creative commons
COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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

이 지 연 교수 지도

석사학위 청구 논문

단백분해효소의 활성과 퇴행성 뇌질환간의 상관관계 연구

- 세린단백분해효소인 HTRA1의 기능탐색에 활용가능한 펩타이드기반 형광프로브의 개발과 검증 -

2023

성신여자대학교 대학원

미래융용과학학과

박 은 채

단백분해효소의 활성과 퇴행성 뇌질환간의 상관관계 연구

- 세린단백분해효소인 HTRA1의 기능탐색에 활용가능한 펩타이드기반 형광프로브의 개발과 검증 -

이 지 연 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2023년 5월

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과

박 은 채

인준서

박은채의 석사학위 논문으로 인준함

2023년 5월

심사위원장 고병조 (서명 또는 인)

심사위원 이지연 (서명 또는 인)

심사위원 임동현 (서명 또는 인)

성신여자대학교 대학원

논문개요

본 연구에서는 생리학적 과정의 중요한 조절자인 단백 분해 효소인 HTRA (High temperature requirement A serine protease)의 다양한 생화학적 경로를 확인 탐색하고자 이를 타겟으로 하는 형광 기질 및 cyclic probe를 합성하였다.

첫째, HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질을 합성하였다. 이전 연구에서 HTRA1, HTRA2 및 DegP를 포함한 HTRA 계열의 단백질 가수 분해 효소를 선택적으로 표적화하는 활성 기반 프로브를 개발하였는데, 이번 연구에서는 기존의 프로브 peptide sequence를 참고하여 Fluorescent tags 였던 fluorescein 대신 coumarin derivative인 7-Amino-4-methylcoumarin을 부착하여 기존의 HTRA의 활성 측정을 위한 substrate로 사용되고 있는 시판중인 기질인 H2-OTP에 비해 분자량이 작은 형광 기질을 합성하고 에세이를 통해 효소-기질 반응을 관찰하였다.

둘째, neuroblastoma cell line인 SK-N-SH와 SH-SY5Y에서 ATRA 처리를 통해 neuron-like 세포로 분화 시킨 뒤 두 세포에서의 HTRA의 수준 변화를 HTRA계열의 단백질 가수 분해 효소를 선택적으로 표지하는 2세대 형광 프로브를 이용하여 SDS-PAGE와 광학영상을 통해 관찰하였다.

셋째, HTRA를 타겟으로 하는 cyclic activity-based probe를 합성하였다. 이전 연구에서는 최적화를 위해 비천연 아미노산을 포함하였고 이 프로브는 질량이 작아 세포 투과도가 높고 선택성이 우수하나 단백질이 고농도로 농축된 시료의 경우 혈장단백질과의 비특이적 반응이 관찰되었다. Cyclodepsipeptide는 serine protease에 강력한 억제 특성을 나타내는 펩티드

종류이며 이러한 구조를 기반으로 한 강력한 HTRA 저해제가 보고된 바 있어 이와 유사한 구조의 cyclic probe를 합성하여 감도와 안정성을 높이고자 하였다.

목 차

논문개요

List of figures

List of tables

List of scheme

I. 서론 ····· 1

1. HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성 ····· 1

2. 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색 ····· 3

3. HTRA를 타겟으로 하는 Cyclic Activity-based probe의 합성 ····· 5

II. 결과 및 고찰 ····· 7

1. HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성 ····· 7

1) 테트라펩타이드 기반 프로브 라이브러리 합성 ····· 7

2) Enzymatic assay ····· 8

2. 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색 ····· 10

1) Cell differentiation ····· 10

2) Selectivity in SH-SY5Y/SK-N-SH ····· 11

3) Live cell imaging ····· 12

3. HTRA를 타겟으로 하는 Cyclic Activity-based probe의 합성 ····· 14

1) hexa-peptide library의 합성 ····· 14

2) Valine-DPP-DCA 합성 ····· 14

3) Valine-DPP-DCA를 이용한 peptide cyclization ····· 14

III. 결론 ····· 18

IV. 실험 ····· 20
1. 실험기기 및 시약 ····· 20
1) 실험기기 ····· 20
2) 시약 ····· 20
2. 실험방법 ····· 21
1) HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성 ····· 21
① Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) technique을 이용한 tetra-peptide 합성 ····· 21
② Peptide-AMC coupling ····· 22
③ Enzyme assay ····· 26
2) 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색 ····· 27
① ATRA를 이용한 SH-SY5Y의 분화 ····· 27
② ATRA를 통해 분화된 SH-SY5Y를 이용한 SDS-PAGE ····· 27
③ ATRA를 이용한 SK-N-SH의 분화와 SDS-PAGE ····· 28
④ ATRA를 이용한 SK-N-SH의 분화와 SDS-PAGE ····· 28
⑤ A-bata를 처리한 세포의 SDS-PAGE ····· 28
⑥ Live cell imaging ····· 29
3) Cyclic Activity-based probe의 합성 ····· 30
① Cyclization을 위한 Valine-DPP-DCA의 합성 ····· 30
② Cyclization을 위한 hexa-peptide의 합성 ····· 31
③ Valine-DPP-DCA를 이용한 펩타이드 cyclization ····· 33

참고문헌 ····· 35

ABSTRACT 37

List of Figures

Figure 1. Structure of 7-amino-4-methylcoumarin
Figure 2. Spectrum of 7-amino-4-methylcoumarin
Figure 3. SH-SY5Y undergo morphological changes during RA-induced differentiation (A) Undifferentiated SH-SY5Y cells cultured in complete growth medium. (B) SH-SY5Y cells treated with 10 μM RA for 4 days
Figure 4. Structure of Cyclosporine
Figure 5. Structural features of Ahp-cyclodepsipeptidesfor serine protease inhibition a) Chemical structures of the natural product
Ahp-cyclodepsipeptides TasA (1) and TasB (2)
Figure 6. Measurement of signal change of fluorescent substrate at various HTRA2 concentrations
Figure 7. Cell differentiation of SH-SY5Y
Figure 9. Cell differentiation of SK-N-SH
Figure 10. Structure of HTRA probe (DS-01-94)
Figure 11. 2nd generation probe with SH-SY5Y/SK-N-SH
Figure 12. Cell differentiation of SK-N-SH (control)
Figure 13. Cell differentiation of SK-N-SH (ATRA 최종농도 10μM)
Figure 14. structure of Cyclic-Activity based peptide probe

List of tables

Table 1. sequence of fluorogenic substrate HTRA

Table 2. sequence of hexa-peptide library

List of scheme

Scheme 1. synthesis of fluorogenic substrate for HTRA

Scheme 2. synthesis of Cyclic-Activity based peptide probe

Ⅰ. 서론

1. HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성

Protein quality control (PQC)의 key cellular process는 모든 단백질의 구조적·기능적 온전함과 적절한 분포를 보장한다. Deficient PQC는 protein aggregates를 유발하고 이는 Alzheimer's disease와 Parkinson's disease의 발병원인이 될 수 있다. bacteria에서 두개의 periplasmic HTRA (high-temperature requirement) protease는 Protein quality control (PQC)의 key player다.[1] High temperature requirement A (HTRA) serine protease는 mammalian cells와 bacteria에서 cell stress response과 protein quality control에 관여한다. HTRA는 processing of amyloid precursor proteins (APP) and degradation of β-amyloid (Aβ) and tau fibrils에 관여한다. 이것은 HTRA가 Alzheimer's disease의 잠재적인 therapeutic target이 될 수 있음을 보여준다.[2]

Human cell에는 HTRA1, HTRA2/Omi, HTRA3/PRSP 그리고 HTRA4 이렇게 homologus HTRA protein이 있다. 이는 정상적이고 스트레스를 받은 조건에서 세포의 죽음, 신호전달, 운동성 등을 조절하고 mitochondrial homeostasis를 유지한다. 이 단백질이 기능을 상실하거나 손상되면 암, 신경퇴행성질환, 관절염 장애 등이 발병할 수 있다.[3]

기존의 HTRA의 활성 측정을 위한 substrate로 사용된 H2-optimal substrate peptide (H2-OTP, IRRVSYSF(Dnp)KK)는 비교적 큰 molecular weight를 가지고 세포투과도가 낮아 실험에 적용할 때 한계가 있었다. 따라서 본 연구에서는 비교적 분자량이 작고 세포 투과성이 좋은 기질을 합성하기 위해 Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) technique을 이용하여 네 개의 아미노산으로 이루어진 tetrapeptide를 합성한 뒤 AMC (7-amino-4-methylcoumarin)를 붙여 HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질을

합성하였다. Peptide-AMC (7-amino-4-methylcoumarin) substrate는 solution 상에서 단백질 분해 효소 활성을 측정하는데 많이 활용된다. coumarin의 형광은 amino group에 결합된 peptide에 의해 quench되고, carboxy terminal amino acid와 결합이 끊어질 때 500배 증가한다. 이러한 특이성은 P1 amino acid와 coumarin 사이의 결합이 끊어졌을 때에만 나타난다.[4]

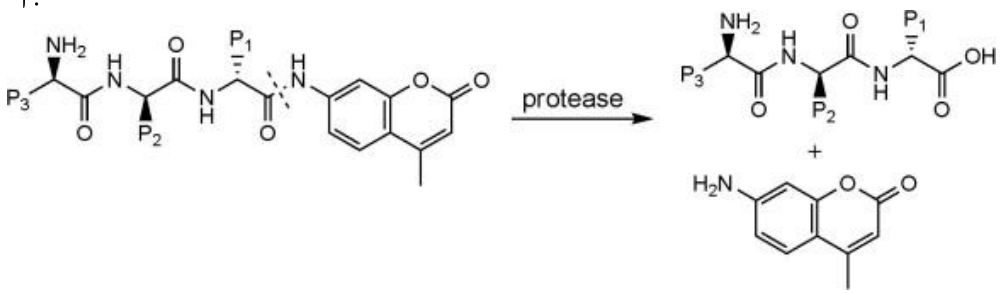


Figure 1. Structure of 7-amino-4-methylcoumarin

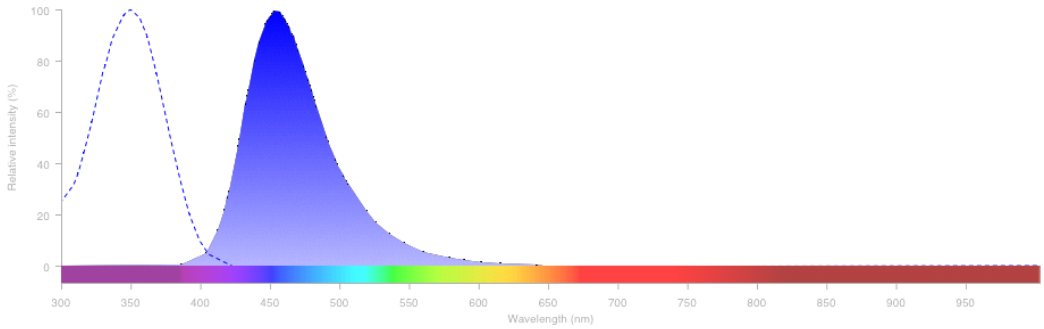


Figure 2. Spectrum of 7-amino-4-methylcoumarin

HTRA는 다양한 생리적 · 병리적 과정에 관여한다. 따라서 HTRA의 활성을 선택적으로 추적할 수 있는 chemical probe는 HTRA의 활성 변화와 이들 효소가 관여하는 다양한 생화학적 경로를 확인하는데 유용한 도구로서 활용될 수 있으며, 나아가 퇴행성 뇌 질환의 발병 기전을 설명하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

2. 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색

ATRA (all trans retinoic acid)는 레티노이드 계열의 비타민 A의 활성 대사산물이며 530개 이상의 유전자의 전사 조절에 관여하기 때문에 사실상 모든 필수 생리적 과정과 기능에 필요하며[5] skeletal myoblast와 neuroblast를 포함한 다양한 세포의 분화를 유도한다. 이러한 ATRA를 수일간 neuroblastoma cell에 처리하면 neuron-like cell로 분화가 된다. [6]

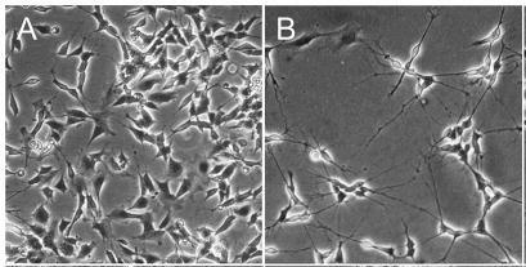


Figure 3. SH-SY5Y cells undergo morphological changes during RA-induced differentiation (A) Undifferentiated SH-SY5Y cells cultured in complete growth medium. (B) SH-SY5Y cells treated with 10 μM RA for 4 days

선행연구결과 신경세포주에 베타아밀로이드를 처리하여 알츠하이머병과 유사한 상태로 신경독성을 유발한 경우 HTRA1 의 활성이 네 배 이상 증가한 것을 확인하였다.[2] 이 연구결과는 알츠하이머병에 있어 HTRA1 의 활성변화를 질병의 바이오마커로 활용할 수 있는 가능성을 제시한다. 따라서 본 연구에서는 선행연구에서 확인한바 있는 U87-MG glioblastoma cell 외에 여러 종류의 서로 다른 신경세포에서 유사한 현상을 확인할 수 있는지를 확인하고자 하였다. 이를 위해 신경독성시험에 많이 활용하는 SH-SY5Y celll과 SK-N-SH cell을 추가로 선택하여 neuron-like state 로 분화를 시도하고자 하였다.

선행 연구를 통해 2세대 프로브의 HTRA계열의 단백 분해 효소에 대한 선

택성을 확인하였다.[11] 본 연구에서는 2세대 프로브 중 반응성과 선택성이 가장 우수한 비천연 아미노산이 포함된 DS-01-94 (CF-Ahx-Leu-Phe-β-Cpa-Val-DPP) 를 사용하여 ATRA 처리시 neuron 형태로 분화된 세포와 분화 전 세포간 HTRA1의 활성이나 발현량에 차이가 있는지 확인하고자 하였다.

3. HTRA를 타겟으로 하는 cyclic activity-based probe의 합성

활성 기반 프로브 (activity-based probe)는 단백질 분해 효소의 단백질 분해 활성을 결정하는데 사용되며 warhead, recognition sequence, 그리고 공유 효소 활성 기반 probe의 복합체의 검출을 위한 reporter tag로 구성된다. 이러한 프로브는 타겟으로 하는 효소와 비가역적으로 공유결합을 통한 선택적 결합을 할 수 있다. Warhead에는 여러 종류가 올 수 있으며 electrophile인 diphenylphosphonate, fluorophosphonate 등은 serine protease를 타겟으로 한다. Fluorescent tag는 SDS-PAGE gel의 형광 스캐닝, 생체 내 형광 이미징에 의해 검출될 수 있다.[7]

본 연구실에서 선행 연구를 통해 개발한 바 있는 HTRA 프로브의 경우 세포 투과도가 높고 선택성이 우수하나 혈액과 같이 단백질이 고농도로 농축된 시료의 경우 비특이적 반응이 많이 관찰되어 활성검출 감도가 다소 떨어지는 단점이 있다. Cyclic peptide는 상대적으로 작은 크기, 높은 친화성과 특이성, 합성의 용이성으로 인해 현대 drug discovery에서 가장 매력적인 물질중인 하나이다. 예로 Cyclosporine은 fungi로부터 유래한 여러 질병의 치료제로 쓰이는 작은 cyclic peptide이며 여러 가지 형태 사이에서 이동할 수 있는 유연성을 나타내며 덕분에 높은 막 투과성을 가지고 있다.[8]

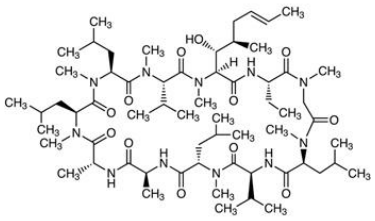


Figure 4. Structure of Cyclosporine

천연물 중 cyclodepsipeptide 구조를 기반으로 한 강력한 HtrA1과 HtrA2 저해제가 보고된 바 있다.[9] 따라서 본 연구에서는 고리형 펩타이드 프로브 구조를 활용하여 새로운 프로브를 합성하고 이를 이용하여 효소 활성을 고감도로 검출할 수 있는 새로운 분석기법을 개발할 계획이다.

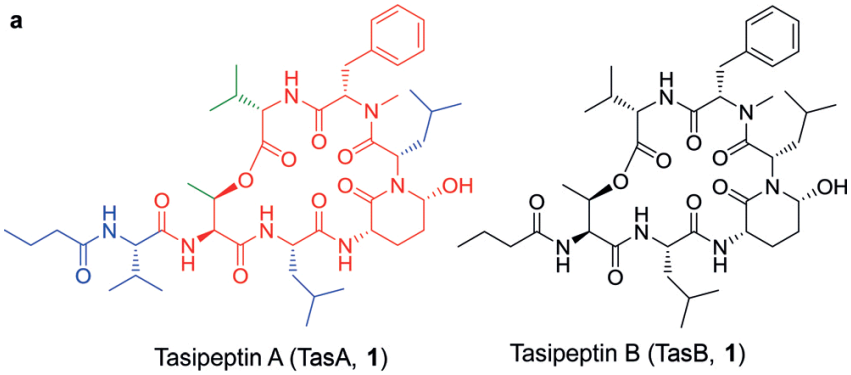


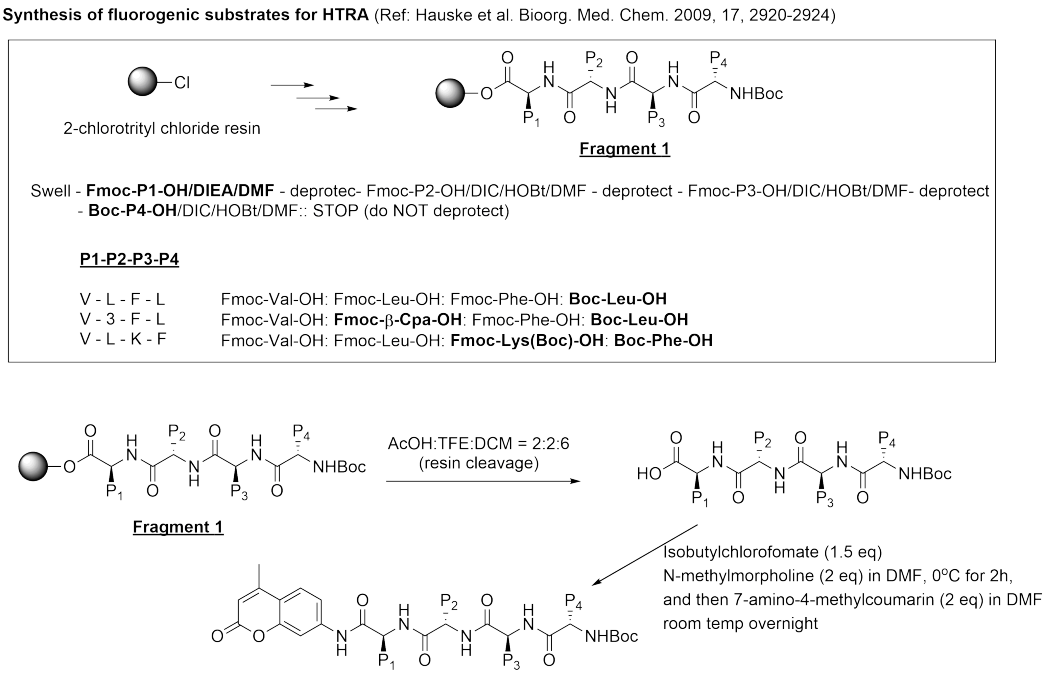
Figure 5. Structural features of Ahp-cyclodepsipeptidesfor serine protease inhibition a) Chemical structures of the natural product Ahp-cyclodepsipeptides TasA (1) and TasB (2)

Ⅱ. 결과 및 고찰

1. HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성

1) 테트라펩타이드 기반 라이브러리 합성

본 연구에서는 선행 연구를 바탕으로 1, 2세대 프로브 중 HTRA에 선택적이었던 펩타이드 시퀀스를 바탕으로 하여 Solid phase peptdie peptide synthesis (SPPS)를 이용하여 H2-Optimal substrate peptide (H2-OPT)보다 짧은 테트라펩타이드를 합성한 뒤 AMC (7-amino-4-methylcoumarin) 부착 후 HPLC로 정제하였다.



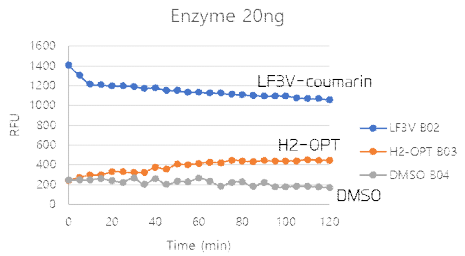
Scheme 1. synthesis of fluorogenic substrate for HTRA

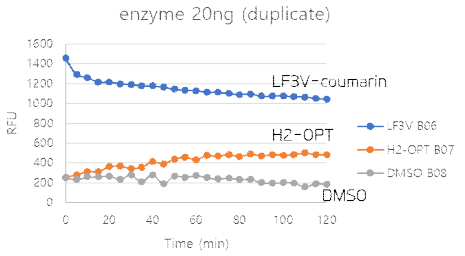
compound	sequence
1	Leu-Phe-Leu-Val-AMC
2	Leu-Phe-β-Cpa-Val-AMC
3	Phe-Lys-Leu-Val-AMC

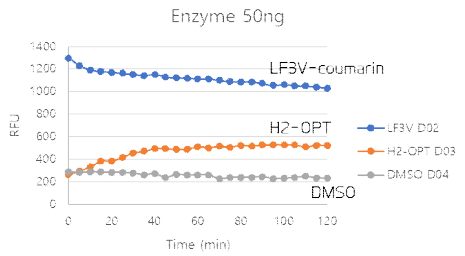
Table 1. Sequence of fluorogenic substrate for HTRA

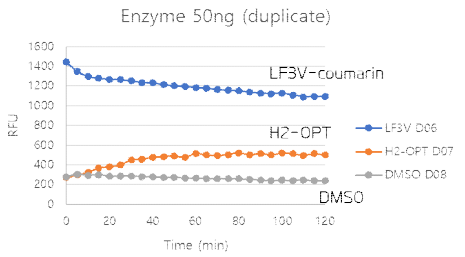
2) Enzymatic assay

합성한 형광 기질과 효소간의 결합력을 확인하기 위해 HTRA의 양을 다르게 하여 각 enzyme을 상용화된 HTRA fluorogenic substrate인 H2-OPT와 합성한 형광기질 (최종농도 10 μM)과 반응시킨 후 microplate reader기를 사용해 RFU값을 측정하였다. enzyme assay를 반복해 보았으나 HTRA와 반응을 하지 않는 듯 보였으며 AMC (7-amino-4-methylcoumarin) 시약의 문제라 생각하여 $CDCl_3$에 녹여 NMR로 확인하였으나 시약은 정상이었다. 1ml assay buffer에 녹여 AMC 만의 흡광도 및 형광을 측정해보았을 때도 문제가 없었다. 따라서 H2-OPT 와 달리 아미노산 개수가 많이 줄어든 신규 형광기질을 recombinant HTRA 가 적절한 기질로 인식하지 못하는 것으로 추측해볼 수 있다.









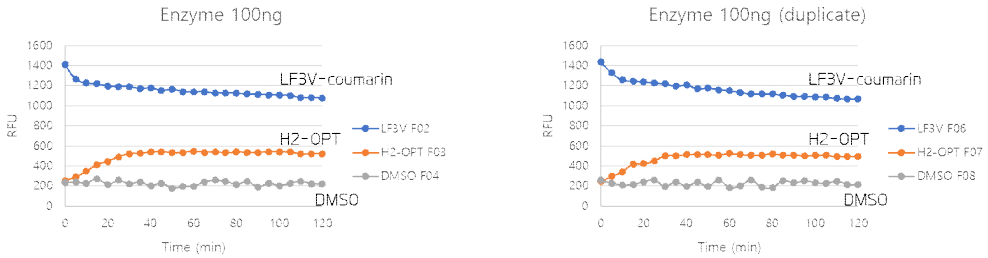


Figure 6. Measurement of signal change of fluorescent substrate at various HTRA2 concentrations

2. 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색

1) Cell differentiation

SH-SY5Y, SK-N-SH를 neuron-like cell로 분화시키기 위하여 ATRA (최종농도 10 μM)를 3일마다 media (DMEM, 10% FBS, 0.1% P/S, ATRA)를 갈아주며 5일 이상 눈으로 충분히 변화가 관찰될 때까지 분화시켰다. SH-SY5Y의 경우 75T flask에서 바로 ATRA를 처리하여도 분화가 잘 되었지만 SK-N-SH의 경우 그렇지 않아 24 well plate를 이용하였다. 5일 이상 지나면 ATRA를 처리하지 않은 세포에 비해 세포가 가늘어지고 neurite outgrowth 가 진행된 것을 관찰 할 수 있었다.

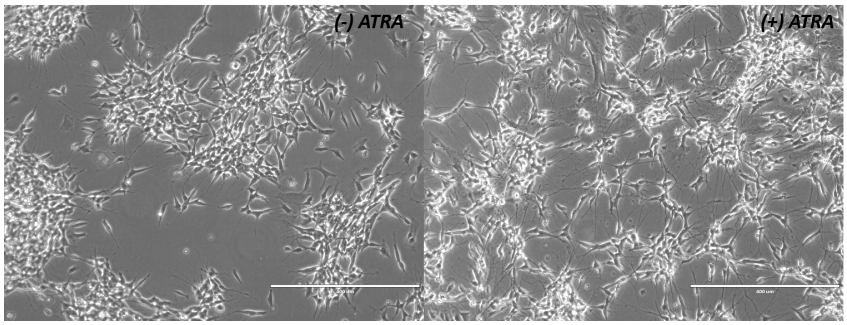


Figure 7. Cell differentiation of SH-SY5Y

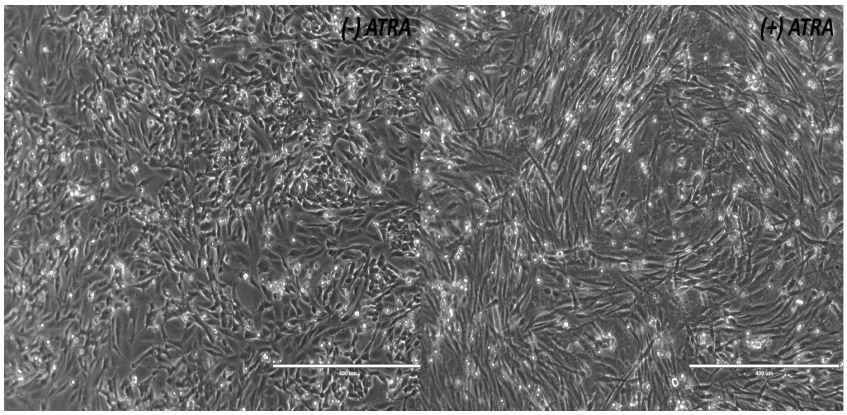


Figure 8. Cell differentiation of SK-N-SH

2) Selectivity in SH-SY5Y/SK-N-SH

ATRA처리에 따른 HTRA의 수준 변화를 관찰하기 위해 충분히 분화된 SH-SY5Y/SK-N-SH에 선행 연구에서 가장 효율이 높고 HTRA 선택적이었던 DS-01-94 (최종농도 10μM)을 처리하여 SDS-PAGE를 진행하였다. 24 well plate에 well당 4X10^5 cell/ml로 깐 뒤 프로브를 처리한 뒤 2시간 동안 37℃CO_2 incubator에 방치 후 RIPA buffer를 처리하여 lysis를 진행한 뒤 BCA assay를 통해 단백질 정량을 한 뒤 media는 media끼리, lysate은 lysate끼리 단백질양을 동일하게 통일한 뒤 SDS-PAGE를 통해 표지된 단백질 밴드를 확인하였다. cell lysate 샘플에서 조금 연하게 보이는 밴드가 HTRA로 추정된다. SDS-PAGE 결과 ATRA를 처리하였을 때에도 HTRA의 활성은 그다지 크게 상승하지 않은 것으로 보인다.

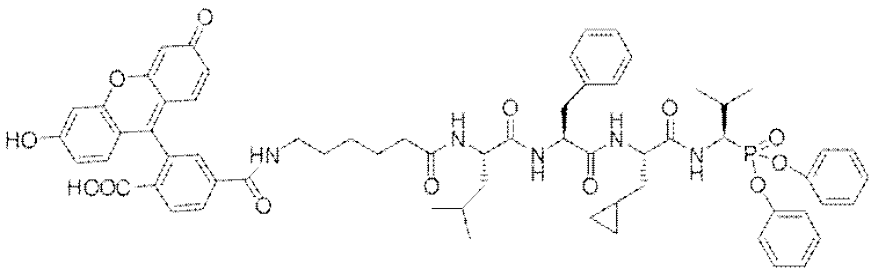


Figure 9. Structure of HTRA probe (DS-01-94)

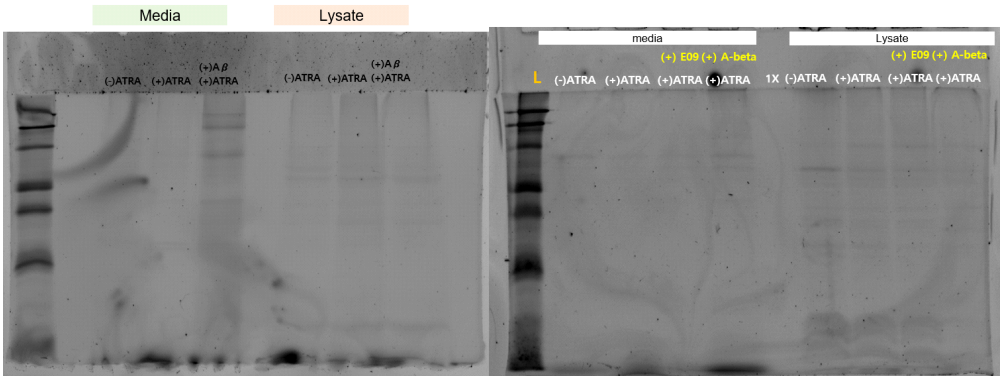


Figure 10. 2nd generation probe with SH-SY5Y/SK-N-SH

3) Live cell imaging

24 well plate에 well당 $4X10^5$ cell/ml로 깐 뒤 프로브를 처리하고, 2시간 동안 37℃ CO_2 incubator에 방치 후 lysis를 진행하기 전에 형광현미경으로 관찰을 해보았다.

형광 세기를 동일하게 한 뒤 관찰하였으나 프로브를 처리하지 않은 well 과 처리한 well 간의 형광신호 차이를 발견하지 못하였다. 이는 두가지 이유를 생각해볼 수 있는데, 첫째, 활성화 된 HTRA1 의 정도가 관찰가능할 만큼 증가하지 않았거나, 둘째, 실험에 사용한 2세대 프로브의 세포투과도가 낮을 가능성 등이 있다. 그러나 HeLa cell을 활용한 실험을 수행하였을 때 정상적으로 HTRA1 이 표지된 것으로 보아 두 번째 보다는 첫 번째 가능성이 더 클 것으로 생각된다. 즉, 논문 등에서 보고된 바 있는 뉴런세포 특이적인 HTRA1 의 발현량 증가 현상이 본 논문에서 수행한 실험조건에서는 확인이 되지 않는 것으로 생각해 볼 수 있다.

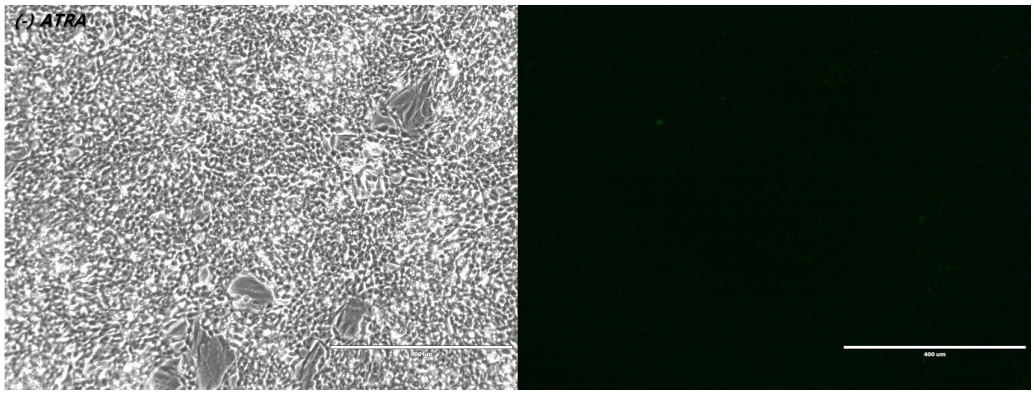


Figure 11. Cell differentiation of SK-N-SH (control)

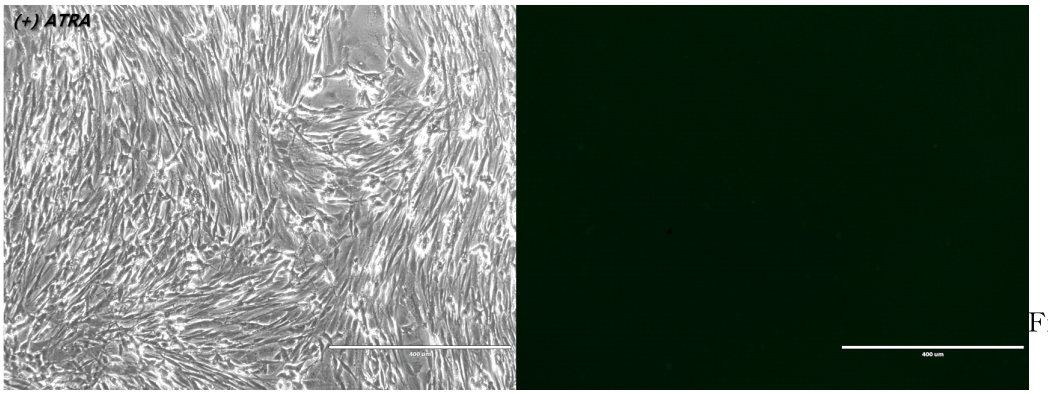


Figure 12. Cell differentiation of SK-N-SH (ATRA 최종농도 10μM)

3. HTRA를 타겟으로 하는 Cyclic Activity-based probe의 합성

4) hexa-peptide library의 합성

Peptoid의 합성은 광주과학기술원 서지원 교수 연구팀과의 공동연구를 통해 확보하였으며 cyclization 반응을 위한 linear peptide 의 합성은 광주과학기술원 대학원생 송다솜이 수행하였다.

cyclization을 위해 펩타이드의 양 끝에 cysteine을 부착하였으며 합성된 peptide에 hex linker를 부착한 뒤 fluorescein을 부착하였다. 기존에 사용하였던 cleavage cocktail로는 펩타이드가 잘 분리되지 않아 조성을 변경하여 resin에서 펩타이드를 분리시킨 뒤 LC-MS를 이용하여 물질의 합성을 확인하였다.

	peptide sequence	
1	Fmoc-Cys(Trt)-Val-Thr(tBu)-Ala-Val-Ser(tBu)-Phe-Cys(Trt)-OH	DS-04-61
2	Fmoc-Cys(Trt)-Val-Ser(tBu)-Ala-Val-Ser(tBu)-Phe-Cys(Trt)-OH	DS-04-62
3	Fmoc-Cys(Trt)-Val-Tyr(tBu)-Ala-Val-Ser(tBu)-Phe-Cys(Trt)-OH	DS-04-63
4	Fmoc-Cys(Trt)-Val-Tyr(tBu)-Phe-Val-Ser(tBu)-Phe-Cys(Trt)-OH	DS-04-64
5	Fmoc-Cys(Trt)-Val-Thr(tBu)-Leu-Val-Ser(tBu)-Leu-Cys(Trt)-OH	DS-04-65

Table 2. sequence of hexa-peptide library

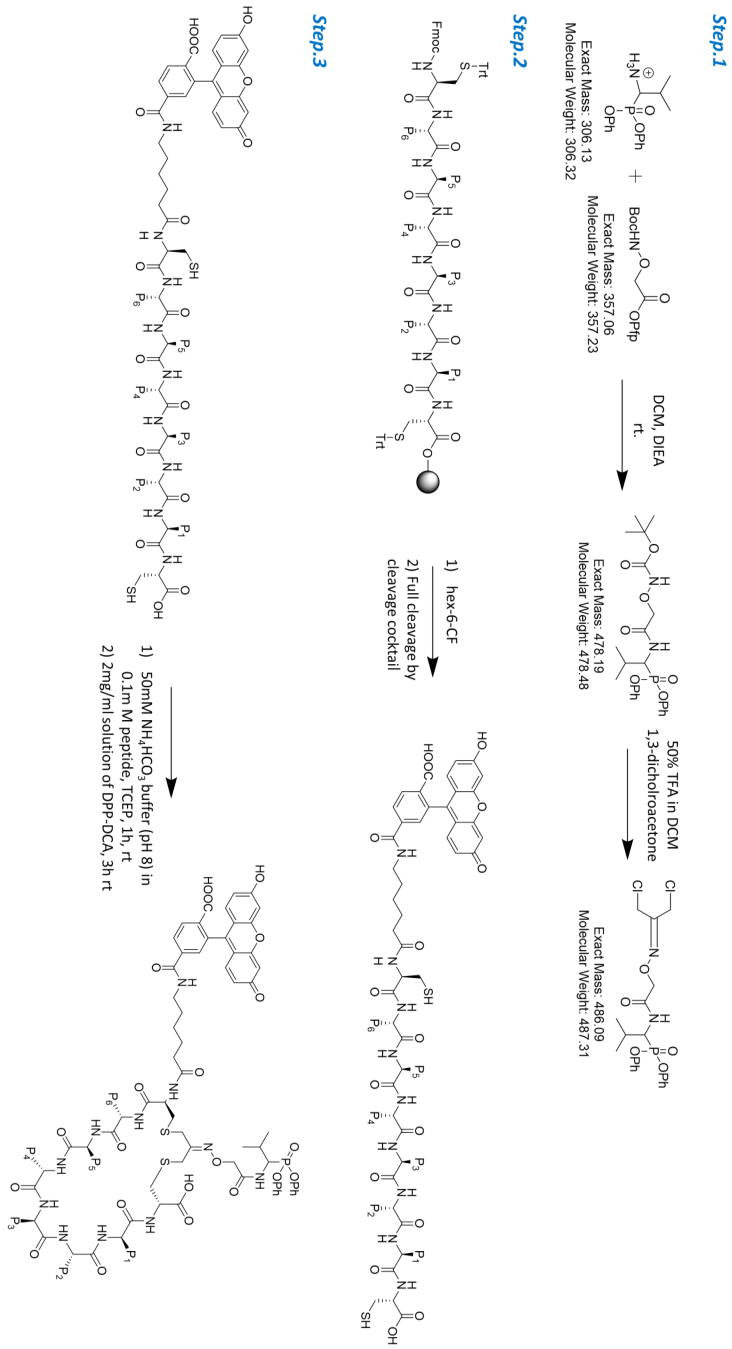
5) Valine-DPP-DCA 합성

cysteine과 결합하여 activity based probe의 warhead 부분으로써 타겟으로 하는 serine protease와 결합할 Valine-DPP-DCA를 합성하였다. 합성 시 TLC로 반응 물질들의 소비를 확인한 뒤 반응을 종료하였으며 최종 물질은 LC-MS로 mass를 확인한 뒤 flash column chromatography로 정제하였으며 반응 시 이용한 용매인 DMF가 완전히 제거되지 않아 끈적한 형태로 남

았다.

6) Valine-DPP-DCA를 이용한 peptide cyclization

NH_4HCO_3 buffer (pH 8)에 peptide의 농도가 0.1 mM이 되게끔 녹인 뒤 Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride를 넣어 이황화결합이 생기는 것을 최소화 한 뒤 앞서 합성한 Valine-DPP-DCA를 첨가하여 cyclization 반응을 보낸 후 -80℃에서 얼린 뒤 동결건조를 한다. DMF가 과량으로 첨가되어 동결건조가 불가능한 경우에는 hyper C18 column을 이용하여 최대한 DMF를 제거한 뒤 동결건조를 진행하였으며 이후 LC-MS로 mass를 통해 성공적으로 cyclization 반응이 이뤄진 것을 확인할 수 있었다. Preparative HPLC를 이용하여 원하는 물질만 분리하였다.



Scheme 2. synthesis of cyclic-activity based peptide probe

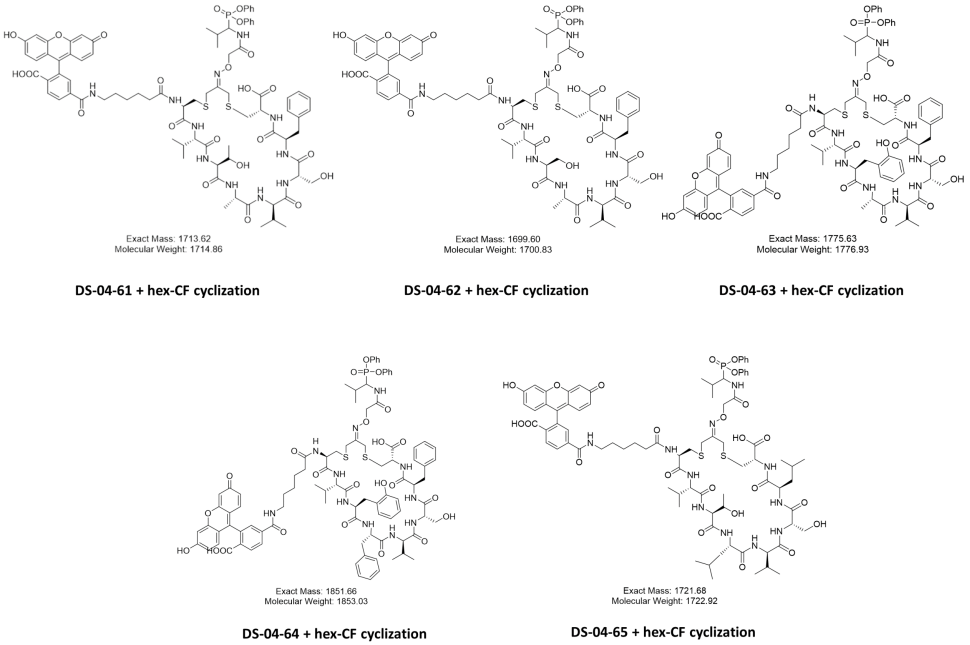


Figure 13. structure of cyclic-activity based peptide probe

Ⅲ. 결론

본 논문에서는 선행 연구를 바탕으로 하여 첫째, peptide sequence를 설정 후 HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질을 합성하고, 기존의 상용화 되고 있는 H2-OPT와 비교하여 봄으로써 물질의 효용성을 평가하고자 하였다. 연구결과 tetrapeptide 기반 substrate 의 경우 아미노산의 개수가 적어 HTRA가 substrate 으로서 인식하지 못하는 것으로 추정된다. covalent probe 의 경우 sequence 인식에 의한 선택성보다 nucleophile 과 효소간의 반응성에 크게 의존하는 반면 substrate 의 경우 sequence 의 인식이 효소와의 반응성에 결정적인 영향을 미치게 되므로 다양한 비천연 아미노산의 도입, unbiased library를 활용한 screening 과 biopanning등의 시도를 통해 개선된 substrate을 얻기 위한 후속연구를 시도해 볼 수 있다.

둘째로, 본 연구실에서 개발한 HTRA를 타겟으로 하는 활성 기반 프로브를 이용하여 기존의 실험에 사용 되었던 HeLa, U87MG 세포가 아닌 SK-N-SH와 SH-SY5Y에서의 HTRA 활성변화를 관찰하고자 하였다. 또한 ATRA를 처리하여 위의 두 세포를 Neuron-like cell로 충분히 분화시킨 뒤의 HTRA 의 활성변화를 추적해 보았다. 형광현미경과 SDS-PAGE를 통한 실험결과 SH-SY5Y 의 경우 HTRA1 의 발현레벨이 다른 세포보다 낮은 편이며 ATRA를 처리하여 neuron 과 비슷한 형태로 분화시킨 후에도 HTRA1 의 활성증가를 관찰할 수는 없었다. 이는 실제 활성증가가 일어나지 않았을 가능성도 있으나, 사용한 프로브의 세포투과도 및 감도의 문제로 인해 확인이 되지 않았을 수도 있다. SK-N-SH 세포의 경우 1세대 프로브로 HTRA1 의 활성변화를 확인한 바 있었으나, 2세대 프로브를 사용하였을 때 활성변화의 확인이 관찰되지 않았으며, 세포 분화 실험 수행시 실험조건상 세포수가 다소 증가하여 분화상태의 확인이 용이하지 않았다. 1세대 프로브에 비해 2세대 프로브의 경우 비천연 아미노산을 포함하므로 세포투과

도, 미디어에 대한 용해도 등이 달라져 세포실험에 필요한 조건을 최적화 할 필요가 있을 것으로 보인다.

셋째로, 본 연구실에서 개발한 비천연 아미노산을 포함한 2세대 프로브의 경우 크기가 작아 세포 투과도가 좋으나 고농축 단백질에서는 감도가 떨어진다는 단점이 있어 이를 cyclization을 통해 극복하고자 하였다. 활성 기반 프로브에서 효소와 공유결합을 하는 electrophile을 먼저 합성 및 정제하여 얻었다. SPPS를 이용하여 hexa-peptide를 합성하였으며 cyclization을 하기 위해 모든 sequence 처음과 끝부분에 thiol side chain을 가진 cystein을 포함하였다. 본 연구를 통해 개발된 프로브는 효소활성을 고감도로 검출할 수 있는 새로운 분석 기법을 개발하는데 이용될 것으로 기대된다.

Ⅳ. 실험

1. 실험기기 및 시약

1) 실험기기

액체크로마토그래피-질량분석기 (Liquid Chromatography)는 HP 1100모델로 질량분석기(MS)는 Electrospray ionization (ESI) 방식의 Agilent Technologies 6130 모델을 사용하여 수행하였으며 column은 Aglient XDB-C18모델을 사용하였다. 액체크로마토그래프 (High Performance Liquid Chromatograph)는 KNAUER 제작사의 AZURA 모델을 사용하여 수행하였으며 column은 Luna C18을 사용하였다. RFU data는 Molecular Devices SpectraMax M5를 사용하였다.

Cell imaging은 EVOS^{TM} FL Imaging System AMF4300을 사용하여 수행되었다.

2) 시약

반응에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich, Thermofisher Scientific, Alfa Aesar, TCI, Acros, Novabiochem, ChemImpex 에서 구입하여 정제 없이 사용하였다. water는 3 차 증류수를 사용하였다. Peptoid의 합성은 광주과학기술원 서지원 교수 연구팀과의 공동연구를 통해 확보하였으며 cyclization 반응을 위한 linear peptide의 합성은 광주과학기술원 대학원생 송다솜이 수행하였다.

2. 실험방법

1) HTRA를 타겟으로 하는 형광 기질 합성

① Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) technique을 이용한 tetra-peptide 합성

1.1 Fmoc-Val-OH (P1) 부착

2-Chlororityl chloride resin (500mg, 0.5 mmol, 1eq)을 Dimethylformamide(DMF) 용매로 30분간 swelling 시킨다. Swelling 되는 동안 Fmoc-Val-OH(P1)를 상온에 꺼내 놓고 상온과 온도가 같아지면 깨끗한 vial (1) 을 준비한 뒤 Fmoc-Val-OH (3eq)를 담는다. 여기에 DMF를 3ml 첨가하여 solid를 충분히 녹인다. 30분 후 swelling이 끝나면 용매를 흘려보내고 코르크 마개를 잘 닫은 후 vial (1) 의 용액을 첨가한다. 그 후 DIEA (3eq)를 첨가한 후 뚜껑을 닫고 흔들어 공기를 빼어내 준 후 2시간 동안 반응을 보낸다. 반응이 끝나면 반응 용매를 흘러 보내고 DMF와 DCM으로 각각 4번씩 충분히 세척해 준 후 건조한다.

1.2 Fmoc-Leu-OH (P2) 부착

Fmoc-Val-OH (P1)이 부착된 resin을 DMF 용매로 30분간 swelling 시킨다. Swelling이 끝나면 용매를 흘려보내고 Fmoc을 제거해 다음 amino acid를 부착할 수 있게 20% piperidine (DMF : piperidine = 1:4)을 resin을 충분히 적실 정도로 첨가한 뒤 뚜껑을 닫고 흔들어 공기를 빼낸 후 5분간 반응을 보낸다. 이 과정을 총 3번 반복한다. Fmoc deprotect을 끝낸 후 반응 용매를 흘려보내고 DMF와 DCM으로 각 4번씩 충분히 세척해준 후 건조한다. 다시 DMF 용매를 이용하여 resin을 30분간 swelling한다. Swelling 되는 동안 Fmoc-Leu-OH (P2), HOBt (coupling reagent), DMF, DIC를 준비

해 둔다. Fmoc-Leu-OH와 HOBt가 상온과 온도가 같아지면 깨끗한 vial (2) 을 준비한 뒤 여기에 Fmoc-Leu-OH와 HOBt를 3eq씩 넣고 DMF 3ml로 solid를 잘 녹여준다. 30분 후 용매를 흘려보내고 코르크를 닫은 후 vial (2)의 용액을 첨가한 후 DIC (3eq)를 첨가한 후 뚜껑을 잘 닫고 흔들어 공기를 빼낸 뒤 2시간 동안 반응을 보낸다. 반응이 끝나면 반응 용매를 흘려보내고 DMF, DCM으로 각각 4번씩 충분히 세척 해준 후 건조한다.

1.3 Fmoc-Lys(Boc)-OH (P3) 부착

Fmoc-Leu-OH (P2)까지 부착된 resin을 DMF 용매로 30분간 swelling 시킨다. Swelling이 끝나면 용매를 흘러 보내고 Fmoc을 제거해 다음 amino acid를 부착할 수 있게 20% piperidine (DMF : piperidine = 1:4)을 resin을 충분히 적실 정도로 첨가한 뒤 뚜껑을 닫고 흔들어 공기를 빼낸 후 5분간 반응을 보낸다. 이 과정을 총 3번 반복한다. Fmoc deprotect을 끝낸 후 반응 용매를 흘러 보내고 DMF와 DCM으로 각 4번씩 충분히 세척해준 후 건조한다. 다시 DMF 용매를 이용하여 resin을 30분간 swelling한다. Swelling되는 동안 Fmoc-Lys(Boc)-OH (P3), HOBt (coupling reagent), DMF, DIC를 준비해 둔다. Fmoc-Lys(Boc)-OH 와 HOBt가 상온과 온도가 같아지면 깨끗한 vial (3) 을 준비한 뒤 여기에 Fmoc-Lys(Boc)-OH 와 HOBt를 3eq씩 넣고 DMF 3ml로 solid를 잘 녹여준다. 30분 후 용매를 흘러 보내고 코르크를 닫은 후 vial (3)의 용액을 첨가한 후 DIC (3eq)를 첨가한 후 뚜껑을 잘 닫고 흔들어 공기를 빼낸 뒤 2시간 동안 반응을 보낸다. 반응이 끝나면 반응 용매를 흘러 보내고 DMF, DCM으로 각각 4번씩 충분히 세척해준 후 건조한다.

1.4 Boc-Phe-OH (P4) 부착

Fmoc-Lys(Boc)-OH (P3)까지 부착된 resin을 DMF 용매로 30분간

swelling 시킨다. Swelling이 끝나면 용매를 흘러 보내고 Fmoc을 제거해 다음 amino acid를 부착할 수 있게 20% piperidine (DMF : piperidine = 1:4)을 resin을 충분히 적실 정도로 첨가한 뒤 뚜껑을 닫고 흔들어 공기를 빼낸 후 5분간 반응을 보낸다. 이 과정을 총 3번 반복한다. Fmoc deprotect을 끝낸 후 반응 용매를 흘러 보내고 DMF와 DCM으로 각 4번씩 충분히 세척해 준 후 건조한다. 다시 DMF 용매를 이용하여 resin을 30분간 swelling한다. Swelling 되는 동안 Boc-Phe-OH (P4), HOBt (coupling reagent), DMF, DIC를 준비해 둔다. Fmoc-Phe-OH가 아니라 Boc-Phe-OH (P4) 인지 한 번 더 확인한다. Boc-Phe-OH (P4) 와 HOBt가 상온과 온도가 같아지면 깨끗한 vial (4) 을 준비한 뒤 여기에 Boc-Phe-OH (P4)와 HOBt를 3eq씩 넣고 DMF 3ml로 solid를 잘 녹여준다. 30분 후 용매를 흘러 보내고 코르크를 닫은 후 vial (4)의 용액을 첨가한 후 DIC (3eq)를 첨가한 후 뚜껑을 잘 닫고 흔들어 공기를 빼낸 뒤 2시간 동안 반응을 보낸다. 반응이 끝나면 반응 용매를 흘러 보내고 DMF, DCM으로 각각 4번씩 충분히 세척해준 후 건조한다.

1.5 Cleavage cocktail을 이용한 Resin full cleavage

Acetic acid (AcOH) 2ml, 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) 2ml, DCM 2ml (Acetic acid (AcOH) : 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE): DCM = 2:2:6, cleavage cocktail) 용액을 깨끗한 vial에 넣는다. 테프론 코르크를 끼운 cartridge에 담긴 Resin은 swelling 하지 않고 cleavage cocktail을 찰랑거릴 정도로 넣는다. 뚜껑을 꽉 닫지 않고 얹은 다음에 500ml 비커에 담은 후 호일로 잘 감싼다. Shaker에서 3시간 동안 반응을 보낸다. 뚜껑이 날아오르거나 용액이 새지는 않는지 5분간 지켜본다.

3시간 후 반응이 끝나기 전에 500ml 둥근 flask를 ice bath에 받친 후

diethyl ether를 넣는다. 반응이 끝나면 diethyl ether가 들어있는 500ml 둥근 flask에 반응 용액을 받는다. 남은 용액이 없게 pump를 이용해 resin을 최대한 짜낸다. 그 다음 Acetonitrile (ACN)과 DCM으로 각각 4번씩 소량으로 씻어준다. 그 후 Evaporator를 이용해 용매를 충분히 날려준다. Evaporator의 water bath 온도는 35℃으로 한다. 용매가 어느정도 날라가면 둥근 flask의 용매를 깨끗한 vial (5) 에 옮긴다. DCM으로 flask를 세척하여 남은 물질이 없게끔 한다. Vial (5) 에 옮긴 후 다시 evaporation 시키면 white solid (Exact mass:705.43 g/mol)를 얻을 수 있다.

② Peptide-AMC coupling

2.1 amino-4-methyl coumarin 부착

FKLV (50mg, 0.059 mmol)을 25ml 둥근 flask에 넣고 stirring bar를 넣는다. DCM (anhydrous) 2ml를 첨가한 후 ice bath를 받친 후 stirring을 해 solid를 녹인 후 4-methlymorpholine (4eq), isobutyl chloroformate (4eq)를 첨가한 후 ice bath를 받친 채로 2시간 동안 반응을 보낸다. 2시간 반응 후 깨끗한 vial (6) amino-4-methyl coumarin (4eq)를 넣고 DMF (anhydrous, 최대 1ml) 0.5ml를 첨가해 AMC를 녹인다. Vial (6)의 용액을 둥근 flask에 첨가한 후 over-night으로 반응을 보낸다. LC-MS를 이용해 반응이 잘 갔는지 확인 후 Evaporation을 진행한다. Evaporation 시 DCM을 첨가한 후 충분히 날려 최대한 acid 냄새가 나지 않게 한다. Evaporation이 끝나면 노란 물질 (Exact mass:862.48 g/mol)을 얻을 수 있다. Flash column chromatograph를 진행하기 전 TLC를 전개용매를 달리하여 찍어본 후 Rf 값을 계산한 후 적절한 전개용매를 선택한다. 본 실험에서는 전개용매 Hexane: Ethyl Acetate = 1: 2를 사용하였다. Column flask 250ml에 전개용

매로 적신 silica gel을 5 cm정도 부어준 후 전개용매를 충분히 흘러 보내 silica gel을 packing 시킨다. Packing이 되는 동안 loading할 sample을 DCM으로 희석하여 준비해 둔 후 packing이 끝나면 pipet을 이용해 벽면을 따라 흘러 보내 silica gel이 파이지 않게 하여 첨가한다. 전개용매도 2cm 정도 pipet을 이용해 조심스럽게 첨가한 후 비커에 있는 용액을 붓는다. 전개용매를 충분히 부은 후 아래 test tube를 둔 후 코르크를 열어 전개용매를 받는다. 용매를 받으면서 TLC를 찍어 보며 같은 양상을 보이는 용액의 tube 숫자를 기록해 둔다. Column이 끝나면 같은 양상의 tube 용액끼리 모아 Evaporation시킨다. 각 vial에 어떤 용액이 들어갔었는지 잘 기록해둔 후 LC-MS를 찍어 mass를 확인한다. (Exact mass:862.48 g/mol)

2.2 Trifluoroacetic acid (TFA)를 이용한 Boc (protecting group) deprotection

Column을 통해 분리한 Product에 TFA 1ml를 첨가한 후 stirring bar를 넣고 2시간 동안 반응시킨 후 Evaporation한다. 산 냄새가 강할 경우 DCM을 첨가한 후 다시 용매를 날려주어 최대한 산을 날린다. 노란 고체 (Exact mass:662.38 g/mol)를 얻을 수 있다. Deprotection이 잘 됐는지 확인하기 위해 LC-MS를 통해 mass를 확인한다.

2.3 Preparative HPLC

Preparative HPLC를 이용하여 원하는 물질만 분리해 낸다. FKLV-coumarin을 ACN 1ml에 녹인 후 Nylon filter에 여과시켜 준비한다. 용매로는 0.1% formic acid/ACN과 0.1% formic acid/DW를 사용하였다. FKVL-coumarin은 9분 대에 분리해 낼 수 있다. 분리한 물질은 -80℃ 냉장고에서 2시간 이상 얼린 후 하루 이상 동결건조 한 뒤 갈색 EP tube에 옮겨 무게를 측정한 뒤 -80℃ 냉장고에 보관하였다.

③ Enzyme assay

EPtube에 Assay buffer (50mM Tris, 200mM NaCl, 0.25% CHAPS, pH 8.0)를 담고 37℃에서 30분간 데운다. black plate에 LF3V-coumarin, H2-OPT, DMSO를 1㎕씩 spot을 찍어둔다. Enzyme의 양을 20ng, 50ng, 100ng이 되게 buffer에 희석 후 spot을 찍어둔 well 아래에 well당 80㎕씩 첨가한다. 데워뒀던 Assay buffer를 spot을 찍어둔 well에 첨가한다. reading 직전에 두 용액을 섞어준 뒤 kinetic을 측정한다. (kinetic fluorescence 120min, interval 30s, 37℃, excitation 328nm, emission 393nm, auto cut off)

2) 신경세포주에서 분화상태에 따른 HTRA 활성변화의 탐색

① ATRA를 이용한 SH-SY5Y의 분화

SH-SY5Y를 배양해둔 75T flask에 ATRA (최종농도 10μM)를 처리한 media (DMEM, 10% FBS, 0.1% P/S)를 3일마다 갈아줘가며 neuron-like cell이 될 때까지 처리해주며 약 6일 정도 걸린다.

② ATRA를 통해 분화된 SH-SY5Y를 이용한 SDS-PAGE

ATRA처리 6~9일 후 완전히 발이 자라나고 neuron-like cell이 되었을 때 이 세포를 24well plate에 well당 10^6cells/mL가 되게 세포를 깔아둔다. 다음 날 기존의 media (DMEM, 10% FBS, 0.1% P/S)를 제거한 뒤 Opit-MEM 200μl를 처리한다. 이 때 Opti-MEM에는 ATRA를 처리하지 않는다. Probe (DS-01-94, 최종농도 10μM)를 처리한 뒤 호일로 감싸서 CO_2 incubator에서 2시간동안 방치한다. 2시간 후에 각 well의 media를 eptube에 옮겨둔 후 PBS(Phosphate buffered saline) 1ml로 5분간 2회 세척한다. RIPA buffer 50μl 처리하여 cell lysis 진행 후 eptube에 20μl씩 분주한다. 단백질 정량 후 media sample은 단백질량을 5μg으로 통일하고 cell lysate sample은 25μg으로 통일하여 5X buffer에 희석한 뒤 100℃에서 5분간 2~3분마다 vortex 해주었다. 이렇게 만든 sample들은 gel에 well당 35μl씩 loading후 80V로 전개시켰으며 Chemidoc을 이용하여 형광을 확인하였으며 coomassie stain을 통해 단백질 band를 확인하였다.

③ ATRA를 이용한 SK-N-SH의 분화와 SDS-PAGE

75T flask에 SK-N-SH를 충분히 배양시킨 후 24well plate에 $5X10^4$ cells/mL가 되게 세포를 깐 뒤 ATRA(최종농도 10μM)를 처리한다. 3일마다 media (DMEM, 5% FBS, 0.1% P/S)를 바꿔주면 6-9일 뒤 세포가 neuroblast-like cell로 분화한다. 충분히 발이 나오고 분화가 되었다고 판단되면 기존의 media를 제거 후 PBS 200μl로 3분씩 3번 세척 후 Opti-MEM으로 교체한다. 24시간 CO_2 incubator에 방치 후 다음 날 새로운 Opti-MEM으로 갈아준 뒤 Probe (DS-01-94, 최종농도 10μM)를 호일을 감싸 CO_2 incubator에서 2시간동안 처리한다. 2시간 후 PBS 1ml로 1분씩 총 2번 세척 후 100μl RIPA buffer처리 후 20분간 ice bath에서 shaking을 진행한다. cell lysat을 10초간 vortex후 냉장 원심분리기로 원심분리한다. (14000rcf, 5min, 0℃) 상층액만 취해서 단백질 정량을 진행 한 뒤 media sample은 단백질양을 8ug으로 통일하고 cell lysate sample은 20μg으로 통일하여 5X buffer에 희석한 뒤 100℃에서 5분간 2~3분마다 vortex 해주었다. 이렇게 만든 sample들은 gel에 well당 35μl씩 loading후 80V로 전개시켰으며 Chemidoc을 이용하여 형광을 확인하였으며 coomassie stain을 통해 단백질 band를 확인하였다.

④ A-bata를 처리한 세포의 SDS-PAGE

24well plate에 기존의 media(DMEM, 10% FBS, 0.1% P/S)를 제거 한 뒤 PBS 200μl로 5분간 3번씩 세척한다. Opti-MEM 200μl에 A-bata (최종농도 10μM)를 처리한 뒤 48시간동안 CO_2 incubator에 둔다. 다음 날 기존의 media (DMEM, 10% FBS, 0.1% P/S, 10μM A-bata)를 제거 한 뒤 Opit-MEM 200μl를 처리한다. 이 때 Opti-MEM에는 ATRA를 처리하지 않

는다. Probe (DS-01-94, 최종농도 10μM)를 처리한 뒤 호일로 감싸서 CO_2 incubator에서 2시간동안 방치한다. 2시간 후에 각 well의 media를 eptube에 옮겨둔 후 PBS(Phosphate buffered saline) 1ml로 5분간 2회 세척한다. RIPA buffer 50μl 처리하여 cell lysis 진행 후 eptube에 20μl씩 분주한다. 단백질 정량 후 media sample은 단백질량을 5μg으로 통일하고 cell lysate sample은 25μg으로 통일하여 5X buffer에 희석한 뒤 100℃에서 5분간 2~3분마다 vortex 해주었다. 이렇게 만든 sample들은 gel에 well당 35μl씩 loading후 80V로 전개시켰으며 Chemidoc을 이용하여 형광을 확인하였으며 coomassie stain을 통해 단백질 band를 확인하였다.

⑤ Live cell imaging

SH-SY5Y, SK-N-SH 둘다 probe 처리 후 cell lysi를 하기 직전 PBS로 충분히 세척 후 형광현미경을 통해 ATRA를 처리하였을 때와 하지 않았을 때의 형광세기 정도를 확인하였다.

3) Cyclic Activity-based probe의 합성

① Cyclization을 위한 Valine-DPP-DCA의 합성

1.1 Valine-DPP 합성

50ml 둥근 flask에 stirring bar를 넣고 benzyl carbamate (1.398mg, 9.25 mmol, 1eq), Acetic acid (3ml), Isobutylaldehyde (1.267ml, 13.87 mmol, 1.5eq), Triphenyl phosphite (2.424mg, 9.25 mmol, 1eq)순으로 첨가 후 condenser를 설치한다. 82℃에서 2시간동안 반응을 보내며 TLC로 benzyl carbamate의 consume을 확인한다. rotary evaporator로 휘발성 compoents를 날리고 methanol을 첨가한다. -20℃에서 overnight으로 재결정시킨 뒤 다음 날 filtration 후 cold methanol로 세척한 뒤 후드 안에서 methanol을 날린 후 LC-MS로 합성이 잘 되었는지 확인한다. (Exact mass: 439.15, Molecular weight:439.45)

100ml 둥근 flask에 product와 stirring bar를 넣고 33% hydrogen bromide/acetic acid 10ml를 첨가한 뒤 room temperature에서 2.5시간동안 반응을 보낸다. rotary evporator로 Acetic acid를 충분히 제거 후 Diethyl ether 60ml 첨가 후 -20℃에서 overnight으로 재결정시킨 뒤 다음 날 filtration 후 cold diethyl ether로 세척한 뒤 후드 안에서 methanol을 날린 후 LC-MS로 합성이 잘 되었는지 확인한다. (Exact mass: 306.13, Molecular weight:306.32)

1.2 Valine-DPP-DCA 합성

(EC-02-85 합성) 둥근 flask에 stirring bar 넣고 Boc-aminooxyacetic acid (200mg, 1.04 mmol, 1eq)를 넣고 DCM 5ml을 첨가 후 pyridine (92.34 μl, 1.144 mmol, 1.1 eq)을 넣은 뒤 Pentafluorophenyl trifluoroacetate (TFA-OPfp)를 첨가 후 room temperature에서 밤새 반응을 보낸다. TLC로

틈틈이 반응이 잘 가고 있는지 확인 후 Boc-aminooxyacetic acid이 consume되면 evaporation한다. Ethyl Acetate (EtOAc, d:0.902 g/ml) 12ml에 재용해 한 뒤 분별 깔때기에 옮기고 둥근 flask를 5% NaHCO3 10ml로 세척을 3번한 뒤 세척 용액을 분별 깔때기에 옮긴다. 깔때기 뚜껑을 덮고 코르크가 잠긴 것을 확인 후 잘 흔들어 준다. 깔때기의 아래 부분을 위로 가게 한 뒤 코르크 열어서 공기를 3번 빼 준다. 뚜껑을 열고 층 분리 기다리는데 밀도에 의해 수용액층 아래이고 유기층 위쪽이다. 이 때 수층은 삼각 flask에 받고 다시 분별 깔때기에 Brine 첨가하여 깔때기 뚜껑을 덮고 코르크가 잠긴 것을 확인 후 잘 흔들어 준다. 깔때기의 아래 부분을 위로 가게 한 뒤 코르크 열어서 공기를 3번 빼 준다. 마찬가지로 수층을 받아준 뒤 유기층은 flask에 옮겨 $MgSO_4$ 첨가하여 최대한 수분 제거 후 filtration 후 Evaporation한다. product는 LC-MS와 NMR로 확인한다. (Exact mass:357.06, Molecular weight: 357.23)

(EC-02-91 합성) 둥근 flask에 EC-02-85 (265.8mg, 0.74 mmol, 1.2 eq), valine-DPP (234.9 mg, 0.61 mmol, 1 eq)를 DCM 10ml에 충분히 녹인 후 DIEA (257 μl, 1.48 mmol, 2eq)를 첨가 후 room temperature에서 overnight stirring한다. TLC (전개조건 HE:EA=2:1)로 EC-02-85가 남아있지 않은지 확인 후 evaporation을 진행한다. LC-MS로 mass확인 후 flash column chromatography (HE:EA=1:1, Rf값 0.345)를 통해 정제한 뒤 product만 모아 LC-MS로 확인한다.

(EC-02-94 합성) 둥근 flask에 EC-02-91 (120.6 mg, 0.25 mmol, 1eq)를 넣고 50% Trifluoroactic acid in DCM 1.5ml에 잘 녹인 뒤 상온에서 1시간동안 반응을 보낸다. rotary evaporator로 용매를 제거 후 1,3-dicholoroacetone (48.2 mg, 0.38 mmol, 1.5 eq)를 넣은 뒤 DMF 500ul 첨가 후 상온에서 overnight stirring한다. LC-MS로 product가 합성되었는

지 확인한다. (Exact mass:486.09, Molecular weight: 487.31) LC-MS로 mass확인 후 flash column chromatography (HE:EA=1:1, Rf값 0.35)를 통해 정제한 뒤 product만 모아 LC-MS로 확인한다.

② Cyclization을 위한 hexa-peptide의 합성

2.1 Peptoid의 합성은 광주과학기술원 서지원 교수 연구팀과의 공동연구를 통해 확보하였으며 실제 합성은 광주과학기술원 대학원생인 송다솜 학생이 수행하였다.

2.2 hexa-peptide의 hex-linker 부착

hexa-peptide resin을 100mg (0.124 mmol, 1eq)을 catridge에 옮긴 후 DMF로 Dimethylformamide(DMF) 용매로 30분간 swelling 시킨다. Fmoc 제거를 위해 20% piperidine을 resin에 첨가 후 5분간 shaking한다. 이 과정을 총 3번 반복한다. Fmoc deprotection이 끝나면 DMF와 DCM을 이용하여 resin을 충분히 세척해주는데 세척의 마무리는 DCM으로 한다. pump를 이용하여 resin을 충분히 건조시켜 모래알처럼 만든 뒤에 DMF로 Dimethylformamide(DMF) 용매로 30분간 swelling 시킨다. Swelling 되는 동안 Fmoc-6-aminohexanoic acid (hex-linker), HOBt (coupling reagent)를 상온에 꺼내둔다. 두 시약의 온도가 상온과 같아지면 vial에 Fmoc-6-aminohexanoic acid (131.5mg, 0.372 mmol, 3eq), HOBt (50.27mg, 0.372 mmol, 3eq)을 담고 DMF 4ml을 첨가하여 잘 녹인다. 30분 뒤 이 용액을 resin에 첨가 한 뒤 DIC를 넣고 2시간동안 shaking을 진행한다. 2시간 후에 DMF와 DCM을 이용하여 resin을 충분히 세척해주는데 세척의 마무리는 DCM으로 한다

2.3. hexa-peptide의 형광 부착

hex-linker까지 부착한 resin을 DMF로 Dimethylformamide(DMF) 용매로

30분간 swelling 시킨다. Fmoc 제거를 위해 20% piperidine을 resin에 첨가 후 5분간 shaking한다. 이 과정을 총 3번 반복한다. Fmoc deprotection이 끝나면 DMF와 DCM을 이용하여 resin을 충분히 세척해주는데 세척의 마무리는 DCM으로 한다. pump를 이용하여 resin을 충분히 건조시켜 모래알처럼 만든 뒤에 DMF로 Dimethylformamide(DMF) 용매로 30분간 swelling 시킨다. vial에 5(6)-carboxyfluorescein (139.9mg, 0.372 mmol, 3eq), HOBt (50.27mg, 0.372 mmol, 3eq)을 담고 NMP (N-Methyl-2-pyrrolidone) 4 ml을 넣어 충분히 solid를 녹인다. Swelling이 충분히 되었으면 vial의 용액을 resin에 첨가 후 DIC를 넣은 뒤에 호일로 잘 감싸서 밤새 shaking을 진행한다.

2.4 Cleavage cocktail을 이용한 Resin full cleavage

cleavage cocktail K(90:2.5:2.5:2.5:2.5=trifluoroacetic acid: thioanisole: water: phenol: 1,2-ethanedithiol)(vol/vol)를 깨끗한 vial에 넣는다. 테프론 코르크를 끼운 cartridge에 담긴 Resin은 swelling 하지 않고 cleavage cocktail을 찰랑거릴 정도로 넣는다. 뚜껑을 꽉 닫지 않고 얹은 다음에 500ml 비커에 담은 후 호일로 잘 감싼다. Shaker에서 2시간 동안 반응을 보낸다. 2시간 후 반응이 끝나기 전에 15ml conical tube에 iced-cold diethyl ether를 넣는다. 반응이 끝나면 diethyl ether가 들어있는 conical tube에 반응 용액을 받는다. 남은 용액이 없게 pump를 이용해 resin을 최대한 짜낸다. tube가 부푸는 것을 방지하기 위해 뚜껑을 살짝 연 뒤 원심분리한다. (3500rpm, 10min) 상층액을 덜어낸 뒤 iced-cold diethyl ether 3ml를 첨가하여 다시 원심분리한다. (3500rpm, 4min) 이 과정을 4번 정도 반복한 뒤 product를 N_2 gas를 이용해 후드 안에서 ether를 충분히 날린 뒤 DW를 첨가하여 얼린 뒤 동결건조한다.

③ Valine-DPP-DCA를 이용한 펩타이드 cyclization

3.1 Valine-DPP-DCA를 이용한 펩타이드 cyclization

둥근 flask에 50mM NH_4HCO_3 buffer (pH 8)에 펩타이드가 0.1mM이 되게 녹인다. Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (1.5 eq)를 첨가 후 N_2 gas 아래 room temperature에서 1시간 동안 반응을 보낸다. 2mg/ml solution of Valine-DPP-DCA in DMF를 첨가 후 room temperature에서 3시간동안 반응을 보낸다.

3.2 DMF 제거를 위한 Solid phase extraction

hyper C18에 ACN 3ml을 첨가하여 column을 충분히 적신 후 DW를 3ml 이상 첨가하여 column이 전체적으로 DW로 치환되게 한 뒤 cyclization한 peptide를 loading하고 DW를 다시 흘려보내 충분히 DMF를 씻어내준다. ACN을 첨가하여 column에 있는 product를 받고 rotary evaporator를 통해 ACN을 충분히 제거 후 동결건조한다.

3.3 Preparative HPLC

Preparative HPLC를 이용하여 원하는 물질만 분리해 낸다. cyclic probe를 ACN 1ml에 녹인 후 Nylon filter에 여과시켜 준비한다. 용매로는 0.1% formic acid/ACN과 0.1% formic acid/DW를 사용하였다. 분리한 물질은 -80℃ 냉장고에서 2시간 이상 얼린 후 하루 이상 동결건조하였다.

참고문헌

1. Michael Meltzer, Allosteric Activation of HtrA Protease DegP by Stress Signals during Bacterial Protein Quality Control, Angew. Chem. Int. Ed. 2008, 47, 1332 – 1334
2. Ho Yeon Nam, Activity-Based Probes for the High Temperature Requirement A Serine Proteases, ACS Chem. Biol. 2020,15,9,2346 – 2354
3. Dorota Zuarwa-Janicka, structural insights into the activation mechanisms of human HtrA serine protease, Archives of biochemistry and biophysics , 2017, 621, 6-23
4. Dirk Wildeboer, Characterization of bacterial proteases with a panel of fluorescent peptide substrates, Characterization of bacterial proteases / D. Wildeboer et al. / Anal. Biochem., 2009, 384, 321 – 328
5. Wu L, Chaudhary SC, Atigadda VR,Belyaeva OV, Harville SR, Elmets CA, et al. Retinoid X Receptor Agonists Upregulate Genes esponsible for the iosynthesis of All-Trans-Retinoic cid in Human Epidermis. PLoS ONE , 2016, 11(4):e0153556.
6. Zhiyin Xun, Retinoic acid-induced differentiation increases the rate of oxygen consumption and enhances the spare respiratory capacity of mitochondria in SH-SY5Y cells, Mechanisms of Ageing and Development, 2012, 133, 176 – 1853
7. Haixiao Fang, Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based probes (AfBPs) for profiling of enzymes,Chem. Sci., 2021, 12, 8288-8310

8. Xinting Li, Timothy W. Craven, and Paul M. Levine, Cyclic Peptide Screening Methods for Preclinical Drug Discovery, Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 65(18), 11913-11926
9. Steffen Köcher, Tailored Ahp-cyclodepsipeptides as Potent Non-covalent Serine Protease Inhibitors, Angew.Chem.Int.Ed. 2017, 56, 8555 - 8558
10. Shiyu Chen, Identification of highly selective covalent inhibitors by phage display, Nat. Biotech. 2021, 39, 490-498
11. Dasom Song, Structure - activity relationship analysis of activity-based probes targeting HTRA family of serine proteases, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2023, 87, 2023 12925

Abstract

Development of chemical probes to study protease activity in the pathogenesis of neurodegenerative diseases

Eun Chae Park
Department of Next Generation Applied Sciences
Graduate School of
Sungshin University

In this study, fluorescent substrates and cyclic probes were synthesized to identify and explore various biochemical pathways of HTRA (High Temperature Requirement A serine protease), an important regulator of physiological processes.

First, a fluorescent substrate targeting HTRA was synthesized. In a previous study, we developed an active-based probe that selectively targets HTRA family proteolytic enzymes including HTRA1, HTRA2, and DegP. In this study, we attached 7-amino-4-methyl coumarin to the previously reported tetrapeptide to generate novel fluorogenic substrate.

Second, after differentiating the neuroblastoma cell lines SK-N-SH and SH-SY5Y into neuron-like cells through ATRA treatment, changes in HTRA levels in the two cells were observed through SDS-PAGE using

a second-generation fluorescent probe that selectively targets HTRA. Third, a library of cyclic activity-based probe targeting HTRA was synthesized. Previous studies included non-natural amino acids for optimization, and although this probe has a small mass, high cell permeability and excellent selectivity, non-specific bindings with serum proteins were observed in samples concentrated with high protein concentrations. Cyclodepsipeptide is a type of peptide that exhibits strong inhibitory properties against serine proteases, and strong HTRA inhibitors based on this structure have been reported. In this work, we designed and synthesized cyclic activity-based probes based on the sequences of the reported cyclodepsipeptides to increase sensitivity and stability of HTRA probes.