



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](#)

이 지 연 교수 지도  
석사학위 청구논문

세린 단백질분해효소의 활성 탐색과  
조절을 위한 화학 프로브의 개발

2025

성신여자대학교 대학원  
미래응용과학학과  
한 수 정

세린 단백질분해효소의 활성 탐색과  
조절을 위한 화학 프로브의 개발

이 지 연 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2024년 11월

성신여자대학교 대학원


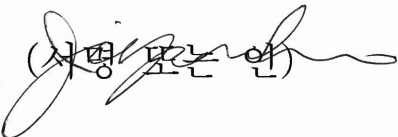

미래응용과학학과

한 수 정

# 인준서

한수정의 석사학위 논문으로 인준함

2024년 12월

심사위원장 채정현 (서명)   
심사위원 이지연 (서명)   
심사위원 임동현 (서명) 

성신여자대학교 대학원

## 논문개요

노인 황반변성은 망막 황반 부위의 진행성 퇴행성 질환으로, HtrA1 세린 단백질분해효소의 과도한 활성화가 주요 발병 기전이다. HtrA1은 세포외 기질을 분해하여 망막 구조를 약화시키고 비정상적인 혈관 신생을 유도해 시력 손실을 초래한다. 본 연구는 HtrA1의 활성을 선택적으로 추적하고 조절할 수 있는 활성기반 프로브를 개발하여 황반변성 진단 및 치료제 개발에 활용할 수 있는 도구를 제시하고자 하였다.

기존 LFLV-DPP 프로브의 한계를 극복하기 위해 테트라펩타이드 구조를 트라이펩타이드로 간소화하고, P1 위치에 valine, P3 위치에 phenylalanine을 고정한 뒤 P2 위치에 소수성 잔기를 도입하여 효소 선택성과 세포 투과성을 개선하였다. SPPS 기법을 통해 합성된 트라이펩타이드 기반 프로브는 기존 프로브보다 세포 투과성이 높고 IC<sub>50</sub> 값에서도 개선된 결과를 보였다. U-87 MG 세포와 HeLa 세포에서 효율적인 활성탐지 성능을 보였으며, 인간 혈청에서도 HtrA1 효소의 활성을 성공적으로 탐지하였다.

또한, 프로브의 구조를 기반으로 트라이펩타이드 형태의 저해제를 설계 및 합성하였으며, 이는 기존 LFLV-DPP 기반 저해제보다 뛰어난 억제 효과를 보였다. 특히, P2 위치에  $\beta$ -cyclopropylalanyl을 도입한 프로브와 저해제가 공통적으로 가장 우수한 IC<sub>50</sub> 값을 기록하였다. 본 연구에서 개발된 트라이펩타이드 프로브와 저해제는 테트라펩타이드 대비 효소 선택성과 억제 효과가 향상되었으며, 노인 황반변성 및 퇴행성 뇌질환의 진단과 치료제 개발에 유용한 가능성을 입증하였다.

다만, 혈청 알부민과의 비특이적 결합 문제를 해결하기 위한 추가 연구가 필요하다. 이러한 연구는 효소 연구와 정밀 의료 기술의 발전에 기여할 강력한 도구를 제공하며, HtrA 단백질분해효소의 선택적 탐지와 조절, 질병 관련 바이오마커 검증 및 치료제 개발을 위한 플랫폼으로 활용될 가능성을 제시한다.

# 목 차

## 논문개요

1. 서론 .....	1
1.1. HtrA 세린 단백질분해효소 패밀리 .....	1
1.2. HtrA 패밀리의 구조적 특징 .....	3
1.3. HtrA1의 기능 .....	7
1.4. HtrA1의 질병 병리학적 역할 .....	9
1.5. HtrA1: 노인 황반변성 치료 타겟으로서의 가능성 .....	13
1.6. 활성기반 프로브 .....	16
1.7. HtrA 활성탐지 프로브에 관한 선행 연구 .....	21
2. 결과 및 고찰 .....	24
2.1. HtrA 활성탐지 트라이펩타이드 프로브의 합성 .....	24
2.1.1. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리의 합성 .....	24
2.1.2. 세포와 재조합 단백질에서의 선택성과 반응성 .....	26
2.1.3. HtrA 효소 활성 분석과 IC <sub>50</sub> .....	32
2.2. HtrA 활성탐지 트라이펩타이드 저해제의 합성 .....	36
2.2.1. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리의 합성 .....	36
2.2.2. Covalent docking을 통한 저해제와 HtrA1 결합 분석 .....	38
2.2.3. HtrA 효소 활성 분석과 IC <sub>50</sub> .....	42
2.2.4. Neutrophil elastase 효소 활성 분석과 IC <sub>50</sub> .....	46
2.2.5. 세포 생존율 측정: MTS 분석 .....	49

2.2.6. 세포 장기 생존 능력 측정: Colony formation 분석	51
<b>3. 결론</b>	<b>54</b>
<b>4. 실험</b>	<b>57</b>
4.1. 실험기기 및 시약	57
4.1.1. 실험기기	57
4.1.2. 시약	58
4.2. 실험방법	59
4.2.1. 트라이펩타이드 저해제의 합성	59
4.2.2. HtrA 형광 기질인 H2-opt의 합성	62
4.2.3. 재조합 단백질 HtrA1의 발현 및 정제	65
4.2.4. 재조합 단백질의 활성탐지	66
4.2.5. 라이브 세포, 배양 배지 및 인간 혈청에서의 단백질의 활성탐지	66
4.2.6. HtrA 효소에 대한 IC <sub>50</sub> 측정	67
4.2.7. Neutrophil elastase 효소에 대한 IC <sub>50</sub> 측정	68
4.2.8. ARPE-19 세포에서의 Neutrophil elastase activity 측정	69
4.2.9. MTS 분석	69
4.2.10. Colony formation 분석	70
4.2.11. Covalent docking	70

## 참고문헌

## ABSTRACT

## 그림 목차

그림 1. 인간 HtrA 패밀리의 도메인 구조 비교 및 HtrA 패밀리 멤버의 촉매 트립신 잔기 주변 서열 정렬 .....	5
그림 2. HtrA1이 세포외 기질(피브로넥틴)을 분해하여 Bruch 막에 미치는 영향 .....	15
그림 3. ABPP의 약물 개발 활용 .....	18
그림 4. 활성기반 프로브의 구성 요소 .....	19
그림 5. HtrA 활성탐지 테트라펩타이드 프로브의 구조-활성 관계 .....	23
그림 6. 3세대 프로브( $1\ \mu\text{M}$ )의 재조합 단백질 HtrA1 및 HtrA2에 대한 선택성과 반응성 .....	29
그림 7. 3세대 프로브( $1\ \mu\text{M}$ )의 U-87 MG, HeLa 세포 내 선택성과 반응성 .....	30
그림 8. 3세대 프로브( $5\ \mu\text{M}$ )의 인간 혈청에서의 선택성과 반응성 .....	31
그림 9. 재조합 단백질 HtrA1과 HtrA2에 대한 트라이펩타이드 프로브의 $\text{IC}_{50}$ 곡선 .....	34
그림 10. compound 6의 최적 도킹 포즈. 도킹 점수 = $-7.631$ .....	41
그림 11. 재조합 단백질 HtrA1(A)과 HtrA2(B)에 대한 트라이펩타이드 acetyl-capped 저해제의 $\text{IC}_{50}$ 곡선 .....	45
그림 12. 재조합 단백질 Neutrophil elastase에 대한 트라이펩타이드 저해제의 $\text{IC}_{50}$ 곡선 .....	47
그림 13. ARPE-19 세포에서의 Neutrophil elastase 활성 분석 .....	48
그림 14. 트라이펩타이드 저해제에 따른 세포 성장 평가 .....	50
그림 15. MDA-MB-231, A549, H460 세포의 colony formation 분석	53

## 표 목차

표 1. HtrA1, HtrA3, HtrA4가 매개하는 경로와 다양한 병리적 상태와의 연관성 .....	12
표 2. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리의 서열 (3세대 프로브) .....	25
표 3. 트라이펩타이드 프로브의 HtrA1, HtrA2에 대한 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) 값 .....	33
표 4. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리의 서열 (1세대 저해제) .....	37
표 5. 트라이펩타이드 저해제의 도킹 점수 .....	39
표 6. 트라이펩타이드 저해제의 HtrA1, HtrA2에 대한 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) 값 .....	44

## 구조식 목차

구조식 1. LFLV-DPP 테트라펩타이드 프로브 .....	23
구조식 2. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리 .....	25
구조식 3. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리 .....	37
구조식 4. 트라이펩타이드 저해제의 대표적인 합성 경로 .....	61
구조식 5. H2-opt 기질의 합성 경로 .....	64

# 1. 서론

## 1.1. HtrA 세린 단백질분해효소 패밀리

HtrA 세린 단백질분해효소(High Temperature Requirement A serine protease) 패밀리는 박테리아에서 스트레스 반응과 단백질 품질 관리를 조절하는 중요한 세린 프로테아제로, 세포 생존과 단백질 대사에 필수적인 역할을 한다[1]. 인간 HtrA 패밀리에는 HtrA1, HtrA2(Omi), HtrA3, HtrA4 네 가지 멤버가 있으며, 이들은 세포 성장, 세포자멸사(apoptosis), 염증을 포함한 다양한 생물학적 과정에 관여한다[2]. HtrA 패밀리의 구성원들은 특정한 기능을 수행하면서도 구조적 유사성을 공유하며, 인체 내에서 중요한 조절 역할을 수행한다.

HtrA1(PRSS11 또는 L56)은 HtrA 패밀리에서 처음 발견된 단백질로 [3, 4], 세포 성장 및 증식을 조절하는 분비 단백질이다. HtrA1은 골관절염(osteoarthritis, OA) 조직에서 과발현되지만 난소암, 흑색종, 변형된 섬유아세포와 같은 악성 종양에서는 발현이 감소한다는 특징을 가진다[3-7]. HtrA1의 과발현 연구 결과에 따르면 이 단백질은 시험관 내외에서 세포 성장을 억제하여 종양 억제 기능을 수행하는 것으로 나타났다[5]. 또한 HtrA1은 뒤센 근위축증(Duchenne muscular dystrophy) 환자의 골격근에서 발현이 증가하며, 근육 병리와 연관성을 시사한다[8].

HtrA2는 Omi라는 이름으로도 알려져 있으며[9, 10], 세포자멸사 조절과 밀접하게 연결되어 있다. 초기 연구에서 HtrA2는 스트레스 반응으로 활성화되는 프로테아제로 발견되었으며, 세포자멸사 단백질 저해제(Inhibitors of Apoptosis Proteins, IAPs)의 활성을 조절하는 기능을 갖는다[11,

12]. HtrA2는 IAP와 결합해 이들의 카스페이스(cysteine-aspartic proteases, caspase) 억제 기능을 차단하고, 이를 통해 세포자멸사를 촉진한다. 이러한 자멸사 활성화는 미토콘드리아로의 수송 및 단백질 절단 과정에서 엄격히 조절되며, 이 과정에서 N-말단 도메인이 제거되어 IAP와의 상호작용이 가능해진다[13].

HtrA3(PRSP)는 연구가 비교적 적게 이루어진 단백질로, HtrA1과 높은 서열 유사성을 보여 두 단백질이 기능적 유사성을 공유할 가능성이 제기되고 있다. HtrA1과 HtrA3의 mRNA 발현 패턴은 여러 인간 조직에서 유사하게 나타나며[14, 15], 이에 따라 HtrA3도 성장 조절이나 종양 억제에 관여할 가능성이 제시되지만, 이를 확인하기 위한 추가 연구가 요구된다[13].

HtrA4는 HtrA 패밀리의 네 번째 멤버로 가장 최근에 보고되었으며, 최초로 유전자은행(GenBank)에 cDNA 서열(AK075205.1)로 등록되었다[13]. HtrA4의 기능에 관한 연구는 아직 부족하지만, 다른 HtrA 프로테아제들과의 구조적 유사성을 바탕으로 세포 스트레스 반응이나 유사한 조절 과정에 관여할 가능성이 제기되고 있다.

박테리아 HtrA(DegP)는 박테리아에서 단백질 품질 유지에 중요한 역할을 한다. DegP는 샤프론(chaperone)과 프로테아제로서 이중 기능을 가지며, 고온과 같은 스트레스 조건에서 변성되거나 손상된 단백질을 인식해 분해한다[16, 17]. 이를 통해 DegP는 해로운 단백질 집합체의 축적을 방지하며, 박테리아 세포의 생존을 보장한다[18]. DegP의 상동체는 다양한 박테리아 종들 사이에 보존되어 있으며, 인간 HtrA 패밀리와 유사한 스트레스 반응 메커니즘을 공유한다.

## 1.2. HtrA 패밀리의 구조적 특징

HtrA 패밀리의 각 멤버는 서로 다른 구조적 특징을 가지고 있으며, 이러한 차이는 각 단백질의 고유한 생물학적 기능에 기여한다.

우선, HtrA1은 시그널 펩타이드(signal peptide), 인슐린 유사 성장 인자 결합 도메인(insulin-like growth factor-binding domain), 카잘형 세린 프로테아제 저해제 도메인(Kazal-type serine protease inhibitor domain), 트립신 유사 프로테아제 도메인(trypsin-like protease domain), 그리고 PDZ 도메인까지 다섯 가지 주요 도메인을 포함하고 있다. 이러한 도메인 구성을 통해 HtrA1은 다양한 생물학적 기능을 수행하며, 특히 PDZ 도메인은 단백질-단백질 상호작용에 중요한 역할을 한다.

HtrA3는 두 가지 이성질체 형태로 존재하는데, 장형(long form)과 단형(short form)으로 나뉜다[19]. 장형 HtrA3는 HtrA1과 거의 동일한 도메인 구성을 가지고 있어 구조적 유사성이 높다. 이에 반해, 단형 HtrA3는 PDZ 도메인을 결여하고 있으며[20], 나머지 시그널 펩타이드, 인슐린 유사 성장 인자 결합 도메인, 카잘형 세린 프로테아제 저해제 도메인, 그리고 트립신 유사 프로테아제 도메인은 장형과 동일하게 유지된다. 이러한 이성질체의 존재는 HtrA3가 다양한 기능을 수행할 수 있는 기초를 제공한다.

HtrA2는 HtrA1 및 HtrA3와는 구조적으로 차별화된 특징을 가지고 있다. HtrA2는 N-terminal(아미노 말단)에 시그널 펩타이드, 인슐린 유사 성장 인자 결합 도메인, 카잘형 세린 프로테아제 저해제 도메인이 없으며[14], 대신 독특한 조절 도메인(regulatory domain, RD)을 포함하고 있다. HtrA2의 이 조절 도메인은 HtrA2가 가지는 특수한 생물학적 역할과 관련이 있으며, 다른 HtrA 멤버들과 구별되는 기능적 특성을 나타내는 데 중요한 역할을 한다[9].

HtrA 단백질의 트립신 유사 프로테아제 도메인을 비교한 결과, 이들 간에는 매우 높은 보존성이 관찰된다. 효소 활성화에 필수적인 촉매 삼합체 (catalytic triad)와 보존된 모티프(GNSGGPL과 TNAHV 등)는 HtrA 패밀리를 전체에서 일관되게 유지된다[14]. 그러나 HtrA2의 단기 형태 (short-form)는 다른 멤버들과 달리 두 번째와 세 번째 촉매 삼합체 잔기 사이에 64개의 아미노산 잔기가 빠져 있다는 구조적 차이를 보인다[14]. 이러한 구조적 차이는 HtrA2와 다른 HtrA 패밀리 멤버들 간의 기능적 차이를 나타내는 중요한 요소로 작용한다.

HtrA 패밀리의 PDZ 도메인 분석에서는 이들 도메인이 특정 펩타이드와의 결합 특이성을 지닌다는 사실이 확인되었다. HtrA1, HtrA2, HtrA3의 PDZ 도메인은 각각 DSRIWWV-COOH, WTMFWV-COOH, FGRWV-COOH 펩타이드와 복합체를 이루며, 이 복합체 구조는 PDB 데이터베이스 [21]에서 HtrA1 (2JOA), HtrA2 (2PZD), HtrA3 (2P3W) 접근 코드로 확인할 수 있다[22, 23]. 이러한 펩타이드들은 마이크로몰 (micromolar)에서 서브마이크로몰 (submicromolar) 수준의 결합 친화도를 보이며, 높은 결합 특이성을 입증한다. 이러한 펩타이드 리간드는 무작위 펩타이드 라이브러리를 통해 M13 박테리오파지의 주요 외피 단백질에 융합된 형태로 처음 확인되었다[24]. 반면 HtrA4의 PDZ 도메인은 아직 구조가 밝혀지지 않았지만, HtrA 패밀리의 PDZ 도메인 간 구조적 유사성을 고려할 때, 이들 간에 펩타이드 인식 메커니즘의 중복성이 있을 가능성이 제기되고 있다.

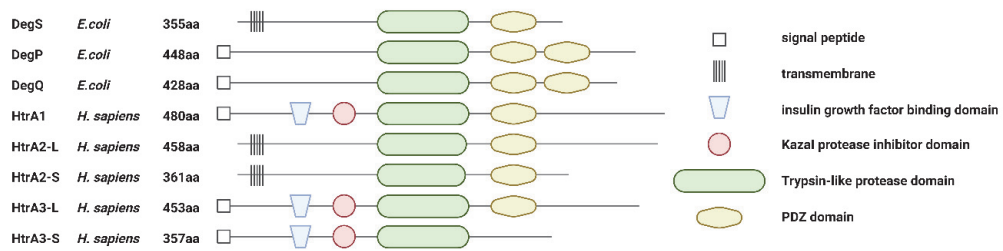


그림 1. 인간 HtrA 패밀리의 도메인 구조 비교 및 HtrA 패밀리 멤버의 촉매 트립신 잔기 주변 서열 정렬 (본 그림은 [14, 19, 20, 25]에서 참고하였음).

인간 HtrA 패밀리의 알려진 모든 멤버인 HtrA1, 두 가지 HtrA2 동형체 (HtrA2-L 및 HtrA2-S), 그리고 두 가지 HtrA3 동형체 (HtrA3-L 및 HtrA3-S)의 도메인 구조 비교를 포함한다.

HtrA1, HtrA2, HtrA3의 발현 패턴을 분석한 결과, 이들 단백질은 특정 조직에서 다르게 분포하거나 부분적으로 중복된 발현 패턴을 보인다. HtrA1은 뇌 관련 조직에서 특히 높은 발현을 보이며, 심장 조직에서는 낮은 발현을 나타낸다. 하지만 대동맥에서는 예외적으로 높은 발현이 관찰된다. HtrA3는 심장과 난소에서 높은 발현을 보이며, 태반에서는 상대적으로 낮은 발현 수준을 나타낸다[14]. HtrA2는 조직 간 비교적 균일한 발현을 보이며, 특히 태아 간과 기타 태아 조직에서 높은 발현을 보여 발달 과정에서 중요한 역할을 수행할 가능성을 시사한다. 성인 조직에서는 HtrA2가 신장, 흉선, 골수, 그리고 갑상선에서 높은 발현을 보이며, 생식 시스템에서는 고환에서 높은 발현을 나타내는 반면, 태반에서는 낮은 발현을 보임으로써 HtrA1 및 HtrA3와 차별성을 보인다. 이러한 발현 차이는 각 HtrA 단백질이 수행하는 생리적 및 병리학적 기능의 특이성을 반영한다[14].

### 1.3. HtrA1의 기능

HtrA1은 단백질 품질 관리와 세포 스트레스 반응에 중요한 역할을 한다. 이 단백질은 세포 내[26-28]와 세포 외 환경[29-34]에서 모두 작용하며, 세포와 조직 건강 유지에 필수적인 다양한 기능을 수행한다. HtrA1의 주요 기능으로는 변형되거나 손상된 단백질의 분해, 세포외 기질 안정성 조절, 그리고 TGF- $\beta$  (Tumor Growth Factor-beta) 신호 전달 경로의 조절이 있다[35].

HtrA1은 세린 프로테아제 도메인을 통해 손상된 단백질이나 응집성 단백질을 분해함으로써 세포를 독성 단백질 축적으로부터 보호한다[4, 9, 36, 37]. 이러한 단백질 분해 작용은 ATP 비의존적 메커니즘을 통해 이루어지며[2, 38], 이는 다른 ATP 의존성 프로테아제와의 차별성을 보여준다. 이 에너지 효율적인 작용 덕분에 HtrA1은 다양한 조직과 생리적 조건에서 효과적으로 기능할 수 있다.

또한, HtrA1은 세포외 기질의 특정 단백질을 분해하여 ECM(extracellular matrix)의 무결성을 유지하고 회전율과 리모델링을 조절한다[31]. 이는 조직 구조와 유연성을 유지하며, 상처 치유, 조직 복구, 혈관 신생 등의 중요한 과정에서 필수적이다[39]. 그러나 HtrA1의 ECM 분해 활성이 과도할 경우, 조직 구조가 불안정해지거나 ECM 분해가 과도하게 이루어져 질병 병리학에 기여할 수 있다[32, 40, 41].

HtrA1은 TGF- $\beta$  신호 전달 경로의 조절에도 중요한 역할을 한다. TGF- $\beta$  단백질이나 그 조절 요소를 분해함으로써 신호 경로의 활성을 조정하며[42-44], 이를 통해 조직 항상성, 면역 조절, 세포 주기 조절 등 다양한 생리적 과정을 지원한다[45]. 이는 암 진행, 섬유증, 혈관 질환 등에서 나타나는 비정상적인 TGF- $\beta$  신호의 조절에 중요한 의미를 가진다.

마지막으로, HtrA1은 세포 스트레스 반응에 참여하여 스트레스 유발로 변형된 단백질을 분해함으로써 손상을 완화하고 단백질 항상성을 유지한다 [42, 46]. 이러한 기능은 노화된 조직과 염증성 환경에서 특히 중요한데, 이와 같은 상황에서는 손상된 단백질의 축적이 더 쉽게 발생한다. 이를 통해 HtrA1은 스트레스 상황에서 세포 생존을 지원하며, 단백질 응집과 관련된 염증 반응을 감소시켜 신경퇴행성 질환 및 자가면역 질환과 같은 병리적 상태에서 중요한 역할을 한다.

#### 1.4. HtrA1의 질병 병리학적 역할

HtrA1은 알츠하이머병(alzheimer's disease, AD)에서 중요한 병리적 단백질인 타우(tau)와  $\beta$ -아밀로이드( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ )의 축적을 관리하는 데 중요한 역할을 한다[36, 47, 48]. 타우 단백질은 과인산화 상태에서 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)을 형성하여 신경세포의 기능을 방해하고 세포사를 유도한다[49]. HtrA1은 타우 집합체를 분해하여 독성을 완화하고 축적을 줄인다.  $\beta$ -아밀로이드에 대해서도 HtrA1은 단량체와 초기 올리고머를 분해하여 더 큰 독성 집합체로의 진행을 억제한다[36, 47, 50, 51]. 그러나 AD의 유전적 위험 요인인 ApoE4(Apolipoprotein E4) 대립 유전자는  $\beta$ -아밀로이드 제거 경로를 방해하고 HtrA1의 발현 및 기능을 저해하여 신경세포 독성을 가중시킨다[52-58]. 따라서 HtrA1의 활성 조절은 AD에서 타우와  $\beta$ -아밀로이드 축적을 줄이고 신경세포를 보호하는 잠재적 치료법으로 주목받고 있다.

HtrA1은 노인 황반변성(age-related macular degeneration, AMD)의 발병에도 중요한 역할을 한다[59-65]. 특히 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium, RPE)와 Bruch 막(Bruch's membrane, BrM)의 안정성을 유지하는 ECM 조절 및 신호 전달 경로에 관여한다[66-68]. ARMS2/HtrA1 유전자 좌의 특정 SNP(single nucleotide polymorphism rs11200638)은 HtrA1 단백질 발현을 증가시키며[37], 이는 BrM의 구조적 무결성을 손상시키고 맥락막 신생혈관(choroidal neovascularization, CNV) 형성을 촉진한다[68, 69]. HtrA1은 ECM 구성 요소인 데코린(decorin), 피브로넥틴(fibronectin), 엘라스틴(elastin) 섬유 등을 분해하여 BrM 안정성을 저하시킨다. 이러한 ECM 분해는 혈관이 BrM을 넘어 망막으로 침투하도록 만들어 CNV를 유도하며, 동시에 ECM 분해 산물이 혈

관 신생을 촉진해 병리학적 상태를 악화시킨다. 또한, HtrA1은 TGF- $\beta$ -ALK5-SMAD2/3(TGF- $\beta$  type 1 receptor(ALK5), Smad2, Smad3 proteins) 신호 경로를 억제하여 혈관 및 신경 조절을 방해하며, 이는 염증 반응과 망막 퇴화를 가속화하여 노인 황반변성 진행에 기여한다[70, 71].

HtrA1은 망막 변성 과정에서도 중요한 역할을 한다[72]. 망막 항상성을 유지하는 ECM 단백질인 TGFBI( transforming growth factor- $\beta$  induced protein)를 분해함으로써 세포와 기질 간 상호작용을 조절하지만, HtrA1의 과활성화는 ECM 불안정성을 초래하며 염증 반응과 세포 스트레스를 촉진하여 망막 변성을 가속화한다.

암 생물학에서도 HtrA1은 암 유형 및 조직 맥락에 따라 상반된 역할을 수행한다[26]. 난소암에서는 TGF- $\beta$  신호를 조절하여 세포 증식과 이동을 억제하고[73], HtrA1 발현 감소는 암의 침습성과 전이를 증가시킨다[74, 75]. 반면 위암에서는 HtrA1이 과발현되어 암 세포의 성장을 억제하는 역할을 한다. 한편, 흑색종에서는 HtrA1 발현 감소가 전이 가능성을 증가시키며[26, 73, 76, 77], ECM 분해를 억제하여 세포 이동성과 침투력을 감소시킨다고 보고되었다[78].

골관절염에서 HtrA1은 연골 ECM 성분인 아그레칸(aggrecan)과 II형 콜라겐을 분해하여 연골 손상을 가속화한다[33, 79, 80]. 또한, HtrA1은 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)과 MMP-3(matrix metalloproteinase-3)을 활성화하여 ECM 추가 분해를 촉진하며, 이는 질환 진행을 악화시킨다[81, 82].

자간전증(pre-eclampsia)에서는 태반 ECM 재구성을 조절하는 HtrA1의 과활성화가 태반의 구조적 불안정성을 초래하며[83, 84], 이로 인해 고혈압과 태아 성장 지연과 같은 주요 증상이 발생한다.

백질뇌병증(progressive multifocal leukoencephalopathy, PML) 및 뇌

소혈관 질환에서는 HtrA1 돌연변이가 ECM 조절 장애를 유발하여 혈관 구조 손상과 혈류 감소를 초래하며 [44], 이는 CADASIL(Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) 및 CARASIL(Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy)과 같은 뇌혈관 질환의 병태생리에 기여한다 [85-91].

표 1. HtrA1, HtrA3, HtrA4가 매개하는 경로와 다양한 병리적 상태와의 연관성 (본 표는 [44]에서 발췌하였음).

Biological site	Pathology	Biological Pathway	HtrAs involved	References
Placenta	Pre-eclampsia	TGF- $\beta$	HtrA1, 3 and 4	[92-95]
Eyes	Age-related macular disorder (AMD)	TGF- $\beta$	HtrA1	[86]
Cerebral blood vessel	Small vessel disease (CARASIL, CADASIL)	TGF- $\beta$ , NOTCH3	HtrA1	[85, 87, 96]
Multiple sites	Cancer	TGF- $\beta$ , NOTCH1	HtrA1, 3 and 4	[97-99]
Neurons	Alzheimer's disease	TGF- $\beta$	HtrA1	[50, 100]
Bones, cartilage	Osteoarthritis	TGF- $\beta$	HtrA1, 3	[101, 102]

## 1.5. HtrA1: 노인 황반변성 치료 타겟으로서의 가능성

노인 황반변성은 중심 시력을 담당하는 황반 부위에 병리적 변화가 발생하여 비가역적인 시력 상실을 초래하는 주요 원인 중 하나이다[65]. 황반은 망막의 특수화된 부위로, 중심 시력의 선명함을 책임지는 원뿔세포가 밀집된 중심 오목(fovea)을 포함한다. 노인 황반변성은 4단계로 구분되며 [103-106], 초기 단계는 망막 색소 상피 이상 없이 작은 드루젠(drusen)이 나타나는 것이 특징이다. 중간 단계에서는 더 큰 드루젠과 RPE의 변화가 관찰되며, 진행된 노인 황반변성은 건성 AMD와 습성 AMD로 나뉜다.

건성 AMD는 RPE와 Bruch 막 아래에 드루젠이 축적되고, 이로 인해 석회화, 위축, 망막 조직의 손실이 발생하는 것이 특징이다[37]. 건성 AMD는 대개 양안에 대칭적으로 나타나며 진행 속도가 느리다. 반면, 습성 AMD는 Bruch 막을 뚫고 맥락막에서 비정상적인 혈관이 자라면서 누출, 삼출, 출혈이 발생하여 빠른 시력 손실을 초래한다. 습성 AMD에는 맥락막 신생혈관과 결절성 맥락막 혈관병증이 포함된다[69]. 맥락막 신생혈관은 전형적인 신생혈관 형성으로 나타나는 반면, 결절성 맥락막 혈관병증(polypoidal choroidal vasculopathy, PCV)는 아시아 인구에서 더 흔히 발견되며 상대적으로 안정적인 병리 경과를 보이는 결절 모양의 혈관 병변을 특징으로 한다[107]. 두 경우 모두 황반의 구조적 무결성을 손상시켜 시력 장애를 유발한다.

iPS-RPE 세포(induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell)에서 고위험 ARMS2/HtrA1 대립유전자를 가진 경우, HtrA1 기질인 EFEMP1(EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1)과 TSP1(thrombospondin 1)의 발현이 증가하며[68, 108], 이는 황반변성 병리 진행에 중요한 영향을 미친다.

EFEMP1은 드루젠 형성, 보체 경로 활성화, 염증 반응 및 TGF- $\beta$  신호 조절을 통해 혈관 신생을 촉진하며, TSP1은 HtrA1에 의해 분해되어 생성된 조각이 내피 세포의 혈관 내강 형성을 유도하여 비정상적인 신생혈관을 유발한다[68]. 이러한 세포외 기질 구성 요소의 증가는 HtrA1의 단백질 분해 활성 증가로 인한 피드백 루프와 관련이 있다.

결과적으로, HtrA1은 ECM 분해와 Wnt(Wingless-type MMTV integration site family) 및 TGF- $\beta$  신호 전달 경로를 통해 노인 황반변성 병리에서 중요한 역할을 수행하며, 이러한 메커니즘은 염증, 비정상적인 신생혈관 형성, 그리고 망막 퇴화를 포함한 황반변성의 주요 병리적 특징을 설명한다. 따라서 HtrA1은 노인 황반변성 치료를 위한 유효한 타겟이 될 수 있음을 의미한다.

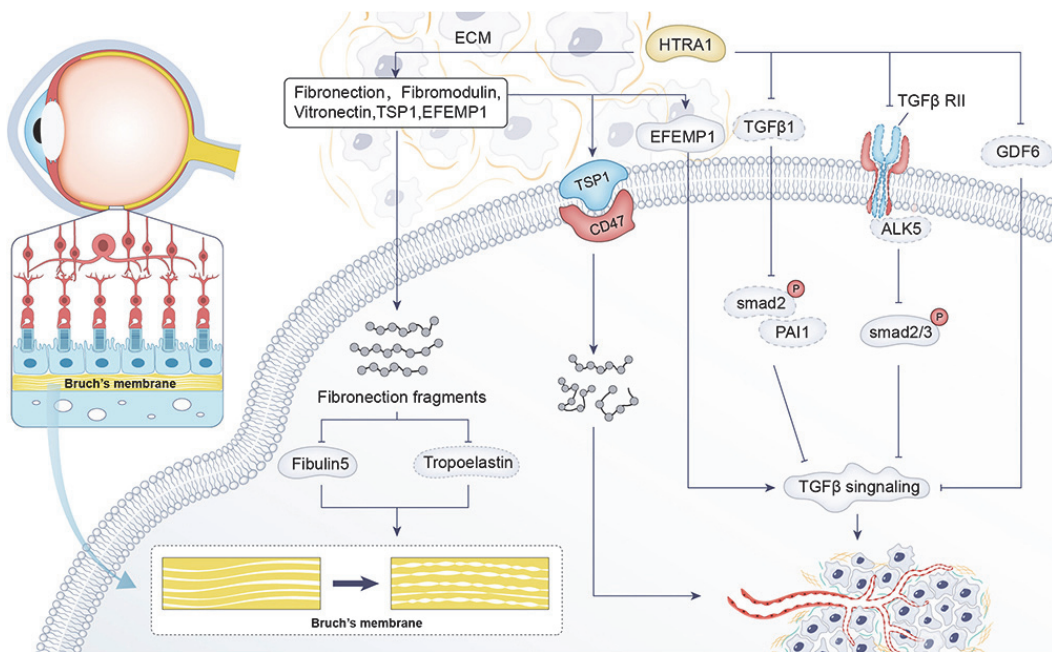


그림 2. HtrA1이 세포외 기질(피브로넥틴)을 분해하여 Bruch 막에 미치는 영향 (본 그림은 [37]에서 발췌하였음).

HtrA1은 세포외 기질(TSP1, EFEMP1)과 TGF- $\beta$  신호 전달 경로(TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  RII(transforming growth factor-beta receptor II), GDF6(growth differentiation factor 6)) 관련 단백질 및 수용체를 통해 혈관 신생에 영향을 미친다.

## 1.6. 활성화 기반 프로브

활성기반 프로브(Activity-Based Probes, ABPs)는 효소의 활성 상태를 선택적으로 탐지하고 연구하기 위해 설계된 특수한 화학 프로브이다. 활성화 기반 프로브는 효소의 활성화된 형태에만 결합하여 비활성화된 형태나 억제된 효소와 구별할 수 있도록 설계되었다. 이는 기존의 기질기반 프로브와 달리 효소의 기질 전환에 의존하지 않고, 효소 활성 부위에 공유 결합을 형성함으로써 효소 활성을 직접 탐지할 수 있게 한다[109].

이러한 특성 덕분에 활성화 기반 프로브는 효소의 동적 조절, 국소화 및 생리학적·병리학적 역할을 이해하는 데 강력한 도구로 사용된다. 특히 단백분해효소(protease)와 같은 다양한 생물학적 과정 및 질병에 관여하는 효소 연구에 있어 활성화 기반 프로브는 뛰어난 도구로 평가받고 있다. 일반적인 항체나 단백질체학 기술은 단백질의 총량을 측정할 수는 있지만, 효소의 활성 상태를 반영하지 못하는 단점이 있다. 반면, 활성화 기반 프로브는 효소의 동적 활성 상태를 직접 탐지할 수 있어 효소 조절 메커니즘 연구에 매우 유용하다[110].

활성기반 프로브는 효소의 특성과 활성 메커니즘에 맞추어 설계되며, 주로 반응성 워헤드(reactive warhead), 표적화 요소(targeting element), 탐지 태그(detection tag)라는 세 가지 주요 구성 요소로 이루어져 있다 [111, 112].

첫 번째 구성 요소인 워헤드는 효소의 활성 부위와 공유 결합을 형성하는 반응성 화학 그룹으로, 표적 효소의 촉매 메커니즘에 따라 설계된다. 예를 들어, 세린 및 트레오닌 단백질분해효소는 플루오로포스폰산(fluorophosphonate)이나 디페닐 포스폰산(diphenyl phosphonate)과 같은 전자 친화적 워헤드를 사용하며, 시스테인 단백질분해효소는 아실옥시메틸

케톤(acyloxymethyl ketone) 및 비닐 설폰(vinyl sulfone) 등 부드러운 전자 친화체를 사용한다. 또한, 메탈로 및 아스파르트산 단백분해효소는 활성화된 물 분자를 사용하는 촉매 메커니즘 특성상 잠재적 전자 친화체(latent electrophiles)를 사용한다.

두 번째 구성 요소인 표적화 요소는 효소의 활성 부위에 특이적으로 결합할 수 있도록 설계된 인식 모티프이다. 주로 기질 유사체나 펩타이드 서열이 사용되며, 효소 특이성을 높이기 위해 라이브러리를 기반으로 최적화가 이루어진다.

세 번째로, 탐지 태그는 형광 염료, 비오틴, 방사성 동위원소 등 다양한 방식으로 효소의 활성탐지를 가능하게 한다. 형광 태그는 실시간 이미징에 적합하며, 비오틴 태그는 효소의 정제와 탐지에 유용하다. 클릭 화학 기반 태그를 활용하면 탐지 과정에서 발생할 수 있는 간섭을 최소화할 수 있다.

또한, 링커(linker)는 선택적으로 워헤드와 태그 사이의 공간적 여유를 제공하며, 선택성을 높이거나 특정 조건에서 분리가 가능하도록 설계될 수 있다.

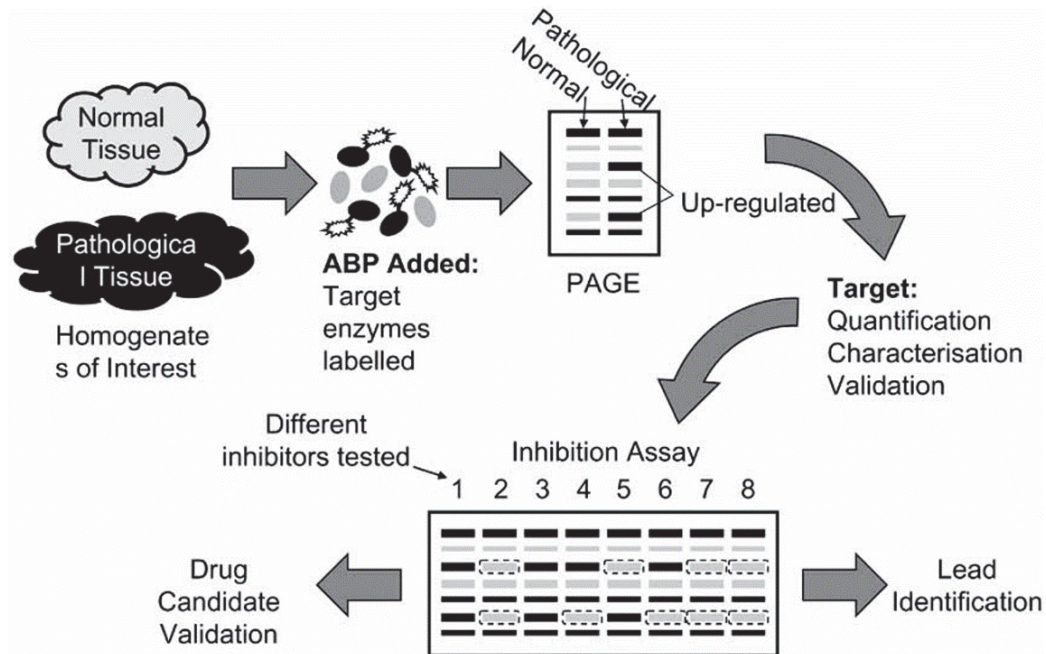


그림 3. ABPP의 약물 개발 활용 (본 그림은 [113]에서 발췌하였음).

ABPP(activity-based protein profiling)를 통해 정상 조직과 비정상 조직의 단백질분해효소 활성 프로파일 차이를 확인할 수 있다. 예를 들어, 태깅 후 PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하여 질병 관련 효소를 식별, 정량화(특히 활성 기준)하고 약물 표적으로 검증할 수 있다. 이를 통해 단백질분해효소 저해제의 효능을 평가하고, 후보 물질의 검증 및 선도 물질 발굴에 활용할 수 있다.

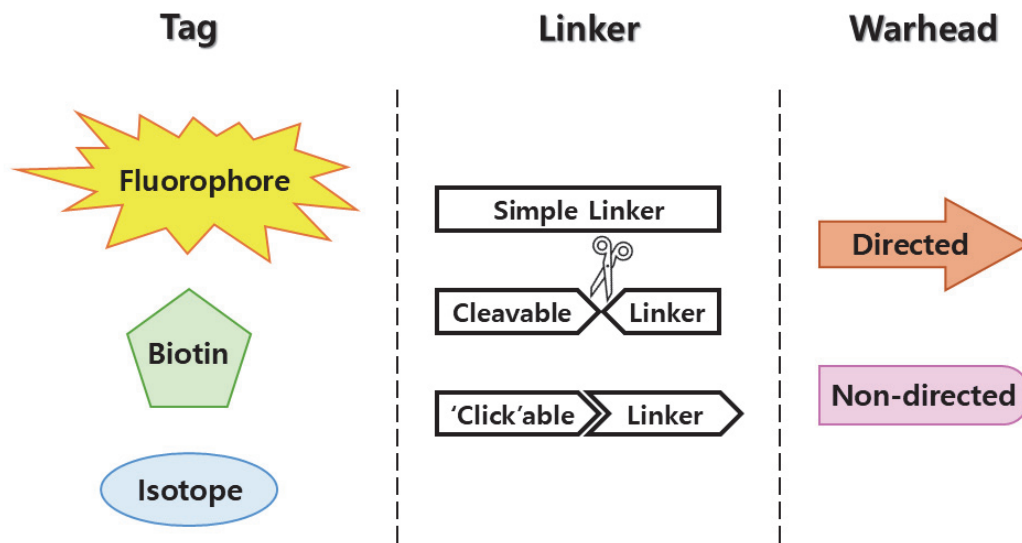


그림 4. 활성기반 프로브의 구성 요소 (본 그림은 [113]에서 참고하였음).  
 활성기반 프로브는 워헤드, 링커, 태그로 구성된다. 워헤드는 효소 활성 부위와 공유 결합을 형성하며, 링커는 용해도 및 절단 특성을 조정하고, 태그는 형광 가시화, 정제, 또는 질량 분석에 활용된다. 이 구성은 유기 합성을 통해 유연하게 설계될 수 있다.

활성기반 프로브는 다양한 활용 분야에서 중요한 역할을 한다. 첫째, 단백질 분해효소 프로파일링에서 활성기반 프로브는 복합 단백질 혼합물에서 활성 상태의 단백질분해효소를 식별하고 정량화하여 질병과 관련된 효소 활성을 규명하는 데 사용된다. 예를 들어, 암 진행에서 시스테인 단백질분해효소 활성을 분석하는 데 활용되었다. 둘째, 라이브 세포 이미징에서는 형광 태그가 포함된 활성기반 프로브를 사용하여 세포와 조직에서 실시간 효소 활성을 시각화할 수 있다. 이를 통해 종양이나 염증 부위에서 효소의 활성을 구체적으로 관찰할 수 있다. 셋째, 활성기반 프로브는 효소 저해제를 평가하는 데도 사용된다. 활성기반 프로브는 저해제와 효소 간 경쟁 결합을 통해 억제 효율성을 측정하며, 물리적으로 정제하기 어려운 효소에도 적용 가능하다. 마지막으로, 활성기반 프로브는 질병 진단 및 치료 표적 검증에서도 중요한 도구로 사용된다. 활성 상태의 효소에 특이적으로 결합함으로써 질병 표적 효소를 검증하고, 이를 바탕으로 치료제 개발을 위한 새로운 전략을 제공한다. 활성기반 프로브는 이러한 강력한 특성과 활용 가능성으로 인해 생물학 연구와 임상 응용 모두에서 핵심적인 도구로 자리 잡고 있다[114].

## 1.7. HtrA 활성탐지 프로브에 관한 선행 연구

선행 연구에서는 HtrA 단백질효소의 활성탐지 및 조절을 목표로 하는 활성기반 프로브가 개발되었다. 이 연구에서는 HtrA1과 HtrA2를 표적으로 하여 효소 활성의 선택성과 효율성을 극대화하는 설계 전략이 적용되었다. 이렇게 개발된 HtrA 선택적 활성기반 프로브를 활용함으로써 세포 내 HtrA1의 활성을 선택적으로 추적할 수 있을 뿐만 아니라, 프로브의 구조-활성 관계(Structure-activity relationship, SAR)를 분석하는 데 유용하게 활용될 수 있었다.

선행 연구에서 개발된 활성기반 프로브는 HtrA 단백질효소의 활성 부위 특성을 기반으로 설계된 펩타이드 서열을 포함하였다. P1 위치에 발린(valine)이나 류신(leucine)을 포함한 펩타이드 서열은 HtrA1과 HtrA2에 대해 높은 선택성을 나타냈으며, P2 및 P3 위치에는 친수성 및 비자연적 아미노산 변형을 도입하여 선택성을 더욱 강화하였다. 연구진은 P1-Val과 P2 위치의 소수성 잔기가 HtrA 효소 활성에 유리하다는 사실을 확인하였으며, P2- $\beta$ -tBu 및 P3-2-Nal 그룹은 HtrA2의 선택성을 향상하는 것으로 나타났다. 또한, P3-Lys는 DegP 선택성을 확보하는 데 필수적임을 밝혀냈다[46].

특히, LFLV-DPP 프로브는 HtrA1에 대해 높은 선택성을 보였으며, HeLa 세포 및 U-87 MG 세포에서 효소의 농도 의존적 라벨링을 성공적으로 수행하였다. 또한, 형광 염료 기반 탐지 태그가 도입되어 실시간 이미징이 가능해졌으며,  $\beta$ -아밀로이드에 노출된 정상세포 모델에서 HtrA1 활성 증가를 명확히 관찰할 수 있었다. 이는 알츠하이머병의 병리적 기전을 탐구하고 조기 진단 바이오 마커로 활용할 가능성을 시사하였다. 한편, HtrA2에 특화된 프로브는 미토콘드리아 타겟팅 그룹과 결합하여

SH-SY5Y 세포 내 미토콘드리아에서도 HtrA2 활성을 성공적으로 표지하였다. SDS-PAGE 분석 결과, LFLV-DPP는 높은 재현성을 보였으며, 비표적 효소 및 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)과의 비특이적 결합이 거의 없었다.[115].

결론적으로, 개발된 프로브는 효소 활성의 정성적 및 정량적 평가에 유용한 도구로 활용될 수 있으며, 효소의 병리적 활성과 관련된 신호를 정밀하게 추적할 가능성을 보여주었다. 이를 통해 새로운 진단 바이오 마커의 발굴과 효소 기능 연구를 위한 강력한 플랫폼을 제시하였다.

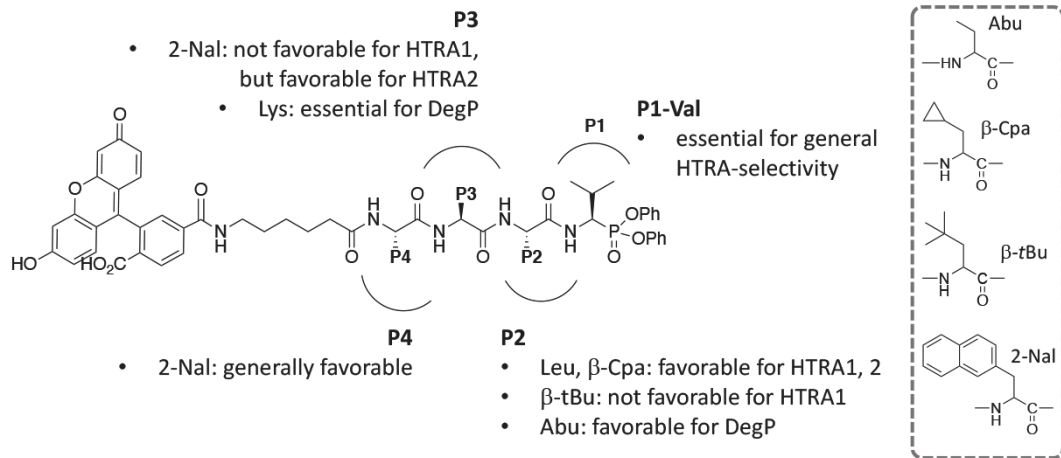
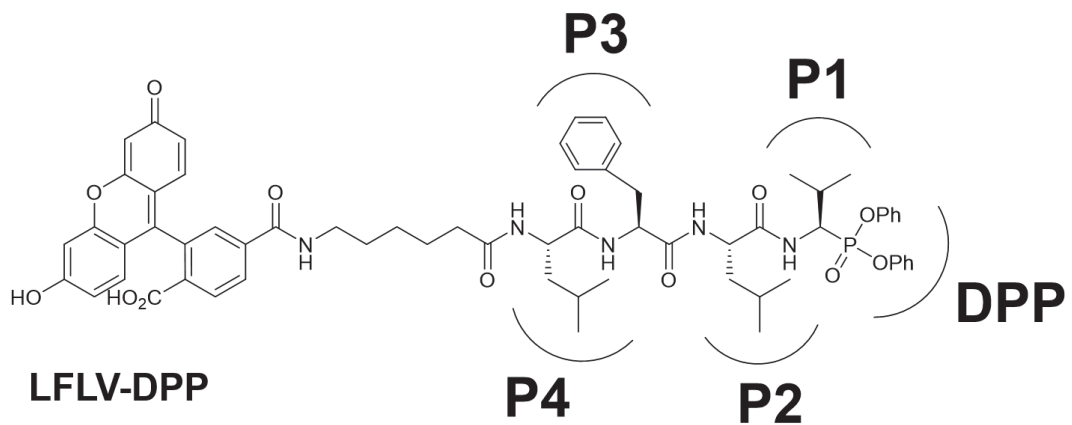


그림 5. HtrA 활성탐지 테트라펩타이드 프로브의 구조-활성 관계 (본 그림은 [46]에서 발췌하였음).

활성기반 프로브의 구조와 각 자리 (P1, P2, P3, P4)의 아미노산 변형이 HtrA1, HtrA2 그리고 DegP에 미치는 선택성과 활성.



구조식 1. LFLV-DPP 테트라펩타이드 프로브.

## 2. 결과 및 고찰

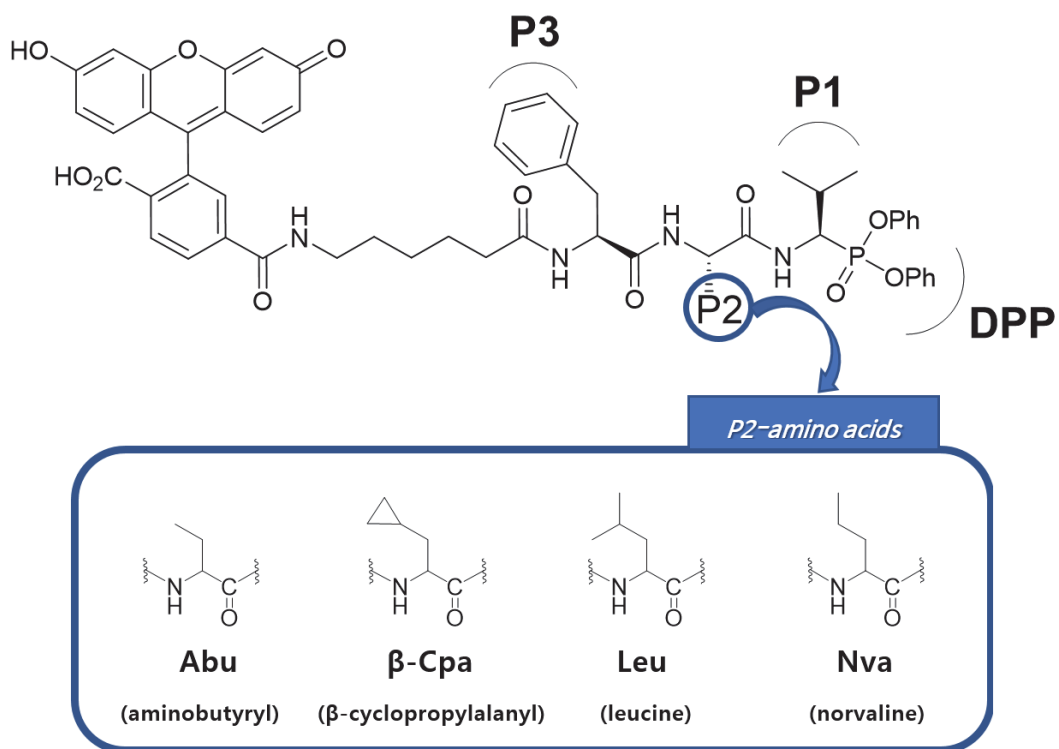
### 2.1. HtrA 활성탐지 트라이펩타이드 프로브의 합성

#### 2.1.1. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리의 합성 (본 라이브러리의 합성은 광주과학기술원과의 공동연구를 통해 송다솜 연구원이 합성하였음)

본 연구에서는 선행 연구를 바탕으로 1, 2세대 프로브 중 HtrA에 선택적이었던 펩타이드 시퀀스를 바탕으로 하여 3세대 프로브를 디자인 및 합성하였다. 특히, P2 위치에서 선택성을 개선하기 위해 Abu(aminobutyryl),  $\beta$ -Cpa( $\beta$ -cyclopropylalanyl), Leu(leucine), Nva(norvaline) 등 다양한 잔기를 포함한 변형 라이브러리를 제작하였다. 이 과정에서 carboxy fluorescein(CF) 태그가 포함된 트라이펩타이드 부분을 표준 고상 펩타이드 결합 기술(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)로 합성하고, 이를 Val-DPP 아미노산과 결합시켰다. 결합 후에는 다시 preparative HPLC 정제를 통해 최종적으로 높은 순도의 프로브를 확보하였다.

표 2. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리의 서열 (3세대 프로브).

Compound	Name	Sequence	Molecular Weight
1	DS-4-173	CF-Ahx-Phe-Abu-Val-DPP	1009.06
2	DS-4-174	CF-Ahx-Phe-β-Cpa-Val-DPP	1035.10
3	DS-4-175	CF-Ahx-Phe-Leu-Val-DPP	1037.12
4	DS-4-176	CF-Ahx-Phe-Nva-Val-DPP	1023.09



구조식 2. 트라이펩타이드 프로브 라이브러리.

P1 자리는 valine, P3 자리는 phenylalanine으로 고정하고, P2 자리만 변형을 준 프로브의 모식도.

### 2.1.2. 세포와 재조합 단백질에서의 선택성과 반응성

세포 환경에서 프로브의 선택성과 반응성을 확인하기 위해, HeLa 및 U-87 MG 세포와 재조합 단백질 HtrA1, HtrA2를 사용하여 프로브 활성 탐지 실험을 수행하였다. 기존에 개발된 LFLV-DPP 프로브를 양성 대조군으로 설정하고, 이를 새롭게 설계된 트라이펩타이드 기반 프로브와 비교하여 평가하였다.

재조합 HtrA1과 HtrA2 단백질에서 두 프로브의 선택성은 큰 차이가 없었으나, 근소한 차이로 인해 트라이펩타이드 기반 프로브 중 compound 2가 HtrA1에서 더 강한 탐지 신호를 나타내며 밴드 두께가 두꺼운 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 재조합 단백질 실험에서 확인된 데이터를 뒷받침하며, 트라이펩타이드 프로브의 반응성이 미세하게 더 우수함을 시사한다.

반면, 세포 수준에서는 두 세포 모델 모두에서 1세대 LFLV-DPP 프로브와 비교하면 트라이펩타이드 기반 프로브의 활성탐지 효율이 확연히 향상된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 트라이펩타이드 프로브가 기존 1세대 프로브보다 세포 환경에서 더 우수한 성능을 발휘하며, 세포 내 투과도가 향상되었음을 입증한다.

특히, U-87 MG 세포에서는 세포 배양액에서 분비된 단백질과의 결합 정도를 관찰하고자 하였는데, 이를 통해 트라이펩타이드 기반 프로브가 기존 LFLV-DPP에 비해 현저히 개선된 성능을 보였다. compound 1은 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)과의 비특이적 결합이 눈에 띄게 줄어든 것으로 확인되었으며, 이는 세포 배양액 내에서도 높은 선택성을 유지할 수 있음을 보여준다. 이러한 결과는 트라이펩타이드 프로브의 설계가 인간 혈청 알부민과의 비특이적 결합 문제를 효과적으로 해결하였음을 입증하며, 세포 환경에서 더 나은 활성탐지 효율과 특이성을 제공한다는 점

에서 중요한 진전을 나타낸다.

이와 같은 결과를 보다 구체적으로 확인하고 분석하기 위해, 추가로 인간 혈청을 이용한 실험과 세포 환경에서의 활성화 실험을 수행하였다. 트라이펩타이드 프로브와 LFLV-DPP를 사용하여 상업적으로 구매한 인간 혈청(human serum) 환경에서 동일한 활성화 실험을 수행하였다. 인간 혈청은 약 100-110 mg/ml에 이르는 고농도의 단백질 혼합물로 구성되어 있으며, 대부분의 분비 효소는 소량으로 존재하기 때문에 특정 효소 활성을 분석하는 데 어려움이 따를 수 있다. 또한, 효소의 단백질 농도와 활성은 표본 획득 방식 및 시점에 따라 다를 수 있다.

실험 결과, 각 혈청 표본(50  $\mu$ g)에 10 ng의 재조합 HtrA1을 첨가했을 때, 모든 프로브는 HtrA1을 명확히 표지하는 것으로 나타났다. 이는 고농도의 단백질 혼합물에서도 활성화 HtrA1을 선택적으로 탐지할 수 있는 프로브의 성능을 입증한다. 반면, HtrA1이 첨가되지 않은 혈청에서는 알부민 밴드만 관찰되었는데, 이는 실험에 사용된 인간 혈청에 자연적으로 존재하는 HtrA1의 양이 탐지하기에 충분하지 않았기 때문으로 보인다.

일반적으로 HtrA1의 혈청 농도는 환자에 따라 약 40-50 ng/ml로 낮고 변동성이 크기 때문에, 실제 환자 표본에서 HtrA1의 활성을 탐지하려면 혈청 표본의 부피를 늘리거나 신호 증폭 기술이 필요할 것으로 보인다. 이를 기반으로, 본 연구는 프로브의 실질적 활용 가능성을 검증하기 위해 표본 전처리 및 신호 증폭 기술을 포함한 후속 연구를 진행할 예정이다. 또한, 이들 프로브의 치료적 응용 가능성을 평가하기 위한 연구도 현재 진행 중이다.

다만, 첫 실험에서 이전에 수행했던 U-87 MG 세포 실험 결과와는 다소 다른 양상이 관찰되었고, 이를 확인하기 위해 인간 혈청 실험을 두 차례에 걸쳐 반복 수행하였다. 두 번째 혈청 실험에서는 트라이펩타이드 프로브의

순서를 바꿔 진행한 결과, 실험마다 변동되는 데이터를 얻었다. 이러한 결과는 비특이적 결합에 기인한 것으로 추정된다.

따라서, 이러한 비특이적 결합의 영향을 최소화하기 위해 프로브 설계와 실험 조건을 더욱 정밀히 조정할 필요가 있다. 이는 향후 연구에서 프로브의 특이성을 강화하고 실험 결과의 재현성을 높이는 중요한 단서를 제공하며, 최적화된 프로브 개발로 이어질 것이다.

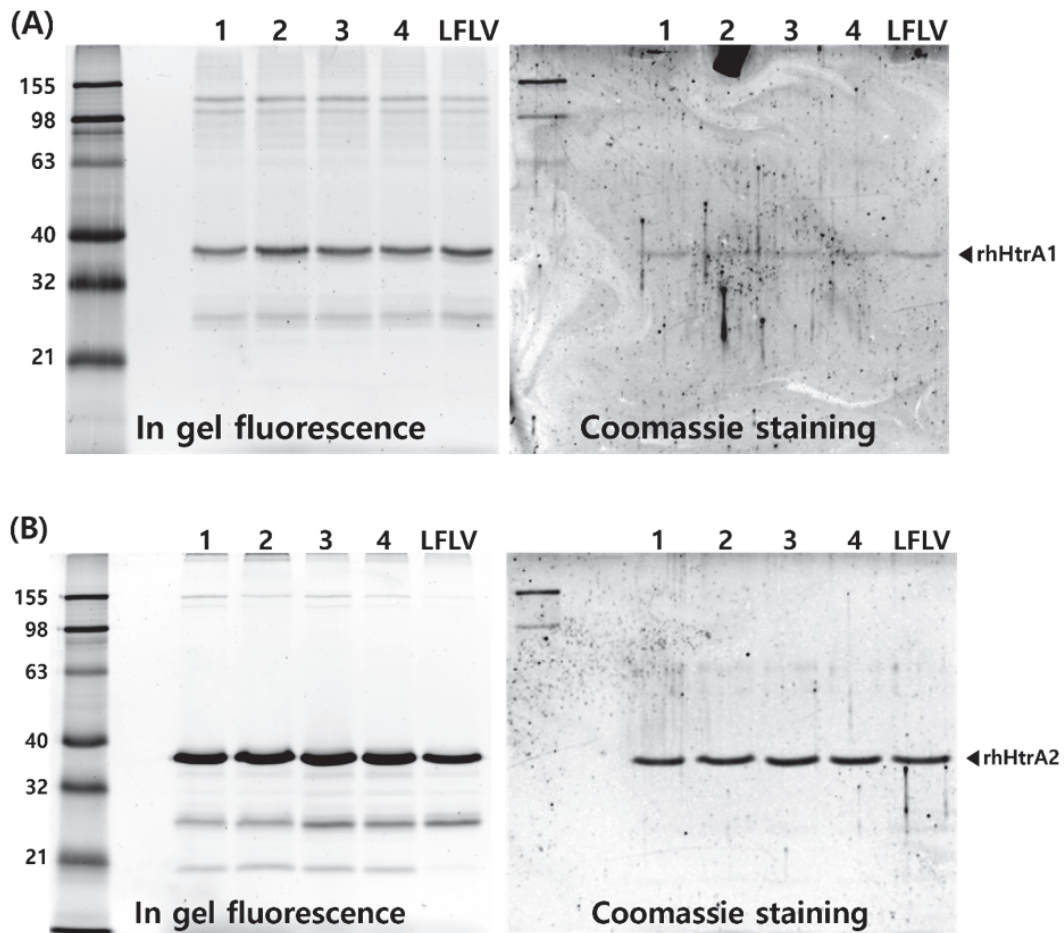


그림 6. 3세대 프로브( $1\ \mu\text{M}$ )의 재조합 단백질 HtrA1 및 HtrA2에 대한 선택성과 반응성.

재조합 단백질 HtrA1과 HtrA2(50ng)에 대한 3세대 프로브( $1\ \mu\text{M}$ )의 선택성 및 반응성. rhHtrA, recombinant HtrA (rhHtrA1,2, 36kDa)

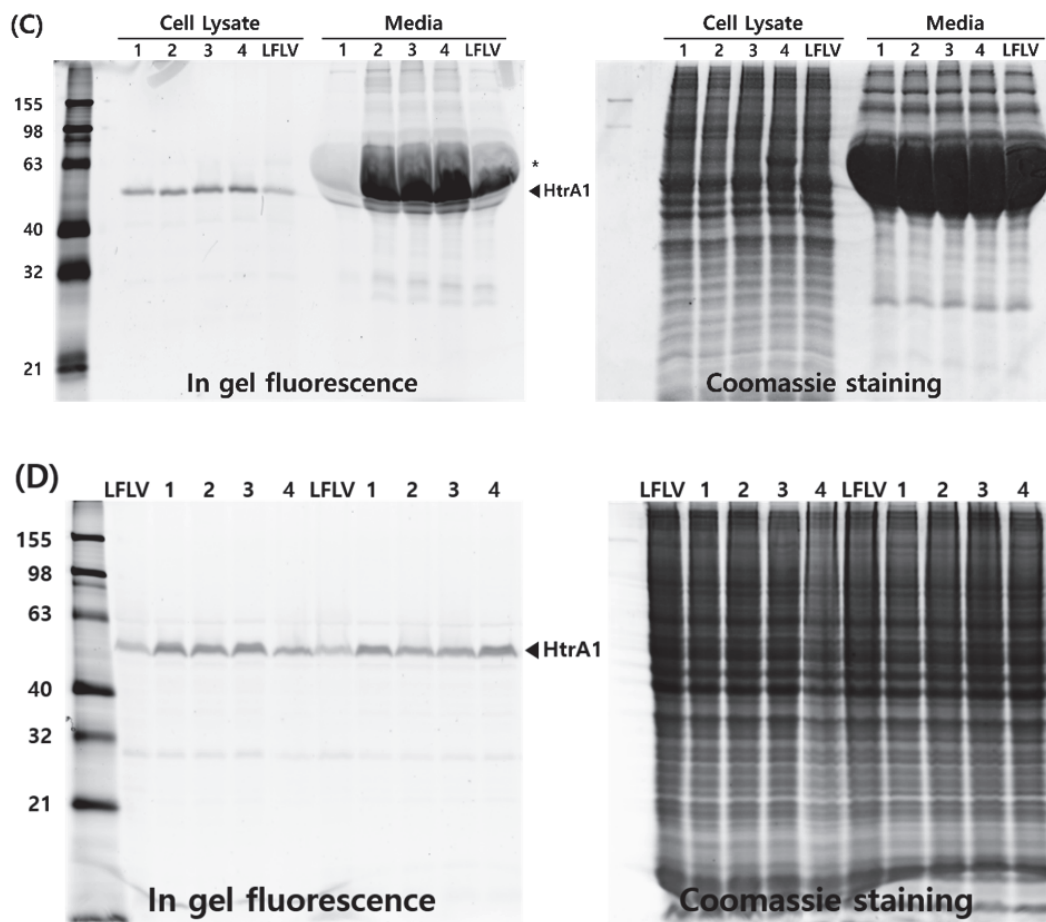


그림 7. 3세대 프로브( $1\ \mu\text{M}$ )의 U-87 MG, HeLa 세포 내 선택성과 반응성. (C) U-87 MG 세포 배양액과 세포 라이세이트에  $1\ \mu\text{M}$  농도의 선택된 프로브로 표지한 후 SDS-PAGE ( $45\ ^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 라벨링). (D) HeLa 세포 라이세이트에  $1\ \mu\text{M}$  농도의 선택된 프로브로 표지한 후 SDS-PAGE ( $45\ ^\circ\text{C}$ 에서 2시간 동안 라벨링). \* 소 혈청 알부민

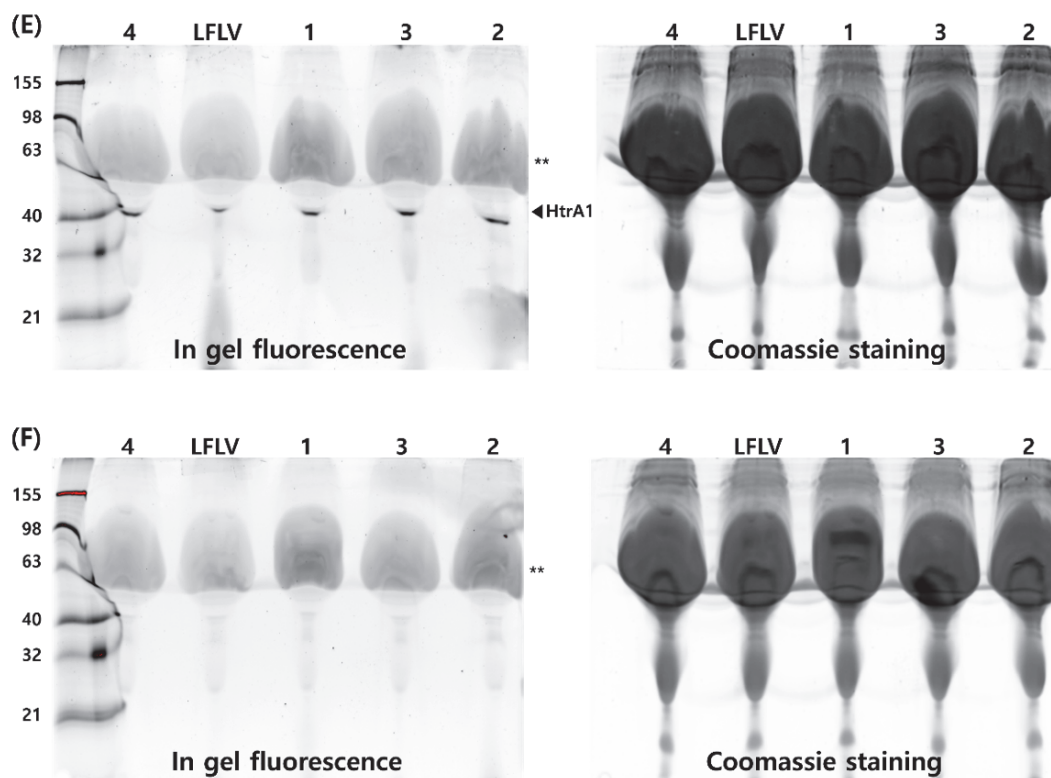


그림 8. 3세대 프로브 ( $5 \mu\text{M}$ )의 인간 혈청에서의 선택성과 반응성.  
 각 프로브 ( $5 \mu\text{M}$ )로 표지된 인간 혈청 ( $50 \mu\text{g}$ ). \*인간 혈청 알부민.

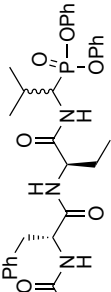
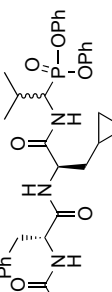
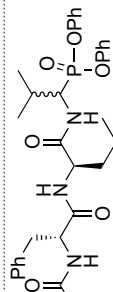
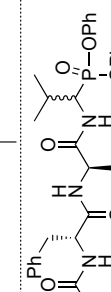
### 2.1.3. HtrA 효소 활성 분석과 IC<sub>50</sub>

프로브의 선택성을 보다 구체적으로 분석하기 위해, 상업적으로 사용 가능한 형광 기질인 H2-opt(H2-optimal substrate)를 이용하여 IC<sub>50</sub> 값을 측정하였다. 이를 통해 재조합 HtrA 및 세포성 HtrA1에 대해 반응성을 보였던 트라이펩타이드 프로브를 선택적으로 평가하였다.

결과적으로, compound 2 (P2-β-Cpa)는 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각 0.69 μM 및 1.4 μM의 가장 강력한 억제 효과를 보이며, 우수한 선택성을 입증하였다. 반면, P2 자리를 류신(leucine)으로 대체한 compound 3는 HtrA1에 대해 1.8 μM, HtrA2에 대해 9.5 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내며 두 효소 간 억제 효과에서 큰 차이를 보였다. 이는 아미노산의 개수를 감소시키더라도 효소 간 선택성을 강화할 가능성을 보여준다.

따라서, 트라이펩타이드 프로브는 기존 LFLV-DPP에 비해 HtrA 효소에 대해 더 우수한 억제 활성을 나타냈으며, compound 2와 3 모두 새로운 설계 전략을 기반으로 효소 선택성과 효율성에서 유망한 도구로 평가되었다. 이러한 결과는 HtrA 연구 및 질병 진단에서 트라이펩타이드 프로브의 활용 가능성을 더욱 확장한다.

표 3. 트라이펩타이드 프로브의 HtrA1, HtrA2에 대한 IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) 값

3 <sup>rd</sup> gen Compound	Name	Sequence	Structure	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
				HtrA1	HtrA2
1	<b>DS-4-173</b>	CF-Ahx-Phe-Abu-Val-DPP		2.6	1.9
2	<b>DS-4-174</b>	CF-Ahx-Phe- $\beta$ -Cpa-Val-DPP		0.69	1.4
3	<b>DS-4-175</b>	CF-Ahx-Phe-Leu-Val-DPP		1.8	9.5
4	<b>DS-4-176</b>	CF-Ahx-Phe-Nva-Val-DPP		3.3	5.7

IC<sub>50</sub> 값은 세 번의 독립적인 실험에서 반복하여 측정되었으며, 평균값  $\pm$  표준 편차로 보고되었다.

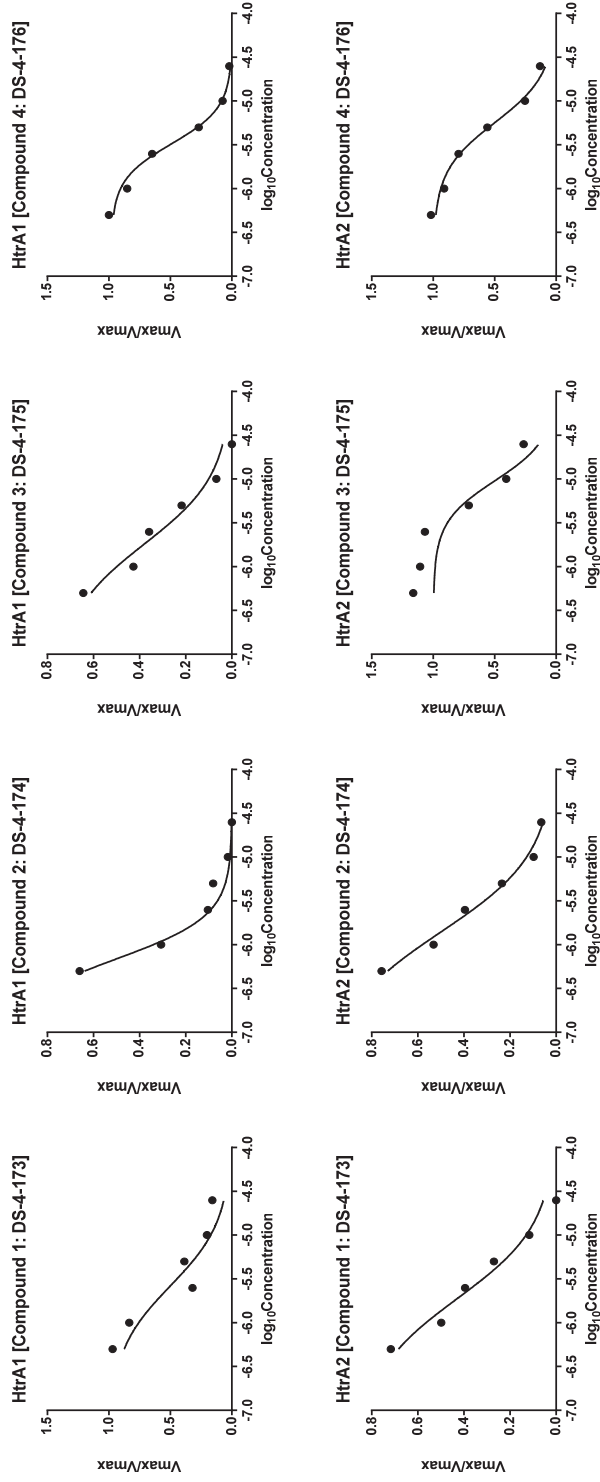


그림 9. 재조합 단백질 HtrA1과 HtrA2에 대한 트라이펩타이드 프로브의 IC<sub>50</sub> 곡선.

요약하자면, 트라이펩타이드 프로브는 기존의 LFLV-DPP 프로브에 비해 효소 선택성과 반응성에서 개선된 성능을 보여주었다. 특히, P2 위치의 변형을 통해 각 프로브가 HtrA1과 HtrA2에 대해 서로 다른 반응성을 나타냈다. Compound 2는 HtrA1과 HtrA2 모두에서 가장 강력한 억제 효과( $IC_{50}$   $0.69 \mu M$  및  $1.4 \mu M$ )를 보이며, 선택성과 억제 효율성에서 우수성을 입증하였다.

또한, P2 자리에 류신을 도입한 compound 3는 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각  $1.8 \mu M$  및  $9.5 \mu M$ 의  $IC_{50}$ 값을 보이며, 두 효소 간 억제 효과에서 큰 차이를 나타냈다. 이는 효소 간 선택성을 강화할 가능성을 보여주는 결과로, 류신과 같은 자연 아미노산을 기반으로 한 설계의 중요성을 시사한다.

세포 실험에서도 트라이펩타이드 프로브는 LFLV-DPP에 비해 HeLa와 U-87 MG 세포에서 더욱 강력한 활성탐지 효율을 나타냈으며, compound 1은 인간 혈청 알부민과의 비특이적 결합이 현저히 감소하여, 복잡한 단백질 환경에서도 높은 선택성을 유지하며 효소 활성을 탐지할 가능성을 보여주었다.

혈청 실험 결과, 트라이펩타이드 프로브는 농도 의존적으로 HtrA1을 성공적으로 활성을 탐지했으나, 자연적으로 존재하는 HtrA1의 농도가 낮아 신호 증폭 기술이나 표본 전처리와 같은 추가적인 접근이 필요할 수 있음을 시사했다. 이는 트라이펩타이드 프로브가 고복잡도 환경에서도 효소 특이적 탐지가 가능하며, 임상적 활용 가능성을 보이는 도구임을 입증한다.

다만, 실험 반복 과정에서 세포 실험과 달리 비특이적 결합이 일부 관찰되었으며, 이를 해결하기 위한 프로브 설계와 실험 조건의 최적화가 향후 연구에서 중요한 과제로 남아 있다. 이러한 결과는 트라이펩타이드 프로브가 효소 연구 및 질병 진단 분야에서 강력한 도구로 활용될 수 있으며, 지속적인 최적화를 통해 실질적 응용 범위를 더욱 확대할 수 있을 것이다.

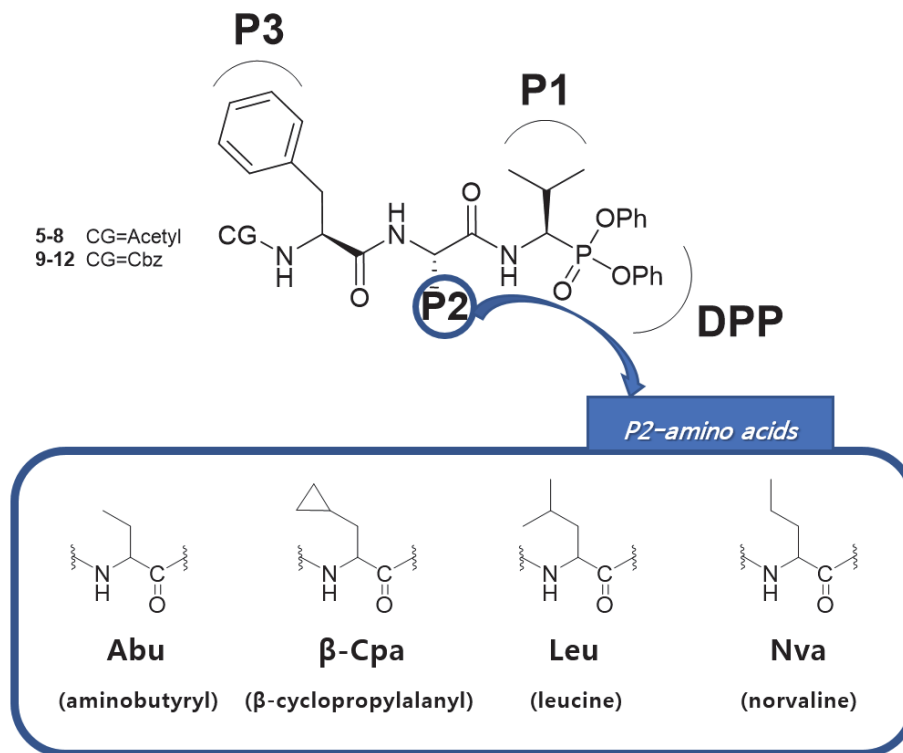
## 2.2 HtrA 활성탐지 트라이펩타이드 저해제의 합성

### 2.2.1. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리의 합성

본 연구에서는 3세대 프로브 서열을 바탕으로 하여 3세대 프로브를 디자인 및 합성하였다. 특히, P2 위치에서의 프로브의 선택성이 저해제에서도 같은 양상으로 관찰되는지 보려고 노력했다. 이 과정에서 Cbz 혹은 acetyl capping group이 포함된 트라이펩타이드 부분을 표준 고상 펩타이드 결합 기술(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)로 합성하고, 이를 Val-DPP 아미노산과 결합했다. 결합 후에는 다시 preparative HPLC 정제를 통해 최종적으로 높은 순도의 프로브를 확보하였다.

표 4. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리의 서열 (1세대 저해제).

Compound	Name	Sequence	Molecular Weight
5	SJ-2-89	Ac-Phe-Abu-Val-DPP	579.63
6	SJ-2-52	Ac-Phe-β-Cpa-Val-DPP	605.67
7	SJ-2-92	Ac-Phe-Leu-Val-DPP	607.69
8	SJ-2-94	Ac-Phe-Nva-Val-DPP	593.66
9	SJ-2-58	Cbz-Phe-Abu-Val-DPP	671.73
10	SJ-2-74	Cbz-Phe-β-Cpa-Val-DPP	697.77
11	SJ-2-70	Cbz-Phe-Leu-Val-DPP	699.78
12	SJ-2-73	Cbz-Phe-Nva-Val-DPP	685.76



구조식 3. 트라이펩타이드 저해제 라이브러리.

P1 자리는 valine, P3 자리는 phenylalanine으로 고정하고, CG(Capping group)와 P2 자리만 변형을 준 저해제의 모식도.

### 2.2.2. Covalent docking을 통한 저해제와 HtrA1 결합 분석

트라이펩타이드 기반 저해제 8종의 도킹 점수를 비교 분석하여, 앞서 평가한 IC<sub>50</sub> 값과의 상관관계를 확인하고, 유사한 결과를 보이는 저해제가 있는지 탐색하였다. 도킹 점수는 저해제와 단백질 간 결합 친화도를 정량적으로 나타내며, 점수가 낮을수록 더 강력한 결합력을 나타내는 저해제로 평가되었다.

도킹 점수 분석 결과, 저해제들의 결합 친화도를 나타내는 점수는 compound 8, 6, 10, 7, 11, 9, 5, 12 순서로 나타났다. Acetyl-capped 저해제만을 비교했을 때는 compound 8, 6, 7, 5 순서로 점수가 높게 평가되었다. 하지만 이 결과를 IC<sub>50</sub> 값과 비교했을 때 약간의 차이가 있었다. IC<sub>50</sub> 결과에서 HtrA1에 대한 억제 능력은 compound 6, 8, 5, 7 순서로 나타났으며, 특히 compound 6이 도킹 점수와 IC<sub>50</sub> 모두에서 우수한 성능을 보였다. 도킹 점수는 저해제가 단백질에 결합하는 안정성을 예측하는 지표로, 실험적으로 측정된 IC<sub>50</sub> 값과 일치하는 경향을 보인 것은 compound 6이 매우 효과적인 저해제로 작용할 가능성을 뒷받침한다.

표 5. 트라이펩타이드 저해제의 도킹 점수.

Compound score 순위	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-7.396	-7.631	-7.480	-7.664	-7.423	-7.554	-7.448	-7.381
2	-7.082	-7.533	-7.430	-7.171	-6.577	-7.519	-7.348	-7.115
3	-7.054	-7.406	-7.234	-6.789	-6.550	-7.237	-6.861	-6.840
4	-6.931	-7.225	-7.150	-6.721	-6.295	-7.131	-6.837	-6.732
5	-6.876	-7.141	-7.076	-6.682	-6.191	-6.850	-6.794	-6.695
6	-6.866	-7.032	-7.053	-6.645	-6.172	-6.839	-6.572	-6.645
7	-6.607	-6.722	-6.556	-6.505	-5.703	-6.824	-6.403	-5.936
8	-6.098	-6.550	-6.513	-6.467	-5.491	-6.747	-6.363	-5.927
9	-5.460	-6.067	-6.427	-6.318	-5.394	-6.398	-6.168	-5.885
10	-5.455	-5.849	-6.130	-5.862	-4.899	-6.319	-6.155	-5.466
11	-5.445	-5.743	-6.058	-5.393	-4.822	-6.311	-6.034	-5.413
12	-5.346	-5.421	-5.654	-5.276	-4.735	-5.970	-5.792	-5.025
13	-5.058	-5.297	-5.317	-5.105	-4.437	-5.765	-5.664	-4.825
14	-5.048	-5.016	-5.228	-4.691	-4.027	-5.361	-4.973	-4.369
15	-4.692	-4.754	-4.872	-4.387	-4.005	-5.234	-4.714	-2.624
	-6.094	-6.359	-6.412	-6.112	-5.515	-6.537	-6.275	-5.792

Compound 6의 결합 메커니즘과 구조적 특징을 보다 구체적으로 이해하기 위해 covalent docking 분석을 수행하였으며, 이를 통해 Compound 6이 HtrA1(PDB: 3NZI)의 활성 부위에서 Ser328과 공유 결합을 형성하며 효소 억제를 유도한다는 결과를 확인하였다.

포즈 분석 결과, 효소와의 결합 특이성을 결정짓는 핵심 요소가 P1 부위와 밀접하게 관련된 것으로 나타났다. P1 부위는 효소의 S1 포켓과 강하게 상호작용하여 결합의 정합성과 친화도를 극대화하였다. 반면, P2 부위는 예상과 달리 효소 결합 부위의 바깥쪽으로 돌출되어 상대적으로 낮은 중요성을 보였으며, Asp250과 약한 상호작용을 나타내어 residue 크기의 영향을 받는 것으로 분석되었다. P3 부위는 Val347을 포함하는 루프 구조와 안정적으로 상호작용하여 효소의 활성형 구조 유지에 기여하였다. Acetyl capping group은 효소 활성 부위 외곽의 잔기들과 약한 소수성 상호작용을 통해 복합체 안정성을 보조했으나, 결합 친화도에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 특히, diphenyl phosphonate 위헤드는 활성 부위의 주요 잔기인 Ser328과 직접 공유 결합을 형성하며, 주변의 소수성 잔기들과의 상호작용을 통해 강력한 억제 효과를 발휘하였다.

이러한 구조적 특징은 compound 6이 HtrA1의 활성 부위에 선택적으로 결합하며 효소 활성을 억제할 수 있음을 보여준다. 이를 기반으로 한 합성과 분석을 통해 최적의 저해제 설계를 목표로 하고자 하였다.

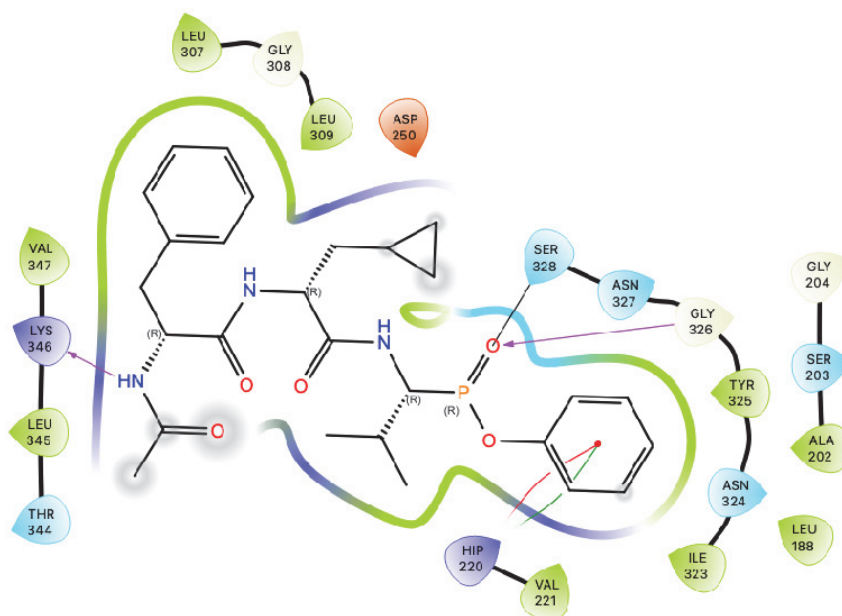
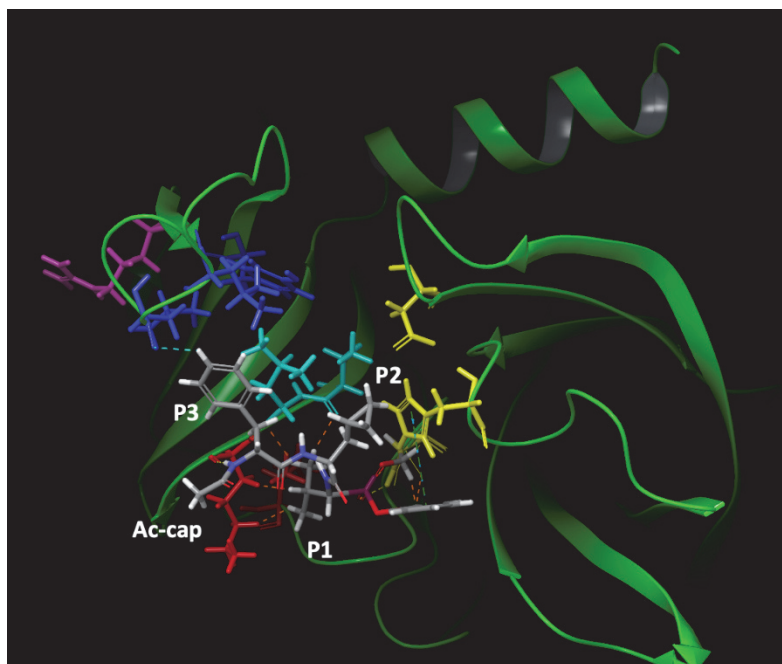


그림 10. compound 6의 최적 도킹 포즈. 도킹 점수 = -7.631.

### 2.2.3. HtrA 효소 활성 분석과 IC<sub>50</sub>

저해제의 선택성과 억제 효율성을 보다 구체적으로 분석하기 위해 상업적으로 사용 가능한 형광 기질인 H2-opt를 활용하여 IC<sub>50</sub> 값을 측정하였다. 이 실험을 통해 재조합 HtrA 및 세포성 HtrA1에 대해 반응성을 보였던 트라이펩타이드 프로브를 기반으로 설계된 저해제들을 선택적으로 평가하였다.

분석 결과, compound 6 (P2-β-Cpa)는 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각 3.66 μM 및 9.98 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내며, 가장 강력한 억제 효과를 보였다. 특히, Ac-capped 저해제 (compound 5-8)가 전반적으로 Cbz-capped 저해제 (compound 9-12)보다 우수한 성능을 보였으며, 이는 capping group의 설계가 저해제의 용해도 및 효율성에 큰 영향을 미친다는 점을 시사한다. 반면, Cbz-capped 저해제는 용해도가 낮아 IC<sub>50</sub> 값에서 큰 변동이 발생하였으며, 최적화를 시도했음에도 50 μM 이상의 IC<sub>50</sub> 값을 보였다.

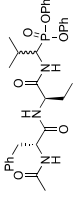
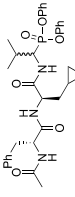
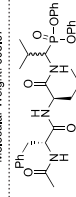
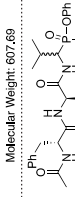
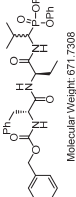
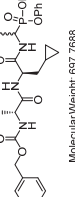
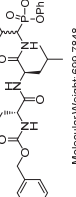
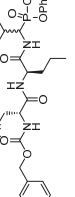
P2 자리를 류신으로 대체한 compound 7은 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각 11.0 μM과 10.9 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내며, 두 효소 간 억제 효과의 차이가 크지 않았다. 이는 효소 간 선택성을 확보하기 어려울 수 있음을 나타낸다. 유사하게, compound 5 또한 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각 11.0 μM과 10.9 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 보이며 비슷한 경향을 나타냈다. 그러나 compound 8은 HtrA1에 대해 8.02 μM, HtrA2에 대해 23.1 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 보여, 두 효소 간 억제 효과에서 명확한 차이를 드러내어 선택적 저해제로서의 가능성을 확인시켰다.

한편, 기존의 테트라펩타이드 저해제 LFLV-DPP는 HtrA1과 HtrA2에 대해 각각 7.6 μM/5.85 μM 및 12 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. 이를 비교했

을 때, 트라이펩타이드 기반 저해제들은 기존 LFLV-DPP보다 HtrA 효소에 대해 더 우수한 억제 활성을 나타냈으며, 특히 compound 5-8은 새로운 설계 전략을 바탕으로 효소 선택성과 효율성에서 유망한 결과를 보였다.

이러한 결과는 HtrA 효소에 관한 연구와 질병 진단에서 트라이펩타이드 저해제의 활용 가능성을 더욱 확장할 기회를 제공하며, 향후 효소 선택성을 강화하고 효율성을 개선한 저해제 설계를 통해 HtrA 관련 질환 치료제 개발에 중요한 이바지를 할 수 있음을 시사한다.

표 6. 트라이펩타이드 저해제의 HtrA1, HtrA2에 대한 IC<sub>50</sub>( $\mu$ M) 값.

Series	Name	Sequence	Structure	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
				HtrA1	HtrA2
Ac-capped	SJ-2-89	Ac-Phe-Abu-Val-DPP	 Molecular Weight: 579.63	9.20	11.6
	SJ-2-52	Ac-Phe- $\beta$ -Cpa-Val-DPP	 Molecular Weight: 605.67	3.66	9.98
	SJ-2-92	Ac-Phe-Leu-Val-DPP	 Molecular Weight: 607.69	11.0	10.9
	SJ-2-94	Ac-Phe-Nva-Val-DPP	 Molecular Weight: 593.66	8.02	23.1
Cbz-capped	SJ-2-58	Cbz-Phe-Abu-Val-DPP	 Molecular Weight: 671.7308	7.52	> 50
	SJ-2-74	Cbz-Phe- $\beta$ -Cpa-Val-DPP	 Molecular Weight: 697.7688	> 50	> 50
	SJ-2-70	Cbz-Phe-Leu-Val-DPP	 Molecular Weight: 689.7848	> 50	> 50
	SJ-2-73	Cbz-Phe-Nva-Val-DPP	 Molecular Weight: 685.7578	9.66	> 50

IC<sub>50</sub> 값은 세 번의 독립적인 실험에서 반복으로 측정되었으며, 평균값  $\pm$  표준 편차로 보고되었다.

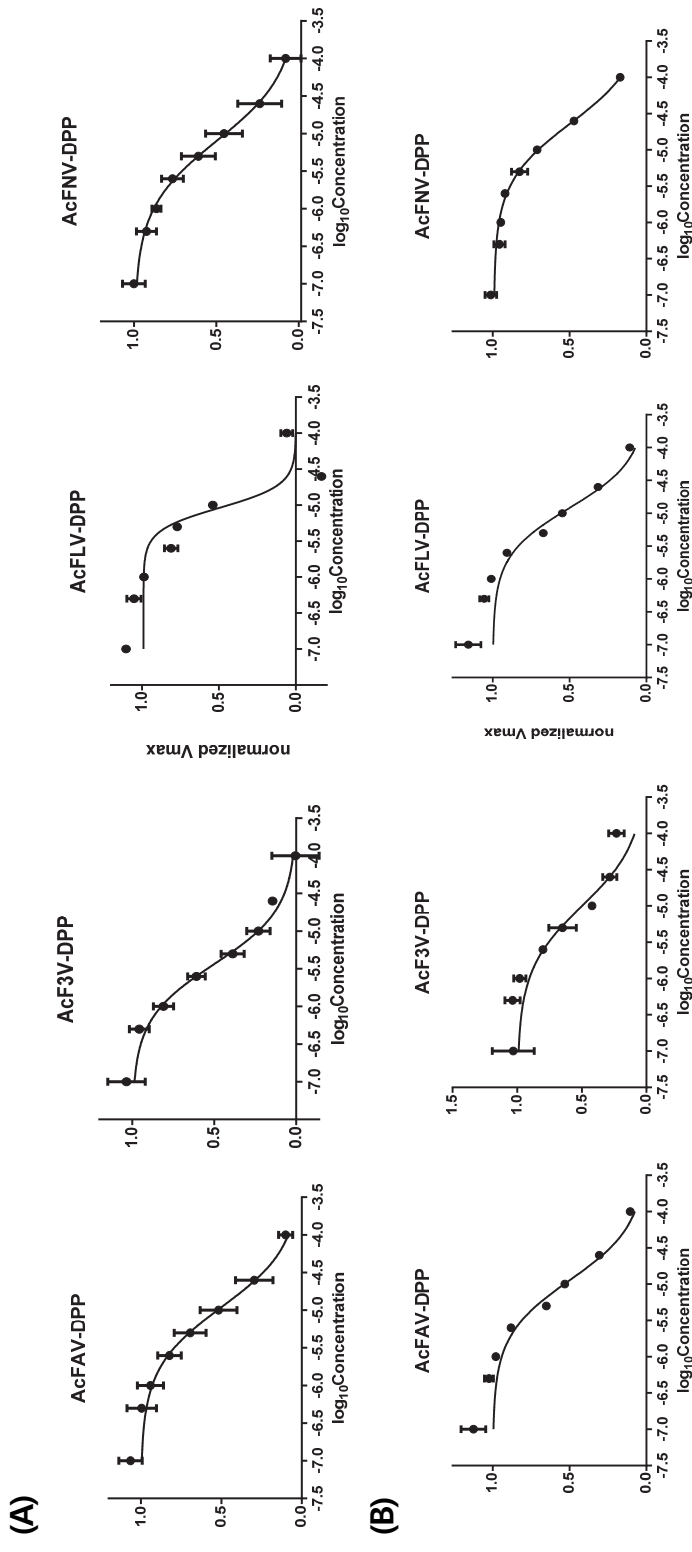


그림 11. 재조합 단백질 HtrA1(A)과 HtrA2(B)에 대한 트라이펩타이드 acetyl-terminated DPP, compound 5; AcFAV-DPP, compound 6; AcF3V-DPP, compound 7; AcFLV-DPP, compound 8.

#### 2.2.4. Neutrophil elastase 활성 분석과 IC<sub>50</sub>

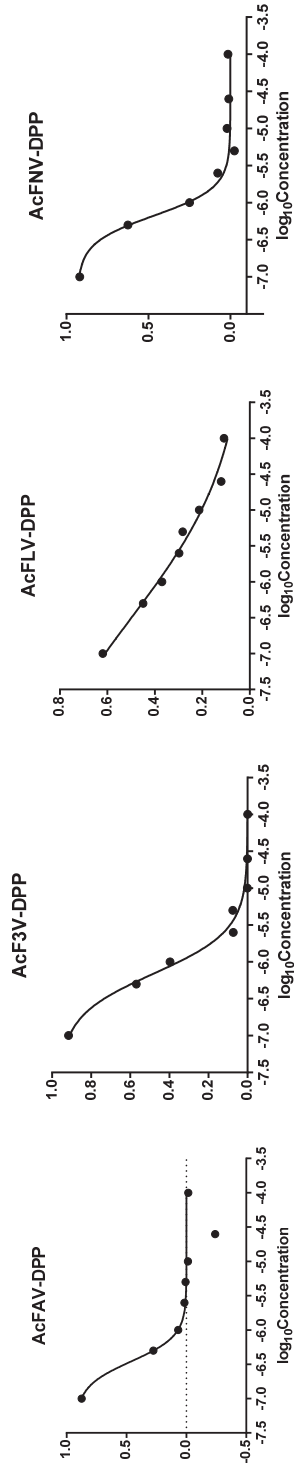
다양한 protease에 대한 저해제의 선택성을 확인하기 위해 neutrophil elastase를 대상으로 IC<sub>50</sub> 값을 측정하였다. Neutrophil elastase에 대한 억제 효과는 펩타이드 P1 위치에 발린이 존재할 경우 강력한 결합을 유도하는 것으로 알려져, 이를 기반으로 억제 효과를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이를 위해 제조합 단백질을 활용한 IC<sub>50</sub> 실험을 수행한 결과, compound 5-8은 모두 소수점 단위의  $\mu\text{M}$  값으로 neutrophil elastase에 대해서도 상당한 억제 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

특히, HtrA와의 IC<sub>50</sub> 값에서도 가장 뛰어난 성능을 보였던 compound 6은 neutrophil elastase에 대해서도  $0.3132\mu\text{M}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내며, 가장 강력한 억제 효과를 보였다. Compound 5는  $0.3489\mu\text{M}$ , compound 7은  $0.6938\mu\text{M}$ , compound 8은  $0.6690\mu\text{M}$ 의 값을 나타내었다. 한편, Cbz-capped 저해제(compound 9-12) 중에서는 compound 11만 측정할 수 있었으며,  $0.6517\mu\text{M}$ 의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냈다. 나머지 Cbz-capped 저해제들은 용해도가 낮아 IC<sub>50</sub> 값에서 큰 변동이 발생하였으며, 최적화를 시도했음에도 여전히  $50\mu\text{M}$  이상의 IC<sub>50</sub> 값을 보였다.

ARPE-19 세포에서 neutrophil elastase 활성 분석 실험을 추가로 진행하였다. 그러나 neutrophil elastase는 주로 호중구에만 존재하여 양이 적고, 세포 내에서 활성도 관찰되지 않았다. 따라서, HtrA 효소 억제에 유의미한 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

이러한 결과는 HtrA에 대한 저해제 개발에서 효소 특이성을 강화하고 비특이적 억제를 최소화하기 위한 추가적인 구조적 설계의 필요성을 시사한다.

(A)



(B)

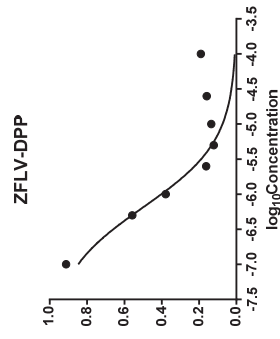


그림 12. 재조합 단백질을 Neutrophil elastase에 대한 트라이펩타이드 저해제의 IC<sub>50</sub> 곡선.  
ZFLV-DPP, compound 11.

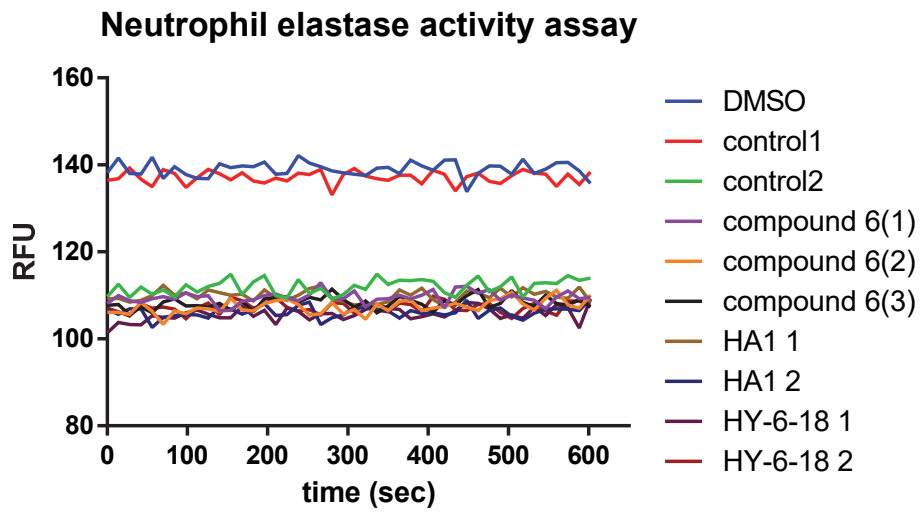


그림 13. ARPE-19 세포에서의 Neutrophil elastase 활성 분석.

HA1은 HtrA 활성제를, HY-6-18은 LFLV-DPP의 저해제 compound를 의미한다.

#### 2.2.5. 세포 생존율 측정: MTS 분석

저해제 라이브러리의 세포 독성을 평가하기 위해 HeLa 세포, U-87 MG 세포 그리고 HepG2 세포를 사용하여 MTS 분석(methanethiosulfonate assay)을 수행하였다. 각 세포주에서 저해제 또는 활성제를 처리한 후 세포 생존율(cell viability)을 측정하였으며, 저해제의 세포 독성 평가 결과는 아래와 같이 나타났다.

MTS 분석 결과, 모든 세포주에서 저해제 처리 후 세포 생존율이 전반적으로 80% 이상으로 나타나, 합성된 저해제들이 세포 독성이 거의 없음을 확인할 수 있었다. 특히, 특정 세포주에서 약간의 차이는 존재했으나, 전체적으로 세포 생존율이 높은 수준을 유지하는 경향을 보였다.

결과적으로, 본 실험은 합성된 저해제들이 세포 독성을 거의 나타내지 않으며, 세포 생존율이 전반적으로 높은 수준을 유지함을 확인하였다. 이러한 결과는 합성된 저해제가 독성이 낮고 안전한 후보 물질로 평가될 가능성을 강하게 시사한다.

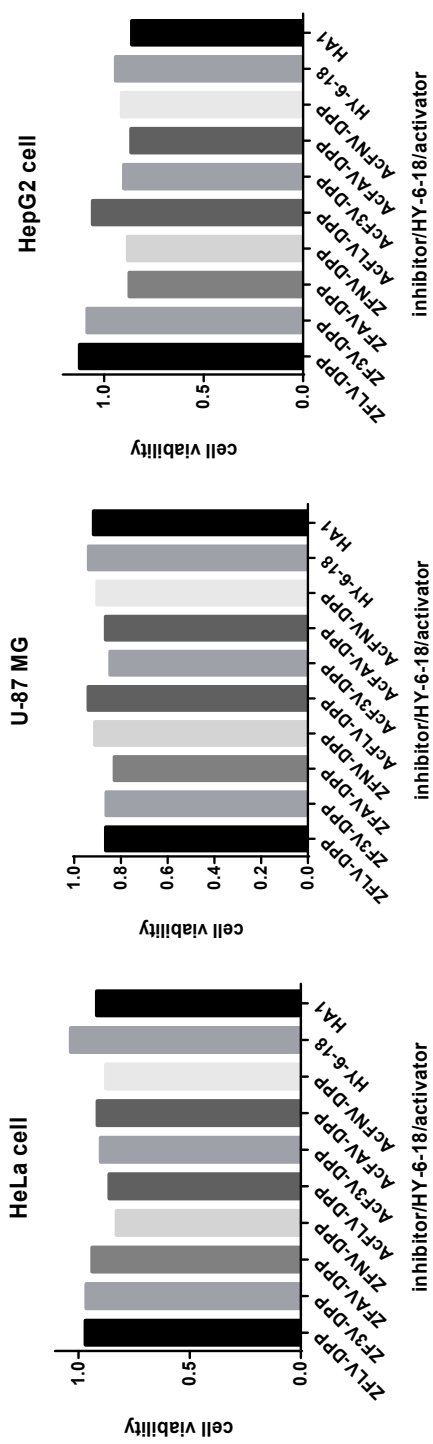


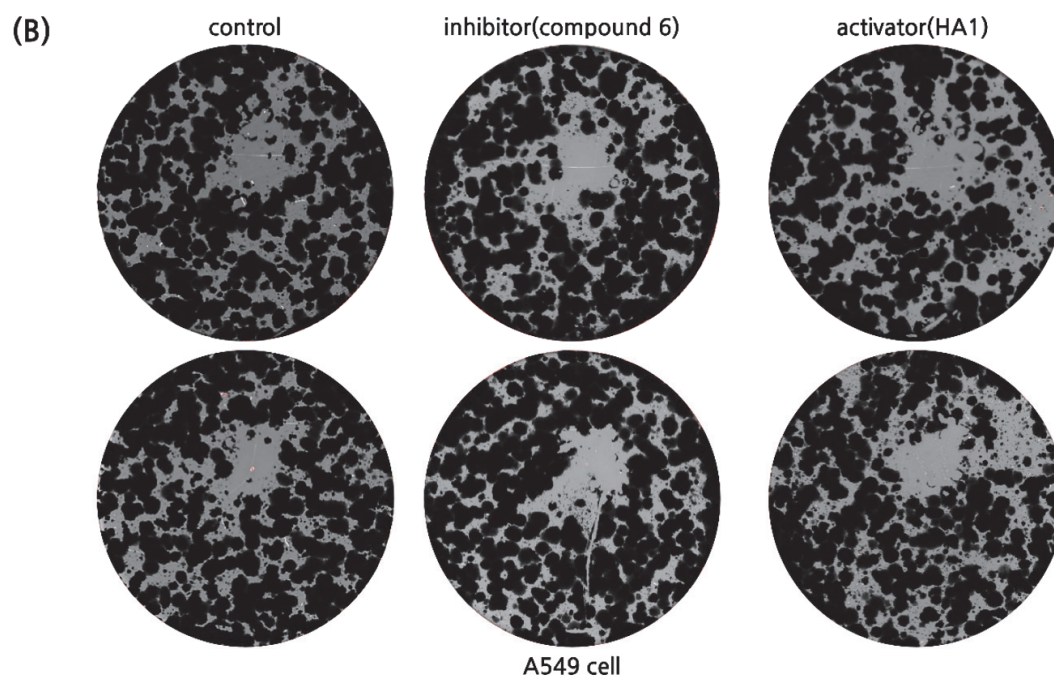
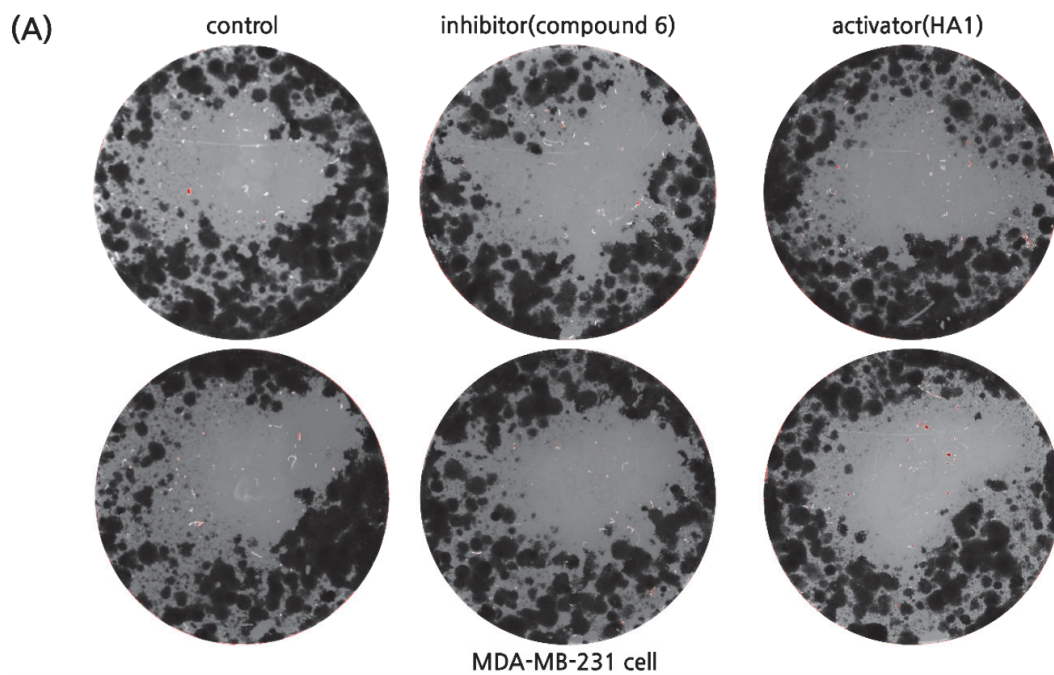
그림 14. 트라이펩타이드 저해제에 따른 세포 성장 평가.

MTS 분석 결과, 합성된 저해제들은 세포 독성이 거의 없고 높은 생존율을 유지하였다. HA1은 HtrA 활성제를, HY-6-18은 LFLV-DPP의 저해제 compound를 의미한다.

#### 2.2.6. 세포 장기 생존 능력 측정: Colony formation 분석

저해제 라이브러리의 세포 증식 억제 효과를 평가하기 위해 MDA-MB-231 세포, A549 세포, 그리고 H460 세포를 사용하여 colony formation 분석을 수행하였다. 각 세포주에 저해제(compound 6) 또는 활성화제(HA1)를 처리한 후, 세포의 콜로니 형성(colony formation) 능력을 평가하였으며, 이를 통해 저해제가 세포 증식에 미치는 영향을 확인하였다.

모든 세포에서 콜로니 형성 양상은 비슷하게 나타나 정확한 비교가 어려웠으나, HtrA 활성화제(HA1)를 처리한 경우 콜로니 수가 상대적으로 감소하는 경향이 관찰되었다. 이러한 결과로 인해 저해제의 영향을 명확히 평가하기에는 어려움이 있었다. 보다 명확한 비교를 위해 향후 실험에서는 MCF-7 세포와 같은 정상 세포를 대조군으로 포함하고, 웰의 중앙 부분에서도 균일하게 세포를 배양하여 분석하는 것이 필요할 것으로 보인다.



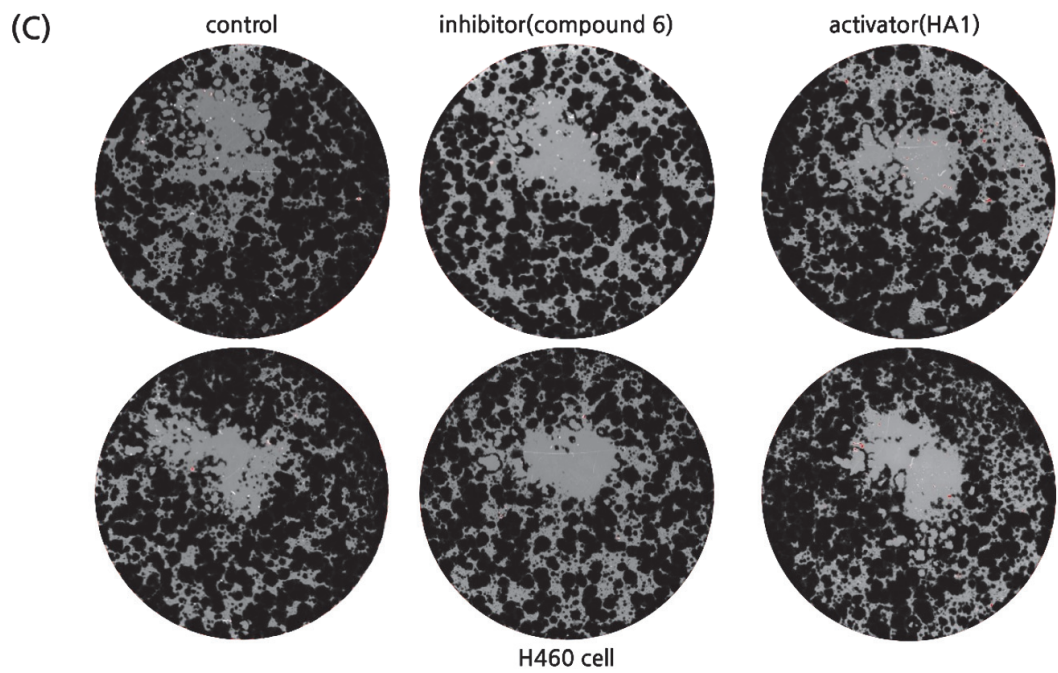


그림 15. MDA-MB-231, A549, H460 세포의 colony formation 분석. 실험은 각 세포에서 동일 조건으로 두 번 반복하여 진행되었다. 대조군 세포(처리하지 않은 세포), 저해제를 처리한 세포, 활성제를 처리한 세포의 사진을 촬영하였다.

### 3. 결론

본 연구에서는 HtrA 효소를 타겟으로 하는 새로운 트라이펩타이드 기반 프로브와 저해제를 설계하고, 그 특이성과 효율성을 평가하였다. 3세대 프로브는 기존의 1세대 및 2세대 프로브와 비교하여 HtrA1 및 HtrA2에 대한 선택성과 반응성에서 개선된 성능을 보였다. 특히, compound 2는 높은 효소 특이성과 낮은 비특이적 결합을 통해 복잡한 단백질 환경에서도 우수한 탐지 성능을 나타냈다. 이러한 특성은 임상적 활용 가능성을 시사하며, 복잡한 혈청 환경에서도 HtrA1의 활성을 탐지할 수 있는 기반을 제공하였다.

저해제 연구에서는 트라이펩타이드 기반 저해제의 IC<sub>50</sub> 값을 분석하여 HtrA 효소에 대한 선택적 억제 능력을 평가하였다. Compound 6은 HtrA1에 대해 가장 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내며, 가장 강력한 억제 효과를 보였다. 그러나 neutrophil elastase에 대한 IC<sub>50</sub> 분석에서 비특이적 억제 효과가 관찰되어, 향후 연구에서는 HtrA 효소에 대한 선택성을 더욱 강화하고 비특이적 억제를 최소화하는 설계가 필요함을 확인하였다.

MTS 분석을 통해 저해제의 세포 독성을 평가한 결과, 모든 세포주에서 저해제 처리 후에도 세포 생존율이 80% 이상으로 유지되어 저해제의 독성이 낮음을 확인하였다. Colony formation 분석에서는 각 세포에서 저해제와 활성제의 영향을 분석하였으나, 콜로니 형성 양상이 전반적으로 비슷하게 나타나 정확한 비교가 어려웠다. 이를 보완하기 위해, 향후 연구에서는 정상 세포를 대조군으로 포함하고, 실험 조건을 더욱 엄밀히 조정하여 분석의 신뢰도를 높이는 것이 필요하다.

이 연구는 HtrA 효소를 타겟으로 하는 프로브와 저해제 설계에 있어 중요한 발전을 제공하며, HtrA 관련 질환의 진단 및 치료제 개발에 있어 유

망한 가능성을 제시하였다. 특히, compound 2와 compound 6의 공통점인 P2 자리의  $\beta$ -cyclopropylalanyl unnatural amino acid가 HtrA의 활성 변화를 추적하는 데 중요한 역할을 한다는 점을 확인하였다. 이는 향후 효소 선택성과 효율성을 더욱 강화하기 위한 설계 방향에 있어 중요한 단서를 제공한다. 또한, 비극성이 낮고 작은 capping group이 용해도가 우수했으며, acetyl-capped 저해제가 특히 높은 용해도와 우수한 IC<sub>50</sub> 및 세포투과도를 보여 현재 노인 황반변성 모델 세포주에서 치료 효과를 검증 중이다.

그럼에도 불구하고, 본 연구를 통해 트라이펩타이드 기반 프로브와 저해제 설계에서 많은 성과를 확인하였으나, 여전히 해결해야 할 몇 가지 과제가 남아 있다. 첫째, 알부민과의 비특이적 결합 문제를 완전히 해결하지 못하였다. 이를 개선하기 위해, PEG(polyethylene glycol)과 같은 극성 또는 수용성이 증가한 링커를 도입하여 알부민과의 결합을 줄이고 선택성을 강화하는 방안을 고려할 수 있다.

둘째, 본 연구에서는 트라이펩타이드 기반 저해제에 초점을 맞췄지만, 테트라펩타이드 기반 저해제를 합성하여 비교함으로써 트라이펩타이드 설계의 한계와 강점을 더욱 명확히 확인할 수 있을 것이다. 이러한 접근은 저해제의 구조적 변형에 따른 효능 변화를 심층적으로 이해하는 데 이바지할 것이다. P2 자리 뿐만 아니라 P3 자리를 활용해 알부민 결합을 완화할 수 있는 테트라펩타이드 저해제 라이브러리를 합성해 비교하는 것이 유망한 전략이 될 수 있다.

셋째, 기존 설계에서 Val-DPP 위헤드를 사용한 방식을 넘어, 대체 위헤드를 활용한 새로운 프로브 및 저해제의 합성을 시도할 수 있다. 예를 들어, Val-DPP에서 diphenyl phosphonate 대신 boronate ester, phosphonate ester, phosphinate ester와 같은 다양한 반응성 electrophile을 적용하여 성능 향상을 도모할 수 있을 것이다.

이와 같은 제언은 향후 연구에서 트라이펩타이드 프로브 및 저해제의 성능을 개선하고, HtrA 효소에 대한 선택성을 강화하여 더욱 효과적인 진단 도구 및 치료제로 발전시키는 데 중요한 방향성을 제공할 것이다.

## 4. 실험

### 4.1. 실험기기 및 시약

#### 4.1.1. 실험기기

액체크로마토그래피-질량분석기 (Liquid Chromatography)는 HP 1100 모델로 질량분석기(MS)는 Electrospray ionization (ESI) 방식의 Agilent Technologies 6130 모델을 사용하여 수행하였으며 column은 Agilent XDB-C18 모델을 사용하였다. 액체크로마토그래프 (High Performance Liquid Chromatograph)는 KNAUER 제작사의 AZURA 모델을 사용하여 수행하였으며 column은 Luna C18을 사용하였다. RFU 및 IC<sub>50</sub> data는 Molecular Devices SpectraMax M3를 사용하였다. 화합물 정제를 위한 flash column chromatography는 Merck사의 Silica gel 60 (Merck-Millipore)를 사용하였다. <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼은 JEOL사의 JNM-ECZ500R/SI(500 MHz <sup>1</sup>H, 125 MHz <sup>13</sup>C) 분광계로부터 얻어졌으며, NMR 용매로는 CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, acetonitrile-d<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O를 사용하였다. Chemical shift는 표준물질인 tetramethylsilane으로부터 ppm단위로 기록하였으며 데이터는 chemical shift multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet), coupling constant (Hz), integration의 순으로 기록하였다. 세포 이미징은 EVOS FL imaging system 를 사용하였다.

#### 4.1.2. 시약

반응에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich, Thermofisher Scientific, Alfa Aesar, TCI, Acros, Novabiochem, ChemImpex, Fisher Chemical, Cayman Chemical, Biosesang에서 구입하여 정제 없이 사용하였다. Water는 3 차 증류수를 사용하였다. 실험에 사용된 트라이펩타이드 프로브 (compound 1-4)의 합성은 광주과학기술원 서지원 교수 연구팀과의 공동 연구를 통해 송다솜 연구원이 수행하였다.

세포 배양에는 HeLa 세포, U-87 MG 세포, HepG2 세포, MDA-MB-231 세포, A549 세포 그리고 H460세포 모두 한국 세포주 은행에서 구매하였으며 (ARPE-19 세포는 울산대학교 의과대학 강민지 교수 연구실에서 제공하였다), 배양 배지는 Gibco사의 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), DMEM:F12 또는 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)를 사용하여 세포에 따라 Fetal bovine Serum (FBS)과 penicillin/streptomycin을 혼합하여 사용하였다.

## 4.2. 실험방법

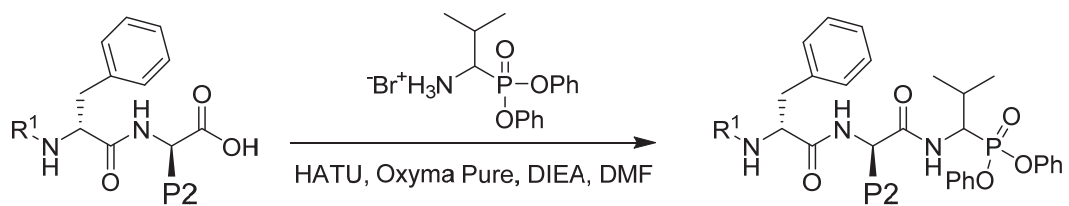
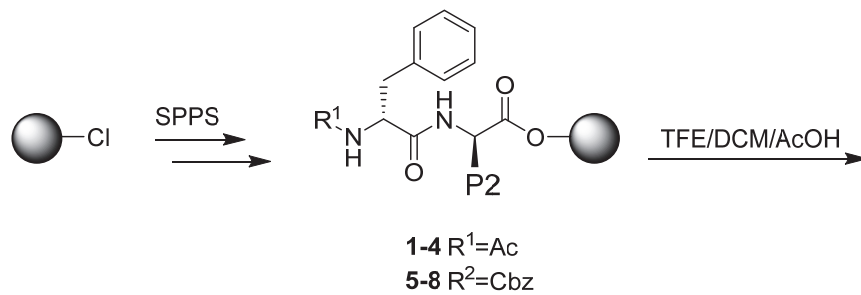
### 4.2.1. 트라이펩타이드 저해제의 합성

펩타이드는 고체상 펩타이드 합성법(Solid-Phase Peptide Synthesis, SPPS)을 사용하여 합성되었다. 2-chlorotriethyl chloride resin (100-200 mesh), 1% DVB (1.00 mmol/g, 300 mg, 0.30 mmol)을 DMF(7.5 mL)에 넣어 상온에서 30분 동안 팽윤시켰다. 펩타이드 결합 반응을 위해 아미노산을 DIEA(116.3 mg, 0.15 mL, 0.90 mmol,  $d = 0.74$  g/mL)와 DMF(1.5 mL)에 용해하여 첨가한 뒤, 강하게 교반하며 1.5시간 동안 반응시켰다. 이후 DMF와  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 세척하였다. 세척 후, 20% piperidine(774 mg, 0.9 mL, 9.09 mmol,  $d = 0.86$  g/mL)을 DMF(4.5 mL)에 혼합하여 3회 반복하여 Fmoc deprotection을 수행하였으며, 이후 다시 DMF와  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 세척하였다. Deprotection 후, 팽윤시킨 레진을 capping group이 달린 원하는 아미노산(0.90 mmol)과 Oxyma Pure (85.3 mg, 0.60 mmol), DIC(109.35 mg, 0.135 mL, 0.90 mmol,  $d = 0.81$  g/mL)을 DMF 용액(2.0 mL)에 혼합하여 펩타이드 결합 반응을 진행하였다.

반응 후 레진은 MeOH, DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 로 세척하였다. 레진은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 팽윤시키고, 클리비지 각테일 (2,2,2-트리플루오로에탄올 : 아세트산 :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1:8$ , v/v/v)을 사용하여 상온에서 2시간 동안 반응시켜 펩타이드를 분리하였다.

건조된 펩타이드에 HATU(1.1eq), Oxyma Pure(1.1eq), DIEA(2.2eq)를 DMF(1.0 mL)에 혼합하여 첨가한 뒤 교반하였다. Valine-diphenyl phosphonate(Val-DPP, 1eq)는 DIEA(1.5eq)와 함께 DMF(0.5 mL)에 준비하였다. Val-DPP는 상온에서 5분간 활성화한 뒤, 교반 중인 펩타이드 용액에 첨가하여 3일간 상온에서 반응을 진행하였다.

Supelclean™ LC-18 SPE Tube를 사용하여 반응이 끝난 펩타이드를 3차 증류수(Distilled water, DW)로 세척한 후, Acetonitrile(ACN)에서 생성물을 수득하였다. 생성된 펩타이드는 preparative HPLC를 사용하여 정제한 후 동결건조하였다. 펩타이드의 순도(>98%)는 분석용 HPLC로 확인되었다.



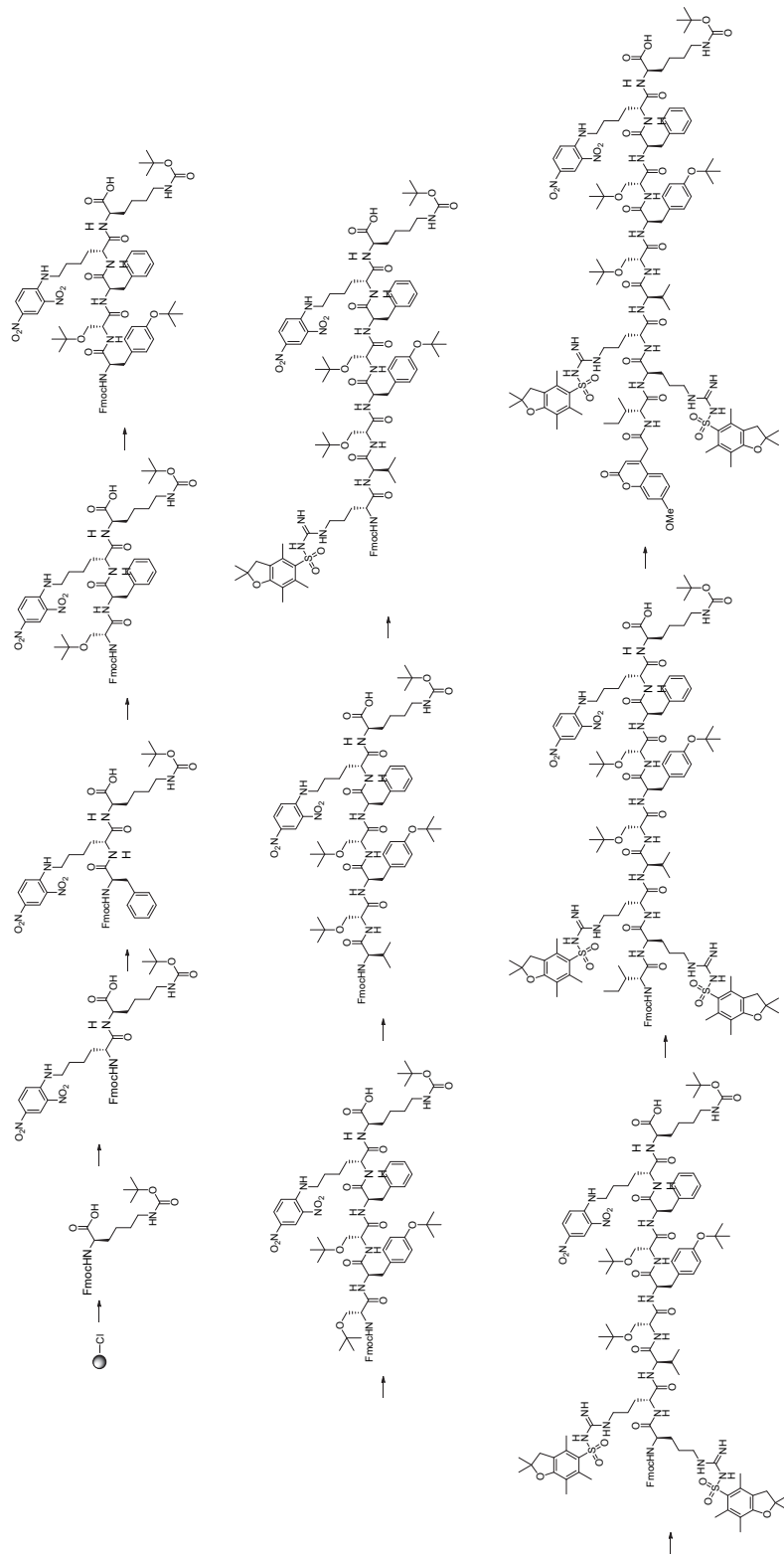
구조식 4. 트라이펩타이드 저해제의 대표적인 합성 경로.

Compound 5와 9의 P2 아미노산은 Abu, compound 6과 10의 P2 아미노산은  $\beta$ -Cpa, compound 7과 11의 P2 아미노산은 Leu, compound 8과 12의 P2 아미노산은 Nva이다.

#### 4.2.2. HtrA 형광 기질인 H2-opt의 합성

펩타이드는 고체상 펩타이드 합성법(Solid-Phase Peptide Synthesis, SPPS)을 사용하여 합성되었다. 2-chlorotriethyl chloride resin (100-200 mesh), 1% DVB (1.00 mmol/g, 300 mg, 0.30 mmol)을 DMF(5.0 mL)에 넣어 상온에서 30분 동안 팽윤시켰다. 펩타이드 결합 반응을 위해 아미노산을 DIEA(91 mg, 0.12 mL, 0.90 mmol,  $d = 0.74$  g/mL)와 DMF(1.5 mL)에 용해하여 첨가한 뒤, 강하게 교반하며 1.5시간 동안 반응시켰다. 이후 DMF와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 세척하였다. 세척 후, 20% piperidine(688 mg, 0.80 mL, 8.08 mmol,  $d = 0.86$  g/mL)을 DMF(3.0 mL)에 혼합하여 3회 반복하여 Fmoc deprotection을 수행하였으며, 이후 다시 DMF와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 세척하였다. Deprotection 후, 팽윤시킨 레진을 원하는 아미노산(0.90 mmol)과 HBTU(N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, 341 mg, 0.90 mmol), DIEA(183 mg, 0.25 mL, 1.80 mmol,  $d = 0.74$  g/mL)을 DMF 용액(2.0 mL)에 혼합하여 펩타이드 결합 반응을 진행하였다. 이후 DMF와 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 세척하였다. 이때, 아미노산 중 Fmoc-Lys(Dnp)-OH은 아미노산을 0.45 mmol, DIEA 0.9 mmol, HBTU 0.9 mmol 사용하여 하룻밤 동안 반응을 진행하였다. 이러한 과정을 반복하여 원하는 서열을 얻은 후, 다시 Fmoc deprotection을 수행하였다. 마지막으로 레진에 붙은 펩타이드를 DMF(5.0 mL)에 서스펜드 시키고, Mca-OH(7-Methoxycoumarin-4-acetic acid, 0.45 mmol), DIEA 0.9 mmol, HBTU 0.9 mmol를 DMF에 용해시켜 첨가한 뒤 강하게 교반하며 하룻밤 동안 반응을 진행하였다. 반응 후 레진은 MeOH, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 세척하였다.

레진은  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 에 팽윤시키고, 클리비지 각테일 (2,2,2-트리플루오로아세트산 : triisopropylsilane :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = 95:2.5:2.5, v/v/v)을 사용하여 상온에서 7.5시간 동안 반응시켜 펩타이드를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 차가운 diethyl ether에 침전시키고, 1500-1800 rpm에서 1분 동안 원심분리한 뒤 상층액을 제거하였다. 이 과정을 10번 반복한 뒤, 생성된 가루를 상온에서 건조시켰다. 생성된 펩타이드는 preparative HPLC를 사용하여 정제한 후 동결건조하였다. 펩타이드의 순도(>98%)는 분석용 HPLC로 확인되었다.



구조식 5. H2-opt 기질의 합성 경로.

#### 4.2.3. 재조합 단백질 HtrA1의 발현 및 정제

Recombinant HtrA1 (pET29)은 BL21(DE3) E. coli에서 니켈-친화성 크로마토그래피를 통해 정제되었다. BL21(DE3) 세포는 형질전환 후 Luria-Bertani(LB) 배지와 100 mg/mL 암피실린(Biosesang)을 포함한 배지에서 37°C에서 conical tube로 하룻밤 동안 배양하였다. 이후, 세포는 6-8시간 동안 37°C에서 LB 배지, 100 mg/mL 암피실린 및 34 mg/mL 클로람페니콜(Biosesang)을 포함한 배지에서 OD<sub>600</sub>이 약 0.8에 도달할 때까지 플라스크에서 배양되었다. 단백질 발현은 18°C에서 0.5 mM IPTG로 20시간 동안 유도하였다.

세포는 4°C에서 3,590 rpm으로 20분간 원심분리하여 수확하였고, 수확된 세포 펠릿은 -80°C에서 동결하여 용해 전까지 보관하였다. 동결된 세포는 얼음 위에서 해동한 후 resuspension buffer(50mM Tris pH 8.0, 500mM NaCl)에 현탁시킨 뒤, 초음파 분해법(sonication)을 통해 용해하였다. 용해물은 4°C에서 13,000 rpm로 1시간 동안 원심분리하여 맑게 한 후, 이 용해물을 Ni-NTA 레진(1L 배양액당 0.75 mL 레진)과 함께 최소 1시간 동안, 경우에 따라 하룻밤 동안 4°C에서 반응시켰다.

결합된 레진은 washing buffer(50mM Tris pH 8.0, 1M NaCl, 20mM imidazole)로 레진 부피의 50배만큼 세척되었으며, 세척된 레진은 elution buffer(50mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 10% glycerol(v/v), 300mM imidazole)를 사용해 효소를 용출되었다. 세척과 용출 과정에서는 Bradford 방법을 사용하여 효소 존재 여부를 확인하였다.

최종적으로, 효소는 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 통해 추가로 정제되었으며, storage buffer(50mM Tris pH 8.0, 200mM NaCl, 10% glycerol(v/v))로 교환하였다. 이 과정

에서 Cytiva사의 PD-10 탈염 컬럼이 사용되었다. 정제된 효소의 농도는 Bradford 방법으로 소 혈청 알부민(BSA)를 표준으로 하여 측정하였으며, 소분하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관되었다.

#### 4.2.4. 재조합 단백질 활성화탐지

직접 발현한 HtrA1과 R&D Systems에서 구매한 재조합 HtrA2, 인간 호중구 엘라스타제 단백질을 각각 50ng씩 50mM Tris pH 8.0, 0.25% CHAPS assay buffer 20  $\mu\text{L}$ 에 희석하였다. 각 단백질을 1  $\mu\text{M}$  농도의 프로브와 혼합하여  $45^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후, SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 반응을 종료하였다. 라벨링된 단백질은 12% SDS-PAGE를 통해 분리하고, ChemiDoc MP Imaging 시스템을 사용하여 분석하였다.

#### 4.2.5. 라이브 세포, 배양 배지 및 인간 혈청에서의 단백질 활성화탐지

모든 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구매하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100U/mL 페니실린, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  스트렙토마이신 (Pen/Strep)을 첨가하여 배양하였다. 인간 혈청은 Sigma-Aldrich에서 구매하였다. HeLa 세포와 U-87 MG 세포는 24-well plate에  $2 \times 10^5$  세포/well로 분주한 뒤,  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  환경에서 활성화탐지 실험 전 18-20 시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 신선한 배지로 교체한 후, 프로브(10  $\mu\text{M}$ )를 첨가하였으며, 세포를 2시간 동안 배양하였다. 최종 DMSO 농도는 1% 미만으로 유지하였다. 각 웰에서 배양액을 수집한 뒤, 인산완충생리식염수(PBS)로 두 번 세척하였다. 활성화 HtrA 단백질의 직접적인 라벨링을

평가하기 위해 SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 세포를 용해하였다. SDS-PAGE sample buffer 첨가 후, 조추출물을 수집하여 85°C에서 10분간 가열(3분마다 vortex)한 뒤, 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 라벨링된 단백질은 형광 스캐너로 젤을 스캔하여 분석하였다.

인간 혈청 활성화탐지 실험의 경우, 혈청은 assay buffer(50mM Tris pH 8.0, 0.25% CHAPS)으로 희석하여 50 µg/well로 준비하고, 일부 시료에는 재조합 HtrA1(10ng/well)을 첨가하고, 다른 시료에는 첨가하지 않고 실험을 진행하였다. 각 시료에 5 µM 농도의 트라이펩타이드 프로브 또는 LFLV-DPP를 첨가한 뒤, 45°C에서 1시간 동안 라벨링을 수행하였다. 반응은 SDS-PAGE sample buffer를 첨가하여 중단시켰다. 표지된 단백질은 12% SDS-PAGE로 분리되었으며, 형광 스캐너로 젤을 스캔하여 분석하였다.

#### 4.2.6. HtrA1과 HtrA2에 대한 IC<sub>50</sub> 측정

##### (1) 트라이펩타이드 프로브

HtrA                      활성화                      형광                      기질인                      H2-opt  
(Mca-Ile-Arg-Arg-Val-Ser-Tyr-Ser-Phe-Lys(Dnp)-Lys (12. µM)과 50mM Tris pH 8.0, 0.25% CHAPS로 구성된 assay buffer를 사용하여 측정하였다. 트라이펩타이드 프로브는 96-Well Black/Clear Bottom Plate(Falcon)에 최종 농도가 0.5 µM ~ 25 µM이 되도록 spot을 찍었다. 100ng의 재조합 단백질을 150 µL의 assay buffer에 희석하여 첨가하였다. 상온에서 10분간 활성화한 뒤, 50 µL의 기질 용액을 추가하였다. 형광 신호(excitation 328 nm, emission 393 nm)는 37°C에서 Spectramax M3 형광 판독기로 30초 간격으로 2시간 동안 측정되었다. IC<sub>50</sub> 값은 GraphPad Prism을 사용한 비선형 회귀분석을 통해 계산되었다.

## (2) 트라이펩타이드 저해제

HtrA 활성은 H2-opt (12.5  $\mu$ M)과 50mM Tris pH 8.0, 0.25% CHAPS로 구성된 assay buffer를 사용하여 측정하였다. 트라이펩타이드 저해제는 96-Well Black/Clear Bottom Plate(Falcon)에 최종 농도가 0.1  $\mu$ M ~ 100  $\mu$ M이 되도록 spot을 찍고, 100  $\mu$ L의 assay buffer에 녹였다. 효소는 50  $\mu$ L의 assay buffer에 희석하여 상온에서 30분간 활성화하였다. 이후, 효소 용액을 프로브와 반응시켜 상온에서 10분간 반응시킨 뒤, 마지막으로 50  $\mu$ L의 기질 용액을 추가하였다. 형광 신호(excitation 328nm, emission 393nm)는 37°C에서 11-13초 간격으로 1시간 동안 Spectramax M3 형광 판독기로 측정되었으며, IC<sub>50</sub> 값은 GraphPad Prism을 사용한 비선형 회귀분석을 통해 계산되었다.

### 4.2.7. Neutrophil elastase에 대한 IC<sub>50</sub> 측정

트라이펩타이드 저해제는 96-Well Black/Clear Bottom Plate(Falcon)에 최종 농도가 0.1  $\mu$ M ~ 100  $\mu$ M이 되도록 spot을 찍었다. Neutrophil elastase를 activation buffer(50mM MES pH 5.5, 50mM NaCl)에 50  $\mu$ g/mL로 희석한 뒤, 37°C에서 2시간 동안 활성화하였다. 이후, 활성화된 효소 용액을 assay buffer(50mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 0.05% Brij-35(w/v))에 1ng/ $\mu$ L 농도로 희석하여 각 웰에 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 형광 기질(MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC, Cayman Chemical)은 assay buffer로 희석하여 50  $\mu$ M 농도로 준비하였고, 이를 각 웰에 100  $\mu$ L씩 추가하였다. 형광 신호(excitation 380nm, emission 460nm)는 37°C에서 11-13초 간격으로 5분 동안 Spectramax M3 형광 판독기로 측정되었으며, IC<sub>50</sub> 값은 GraphPad Prism을 사용한 비선형 회귀분석을 통해 계산되었다.

#### 4.2.8. ARPE-19 세포에서의 Neutrophil elastase activity 분석

ARPE-19 세포는 울산대학교 의과대학 강민지 교수 연구실에서 제공하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100 U/mL 페니실린, 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 (Pen/Strep)을 첨가하여 배양하였다. ARPE-19 세포는 24-well plate에  $5 \times 10^4$  세포/well로 분주한 뒤, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 실험 전 18-20시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 PBS로 두 번 세척하고, Opti-MEM으로 배양액을 교체하였다. Opti-MEM 처리 시, 저해제, 활성화제 또는 대조군으로 DMSO를 Opti-MEM에 희석하여 최종 농도 50  $\mu$ M이 되도록 준비한 뒤, 24시간 동안 처리하였다. 96-Well Black/Clear Bottom Plate (Falcon)에 배양액을 100ul/well 로 분주한 뒤, 기질 용액은 assay buffer (50mM Tris pH 7.5, 1M NaCl, 0.05% Brij-35(w/v))로 희석하여 50  $\mu$ M 농도로 준비하였고, 이를 각 웰에 100  $\mu$ L씩 추가하였다. 형광 신호(excitation 380nm, emission 460nm)는 37°C에서 11-13초 간격으로 5-15분 동안 Spectramax M3 형광 판독기를 사용해 측정하였다.

#### 4.2.9. MTS 분석

HeLa, U-87MG, 그리고 HepG2 세포를 각각  $1 \times 10^4$  cells/well로 96-well plate에 배양하였다. 18-20시간 배양한 뒤, 배지를 교체하고 저해제를 10  $\mu$ M 농도로 첨가하여 발색 반응시켰다. 이후, 배지를 교체한 후 well당 20  $\mu$ L의 MTS 용액을 추가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 동안 배양하였다. 최종적으로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 4.2.10. Colony formation 분석

모든 세포주는 한국세포주은행(서울, 한국)에서 구매하였으며, Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 100U/mL 페니실린, 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 (Pen/Strep)을 첨가하여 배양하였다. MDA-MB-231 세포, A549 세포와 H460 세포는 6-well plate에  $1 \times 10^3$  세포/well로 분주한 뒤, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경에서 활성탐지 실험 전 18-20시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 저해제 또는 활성제(10  $\mu$ M)가 처리된 신선한 배지로 교체한 뒤, 세포를 3일 동안 배양하였다. 이후, 3일마다 저해제 또는 활성제가 처리된 신선한 배지로 교체하는 과정을 반복하였다. 13일째 되는 날, PBS로 두 번 세척한 뒤, Fixing buffer (Methanol:Glacial Acetic Acid:Water=1:1:8)로 사용해 세포를 고정하였다. 고정된 세포는 0.1% crystal violet으로 상온에서 15분간 염색하였으며, PBS로 두 번 세척한 후 형광 스캐너로 세포 사진을 촬영하였다.

#### 4.2.11. Covalent docking

Covalent docking은 Schrödinger의 Covalent Docking 워크플로우를 사용하여 Maestro(Schrödinger Suite)에서 수행하였다. 저해제의 화학 구조는 LigPrep 모듈을 사용해 3D 좌표와 생리학적 pH(7.4)에서의 양성자화를 생성하여 준비하였다. HtrA1(PDB: 3NZI)의 단백질 구조는 Protein Preparation Wizard를 사용해 전처리하였으며, 여기에는 결합 순서 지정, 수소 추가, 결정학적 물 분자의 제거, 수소 결합 네트워크 최적화, 그리고 제한된 에너지 최소화 과정이 포함되었다.

Covalent docking receptor grid는 활성 부위 내에서 공유 결합 부위로 Ser328을 정의하여 생성하였다. 저해제의 전기친화적 위헤드(electrophilic

warhead)는 Ser328과 공유 결합을 형성하기 위한 반응성 그룹으로 지정되었다. 도킹 과정에서는 공유 결합 형성과 함께 저해제와 HtrA1 결합 포켓 간의 비공유 상호작용도 고려하였다.

도킹 시뮬레이션은 CovDock 모듈을 사용하여 수행하였으며, 저해제의 다양한 구조적 형태와 방향을 샘플링하여 가능한 결합 포즈를 생성하였다. 도킹 결과는 도킹 점수, 결합 상호작용, 공유 결합의 기하학적 구조를 기준으로 가장 적합한 포즈를 선택하여 분석하였다. Compound 6 (SJ-2-52)는 HtrA1 (PDB: 3NZI)의 Ser328 측쇄에 공유적으로 도킹되었다. 최종 도킹 포즈의 시각화와 분석은 모두 Maestro를 사용하여 수행하였다.

## 참고문헌

1. Harrer, A., et al., Overexpression of serine protease HtrA enhances disruption of adherens junctions, paracellular transmigration and type IV secretion of CagA by *Helicobacter pylori*. *Gut Pathog*, 2017. **9**: p. 40.
2. Clausen, T., C. Southan, and M. Ehrmann, The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol Cell*, 2002. **10**(3): p. 443–55.
3. Zumbunn, J. and B. Trueb, Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. *FEBS Lett*, 1996. **398**(2–3): p. 187–92.
4. Hu, S.I., et al., Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*, 1998. **273**(51): p. 34406–12.
5. Baldi, A., et al., The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene*, 2002. **21**(43): p. 6684–8.
6. Baldi, A., et al., Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study. *Exp Dermatol*,

2003. **12**(2): p. 213–8.

7. Shridhar, V., et al., Identification of underexpressed genes in early- and late-stage primary ovarian tumors by suppression subtraction hybridization. *Cancer Res*, 2002. **62**(1): p. 262–70.

8. Bakay, M., et al., A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul Disord*, 2002. **12 Suppl 1**: p. S125–41.

9. Faccio, L., et al., Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2581–8.

10. Gray, C.W., et al., Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(18): p. 5699–710.

11. van Loo, G., et al., The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(1): p. 20–6.

12. Verhagen, A.M., et al., HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem*, 2002. **277**(1): p. 445–54.

13. De Luca, A., et al., Distribution of the serine protease HtrA1

in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 2003. **51**(10): p. 1279–84.

14. Nie, G.Y., et al., Identification and cloning of two isoforms of human high-temperature requirement factor A3 (HtrA3), characterization of its genomic structure and comparison of its tissue distribution with HtrA1 and HtrA2. *Biochem J*, 2003. **371**(Pt 1): p. 39–48.

15. Nie, G.Y., et al., A novel serine protease of the mammalian HtrA family is up-regulated in mouse uterus coinciding with placentation. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(5): p. 279–90.

16. Spiess, C., A. Beil, and M. Ehrmann, A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 1999. **97**(3): p. 339–47.

17. Krojer, T., et al., Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 2002. **416**(6879): p. 455–9.

18. Pallen, M.J. and B.W. Wren, The HtrA family of serine proteases. *Mol Microbiol*, 1997. **26**(2): p. 209–21.

19. Faccio, L., et al., Tissue-specific splicing of Omi stress-regulated endoprotease leads to an inactive protease with a modified PDZ motif. *Genomics*, 2000. **68**(3): p. 343–347.

20. Ferry Jr, R.J., R.W. Cerri, and P. Cohen, Insulin-like growth

factor binding proteins: new proteins, new functions. *Hormone Research in Paediatrics*, 1999. **51**(2): p. 53–67.

21. Berman, H.M., et al., The protein data bank. *Nucleic acids research*, 2000. **28**(1): p. 235–242.

22. Runyon, S.T., et al., Structural and functional analysis of the PDZ domains of human HtrA1 and HtrA3. *Protein Science*, 2007. **16**(11): p. 2454–2471.

23. Zhang, Y., et al., Structural and functional analysis of the ligand specificity of the HtrA2/Omi PDZ domain. *Protein science*, 2007. **16**(8): p. 1738–1750.

24. Held, H.A. and S.S. Sidhu, Comprehensive mutational analysis of the M13 major coat protein: improved scaffolds for C-terminal phage display. *Journal of Molecular biology*, 2004. **340**(3): p. 587–597.

25. Singh, H., et al., Activity-modulating monoclonal antibodies to the human serine protease HtrA3 provide novel insights into regulating HtrA proteolytic activities. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e108235.

26. Chien, J., et al., Serine protease HtrA1 associates with microtubules and inhibits cell migration. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(15): p. 4177–87.

27. Campioni, M., et al., The serine protease HtrA1 specifically

interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. *Mol Cancer Res*, 2010. **8**(9): p. 1248–60.

28. Clawson, G.A., et al., Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins. *J Cell Biochem*, 2008. **105**(1): p. 81–8.

29. Tiaden, A.N. and P.J. Richards, The emerging roles of HTRA1 in musculoskeletal disease. *Am J Pathol*, 2013. **182**(5): p. 1482–8.

30. Jones, A., et al., Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(35): p. 14578–83.

31. Vierkotten, S., P.S. Muether, and S. Fauser, Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e22959.

32. Grau, S., et al., The role of human HtrA1 in arthritic disease. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(10): p. 6124–6129.

33. Tsuchiya, A., et al., Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone*, 2005. **37**(3): p. 323–36.

34. Chamberland, A., et al., Identification of a novel HtrA1-susceptible cleavage site in human aggrecan: evidence for the involvement of HtrA1 in aggrecan proteolysis in vivo. *J Biol Chem*, 2009. **284**(40): p. 27352–9.
35. Skorko-Glonek, J., et al., HtrA protease family as therapeutic targets. *Current pharmaceutical design*, 2013. **19**(6): p. 977–1009.
36. Cabrera, A.C., et al., HtrA1 activation is driven by an allosteric mechanism of inter-monomer communication. *Scientific Reports*, 2017. **7**(1): p. 14804.
37. Song, S., et al., Progress in the Study of the Role and Mechanism of HTRA1 in Diseases Related to Vascular Abnormalities. *Int J Gen Med*, 2024. **17**: p. 1479–1491.
38. Clausen, T., et al., HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(3): p. 152–62.
39. Guo, F., et al., Carfilzomib relieves pancreatitis-initiated pancreatic ductal adenocarcinoma by inhibiting high-temperature requirement protein A1. *Cell Death Discov*, 2024. **10**(1): p. 58.
40. Chien, J., et al., A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene*, 2004. **23**(8): p. 1636–1644.

41. Nie, G., et al., Distinct expression and localization of serine protease HtrA1 in human endometrium and first-trimester placenta. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 2006. **235**(12): p. 3448–3455.
42. Narkiewicz, J., et al., Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF- $\beta$ 1 genes in primary endometrial cancer. *Oncol Rep*, 2009. **21**(6): p. 1529–37.
43. Oka, C., et al., HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, 2004. **131**(5): p. 1041–53.
44. Oka, C., et al., Interplay between HTRA1 and classical signalling pathways in organogenesis and diseases. *Saudi J Biol Sci*, 2022. **29**(4): p. 1919–1927.
45. Zurawa-Janicka, D., et al., Expression of HTRA Genes and Its Association with Microsatellite Instability and Survival of Patients with Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(11).
46. Song, D., et al., Structure–activity relationship analysis of activity–based probes targeting HTRA family of serine proteases. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023. 87: p. 129259.
47. Tennstaedt, A., et al., Human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA1) degrades tau protein aggregates. *J Biol Chem*, 2012. **287**(25): p. 20931–41.

48. Chien, J., X. He, and V. Shridhar, Identification of tubulins as substrates of serine protease HtrA1 by mixture-based oriented peptide library screening. *J Cell Biochem*, 2009. **107**(2): p. 253–63.
49. Chen, S., et al., HTRA1 disaggregates alpha-synuclein amyloid fibrils and converts them into non-toxic and seeding incompetent species. *Nat Commun*, 2024. **15**(1): p. 2436.
50. Grau, S., et al., Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. **102**(17): p. 6021–6026.
51. Poepsel, S., et al., Determinants of amyloid fibril degradation by the PDZ protease HTRA1. *Nature chemical biology*, 2015. **11**(11): p. 862–869.
52. Verghese, P.B., et al., ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(19): p. E1807–16.
53. Morris, J.C., et al., APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol*, 2010. **67**(1): p. 122–31.
54. Chu, Q., et al., HtrA1 Proteolysis of ApoE In Vitro Is Allele Selective. *J Am Chem Soc*, 2016. **138**(30): p. 9473–8.
55. Belloy, M.E., V. Napolioni, and M.D. Greicius, A Quarter

Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron*, 2019. **101**(5): p. 820–838.

56. Pihlaja, R., The role of astrocytes as beta–amyloid degrading glial cells: *implications for alzheimer's disease*. 2011, *Itä–Suomen yliopisto*.

57. Pires, M. and A.C. Rego, Apoe4 and Alzheimer' s Disease Pathogenesis—Mitochondrial Deregulation and Targeted Therapeutic Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023. **24**(1): p. 778.

58. Munoz, S.S., et al., The serine protease HtrA1 contributes to the formation of an extracellular 25–kDa apolipoprotein E fragment that stimulates neuritogenesis. *J Biol Chem*, 2018. **293**(11): p. 4071–4084.

59. Yang, Z., et al., A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age–related macular degeneration. *Science*, 2006. **314**(5801): p. 992–993.

60. Dewan, A., et al., HTRA1 promoter polymorphism in wet age–related macular degeneration. *Science*, 2006. **314**(5801): p. 989–92.

61. Deangelis, M.M., et al., Alleles in the HtrA serine peptidase 1 gene alter the risk of neovascular age–related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2008. **115**(7): p. 1209–1215 e7.

62. Jacobo, S.M., et al., Age-related macular degeneration-associated silent polymorphisms in HtrA1 impair its ability to antagonize insulin-like growth factor 1. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(10): p. 1976–90.
63. Iejima, D., M. Nakayama, and T. Iwata, HTRA1 Overexpression Induces the Exudative Form of Age-related Macular Degeneration. *J Stem Cells*, 2015. **10**(3): p. 193–203.
64. Gili, P., et al., Gene polymorphisms associated with an increased risk of exudative age-related macular degeneration in a Spanish population. *Eur J Ophthalmol*, 2022. **32**(1): p. 651–657.
65. Fleckenstein, M., et al., Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers*, 2021. **7**(1): p. 31.
66. Williams, B.L., et al., Chromosome 10q26-driven age-related macular degeneration is associated with reduced levels of HTRA1 in human retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021. **118**(30).
67. Friedrich, U., et al., Risk- and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic effects due to protein deficiency. *Hum Mol Genet*, 2011. **20**(7): p. 1387–99.
68. Lin, M.K., et al., HTRA1, an age-related macular degeneration protease, processes extracellular matrix proteins EFEMP1 and TSP1. *Aging Cell*, 2018. **17**(4): p. e12710.

69. Nashine, S., Potential Therapeutic Candidates for Age-Related Macular Degeneration (AMD). *Cells*, 2021. **10**(9).
70. Maring, J.A., et al., Interrogating TGF-beta Function and Regulation in Endothelial Cells. *Methods Mol Biol*, 2016. **1344**: p. 193-203.
71. Pan, Y., et al., Binding of Gtf2i-beta/delta transcription factors to the ARMS2 gene leads to increased circulating HTRA1 in AMD patients and in vitro. *J Biol Chem*, 2021. **296**: p. 100456.
72. Poulsen, E.T., et al., The serine protease HtrA1 cleaves misfolded transforming growth factor  $\beta$ -induced protein (TGFBIp) and induces amyloid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 2019. **294**(31): p. 11817-11828.
73. Chien, J., et al., HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. *Current cancer drug targets*, 2009. **9**(4): p. 451-468.
74. Mullany, S.A., et al., Expression and functional significance of HtrA1 loss in endometrial cancer. *Clinical Cancer Research*, 2011. **17**(3): p. 427-436.
75. Zhu, F., et al., Serine protease HtrA1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international: HBPD INT*, 2010. **9**(5): p. 508-512.
76. Zurawa-Janicka, D., J. Skorko-Glonek, and B. Lipinska, HtrA

proteins as targets in therapy of cancer and other diseases. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(7): p. 665–79.

77. Canfield, A., et al., HtrA1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization? *Biochemical Society Transactions*, 2007. **35**(4): p. 669–671.

78. Wu, H., et al., HTRA1 promotes transdifferentiation of normal fibroblasts to cancer-associated fibroblasts through activation of the NF- $\kappa$ B/bFGF signaling pathway in gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **514**(3): p. 933–939.

79. Chen, P.H., et al., High-Temperature Requirement A1 Protease as a Rate-Limiting Factor in the Development of Osteoarthritis. *Am J Pathol*, 2019. **189**(7): p. 1423–1434.

80. Wu, J., et al., Comparative proteomic characterization of articular cartilage tissue from normal donors and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(11): p. 3675–84.

81. Jiang, J., et al., Overexpression of HTRA1 leads to down-regulation of fibronectin and functional changes in RF/6A cells and HUVECs. 2012.

82. Tiaden, A.N., et al., Detrimental Role for Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) in the Pathogenesis of Intervertebral Disc (IVD) Degeneration\*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. **287**(25): p. 21335–21345.

83. Inagaki, A., et al., Upregulation of HtrA4 in the placentas of patients with severe pre-eclampsia. *Placenta*, 2012. **33**(11): p. 919–926.
84. Tavarna, T., et al., Fetal growth restriction is a host specific response to infection with an impaired spiral artery remodeling-inducing strain of *Porphyromonas gingivalis*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1): p. 14606.
85. Beaufort, N., et al., Cerebral small vessel disease-related protease HtrA1 processes latent TGF-beta binding protein 1 and facilitates TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(46): p. 16496–501.
86. Friedrich, U., et al., Synonymous variants in HTRA1 implicated in AMD susceptibility impair its capacity to regulate TGF-beta signaling. *Hum Mol Genet*, 2015. **24**(22): p. 6361–73.
87. Klose, R., et al., Loss of the serine protease HTRA1 impairs smooth muscle cells maturation. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 18224.
88. Verdura, E., et al., Heterozygous HTRA1 mutations are associated with autosomal dominant cerebral small vessel disease. *Brain*, 2015. **138**(Pt 8): p. 2347–58.
89. Hara, K., et al., Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N Engl J Med*, 2009. **360**(17): p. 1729–39.

90. Zellner, A., et al., CADASIL brain vessels show a HTRA1 loss-of-function profile. *Acta neuropathologica*, 2018. **136**: p. 111–125.
91. O'Callaghan, C.J. and B. Williams, Scientific Contributions–Mechanical Strain–Induced Extracellular Matrix Production by Human Vascular Smooth Muscle Cells: Role of TGF- $\beta$ 1. *Hypertension*, 2000. **36**(3): p. 319–324.
92. Hasan, M.Z., et al., Abnormal development of placenta in HtrA1-deficient mice. *Dev Biol*, 2015. **397**(1): p. 89–102.
93. Li, Y., et al., Placental HtrA3 is regulated by oxygen tension and serum levels are altered during early pregnancy in women destined to develop preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(2): p. 403–11.
94. Liu, C., et al., Elevated HTRA1 and HTRA4 in severe preeclampsia and their roles in trophoblast functions. *Mol Med Rep*, 2018. **18**(3): p. 2937–2944.
95. Wang, Y., et al., HtrA3 Isoform-Specific ELISAs for Early Detection of Preeclampsia. *SLAS Discov*, 2018. **23**(10): p. 1092–1099.
96. Tikka, S., et al., CADASIL and CARASIL. *Brain Pathol*, 2014. **24**(5): p. 525–44.
97. Cheng, H., et al., HtrA1 suppresses the growth of pancreatic

cancer cells by modulating Notch-1 expression. *Braz J Med Biol Res*, 2018. **52**(1): p. e7718.

98. Globus, O., et al., High-Temperature Requirement A1 (Htra1) – A Novel Regulator of Canonical Wnt Signaling. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 17995.

99. Klose, R., et al., Inactivation of the serine protease HTRA1 inhibits tumor growth by deregulating angiogenesis. *Oncogene*, 2018. **37**(31): p. 4260–4272.

100. Launay, S., et al., Htra1-dependent proteolysis of TGF-beta controls both neuronal maturation and developmental survival. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(9): p. 1408–16.

101. Graham, J.R., et al., Serine protease HTRA1 antagonizes transforming growth factor-beta signaling by cleaving its receptors and loss of HTRA1 in vivo enhances bone formation. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74094.

102. Larkin, D.J., et al., Inflammatory markers associated with osteoarthritis after destabilization surgery in young mice with and without Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE). *Front Physiol*, 2013. **4**: p. 121.

103. Deng, Y., et al., Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis*, 2022. **9**(1): p. 62–79.

104. Davis, M.D., et al., The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17. *Arch Ophthalmol*, 2005. **123**(11): p. 1484-98.
105. Ferris, F.L., et al., A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18. *Arch Ophthalmol*, 2005. **123**(11): p. 1570-4.
106. Lim, L.S., et al., Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2012. **379**(9827): p. 1728-38.
107. Varma, R., et al., Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in Chinese American Adults: The Chinese American Eye Study. *JAMA Ophthalmol*, 2016. **134**(5): p. 571-577.
108. Chen, C.Y., et al., N-Terminomics identifies HtrA1 cleavage of thrombospondin-1 with generation of a proangiogenic fragment in the polarized retinal pigment epithelial cell model of age-related macular degeneration. *Matrix Biol*, 2018. **70**: p. 84-101.
109. Edgington, L.E., M. Verdoes, and M. Bogyo, Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. *Curr Opin Chem Biol*, 2011. **15**(6): p. 798-805.
110. Fonovic, M. and M. Bogyo, Activity based probes for proteases: applications to biomarker discovery, molecular imaging and drug screening. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(3): p. 253-61.

111. Serim, S., U. Haedke, and S.H. Verhelst, Activity-based probes for the study of proteases: recent advances and developments. *ChemMedChem*, 2012. **7**(7): p. 1146–59.
112. Fonovic, M. and M. Bogoy, Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert Rev Proteomics*, 2008. **5**(5): p. 721–30.
113. William Percy, H., W. Sasala Roshinie, and T. Edward William, Activity Based Chemical Proteomics: Profiling Proteases as Drug Targets. *Current Drug Discovery Technologies*, 2008. **5**(3): p. 200–212.
114. Heal, W.P., T.H. Dang, and E.W. Tate, Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chem Soc Rev*, 2011. **40**(1): p. 246–57.
115. Nam, H.Y., et al., Activity-Based Probes for the High Temperature Requirement A Serine Proteases. *ACS Chem Biol*, 2020. **15**(9): p. 2346–2354.

## ABSTRACT

### Development of Chemical Probes for Exploring and Regulating Serine Protease Activity

Soo Jung Han

Department of Next Generation

Applied Sciences

Graduate School of

Sungshin University

Age-related macular degeneration is a progressive degenerative disease of the macular region of the retina, with hyperactivation of the HtrA1 serine protease being a key pathological mechanism. HtrA1 degrades extracellular matrix, weakening retinal structure and inducing abnormal neovascularization, leading to vision loss. This study aimed to develop an activity-based probe capable of selectively tracking and modulating HtrA1 activity, providing a tool for age-related macular degeneration diagnosis and therapeutic development.

To overcome the limitations of the existing LFLV-DPP probe, the tetrapeptide structure was simplified into a tripeptide design. Valine was fixed at the P1 position and phenylalanine at the P3 position, while various hydrophobic residues were introduced at the P2

position to improve enzyme selectivity and cell permeability. The tripeptide-based probe synthesized using solid-phase peptide synthesis demonstrated superior cell permeability and improved IC<sub>50</sub> values compared to its predecessors. The probe exhibited efficient labeling performance in HeLa and U-87 MG cells and successfully detected HtrA1 activity in human serum.

Additionally, a tripeptide-based inhibitor was synthesized using the probe's structure as a template. This inhibitor exhibited greater inhibitory effects than the LFLV-DPP-derived inhibitors. The tripeptide-based probes and inhibitors developed in this study demonstrated enhanced enzyme selectivity and inhibitory efficacy, establishing their potential utility for the diagnosis and therapeutic development of age-related macular degeneration and related diseases.

However, additional research is required to address the issue of non-specific binding to serum albumin. This work provides a robust tool for advancing enzyme research and precision medicine, offering a platform for selective detection and modulation of HtrA1, as well as validation of disease-related biomarkers and development of novel therapeutics.