

University of Groningen

X-ray studies on porcine pancreatic phospholipase A2 Mutants.

Thunnissen, Marjolein Monique Godelieve 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:

1992

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

Citation for published version (APA):

Thunnissen, M. M. G. M. (1992). *X-ray studies on porcine pancreatic phospholipase A2 Mutants*. 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.

Summary of this thesis.

Phospholipase A₂ is a digestive enzyme that is produced in the pancreas of mammals as a proenzyme. This proenzyme is activated in the duodenum by tryptic cleavage of the first seven N-terminal amino acids. The enzyme can also be found in large quantities in the venom of snakes and bees. In much smaller amounts it occurs in almost every cell-type, where it plays a role in the turnover and maintenance of membranes and in the production of arachidonic acid. Arachidonic acid is a precursor of compounds that are involved in inflammation and allergic reactions. Therefore, much effort has been put into the design of inhibitors of phospholipase A₂ which could be used as drugs in the treatment of chronic inflammatory diseases such as asthma and arthritis

Phospholipase A₂ catalyses the hydrolysis of the sn2 ester bond of phospholipids in a calcium dependent reaction. The enzyme is both highly stereo- and site specific. The calcium ion important for the activity binds in the active site of the enzyme close to His48 and Asp99, the catalytically important residues of phospholipase A₂. Based on the three-dimensional structure and biochemical experiments, a mechanism was proposed in which a water molecule that is hydrogen bonded to His48, attacks the carbon atom of the scissile bond and a tetrahedral intermediate is formed. Breakdown of this tetrahedral intermediate yields a fatty acid and a lysophospholipid. Calcium was proposed to have a dual role in this mechanism: firstly to bind the oxygen atom of the scissile bond and to polarize the bond, thereby helping to stabilize the formed transition intermediate. Secondly calcium was proposed to bind the phosphate group of the phospholipid. However until recently, no direct evidence had been obtained for this proposed reaction mechanism.

Phospholipase is much more active on aggregated substrates than on monomeric substrates. The enzyme binds to the interface between lipid and bulk water and becomes more than a 1000 times more active. The mechanism of this activation is one of the main topics in the research on phospholipase A₂. Currently the structural differences of the substrate molecule in the aggregated state and the monomeric state are thought to be the most important factor in this activation.

In this thesis the structures of several mutants of porcine pancreatic phospholipase A₂ and complexes of a mutant with inhibitors are described and discussed. The main subject of almost all these studies is the analysis of the reaction mechanism towards monomeric substrates and the activation of the enzyme by aggregated substrates. The role of loops and individual aminoacids is investigated by

site-directed mutagenesis experiments. The complexes with inhibitors allowed the identification of key-elements in the reaction mechanism and also the hydrophobic binding pocket could be described in more detail. The structure of these complexes could serve as a starting point for drug-design purposes.

Summary of the chapters

In the first chapter we give an overview of the most important properties of phospholipase A₂. The general structure is described and a discussion about the reaction mechanism is given. Models about the activation of the enzyme on aggregated substrate models are described and discussed.

In chapter 2 we describe the characterization and structure determination of a porcine phospholipase A₂ mutant in which loop 62 to 66 is removed by site-directed mutagenesis. This loop is missing in snake venom phospholipases, which have in general higher turn-over numbers and a different specificity. This $\Delta 62-66$ mutant shows a twofold increase in activity towards monomeric substrates and a sixteen fold higher activity towards aggregated short chain lecithins, but a decreased activity towards negatively charged substrates. The mutant has also a specificity slightly different from the wild type enzyme. The structure determination to 2.5 Å resolution showed that the overall structure of the mutant enzyme does not change, only in the region of the loop deletion conformational changes occur. The conformation of the deletion loop is intermediate between the loops of wild type porcine and *Crotalus atrox* phospholipase A₂, which lacks 8 residues in this region. No conformational changes of the active site residues could be seen, although some minute changes might occur since the binding constant for the calcium ion in the active site has also changed. The explanation for the increase in activity towards the micellar short chain lecithins is hampered by the lack of structural information about the enzyme-micelle complex. However, the deleted loop is part of the putative binding site for aggregated molecules, which is affected by the mutations. One hypothesis is that the active site could now have a slightly different orientation with respect to the interface. Alternatively the interface binding site in the mutant lies more or less in one plane, while in the wild type enzyme the deleted loop protrudes from this plane. This protrusion might destabilize the enzyme-micelle complex, however the hydrophobicity of this loop might be beneficial for the complex of phospholipase with relatively tightly packed micelles.

The refinement of the structure of this $\Delta 62-66$ mutant to 2.1 Å resolution and a detailed description of the structure are given in chapter 3. The mutant is refined by a combination of molecular dynamics refinement by the MDX-GROMOS package and

least squares refinement by the TNT package. The structure is refined to an R-factor of 18.6%.

A comparison with the wild type enzyme showed that an internal hydrophobic pocket in which Phe63 was buried is maintained in the structure of the $\Delta 62-66$ mutant by a movement of the disulfide bridge between residues 62 and 66. A second calcium binding site between two phospholipase molecules is discussed. This second calcium binding site is also found in the wild type enzyme. Site-directed mutagenesis experiments had given indications that Asp66 might be part of this binding site, but in this mutant structure the second calcium is still seen, although residue 66 is deleted.

In chapter 4 we describe the structure of a complex between a mutant phospholipase A₂ and a substrate derived inhibitor and the implications of this structure for the reaction mechanism. The inhibitor has an amide bond instead of an ester bond at the C2 position and only a short alkyl chain at the C1 position of the glycerol. The structure clearly showed that the calcium ion, as was predicted by the proposed reaction mechanism, interacts both with one of the oxygens of the phosphate group and the carbonyl oxygen of the scissile bond of the inhibitor. These two oxygens replace the two water molecules that ligate the calcium in the bovine phospholipase A₂. Also Tyr69 interacts with the phosphate group and the substrate molecule is fixed between these three specific interactions. The fatty acid at the C2 position of the glycerol makes many contacts with hydrophobic residues. Many of these residues are conserved or substituted by residues with an equivalent functional group throughout the family of phospholipases A₂. The inhibitor is bound in a conformation which is similar to that of natural phospholipids, as determined by X-ray crystallography and NMR in solution.

However the proposed nucleophilic water molecule near the N δ 1 of the active site histidine could not be observed in the structure of this complex. There is a hydrogen bond between the NH of the amide bond of the inhibitor and the N δ 1 atom. In a true substrate this hydrogen bond can not exist. Modelbuilding showed that by simple tilting of the ester bond away from the N δ 1, enough space could be created for a water molecule. This water molecule makes a hydrogen bond to the histidine and is at about 2.8 Å from the carbonyl carbon atom of the substrate molecule. With natural substrates this water could therefore act as the nucleophile.

In chapter 5 the structure determination and refinement of the complex is described. The structure was solved by molecular replacement methods, using the $\Delta 62-66$ mutant as search molecule in the rotation and translation functions. The refinement was done with the TNT package. The final R-factor was 18.9 % for all data between 8 and 2.4 Å resolution.

The structure is compared to the wild type porcine enzyme and also to the bovine phospholipase A₂

and the structure of bovine phospholipase A₂ covalently inhibited by p-bromo-phenacylbromide. They are no conformational changes of the backbone upon binding of the inhibitor in the enzyme, only some sidechains adjust themselves. The C2 fatty acid chain of the inhibitor is bound in a pocket that also binds a 2-methyl-2,4 pentanediol molecule in the native bovine phospholipase A₂ and part of the p-bromo-phenacyl in the p-bromo phenacylbromide inhibited structure.

A complex of the same mutant but with an other inhibitor is described in chapter 6. Like the previous inhibitor this compound has an amide bond instead of an ester bond at the C2 position of the glycerol, but at the C1 position a short fatty acid is present. A dataset is collected on Imageplate in the synchrotron at the EMBL outstation in Hamburg to 2.7 Å resolution. There are two protein molecules in the asymmetric unit, in each of them the inhibitor molecule is bound in a different position. The density for the inhibitor molecules is only limited. The carbonyl oxygens of the scissile bond of this inhibitor are not ligated to the calcium ion, the phosphate groups make however interactions with both the calcium ion and Tyr69. The C2 acyl chain binds in a similar manner as is the case for the inhibitor described in chapters 4 & 5; the C1 acyl chain makes in one of the two molecules an interaction with the tryptophan at position 31. The structure of this complex might reflect the unproductive binding of monomeric substrates in the active site of phospholipase A₂.

The two conserved tyrosines which are part of the N-terminal hydrogen bonding system of phospholipase A₂ are investigated in chapter 7. From site directed mutagenesis experiments it was known that the two tyrosines at position 52 and 73 could be mutated into phenylalanines with only very limited effect on the catalytic properties of the enzyme. However if these tyrosines were replaced by other residues no activity was left. Based on these observations it was concluded that the aromatic rings of these two residues are of structural importance for the enzyme and that they had no catalytic role. To see how the enzyme compensates the loss of the two hydroxyl groups, the structures of the phenylalanine mutants were determined. The structures showed that there are neither conformational changes of the enzyme, nor extra water molecules could be observed near the positions of the deleted hydroxyl groups. In each mutant there is a loss of a hydrogen bond, Asp99 is no longer making all it's possible hydrogen bonds. This could have an effect on the stability and/or the folding of phospholipase A₂.

In chapter 8 the structure determination of a mutant in which Phe63 is replaced by a valine is described. A loop of 14 residues, in which there is only one substitution (bovine: Val63; porcine: Phe63) between the bovine and porcine phospholipases A₂,

a large conformational difference in conformation was substitution. To see whether the correct structure was determined the mutant in which Phe63 was replaced by a valine was crystallized. The enzyme was crystallized in space group P2₁2₁2₁. The determination by molecular replacement showed that there is a dimer in the crystal such that the local two-fold axes are parallel to the crystal axes. The crystallographic symmetry generates a second molecule in the unit cell as the first molecule in the unit cell translated over 1/2, 1/2, 0 in the three crystal axes. This gives rise to a dimeric symmetry. The structure was refined by TNT and molecular refinement (XPLOR).

Loop 58 to 68 in the first asymmetric unit is in very probably disordered or very flexible conformation in the second monomer in the dimer. It's conformation could not be determined unambiguously. This loop has a structure that resembles the structure of the bovine enzyme, especially the first phosphate group deviates, probably due to the substitution by a Glu. While Asn 71 makes a contact with Asp66 in the bovine enzyme, in the porcine PLA₂ is part of a binding site for the calcium ion. This site does not exist in the structure. Like in the bovine enzyme the hydrophobic pocket, in which the fatty acid is maintained and now accommodated by a bridge between Cys61 and Cys62. The difference in the disordering of the monomers in the asymmetric unit is probably only marginally due to hydrophobic contacts and the substitution of Phe63Val. The structure also shows that the Phe63Val substitution causes a conformational change.

Samenvatting.

Fosfolipase A₂ is een enzym dat in alle gewone zoogdieren geproduceerd wordt als pro-enzym. Het wordt geactiveerd door afsplitsing van de eerste zes aminozuren van de twaalfvingerige darm. Fosfolipase A₂ speelt een rol bij de vetering van vetten en is ook in grote hoeveelheden aanwezig in gif van slangen en bij de afweer van grote hoeveelheden wordt het actief. Het is een cel, en hier vervult het een belangrijke rol in regulatie en de productie van uitgangsstof voor de synthese van cholesterol. Het is betrokken zijn bij het ontstaan van allergische reacties. Veel onderzoek is dan ook gericht op het verbeteren van de fosfolipase A₂ die gebruikt wordt in de geneeskunde.

a large conformational difference occurs. This difference in conformation was explained by the one substitution. To see whether this hypothesis was correct the structure was determined of a porcine mutant in which Phe63 was replaced by a valine.

The enzyme was crystallized in a new crystal form, in space group $P2_12_12_1$. The structure determination by molecular replacement methods showed that there is a dimer in the asymmetric unit, such that the local two-fold axis is parallel to one of the crystal axes. The crystallographic and non-crystallographic symmetry operators together generate a second molecule in the same orientation as the first molecule in the unit cell, approximately translated over $1/2, 1/2, 0$ relative to the first molecule. This gives rise to $C222_1$ pseudo symmetry. The structure was refined by least squares refinement (TNT) and molecular dynamics refinement (XPLOR).

Loop 58 to 68 in the first monomer in the asymmetric unit is in very weak density and probably disordered or very flexible, while the same loop in the second monomer is in good density and its conformation could be determined unambiguously. This loop has a structure which resembles the structure of the loop in the bovine enzyme, especially the first part. The second part deviates, probably due to the substitution of Asn71 by a Glu. While Asn 71 makes a hydrogen bond with Asp66 in the bovine enzyme, Glu71 in the porcine PLA2 is part of a binding site for a second calcium ion. This site does not occur in the bovine structure. Like in the $\Delta 62-66$ mutant the hydrophobic pocket, in which Phe63 was buried, is maintained and now accommodates the disulfide bridge between Cys61 and Cys91.

The difference in the disorder of the loop in the two monomers in the asymmetric unit shows that this loop is probably only marginally stabilized by hydrophobic contacts and hydrogen bonds. The structure also shows that indeed this single Phe63Val substitution can cause a dramatic conformational change.

Samenvatting.

Fosfolipase A_2 is een enzym dat onder andere geproduceerd wordt als proenzyme in de alveesklier van zoogdieren. Het wordt geactiveerd door afsplitsing van de eerste zeven aminozuren in de twaalf vingerige darm. Fosfolipase A_2 speelt hier een rol bij de vetering van voedsel. Het eiwit kan ook in grote hoeveelheden gevonden worden in het gif van slangen en bijen. In veel kleinere hoeveelheden wordt het aangetroffen in bijna elke cel, en hier vervult het een rol bij de membraan regulatie en de productie van arachidonzuur, een uitgangsstof voor de synthese van verbindingen die betrokken zijn bij het ontstaan van ontstekingen en allergische reacties. Veel onderzoek aan fosfolipase is dan ook gericht op het vinden van remmers van fosfolipase A_2 die gebruikt kunnen worden als

geneesmiddelen voor chronische ontstekingsziekten zoals astma en reuma.

Fosfolipase A_2 is een klein eiwit van ongeveer 14000 dalton. Het bevat een groot percentage secundaire structuur. Al deze secundaire structuur elementen zijn aan elkaar gekoppeld door zwavelbruggen.

Het enzym katalyseert de hydrolyse van de esterbinding op de $sn2$ plaats van fosfolipiden. Fosfolipiden zijn de hoofdbestanddelen van membranen. Fosfolipase A_2 is zowel stereo- als plaats specifiek. De reactie vindt alleen plaats in aanwezigheid van een calcium ion, dat gebonden is in het actief centrum. His48 en Asp99 zijn de aminozuren die betrokken zijn bij de katalyse. Op grond van de 3D-structuur en biochemische experimenten is er een algemeen werkingsmechanisme voorgesteld waarbij een water molecuul een nucleofiele aanval op het koolstof atoom van de te splitsen binding uitvoert. Er ontstaat een tetraëdrisch intermediair dat uiteen valt in een vetzuur en een lysopfosfolipide. Er zijn een aantal functies voor het calcium ion voorgesteld. Ten eerste moet het een interactie geven met de carboniele zuurstof van de te knippen binding en deze binding polariseren. Verder is het betrokken bij de stabilisatie van het tussenproduct en moet het de fosfaatgroep van het fosfolipide binden. Lange tijd was er echter geen direct bewijs voor dit reaktiemechanisme.

Fosfolipase vertoont een veel grotere activiteit ten opzichte van substraat moleculen in geaggregeerde toestand dan op de losse substraat moleculen. Het enzym kan binden aan het grensvlak tussen de lipiden en de waterige oplossing en het is in deze toestand meer dan 1000 keer zo actief. Het mechanisme van deze activiteitsverhoging is een belangrijk onderdeel van het onderzoek aan fosfolipase A_2 . De belangrijkste reden van deze activiteitsverhoging wordt meestal toegeschreven aan het verschil in conformatie van losse substraat moleculen in oplossing en die in geaggregeerde toestand.

Dit proefschrift behandelt de structuurbepaling van verschillende fosfolipase A_2 mutanten en complexen van deze mutanten met remmers die op natuurlijke substraten lijken. Het belangrijkste doel van het onderzoek was het ophelderen van het reaktiemechanisme van fosfolipase A_2 zowel op monomere substraat moleculen als op substraat moleculen in geaggregeerde toestand. De rol van enkele aminozuren en van een oppervlakte "loop" zijn bestudeerd met behulp van plaats gerichte mutagenese. De structuren van de complexen met de remmers hebben het mogelijk gemaakt om elementen van het reactie mechanisme te karakteriseren en ook een hydrophobe bindingsplaats waarin de vetzuurketens binden is geïdentificeerd. De

structuur van deze complexen kan een eerste stap zijn voor de ontwikkeling van een nieuw geneesmiddel.

b) Samenvatting van de hoofdstukken.

In hoofdstuk 1 wordt een algemene inleiding over de structuur, functie en werking van fosfolipases gegeven. Het reactiemechanisme wordt uitgelegd en bediscussieerd. Modellen voor de activatie van fosfolipase op grensvlakken worden uitgelegd.

In hoofdstuk 2 worden de kinetische en structurele eigenschappen beschreven van een mutant waarin een oppervlakte "loop" (residueën 62 tot en met 66) is verwijderd. In slangegif fosfolipases wordt ook een dergelijke deletie aangetroffen. Deze enzymen zijn veel actiever dan de pancreas enzymen en hebben ook een iets andere specificiteit. De mutant bleek eigenschappen te hebben die meer op die van de slangegif enzymen leken. De 3-D structuur liet zien dat het grootste gedeelte van het eiwit een zelfde opbouw had als het varkens fosfolipase A₂, alleen in het gedeelte van de deletie waren grote afwijkingen te zien. Het actief centrum was niet veranderd. Een mogelijke verklaring voor de activiteits veranderingen zou kunnen zijn dat de bindings plaats voor geaggregeerde substraat molekulen is veranderd.

In hoofdstuk 3 wordt de verdere verfijning tot een resolutie van 2.1 Å van deze structuur beschreven. Een hydrophobe bindings plaats, waarin Phe63 geplaatst zat, is nog steeds aanwezig en wordt nu opgevuld door een zwavelbrug die van positie verandert. Een tweede calcium bindings plaats tussen twee fosfolipase molekulen wordt bediscussieerd.

In hoofdstuk 4 wordt de structuur van een complex van fosfolipase A₂ met een remmer beschreven. Deze remmer lijkt op het natuurlijke substraat maar heeft in de plaats van een ester binding op de C2 positie van het glycerol een amide binding. Verder zit er geen vetzuur keten op de C1 positie maar een korte alkyl staart. Deze structuur toont duidelijk aan dat het calcium zowel een interactie heeft met een zuurstof van de fosfaatgroep als met de zuurstof van de te knippen binding. Deze twee zuurstof atomen vervangen de twee water molekulen die een interactie hadden met de calcium in de runder fosfolipase A₂ structuur. De vetzuurketen op de C2 plaats maakt vele contacten met hydrophobe residuen in het actieve centrum van fosfolipase. Veel van deze residueën zijn geconserveerd of hebben een vergelijkbare functionele groep in de familie van fosfolipases A₂. De remmer heeft een conformatie die erg veel lijkt op die van natuurlijke lipiden. Echter het water molecuul dat van belang is voor het reactie mechanisme kan niet in deze structuur gevonden worden. In de plaats daarvan is er een waterstofbrug tussen de NH van de amide-binding in de remmer en het Nδ1 atoom van His48. In natuurlijke substraten kan deze waterstofbrug niet

gevormd worden en de afstand tussen het substraat en de histidine zal groter zijn. Hierdoor zou er ruimte vrij kunnen komen voor een water molecuul. Modelbouw toont aan, dat inderdaad door een simpele verschuiving van de remmer er genoeg plaats zou kunnen ontstaan voor dit water molecuul.

De details van de structuur opheldering van het complex beschreven in hoofdstuk 4 en een vergelijking met andere fosfolipases wordt gegeven in hoofdstuk 5.

In hoofdstuk 6 wordt de structuur van een complex met een andere remmer beschreven. Deze remmer heeft net als de remmer in de vorige twee hoofdstukken een amide binding op de C2 positie, maar het heeft ook een korte vetzuur keten op de C1 positie. Het bleek dat deze remmer op twee verschillende manieren in het eiwit bindt. Wellicht dat de structuur van deze complexen een afspiegeling is van de niet-productieve bindingswijze die monomeren in het actief centrum van fosfolipase A₂ zouden kunnen hebben.

In hoofdstuk 7 wordt ingegaan op de rol van twee geconserveerde tyrosines in het waterstofbruggen systeem dat de N-terminus van het eiwit verbindt met de actief centrum residueen. Ondanks het feit dat deze tyrosines geconserveerd zijn, kunnen ze vervangen worden door fenylalanines zonder dat de activiteit van het eiwit wordt aangetast.

De structuur opheldering van de twee mutanten toont aan dat in beide een waterstofbrug verloren gaat en dat Asp99 niet langer in staat is al zijn waterstofbruggen te maken. Dit zou van invloed kunnen zijn op zowel de stabiliteit als de opbouw van het eiwit.

In hoofdstuk 8 wordt de structuur en structuur opheldering beschreven van een mutant waarin Phe63 is vervangen door een valine. In een "loop" van 14 aminozuren is de substitutie van een Val in runder fosfolipase naar een Phe in varkens fosfolipase de enige verandering. De conformatie van deze "loop" is echter in beide eiwitten verschillend. De verklaring voor deze verandering werd aan de ene substitutie zelf toegeschreven. Een mutant is geconstrueerd in Utrecht waarin Phe 63 in het varkens enzyme is vervangen door een valine.

Het eiwit kon gekristalliseerd worden in ruimtegroep P2₁2₁2₁. Tijdens de structuur bepaling met behulp van rotatie- en translatie functies bleek dat er een dimeer in de asymmetrische eenheid is, waarbij de lokale tweevoudige rotatie-as parallel loopt aan een van de kristallografische schroefassen. De kristallografische en niet kristallografische symmetrie operatoren tesamen, genereerden een tweede molecuul in dezelfde orientatie als het eerste molecuul in de eenheid-cel. Dit molecuul is ongeveer over een vector 1/2, 1/2, 0 getransleerd ten opzichte van het eerste molecuul. Dit gaf aanleiding tot C222₁ pseudosymmetrie.

In een van de twee molekulen eenheid is de dichtheid voor de slecht en deze loop is ho wanordelijk of beweeglijk. In was de dichtheid voor de "loop" structuur in een eenduidige c worden. Deze "loop" heeft een veel lijkt op de "loop" zoals fosfolipase A₂ gevonden wor gedeelte komt bijna precies c gedeelte wijkt meer af, wat ho wijten is aan de vervanging PLA₂) door een glutamine z Asp66 maakte in de ru waterstofbrug met Asn71. De niet langer gevormd worden. G de binding van een tweede dergelijke bindingsplaats komt niet voor.

Het verschil in orde en/of bet "loop" in de beide molekulen eenheid toont aan dat deze lo gestabiliseerd wordt door hydr waterstofbrug vorming. De s ook aan dat inderdaad de verv aminozuur tot grote conforma leiden.

In een van de twee molekulen in de asymmetrische eenheid is de dichtheid voor de "loop" 58 tot 68 zeer slecht en deze loop is hoogstwaarschijnlijk wanordelijk of beweeglijk. In het andere molekuul was de dichtheid voor de "loop" wel goed en kon de structuur in een eenduidige conformatie gebouwd worden. Deze "loop" heeft een conformatie die erg veel lijkt op de "loop" zoals deze in het runder fosfolipase A₂ gevonden wordt. Vooral het eerste gedeelte komt bijna precies overeen. Het tweede gedeelte wijkt meer af, wat hoogstwaarschijnlijk te wijten is aan de vervanging van Asn71 (runder-PLA₂) door een glutamine zuur (varkens-PLA₂). Asp66 maakte in de runderstructuur een waterstofbrug met Asn71. Deze waterstofbrug kan niet langer gevormd worden. Glu71 is betrokken bij de binding van een tweede calcium ion. Een dergelijke bindingsplaats komt in het runder enzyme niet voor.

Het verschil in orde en/of beweeglijkheid van de "loop" in de beide molekulen in de asymmetrische eenheid toont aan dat deze loop slechts marginaal gestabiliseerd wordt door hydrophobe interacties en waterstofbrug vorming. De structuur toont echter ook aan dat inderdaad de vervanging van een enkel aminozuur tot grote conformatie veranderingen kan leiden.