



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 청구 논문

퇴행성 뇌 질환에 관여하는  
단백분해효소의 실시간 활성 탐색을  
위한 화학 프로브의 개발

-퇴행성 뇌 질환에 관여하는 특정 효소와  
선택적으로 반응하여 형광신호를 나타내는  
화학 프로브의 생물학적 평가-

2018

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과

홍종아

퇴행성 뇌 질환에 관여하는  
단백분해효소의 실시간 활성 탐색을  
위한 화학 프로브의 개발

-퇴행성 뇌 질환에 관여하는 특정 효소와  
선택적으로 반응하여 형광신호를 나타내는  
화학 프로브의 생물학적 평가-

이 지 연 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2017년 11월

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과

홍종아

# 인 준 서

홍종아의 석사학위 논문으로 인준함

2017년 11월

심사위원장 ..... 채 정 현 ..... (서명 또는 인)

심 사 위 원 ..... 이 지 연 ..... (서명 또는 인)

심 사 위 원 ..... 강 창 수 ..... (서명 또는 인)

성신여자대학교 일반대학원

## 논문개요

화학 프로브는 특정 단백질과 선택적으로 결합하여 단백질의 기능 및 활성을 탐색할 수 있는 저분자 물질로 기초 및 응용 화학, 생물학 연구에서 많이 활용되는 도구이다. 본 연구에서는 퇴행성 뇌 질환과 관련이 있는 여러 특정 효소와 선택적으로 반응하여 형광 신호를 나타내는 화학 프로브 및 특정 세포소기관을 타겟으로 하는 분자 수송체를 합성하여 이들의 생화학적 특성을 탐색하였다.

첫째, Asparaginyl endopeptidase (AEP 또는 legumain)를 타겟으로 하는 활성 기반 프로브(activity-based probe)를 합성하고 살아있는 세포 및 추출물에서 프로브의 형광 신호 변화를 다양한 분석 기법을 활용하여 탐색하였다. 기존에 개발된 활성 기반 프로브의 구조와 달리 본 연구에서는 warhead에 전자 분포 변화에 따라 형광 신호가 변하는 특성을 갖는 naphthalimide 유도체를 접합함으로써 효소와의 선택적 반응을 통해 형광 신호가 증가하도록 디자인된 스마트 프로브를 합성하였다. SDS-PAGE 실험을 통해 세포 추출물 및 살아있는 세포에서 프로브와 효소 간의 선택적인 반응 및 세포막 투과성을 확인하였으며, 공 초점 현미경을 이용하여 여러 종류의 살아있는 세포에서 AEP의 활성을 관찰하였다.

둘째, 펩타이드 모사체인 펩토이드 구조를 활용하여 mitochondria-targeting transporter를 디자인 및 합성하고 이들 물질의 세포 내에서의 분자 수송 양상 및 효율을 탐구하였다. 기존에 연구된 peptide 기반 mitochondria-targeting transporter는 mitochondria의 inner mitochondrial membrane (IMM)의 특성으로 인해 세포 내부로 분자가 들어가는 것이 어려울 뿐만 아니라 proteolysis reaction에 의해 분해가

잘 일어나 살아있는 생체 모델에 적용 시 효율이 떨어진다는 단점이 있다. 본 연구에서는 peptide의 특징은 유지하면서 기존의 단점을 극복하기 위해 backbone의  $\alpha$ -carbon이 아닌 질소 원자에 곁가지가 붙어있는 peptoid를 이용해 mitochondria-targeting peptoid (MTP)를 합성하였으며 이들 MTP 라이브러리가 mitochondria로 선택적으로 수송되는 정도를 정량하였다. 먼저 공 초점 현미경을 사용하여 살아있는 세포에서 mitochondria와 선택적으로 결합하는지 확인하였으며, JC-1 assay를 통해 세포 독성을 확인하였고 flow cytometry (FACS)를 이용해 살아있는 세포에서의 형광 광도를 측정하여 각 물질의 세포 투과도를 정량하였다.

셋째. High temperature requirement A (HtrA)에 선택적으로 결합하는 활성 기반 프로브를 디자인 및 합성하였다. HtrA는 serine protease의 한 종류로 mitochondria에서 다양한 신경 전달 경로를 유발 및 조절 하는 등 다양한 cellular processes에 중요한 역할을 하며 특히 알츠하이머에 원인 중 하나인 tau protein의 분해와도 연관이 있다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 여러 가지 HtrA 활성 기반 프로브를 디자인 및 합성하여 다양한 serine protease와의 선택성을 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

본 연구를 통해 개발된 활성 기반 프로브들은 AEP 및 HtrA의 활성 변화와 이들 효소가 관여하는 다양한 생화학적 경로를 확인하는 데 유용한 도구로써 활용될 수 있으며, 나아가 퇴행성 뇌 질환의 발병 기전을 설명하는데 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

# 목 차

논문 개요

List of Figures

List of Tables

List of Scheme

I. 서론	1
1. Asparaginyl endopeptidase (AEP)와 선택적으로 결합하여 AEP 활성을 영상화 할 수 있는 activity based probes의 개발	1
2. Peptoid를 기반으로 한 mitochondria-targeting transporter의 개발	5
3. High temperature requirement protein A (HtrA)와 선택적으로 결합하여 효소 활성을 영상화 할 수 있는 activity based probes의 개발	8
II. 결과 및 고찰	10
1. Asparaginyl endopeptidase (AEP)와 선택적으로 결합하여 AEP 활성을 영상화 할 수 있는 ‘smart activity-based probe의 개발	10
1.1 Solid phase synthesis technique을 활용한 스마트 프로브 합성	10
1.2 분광학적 분석을 통한 AEP와의 특이적 결합 확인	13
1.3. SDS-PAGE 를 이용한 AP-1의 표지 효율성 탐색	16

1.4 Confocal microscopy을 이용한 live cell imaging . . . .	18
2. Peptoid를 기반으로 한 mitochondria-targeting transporter의 개발 . . . . .	26
2.1. Mitochondria targeting peptoid (MTP)의 디자인 및 합성 . . . . . .	26
2.2. 공 초점 현미경을 이용한 live cell imaging . . . . .	28
3. High temperature requirement protein A (HtrA)와 선택적으 로 결합하여 효소 활성을 영상화 할 수 있는 activity based probes의 개발 . . . . .	32
3.1 HtrA에 특이적으로 결합하는 activity based probes 합성 .	32
3.2 SDS-PAGE를 이용한 정제된 단백질 및 살아있는 세포에서의 선 택성 실험 . . . . .	35
III. 결론 . . . . .	38
IV. 실험 . . . . .	40
1. 실험기기 및 시약 . . . . .	40
2. 실험 방법 . . . . .	41
2.1 합성 . . . . .	41
2.2 Direct labeling of endogenous AEP in intact cells and cell lysates . . . . .	55
2.3 Live cell imaging of active AEP . . . . .	55
2.4 Live cell imaging of MIP . . . . .	56
2.5 JC-1 assay of MTP . . . . .	56

2.6 Measurement of fluorescence intensity of MTP . . .	56
2.7 Direct labeling of serine protease family in purified protein . . . . .	56
참고문헌 . . . . .	58
Abstract . . . . .	64

## List of Figures

Figure 1.(a) General composition of a direct ABP, (b) Examples of ABPs: NIRF labelled activity-based probe, Quenched activity-based probe

Figure 2. (a) Structures of AP-1 and the control probes (b) Schematic-diagram of a smart ABP with a turn-on response

Figure 3. (a) Examples of Mitochondria-targeting transporter, (b) A representative structure of mitochondria-penetrating peptide (MPP)s

Figure 4. (a) HtrA proteases. (b) Biological functions of mammalian HtrA proteases

Figure 5. Structures of the HtrA-targeting activity-based probes

Figure 6. (a) Fluorescence emission spectra of AP-1, (b) Fluorescence emission intensity of AP-1 in buffers in the presence and absence of DTT

Figure 7. Mass spectrometry data of AP-1 in the presence of excess DTT, showing a mass peak corresponds to a DTT adduct

Figure 8. Fluorescence emission intensity of (a) AP-1 and (b) the control probes in the presence of different

amounts of RAW cell lysate

Figure 9. Comparison of the AEP labelling by AP-1 and the control probes in RAW cell lysates

Figure 10. Comparison of the AEP labelling by AP-1 and the control probe intact (a) NIH 3T3 cell, (b) RAW 264.7 cell and (c) HT 22 cell

Figure 11. (a) Quantified mean fluorescence intensity of AP-1, Control 1, and Control 2 in the absence and presence of an AEP inhibitor, and (b) lysosomal colocalization ratio

Figure 12. Representative images of NIH-3T3 cells treated with AP-1

Figure 13. Representative images of NIH-3T3 cells treated with Control 1

Figure 14. Representative images of NIH-3T3 cells treated with Control 2

Figure 15. Representative images of NIH-3T3 cells pre-treated with AEP inhibitor, and labelled with AP-1, Control 1,2

Figure 16. Live cell imaging of active AEP in HCT-116 human colon cancer cells: (a) representative images of cells labelled with AP-1 for 2 h, (b) cellular colocalization, c) protein bands labelling active AEP in HCT-116 cells

Figure 17. Live cell imaging of active AEP in HT-22 cells:

(a) representative images of cells labelled with AP-1 for 2 h and (b) subcellular activity of AEP upon treatment with  $A\beta$

Figure 18. Representative images of HeLa cells treated with MTPs

Figure 19. The Pearson's correlation coefficients for MTPs 1-8

Figure 20. (a) JC-1 assay, (b) fluorescence intensity measured by FACS

Figure 21. Comparison of HP probes reacted with (a) trypsin, chymotrypsin, elastase, (b) HtrA 1 & 2, DegP proteases

Figure 22. Comparison of the HtrA labelling by HP probes (a) in intact HeLa cells, (b) live cell imaging in HeLa cells

Figure 23. Compound 1

Figure 24. Compound 2

Figure 25. Compound 3

Figure 26. Compound 4

Figure 27. Compound 5

Figure 28. Compound 6

Figure 29. Compound 7

Figure 30. Compound 8

Figure 31. Compound 9

Figure 32. Compound 10

Figure 33. Compound 11

## List of Tables

Table 1. Mitochondria-targeting peptoids (MTP)

Table 2. Structure of HtrA-targeting activity-based probe

## List of Scheme

Scheme 1. Synthesis of Naphthalimide derivatives

Scheme 2. Synthesis of AP-1, Control 1, 2 and AEP inhibitor

Scheme 3. Synthesis of diphenylphosphonate electrophile

Scheme 4. Synthesis of HtrA-targeting activity-based probe

## I. 서론

본 연구는 퇴행성 뇌 질환의 발병 과정에 관련되어 있는 것으로 알려진 asparaginyl endopeptidase (AEP) 및 high temperature requirement A 2 (HtrA 2) serine protease와 선택적으로 결합하여 형광 신호를 발생시키는 활성 기반 프로브 (activity-based probes, ABPs)를 개발하고 프로브들의 선택성 및 효소 반응성을 세포 내에서 탐색하고자 한다. 또한, 펩타이드 모사체인 펩토이드를 기반으로 한 mitochondria-targeting peptoid (MTP)를 디자인 및 합성하여 세포 투과성 및 표지 능력을 분석하고 검증된 유도체들을 본 연구에서 합성한 HtrA 2 targeting ABP와 연결시켜 활용하고자 한다.

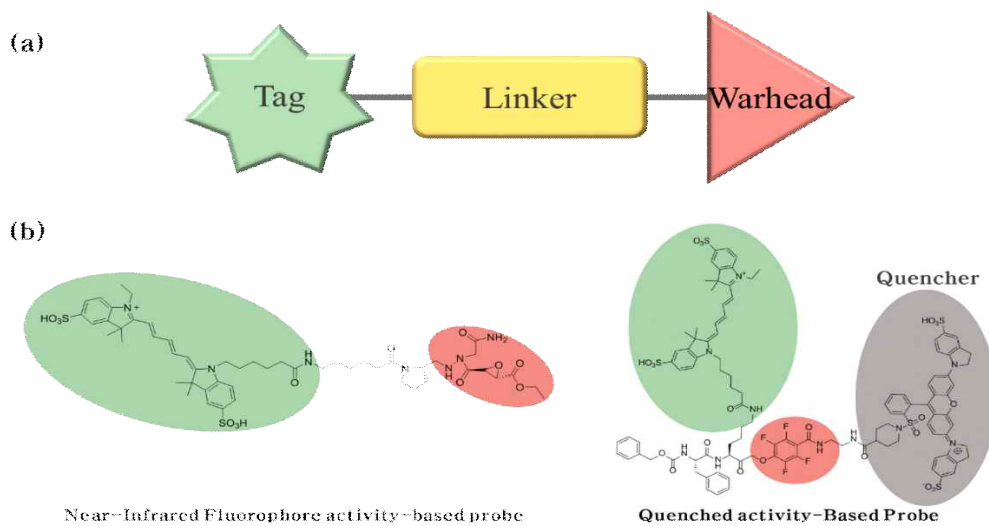
### 1. Asparaginyl endopeptidase (AEP)와 선택적으로 결합하여 AEP 활성을 영상화 할 수 있는 activity-based probes의 개발

Asparagine endopeptidase (AEP 또는 legumain)은 lysosomal cysteine protease 중의 하나로 substrate의 C-terminal에 있는 asparagine을 인식해 peptide 결합을 분해한다.<sup>1</sup> AEP는 면역세포 발현<sup>2</sup>, 염증반응<sup>3,4</sup> 등에 관여하며, 최근에는 과발현된 AEP가 cancer 및 acute lymphoblastic leukemia, Alzheimer's disease와도 연관이 있다고 알려졌다.<sup>5,6</sup> 따라서 AEP에 선택적으로 결합하여 실시간으로 AEP의 활성을 알 수 있는 화학 프로브의 개발은 AEP의 기능 연구와 이해를 돕는 데 중요한 역할을 할 수 있다.

기존에 개발된 화학 프로브들은 대부분 substrate 기반의 형광 물질로 효소의 peptide bond 분해 반응을 이용한다. 기질 기반 프로브 (substrate-based probe)는 substrate와 비슷한 구조로 절단 서열에 형광 물질이 결합되어 있으며 효소에 의해 peptide가 끊어지면서 형광 물질

을 방출하게 된다. 이때 하나의 효소가 다수의 프로브 분자를 분해하므로 신호 증폭이 가능하여 감도가 높고 활성의 정량이 쉽다는 장점이 있으나 enzyme assay와 같은 정제된 효소를 활용하지 않는 경우 신호의 선택성이나 검출 방법에 한계가 있어 활용 범위가 제한적이라는 단점이 있다. 반면, 효소의 active site와 직접적으로 결합하는 활성 기반 프로브를 활용하게 되면 기존에 개발된 기질 기반 물질들의 한계를 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 효소의 활성 변화 관찰 및 분리 정제까지 가능하기 때문에 다양한 분야에 응용이 가능하다.<sup>7,8</sup>

활성 기반 프로브는 일반적으로 세 가지 구조적 요소로 이루어져 있다. 1) 효소의 active site와 직접 반응하여 covalent bond를 형성하는 electrophile (warhead), 2) 효소를 인식하여 타겟에 선택적으로 결합할 수 있도록 돕는 선택성 그룹 (linker), 3) 타겟의 확인과 분리, 정제 및 영상화에 이용될 수 있는 리포터 그룹 (reporter tag, 형광물질)으로 나뉜다.<sup>9,10</sup>



**Figure 1. (a) General composition of a direct ABP, (b) Examples of ABPs: NIRF labelde activity-based probe, Quenched activity-based probe.<sup>11,12</sup>**

이전에 보고된 near-infrared fluorophore (NIRF) labelled activity-based probe (Figure 1b)는 azaepoxide electrophile을 이용한 것으로 legumain에 대하여 높은 선택성을 갖는 반면 legumain과 결합하지 않은 자유 프로브가 방출하는 형광으로 인해 형광 신호를 측정하기 전에 자유 프로브를 제거하는 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 이를 보완하기 위해 자유 프로브의 형광 방출을 억제하는 quencher를 결합시킨 Quenched activity-based probe (qABP, Figure 1b)는 NIRF 프로브 보다 민감성과 특이성이 향상되었지만, 상대적으로 큰 분자량을 갖는 quencher로 인하여 세포 내부로의 확산에 영향을 줄 수 있다는 단점이 있다. <sup>11,12</sup>

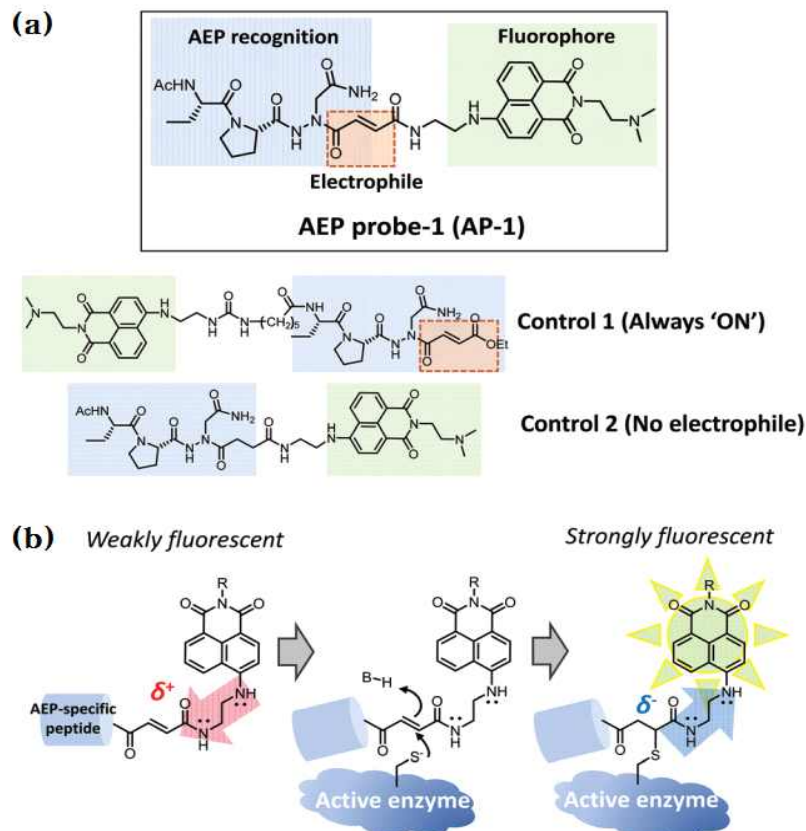


Figure 2. (a) Structures of AP-1 and the control probes (b) Schematic diagram of a smart ABP with a turn-on response.<sup>13</sup>

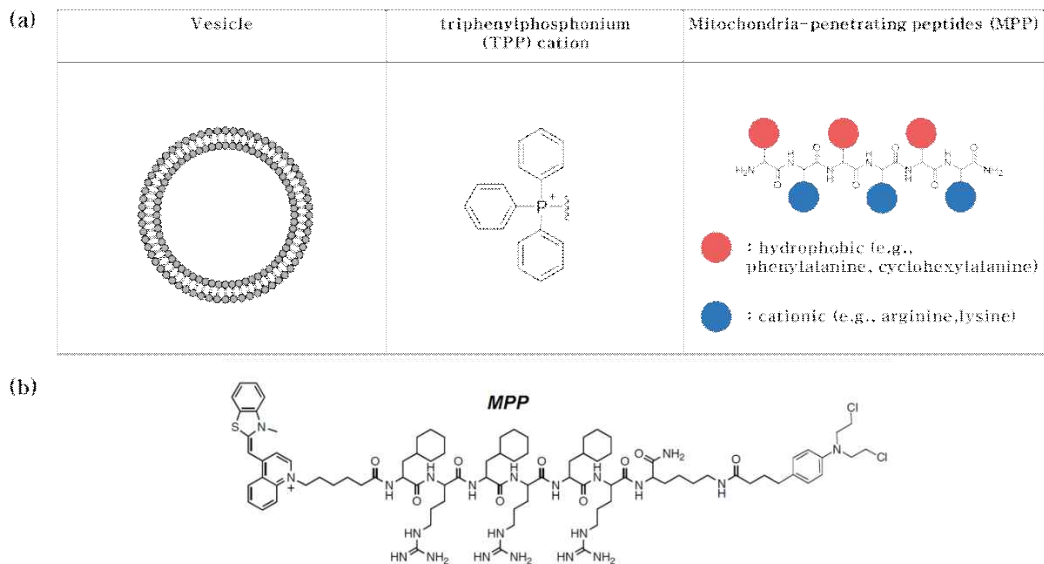
따라서 본 연구에서는 quencher-fluorophore 개념을 도입함과 동시에 기존에 개발된 qABP의 단점을 보완하기 위하여 warhead (electrophile)의 right hand side에 전자 분포 변화에 따라 형광 신호가 변하는 특성을 갖는 naphthalimide 유도체를 직접 연결함으로써 legumain과 선택적 결합 시 photoinduced electron transfer (PeT)로 인해 형광이 turn-on 되도록 디자인된 스마트 프로브 AEP probe-1 (AP-1)을 합성, 살아있는 세포와 추출물에 처리하여 효소 활성 변화를 확인하였으며 이를 통해 다양한 질병 모델, 특히 알츠하이머병의 발병 과정에서의 AEP의 역할을 연구하고자 한다.

## 2. Peptoid를 기반으로 한 mitochondria-targeting transporter의 개발

Mitochondria는 세포의 에너지 공급원으로써 세포의 사멸 및 생존에 관여하는 세포소기관이다.<sup>14</sup> 최근 여러 연구 결과를 보면 mitochondrial DNA의 변이 및 oxidative stress로 인한 노화가 mitochondria의 기능 장애를 발생시키며<sup>15</sup> 이로 인해 노화, 당뇨, 암 뿐만 아니라 Alzheimer's disease, Parkinson's disease, 그리고 Huntington's disease와 같은 퇴행성 뇌 질환에 관여한다고 알려졌다.<sup>16</sup>

Mitochondria는 여러 질병을 치료하기 위한 중요한 표적이지만 inner mitochondrial membrane (IMM)이 갖는 특성이 확산 수송을 제한하기 때문에 분자가 mitochondria 내부로 접근하기 쉽지 않다. 따라서 mitochondria-targeting transporter의 개발은 mitochondria 특이적 치료에 도움이 될 것이다.<sup>17</sup>

이전에 연구된 mitochondria-targeting transporter로는 vesicle, triphenylphosphonium (TPP) cation, mitochondria-penetrating peptides (MPP)가 있다 (Figure 3). 첫째, vesicle은 liposome이나 nanoparticle을 이용하는 것으로 비교적 고분자나 charge를 띄는 cargo를 운반할 수 있지만 합성이 복잡하고 vesicle의 크기가 커지면 면역 반응을 일으킬 수 있으며 수송 효율성이 떨어진다. 둘째, triphenylphosphonium (TPP) cation은 3개의 hydrophobic phenyl 그룹과 한 개의 양전하를 갖는 대표적인 mitochondria 분자 수송 물질로 cargo와의 연결이 쉽고 낮은 toxicity를 갖는다는 장점이 있지만 고분자 물질의 수송을 위해서는 다수의 cation을 결합시켜야 하기 때문에 high cationic charge에 의해 독성을 유발할 가능성이 높다.<sup>18,19</sup>



**Figure 3. (a) Examples of Mitochondria-targeting transporter, (b) A representative structure of the mitochondria-penetrating peptide (MPP)s.<sup>21</sup>**

마지막으로 mitochondria-penetrating peptides (MPP)는 cationic 하면서 hydrophobic residues를 갖는 peptide를 이용하여 합성한다. 기존에 알려진 MPP로는 D-(KLAKLAK)<sub>2</sub> proapoptotic peptides, Mn-porphyrin-oligopeptide conjugates, SS tetrapeptides, Choline esters of glutathione, N-acetyl-L-cysteine가 있다.<sup>20</sup> MPP는 다양한 cargo를 mitochondria 내부로 전달할 수 있다는 장점이 있지만<sup>21</sup> peptide의 구조적인 한계로 생체 내에서 proteolysis reactions에 의해 분해가 잘 일어나 살아있는 생체 내에 적용 시 수송 효율이 현저하게 떨어질 가능성이 크다.<sup>22</sup> 이를 보완하기 위해 본 연구에서는 peptide와 구조적으로 유사한 모사체인 peptoid를 이용하여 mitochondria-targeting peptoid (MTP)를 합성하였다.

Peptoid는 peptidomimetics로 peptide와는 다르게 backbone의  $\alpha$ -carbon이 아닌 질소 원자에 곁가지가 붙어 있는 구조다.<sup>23</sup> Peptoid를 활용하게 되면 peptide의 다양한 특징을 유지하면서 동시에 효소에 의한 분해가 일어나지 않으며 비 면역 특이적이고 극한 조건에서도 구조적 안정성을 유지할 수 있는 등 peptide가 지닌 단점을 극복할 수 있다는 장점이 있다. Peptoid의 이와 같은 특징 때문에 현재 다양한 항균 물질, 센서, 분자 수송체 개발 등을<sup>24</sup> 목적으로 많은 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 기존에 알려진 lysine이나 arginine의 peptoid 유도체인 *N*Lys나 *N*btg 및 다양한 hydrophobic group과 chirality를 갖는 잔기를 추가로 도입하여 이전에는 연구되지 않은 새로운 sequence를 도입한 라이브러리를 합성하고 이를 활용하여 물질의 분자 수송 양상 및 효율을 분석하고자 한다. 특히 이들 중 mitochondria로 선택적으로 수송되는 물질을 발굴하여 mitochondrial protease인 HtrA 2를 타겟으로 하는 ABP와 연결시켜 연구에 활용하고자 한다.

### 3. High temperature requirement protein A (HtrA)와 선택적으로 결합하여 효소활성을 영상화 할 수 있는 activity-based probes의 개발

생물학적 과정에서 단백질 형성 시 일어나는 misfold, mislocalize 및 단백질 fragment의 축적은 세포의 기능을 망가트릴 수 있다.<sup>25</sup> 이러한 과정에서 chaperone과 protease는 refolding, localization, degradation의 과정을 거쳐 잘못된 단백질을 없애거나 바로 잡는데 이를 protein quality control이라고 한다.<sup>26</sup> High temperature requirementA (HtrA)는 serine protease의 한 종류로 주로 ATP independent protein quality control과 protein aggregate에 관여하며,<sup>27</sup> regulatory proteins을 절단하거나 격리함으로써 다양한 신경 전달 경로를 유발 및 조절하는 등 cellular processes에 중요한 관여를 한다.<sup>28,29</sup> 특히 알츠하이머에 원인 중 하나인 tau protein의 분해와도 연관이 있다고 보고된 바 있다.<sup>30</sup>

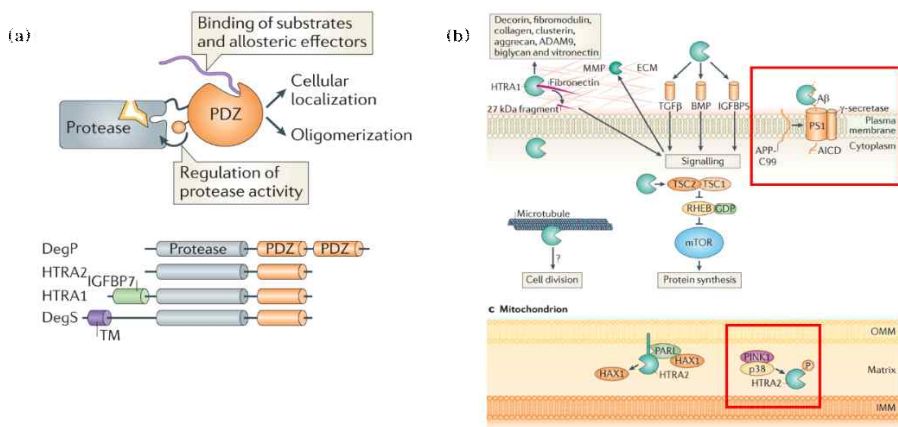


Figure 4. (a) HtrA proteases. (b) Biological functions of mammalian HtrA proteases.<sup>27</sup>



## II. 결과 및 고찰

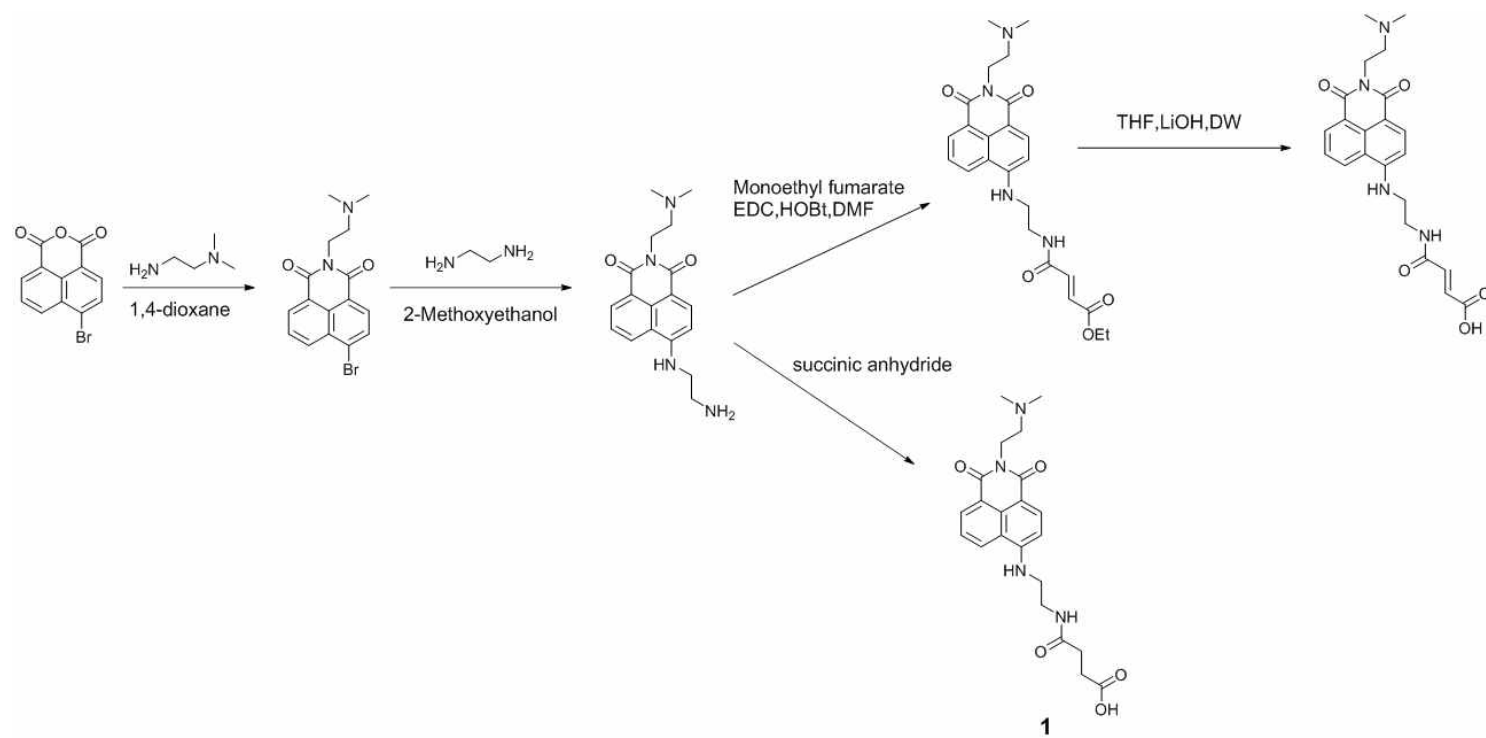
### 1. Asparaginyl endopeptidase (AEP)와 선택적으로 결합하여 AEP 활성을 영상화 할 수 있는 ‘smart activity-based probe’ 의 개발

(본 연구는 최나은, 나여경, 남호연의 공동참여 하에 수행하였으며 *Org. Biomol. Chem.*, 2017, 15, 8018에 출판되었다. 본 섹션의 내용은 출판 내용 중 일부를 발췌 변형하여 작성되었다.)

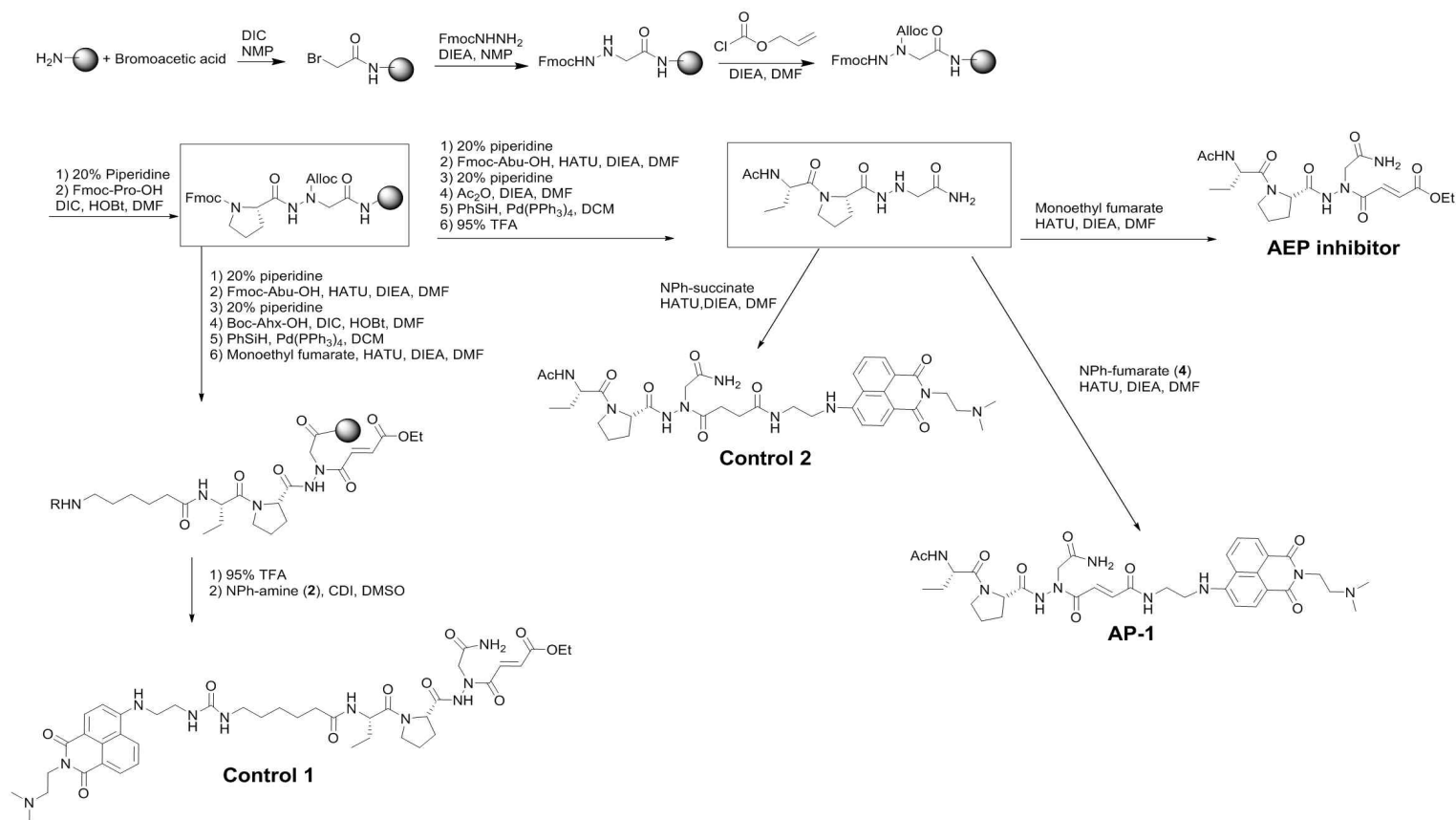
#### 1.1 Solid phase synthesis technique을 활용한 스마트 프로브 합성

본 연구는 asparaginyl endopeptidase (AEP)에 선택적으로 결합하여 AEP의 활성을 영상화할 수 있는 스마트 프로브 AP-1을 디자인하였다. solid phase synthesis technique을 이용해 peptide를 합성하여 HPLC로 정제하였다. 여기에 전자 분포 변화에 따라 형광 신호를 갖는 naphthalimide 유도체를 반응시켜 AEP와의 선택적인 결합 시 photo-induced electron transfer (PeT) 과정에 의해 형광 신호가 변화되는 smart probe AP-1을 합성하였다. 형광물질은 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride 시약을 시작으로 합성하였다 (Scheme 2). 기존의 논문을 참고하여 cysteine기와 반응하는 Michael acceptor (electrophile)를 도입하기 위해 monoethyl fumarate를 결합하였다.

Control은 두 가지로 photoinduced electron transfer (PeT)에 의한 신호 변화가 일어나지 않도록 합성하였다. 첫째, naphthalimide 유도체를 alkyl chain을 이용해 Michael acceptor (electrophile)와 멀리 떨어트려 놓은 Control 1을 합성하였다. 둘째, monoethyl fumarate 대신 succinic anhydride를 사용하여 이중결합이 없는 naphthalimide 유도체로서 AEP의 active site의 cysteine과 공유 결합을 하지 않는 Control 2를 합성하였다.



**Scheme 1. Synthesis of Naphthalimide derivatives.**



**Scheme 2. Synthesis of AP-1, Control 1, 2 and AEP inhibitor.**

## 1.2 분광학적 분석을 통한 AEP와의 특이적 결합 확인

AP-1이 AEP의 active site에 존재하는 thiol과 반응하는지 알아보기 위해 buffer에 과량의 DTT (100 equivalent)를 첨가한 후 AP-1을 처리하여 emission을 측정하였다 (Figure 6b). pH 7.4일 때 AP-1 처리 직후 RFU 값은 2배로 뛰었으며 pH 4.5일 때는 pH 7.4일 때보다 훨씬 느리게 증가하였는데 이는 산성조건이 thiol의 친핵성을 억제했기 때문이라고 생각한다. LC-MS로 위 sample을 분석한 결과 DTT와 AP-1이 결합한 질량에 해당되는 단일 피크가 보였으며 이는 AP-1의 형광 신호 증가는 AEP의 active site에 thiol과의 선택적인 결합에 의해 일어난 것임을 알 수 있다 (Figure 7).

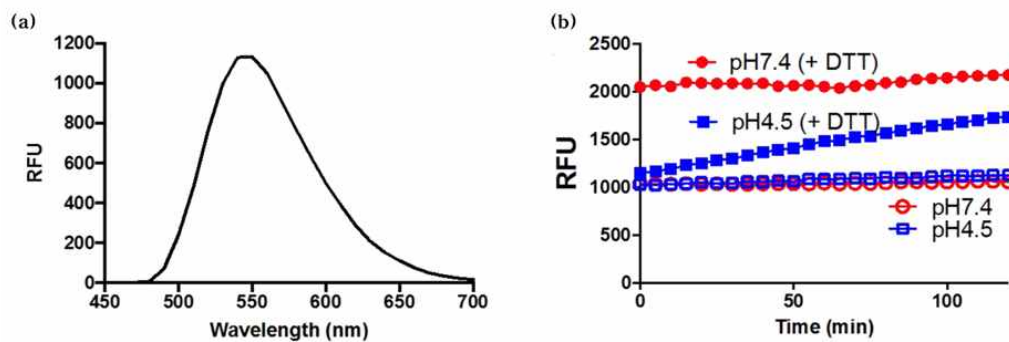


Figure 6. (a) Fluorescence emission spectra of AP-1 (ex. 450 nm) ,(b) Fluorescence emission intensity of AP-1 in buffers in the presence and absence of DTT (ex. 450 nm, em. 550 nm). (나여경이 수행하였다.)

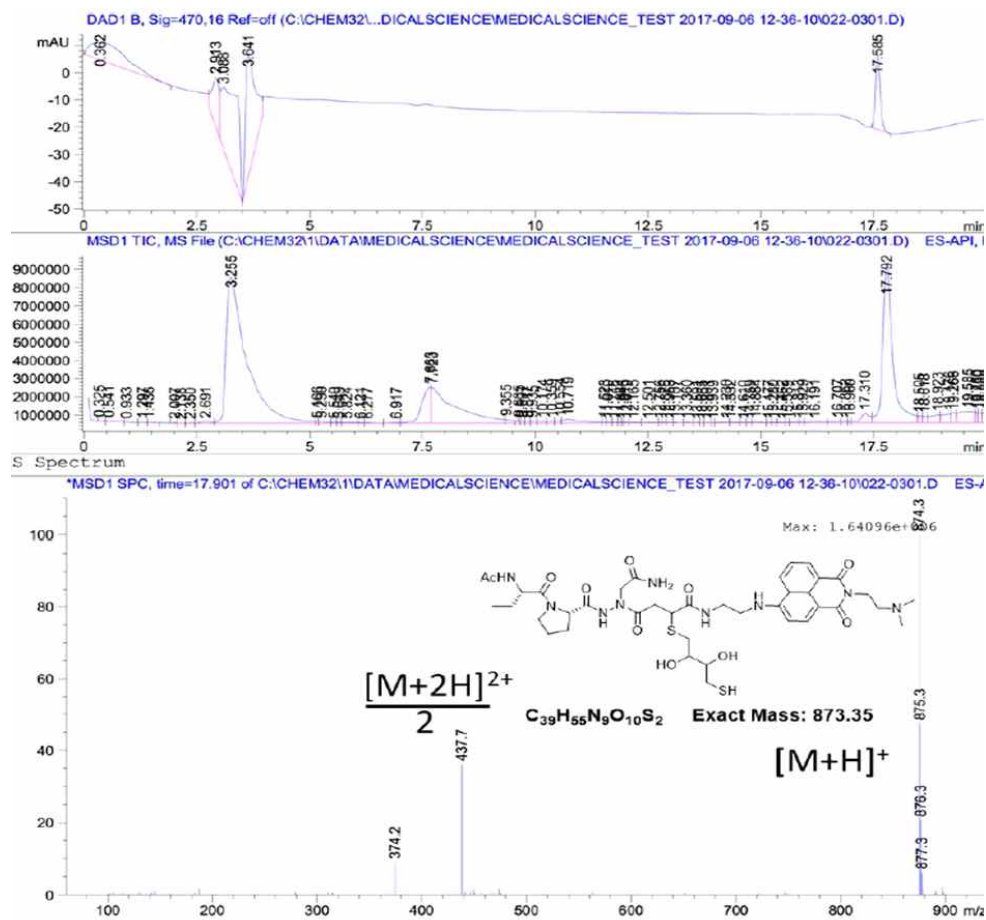
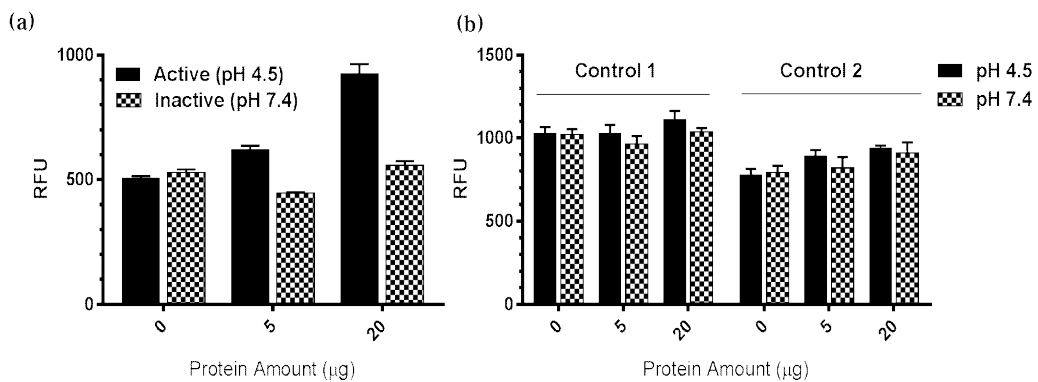


Figure 7. Mass spectrometry data of AP-1 in the presence of excess DTT, showing a mass peak corresponding to a DTT adduct.

AEP와의 특이적인 결합에 의한 AP-1의 신호변화를 조사하기 위해, AEP가 풍부한 RAW 264.7 세포 추출물에서 AP-1의 분광학적 특성을 확인하였다. AEP의 활성 조건을 달리하기 위해 단백질의 양을 다르게 하여 pH 4.5 (active)와 pH 7.4 (inactive)에서 실험하였다. AP-1은 단백질이 없을 때 약한 형광을 띄었으며 pH 7.4일 때는 단백질의 양과 상관없이 무시할 수 있는 신호 변화를 나타내었다. 그에 비해 pH 4.5 조건하에 단백질이 존재할 때 AP-1의 형광은 2배로 증가하였으며 이것이 AEP와의 특이적인 결합에 의한 것인지 확인하기 위해 PeT 과정이 일어나지 않는 Control 1, 2를 처리하여 같은 조건으로 실험하였다. Control 1, 2 모두 단백질의 양, pH에 상관없이 유의미한 신호 증가가 없었으며 이는 AP-1의 형광 신호의 증가가 AEP와의 특이적인 결합에 의해 나타난다는 것을 보인다 (Figure 8).



**Figure 8.** Fluorescence emission intensity of (a) AP-1 (at 540 nm; ex.450 nm) and (b) the control probes at 5 µM in the presence of different amounts of RAW cell lysate.

### 1.3 SDS-PAGE를 이용한 AP-1의 표지 효율성 탐색

AP-1의 표지 효율성을 알아보기 위해 세포 추출물과 살아있는 세포에서 AP-1와 Control을 처리 후 생성된 단백질 밴드들을 SDS-PAGE를 통해 관찰하였다.

RAW lysate에서 AP-1과 Control 1 모두 활성화된 AEP를 선택적으로 표지했으며 Control 2는 아무것도 표지하지 않는 것을 확인하였다. 또한 여러 농도의 probe를 처리한 결과 AP-1은 10 nM의 농도에서 활성화된 효소를 선택적으로 표지하였지만, Control 1은 이보다 낮은 농도인 1 nM서 표지하였다 (Figure 9). 이는 AP-1에서 electrophile과 fluorophore가 인접해 있기 때문에 프로브와 효소 간의 반응성에 영향을 미친 것으로 추측된다.

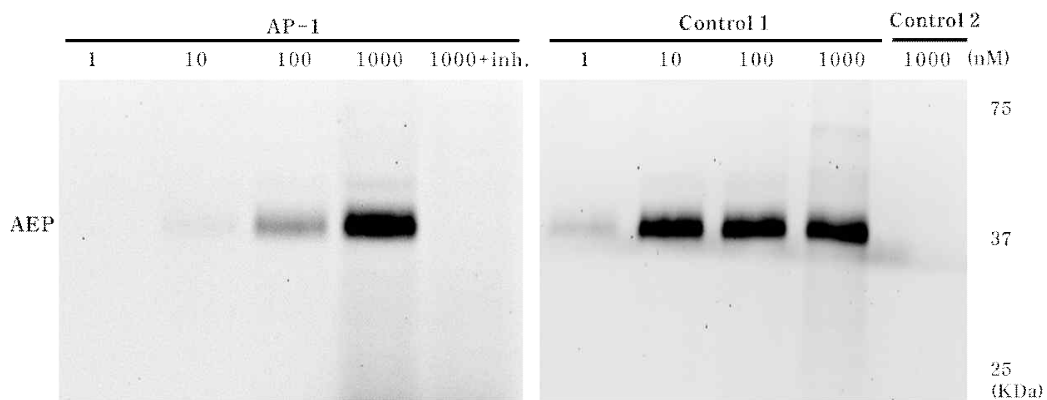
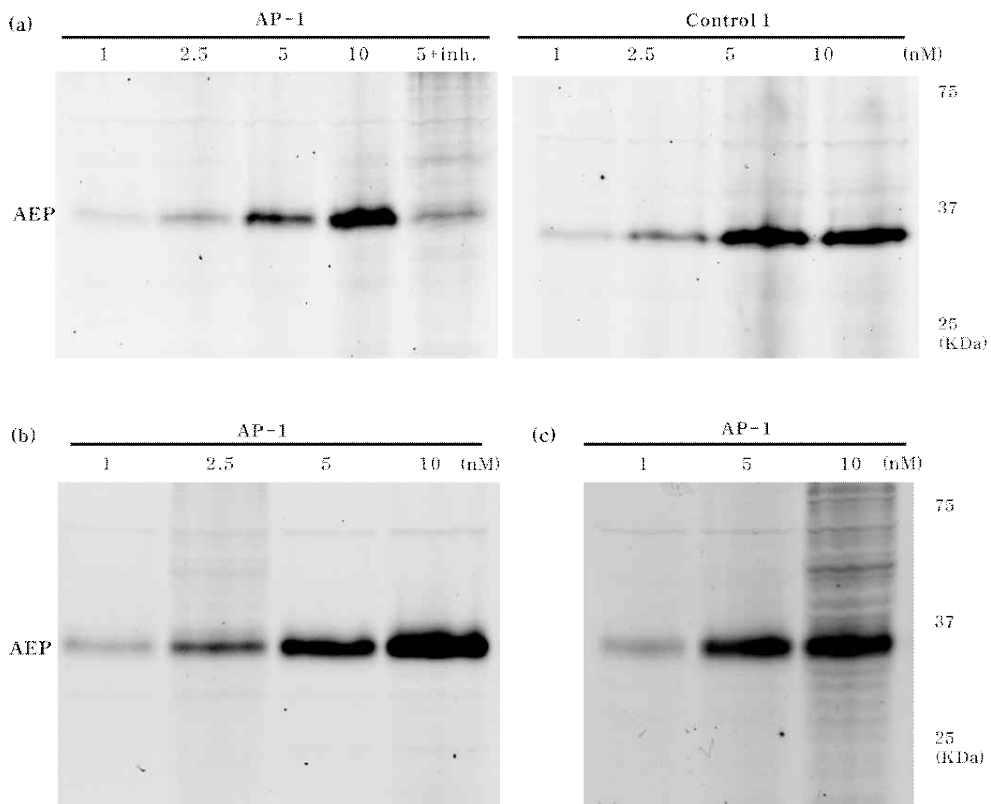


Figure 9. Comparison of the AEP labelling by AP-1 and the control probes in RAW cell lysates.

위 실험을 토대로 살아있는 세포에서의 막 투과성과 선택성을 조사하기 위해, RAW 264.7과 NIH-3T3, HCT 116, HT22 세포에 AP-1과 control 들을 처리한 결과 RAW lysate에서의 AP-1의 반응성은 Control 1보다 낮았지만 두 프로브 모두 살아있는 세포에서 유사한 선택성과 반응성을 보였다. 또한, RAW lysate 및 살아있는 세포에 AEP inhibitor 전처리를 하여 AP-1의 표지가 선택적으로 저해되는 것을 확인하였다 (Figure 10).



**Figure 10. Comparison of the AEP labelling by AP-1 and the control probe intact (a) NIH 3T3 cell, (b) RAW 264.7 cell and (c)HT 22 cell.**

#### 1.4 Confocal microscopy을 이용한 live cell imaging

살아있는 NIH 3T3 세포에 AP-1 및 control 들을 처리하여 AEP의 활성을 공 초점 현미경을 통해 관찰하였다. AP-1 및 control 들을 cell 에 처리한 뒤 30, 60, 120, 180분이 지났을 때의 형광 이미지를 촬영한 뒤 Pearson' s correlation coefficients (Rr) 값을 구하여 프로브의 신호와 lysosome간의 colocalization 정도를 정량하였다.

AP-1 (10 mM)과 Control 1,2 (5 mM)을 처리한 뒤 30, 60, 120, 180분 경과했을 때의 형광 강도를 정량한 결과 AP-1의 형광 신호는 2시간까지 증가한 후 이후에는 형광 광도가 크게 증가하지 않는 반면, Control 1은 시간이 지남에 따라 계속 증가했다. 이는 AP-1은 AEP와 선택적인 반응에 의해 형광의 강도가 증가하는 반면 Control 1은 비 선택적인 반응에 의한 형광의 축적이라고 보여진다. 이것을 확인하기 위해 AEP의 활성을 억제하는 AEP inhibitor를 전처리한 후 AP-1, control 들을 위 실험과 같은 조건으로 처리한 뒤 이미징 촬영을 진행하여 형광 강도를 정량한 결과 AP-1로 표지된 세포는 약한 형광을 나타내었고 시간이 지남에 따라 무시할 수 있는 신호 증가를 보였다. 그러나, Control 1은 시간이 지남에 따라 형광이 증가하는 것을 유지하여, Control 1이 비 선택적인 반응에 의해 형광의 세기가 축적되는 것을 확인하였다. 또한 AEP와 결합이 일어나지 않게 디자인 한 electrophile이 없는 Control 2를 처리했을 때 시간이 지나도 형광이 약하게 나타나는 것을 볼 수 있다.

Figure 11은 probe와 lysotracker 사이의 Pearson' s correlation coefficients (Rr)을 정량한 것으로 lysosomal cysteine protease인 AEP를 타깃 하는 물질 AP-1, Control 1,2와 lysosome에 선택적인 결합을 하는 형광 물질인 lysotracker를 이용하여 이들 형광 신호가 얼마나 겹쳐지는지를 확인하였다. (이때  $Rr = +1$ 은 두 신호 간의 완전한 겹침을

나타내지만  $Rr=0$ 은 상관관계가 없음을 나타낸다.) AP-1의  $Rr$  값을 보면 시간이 지남에 따라 +0.2에서 +0.6까지 증가하였고 Control 1은 +0.2에서 +0.4까지 증가함을 확인하였다. 또한 AP-1의  $Rr$  값이 Control 1 보다 항상 높은 것을 알 수 있다. 이 결과들을 통해 Control 1에 의한 형광 세기 증가는 비특이적 결합에 의한 축적에 기인하고 AP-1이 AEP와 보다 신속하고 선택적으로 반응한다고 볼 수 있다.

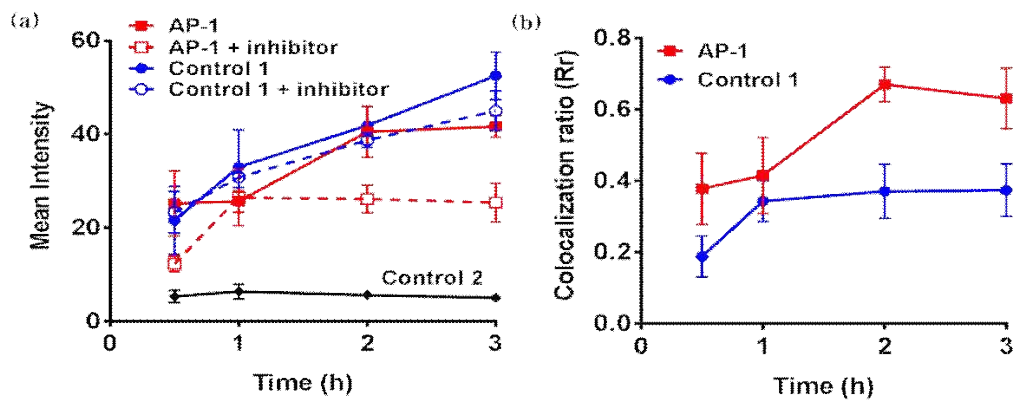
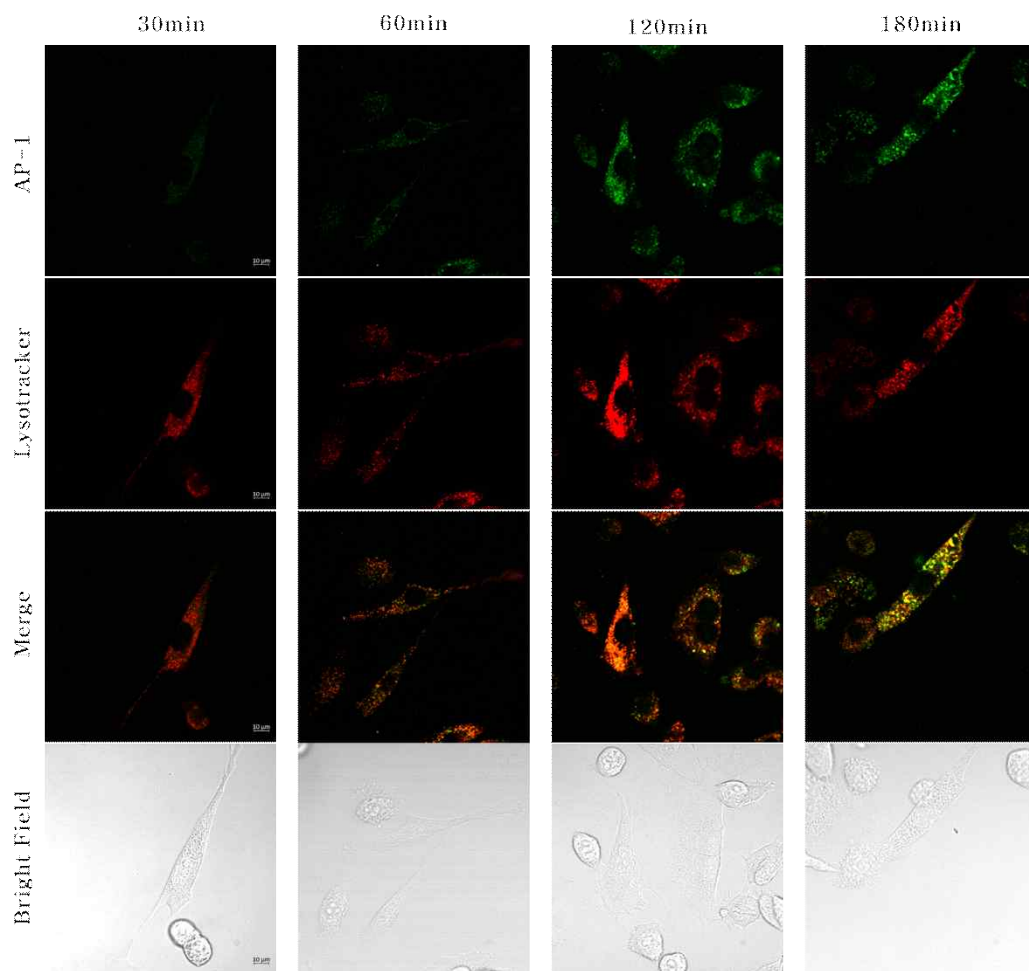
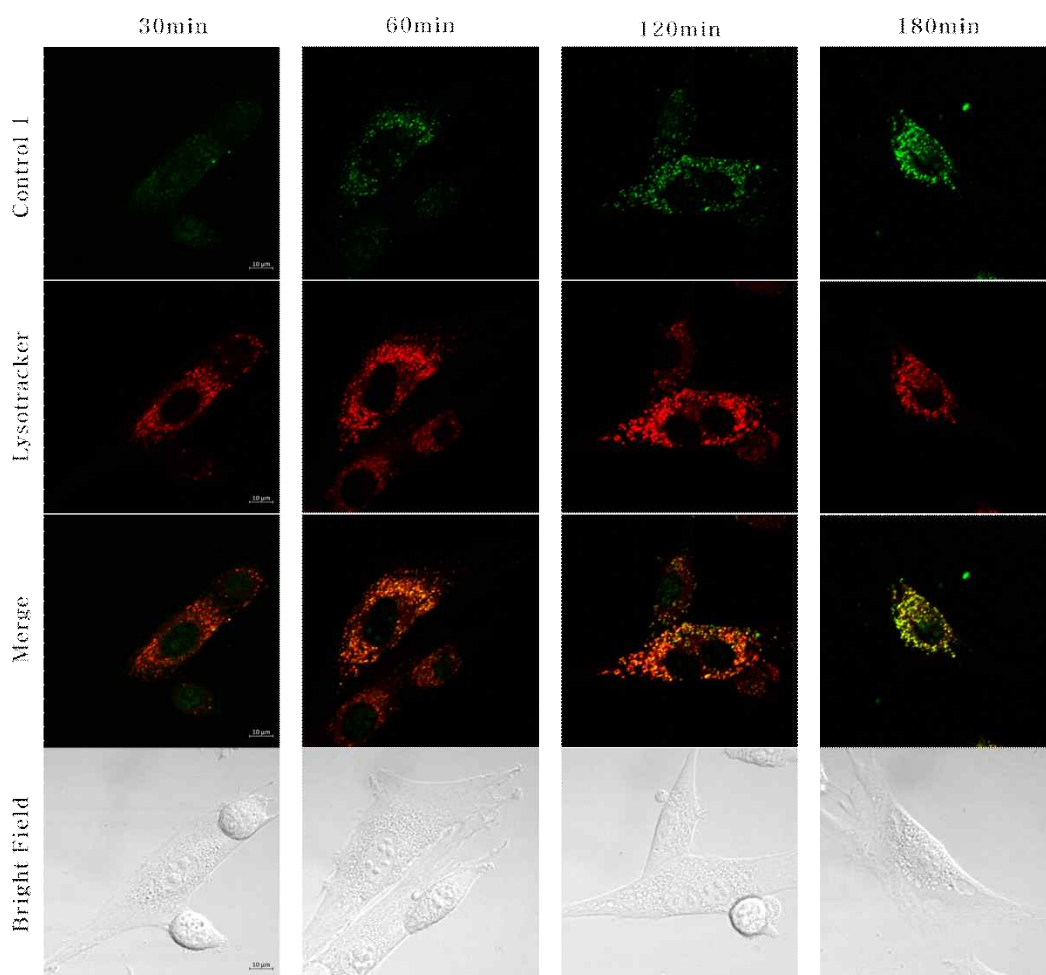


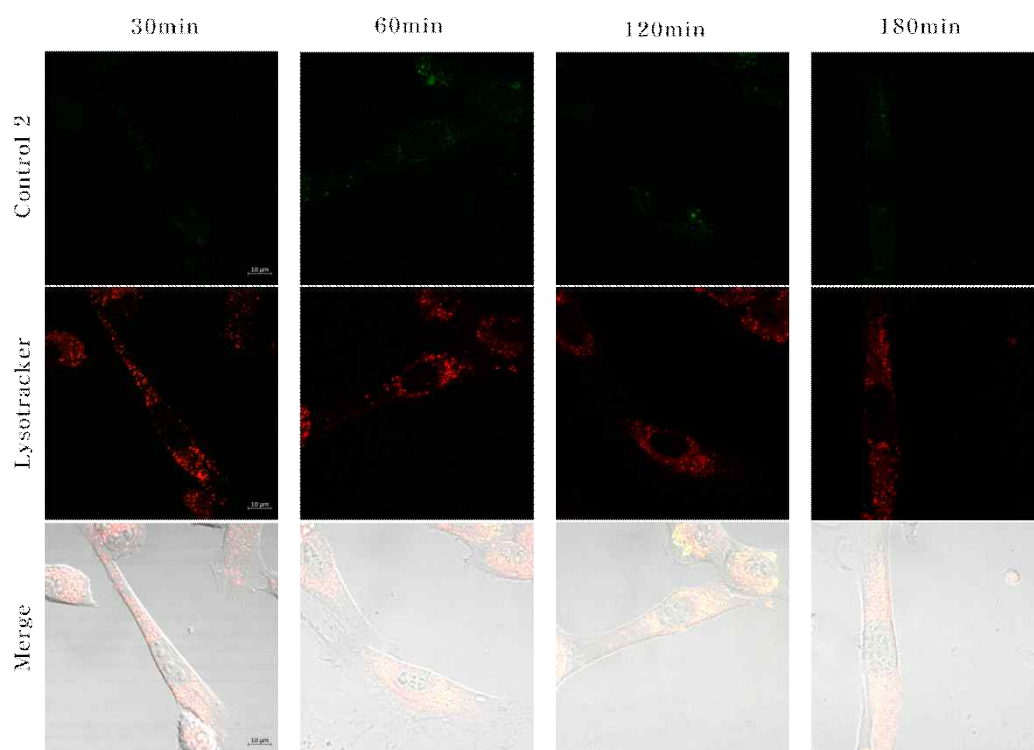
Figure 11. (a) Quantified mean fluorescence intensity of AP-1, Control 1, and Control 2 in the absence and presence of an AEP inhibitor, and (b) lysosomal colocalization ratio.



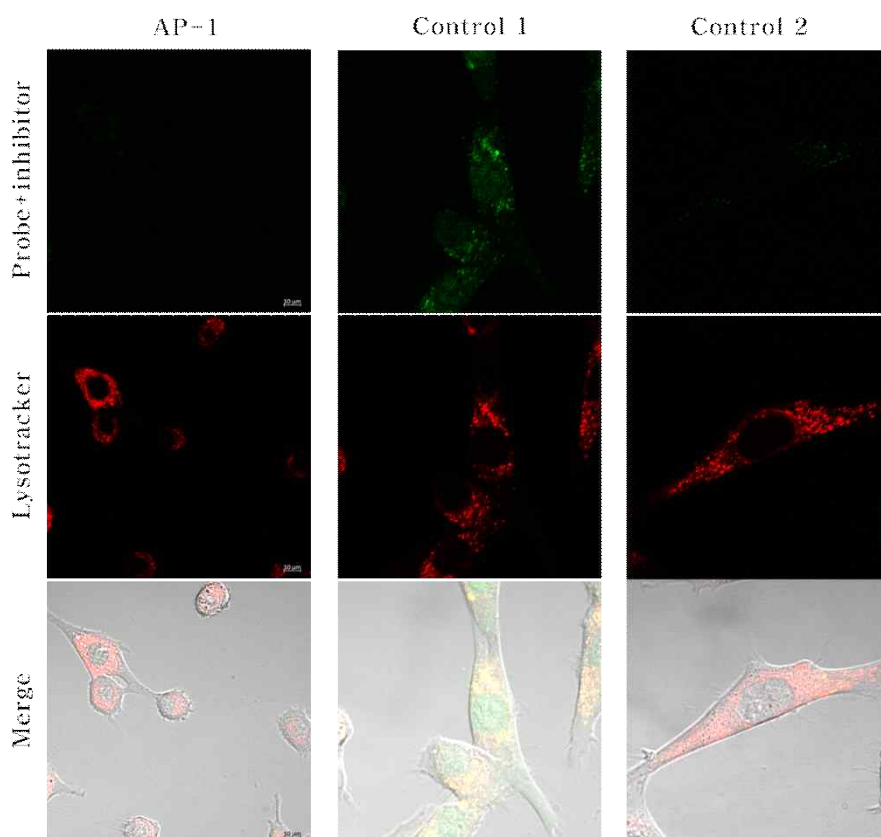
**Figure 12. Representative images of NIH-3T3 cells treated with AP-1 at 10  $\mu$ M.**



**Figure 13. Representative images of NIH-3T3 cells treated with Control 1 at 10  $\mu$ M.**

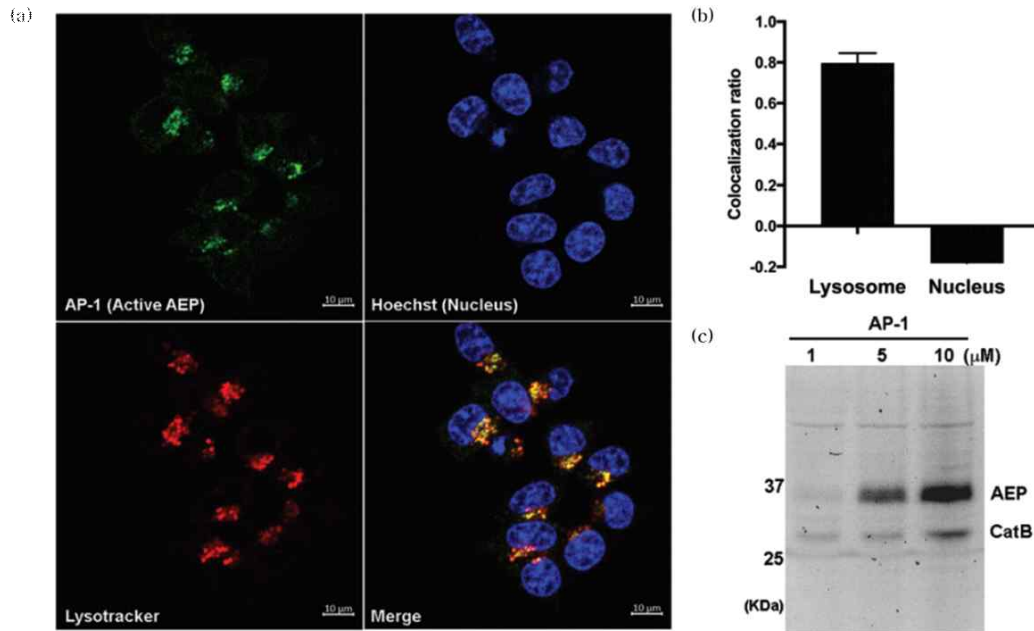


**Figure 14. Representative images of NIH-3T3 cells treated with Control 2 at 10  $\mu$ M.**



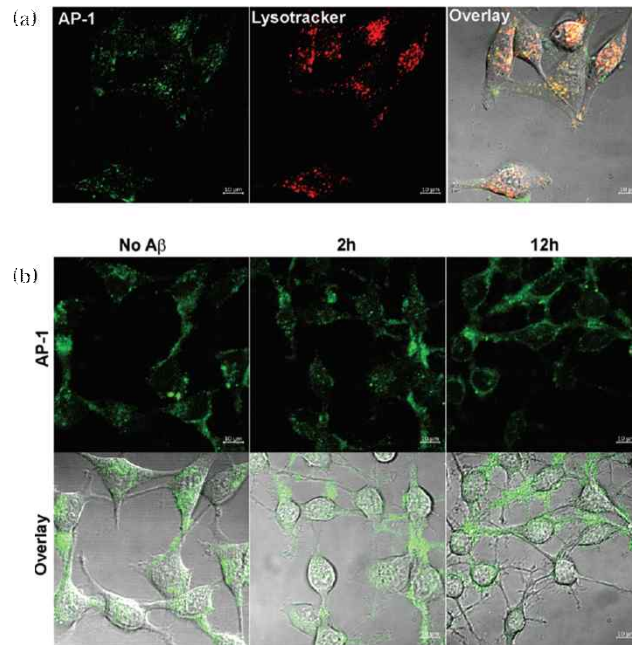
**Figure 15. Representative images of NIH-3T3 cells pretreated with AEP inhibitor (50  $\mu$ M), and labelled with AP-1, Control 1, 2 at 10  $\mu$ M.**

또한, 핵 속에서의 활성 AEP를 관찰하기 위해 human colon cancer 세포인 HCT-116 세포에 AP-1을 처리하여 AEP의 활성을 공 초점 현미경을 통해 관찰하였다. Figure 16을 보면 HCT-116 세포 내 lysosome과의  $R_r = +0.8$ 이고 핵과의  $R_r = -0.2$ 으로 국소화된 lysosome에서 활성 AEP와의 결합에 의한 형광 신호가 발생했으나 핵 내부의 AEP 활동은 관찰할 수 없었다. 이는 핵 속의 AEP가 불활성 상태일 가능성을 제시할 수 있다. 또한, SDS-PAGE를 실행한 결과 프로브 농도에 비례하여 형광 또한 증가하였으며 off target인 cathepsin을 약하게 표지하는 것을 확인하였다.



**Figure 16.** Live cell imaging of active AEP in HCT-116 human colon cancer cells: (a) representative images of cells labelled with AP-1 (10 μM) for 2 h, (b) cellular colocalization, (c) protein bands labelling active AEP in HCT-116 cells.

최근 연구 결과에 따르면 알츠하이머병의 발병 과정에서 중요한 역할을 하는  $\beta$ -amyloid peptides ( $A\beta$ )가 AEP를 활성화 시킨다고 보고된 바가 있다.<sup>33</sup> 따라서 본 연구에서는 뉴런 세포인 HT-22 세포주에  $\beta$ -amyloid peptides ( $A\beta$ )를 처리한 뒤 AEP의 활성 변화 및 세포 내 분포 변화를 확인해보았다. 공 초점 현미경을 통해 확인한 결과 전반적인 세포 형태는 시간이 지남에 따라 분화된 뉴런과 유사함을 보였다. 또한,  $A\beta$ 를 처리하지 않았을 때에는 활성 AEP가 cytosol에 있다가  $A\beta$ 를 처리 후 시간이 지남에 따라 활성 AEP는 대부분 세포막으로 이동했음을 확인하였다 (Figure 17).



**Figure 17. Live cell imaging of active AEP in HT-22 cells : (a) representative images of cells labelled with AP-1 ( $10\ \mu\text{M}$ ) for 2 h and (b) subcellular activity of AEP upon treatment with  $A\beta$  ( $0.8\ \mu\text{M}$ ).**

## 2. Peptoid를 기반으로 한 mitochondria-targeting transporter의 개발

(본 연구는 광주과학기술원 화학과 서지원 교수 연구팀과 공동연구를 통해 진행하였으며 펩토이드 라이브러리의 합성 및 정제는 광주과학기술원 소속 남호연 연구원이 수행하였다.)

### 2.1 Mitochondria-targeting peptoid (MTP)의 디자인 및 합성

본 연구에서는 mitochondria에 선택적인 분자 수송 물질인 mitochondria-targeting peptoid (MTP)를 디자인 및 합성하였다.

우선 solid phase synthesis technique을 이용해 peptoid를 합성하여 HPLC로 정제한 뒤 영상화를 할 수 있도록 형광 물질인 fluorescein을 결합하였다. Mitochondria 내부로의 투과를 위해 양전하를 띠는 잔기와 친유성 잔기를 이용하였다. 친유성 잔기로는 chirality가 있는 *N*sch, *N*spe 잔기와 chirality가 없는 *N*ch, *N*pm 잔기를 이용하였으며 양전하성 잔기로 *N*Lys와 *M*btg를 사용하여 친유성 잔기와 양전하성 잔기가 반복되는 구조를 이용하여 양쪽성 펩토이드를 합성하였다. Control은 세가지로 기존의 cell penetrating sequence로 알려진 arginine 잔기를 이용하여 MTP-6을 합성하였고 arginine의 peptoid 버전인 *M*btg 잔기를 이용하여 MTP-7을 합성하였다. 마지막으로 Lysine의 peptoid 버전인 *N*Lys를 이용하여 MTP-8을 합성하였다.

Peptoids	Sequence	HPLC elution (% ACN)	Net charge
1	CF-(Mlys-Nch-Mbtg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	38.97	7
2	CF-(Mlys-Nsch-Mbtg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	40.00	7
3	CF-(Mlys-Npm-Mbtg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	35.09	7
4	CF-(Mlys-Nspe-Mbtg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	35.71	7
5	CF-(Mlys-Ndp-Mbtg) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub>	43.13	7
6	CF-(Arg) <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	30.88	7
7	CF-(Mbtg) <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	29.20	7
8	CF-(Mlys) <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	26.32	7

Nch	Nsch	Npm	Nspe	Ndp	Mlys	Nbtg
<i>Hydrophobic submonomers</i>					<i>Cationic submonomers</i>	

**Table 1. Mitochondria-targeting peptoids (MTP).**

(남호연이 합성 후 정제하였음)

## 2.2 공 초점 현미경을 이용한 live cell imaging

MTP가 mitochondria에 선택적으로 결합 하는지 알아보기 위해 우리는 살아있는 HeLa 세포에 MTP 및 mitochondria와 선택적인 결합을 하는 형광 물질인 Mitotracker를 처리한 뒤 공 초점 현미경을 통해 live cell imaging 실험을 수행하였다. 형광 이미지는 각각의 MTP를 1시간 동안 세포에 처리한 뒤에 촬영하였다 (Figure 18).

MTP의 mitochondria 선택성을 확인하기 위해 Mitotracker를 사용해 Pearson's correlation coefficients (Rr)을 정량하였다 (이때 Rr = +1 은 두 신호 간의 완전한 겹침을 나타내지만 Rr=0은 상관관계가 없음을 나타낸다). Figure 19를 보면 Rr 값이 MTP-1 = + 0.69, MTP-2 = +0.81로 mitochondria에 높은 선택성을 보였으며 나머지 MTP는 Rr 값이 +0.4 이하로 mitochondria에 비교적 낮은 선택성을 나타내었다. MTP-1과 2의 Rr 값의 차이는 chiral residue를 도입함으로써 생성된 helicity로 인한 차이로 추측된다. 또한 MTP-3과 4의 구조에서도 achiral한 잔기를 이용하여 합성된 MTP-3보다 chiral한 잔기를 이용하여 합성된 MTP-4의 Rr 값이 더 크다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해서 chiral한 잔기를 갖는 MTP가 achiral한 구조를 갖는 잔기보다 높은 Rr 값을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 다수의 mitochondrial protein에서 자연적으로 발견되는 mitochondrial targeting sequence (MTS) 역시 양쪽성 나선구조 (amphipathic helices)를 가지고 있다는 사실을 고려해볼 때 본 연구에서 개발된 MTP 중 helical MTP의 경우 더 향상된 mitochondria 수송 능력을 가지고 있는 것으로 추측해 볼 수 있으며 이는 circular dichroism 측정 등의 추가 실험을 통해 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

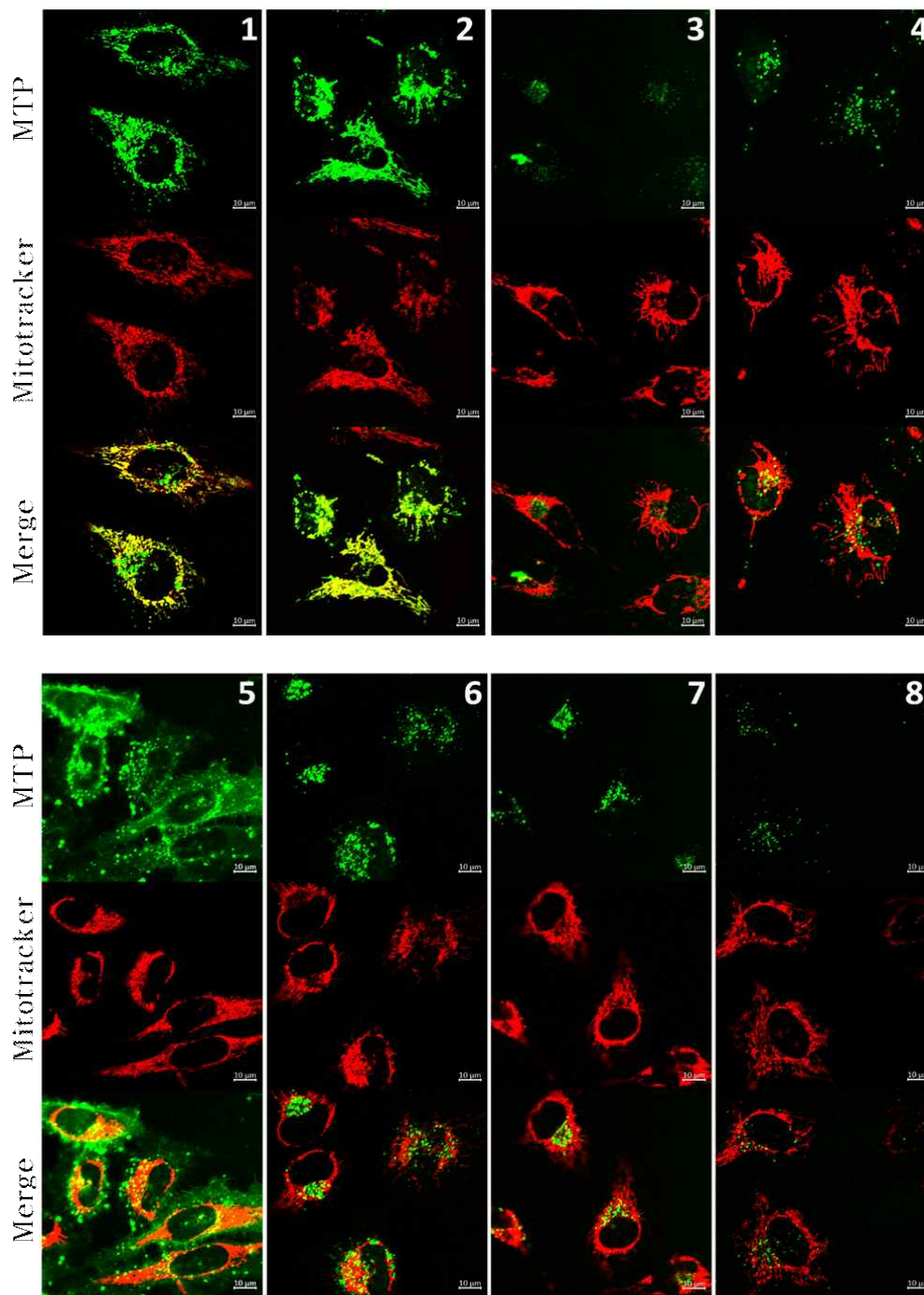
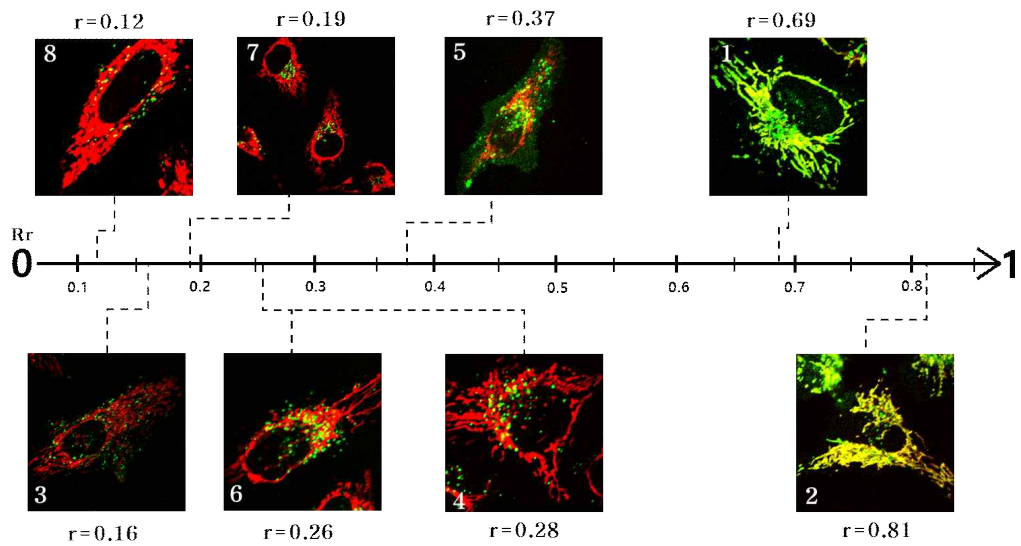


Figure 18. Representative images of HeLa cells treated with MTPs at 5  $\mu$ M



**Figure 19. The Pearson's correlation coefficients for MTPs 1-8.**

세포 투과성을 측정하기 위해 살아있는 HeLa cell에 MTP를 처리한 뒤 유세포 분석기를 이용하여 세포 투과도를 측정하였다. Figure 20a에 fluorescence intensity를 보면 MPT를 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 세포보다 3배, fluorescein만 처리한 세포보다 2배 정도 fluorescence intensity가 2배 정도 높다는 것을 확인 하였다. MTP-1~4번까지는 비슷한 형광 세기를 나타낸 것으로 보아 세포 투과도도 비슷함을 알 수 있으며 MTP-5이 가장 hydrophobic한 구조로 가장 높은 세포투과성을 나타내었다.

다음으로 MTP들의 미토콘드리아 독성을 확인하기 위해 mitochondrial membrane potential을 측정하는 실험인 JC-1 assay를 수행 하였다. 정상 세포 내에서의 JC-1 dye는 미토콘드리아 내부에 red 형광을 띄며 축적되고, mitochondria의 기능 이상으로 membrane depolarization이 일어난 경우 JC-1 dye는 mitochondria에서 빠져 나온 후 세포질에서 green 형광을 띄게 된다. 따라서 JC-1이 나타내는 red와 green 형광 신호의 비율을 측정하면 mitochondrial membrane depolarization을 정량화 할 수 있게 된다. Figure 20b를 보면 MTP-1~4는 별다른 세포 독성을 일으키지 않는다는 것을 확인할 수 있으며 MTP-5가 mitochondrial membrane de-polarization이 일어난 것을 확인할 수 있었는데 이는 앞에 결과를 미루어 봤을 때 MTP-5의 높은 세포투과도가 mitochondrial membrane depolarization에도 어느 정도 영향을 미쳤을 것으로 추측된다. 따라서 앞선 결과와 함께 우수한 세포투과성과 낮은 세포 독성을 나타내며 mitochondria에 선택적인 MTP-1,2가 mitochondria 특이적 수송체로써 사용 가능성이 가장 높다고 제시할 수 있다.

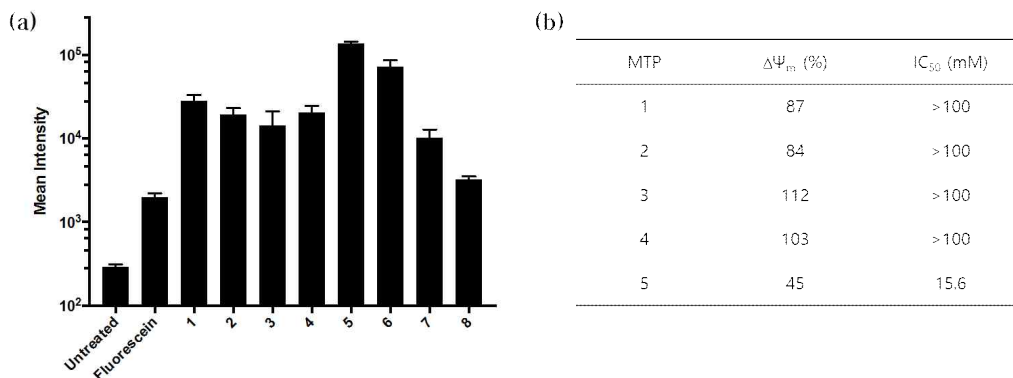


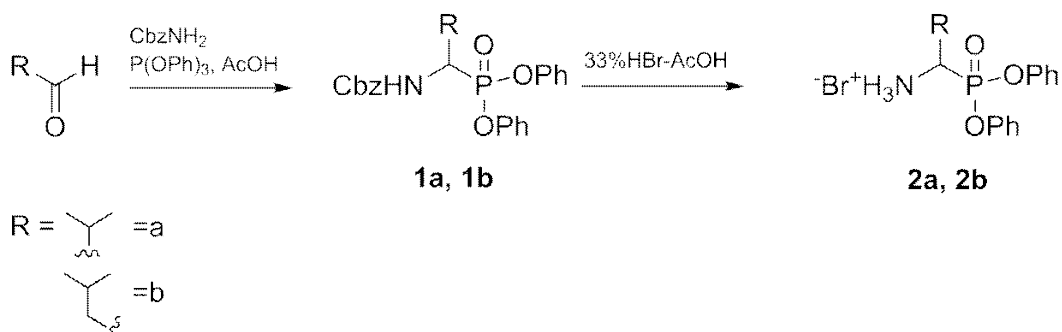
Figure 20. (a) JC-1 assay, (b) fluorescence intensity measured by FACS.

### 3. High temperature requirement protein A (HtrA)와 선택적으로 결합하여 효소 활성을 영상화 할 수 있는 activity-based probes의 개발

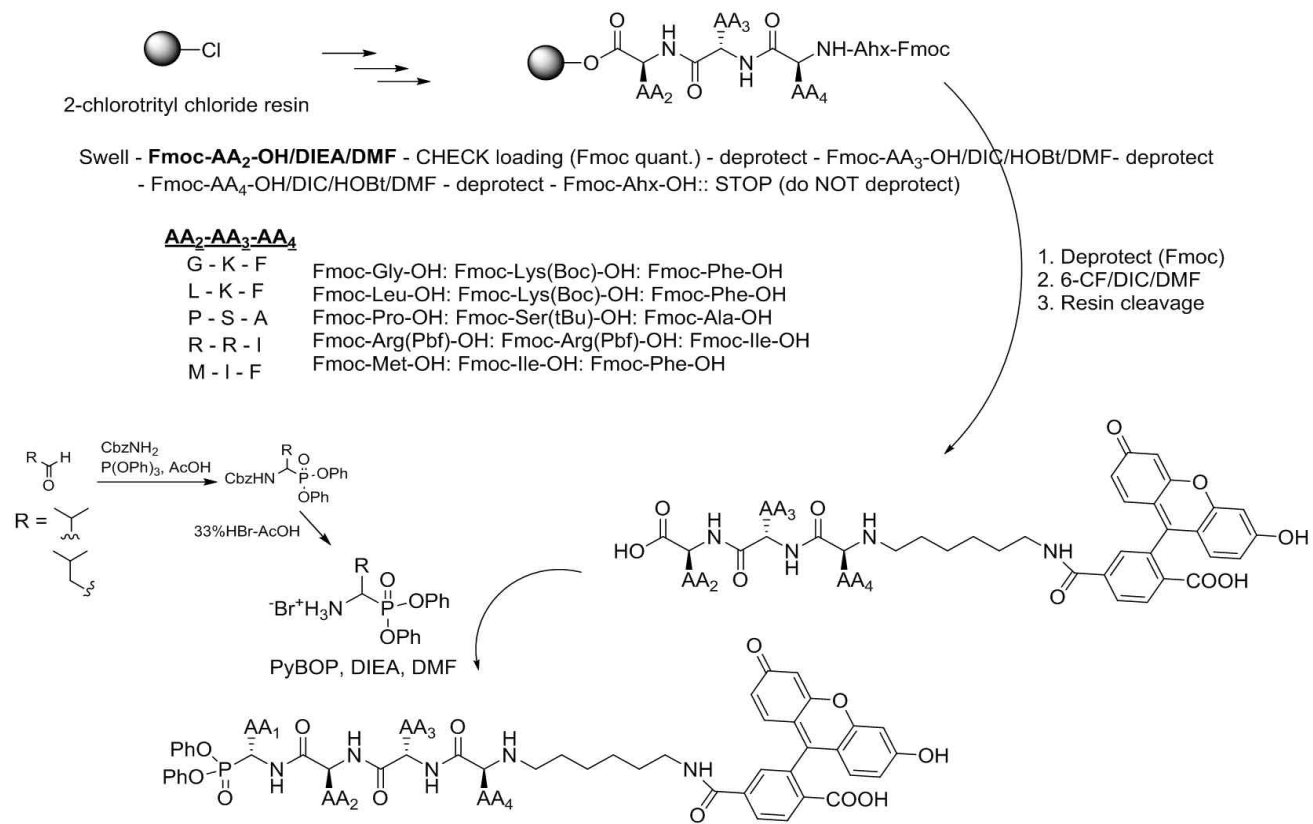
#### 3.1 HtrA에 특이적으로 결합하는 activity based probes 합성

본 연구는 기존에 알려진 HtrA peptide substrates를 참고하여 HtrA에 선택적으로 결합할 수 있는 HtrA 활성 기반 프로브를 디자인 및 합성하였다.

우선 solid phase synthesis technique를 이용해 peptide를 합성하여 HPLC로 정제하였다. 거기에 영상화를 할 수 있도록 초록색 형광 물질인 fluorescein을 결합 하였으며 electrophile은 serine protease와의 결합 시 수용성 환경에서도 안정적으로 반응할 수 있는 diphenylphosphonate를 사용하여 합성하였다.

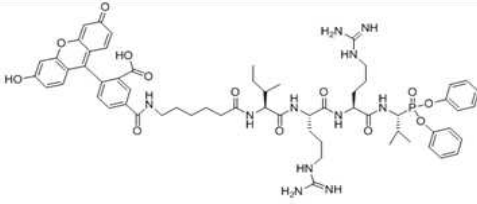
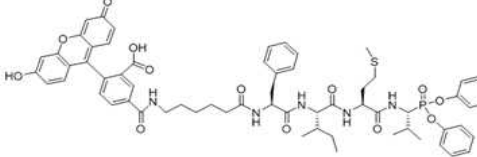
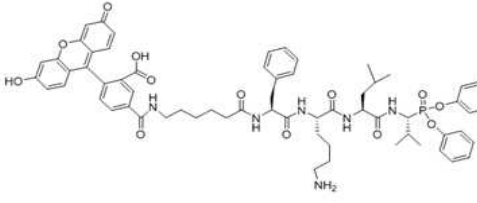
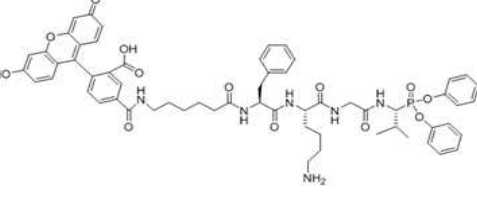
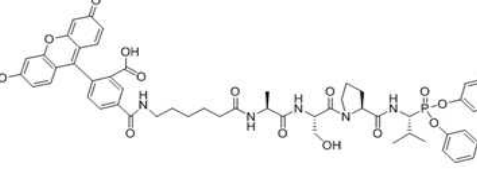


Scheme 3. Synthesis of diphenylphosphonate electrophile.



**Scheme 4. Synthesis of HtrA target activity based probe**

(남호연과 공동으로 합성함)

	Peptide sequence	Target	Structure
HP-1	(I-R-R-V)	HTRA 1 & 2	
HP-2	(F-I-M-V)	HTRA 2	
HP-3	(F-K-L-V)	HTRA 1	
HP-4	(F-K-G-V)	DegP	
HP-5	(A-S-P-V)	Elastase	

**Table 2. Structure of HtrA-targeting activity-based probe.**

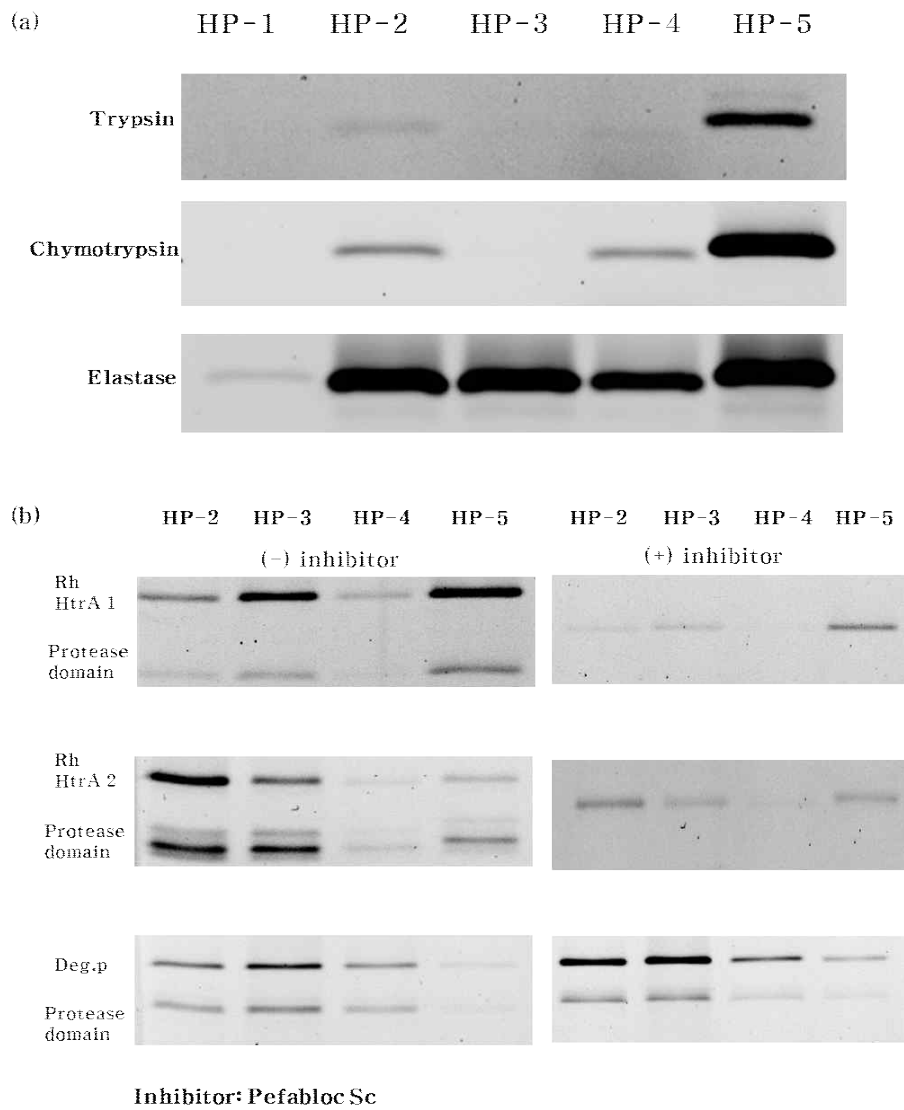
(남호연과 공동으로 합성)

### 3.2 SDS-PAGE를 이용한 정제된 단백질 및 살아있는 세포에서의 선택성 실험

HtrA probe의 표지 효율성과 선택성을 알아보기 위해 serine protease family에 속하는 trypsin, chymotrypsin, neutrophil elastase에 HtrA-targeting probe (HP)를 처리한 뒤 단백질 밴드를 관찰하였다. trypsin에 대해서는 HP-5가 가장 높은 선택성을 보였으며 chymotrypsin은 HP-5가 진하게 HP-2, 4는 약하게 표지하였다. neutrophil elastase는 HP-1을 제외한 나머지 프로브들이 강하게 표지하는 것을 확인할 수 있는데 이는 neutrophil elastase가 P1위치에 valine을 선호하기 때문으로 추측된다 (Figure 21a).

또한 recombinant HtrA 1 & 2, DegP에 HP를 처리하여 단백질 밴드를 관찰하였다. Figure 21b를 보면 HtrA 1 & 2의 mature한 형태 (38 kDa)를 표지하였으며 DegP (45 kDa)도 표지한 것을 볼 수 있다. 이때 HtrA 1 & 2, DegP 모두 공통적으로 24 kDa에 해당하는 단백질을 표지하는데 이는 mature protein에서 분리된, active site가 포함된 protease domain이라고 보여진다. 또한 단백질의 종류에 따라 프로브에 의해 표지되는 양상이 조금씩 다른데 HtrA 1에는 HP-3, 5가 큰 선택성을 보였고 HtrA 2는 HP-2, 3가 DegP는 HP-2, 3, 4가 높은 선택성을 보였으며 HP-1은 모든 단백질에 선택성이 낮은 것으로 나타났다.

HP의 선택성을 확인하기 위해 광범위한 serine protease inhibitor인 Pefabloc Sc를 HtrA 1 & 2, DegP에 전처리한 뒤 같은 실험을 진행한 결과 DegP는 표지가 저해되지 않는 반면에 HtrA 1, 2는 표지가 저해된 것을 확인하였다. 이를 통해 HP가 human HtrA와 더 선택적으로 반응한다는 것을 확인하였다 (Figure 21b).



**Figure 21. Comparison of HP probes reacted with (a) trypsin, chymotrypsin, elastase, (b) HtrA 1 & 2, DegP proteases.**

또한, 살아있는 HeLa cell에 세포 투과성 및 선택성을 보기 위하여 HtrA probe를 처리한 뒤 라벨링 실험을 진행하였다. Coomassie blue를 처리하였을 때와 비교해보면 HP가 하나의 단백질만을 선택적으로 표지하는 것을 확인할 수 있으며 HP-3와 5가 가장 강한 선택성을 나타낸 것을 확인하였다. 이 실험을 바탕으로 가장 강한 표지를 보인 HP-3을 HeLa cell에 처리 후 imaging 실험을 진행한 결과 cytosol상에 존재하는 프로브 형광 신호를 관찰할 수 있었으며, 이 신호가 프로브와 HtrA 간의 결합에 의한 것인지 확인하기 위해 추후에 immunoprecipitation을 진행하여 확인할 계획에 있다.

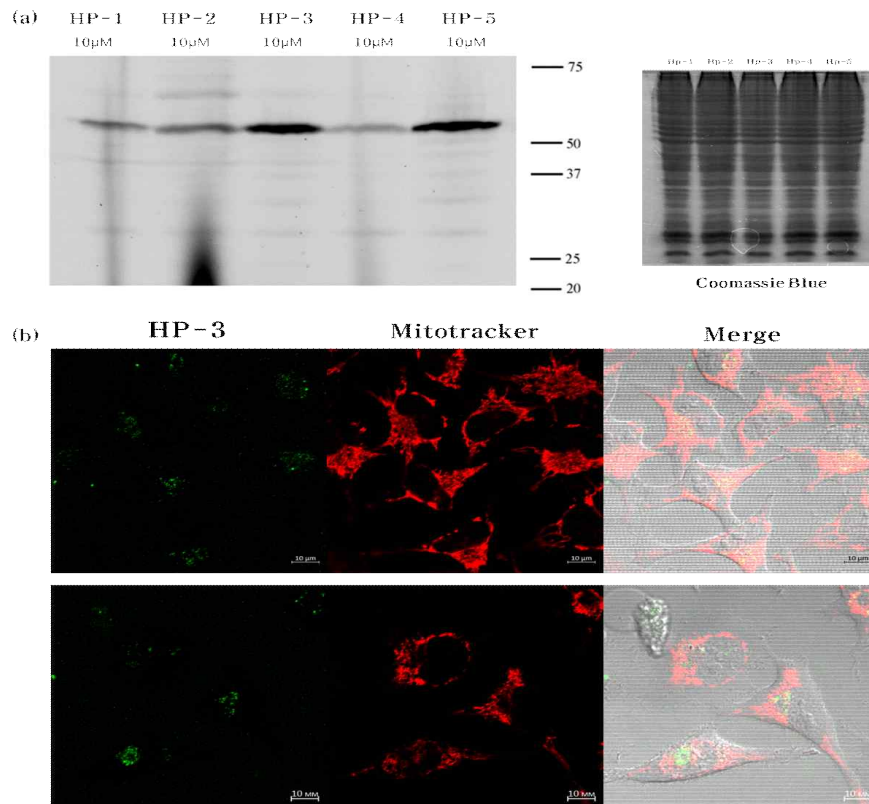


Figure 22. Comparison of the HtrA labelling by HP probes (a) in intact HeLa cells, (b) live cell imaging of HeLa cells.

### III. 결론

본 연구는 단백질효소와 선택적으로 결합하는 활성 기반 프로브 (activity-based probe)를 디자인 및 합성하여 프로브들의 선택성 및 효소 반응성을 세포 내에서 탐색하였다. 또한 미토콘드리아를 타겟으로 하는 분자수송체를 개발하여 본 연구에서 합성한 활성 기반 프로브에 결합시켜 사용하고자 하였다.

첫째, asparaginyl endopeptidase (AEP 또는 legumain)와 선택적으로 결합하는 활성 기반 프로브를 합성하였다. naphthalimide 유도체를 사용해 legumain과 선택적 결합 시 photoinduced electron transfer (PeT)로 인한 turn-on 형광 반응이 일어나도록 디자인된 스마트 프로브 AEP probe-1 (AP-1)을 합성하였다. 살아있는 세포와 추출물에 처리하여 SDS-PAGE를 통해 AEP에 선택적으로 결합하는 것을 확인하였으며 다양한 살아있는 cell에 처리 후 공 초점 현미경을 통해 형광 광도 및 colocalization 을 정량한 결과 AP-1이 효소 활성을 비교적 정확하게 반영하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 AP-1이 살아있는 세포에서 AEP의 세포 내 활성 및 이동 경로를 탐지하는 데 유용한 도구를 제공하며, 암 및 알츠하이머를 비롯한 많은 퇴행성 뇌 질환의 발병 기전에서 AEP의 기능적 기능을 설명하는 데 도움이 될 것이라고 생각된다.

둘째, peptoid 기반의 mitochondria-targeting transporter 라이브러리를 만들고 세포 내에서의 분자 수송 양상 및 효율을 탐구하였다. 기존의 peptide 기반의 mitochondria-targeting transporter가 갖는 특징은 유지하면서 단점은 보완하고자 본 연구에서는 backbone의 질소 원자에 곁가지가 붙어 있는 peptoid 기반의 mitochondria-targeting peptoid (MTP)를 합성하였다. 합성된 MTP를 HeLa cell에 처리한 뒤 공 초점

현미경을 사용하여 mitochondria에 선택적으로 결합하는 MTP가 있음을 확인하였고 정량된 Rr을 통해 이들 MTP가 mitochondria에 높은 선택성을 보이는 것을 확인하였다. 또한, JC-1 assay를 통해 각각의 MTP가 mitochondrial membrane potential에 미치는 영향을 확인하였으며 형광 유세포 분석을 이용하여 세포 투과도를 정량하였다. 이러한 결과를 통해 mitochondria에 대한 선택적 수송능력이 가장 큰 MTP-1,2를 발굴하였으며, 이후 후속연구를 통해 mitochondrial serine protease인 HtrA 2 활성 기반 프로브와 결합하여 활용할 계획이다.

셋째, HtrA에 선택적으로 결합하는 활성 기반 프로브를 합성하였다. 여러가지 serine protease family에 속하는 trypsin, chymotrypsin, elastase, HtrA 1, HtrA 2, DegP와의 선택적 반응성을 SDS-PAGE를 통해 확인 하였으며 추후 immunoprecipitation 및 여러 가지 실험을 통해 합성된 HtrA probe의 생화학적 특성을 탐색하고, HtrA 2를 타겟으로 하기위해 MTP와 conjugation하여 이용할 계획에 있으며 나아가 HtrA에 선택적인 enzyme activity assay를 개발하고자 한다.

## IV. 실험

### 1. 실험기기 및 시약

#### 1.1 실험기기

$^1\text{H}$  NMR과  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼은 VNMRS500 (500 MHz  $^1\text{H}$ , 125 MHz  $^{13}\text{C}$ ) 분광계로부터 얻어졌다. NMR 용매로는  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하였으며, chemical shift는 표준물질인 tetramethylsilane 으로부터 ppm 단위로 기록하였다. 데이터는 chemical shift multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet), coupling constant (Hz), integration의 순으로 기록하였다. Flash column chromatography는 Silica gel 60 (Merck-Millipore)을 이용하였다. 반응분석은 Agilent사의 Agilent Technologies 6130 질량 분석기 (LC-MS)를 이용하였다. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 정제는 Knauer사의 Azura preparative HPLC 모델로 column은 Sunfire C18 OBD Prep Column (Waters)을 사용하였다. 이동상은 DW에서 10:90=acetonitrile (용매 A) 및 0.1% formic acid in DW (용매 B)로 구성된다. Fluorescence 측정은 Spectramax M5 microplate reader (Molecular Devices)를 사용하였으며 live cell imaging은 Carl Zeiss사의 LSM 700을 사용하였다. 형광 유세포 분석기는 SONY사의 SH 800을 사용하였다. Cell & lysate labeling 실험에서 gel imaging은 ChemiDoc MP Imaging System (Biorad)을 사용하였다.

## 1.2 시약

반응에 사용된 시약은 Aldrich-Sigma, Fisher Chemical, Alfa Aesar, TCI, Acros 등에서 구입하여 정제 없이 사용하였다. water는 3차 증류수를 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 합성

#### Compound 1

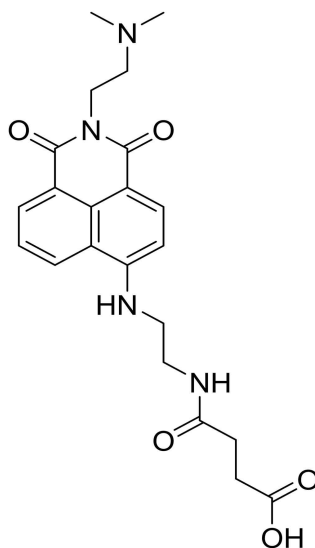


Figure 23. Compound 1

#### 4-((2-((2-(2-(Dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobutanoic acid (1)

첫번째 둥근 바닥 플라스크에 기존에 합성한 6-((2-aminoethyl)amino)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1H-benzo[de]isoquinoline

-1,3(2H)-dione (50 mg, 0.15 mmol)을 anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 3 mL에 완전히 녹인 후 ice bath에서 0 °C로 준비한다. 다른 등근 바닥 플라스크에는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : diethylether = 1 : 1용매에 succinic anhydride (16.01 mg, 0.16 mmol)을 녹인다. 위 용액을 첫번째 등근 바닥 플라스크에 dropwise로 천천히 넣는다. 상온에서 overnight 반응 후 감압 농축하여 노란색 고체를 얻었다. 수득률: 88.1 mg (139%) ESI-MS: *m/z* calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup>:427.19; found:427.2

## Compound 2

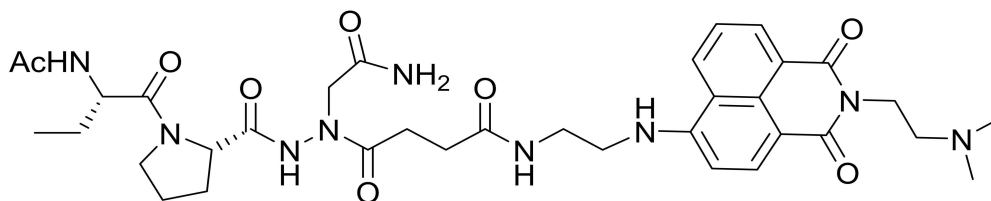


Figure 24. Compound 2

4-(2-(((S)-2-Acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-(2-amino-2-oxoethyl)hydrazinyl)-N-(2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)-4-oxobutanamide (Control 2)

Rink amide MBHA resin(500 mg, 0.325 mmol, 1 eq)을 *N,N*-dimethylformamide 용매에서 15분간 팽윤시킨다. 20% piperidine / *N,N*-dimethylformamide 용액으로 15분씩 3번 처리하여 Fmoc group 을 떼어낸다 (deprotecting). Bromo acetic acid (0.67 g, 4.875 mmol, 15 eq)를 NMP (4 mL)에 용해하여 레진에 넣은 뒤 DIC (0.9 mL)를 넣고 1시간 반응한다. Fmoc hydrazine (250 mg, 0.975 mmol, 3 eq)을 NMP (2 mL)에 녹여 레진에 넣은 뒤 DIEA (170  $\mu$ L, 0.975 mmol, 3 eq)를 넣고 overnight 반응한다. Fmoc quantification하여 레진에 loading 양을 측정한다 (0.2 mmol/g). Allyl chloroformate (42.52  $\mu$ L, 0.4 mmol, 4 eq)를 NMP 1 mL에 녹인 용액을 레진에 넣고 DIEA (69.86  $\mu$ L, 0.4 mmol, 4 eq)를 넣은 후 1 시간 반응한다. 20% piperidine / *N,N*-dimethylformamide 용액으로 15분씩 3 번 처리하여 Fmoc group을 떼어낸다. Fmoc-Pro-OH

(202.42 mg, 0.6 mmol, 6 eq)과 HOBt (81.072 mg, 0.6 mmol, 6 eq)를 *N,N*-dimethylformamide (1.2 mL)에 녹여 레진에 넣고 DIC (93.96  $\mu$ L, 0.6 mmol, 6 eq)을 넣어준 뒤 overnight 반응한다. Deprotecting 후 Fmoc-Abu-OH (97.62 mg, 0.3 mmol, 3 eq)와 HATU (114.07 mg, 0.3 mmol, 3 eq)를 *N,N*-dimethylformamide (1.2 mL)에 녹여 레진에 넣고 DIEA (104.8  $\mu$ L, 0.6 mmol, 6 eq)을 넣어준 뒤 overnight 반응한다. Deprotecting 후 acetic anhydride (47.2  $\mu$ L, 0.5 mmol, 5 eq)을 *N,N*-dimethylformamide 1 mL에 녹인 용액을 레진에 넣고 DIEA (87.1  $\mu$ L, 0.5 mmol, 5 eq)을 넣은 뒤 5분간 반응하여 AC capping을 한다. 레진에 phenylsilane (308.1  $\mu$ L, 2.5 mmol, 25 eq)를 넣은 후 tetrakis (triphenylphosphine) palladium (28.9 mg, 0.025 mmol, 0.25 eq)를 첨가하고 argon 가스로 카트리지를 포화 시키면서 1시간 반응하여 Alloc을 제거한다. 95% TFA cocktail (v/v, TFA : DW : TIS=95 : 2.5 : 2.5)을 이용하여 1시간 처리한 뒤 레진에서 떨어진 생성물이 포함된 용액을 둥근 바닥 플라스크에 모은다, 레진에 남아있는 생성물들을 모으기 위해 TFA cocktail(x3), acetonitrile : DW = 1 : 1 (x3), acetonitrile (x 3)으로 레진을 씻어낸 용액을 위 둥근 바닥 플라스크에 같이 모은다. 거른 용액과 세척 용액을 회전 증발 농축기를 이용하여 농축한 뒤 HPLC로 prep 한다. Eppendorf tube에 위 peptide (3 mg, 0.010 mmol, 1 eq)을 DMSO 200  $\mu$ L에 녹여준다. 여기에 compound 1 (4.09 mg, 0.010 mmol, 1 eq), HATU (3.65 mg, 0.010 mmol, 1 eq), 그리고 DIEA (3.34  $\mu$ L, 0.019 mmol, 10 eq)를 넣어준 뒤 빛을 차단하여 반응한다. 반응 후 HPLC로 정제하였다. 수득률 : 0.5 mg (7.2%) ESI-MS: *m/z* calcd. for C<sub>35</sub>H<sub>47</sub>N<sub>9</sub>O<sub>8</sub> [M + H]<sup>+</sup>:722.35; found: 722.4

### Compound 3

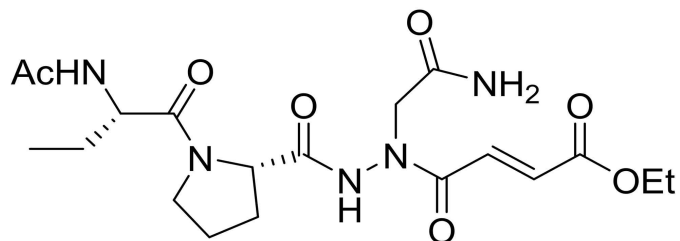


Figure 25. Compound 3

**Ethyl(E)-4-(2-(((S)-2-Acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-(2-amino-2-oxoethyl) hydrazinyl)-4-oxobut-2-enoate.**

Compound 2의 Alloc 제거까지 동일하게 합성한다. 그리고 monoethylfumarate (43.239 mg, 0.3 mmol, 3 eq)와 HATU (114.06 mg, 0.3 mmol)를 *N,N*-dimethylformamide에 용해하여 레진에 넣어준 뒤 DIEA (104.51  $\mu$ L, 0.6 mmol, 6 eq)를 넣고 overnight 반응한다. 95% TFA cocktail (v/v, TFA : DW : TIS = 95 : 2.5 : 2.5)로 1시간 동안 full cleavage 한 뒤 HPLC로 정제하였다. 수득률 : 5.7 mg (12.9%) ESI-MS:  $m/z$  calcd. for  $C_{19}H_{29}N_5O_7$   $[M + H]^+$ : 440.21; found: 440.2

## Activity-based probes for HtrA

### Compound 4

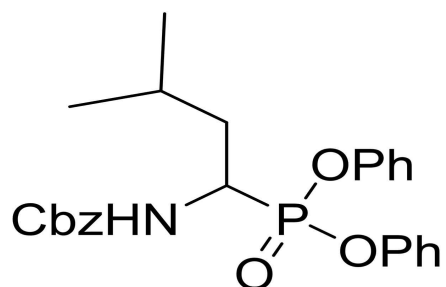


Figure 26. Compound 4

### Benzyl(1-(diphenoxyphosphoryl)-3-methylbutyl)carbamate (1a)

둥근 바닥 플라스크에 benzyl carbamate (1.19 ml 9.25 mmol)과 acetic acid (60.00 mL, 48.46 mmol)을 넣고 뒤이어 triphenyl phosphite (2.81 g, 9.25 mmol)과 isovaleraldehyde (1.00 g, 13.87 mmol)을 넣어준다. 82 °C에서 2시간 반응한다. 회전 증발 농축기를 이용하여 남아있는 acetic acid를 날려주고 40 °C로 가열한 methanol을 아주 소량만 첨가한 뒤 -20 °C에서 overnight 한다. 반응 후 다음날 감압 여과하여 동결건조 하였다. 하얀색 고체. 수득률 : 0.9 g (21.5%) ESI-MS :  $m/z$  calcd. for  $C_{25}H_{28}NO_5P$   $[M+H]^+$ : 54.17; found: 454.2  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.43-7.02 (m, 15H), 5.12-5.06 (m, 2H), 4.63-4.51 (m, 1H), 1.87-1.68 (m, 3H), 1.01 - 0.89 (m, 6H).

## Compound 5

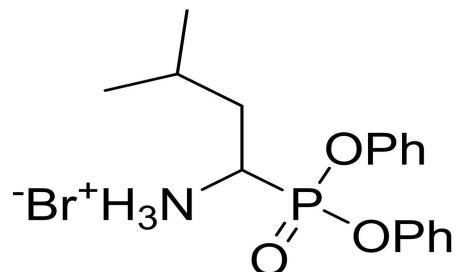


Figure 27. Compound 5

### 1-(Diphenoxyphosphoryl)-3-methylbutan-1-aminium bromide (2a)

둥근 바닥 플라스크에 compound 4 (0.73 g, 1.6 mmol)를 넣은 뒤 33% HBr-AcOH solution 2.5 mL를 넣고 상온에서 1h 반응한다. 회전 증발 농축기로 산을 날린다. Diethyl ether 50 mL를 넣고 -20 °C에서 overnight, 반응 후 다음날 감압 여과 하여 동결건조 하였다. 하얀색 고체. 수득률: 0.2 g (48.73%) ESI-MS: $m/z$  calcd. for  $C_{17}H_{22}NO_3P$   $[M+H]^+$  :320.13; found : 320.1  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.01 (s, 3H), 7.37-7.03 (m, 10H), 2.24-2.03 (m, 1H), 1.95-1.88 (m, 2H), 0.89 (dt,  $J=13.7, 6.8$ Hz, 6H).

## Compound 6

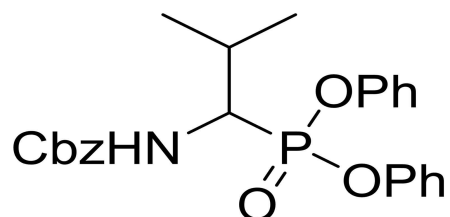


Figure 28. Compound 6

### Benzyl (1-(diphenoxyphosphoryl)-2-methylpropyl)carbamate (1b)

동근 바닥 플라스크에 benzyl carbamate (1.19 ml, 9.25 mmol)와 acetic acid 60.00 mL를 넣은 뒤 triphenylphosphite (2.87 g, 9.25 mmol)와 isobutyraldehyde (1.00 g, 13.87 mmol)를 첨가하여 82 °C에서 2시간 반응한다. 회전 증발 농축기를 이용하여 남아있는 acetic acid를 날려주고 40 °C에서 가열한 methanol을 아주 소량만 첨가한 뒤 -20 °C에서 overnight 반응한다. 반응 후 다음날 감압 여과하여 동결건조 하였다. 하얀색 고체. 수득률 : 3.43 g (77.32%) ESI-MS :  $m/z$  calcd. for  $C_{24}H_{26}NO_5P$   $[M+H]^+$ : 440.15; found: 440.2  $^1H$  NMR (500MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.39-7.05 (m, 15H), 5.19- 5.08 (m, 2H), 4.45 (ddd,  $J=19.5, 10.8, 4.1$ Hz, 1H), 2.43 (ddt,  $J=13.7, 11.0, 7.0$ Hz, 1H), 1.10 (dd,  $J=14.8, 6.5$ Hz, 6H).

## Compound 7

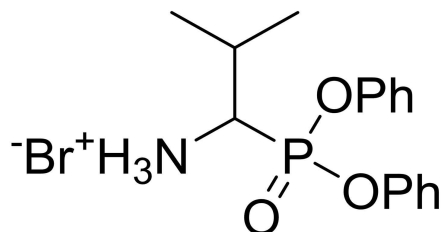


Figure 29. Compound 7

### 1-(Diphenoxyphosphoryl)-2-methylpropan-1-aminium bromide (2b)

Compound 5와 같은 방법으로 합성한다. 하얀색 고체. 수득률: 1.8 g (63.6%) ESI-MS:  $m/z$  calcd. for  $C_{16}H_{20}NO_3P$   $[M+H]^+$ : 306.12; found: 306.1  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.03 (s, 1H), 7.36-7.07 (m, 4H), 3.82 (d,  $J=13.5$ Hz, 1H) ,2.66 (ddd, $J=18.8, 11.7, 6.8$ Hz, 1H), 1.33-1.24 (m, 2H).

## Compound 8

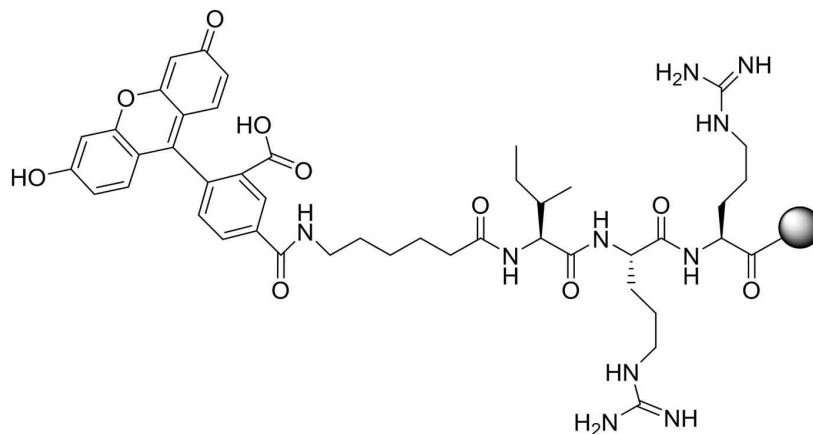


Figure 30. Compound 8

5-(((6S,9S,12S)-6-Acetyl-1-amino-12-((S)-sec-butyl)-9-(3-guanidinopropyl)-1-imino-8,11,14-trioxo-2,7,10,13-tetraazanonadecan-19-yl)carbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthene-9-yl)benzoic acid (P1)

2-Chlorotrityl resin (500 mg, 1 eq)을 *N,N*-dimethylformamide 용매에서 15분간 팽윤시킨다. Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1459.7 mg, 3 eq)를 *N,N*-dimethylformamide에 녹여 레진에 넣은 후 DIEA (391  $\mu$ L, 3 eq)를 첨가하여 1.5시간 반응 한다. *N,N*-dimethylformamide,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 으로 레진을 세척 후 *N,N*-dimethylformamide로 레진을 팽윤시킨 뒤 20% piperidine / *N,N*-dimethylformamide용액으로 15분씩 3번 처리하여 Fmoc group을 떼어낸다 (deprotecting). (이후의 반응을 한번 할 때 마다 세척-팽윤-deprotecting 과정을 반복한다.) Fmoc quantification을 진행하여 레진에 loading 양을 측정한다 (0.2 mmol/g). Fmoc-Arg(Pbf)-OH

(194.6 mg, 3 eq)와 HOBt (40.53 mg, 3 eq)를 *N,N*-dimethylformamide에 녹인 용액을 레진에 넣고 DIC (46.4  $\mu$ L, 3 eq)를 넣은 뒤 1.5시간 반응한다. Fmoc-Ile-OH (106.02 mg, 3 eq)와 HOBt (40.53 mg, 3 eq)를 *N,N*-dimethylformamide에 용해하여 레진에 넣은 뒤 DIC (46.4  $\mu$ L, 3 eq)를 넣고 1.5시간 반응 한다. Fmoc-Ahx-OH (116.63 mg, 3 eq)와 HOBt (40.53 mg, 3 eq)를 *N,N*-dimethylformamide에 용해하여 레진에 넣은 뒤 DIC (46.4  $\mu$ L, 3 eq)를 넣고 1시간 반응 한다. 5-carboxy-fluorescein (75.26 mg, 2 eq)와 HBTU (75.85 mg, 2 eq)를 *N,N*-dimethylformamide에 녹인 용액을 레진에 넣고 뒤이어 DIEA (51.7  $\mu$ L, 3 eq)를 넣고 1.5시간 반응 한다. 반응이 끝나면 *N,N*-dimethylformamide, isopropanol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>으로 레진을 세척한 뒤 동결건조 한다.

## Compound 9

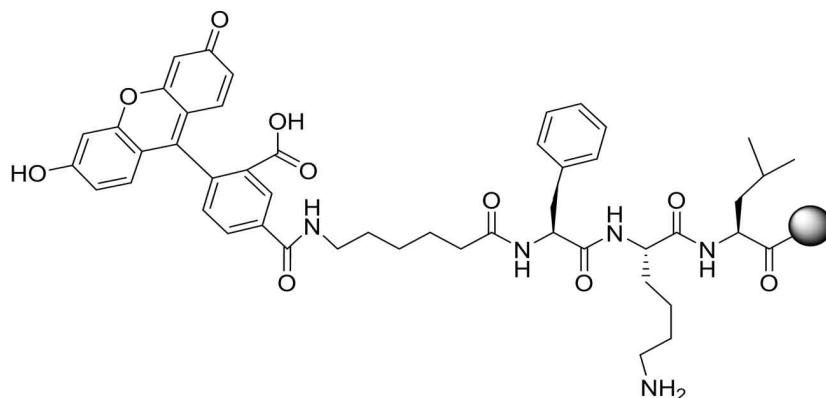


Figure 31. Compound 9

5-((6-(((S)-1-(((S)-6-Amino-1-(((S)-5-methyl-2-oxohexan-3-yl)amino)-1-oxohexan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-6-oxohexyl) carbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid (P2)

Compound 8과 같은 방법으로 합성 한다.

## Compound 10

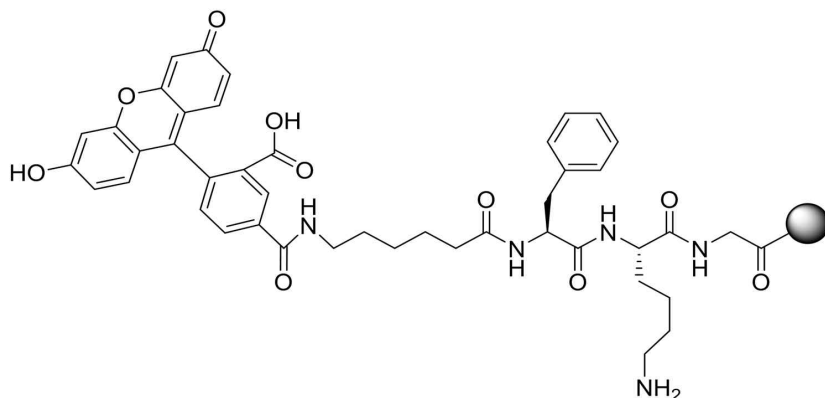


Figure 32. Compound 10

**5-((6-(((S)-1-(((S)-6-Amino-1-oxo-1-((2-oxopropyl)amino)hexan-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)amino)-6-oxohexyl)-carbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid (P3)**

Compound 8과 같은 방법으로 합성 한다.

## Compound 11

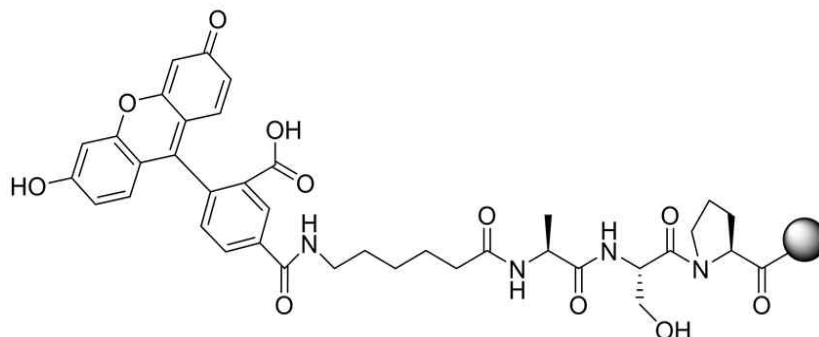


Figure 33. Compound 11

5-((6-(((S)-1-(((S)-1-((S)-2-Acetylpyrrolidin-1-yl)-3-hydroxy-1-oxopropan-2-yl)amino)-1-oxo-propan-2-yl)amino)-6-oxohexyl)carbamoyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)benzoic acid (P3)

Compound 8과 같은 방법으로 합성 한다.

## 2.2 Direct labeling of endogenous AEP in intact cells and cell lysates.

Labeling 24-26 시간 전에 RAW 264.7 cells (350,000 cell/well)과 NIH-3T3 cells (350,000 cell/well), HCT 116 cells (350,000 cell/well), HT 22 (350,000 cell/well)을 24 well plate에 배양하였다. AEP inhibitor를 90분 동안 전처리하고 AP-1 또는 control probe를 농도에 따라 60분 동안 처리하였다. (final DMSO 농도를 0.2% 미만으로 유지하였다.) PBS buffer로 세척한 후 sample buffer를 처리하여 cell을 용해시킨 후 용해된 lysates을 모아서 12.5% SDS-PAGE로 분리 하였다. 표지된 단백질은 ChemiDoc MP Imaging System (fluorescein ex.460-490 nM/em.532 nM, Rhodamine ex.520-545 nM /em.602 nM)으로 분석하였다. lysates labeling은 RAW 264.7 cell을 이용하여 진행하였다. 5 mM DTT를 함유하는 50 mM citrate phosphate buffer (pH 4.5)에서 1 mg/ml로 희석하고 직접 표지하였다. 25  $\mu$ L의 lysates 시료를 90분 동안 억제제로 전처리하고 또 다른 60분 동안 AP-1 또는 control probe로 표지 하였다. 표지된 샘플을 12.5% SDS-PAGE로 분리하고 Chemidoc 스캐너로 gel을 스캐닝하여 분석하였다.

## 2.3 Live cell imaging of active AEP

Imaging 24-26 시간 전에 NIH-3T3 cells (350,000 cell/well), HCT 116 cells (250,000~350,000 cell/well)을 1 well plate에 배양하였다. AEP inhibitor를 90분 동안 전처리하고 AP-1 또는 control probes를 농도에 따라 30, 60, 120, 180분 동안 처리하였다. (final DMSO 농도를 0.2% 미만으로 유지하였다.) LysoTracker를 5분 동안 처리한 뒤 PBS buffer로 세척하고 Phenol red free DMEM을 넣

고 confocal microscopy로 촬영하였다.

#### 2.4 Live cell imaging of MTPs

Imaging 24-26 시간 전에 HeLa (150,000 cell/well)을 1 well plate에 배양하였다. MTP를 최종 농도 5  $\mu$ M에 맞춘 후 60분 동안 처리하였다. (final DMSO 농도를 0.2% 미만으로 유지하였다.) 60분 후 Mitotracker를 15분 동안 처리하였다. PBS로 세척 후 Opti-MEM media를 넣고 Green background suppressor 2 방울 처리 후 confocal microscopy로 촬영하였다.

#### 2.5 JC-1 assay of MTPs

실험 24-26 시간 전에 HeLa cells (30,000 cell/well)을 96 well plate에 배양하였다. JC-1를 최종 농도 7.5  $\mu$ M에 맞게 30분간 처리한 뒤 PBS로 세척 하였다. MTP를 최종 농도 10  $\mu$ M를 농도에 맞게 30분간 처리 한 뒤 microplate reader로 형광을 측정 하였다.

#### 2.6 Flow cytometry

실험 24-26 시간 전에 HeLa cells (350,000 cell/well)을 6 well plate에 배양하였다. MTP를 최종 농도 5  $\mu$ M에 맞춘 뒤 60분 동안 처리하였다. (final DMSO 농도를 0.2% 미만으로 유지하였다.) 60분 후 cell을 떼어낸 다음 2% FBS/PBS 500  $\mu$ L에 현탁 시킨 뒤 flow cytometry 장비로 각 MTP의 세포 투과도를 분석하였다

#### 2.7 Direct labeling of serine protease family in purified protein

50 mM Tris buffer (pH 8.0)에서 0.05 mg/20  $\mu$ L로 희석하고 직접 표지하였다. 25  $\mu$ L의 lysates 시료를 1시간 동안 활성화 시키고 (45  $^{\circ}$ C) 또 다른 30분 동안 상온에서 HtrA probe로 최종 농도 1  $\mu$ M에 맞

게 표지하였다. 표지된 샘플을 12.5% SDS-PAGE로 분리하고 Chemidoc 스캐너로 gel을 스캐닝하여 분석하였다.

## 참고문헌

1. Lee, J.; Bogyo, M., Synthesis and evaluation of aza-peptidyl inhibitors of the lysosomal asparaginyl endopeptidase, legumain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (3), 1340-1343.
2. Sexton, K. B.; Witte, M. D.; Blum, G.; Bogyo, M., Design of cell-permeable, fluorescent activity-based probes for the lysosomal cysteine protease asparaginyl endopeptidase (AEP)/legumain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (3), 649-653.
3. Edgington-Mitchell, L. E.; Wartmann, T.; Fleming, A. K.; Gocheva, V.; van der Linden, W. A.; Withana, N. P.; Verdoes, M.; Aurelio, L.; Edgington-Mitchell, D.; Lieu, T.; Parker, B. S.; Graham, B.; Reinheckel, T.; Furness, J. B.; Joyce, J. A.; Storz, P.; Halangk, W.; Bogyo, M.; Bunnett, N. W., Legumain is activated in macrophages during pancreatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. LiverPhysiol.* **2016**, *311* (3), G548-560.
4. Lunde, N. N.; Holm, S.; Dahl, T. B.; Elyouncha, I.; Sporsheim, B.; Gregersen, I.; Abbas, A.; Skjelland, M.; Espevik, T.; Solberg, R.; Johansen, H. T.; Halvorsen, B., Increased levels of legumain in plasma and plaques from patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2017**, *257*, 216-223.
5. Morita, Y.; Araki, H.; Sugimoto, T.; Takeuchi, K.;

Yamane, T.; Maeda, T.; Yamamoto, Y.; Nishi, K.; Asano, M.; Shirahama-Noda, K.; Nishimura, M.; Uzu, T.; Hara-Nishimura, I.; Koya, D.; Kashiwagi, A.; Ohkubo, I., Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal oximal tubular cells. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (7), 1417-1424.

6. Basurto-Islas, G.; Grundke-Iqbal, I.; Tung, Y. C.; Liu, F.; Iqbal, K., Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288* (24), 17495-17507.

7. Blum, G.; Weimer, R. M.; Edgington, L. E.; Adams, W.; Bogyo, M., Comparative assessment of substrates and activity based probes as tools for non-invasive optical imaging of cysteine protease activity. *PloS one* **2009**, *4* (7), e6374.

8. Edgington, L. E.; Verdoes, M.; Bogyo, M., Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes. *Current opinion in chemical biology* **2011**, *15* (6), 798-805.

9. Heal, W. P.; Dang, T. H.; Tate, E. W., Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chemical Society reviews* **2011**, *40* (1), 246-257.

10. Fonovic, M.; Bogyo, M., Activity-based probes as a tool for functional proteomic analysis of proteases. *Expert*

*review of proteomics* **2008**, *5* (5), 721-730.

11. Lee, J.; Bogyo, M., Development of near-infrared fluorophore (NIRF)-labeled activity-based probes for in vivo imaging of legumain. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5* (2), 233-243.

12. Segal, E.; Prestwood, T. R.; van der Linden, W. A.; Carmi, Y.; Bhattacharya, N.; Withana, N.; Verdoes, M.; Habtezion, A.; Engleman, E. G.; Bogyo, M., Detection of intestinal cancer by local, topical application of a quenched fluorescence probe for cysteine cathepsins. *Chem. Biol.* **2015**, *22* (1), 148-158.

13. Hong, J. A.; Choi, N. E.; La, Y. K.; Nam, H. Y.; Seo, J.; Lee, J., Development of a smart activity-based probe to detect subcellular activity of asparaginyl endopeptidase in living cells. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (38), 8018-8022.

14. Johri, A.; Beal, M. F., Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2012**, *342* (3), 619-630.

15. Lin, M. T.; Beal, M. F., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **2006**, *443* (7113), 787-795.

16. Reddy, P. H., Role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *CNS spectrums* **2009**, *14* (57), 8-13; discussion 16-18.

17. Horton, K. L.; Stewart, K. M.; Fonseca, S. B.; Guo, Q.; Kelley, S. O., Mitochondria-penetrating peptides. *Chemistry & biology* **2008**, *15* (4), 375-382.
18. Rin Jean, S.; Tulumello, D. V.; Wisnovsky, S. P.; Lei, E. K.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O., Molecular vehicles for mitochondrial chemical biology and drug delivery. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (2), 323-333.
19. Yousif, L. F.; Stewart, K. M.; Kelley, S. O., Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications. *Chem Bio Chem* **2009**, *10* (12), 1939-1950.
20. Frantz, M. C.; Wipf, P., Mitochondria as a target in treatment. *Environmental and molecular mutagenesis* **2010**, *51* (5), 462-75.
21. Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Mourtada, R.; Gronda, M.; Horton, K. L.; Hurren, R.; Minden, M. D.; Schimmer, A. D.; Kelley, S. O., Rerouting chlorambucil to mitochondria combats drug deactivation and resistance in cancer cells. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (4), 445-534.
22. Passos, S. T.; Correa, J. R.; Soares, S. L.; da Silva, W. A.; Neto, B. A., Fluorescent Peptoids as Selective Live Cell Imaging Probes. *The Journal of organic chemistry* **2016**, *81* (6), 2646-51.
23. Hill, D. J.; Mio, M. J.; Prince, R. B.; Hughes, T. S.; Moore, J. S., A field guide to foldamers. *Chemical reviews*

2001, *101* (12), 3893-4012.

24. Stawikowski, M. J., Peptoids and peptide-peptoid hybrid biopolymers as peptidomimetics. *Methods in molecular biology* **2013**, *1081*, 47-60.

25. Clausen, T.; Kaiser, M.; Huber, R.; Ehrmann, M., HTRA proteases: regulated proteolysis in protein quality control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12* (3), 152-162.

26. Ortega, C.; Anderson, L. N.; Frando, A.; Sadler, N. C.; Brown, R. W.; Smith, R. D.; Wright, A. T.; Grundner, C., Systematic Survey of Serine Hydrolase Activity in *Mycobacterium tuberculosis* Defines Changes Associated with Persistence. *Cell chemical biology* **2016**, *3* (2), 290-298.

27. (a) Kim, D. Y.; Kim, K. K., Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *38* (3), 266-74; (b) Tennstaedt, A.; Popsel, S.; Truebestein, L.; Hauske, P.; Brockmann, A.; Schmidt, N.; Irle, I.; Sacca, B.; Niemeyer, C.M.; Brandt, R.; Ksiezak-Reding, H.; Tirniceriu, A.L.; Egensperger, R.; Baldi, A.; Dehmelt, L.; Kaiser, M.; Huber, R.; Clausen, T.; Ehrmann, M., Human high temperature requirement serine protease A1 (HTRA 1) degrades tau protein aggregates. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (25), 20931-20941.

28. Tait, S. W.; Green, D. R., Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* **2012**, *125* (Pt4), 807-815.

29. Graef, M.; Nunnari, J., Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO J.* **2011**, *30*(11), 2101-2014.
30. Clausen, T.; Southan, C.; Ehrmann, M., The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **2002**, *10* (3), 443-455.
31. Pan, Z.; Jeffery, D. A.; Chehade, K.; Beltman, J.; Clark, J. M.; Grothaus, P.; Bogyo, M.; Baruch, A., Development of activity-based probes for trypsin-family serine proteases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (11), 2882-2885.
32. Wysocka, M.; Wojtysiak, A.; Okonska, M.; Gruba, N.; Jarzab, M.; Wenta, T.; Lipinska, B.; Grzywa, R.; Sienczyk, M.; Rolka, K.; Lesner, A., Design and synthesis of new substrates of HtrA2 protease. *Anal. Biochem.* **2015**, *475*, 44-52.
33. Zhang, Z.; Song, M.; Liu, X.; Su Kang, S.; Duong, D. M.; Seyfried, N. T.; Cao, X.; Cheng, L.; Sun, Y. E.; Ping Yu, S.; Jia, J.; Levey, A. I.; Ye, K., Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature communications* **2015**, *6*, 8762.

## Abstract

**Development of chemical probes that can monitor the activity of the proteases associated with neurodegenerative diseases**

Jong-Ah Hong

Department of Next-generation applied Science

Graduate School of

Sungshin University

The main purpose of this research is to develop chemical probes that can selectively monitor the activity of various proteases, and apply these probes to study the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Specifically, we intended to develop chemical probes for asparaginyl endopeptidase (AEP) and high temperature requirement protein A (HtrA), together with mitochondria-specific peptoid transporters that can deliver the chemical probes to the mitochondria.

First, a ‘smart’ activity-based probe targeting AEP (AP-1) was developed by incorporating a naphthalimide fluorophore that was designed to induce a turn-on

fluorescence signal in response to the enzyme activity. AP-1 successfully generated the fluorescence enhancement upon reacting with AEP in cell extracts and live cells. The optimization of the overall scaffold may improve the fluorescence enhancement, which can be potentially used for time-lapse microscopy.

Second, peptoid-based mitochondria-targeting transporters were designed and their cell penetration and mitochondrial localization were quantified by live cell imaging and flow cytometry. In addition, their mitochondrial toxicity and cytotoxicity were also evaluated. A promising candidate MTP-2, which demonstrated remarkable mitochondrial localization with minimal mitochondrial toxicity, was identified. This peptoid-based mitochondrial transporter will be used to selectively deliver the HtRA probes to the mitochondria in our future research.

Finally, HtrA selective activity-based probes were designed and synthesized. Their selectivity and reactivity were examined by using various serine proteases including HtrA1, HtrA2, DegP (bacterial HtrA), trypsin, chymotrypsin, and elastase. Several probes that can selectively label the HtrA family proteases were identified, and a library of compounds with a different electrophile and varying sequences may result in more selective probes in the near future.

Overall, we developed protease specific chemical probes and

mitochondrial transporters that can provide a versatile and robust method to study enzyme functions in biological systems. The long-term goal of this research is to utilize these chemical tools to elucidate the functional roles of the cysteine and serine proteases in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, and discover a potential disease marker.