and Selective Urea FAAH Inhibitor. *Chem. Lett* **2**, 91–96 (2011).
53. Baggelaar, M. P. *et al.* Highly Selective, Reversible Inhibitor Identified by Comparative Chemoproteomics Modulates Diacylglycerol Lipase Activity in Neurons. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 8851–8857 (2015).
54. Mock, E. D. *et al.* Discovery of a NAPE-PLD inhibitor that modulates emotional behavior in mice. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 667–675 (2020).
55. Zhou, J. *et al.* Activity-Based Protein Profiling Identifies α -Ketoamides as Inhibitors for Phospholipase A2 Group XVI. *ACS Chem. Biol.* **14**, 164–169 (2019).
56. Zhou, J. *et al.* Structure-Activity Relationship Studies of α -Ketoamides as Inhibitors of the Phospholipase A and Acyltransferase Enzyme Family. *J. Med. Chem.* **63**, 9340–9359 (2020).

57. László, Z. I. *et al.* ABHD4-dependent developmental anoikis safeguards the embryonic brain. *Nat. Commun.* **11**, 1–16 (2020).