creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사 학위논문

Part Ⅰ. 분자 모델링을 이용한 항암 활성을 갖는 peptidomimetic 약물 설계

Part Ⅱ. PDEδ 저해제에 관한 초기 연구

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약품제조화학 전공

이 호 진

Part Ⅰ. 분자 모델링을 이용한 항암 활성을 갖는 peptidomimetic 약물 설계

Part Ⅱ. PDEδ 저해제에 관한 초기 연구

지도 교수 이 지 연

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2016 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약품제조화학 전공
이 호 진

이 호 진의 약학석사 학위논문을 인준함
2016 년 2 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초 록

[Part Ⅰ]

펩타이드 유사 구조 화합물은 다양한 작용기를 쉽게 도입할 수 있고 세포 내에서 peptidase에 의한 분해로부터 안정성을 가질 수 있다는 장점이 있어 많은 연구가 진행되고 있다. 본 실험실의 선행연구에서는 peptoid library를 이용하여 항암 활성 실험을 진행하였고 Insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R)와 Src 단백질의 인산화를 저해하는 화합물인 1,3,4-oxadiazinone을 합성하였다. 본 연구에서는 분자 모델링 연구를 통해 1,3,4-oxadiazinone의 구체적인 binding mode를 규명하며 더 강력한 효능을 갖는 화합물을 찾는 것을 목표로 하였다. ATP 결합 부위에 리간드를 갖고 있는 IGF-1R의 구조를 이용하여 분자 모델링 시 기존의 리간드와 1,3,4-oxadiazinone 화합물이 잘 겹쳐진 형태를 보이며 유사한 상호작용을 보여 화합물이 리간드로서 상호작용 할 수 있음을 확인하였다. 또한 화합물 골격 내의 고리 구조에서 C6 위치의 변형을 통해 단백질과의 상호작용이 증가될 수 있음을 알게 되었다. 실제 C6 위치가 변형되어 합성된 화합물들을 이용하여 항암 활성 실험 시 분자 모델링과 상응하는 결과를 보였다. 본 연구를 바탕으로 C6 위치에 다양한 치환기를 도입한다면 항암 활성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

주요어 : IGF-1R, Peptidomimetic, 분자 모델링

학 번 : 2014-21970

[PartⅡ]

항암 타겟으로 알려진 Ras 단백질은 신호 전달 기전 내에서 GTPase로서 역할을 수행하며 Phosphodiesterase δ-subunit (PDEδ)은 Ras와 상호작용하여 세포질 내로의 확산을 촉진하며 세포 내 위치를 조절하는 역할을 한다. 따라서 Ras와 PDEδ의 상호작용을 저해하면 Ras 신호 전달을 억제할 수 있다. 본 연구에서는 과 발현시킨 recombinant PDEδ을 이용하여 형광을 갖는 화합물을 Fluorescence based polarization 실험을 통해 screening 하였으며 K_d값이 300-500 nM 수준의 화합물을 도출하였다. PDEδ 저해제로 알려진 화합물을 이용하여 Competition binding assay를 실시하였으며 그 결과 실험실 화합물이 PDEδ 저해제와 같은 binding site에 작용한다는 사실을 규명하였다. 추가적으로 분자모델링 연구를 통해 화합물이 PDEδ의 활성화 자리에 리간드로서 상호작용 할 수 있음을 확인하였다. 본 연구는 Ras와 PDEδ의 직접적인 상호작용을 억제하는 저해제에 관한 연구에 기초지식을 제공할 것으로 기대된다.

주요어 : PDEδ, Fluorescence based polarization,
Competition binding assay

학 번 : 2014-21970

목 차

[Part Ⅰ]

제 1 장 서 론 2

제 2 장 실험 결과 8
제 1 절 분자 모델링을 통한 새로운 화합물 설계 8
제 2 절 Src 단백질 내에서의 binding pose 규명 12
제 3 절 리간드로서 LL-2003 (3c)의 상호작용 15

제 3 장 결론 및 고찰 21

제 4 장 실험 방법 24
제 1 절 분자 모델링 24

[Part Ⅱ]

제 1 장 서 론 26

제 2 장 실험 결과 31
제 1 절 Fluorescence 측정 31
제 2 절 Fluorescence based polarization screening 33
제 3 절 Competition binding assay 36
제 4 절 Target specificity 확인 38
제 5 절 분자 모델링 연구 41

제 3 장 결론 및 고찰 45

제 4 장 실험 방법 48
제 1 절 클로닝 48
제 2 절 단백질 발현과 정제 48
제 3 절 Fluorescence 측정 49
제 4 절 Fluorescence based polarization 측정 49
제 5 절 Competition binding assay 50
제 6 절 Target specificity 확인 51
제 7 절 분자 모델링 52

참고문헌 53

Abstract 60

표 목차

[표 1-1] IGF-1R에서의 docking score 11
[표 1-2] Src에서의 docking score..... 14
[표 1-3] Src에서의 docking score..... 20
[표 2-1] 도출한 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물..... 35

그림 목차

[그림 1-1] IGF-1R의 구조적 다이어그램..... 3
[그림 1-2] Cixutumumab으로 항암 치료 시 내성 유발 기전 ... 5
[그림 1-3] Amber 방법으로 minimization 결과 10
[그림 1-4] IGF-1R (Tripos)에 binding 된 리간드의 pose .. 10
[그림 1-5] IGF-1R에 binding 된 OXA40 pose..... 11
[그림 1-6] Src 단백질을 이용한 분자 모델링 13
[그림 1-7] Src 단백질에 binding 된 OXA40 pose..... 13
[그림 1-8] IGF-1R 내에서 리간드의 상호작용 다이어그램.... 17
[그림 1-9] Src 내에서 리간드의 상호작용 다이어그램 18
[그림 1-10] LL-2003 (3c)의 상호작용 다이어그램..... 19
[그림 2-1] Ras 단백질의 post-translational modification.... 28
[그림 2-2] Ras의 신호 전달 경로 및 deltarasin 저해기전..... 29
[그림 2-3] Indolizino[3,2-c]quinoline, PDEδ 형광측정..... 32
[그림 2-4] Fluorescence based polarization screening..... 33
[그림 2-5] Indolizino[3,2-c]quinoline의 polarization 결과.. 34
[그림 2-6] Competition binding assay 결과 37
[그림 2-7] Indolizino[3,2-c]quinoline의 K_d와 half-life..... 37
[그림 2-8] Target specificity 확인..... 39
[그림 2-9] PDEδ와 화합물 3의 Native gel electrophoresis . 40
[그림 2-10] PDEδ에 binding 된 리간드의 pose..... 43
[그림 2-11] PDEδ의 구조내에서 화합물들의 pose 비교 43
[그림 2-12] 화합물 3의 binding pose 44
[그림 2-13] PDEδ의 binding pocket에서 화합물 pose 비교 . 44

Part Ⅰ. 분자 모델링을 이용한 항암 활성을 갖는 peptidomimetic 약물 설계

제 1 장 서론

Insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R)는 세포막에서 발견되는 단백질로 transmembrane receptor이며 성장인자에 의해 활성을 나타내는 receptor tyrosine kinase로 세포 발생과 증식에 관여하며, 활성화 시 세포 사멸을 억제한다.[1-2] 성장인자는 대표적으로 insulin과 유사한 구조를 가지는 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)과 2 (IGF-2)가 있으며 특히 IGF-1의 경우에는 IGF-1R과 높은 affinity로 결합한다. IGF-2도 낮은 affinity을 갖고 있지만 IGF-1R과 결합하여 활성을 나타낸다.[3] IGF-1R은 1974년 방사선 동위원소인 ^{125}I로 표지된 insulin과 soluble fraction of nonsuppressible insulin-like activity (NSILAs)을 이용하여 쥐의 간 세포막을 분리하였을 때 Insulin receptor (IR)과 다른 단백질로 처음 보고되었으며 IGF-1R이 결핍된 쥐에서는 정상 쥐와 비교하여 몸무게가 절반 이하로 태어나며 일찍 죽는다는 연구 결과가 있다.[4-5] 인간의 IGF-1R complementary DNA (cDNA)는 1986년 cloning 되었으며 서열이 분석되었다.[1] cDNA는 4989개의 nucleotide로 이루어져있으며 이는 1367개의 amino acid를 포함한다. Receptor 전구체는 30개의 signal peptide (1-30)를 갖고 있으며, Arg-Lys-Arg-Arg으로 구성된 furin protease cleavage site를 포함한다 (708-711). 이는 IGF-1R을 α-chain과 β-chain으로 구분짓는 부위이다. α-chain과 β-chain의 195개의 residue는 extracellular 부위를 구성하며 N-glycosylation site를 포함한다.[1] β-chain에는 transmembrane sequence를 포함하며 (906-929) tyrosine kinase를 포함한 408개의 residue로 이루어진 cytoplasmic domain를 갖고 있다

(그림 1-1).[1, 6-7] IGF-1R을 다른 insulin receptor와 구분 짓는 주요한 특징은 세포 표면에서 disulphide-linked dimer로 존재하며 신호 전달 시 다른 receptor는 oligomerization을 요구하는데 반해 IGF-1R은 domain rearrangement를 요구한다는 것이다.[8]

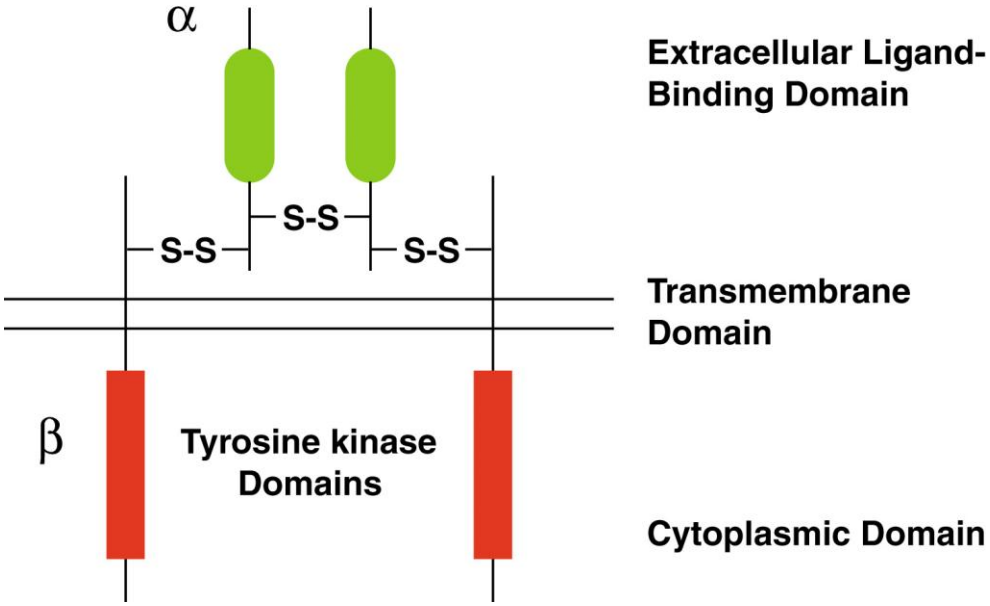


그림 1-1. IGF-1R의 구조적 다이어그램.[9]

IGF-1R의 tyrosine kinase로서 활성은 세밀하게 조절된다. 활성을 보이지 않는 상태에서 kinase domain의 C lobe에 존재하는 activation loop가 활성 자리에 존재하는 Tyr1135와 결합된 형태를 보이며 활성이 억제된 형태의 구조를 보인다.[10-11] 내분비계 장기로부터 분비되어 IGF-1R 주변에 존재하는 성장인자가 IGF-1R에 결합하게 되면 IGF-1R은 활성을 나타낸다. IGF-1R의 extracellular domain에 성장인자가 결합하면 IGF-1R은 domain rearrangement가 일어나며 dimer을 이루고 있는 IGF-1R은 다른 kinase domain의 Tyr1135와 activation loop에 존재하는 Tyr1131과 Tyr1136의 autophosphorylation을 일으킨다.

리간드가 IGF-1R에 결합되었을 때 이 autophosphorylation에 의해 activation loop는 활성 억제 상태의 구조가 불안정해지며 활성 상태의 구조가 더 안정화된다.[9] Tyr1131, 1135, 1136의 autophosphorylation 외에도 막 근처에 존재하는 tyrosine residue와 C-terminal에 존재하는 serine residue의 phosphorylation도 유발된다. 이 phosphorylation은 insulin-receptor substrate-1 (IRS-1), Shc와 14-3-3 protein 등의 단백질을 불러 모으며 상호작용을 통해 세포 성장 등의 다양한 신호를 전달하게 된다.[12-14]

임상학적 측면에서 IGF-1R은 폐암, 대장암, 유방암, 중추신경계의 암 질환 등의 다양한 암세포 내에서 과 발현되어 있으며 암세포의 형성과 전이 특히, 항암 치료에 대한 저항성과 연관되어 있다.[14-18] 인간의 암세포 내에서 IGF-1R 인산화의 억제는 암세포의 세포 사멸을 유도할 수 있어 암을 치료하는 효과적인 방안으로 대두되고 있으며 활발한 연구가 진행되고 있다.[19-22]

현재 IGF-1R 표적 항암제로는 단일클론항체 (mAb)와 Tyrosine kinase inhibitor (TKI)가 개발되어 임상 시험 중에 있다. 하지만 IGF-1R 표적 단일클론항체를 대상으로 한 임상 시험 결과 치료 초기에는 우수한 효과를 보이지만 내성이 유발되어 치료효과가 저하되는 것으로 나타났다. IGF-1R 표적 단일클론항체로 알려진 cixutumumab를 이용하여 치료 시 IGF-1R에 결합하지 못한 성장인자가 Src 단백질의 신호를 매개하는 integrin β3에 결합하여 Src 단백질의 활성을 증가시키며 이로 인해 내성이 유발된다는 것이 보고되었다 (그림 1-2).[23-24] 이를 극복하기 위한 대안으로 IGF-1R과 Src 단백질의 활성을 억제하는 약을 병행 투여하는 방법이 제시되었지만 이 방법은 강한 독성을 갖는 다는 단점이 있다. 그러므로 IGF-1R과 Src 단백질을 하나의 약을 복용함으로써 동

시에 두 단백질을 저해할 수 있는 이중 저해제의 개발은 약물 내성 문제를 해결하는 효과적인 해결책이 될 수 있다.

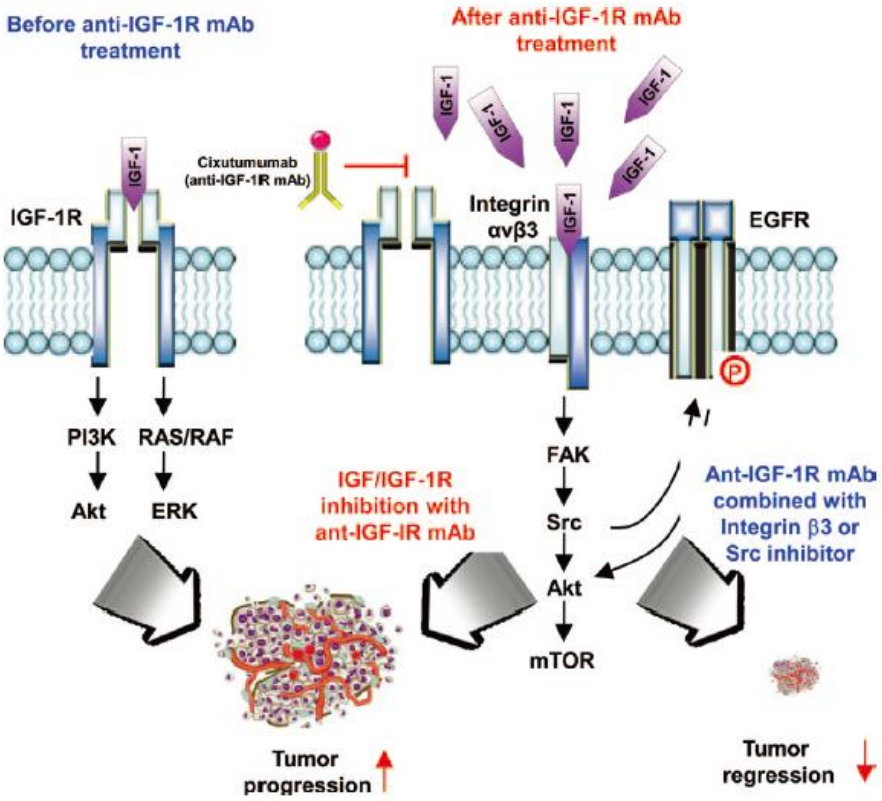


그림 1-2. Cixutumumab으로 항암 치료 시 내성 유발 기전.[24]

임상학적으로 Src 단백질은 최초로 발견된 proto-oncoprotein으로 비이상적인 Src 단백질의 지속적인 활성은 대장암, 유방암 등의 다양한 암 세포 생성의 주요한 원인이 된다.[25-27] 따라서 IGF-1R과 마찬가지로 Src 단백질도 암을 치료하는 주요한 목표 단백질로 지속적으로 많은 연구가 진행되고 있다.[28]

Src 단백질은 non-receptor protein tyrosine kinase로 1911년 Peyton Rous가 Rous sarcoma virus에 대한 연구를 진행하는 과정에서 chicken tumor virus로 발견되었다.[29] Src 단백질은 척추동물의 전반적

인 세포에서 발현되어 있으며 특히 뇌, 혈소판, 파골 세포에서 높은 수치로 발현되어있다.[30] Src family로는 11종류가 있으며 세포의 내막 근처에서 다양한 성장인자와 integrin 그리고 G-protein coupled receptor 들과 상호 작용을 통해 세포의 성장과 분화 그리고 세포 이동과 관련된 신호 전달의 필수적인 매개체의 역할을 한다.[30-31] Src 단백질은 각 종류마다 특유의 N-terminal domain을 갖고 있으며 PxxP 서열을 인식하여 결합할 수 있는 Src homology 3 (SH3) domain, phosphotyrosine에 결합할 수 있는 Src homology 2 (SH2) domain과 tyrosine kinase 활성을 갖는 catalytic domain 그리고 짧은 C-terminal tail를 공통적으로 갖고 있다.[32] Src 단백질에는 활성 조절과 관련된 2개의 phosphorylation site가 존재한다. Activation loop에 존재하는 Tyr418은 Src의 완전한 활성 상태일 때 phosphorylation이 되며, C-terminal tail에 존재하는 Tyr529는 Src가 비활성 상태일 때 phosphorylation 된다.[32] Src 단백질의 비활성 상태의 구조는 Src를 이루는 여러 domain간의 상호 작용을 통해 유발되며 그 구조는 '묶음 다발'과 같은 형태를 보인다. Src의 SH3-SH2 domain은 비활성 상태의 구조를 유지하는 clamp의 역할을 하며 phosphorylation된 Tyr529의 C-terminal과 SH2 domain은 상호작용을 통해 비활성 상태의 구조를 유지하는 걸쇠 역할을 하게 된다.[32] Tyr529가 dephosphorylation되고 SH2 또는 SH3 domain에 리간드가 결합하며 Tyr418이 phosphorylation 되면 domain간의 상호작용이 감소하며 활성 상태의 구조가 되는 것이다.

펩토이드는 펩타이드 골격에 α-탄소가 아닌 질소에 작용기가 치환된 구조로 N-substituted glycine oligomer이다. 펩토이드는 생체 내 구성물질과 유사하기 때문에 부작용이 적고 적은 용량으로도 질병 치료가 가

능하며 생체 내 특이성이 높다는 장점을 갖고 있다. 또한 생체 내에서 펩타이드와 달리 산화, 가수분해, 탈아민화 반응에 의해 분해되지 않는다는 장점도 가지고 있다.[33-34] 펩토이드 구조는 질병 치료에 유용하게 사용되지만 펩타이드 구조와 비교하여 구조적 유연성이 높아 목표 단백질과의 상호 작용에 있어 한계를 갖고 있다. 이러한 한계점을 극복하기 위하여 선행 연구에서는 solid-phase synthesis를 이용하여 펩토이드 구조에 2-aryl-1,3,4-oxadiazin-5-ones 구조를 도입함으로써 구조적 유연성을 개선한 펩토이드 화합물인 oxadiazinone library를 구축하였다. 구축된 library를 이용하여 암 세포 주에 대한 MTT assay를 진행하였을 때, 대조군 대비 cell viability를 50% 정도 감소시킨 화합물인 OXA40을 hit compound로 도출하였다. Western blot analysis을 통하여 OXA40이 암세포 내에 과 발현 되는 특정 단백질인 IGF-1R과 Src 단백질의 인산화를 특이적으로 방해하는 것을 알 수 있었다.[35] Oxadiazinone 화합물은 현재 생물학적 효과에 대한 연구가 적으며 항암 활성에 관한 연구도 초기단계에 있다.[36] 또한 현재 알려진 항암 치료제와 비교하여 구조적 연관성이 낮다. 따라서 oxadiazinone 화합물은 새로운 항암 치료 후보물질로서 매력적인 구조이다.

본 연구에서는 선행 연구를 통해 도출한 화합물에 대하여 분자 모델링을 실시하여 binding mode를 규명하는 것을 목표로 하였다. 또한 알려진 저해제와 binding pose를 비교하여 더 높은 활성을 갖는 화합물을 찾는 것을 목표로 하였다.

제 2 장 실험 결과

제 1 절 분자 모델링을 통한 새로운 화합물 설계

OXA40의 binding pose를 규명하기 위하여 PQIP를 리간드로 가지고 있는 IGF-1R 구조를 (PDB: 3D94) 이용하여 분자 모델링을 실시하였다.[37] PQIP는 IGF-1R의 ATP binding site에 결합하는 것으로 알려진 리간드로 OXA40을 PQIP를 추출하여 생성한 ATP binding site에 docking 하였다. 기존 구조에서 추출한 PQIP를 함께 docking하였으며 그림 1-3은 Amber 방법을 이용하여 단백질의 구조를 안정화한 결과로 기존의 PDB 내에 존재하는 PQIP와 추출하여 다시 docking한 PQIP를 비교하였을 때 RMSD 2.153 Å으로 두 결과상에 차이가 존재하며 PQIP와 OXA40를 비교하여도 구조가 적절하게 겹쳐지지 않았다. 반면에 그림 1-4는 Tripos 방법으로 minimization한 결과로 추출한 PQIP와 기존의 PDB 구조의 PQIP를 비교하였을 때 (그림 1-4A; RMSD 0.579 Å) 기존의 형태와 매우 유사한 결과를 보였으며 이를 통하여 docking의 유효성을 확인하였다. 그림 1-4B는 PQIP와 OXA40의 결과를 겹쳐 놓은 것으로 두 물질은 전체적으로 ATP binding site 내에서 곡선 형태를 보이며 oxadiazinone ring과 PQIP의 imidazo[1,5-a]pyrazine-8-amine이 잘 겹쳐지며 매우 유사한 pose를 보인다. 하지만 OXA40은 oxadiazinone C6 위치의 chloro group이 위치하는데 반해 PQIP는 phenylquinoline이 위치함으로써 binding site의 hydrophobic pocket을 OXA40에 비하여 더 잘 채운다. 그림 1-5는 OXA40의 IGF-1R 내에서의 상호작용을 나타낸 것으로 oxadiazinone C6 위치에 존재하는 chloro group은 IGF-1R과 상호작용을 하지 않는 것으로 예측된다. 그

러므로 oxadiazinone C6 위치를 PQIP와 같이 aromatic group으로 치환한다면 IGF-1R과 상호작용이 증가할 것이라 생각하였다. 이를 바탕으로 C6가 phenyl로 치환된 화합물 **3b-3d, 4c**가 설계되었고 추가로 IGF-1R에 docking하여 binding mode를 확인하였다. 그림 1-4C를 보면 LL-2003 (**3c**)의 phenyl이 OXA40의 chloro group과 잘 겹쳐진 형태를 보이며 전체적으로도 매우 유사한 pose를 갖는 것을 확인할 수 있다. 표 1-1를 살펴보면 OXA40은 docking score가 ($-\log K_d$) 5.5535로 낮은 score를 보인다. 그러나 C6 위치가 phenyl로 치환된 구조 **3b-3d, 4c**는 OXA40과 비교하여 더 높은 score를 보이는 것을 알 수 있다. 이는 치환된 phenyl group이 IGF-1R의 binding site에 존재하는 residue와의 상호작용이 증가하였기 때문이라 생각하였다. 이를 기반으로 C6 위치가 치환된 화합물이 합성되었으며 이호영 교수님 연구실에서 항암 활성 평가 (MTT assay)와 목표 단백질 확인을 위한 western blot analysis를 실시해 주었다.[35] 그 결과 phenyl로 치환된 화합물은 OXA40 보다 더 높은 활성을 갖는 것으로 모델링의 결과와 상응하는 결과를 확인하였으며 그 중 가장 활성이 높았던 LL-2003 (**3c**)을 추가 실험을 하기 위하여 대표 물질로 선정하였다.[35] LL-2003 (**3c**)을 western blot analysis하였을 때 IGF-1R과 Src 단백질의 발현에는 영향을 주지 않으며 IGF-1R와 Src 단백질의 인산화를 동시에 저해하는 결과를 얻을 수 있었다.[35]

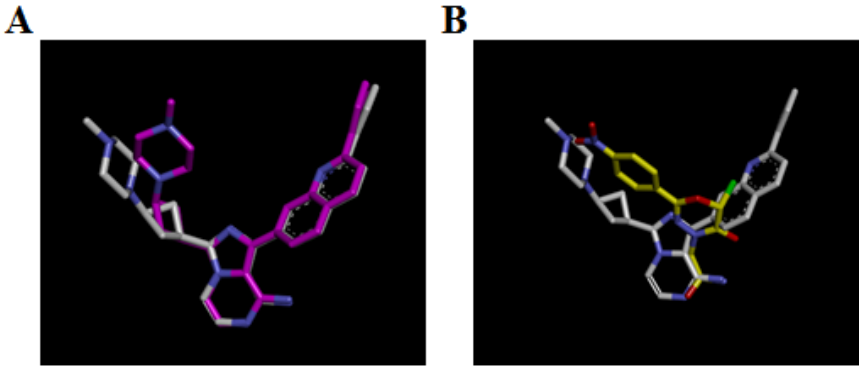


그림 1-3. Amber 방법으로 minimization 결과. A. IGF-1R PDB 내 PQIP (PDB: 3D94; white)와 다시 docking한 PQIP (magenta)의 binding pose 비교. **B.** PQIP (white)와 OXA40 (yellow)의 pose 비교.

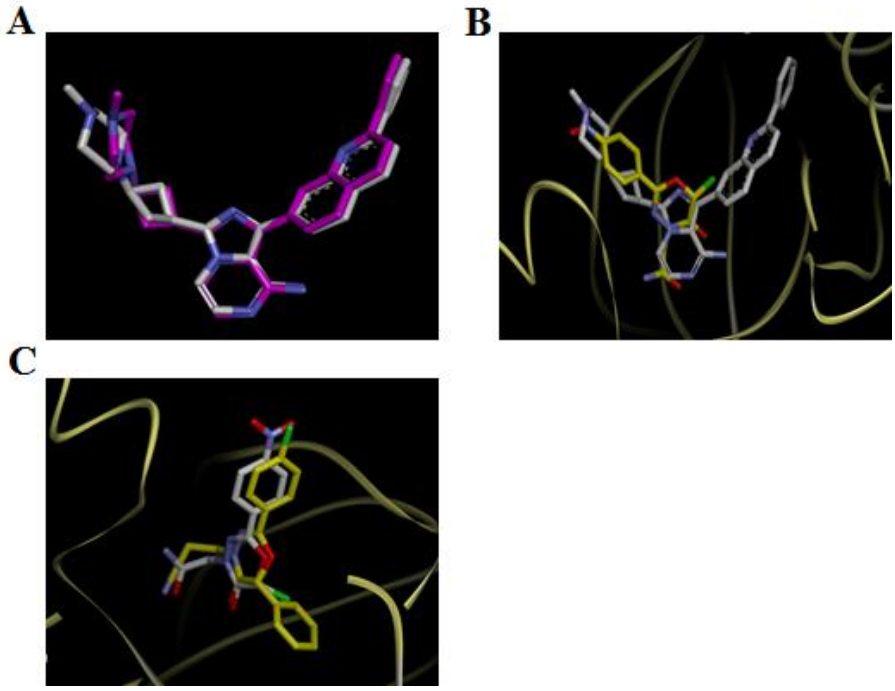


그림 1-4. IGF-1R (Tripos 방법을 이용하여 minimization)에 binding 된 리간드의 pose. A. IGF-1R PDB 내 PQIP (PDB: 3D94; white)와 다시 docking한 PQIP (magenta)의 binding pose 비교. **B.** PQIP (white)와 OXA40 (yellow)의 pose 비교. **C.** OXA40 (white)과 LL-2003 (**3c**) (yellow)의 pose 비교.

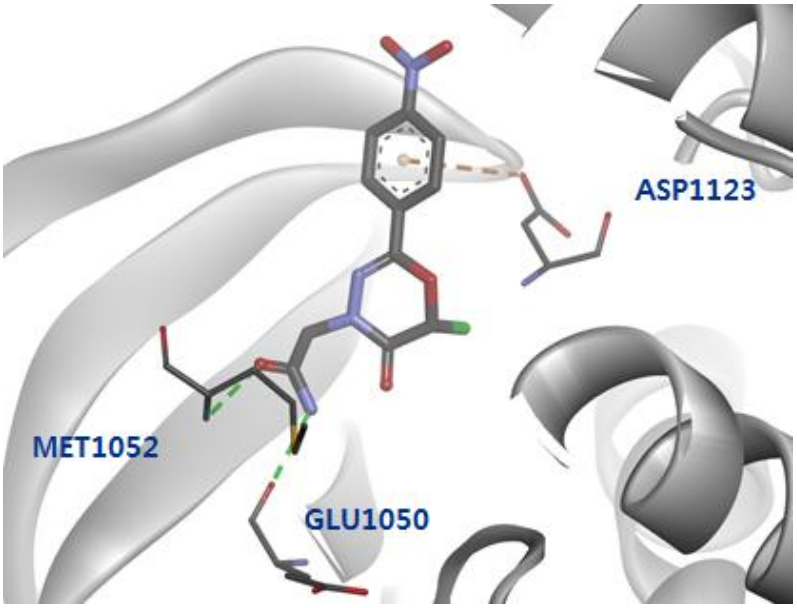
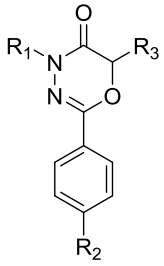


그림 1-5. IGF-1R에 binding 된 OXA40 pose.



Compound				Sulflex-Dock total score (-logKd)	Crash	Polar
	R_1	R_2	R_3			
OXA40	$-CH_2CONH_2$	$-NO_2$	-Cl	5.5535	-0.6493	3.1372
3b	$-CH_2CH_2CN$	$-NO_2$	-Ph	6.7235	-1.1729	0.7479
3c (LL-2003)	$-CH_2CH_2CN$	-Cl	-Ph	7.5946	-1.3665	2.3860
3d	$-CH_2CH_2CN$	-Br	-Ph	6.8658	-0.5649	0.4341
4c	$-CH_2CH_2COOCH_3$	-Cl	-Ph	7.7141	-0.5602	1.7115

표 1-1. IGF-1R에서의 docking score.

제 2 절 Src 단백질 내에서의 binding pose 규명

대표 물질로 선정한 LL-2003 (**3c**)의 Src 단백질의 binding pose를 규명하기 위해 ATP binding site에 리간드를 (CGP77675) 포함한 구조를 이용하여 (PDB: 1YOL) 분자 모델링을 수행하였다.[32] 목표 단백질인 IGF-1R과 Src는 아미노산 서열은 39%로 낮은 상동성을 가지지만 그림 1-6A와 같이 8개의 α-helices와 1개의 β-sheet 구조를 공유하며 RMSD 6.375 Å으로 (각 residue의 Cα 탄소를 기준으로 align) 높은 구조적 일치성을 보인다 (PDB: 3D94; IGF-1R, PDB: 1YOL; Src). 따라서 LL-2003 (**3c**)은 IGF-1R에서와 같이 Src의 ATP binding site 내에서 단백질과 상호작용할 수 있을 것이라 생각하였다. 분자 모델링 결과 그림 1-6B와 같이 LL-2003 (**3c**)의 chloro group은 단백질 표면으로 노출되며 phenyl group은 hydrophobic pocket내에 적절히 위치한다. 반면 hit compound인 OXA40은 oxadizinone C6 위치의 chloro group이 Src 단백질과 상호작용을 보이지 않는 것을 관찰할 수 있었다 (그림 1-7). 이는 IGF-1R 결과와 유사하였으며 표 1-2를 살펴보면 docking score 또한 OXA40이 5.1727 로 ($-\log K_d$) 낮은 수치를 보이는 반면에 C6 위치가 phenyl로 치환된 **3b-3d**와 **4c**는 모두 OXA40보다 더 높은 score를 보였다. 그러므로 phenyl로 치환된 구조는 Src 단백질과 상호작용을 통해 화합물과 단백질 binding의 안정성을 부여할 것으로 예상하였다.

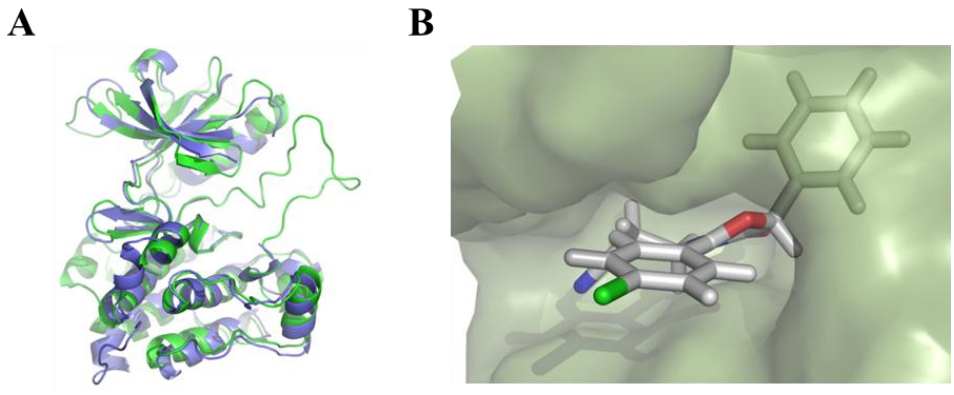


그림 1-6. Src 단백질을 이용한 분자 모델링. A. IGF-1R (PDB: 3D94; green)와 Src (PDB: 1YOL; purple)의 구조적 일치도 비교. B. LL-2003 (3c)의 Src 단백질 binding site내에서의 binding pose.

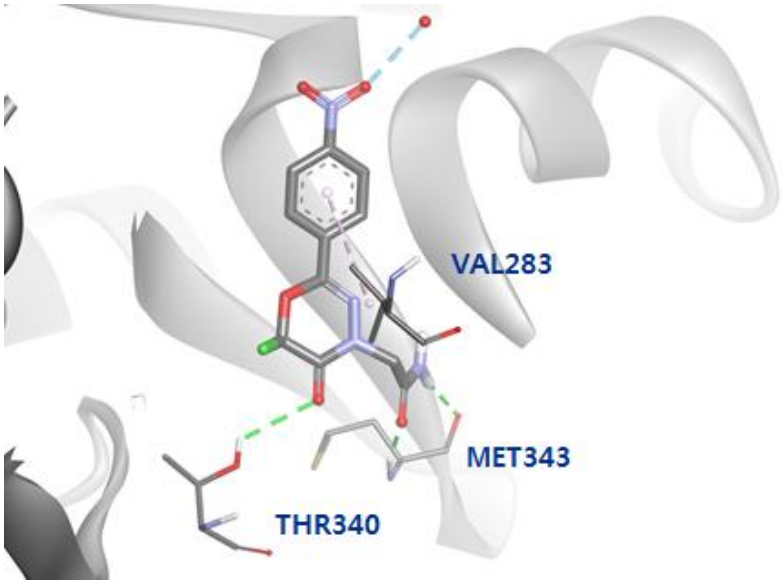
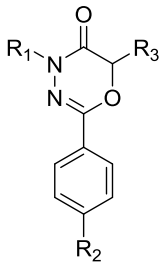


그림 1-7. Src 단백질에 binding 된 OXA40 pose.



Compound				Sulflex-Dock total score (-logK$_d$)	Crash	Polar
	R$_1$	**R$_2$**	**R$_3$**			
OXA40	-CH_2CONH_2	-NO_2	-Cl	5.1727	-0.6179	3.6130
3b	-CH_2CH_2CN	-NO_2	-Ph	7.5363	-0.7665	1.9466
3c (LL-2003)	-CH_2CH_2CN	-Cl	-Ph	6.4196	-1.2135	0.7870
3d	-CH_2CH_2CN	-Br	-Ph	6.3901	-0.9074	0.6840
4c	-$CH_2CH_2COOCH_3$	-Cl	-Ph	7.0490	-1.6231	0.5933

표 1-2. Src에서의 docking score.

제 3 절 리간드로서 LL-2003 (3c)의 상호작용

그림 1-8은 IGF-1R을 이용하여 docking한 결과로 화합물 **3b, 3d, 4c**의 binding pose와 상호작용 다이어그램을 나타낸 결과이다. 그림 1-5의 OXA40의 상호작용 다이어그램 결과와 비교해보면 화합물 **3b, 3d, 4c**의 oxadiazinone C6 위치의 phenyl group이 공통적으로 Met1024, Met1049와 hydrophobic interaction을 보이고 있다. 그림 1-9는 Src 단백질 내에서의 화합물 **3b, 3d, 4c**의 상호작용 다이어그램을 나타낸 결과로 IGF-1R과 마찬가지로 그림 1-7의 OXA40의 결과와 비교하였을 때 C6의 위치로 치환된 phenyl group이 Ala295, Ile338의 hydrophobic한 residue와 증가된 상호작용을 통해 결합적 안정성이 증가된 것으로 생각된다. 따라서 oxadiazinone C6 위치의 phenyl group 치환은 IGF-1R과 Src 단백질 모두에서 결합적 안정성을 높여주는 것으로 생각된다.

대표물질로 선정한 LL-2003 (**3c**)의 결과를 좀 더 살펴보며 그림 1-10A는 IGF-1R docking 결과로 oxadiazinone ring C6의 phenyl group이 화합물 **3b, 3d, 4c**와 공통적으로 IGF-1R의 N lobe residue (Met1024, Met1049)와 hydrophobic interaction을 함으로써 결합의 안정성에 기여한다. Met1024는 phenyl group과 π-sulfur interaction을[38] 하며 Met1049는 IGF-1R의 gatekeeper residue로 phenyl group과 π-alkyl interaction을 하고 있다. LL-2003 (**3c**)의 O1 atom은 Asp1123과 hydrogen bond을 하고 있는데 이 residue는 IGF-1R에서 보존된 DFG motif 이다 (표 1-3).

그림 1-10B의 Src 단백질의 결과에서는 oxadiazinone ring의 phenyl group은 hydrophobic pocket에 위치하는 Ala295, Ile338, Thr340과 상호작용을 하며 Thr340의 경우 LL-2003 (**3c**)의 carbonyl oxygen과

수소결합을 하고 있다. 또한 Val283은 Src의 Gly loop의 한 부분으로 chlorophenyl group과 hydrophobic interaction을 통해 결합적 안정성을 부여한다 (표 1-3).

LL-2003 (**3c**)는 두 단백질 내에서 리간드와 상호작용에 중요한 hinge residue와 상호작용을 한다. IGF-1R의 보존된 hinge residue로 알려진 Met1052는 LL-2003 (**3c**)의 nitrile group과 수소 결합을 하고 있다. 또한 Src의 hinge region으로 알려진 Thr340은 LL-2003 (**3c**)의 carbonyl oxygen과 수소 결합을 할 수 있으며 Thr340은 Src 단백질에 선택적인 결합에 있어서 중요한 residue로 알려져 있다.[39] 이 결과는 현재 알려진 kinase 저해제가 갖는 공통적인 특징으로 LL-2003 (**3c**)는 두 단백질의 hinge region과의 우호적인 상호작용을 통해 리간드로서 단백질에 결합할 수 있을 것으로 예측된다.

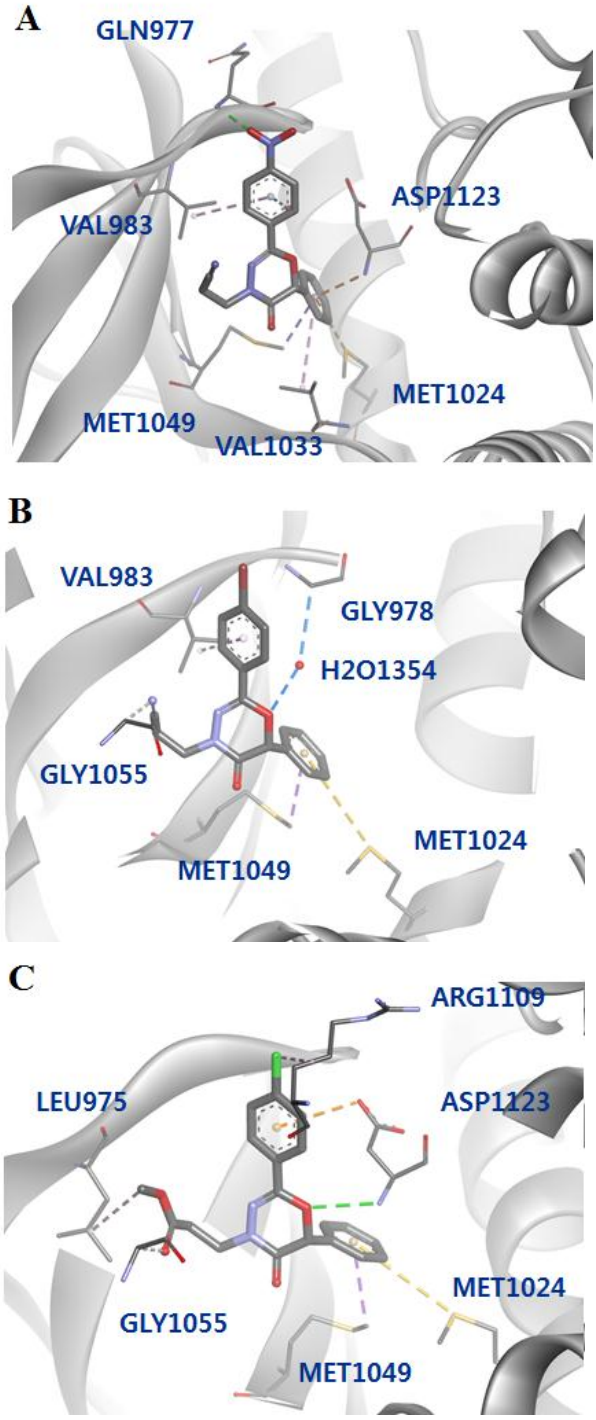


그림 1-8. IGF-1R 내에서 리간드의 상호작용 다이어그램. A. 3b의 binding pose. B. 3d의 binding pose. C. 4c의 binding pose.

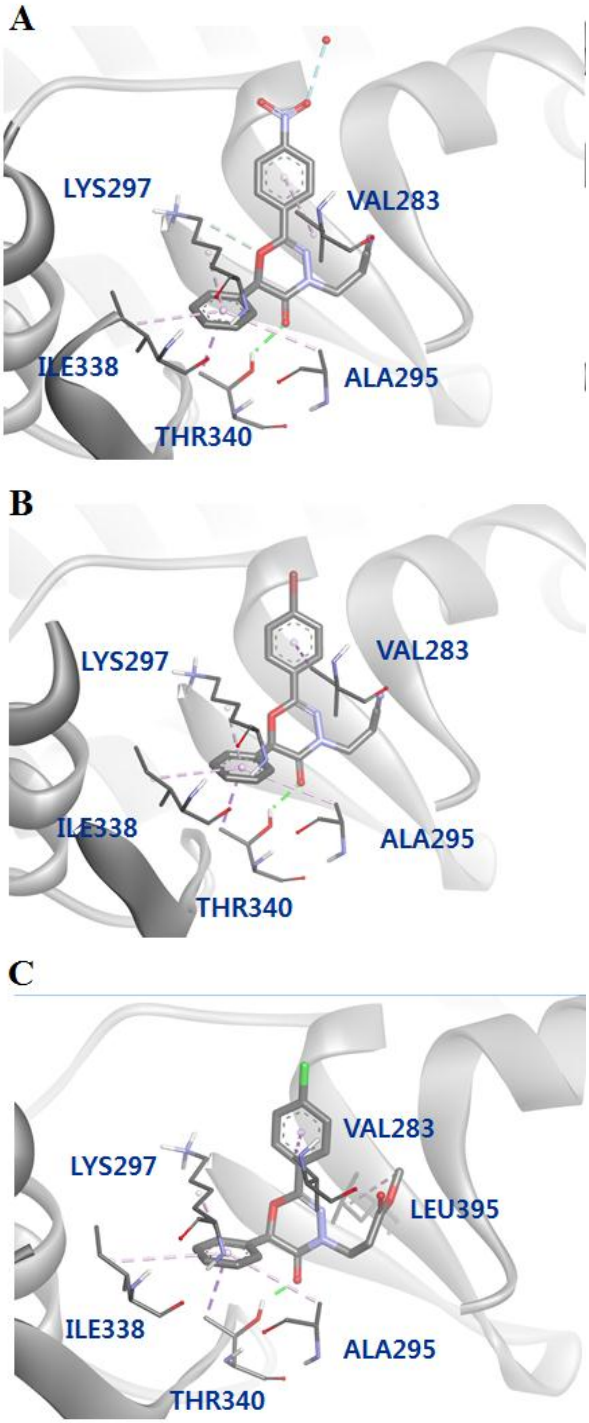


그림 1-9. Src 내에서 리간드의 상호작용 다이어그램. A. 3b의 binding pose. B. 3d의 binding pose. C. 4c의 binding pose.

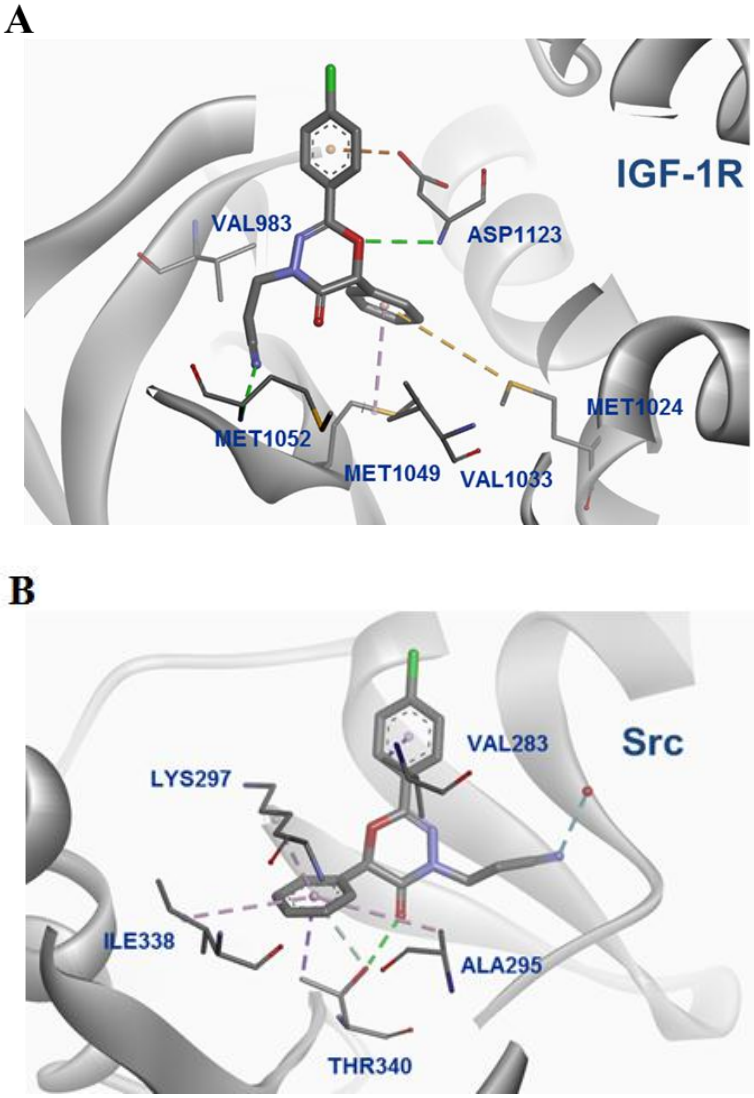


그림 1-10. LL-2003 (3c)의 상호작용 다이어그램. A. IGF-1R (PDB: 3D94)의 상호작용. B. Src (PDB: 1YOL)의 상호작용. 수소결합 (green), -sulfur (gold), -alkyl hydrophobic interaction (pink)을 나타낸다.

Target	Name	Distance	Category	Type
	MET1052 - 3c : Nitrile	2.743 Å	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
	ASP1123 - 3c : O1 atom	3.083 Å	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
IGF-1R	ASP1123 - 3c : Chlorophenyl	3.921 Å	Electrostatic	Pi-Anion
	MET1024 - 3c : phenyl	5.773 Å	Other	Pi-Sulfur
	MET1049 - 3c : phenyl	4.298 Å	Hydrophobic	Pi-Alkyl
	THR340 - 3c : carbonyl oxygen	2.633 Å	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond
	THR340 - 3c : phenyl	3.459 Å	Hydrogen Bond	Pi-Donor Hydrogen Bond
	THR340 - 3c : phenyl	3.403 Å	Hydrophobic	Pi-Sigma
Src	VAL283 - 3c : Chlorophenyl	3.639 Å	Hydrophobic	Pi-Sigma
	ALA295 - 3c : phenyl	4.895 Å	Hydrophobic	Pi-Alkyl
	LYS297 - 3c : phenyl	3.742 Å	Hydrophobic	Pi-Alkyl
	ILE338 - 3c : phenyl	5.310 Å	Hydrophobic	Pi-Alkyl

표 1-3. LL-2003 (3c)의 상호작용 다이어그램.

제 3 장 결론 및 고찰

IGF-1R은 암의 생성과 성장에 있어서 수 년 동안 주요한 목표 단백질로 여겨져 왔다.[40] 하지만 최근까지도 개발된 IGF-1R의 저해제는 매우 적으며 지속적인 연구가 필요하다. 선행 연구에서 도출한 OXA40은 solid-phase synthesis을 이용하여 합성할 수 있기 때문에 합성이 쉽다는 장점과 현존하는 IGF-1R 저해제와 비교하여 새로운 구조라는 장점을 갖고 있어서 매력적인 화합물로 연구적 가치가 높다. 그러므로 본 연구에서는 분자 모델링을 이용하여 OXA40에 대한 IGF-1R에서의 binding pose를 규명하였다. OXA40은 IGF-1R의 ATP binding site에 존재하는 리간드 PQIP와 동시에 docking 하였으며 그 결과 oxadiazinone ring과 PQIP의 imidazo[1,5-a]pyrazine-8-amine 부위가 잘 겹쳐지며 전체적인 구조도 매우 유사한 binding pose를 보였다. 그러므로 OXA40은 IGF-1R의 ATP binding site에 결합할 것으로 생각하였다. 하지만 OXA40은 PQIP와 비교하였을 때 oxadiazinone C6 위치의 chloro group이 위치하여 IGF-1R과의 상호작용이 더 낮은 것으로 생각되었다. 따라서 oxadiazinone C6 위치를 PQIP와 같이 aromatic group으로 치환한다면 IGF-1R과 상호작용이 증가할 것이라 생각하였으며 더 높은 활성을 가질 수 있는 oxadiazinone ring의 C6 위치가 phenyl로 치환된 화합물에 대한 설계를 제안하였다. 이를 바탕으로 C6위치가 치환된 화합물이 합성되었으며 이호영 교수님 연구실에서 이 화합물의 항암 활성 평가 (MTT assay)와 목표 단백질을 찾기 위한 western blot assay를 수행하였다.[35] 항암 활성 평가 결과 phenyl로 치환된 화합물은 OXA40 보다 더 높은 활성을 갖는 것으로

모델링의 결과와 상응하는 결과를 확인하였으며 그 중 가장 활성이 높았던 LL-2003 (**3c**)을 추가 실험을 하기 위하여 대표 물질로 선정하였다.[35] 항암 활성 평가를 통하여 선정한 LL-2003 (**3c**)을 western blot analysis하였을 때 IGF-1R과 Src 단백질의 발현에는 영향을 주지 않으며 IGF-1R와 Src 단백질의 인산화를 동시에 저해하는 것을 관찰하였다.[35] 이는 기존의 알려진 저해제가 갖는 증가된 Src 단백질의 활성에 의해 유발되는 내성 문제를 해결할 수 있는 효과적인 대안으로 생각된다.

Src 단백질은 IGF-1R과 아미노산 서열 비교 시 낮은 상동성을 보이지만 높은 구조적 일치성을 보였다. 따라서 IGF-1R과 유사하게 LL-2003 (**3c**)는 Src 단백질의 ATP binding site에 결합할 수 있을 것으로 생각되어 ATP binding site에 리간드를 갖고 있는 구조를 이용하여 docking을 실시하였다. Src 단백질에서 LL-2003 (**3c**)는 IGF-1R과 유사한 결과를 보였으며 C6의 위치가 phenyl로 치환된 구조들이 OXA40 보다 더 높은 docking score를 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다.

PQIP는 IGF-1R의 ATP binding site 내에서 hinge region에 존재하는 Met1052와 수소결합을 하고 있다. 추가적으로 PQIP의 phenylquinoline이 kinase에서 보존된 것으로 알려진 DFG motif인 Asp1123와 gatekeeper로 알려진 Met1049과 N lobe에 위치한 Met1024 residue 사이에 존재하며 주변 residue와 상호작용을 통해 ATP binding site에 결합하는 것으로 알려져 있다.[37] LL-2003 (**3c**)의 상호작용을 PQIP의 결과와 비교하면 리간드 결합에 중요한 residue와 공통적으로 상호작용을 보이며 OXA40과 비교하여 치환된 phenyl group이 IGF-1R의 hydrophobic한 pocket내에 적절하게 위치함으로써

안정성을 부여할 수 있음을 확인하였다. 또한 Src 단백질의 리간드인 CGP77675의 상호작용과 비교하여도 결합에 중요한 상호작용을 보인다.[32] 특히 Src 단백질의 결합적 선택성에 중요한 hinge region의 Thr340과 수소결합과 hydrophobic interaction을 갖고 있다. LL-2003 (**3c**)는 모델링 결과에서 IGF-1R과 Src 단백질의 hinge region의 residue와 상호작용을 보이며 이는 kinase와의 상호작용에 있어서 매우 중요한 상호작용으로 LL-2003 (**3c**)이 두 단백질에 모두 결합할 수 있음을 확인할 수 있다.

본 연구는 분자 모델링을 통하여 OXA40의 binding pose 규명을 통해 활성이 증가된 새로운 oxadizinone 화합물을 제안하였으며 이를 바탕으로 oxadiazinone ring의 C6 위치에 다양한 치환기 도입을 통해 항암 활성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

제 4 장 실험 방법

제 1 절 분자 모델링

분자 모델링 (Molecular docking)은 Sybyl-X2.1.1 (Tripos Inc, St Louis, MO) 프로그램의 Surflex-dock을 이용하여 수행하였으며, IGF-1R 단백질 (PDB: 3D94)과 Src 단백질 (PDB: 1YOL)의 구조는 리간드를 포함한 형태를 이용하였다. 새로운 리간드는 이차원적 구조를 이용하여 Sybyl program 내에서 삼차원적 구조를 생성하였다. 단백질의 구조는 수소를 모두 추가해 주었으며, 구조의 안정화를 위해 Powell's 방법을 이용하여 RMSD가 0.001 kcal/mol · Å 보다 낮을 때까지 Amber와 Tripos 방법으로 energy minimization을 실시하였다 (Conjugate gradient minimization). 기존의 구조 내에 포함된 리간드는 추출하였으며 수소결합에 참여하지 않은 물 분자 또한 제거하였다. Docking은 Surflex-Dock GeomX 모드를 이용하여 수행하였으며, Threshold 0.5 Å와 Bloat 0 Å으로 하여 추출한 리간드를 기준으로 binding site을 형성하였다. 추출한 리간드 구조를 새로운 리간드와 함께 docking하였으며 기존의 binding되어 있는 형태와 비교하여 유효성을 판단하였다. 분자간의 상호작용을 더 보기 위해 Discovery studio 4.0 visualizer를 이용하였다.

Part Ⅱ. PDEδ 저해제에 관한 초기 연구

제 1 장 서론

Ras 단백질은 GTPase의 한 종류로 세포의 성장, 분화 그리고 자살 등의 신호 전달을 매개하는 단백질이다.[41] 세포 성장 인자가 세포막에 존재하는 receptor tyrosine kinase (RTK)와 결합하면 수용체에 존재하는 tyrosine residue가 인산화되고 이는 guanine nucleotide exchange factor (GEF)를 세포막 근처로 모이게 한다. Ras 단백질은 세포막 근처에 모인 GEF에 의해 활성화 되며 이를 통해 Ras/Raf/Mek/Erk의 경로를 따라 세포 성장과 관련된 신호를 전달하게 된다 (그림 2-1).[42] 활성 상태의 Ras 단백질은 GTPase activating proteins (GAP)와 결합을 통해 Ras에 결합된 GTP의 가수 분해를 촉진한 후 다시 Ras 단백질은 비활성 상태인 GDP가 결합된 형태가 된다.[43-44] 따라서 Ras 단백질은 GTP가 결합된 형태의 활성 상태와 GDP가 결합된 비활성 상태의 cycle에 따라 신호 전달에서 스위치 역할을 한다.[45] 그러나 변이된 Ras 단백질은 GTPase의 활성을 상실하여 GTP가 결합된 활성 상태를 유지하게 되어 세포 성장과 관련된 신호를 지속적으로 전달하여 암을 유발한다.[46] 항암 목표 단백질로서 중요성 때문에 과거 수 십 년 동안 Ras 단백질의 신호 전달을 막는 저해제 개발 연구가 진행되고 있지만 아직 임상학적으로 사용되는 약은 존재하지 않는다. 이는 Ras 단백질과 GTP사이의 affinity가 picomolar 수준이며 단백질 내 알려진 allosteric site가 존재하지 않기 때문이다.[47] 따라서 임상에서 사용 가능한 Ras 단백질 저해제에 대한 개발은 주요한 과제로 남아 있다. Ras 단백질은 K-Ras4A, K-Ras4B, N-Ras, H-Ras로 4종류의 isoform이 존재한다. 모든 isoform은 공통적으로 높게 보존된 G-

domain이 있으며 세포막에 결합할 수 있는 C-terminal hypervariable region (HVR)이 존재한다. Ras 단백질의 생물학적 활성은 세포 내 위치와 단백질의 dynamic과 연관되어 있다.[48-50] Ras 단백질은 세포 내에서 활성을 보이기 위해서 정확한 위치의 세포막에 결합되어야 하며 이를 위해서는 단백질이 발현된 후에 추가로 변형되는 post-translational modification 과정이 필요하다. 모든 isoform의 Ras 단백질은 공통적으로 C-terminal에 CaaX의 서열을 갖고 있으며 세포질에 존재하는 farnesyltransferase에 의해 15개의 탄소로 이루어진 farnesyl group이 CaaX 서열의 cysteine thiol에 첨가된다. 그 이후 Ras converting enzyme 1 (RCE1)에 의해 C-terminal 말단의 3개의 아미노산이 제거되며 Isoprenylcysteine methyl transferase에 의해 methylation 되는 modification이 일어난다 (그림 2-1).[51] 하지만 이 modification만으로 Ras 단백질이 세포막에 안정하게 결합하기는 충분하지 않다. H-Ras와 N-Ras는 추가적으로 HVR에 존재하는 cysteine residue에 가역적으로 S-palmitoylation이 일어난다. 따라서 N-Ras와 H-Ras는 palmitoylation의 cycle에 따라 세포 내에서 단백질의 위치가 조절될 수 있다.[50, 52-53] 반면에 K-Ras는 K-Ras 유전자로부터 발현되어 alternative splicing에 의해 K-Ras4A, K-Ras4B의 isoform이 발현된다. K-Ras4A는 H-Ras와 N-Ras와 같이 S-palmitoylation이 일어나며 farnesylation과 palmitoylation에 의해 세포막에 안정하게 결합할 수 있다. 그러나 K-Ras4B는 HVR에 연속적인 양전하를 띠는 lysine residue가 존재한다. 이는 음전하를 띠고 있는 세포막에 정전기적 인력에 의해 결합할 수 있다. 따라서 K-Ras4B의 경우에는 정전기적 인력과 farnesylation에 의해 세포막에 결합하게 된다. 변이된 K-Ras 유전자는 췌장암, 대장암, 폐암에서 각각 90%, 45%, 35%에서 발견 되며

K-Ras4A 단백질 보다 K-Ras4B 단백질은 더 다양한 세포에서 발현된다. 따라서 K-Ras4B는 Ras 단백질의 isoform 중 가장 중요한 항암 목표 단백질로 여겨진다.[54-56]

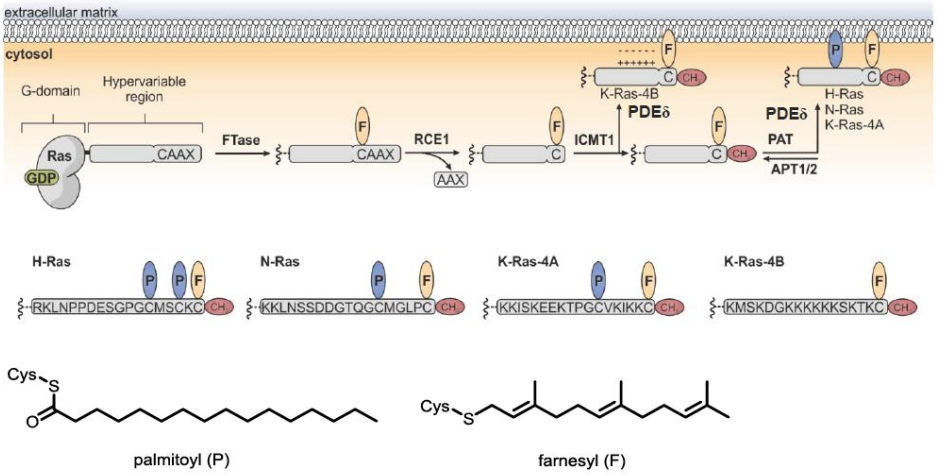


그림 2-1. Ras 단백질의 post-translational modification.[42]

17-kDa의 prenyl-binding protein인 PDEδ는 cGMP 3',5'-cyclic phosphodiesterase delta subunit으로 다양한 종에서 높게 보존되어 있다. PDEδ의 구조는 2개의 β-sheet 구조에 의해 형성된 hydrophobic한 pocket을 가진 형태로 immunoglobulin-like β-fold 구조이며 이 pocket 내에는 prenyl group이 결합할 수 있다.[57] PDEδ는 mammalian의 광수용체 세포로부터 분리되었으며 cyclic nucleotide phosphodiesterase 6 (PDE6)의 C-terminal에 prenyl group과 상호작용 하여 PDE6를 세포막으로부터 분리하는 역할을 수행하여 PDE6의 활성을 조절하는 것으로 보고되었다.[58] PDEδ는 광수용체 세포뿐만 아니라 전반적으로 대부분의 세포 내에서 발현되며 PDE6뿐만 아니라 farnesylation된 Ras 단백질과도 상호작용한다.[59] PDEδ는 Ras 단백질의 farnesyl group과의 결합을 통해 Ras 단백질을 세포막으로부터 분리시

켜 시공간적인 위치를 조절함으로써 Ras 단백질의 신호전달을 조절한다. 이는 PDEδ 변이와 siRNA를 이용한 연구를 통해 PDEδ의 상호 작용 억제는 Ras 단백질의 신호 전달의 저해를 유발하는 것으로 확인하였다.[60] 최근 독일의 Waldmann 그룹에서는 Ras 단백질을 직접 저해하는 저해제의 대안으로 Ras 단백질과 PDEδ 사이의 상호작용을 억제하여 신호전달을 억제할 수 있는 저해제 deltarasin에 관한 연구를 (그림 2-2) 보고한 바 있다.[61] Deltarasin은 PDEδ의 prenyl binding site에 결합하며 이는 PDEδ와 Ras가 결합하는 것을 막아 Ras가 신호 전달을 위해 정확한 위치에 존재하지 못하게 하여 신호 전달을 억제하는 역할을 한다.

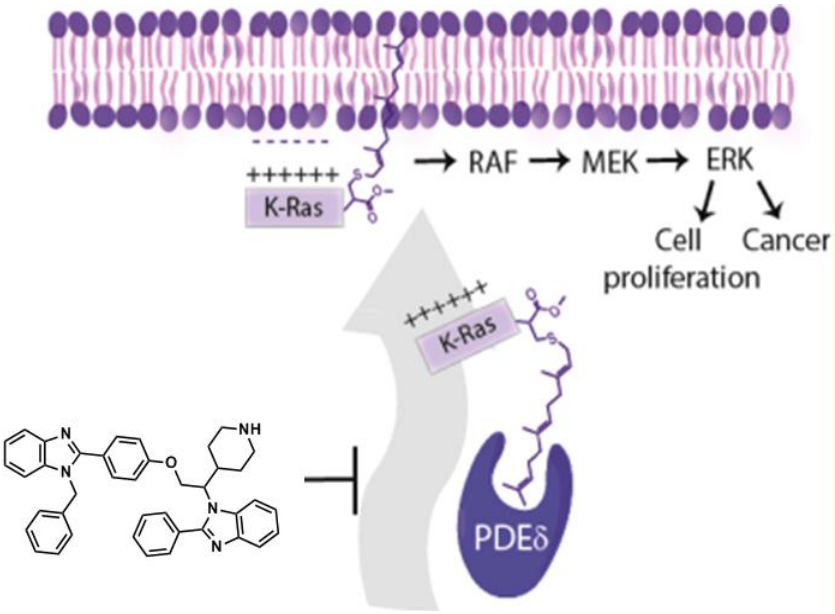


그림 2-2. Ras 단백질의 신호 전달 경로 및 deltarasin 저해 기전.[62]

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 PDEδ의 저해제인 deltarasin과 구조적 유사성을 보이며 380-430 nm에서 최대 흡수 파장을 나타내고, 480-540 nm에서 최대 방출 파장을 보인다. Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 90-110 nm로 높은 stokes shift을 보이며 이는

흡수 파장과 방출 파장이 명확히 구분 되는 특징으로 fluorescence probe로 사용되는데 이점이 있다. 또한 환경에 따라 형광의 방출 파장이 변하며 이는 생물학적 변화나 리간드와 목표 단백질 사이의 상호작용을 관찰하는데 용이하다.[63]

본 연구에서는 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물이 deltarasin과 구조가 유사하다는 점에 착안하여 PDEδ의 새로운 저해제를 찾는 것을 목표로 하였다. Deltarasin은 형광적 특성을 갖고 있지 않기 때문에 형광물질을 conjugation하여 연구를 진행하였지만 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 형광적 특성을 가지고 있기 때문에 쉽고 빠르게 PDEδ 저해제에 관한 연구를 진행할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

제 2 장 실험 결과

제 1 절 Fluorescence 측정

E.Coli cell에서 과 발현 시켜 분리 정제한 재조합 PDEδ을 이용하여 형광 측정 실험을 실시하였다. 단백질은 280 nm 빛을 조사하였을 때 tryptophan residue에 의해 340 nm에서 최대 방출 파장을 보이며 리간드가 결합되었을 때 340 nm의 최대 방출 파장의 세기가 감소하거나 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 현상에 의해 최대 방출 파장의 변화를 보인다. PDEδ는 구조 내에 4개의 tryptophan을 갖고 있으며 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 형광을 보이기 때문에 PDEδ에 결합한다면 FRET 현상에 의해 최대 방출 파장이 변화할 것으로 예상했다. 그림 2-3를 살펴 보면 빨간색 점선은 PDEδ의 형광을 파랑색 실선은 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 형광을 각각 280 nm 빛을 조사하여 측정한 결과이다. Buffer 내에서 PDEδ는 340 nm에서 최대 방출 파장을 보이며 Indolizino[3,2-c]quinoline는 약 500 nm에서 최대 방출 파장을 보인다. 녹색의 실선은 PDEδ와 Indolizino[3,2-c]quinoline를 섞은 후 형광을 측정하였을 때의 형광 파장이며 단백질의 340 nm에서의 최대 방출 파장은 줄어들며, Indolizino[3,2-c]quinoline의 최대 방출 파장이 475 nm로 shift되는 것을 관찰할 수 있었으며 자체 형광 세기도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. FRET 현상의 관찰을 통하여 일차적으로 Indolizino[3,2-c]quinoline이 PDEδ에 결합하는 것을 확인할 수 있었으며 화합물 2와 같이 형광의 세기가 낮거나 화합물 13과 같이 형광의 변화가 없는 화합물은 제외하고 binding 확인 실험을 추가적으로 실시 하였다.

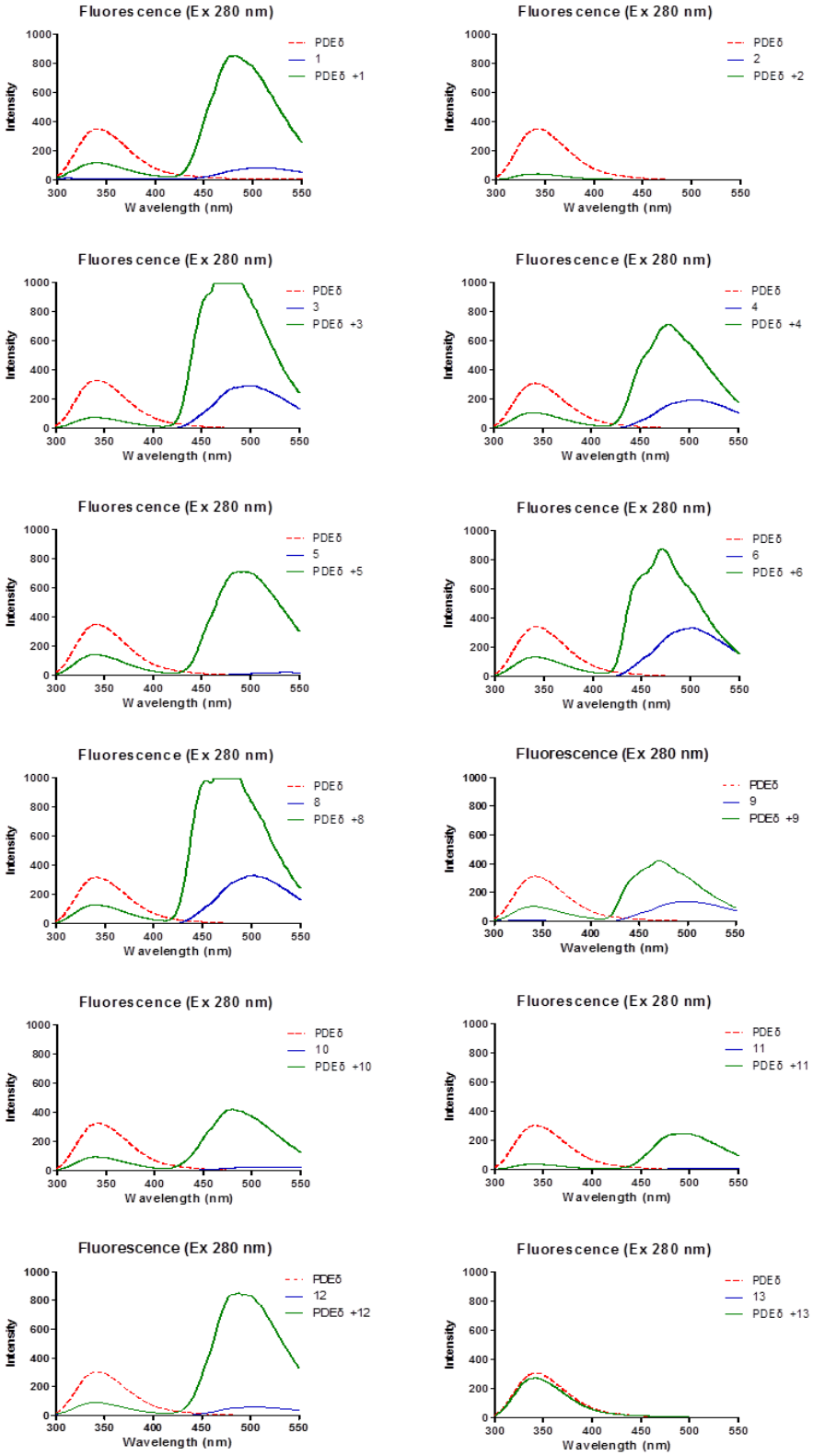


그림 2-3. Indolizino[3,2-c]quinoline과 PDEδ의 형광 측정 결과.

제 2 절 Fluorescence based polarization screening

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물과 PDEδ의 binding을 추가적으로 확인하기 위하여 fluorescence based polarization 실험을 실시하였다. Fluorescence polarization 실험은 형광을 갖고 있는 화합물이 단백질에 결합하였을 때 화합물의 tumbling되는 속도 차이를 형광을 이용하여 확인하는 실험으로 polarization된 빛을 조사하였을 때 화합물이 단백질에 결합한 경우 tumbling되는 속도가 낮아지며 그 결과 polarization된 빛을 확인할 수 있다. 정량적으로 fluorescence polarization은 빛을 조사하였을 때 방출된 parallel한 빛과 perpendicular한 빛의 세기 정도 차이를 전체 방출된 빛의 세기로 나눈 값으로 정의한다.[64] 그림 2-5를 살펴 보면 0.5 μM Indolizino[3,2-c]quinoline이 존재하는 상태에 PDEδ를 0-32 μM로 농도를 증가시켜 첨가하였을 때 polarization 정도가 첨가한 PDEδ 농도에 따라 증가하며 과량의 단백질이 첨가되었을 때 포화 상태를 이루는 것을 관찰할 수 있었다. 이를 이용하여 형광을 보이는 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물들을 screening 하였으며 (그림 2-4) 그 결과 300-500 nM 수준의 높은 affinity를 갖는 화합물을 확인하였으며 그 중에서 추가적인 실험을 실시하기 위하여 8 종류의 화합물을 선정하였다 (표 2-1).

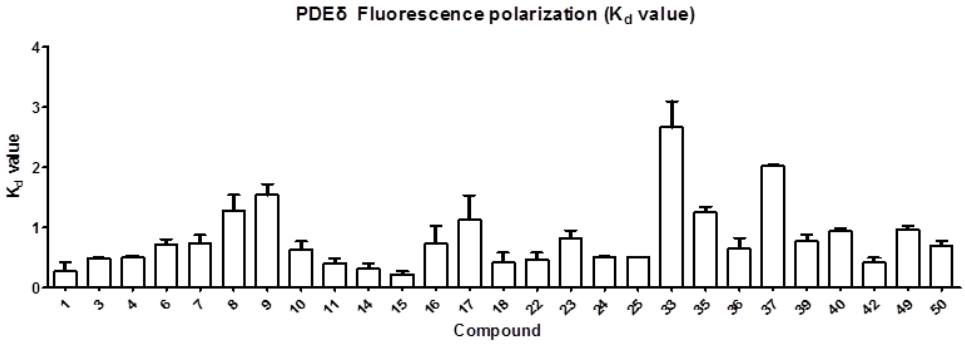


그림 2-4. Fluorescence based polarization screening 결과.

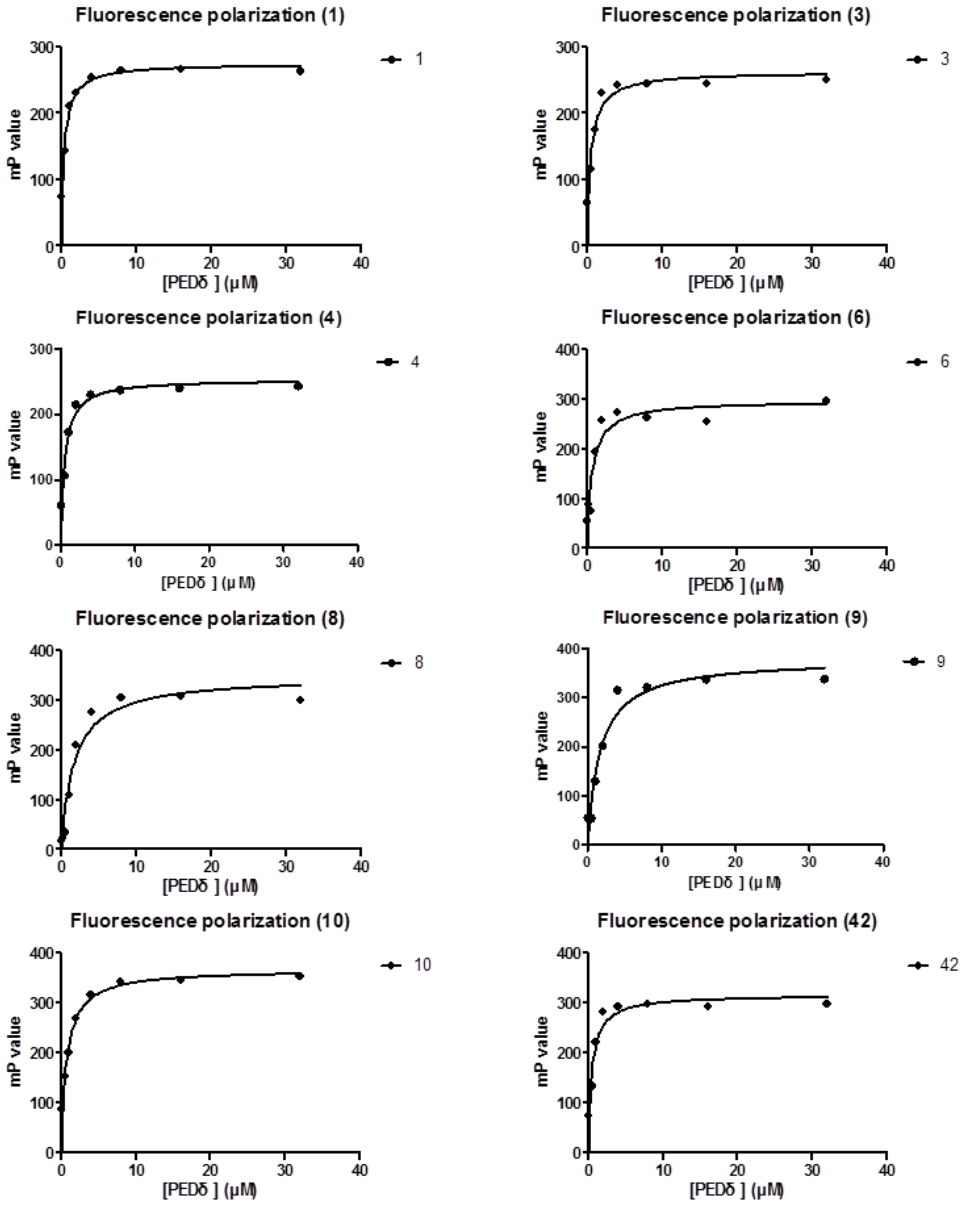
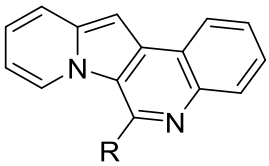


그림 2-5. Indolizino[3,2-c]quinoline의 Polarization 결과.



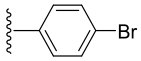
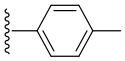
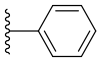
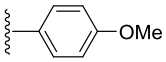
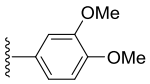
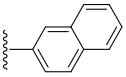
Compound	R	λ_{abs} (nm)	$\lambda_{max\ em}$ (nm)	K_d value (μM)
1		430	530	0.284
3		440	526	0.491
4		430	515	0.505
6		430	515	0.729
8		430	515	1.285
9		430	515	1.541
10		430	530	0.643
42		440	526	0.425

표 2-1. 도출한 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물.

제 3 절 Competition binding assay

Fluorescence based polarization screening을 통해 도출한 8개의 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물에 대해 PDEδ 저해제로 알려진 deltarasin과 polarization 실험을 이용한 Competition binding 실험을 실시하였다. 미리 incubation하여 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물과 PDEδ complex을 형성한 후 형광을 갖지 않는 deltarasin을 과량 첨가하였을 때, deltarasin과 화합물이 같은 binding site를 공유하면 과량의 deltarasin에 의해 화합물의 상호작용이 대체된다. 이에 따라 결합하지 않은 화합물의 농도가 증가함에 따라 polarization 정도는 감소하게 되며 결국 PDEδ와 complex를 이루었던 화합물이 모두 대체되면 depolarization된다. 그림 2-6을 살펴 보면 시간에 따라 Indolizino[3,2-c]quinoline와 PDEδ complex에 의한 polarization 수치는 변하지 않는데 반해 deltarasin을 과량 첨가한 경우 polarization 정도가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 시간에 따라 polarization이 감소하는 그래프를 통해 half-life를 측정할 수 있으며 이를 통하여 과량의 경쟁 화합물이 존재할 때 측정하고자 하는 화합물의 dissociation rate constant를 구할 수 있다.[65] 그림 2-6를 보면 상대적으로 K_d가 높은 화합물 9의 경우 3과 비교하여 deltarasin을 첨가하였을 때, 초기 polarization 값의 감소를 보이며 이는 측정된 half-life 보다 더 낮은 값을 가질 것으로 생각된다. Fluorescence based polarization 실험을 통하여 K_d와 half-life를 확인한 결과 더 높은 affinity를 갖는 화합물이 더 긴 half-life를 갖는 것을 확인할 수 있었다 (그림 2-7).

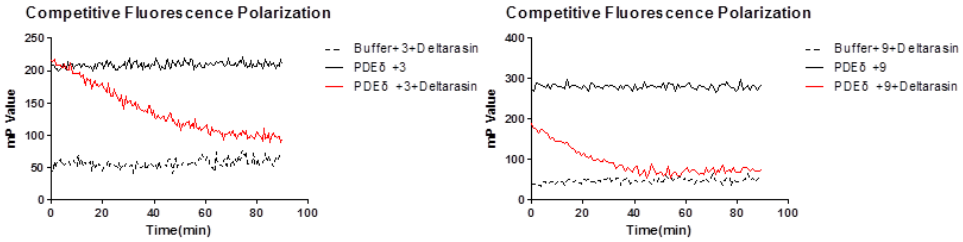


그림 2-6. Competition binding assay 결과.

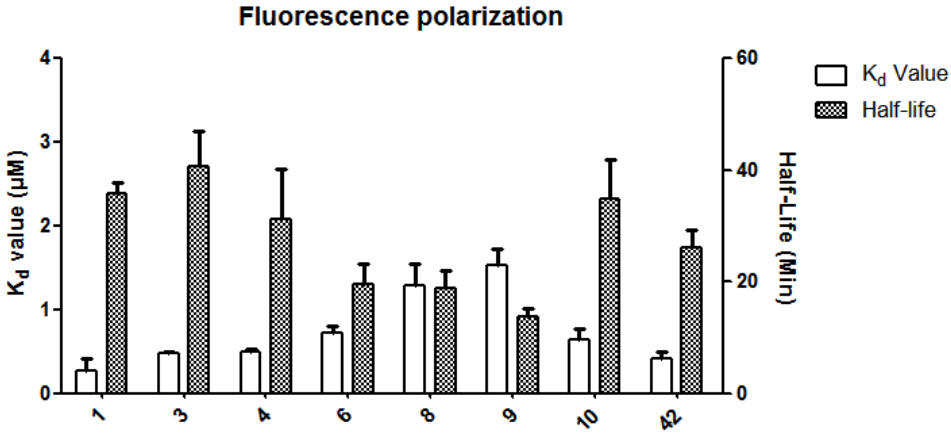


그림 2-7. Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 K_d와 half-life.

제 4 절 Target specificity 확인

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 PDEδ에 대한 결합적 특이성을 확인하기 위해 정제 과정에서 얻어지는 여러 fraction에 형광의 세기가 높으며 PDEδ의 결합 정도가 높은 화합물 **3**을 첨가한 후 형광을 관찰하였다. 그림 2-8의 SDS gel electrophoresis 결과를 보면 과 발현된 PDEδ는 elution 1, 2, 3과 soluble fraction에 많이 존재한다. 이때 각 fraction에 0.5 mM의 화합물 **3**을 첨가하면 **3**이 PDEδ와 상호작용을 통해 나타내는 최대 방출 파장 약 475 nm의 색인 cyan 색을 관찰할 수 있었다 (Ex 312 nm). 또한 PDEδ가 포함된 정도에 따라 soluble과 elution 1, 2, 3의 fraction에서 강한 형광을 관찰할 수 있었으며 **3**의 농도를 0.1 mM로 낮추었을 때 **3**은 PDEδ가 가장 많이 포함된 elution 1, 2 fraction에서만 약한 형광을 관찰할 수 있었다. 따라서 화합물 **3**은 PDEδ에 특이적으로 결합하여 형광을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 plate 상에서 나타난 결합에 따른 형광은 1주일의 시간이 지나도 유지되는 것을 관찰할 수 있었으며 이를 통해 PDEδ와 결합된 화합물 **3**의 형광은 매우 안정한 것으로 생각된다.

화합물 **3**을 PDEδ를 과 발현시킨 *E.Coli* cell를 lysis시킨 lysate와 incubation하여 Native gel electrophoresis 통해 **3**의 PDEδ에 대한 결합 특이성을 추가적으로 관찰하였다. 화합물 **3**과 PDEδ의 상호작용을 유지하기 위해 Sodium dodecyl sulfate (SDS)가 포함되지 않은 native gel을 이용하여 전기영동 하였다. Native gel electrophoresis는 단백질의 3차 구조를 유지한 상태로 단백질을 분리하는 방법으로 단백질의 크기뿐만 아니라 전하에 따라 gel 상에서 이동속도의 차이가 나며 이를 이용하여 단백질을 분리하는 것이다. 정확한 비교를 위해 분리 정제한 단백질과 **3**을 incubation한 샘플을 함께 native gel에 loading하였다. 그

림 2-9A는 PDEδ와 3을 incubation한 후 native gel을 이용하여 분리한 뒤 화합물 3의 형광을 관찰한 결과로 312 nm의 빛을 조사한 후 585-625 nm의 방출파장을 관찰한 결과이다. 결과를 보면 화합물 3이 존재하는 lane에서만 band가 관찰되는 것을 확인할 수 있다. 그림 2-9B는 형광을 관찰한 같은 gel을 coomassie blue를 이용하여 염색한 후 band를 관찰한 결과로 gel 상의 단백질을 관찰할 수 있다. 결과를 보면 화합물 3의 형광이 관찰된 band의 위치에서 lysate와 분리 정제한 단백질의 band가 관찰되는 것을 확인할 수 있다. Lysate lane의 결과를 보면 lysate상에는 여러 단백질이 포함되어 있는데 화합물 3의 형광은 PDEδ가 존재하는 위치의 band에서만 특이적으로 나타난다. 따라서 화합물 3의 PDEδ에 대한 결합 특이성은 매우 높은 것으로 생각된다.

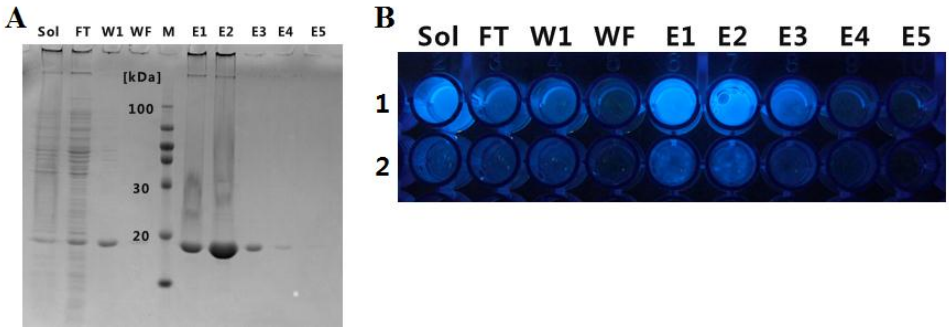


그림 2-8. Target specificity 확인. A. 21% SDS gel electrophoresis. **B.** 각 fraction에 화합물 3을 처리하였을 때의 형광 (1: 화합물 3을 0.5 mM 첨가, 2: 화합물 3을 0.1 Mm 첨가). Sol: Soluble, FT: Flow through, W1: Washing 1, WF: Washing final, M: Marker, E1-5: Elution을 나타낸다.

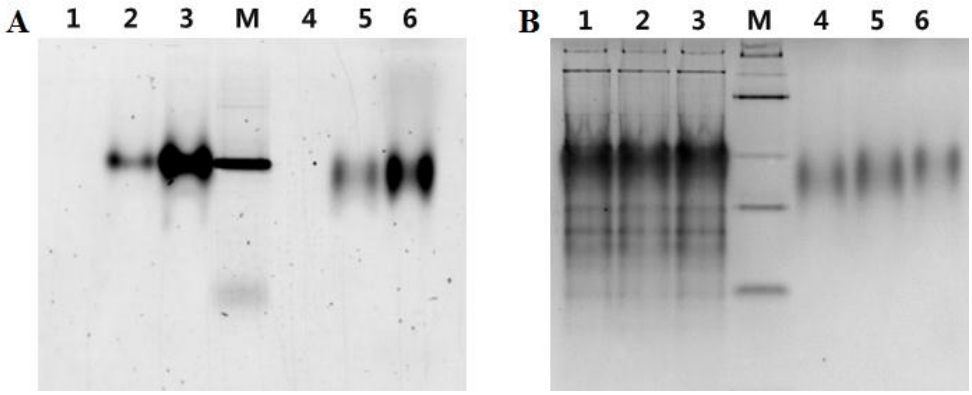


그림 2-9. PDEδ와 화합물 3의 Native gel electrophoresis을 이용한 interaction 확인. A. ImageQuant LAS 4000을 이용하여 12% native gel에 대한 화합물 **3**의 형광 분석 (Ex 312 nm, Em 585-625 nm). **B.** Coomassie blue 염색을 통한 native gel의 분석. (1: Lysate에 DMSO 첨가, 2: Lysate에 화합물 **3**을 5 μM 첨가, 3: Lysate에 화합물 **3**을 50 μM 첨가, M: Marker, 4: 정제한 PDEδ에 DMSO 첨가, 5: 정제한 PDEδ에 화합물 **3**을 5 μM 첨가, 6: 정제한 PDEδ에 화합물 **3**을 50 μM 첨가).

제 5 절 분자 모델링 연구

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 PDEδ에서의 binding pose를 확인하기 위해서 PDEδ에 리간드 *rac*-S1를 포함한 구조를 이용하여 분자 모델링을 실시하였다 (PDB: 4JV8).[61] 기존 구조에서 추출한 *rac*-S1를 함께 docking하였으며 그림 2-10A는 추출한 *rac*-S1와 기존의 PDB 구조 내 *rac*-S1의 pose를 비교한 결과로 (RMSD 0.4030 Å) 기존의 형태와 매우 유사한 결과를 보였으며 이를 통하여 docking의 유효성을 확인하였다. 그림 2-10B는 *rac*-S1과 화합물 3를 비교한 결과로 매우 유사한 binding pose를 보인다. 그림 2-11을 보면 화합물 3의 docking된 pose는 기존에 알려진 farnesyl group과 (PDB: 3T5G)[57] (*S*)-5의 (PDB: 4JVF) pose[61]와 비교하였을 때도 매우 유사하며 PDEδ의 farnesyl group이 결합하는 binding pocket 내에 위치한다. 따라서 화합물 3은 PDBδ의 farnesyl group이 결합하는 binding site에 결합할 것으로 생각했다.

그림 2-12는 화합물 3의 PDEδ binding site 내에서 상호작용 다이어그램으로 화합물 3은 PDEδ의 pocket 내에서 기존의 PDB 구조 내에서 수소 결합에 참여하는 것으로 알려진 Arg61과[61] 수소 결합을 하고 있으며 전반적으로 hydrophobic한 pocket 내에 존재하는 Met20, Ala47, Leu63, Val145, Leu147의 residue와 hydrophobic interaction을 이루어 결합적 안정성을 가질 것으로 보인다. 또한 저해제가 PDEδ pocket 내부에 들어가기 위해 중요한 Trp90과도 hydrophobic interaction을 보이며 따라서 화합물 3은 리간드로서 PDEδ에 결합할 수 있을 것으로 생각된다.[61] 화합물 9와 비교하여 10은 공통적으로 Indolizino[3,2-c]quinoline의 6번 위치에 naphthyl group을 치환기로 가지고 있지만 naphthyl group의 치환된 위치가 차이 난다. K_d를 비교하면 화합물 9는

1.541 μM이며 화합물 10은 0.643 μM로 약 2배의 차이가 난다. 화합물 9는 도출한 8개 화합물 중에 가장 높은 K_d 값을 갖고 있으며 이는 Indolizino[3,2-c]quinoline의 6번 위치에 크기가 큰 치환기를 갖고 있으며 naphthyl의 1번 위치에 치환되어 있으며 이는 binding pocket과 비교하여 너무 큰 치환기가 존재하여 반발력이 커지기 때문인 것으로 예상된다. 화합물 10은 naphthyl의 2번 위치에 치환됨으로써 binding pocket 내에서 주변 residue와 반발력이 적은 형태로 위치하기 때문에 더 낮은 K_d 값을 갖는 것으로 생각된다 (그림 2-13). 마찬가지로 Indolizino[3,2-c]quinoline의 6번 위치에 상대적으로 작은 치환기를 갖는 화합물 3과 같은 형태의 Indolizino[3,2-c]quinolone 화합물이 PDEδ에 리간드로서 더 높은 결합성을 갖는 것으로 보인다.

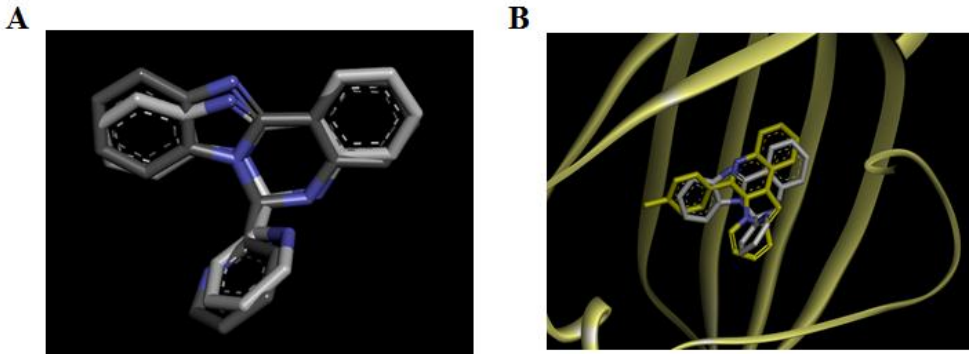


그림 2-10. PDEδ에 binding 된 리간드의 pose. A. PDEδ cocrystal *rac*-S1 (PDB: 4JV8; white)과 다시 docking한 *rac*-S1 (gray)의 binding pose 비교. B. *rac*-S1(white)과 화합물 3 (yellow)의 binding pose 비교.

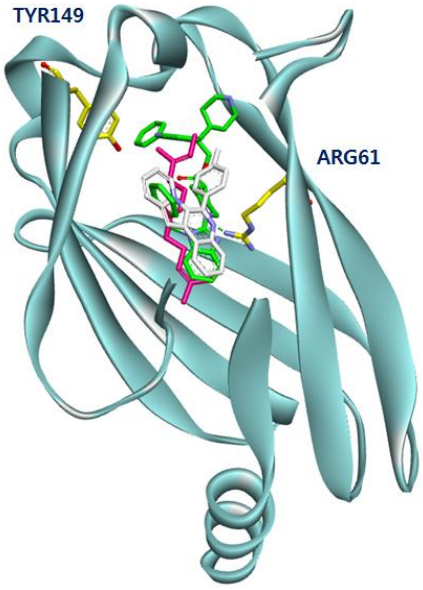


그림 2-11. PDEδ의 구조 내에서의 화합물 3 (white)과 farnesyl group (magenta)과 (S)-5 (green)의 pose 비교.

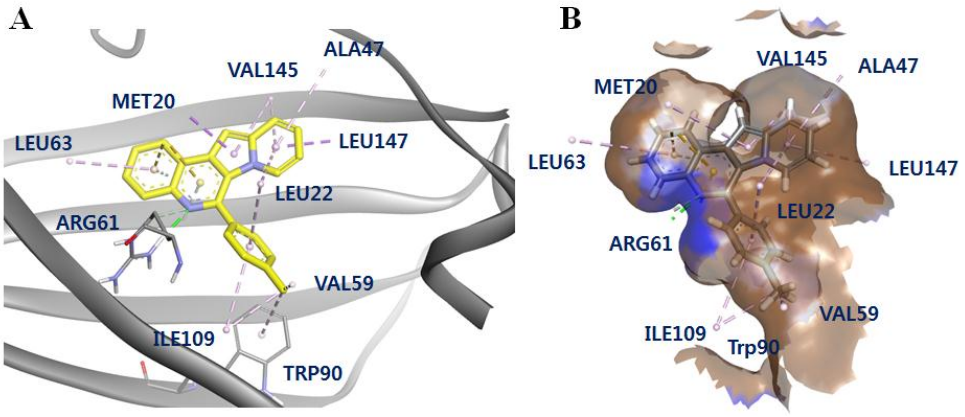


그림 2-12. 화합물 3의 binding pose. A. 화합물 3의 상호작용 다이어그램. B. 화합물 3의 binding pocket 내에서의 pose. 수소결합 (green), -sulfur (gold), -alkyl hydrophobic interaction (pink)을 나타낸다.

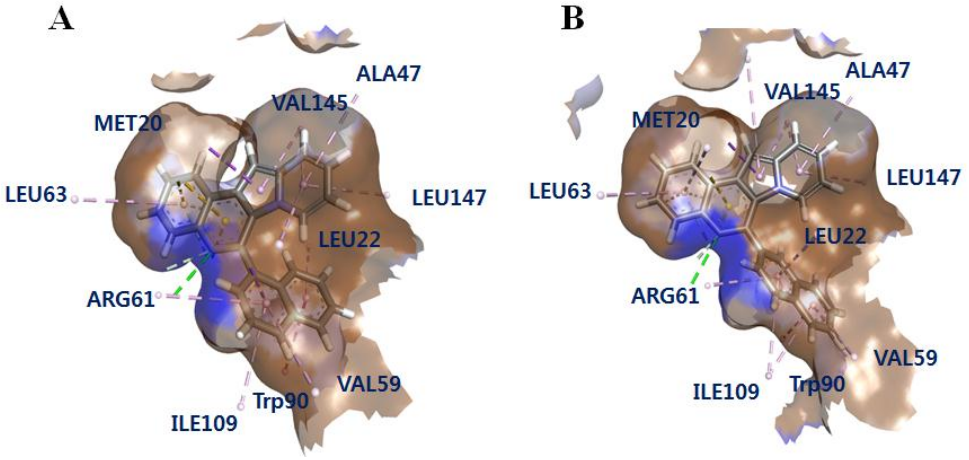


그림 2-13. PDEδ의 binding pocket 내에서의 화합물 pose 비교. A. 화합물 9의 binding pose. B. 화합물 10의 binding pose. Hydrophobic한 pocket (brown), hydrophilic pocket (blue)을 나타낸다.

제 3 장 결론 및 고찰

Ras 단백질은 인간의 암세포 내에서 20-30% 돌연변이 된 형태가 발견되며 암을 유발하는 것으로 알려져 지난 수 십 년 동안 항암 목표 단백질로 많은 연구가 진행되고 있다.[66] 그러나 Ras 단백질과 GTP사이의 affinity가 picomolar 수준이며 단백질 내 알려진 allosteric site가 존재하지 않기 때문에 Ras 단백질을 직접 저해하는 치료제는 아직 개발되지 못하였다. 최근에 Ras 단백질의 세포 내의 위치에 대한 연구와 암 유발에 대한 연구를 진행된 연구에서 Ras 단백질의 세포 증식에 대한 신호 전달을 막을 수 있는 PDEδ를 타겟하는 저해제에 관한 연구가 진행되었다. PDEδ를 억제함으로써 암을 유발하는 Ras의 신호 전달 억제는 좋은 전략임에도 불구하고 현재까지 deltarasin 이외에 PDEδ의 저해제는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 새로운 PDEδ 저해제를 찾는 것을 목표로 하였다.

과 발현 시킨 재조합 단백질 PDEδ를 이용하여 형광을 보이는 화합물 Indolizino[3,2-c]quinoline을 Fluorescence based polarization 실험을 통해 screening 하였다. Indolizino[3,2-c]quinoline에 PDEδ를 농도에 따라 첨가하였을 때 첨가된 농도가 증가함에 따라 polarization 값이 증가하는 것을 확인하였으며 이를 통해 PDEδ와 상호작용할 수 있는 화합물 8개를 도출하였다. 8종류의 화합물을 이용하여 추가로 기존에 알려진 PDEδ 저해제 deltarasin과 Competition binding assay을 실시하였으며 이를 통해 화합물이 deltarasin과 같은 binding site인 prenyl binding site에 결합하는 것을 확인하였다. Indolizino[3,2-c]quinoline 중 PDEδ에 더 높은 affinity를 갖는 물질이 더 긴 half-life를 갖는 서

로 상응하는 결과를 얻을 수 있었으며 이는 Indolizino[3,2-c]quinoline이 PDEδ의 저해제로 작용할 수 있음을 알 수 있다. 또한 화합물 중 affinity가 높은 화합물 3를 이용하여 PDEδ에 대해 특이적으로 상호작용할 수 있는지 확인하였다. 정제 과정에서 얻을 수 있는 여러 fraction들에 3을 첨가하였을 때 PDEδ가 많이 포함되어 있는 fraction에서만 특이적으로 형광을 관찰할 수 있었으며 추가적으로 Native gel electrophoresis를 이용하여 화합물 3의 PDEδ에 대한 결합 특이성에 대해 확인하였다. *E coli* cell lysate 내에는 다양한 단백질이 존재하지만 화합물 PDEδ가 존재하는 것으로 생각되는 band 위치에서만 화합물 3의 형광을 보였으며 그 위치는 정제한 PDEδ와 동일한 위치였다. 그러므로 화합물 3은 PDEδ에 특이적으로 결합하는 것으로 생각된다. 분자 모델링을 이용하여 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 PDEδ에 대한 binding pose를 규명하였다. 리간드를 포함한 PDEδ 구조를 이용하여 docking한 결과 화합물 3은 리간드와 매우 유사한 binding pose를 보였으며 이 pose는 farnesyl group의 binding site와도 동일한 위치였다. 화합물 3은 전반적으로 hydrophobic한 PDEδ의 pocket 내에 존재하는 Met20, Ala47, Leu63, Val145, Leu147의 residue와 hydrophobic interaction을 이루며 수소 결합에 참여하는 것으로 알려진 Arg61과 수소 결합을 보였다. 또한 저해제가 PDEδ pocket 내부에 들어가기 위해 중요한 Trp90과도 hydrophobic interaction 하고 있음을 관찰하였다. 그러므로 화합물 3은 리간드로서 PDEδ에 결합할 수 있을 것으로 생각한다. Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 6번 위치에 다양한 치환기를 갖고 있다. 분자 모델링을 통해 6번 위치의 치환기가 있는 위치의 PDEδ의 binding pocket은 좁은 공간을 갖는 것을 확인할 수 있었으며 따라서 치환기의 크기와 방향에 따라 PDEδ에 대한 결합 정도가 달라질

수 있음을 확인하였다.

본 연구에서 screening 통해 도출한 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물 8종에서 K_d값이 300-500 nM 수준의 높은 affinity를 가지는 화합물 몇 종을 확인할 수 있었으며 형광을 가지고 있다는 장점이 있어 fluorescence probe로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구는 PDEδ 저해제에 대한 기초 연구로써 Ras와 PDEδ의 상호작용을 억제함으로써 Ras 단백질의 신호 전달을 막는 저해제에 관한 연구에 토대를 제공할 것으로 기대된다.

제 4 장 실험 방법

제 1 절 클로닝

PDEδ는 cDNA를 한국유전자은행으로부터 구매하였으며, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 진행하기 위해 DNA oligomer는 코스모진텍에서 구매하였다. DNA oligomer는 다음과 같다: PDEδ-f 5'-GGTTGCTAGCATGTCAGCCAAGGACGAGCG-3', PDEδ-r 5'-GGTTGGATCCTCAAACATAGAAAAGTCTCACTCTGGATGTGC-3' 위 Primer를 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 진행하였으며 Primer는 각 Nhe I 또는 BamH I 의 제한 효소 자리를 포함하고 있다. PCR 생성물을 Nhe I (NEB)과 BamH I (NEB) 두 개의 제한 효소를 처리하였으며 pET28a(+) 벡터도 같은 제한 효소를 처리하여 자른 후 T4 ligase (NEB)를 이용하여 ligation하였다. 이 clone은 sequence 검증 과정을 통해 원하는 PDEδ DNA sequence를 확인하였으며 단백질 발현을 위해 BL21(DE3) strain에 transformation하였다.

제 2 절 단백질 발현과 정제

pET28a(+) 벡터에 클로닝한 PDEδ를 포함한 BL21(DE3)를 37℃를 유지한 incubator 내에서 OD 0.8-1.0이 될 때까지 배양하였다. 그 이후 β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 200 μM 처리하여 18℃를 유지한 생태로 16시간 이상 배양하여 단백질을 과 발현시켰다. Cell pellet은 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% Glycerol]에 protease inhibitor 1/4 pellet

(Roche)이 포함된 buffer에 녹여주었다. 그 이후 sonicator를 이용하여 lysis하였으며 단백질은 Ni-NTA 친화 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제 시 사용한 washing buffer는 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 40 mM imidazole, 10% Glycerol]이며 단백질을 용출하기 위해 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, 10% Glycerol]를 사용하였다. 정제한 단백질은 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% Glycerol, 1mM DTT]를 이용하여 4시간 이상의 투석 과정을 두 번 진행하였으며 원심분리기를 이용하여 농축하였다.

제 3 절 Fluorescence 측정

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물과 PDEδ 사이의 상호작용을 알아보기 위해 형광의 변화를 측정하였다. 형광 측정을 위해 Tris buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl]를 사용하였다. PDEδ의 농도는 2 μM로 하였으며 Indolizino[3,2-c]quinoline의 농도는 PDEδ와 동일 농도인 2 μM로 하였으며 1.4 ml cuvette (Hellma)을 이용하였다. 화합물을 첨가 후 3번 inverting 후 1분의 incubation 시간을 가졌으며 Spectrofluorometer (JASCO, FP-6500)를 이용하여 Ex 280 nm에서 형광을 측정하였다. 측정 시 band width는 Ex 3 nm, Em 5 nm로 하였다.

제 4 절 Fluorescence based polarization 측정

Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물과 PDEδ의 binding을 알아보기 위하여 fluorescence polarization을 측정하였다. 측정 시 사용한 plate

는 black 96-well plate (SPL)이며 0.5 μM Indolizino[3,2-c]quinoline과 PDEδ는 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM를 serial dilution 하여 만들었다. Buffer는 PBS buffer [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4 (pH 7.2)]를 사용하였다. Indolizino[3,2-c]quinoline과 PDEδ를 96-well plate에서 섞은 후 4℃ 냉장고에서 2시간 incubation 하였다. SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices)를 사용하여 측정하였으며 형광의 파장은 buffer 내에서 화합물이 나타내는 최대 흡수 파장과 방출 파장을 이용하였다.[63]

제 5 절 Competition binding assay

Competition binding assay를 위하여 PDEδ의 알려진 저해제인 deltarasin은 ChemieTek에서 구매하였으며 DMSO를 이용하여 stock을 제조하였다. 0.5 μM Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물과 fluorescence polaization 실험을 통해 측정한 K_d 값을 이용하여 complex 비율이 약 0.68%가 되는 PDEδ 농도를 사용하였다. Deltarasin의 농도는 사용한 PDEδ의 농도와 동일 농도를 사용하였다. 측정 시 사용한 buffer는 PBS buffer [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4 (pH 7.2)]를 사용하였으며 4℃ 냉장고에서 2시간 incubation 후 polarization 측정 전 deltarasin을 첨가하였다. Fluorescence polarization 측정 방법은 위와 동일하며 형광 측정 파장은 Ex 430 nm로 Em 520 nm로 동일하게 유지하여 측정하였다.

제 6 절 Target specificity 확인

PDEδ 정제 시 얻을 수 있는 fraction을 이용하여 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물의 결합 특이성을 확인하였다. 21% SDS-PAGE gel를 이용하여 150V에서 70분 동안 전기영동 하여 각 fraction 별 PDEδ가 포함된 양을 확인하였다. 화합물 **3**과 PDEδ의 상호작용에 따른 형광을 관찰하기 위해 투명 96-well plate (SPL)를 이용하여 well에 각 fraction을 50 μℓ씩 첨가하였으며 화합물 **3**은 0.5 mM, 0.1 mM을 첨가하였다. 형광 관찰은 transilluminator (Vilber Lourmat)를 이용하여 312 nm의 빛을 조사하였으며 사진촬영은 Cannon EOS 550D 카메라를 이용하였다.

12% Native gel를 이용하여 추가적으로 화합물 **3**의 결합 특이성을 관찰하였다. 390 μM의 lysate에 화합물 **3**을 0, 5, 50 μM로 농도로 각각 첨가하였다. Gel 상에서 정확한 분석을 하기 위해 분리 정제한 PDEδ도 함께 loading 하였으며 PDEδ의 농도는 22.9 μM을 사용하였으며 첨가한 화합물 **3**의 농도는 동일하게 0, 5, 50 μM를 첨가하였다. 단백질과 화합물 **3**과의 interaction 시간을 주기 위하여 2시간 동안 4℃ 냉장고에서 incubation 하였다. Buffer는 Tris buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10% Glycerol]에 Protease inhibitor 1/4 pellet (Roche)이 포함된 buffer을 사용하였다. Native gel electrophoresis는 70V에서 2시간 30분 동안 진행하였으며 band의 위치를 비교하기 위하여 Marker를 사용하였다. 형광의 관찰은 ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science)를 이용하였으며 605DF40 EtBr filter을 이용하였다. Coomassie blue를 이용하여 염색한 후 형광을 관찰한 결과와 비교하여 결과를 분석하였다.

제 7 절 분자 모델링

분자 모델링 (Molecular docking)은 Sybyl-X2.1.1 (Tripos Inc, St Louis, MO) 프로그램의 Surflex-dock을 이용하여 수행하였으며, PDEδ (PDB: 4JV8)의 구조는 리간드를 포함한 형태를 이용하였다. Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물은 이차원적 구조를 이용하여 Sybyl program 내에서 삼차원적 구조를 생성하였다. 단백질의 구조는 수소를 모두 추가해 주었으며, 구조의 안정화를 위해 Powell's 방법을 이용하여 RMSD가 0.001 kcal/mol · Å 보다 낮을 때까지 Tripos 방법을 이용하여 energy minimization을 실시하였다 (Conjugate gradient minimization). 기존의 구조 내에 포함된 리간드는 추출하였으며 수소결합에 참여하지 않은 물 분자 또한 제거하였다. Docking은 Surflex-Dock GeomX 모드를 이용하여 수행하였으며, Threshold 0.5 Å와 Bloat 0 Å으로 하여 추출한 리간드를 기준으로 binding site을 형성하였다. 추출한 리간드 구조를 새로운 리간드와 함께 docking하였으며 기존의 binding되어 있는 형태와 비교하여 유효성을 판단하였다. 분자간의 상호작용을 더 보기 위해 Discovery studio 4.0 visualizer를 이용하였다.

참고 문헌

1. Ullrich, A.; Gray, A.; Tam, A. W.; Yang-Feng, T.; Tsubokawa, M.; Collins, C.; Henzel, W.; Le Bon, T.; Kathuria, S.; Chen, E.; et al., Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986, *5* (10), 2503-12.
2. Blakesley, V. A.; Scrimgeour, A.; Esposito, D.; Le Roith, D., Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996, *7* (2), 153-9.
3. Baker, J.; Liu, J. P.; Robertson, E. J.; Efstratiadis, A., Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993, *75* (1), 73-82.
4. Megyesi, K.; Kahn, C. R.; Roth, J.; Neville, D. M., Jr.; Nissley, S. P.; Humbel, R. E.; Froesch, E. R., The NSILA-s receptor in liver plasma membranes. Characterization and comparison with the insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 1975, *250* (23), 8990-6.
5. Megyesi, K.; Kahn, C. R.; Roth, J.; Froesch, E. R.; Humbel, R. E.; Zapf, J.; Neville, D. M., Jr., Insulin and non-suppressible insulin-like activity (NSILA-s): evidence for separate plasma membrane receptor sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974, *57* (1), 307-15.
6. Ebina, Y.; Ellis, L.; Jarnagin, K.; Edery, M.; Graf, L.; Clauser, E.; Ou, J. H.; Masiarz, F.; Kan, Y. W.; Goldfine, I. D.; et al., The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell* 1985, *40* (4), 747-58.
7. Ullrich, A.; Bell, J. R.; Chen, E. Y.; Herrera, R.; Petruzzelli, L. M.; Dull, T. J.; Gray, A.; Coussens, L.; Liao, Y. C.; Tsubokawa, M.; et al., Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985, *313* (6005), 756-61.
8. Adams, T. E.; Epa, V. C.; Garrett, T. P.; Ward, C. W.,

Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, *57* (7), 1050-93.
9. Favelyukis, S.; Till, J. H.; Hubbard, S. R.; Miller, W. T., Structure and autoregulation of the insulin-like growth factor 1 receptor kinase. *Nat. Struct. Biol.* 2001, *8* (12), 1058-63.
10. Munshi, S.; Hall, D. L.; Kornienko, M.; Darke, P. L.; Kuo, L. C., Structure of apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase at 1.5 A resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003, *59* (Pt 10), 1725-30.
11. Munshi, S.; Kornienko, M.; Hall, D. L.; Reid, J. C.; Waxman, L.; Stirdivant, S. M.; Darke, P. L.; Kuo, L. C., Crystal structure of the Apo, unactivated insulin-like growth factor-1 receptor kinase. Implication for inhibitor specificity. *J. Biol. Chem.* 2002, *277* (41), 38797-802.
12. LeRoith, D.; Werner, H.; Beitner-Johnson, D.; Roberts, C. T., Jr., Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.* 1995, *16* (2), 143-63.
13. Kato, H.; Faria, T. N.; Stannard, B.; Roberts, C. T., Jr.; LeRoith, D., Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol. Endocrinol.* 1994, *8* (1), 40-50.
14. Baserga, R.; Hongo, A.; Rubini, M.; Prisco, M.; Valentinis, B., The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, *1332* (3), F105-26.
15. Garrett, T. P.; McKern, N. M.; Lou, M.; Frenkel, M. J.; Bentley, J. D.; Lovrecz, G. O.; Elleman, T. C.; Cosgrove, L. J.; Ward, C. W., Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature* 1998, *394* (6691), 395-9.
16. Wang, Y.; Sun, Y., Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr. Cancer Drug Targets* 2002, *2* (3), 191-207.
17. Hongo, A.; Yumet, G.; Resnicoff, M.; Romano, G.; O'Connor, R.; Baserga, R., Inhibition of tumorigenesis and induction of apoptosis in human tumor cells by the stable expression of a myristylated COOH terminus of the insulin-like growth factor I receptor. *Cancer Res.* 1998, *58* (11), 2477-84.

18. Weroha, S. J.; Haluska, P., IGF-1 receptor inhibitors in clinical trials--early lessons. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008, *13* (4), 471-83.
19. Dziadziuszko, R.; Camidge, D. R.; Hirsch, F. R., The insulin-like growth factor pathway in lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008, *3* (8), 815-8.
20. Morgillo, F.; Woo, J. K.; Kim, E. S.; Hong, W. K.; Lee, H. Y., Heterodimerization of insulin-like growth factor receptor/epidermal growth factor receptor and induction of survivin expression counteract the antitumor action of erlotinib. *Cancer Res.* 2006, *66* (20), 10100-11.
21. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D., Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, *61* (2), 69-90.
22. Scagliotti, G. V.; Novello, S., The role of the insulin-like growth factor signaling pathway in non-small cell lung cancer and other solid tumors. *Cancer Treat. Rev.* 2012, *38* (4), 292-302.
23. Min, H. Y.; Yun, H. J.; Lee, J. S.; Lee, H. J.; Cho, J.; Jang, H. J.; Park, S. H.; Liu, D.; Oh, S. H.; Lee, J. J.; Wistuba, II; Lee, H. Y., Targeting the insulin-like growth factor receptor and Src signaling network for the treatment of non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* 2015, *14*, 113.
24. Shin, D. H.; Lee, H. J.; Min, H. Y.; Choi, S. P.; Lee, M. S.; Lee, J. W.; Johnson, F. M.; Mehta, K.; Lippman, S. M.; Glisson, B. S.; Lee, H. Y., Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin beta3-Src pathway. *J. Natl. Cancer Inst.* 2013, *105* (20), 1558-70.
25. Schwartz, D. E.; Tizard, R.; Gilbert, W., Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. *Cell* 1983, *32* (3), 853-69.
26. Czernilofsky, A. P.; Levinson, A. D.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M.; Tischer, E.; Goodman, H. M., Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* 1980, *287* (5779), 198-203.
27. Hunter, T.; Sefton, B. M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980, *77* (3), 1311-5.

28. Yeatman, T. J., A renaissance for SRC. *Nat. Rev. Cancer* 2004, *4* (6), 470-80.
29. Rous, P., A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J. Exp. Med.* 1911, *13* (4), 397-411.
30. Brown, M. T.; Cooper, J. A., Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1996, *1287* (2-3), 121-49.
31. Thomas, S. M.; Brugge, J. S., Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, *13*, 513-609.
32. Breitenlechner, C. B.; Kairies, N. A.; Honold, K.; Scheiblich, S.; Koll, H.; Greiter, E.; Koch, S.; Schafer, W.; Huber, R.; Engh, R. A., Crystal structures of active SRC kinase domain complexes. *J. Mol. Biol.* 2005, *353* (2), 222-31.
33. Zuckermann, R. N.; Kerr, J. M.; Kent, S. B. H.; Moos, W. H., Efficient Method for the Preparation of Peptoids [Oligo(N-Substituted Glycines)] by Submonomer Solid-Phase Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, *114* (26), 10646-10647.
34. Burkoth, T. S.; Fafarman, A. T.; Charych, D. H.; Connolly, M. D.; Zuckermann, R. N., Incorporation of unprotected heterocyclic side chains into peptoid oligomers via solid-phase submonomer synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125* (29), 8841-5.
35. Alam, M. M.; Lee, S. C.; Jung, Y.; Yun, H. J.; Min, H. Y.; Lee, H. J.; Pham, P. C.; Moon, J.; Kwon, D. I.; Lim, B.; Suh, Y. G.; Lee, J.; Lee, H. Y., Novel C6-substituted 1,3,4-oxadiazinones as potential anti-cancer agents. *Oncotarget* 2015, *6* (38), 40598-610.
36. Ke, S. Y.; Qian, X. H.; Liu, F. Y.; Wang, N.; Yang, Q.; Li, Z., Novel 4H-1,3,4-oxadiazin-5(6H)-ones with hydrophobic and long alkyl chains: design, synthesis, and bioactive diversity on inhibition of monoamine oxidase, chitin biosynthesis and tumor cell. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, *44* (5), 2113-21.
37. Wu, J.; Li, W.; Craddock, B. P.; Foreman, K. W.; Mulvihill, M. J.; Ji, Q. S.; Miller, W. T.; Hubbard, S. R., Small-molecule inhibition and activation-loop trans-phosphorylation of the

IGF1 receptor. *EMBO J.* 2008, *27* (14), 1985-94.
38. Ringer, A. L.; Senenko, A.; Sherrill, C. D., Models of S/pi interactions in protein structures: comparison of the H2S benzene complex with PDB data. *Protein Sci.* 2007, *16* (10), 2216-23.
39. Liu, Y.; Bishop, A.; Witucki, L.; Kraybill, B.; Shimizu, E.; Tsien, J.; Ubersax, J.; Blethrow, J.; Morgan, D. O.; Shokat, K. M., Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem. Biol.* 1999, *6* (9), 671-8.
40. Pollak, M., Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 2008, *8* (12), 915-28.
41. Barbacid, M., ras genes. *Annu. Rev. Biochem* 1987, *56*, 779-827.
42. Spiegel, J.; Cromm, P. M.; Zimmermann, G.; Grossmann, T. N.; Waldmann, H., Small-molecule modulation of Ras signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2014, *10* (8), 613-22.
43. Vetter, I. R.; Wittinghofer, A., The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001, *294* (5545), 1299-304.
44. Milburn, M. V.; Tong, L.; deVos, A. M.; Brunger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S. H., Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 1990, *247* (4945), 939-45.
45. Milroy, L. G.; Ottmann, C., The renaissance of Ras. *ACS Chem. Biol.* 2014, *9* (11), 2447-58.
46. Bos, J. L., ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989, *49* (17), 4682-9.
47. Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M., K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013, *503* (7477), 548-51.
48. Schmick, M.; Vartak, N.; Papke, B.; Kovacevic, M.; Truxius, D. C.; Rossmannek, L.; Bastiaens, P. I., KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell* 2014, *157* (2), 459-71.
49. Stephen, A. G.; Esposito, D.; Bagni, R. K.; McCormick, F., Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell* 2014, *25* (3),

272-81.
50. Rocks, O.; Peyker, A.; Kahms, M.; Verveer, P. J.; Koerner, C.; Lumbierres, M.; Kuhlmann, J.; Waldmann, H.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I., An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 2005, *307* (5716), 1746-52.
51. Gillette, W. K.; Esposito, D.; Abreu Blanco, M.; Alexander, P.; Bindu, L.; Bittner, C.; Chertov, O.; Frank, P. H.; Grose, C.; Jones, J. E.; Meng, Z.; Perkins, S.; Van, Q.; Ghirlando, R.; Fivash, M.; Nissley, D. V.; McCormick, F.; Holderfield, M.; Stephen, A. G., Farnesylated and methylated KRAS4b: high yield production of protein suitable for biophysical studies of prenylated protein-lipid interactions. *Sci Rep* 2015, *5*, 15916.
52. Rocks, O.; Peyker, A.; Bastiaens, P. I., Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006, *18* (4), 351-7.
53. Rocks, O.; Gerauer, M.; Vartak, N.; Koch, S.; Huang, Z. P.; Pechlivanis, M.; Kuhlmann, J.; Brunsveld, L.; Chandra, A.; Ellinger, B.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I., The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* 2010, *141* (3), 458-71.
54. Downward, J., Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2003, *3* (1), 11-22.
55. Prior, I. A.; Lewis, P. D.; Mattos, C., A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012, *72* (10), 2457-67.
56. To, M. D.; Wong, C. E.; Karnezis, A. N.; Del Rosario, R.; Di Lauro, R.; Balmain, A., Kras regulatory elements and exon 4A determine mutation specificity in lung cancer. *Nat. Genet.* 2008, *40* (10), 1240-4.
57. Hanzal-Bayer, M.; Renault, L.; Roversi, P.; Wittinghofer, A.; Hillig, R. C., The complex of Arl2-GTP and PDE delta: from structure to function. *EMBO J.* 2002, *21* (9), 2095-106.
58. Zhang, H.; Hosier, S.; Terew, J. M.; Zhang, K.; Cote, R. H.; Baehr, W., Assay and functional properties of PrBP(PDEdelta), a prenyl-binding protein interacting with multiple partners. *Methods Enzymol.* 2005, *403*, 42-56.
59. Nancy, V.; Callebaut, I.; El Marjou, A.; de Gunzburg, J., The

delta subunit of retinal rod cGMP phosphodiesterase regulates the membrane association of Ras and Rap GTPases. *J. Biol. Chem.* 2002, *277* (17), 15076-84.

60. Chandra, A.; Grecco, H. E.; Pisupati, V.; Perera, D.; Cassidy, L.; Skoulidis, F.; Ismail, S. A.; Hedberg, C.; Hanzal-Bayer, M.; Venkitaraman, A. R.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I., The GDI-like solubilizing factor PDEdelta sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat. Cell Biol.* 2012, *14* (2), 148-58.
61. Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A.; Hoffmann, M.; Hahn, S. A.; Triola, G.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I.; Waldmann, H., Small molecule inhibition of the KRAS-PDEdelta interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* 2013, *497* (7451), 638-42.
62. Zimmermann, G.; Schultz-Fademrecht, C.; Kuchler, P.; Murarka, S.; Ismail, S.; Triola, G.; Nussbaumer, P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H., Structure guided design and kinetic analysis of highly potent benzimidazole inhibitors targeting the PDEdelta prenyl binding site. *J. Med. Chem.* 2014, *57* (12), 5435-48.
63. Park, S.; Kwon, D. I.; Lee, J.; Kim, I., When Indolizine Meets Quinoline: Diversity-Oriented Synthesis of New Polyheterocycles and Their Optical Properties. *ACS. Comb. Sci* 2015, *17* (8), 459-469.
64. Lea, W. A.; Simeonov, A., Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opin Drug Discov* 2011, *6* (1), 17-32.
65. Zheng, X.; Bi, C.; Li, Z.; Podariu, M.; Hage, D. S., Analytical methods for kinetic studies of biological interactions: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, *113*, 163-80.
66. Brunsveld, L.; Kuhlmann, J.; Alexandrov, K.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S.; Waldmann, H., Lipidated ras and rab peptides and proteins--synthesis, structure, and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, *45* (40), 6622-46.

Abstract

Part Ⅰ. Molecular docking studies to develop novel peptidomimetics as anticancer agents.

Part Ⅱ. Studies towards the development of PDEδ inhibitor.

Lee Ho Jin

College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

[Part Ⅰ]

Peptoids are poly-N-substituted glycines that have been known to interact with various protein targets. They are attractive synthetic scaffolds due to the easy incorporation of a variety of functionalities in addition to the stability to peptidases inside the cells. In previous study, we identified pharmacologically promising peptidomimetic compound (OXA40) from our in-house chemical libraries that showed inhibitory effects against the human lung cancer cell line. Biological evaluations suggested that these compounds inhibit the phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) kinase and Src. Here, we report molecular docking studies to examine the binding mode and the molecular interactions of the compounds with the IGF-1R and Src. Docking analysis suggests that modification at the C6 position of the oxadiazinone ring generates inhibitors with improved docking scores and poses. Designed compounds with phenyl group at the C6 position showed increased inhibitory effects in cancer cells. Also, they

effectively inhibited the phosphorylation of IGF-1R and Src in western blot analysis. These results are correlated with the result of molecular docking study. Therefore, this study suggests that the anticancer activities of oxadiazinone analogues will be increased by incorporating the various substituents at C6 position.

Keywords : IGF-1R, Peptidomimetic, Molecular docking
Student Number : 2014-21970

[Part Ⅱ]

K-Ras plays a crucial role in human cancer and mutated K-Ras oncogenes are frequently found in human tumors. However, no successful small molecule inhibitors that directly target K-Ras mutants have been reported in clinical trials yet. The cellular distribution of the K-Ras protein is known to be critical for its oncogenic activity and is controlled by the prenyl-binding protein PDEδ (phosphodiesterease δ-subunit). Recently, the inhibition of Ras-PDEδ interaction by small molecules has shown to suppress Ras signaling. Here, we conducted fluorescence-based polarization assays using His-tagged PDEδ and identified several compounds that bind to PDEδ with the K_d values of 300-500 nM. In addition, the competition binding assay with the known PDEδ inhibitor demonstrated that these compounds occupy the same binding site of PDEδ. Our results will provide that the basic understanding in the discovery of PDEδ inhibitor which directly interrupts the interaction between PDEδ and Ras.

Keywords : PDEδ, Fluorescence based polarization,
Competition binding assay
Student Number : 2014-21970