

HDM2-p53 상호작용 억제제 개발에서의 탄화수소체인의 역할과 중요성

여진희¹, 임해리², 함시현*²

¹화학응용화학과, 대구대학교, 경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201

²화학과, 숙명여자대학교, 서울특별시 용산구 청파로47길 100, 숙명여자대학교 과학관 501B호

E-mail: secret940202@naver.com,

암을 억제시키는 기능을 하는 단백질로 잘 알려진 p53은, 주로 종양세포에서 과도하게 발현되는 단백질인 HDM2와 복합체를 형성하여 비활성화되고 항암기능을 상실하게 됩니다. 때문에 종양세포에서의 p53-HDM2의 상호작용을 억제하기 위해 현재까지 많은 연구가 진행되어왔으며, 다양한 p53-HDM2 억제제가 개발된 바 있습니다. 최근 연구들에 따르면, HDM2와 결합친화도를 높이고 소수성 작용(hydrophobic interaction)에 기여하여 보다 안정한 구조를 만드는 탄화수소체인(staple)을 연결시킨 펩타이드 설계에 대한 관심이 높아지고 있는 추세입니다. 이에, 본 연구에서는 분자동역학 모의실험을 통해서 얻은 탄화수소체인-p53과 비탄화수소체인-p53 및 각각의 HDM2와 결합한 복합체를 기반으로 EDISON의 용매화 자유 에너지(Solvation Free Energy) 프로그램을 이용하여 탄화수소체인의 특징 및 역할을 구조적인 측면과 열역학적인 측면으로 분석하여 비교하고자 합니다. 우리 연구에서 비탄화수소체인-p53의 구조는 분자동역학 시뮬레이션을 수행하는 동안 나선구조형태로 풀려 HDM2와 결합 유도 시에 주요결합 아미노산 잔기가 올바른 결합부위와 상호작용하지 못한 결과를 확인한 반면, 탄화수소체인이 형성된 구조는 시뮬레이션 동안에도 펩타이드의 나선구조를 유지시켜 HDM2와 주요 결합을 형성하는 아미노산 잔기들을 올바른 방향으로 배치시켜 HDM2와의 결합친화도를 높였습니다. 이 연구 결과는 탄화수소체인이 펩타이드의 나선성을 유지시키고, HDM2와의 상호작용을 통한 구조적인 안정성 유도 및 용매화 자유에너지에 큰 기여를 통해 p53-HDM2상호작용 억제제에서 긍정적인 역할을 할 가능성을 보여줍니다.

서론

p53 음성조절자인 MDM2가 과도하게 발현된 종양세포에서, p53-HDM2 상호 작용을 억제시키면 p53이 종양의 성장을 억제하기 위해 다시 농도가 증가합니다.[1] 이러한 p53-HDM2 상호작용을 억제하는 방법은 새로운 항암제 개발의 주요 목표 중 하나이며 새로운 약물개발에 대한 여러 독창적인 방법들이 끊임없이 모색되고 있습니다.[2] 그러나 p53-HDM2상호작용과 같이 단백질-단백질 상호작용을 모방하여

HDM2와 결합하기 위해 설계되는 작은 분자나 펩타이드들은 일반적으로 유연한 성격을 갖기 때문에 낮은 결합력과 세포막 투과성, 그리고 단백질분해 효소에 있어 취약하다는 단점을 가지고 있습니다.[3],[4] 최근에 이러한 문제들을 극복하기 위한 시도로써, 펩타이드에 탄화수소체인(staple)을 연결시켜 더욱 안정하고 단백질 분해에 대한 저항성을 갖는 SAH-p53-8이나 ATSP-7041의 사례 같은 탄화수소체인이 연결된 나선형 펩타이드의 설계가 성공적으로 나타났습니다.[5],[6]

이러한 최근 연구들에 있어, 탄화수소체인의 중요성을 검토하기 위하여 우리는 계산화학분야의 분자동역학 모의실험방법과 EDISON의 용매화 자유에너지(Solvation Free Energy) 프로그램을 통해 단백질의 구조를 확인하고 용매화 자유 에너지 값을 계산함으로써 그 역할을 구조적이고 열역학적인 방법으로 분석하고자 합니다. 특히, 우리는 AMBER프로그램을 이용하여 펩타이드가 HDM2와 복합체 형성하였을 때 주요 결합부위와 소수성 상호작용을 하는 HDM2의 염기를 확인하는 연구도 함께 수행하여 탄화수소체인이 복합체 구조의 안정도를 높이는 역할의 이해를 도울 것입니다.

이 실험에서 우리는 PDB에 있는 3V3B 구조를 바탕으로, HDM2와 주요 결합을 형성하는 소수성 아미노산인 F, W 및 L에 초점을 맞추어 p53의 염기 순서를 따라 펩타이드를 재설계하고[7], 탄화수소체인의 역할을 확인하기 위하여 구조의 나선성을 가장 두드러지게 유지시켜 안정성을 증가시키는 i, i+7(11)형태의 탄화수소체인을 연결시킨 구조[8]를 사용했습니다(그림1). 또한, 추가적으로 HDM2와의 소수성 상호작용을 고려하여 소수성 잔기인 Tyrosine을 배치시켜 HDM2와의 복합체 형성 시 HDM2 표면과 적절한 상호작용으로 결합 친화도의 기여할 것을 기대합니다(표1).

우리 연구에서 탄화수소체인-p53은, 탄화수소체인이 펩타이드의 나선구조를 안정적으로 고정시켜주었고, 분자동역학 시뮬레이션 이후로

펩타이드 이름	아미노산 염기서열
탄화수소체인-p53	Ac-TSF*EYWALL*-NH ₄
비탄화수소체인-p53	Ac-TSFAEYWALLA-NH ₄

표1. 연구에 사용된 펩타이드의 아미노산 염기서열 (*-탄화수소체인)

도 높은 나선성을 유지하여 구조적인 측면에서 결합친화도에 큰 기여할 뿐 아니라, 열역학적인 측면으로도 HDM2와 높은 상호작용을 통하여 탄화수소체인이 앞으로 p53-HDM2 억제제에서의 큰 역할을 할 수 있을 것임을 기대시킵니다.

이론 및 계산방법

1. 분자 동역학 시뮬레이션

우리는 AMBER 14 패키지의 PMEMD-cuda 모듈을 사용하여 탄화수소체인이 연결된 펩타이드와 연결되지 않은 펩타이드, 각각의 HDM2와의 복합체들을 300K, 1 bar, 중성의 pH 조건에서 분자 동역학 시뮬레이션을 수행하였습니다. 펩타이드들은 50ns, 복합체는 10ns동안 시행하였으며, 모든 구조들은 모두 ff99SB-ILDN 힘 영역과 12Å의 TIP3P 물 박스모델로 계산되었다. 또한, 연구에서 사용된 복합체는 AutoDock vina 프로그램[9]을 사용하였습니다.

2. 용매화 자유에너지 분석

분자동역학 시뮬레이션을 통해 생성한 단백질 구조들에 우리는 용매화 자유에너지에 대한 3D-RISM(3D reference Interaction Site Model) 이론을 계산하였습니다. 3D-RISM 이론은 단백질 주위의 물의 위치 i에서부터 r의 3D분포함수인 $g_i(r) = h_i(r) + 1$ 을 얻기 위한 통계역학에 기초한 적분 방정식 이론입니다. 이 이론에서 사용되는 3D-RISM 방정식은 다음과 같습니다.

$$h_i(r) = \sum_j \int dr' \chi_{ij}(|r-r'|)c_j(r')$$

각 $h_i(r)$ 의 범위에 따라 다르게 풀린다.

$$h_i(r) = \begin{cases} \exp[-\beta u_i(r) + h_i(r) - c_i(r)] - 1 & \text{for } h_i(r) \leq 0 \\ -\beta u_i(r) + h_i(r) - c_i(r) & \text{for } h_i(r) > 0 \end{cases}$$

이 방정식에서, $c_i(r)$ 은 직접 상관 함수이고, $\chi_{ij}(r)$ 은 물의 자화율 함수이고, $u_i(r)$ 은 단백질과 물의 상호작용 포텐셜이며, $\beta = 1/(k_B T)$ 는 해당 온도이다. 용매화 자유에너지 G_{solv} 는 다음과 같은 식을 통해 계산하였습니다.

$$G_{solv} = \rho k_B T \sum_i \int dr \left[\frac{1}{2} h_i(r)^2 \theta(h_i(r)) - c_i(r) - \frac{1}{2} h_i(r) c_i(r) \right]$$

여기서 ρ 는 물의 평균 밀도값이고 $\theta(x)$ 는 Heaviside계단 함수입니다.

결과 및 논의

Stp p53과 unstp p53의 구조적 특징

분자동역학 시뮬레이션을 통하여 얻은 탄화수소체인 p53은 야생형 p53의 형태와 비교하였을 때, HDM2와 결합하는 주요 잔기인 F3, W7, L10 위치가 비슷한 구조를 보이는 반면[10], 비탄화수소체인 p53은 L10의 위치가 변한 것을 확인할 수 있었습니다(그림1). 이를 자세히 확인하기 위해 우리는 이차구조를 분석했습니다(그림2). 시뮬레이션 동안 비탄화수소체인

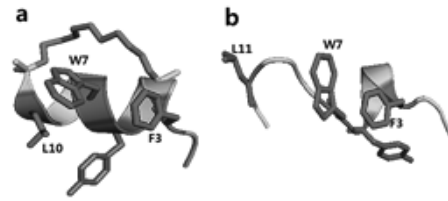


그림1 a. 탄화수소체인 p53과 b. 비탄화수소체인 p53. (각각 HDM2와 결합에 관여하는 주요 잔기(F3, W7, L10)는 빨간색으로, 탄화수소체인은 자주색 그리고 상호작용에 기여하는 잔기 Y6을 파란색으로 나타내었습니다)

p53은 이차구조인 나선구조(7.92%)가 확연히 줄어들었고, band와 turn형태가 증가하여 그림 1에서 보이는 것처럼 코일형태를 가지게 되면서 잔기들의 움직임이 상대적으로 자유로워진 것으로 생각됩니다. 이에 비해, 탄화수소체인 나선구조(51.05%)는 비교적 높게 유지되고 비교적 band와 turn형태가 작아 각 잔기들의 움직임이 한정된 것으로 생각됩니다. 이는 시뮬레이션 동안 잔기의 끝에 위치한 탄소(C_α)와 다른 잔기 끝의 탄소(C_α)를 기준으로 한 거리의 변화(그림3)를 통해 움직임을 확인한 결과, 비탄화수소체인 p53은 편차가 4.957Å으로 큰 움직임을 보였고, 탄화수소체인 p53의 편차는

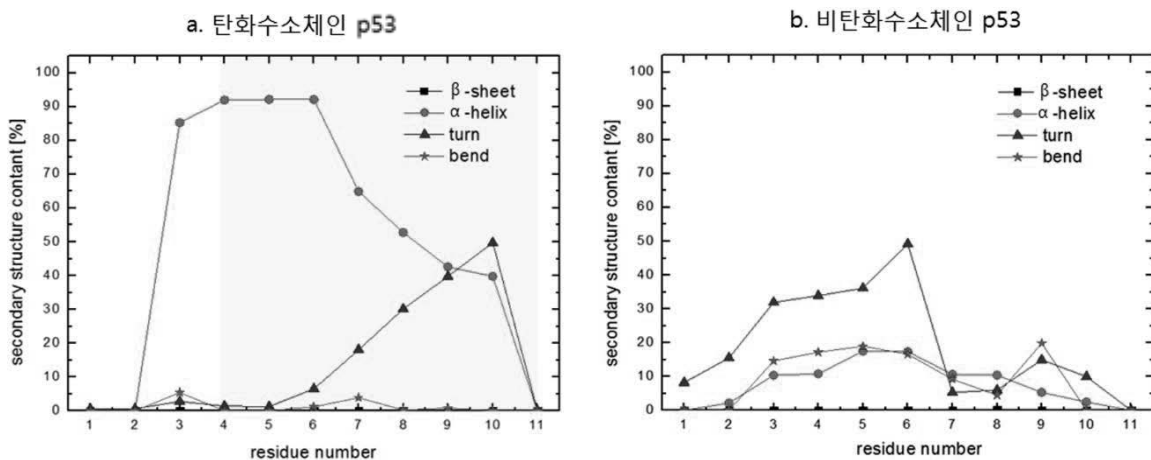


그림 2. a. 탄화수소체인 p53 및 b. 비탄화수소체인 p53의 각 아미노산 잔기에 해당하는 이차구조. (탄화수소체인 사이에 존재하는 아미노산 잔기들은 푸른색 바탕으로 표시하였습니다.)

0.986Å으로 작은 변화를 보였을 뿐만 아니라, C_α제곱평균편차(C_α-RMSD) 또한 비탄화수소체인 p53이 평균 3.94Å(±0.86)으로 탄화수소체인 p53의 평균 값 1.22(±0.24)보다 작은 값으로 탄화수소체인 p53 구조가 더 안정함을 알 수 있었습니다.

탄화수소체인 p53/HDM2과 비탄화수소체인 p53/HDM2의 구조적 특징

Autoduck vina 프로그램을 이용하여 각각의 펩타이드와 HDM2의 복합체형성을 유도하였을 때, 탄화수소체인 p53은 올바른 HDM2의 결합 부위에 잘 결합하는 형태를 보였으나 비탄화수소체인 p53은 결합 잔기 부분 중 하나인 L10 부분이 적절한 형태로 결합하지 않는 형태를 보였습니다(그림4)[10]. 우리는 각 펩타이드가 HDM2와 정확하게 잘 결합하고 있는지 알아보기 위해 결합 잔기 F3, W7, L10와 소수성 작용하고 있는 HDM2의 잔기들을 살펴보았습니다. 탄화수소체인 p53의 F3는 HDM2의 G35, I38, M39, Q49, V52, V70 부분과, W7은 G35, L34, V70 부분 그리고 L10은 L31, V70, H73부분과

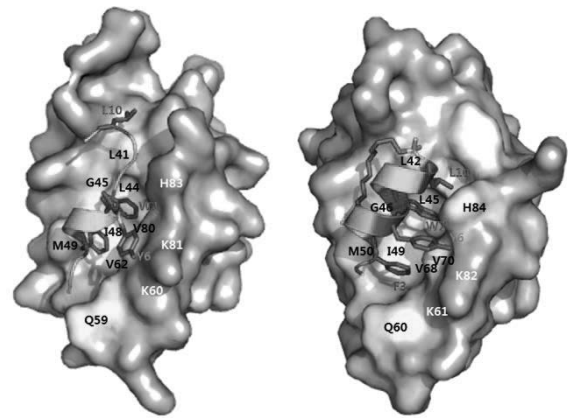


그림 4. a. 탄화수소체인 p53/HDM2 복합체 및 b. 비탄화수소체인 p53/HDM2 복합체. (각 주요 결합 잔기(F3, W7, L10)와 상호작용하는 HDM2의 잔기들을 노란색표면으로 나타내었고, Y6과 상호작용하는 잔기를 연한 보라색표면으로 나타내었습니다)

상호작용하는 부분이 야생형 p53/HDM2인 1YCR구조에서의 p53과 상호작용 하고있는 HDM2의 잔기들과 같았습니다[10]. 비탄화수소체인 p53의 경우, F3은 탄화수소체인 p53과 같은 부분의 HDM2 잔기와 상호작용 하고 있었고 W7는 탄화수소체인 p53과 같은 HDM2의 G35, L34, V70부분, 그리고 탄화수소체인

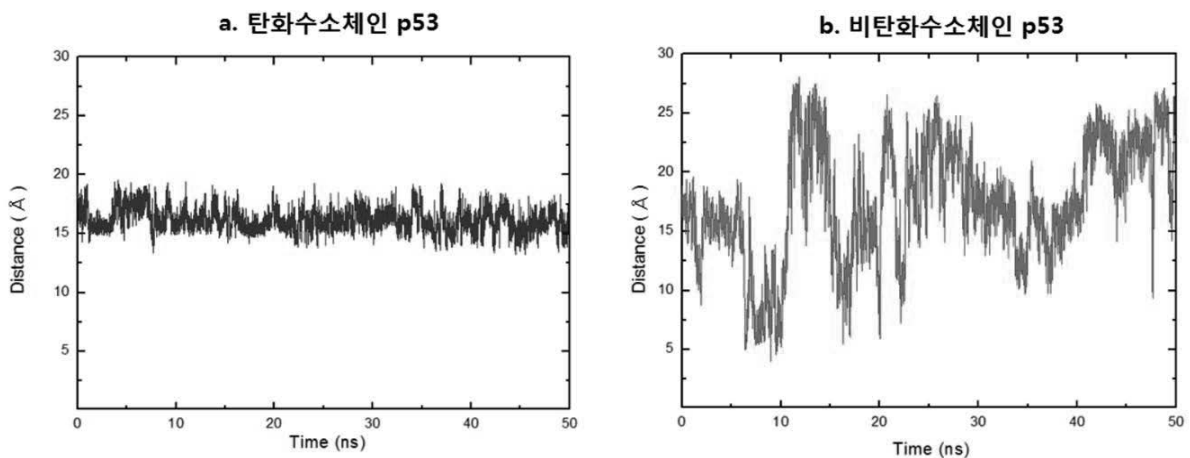


그림 3. a.탄화수소체인 p53과 b. 비탄화수소체인 p53의 잔기의 끝에 위치한 탄소(C_α)와 다른 잔기 끝의 탄소(C_α)를 기준으로 한 거리의 변화를 5ps마다 총 50ns동안 나타낸 그래프입니다

p53에서는 관찰되지 않은 상호작용이지만 1YCR에서 관찰된 I38, L31 부분이 추가로 상호작용하고 있었는데 이는 나선구조 위에 있지 않은 W7이 유동성 있게 HDM2의 소수성 잔기들 사이로 깊숙이 들어갈 수 있었기 때문인 것으로 생각됩니다. 반면, 비탄화수소체인 p53의 L10은 예상대로 HDM2의 L31부분만 1YCR과 같은 소수성 상호작용을 하고, 결합부위가 아닌 다른 K28, Y77부분과 상호작용 하고 있음을 확인하였습니다. 또한, 복합체에서 각각의 펩타이드들은 나선성이 증가되는 특징을 나타내었는데, 탄화수소체인 p53의 경우는 51.05%에서 62.72%로, 비탄화수소체인 p53은 7.92%

에서 14.36%로 증가함을 보여주었습니다. 이러한 결과는 HDM2와의 소수성 상호작용을 통해 구조가 안정화되었음을 알려줍니다

탄화수소체인 p53/HDM2과 비탄화수소체인 p53/HDM2의 용매화 결합 자유에너지 분석.

우리는 탄화수소체인-p53/HDM2 복합체와 비탄화수소체인-p53/HDM2 복합체의 안정도를 알아보고, 그 안정도에 기여하고 있는 각각의 아미노산 잔기들을 확인하기 위해 용매화 결합 자유에너지를 분석하였습니다(그림5). 탄화수소체인-p53/HDM2의 아미노산 잔기들은 전체적

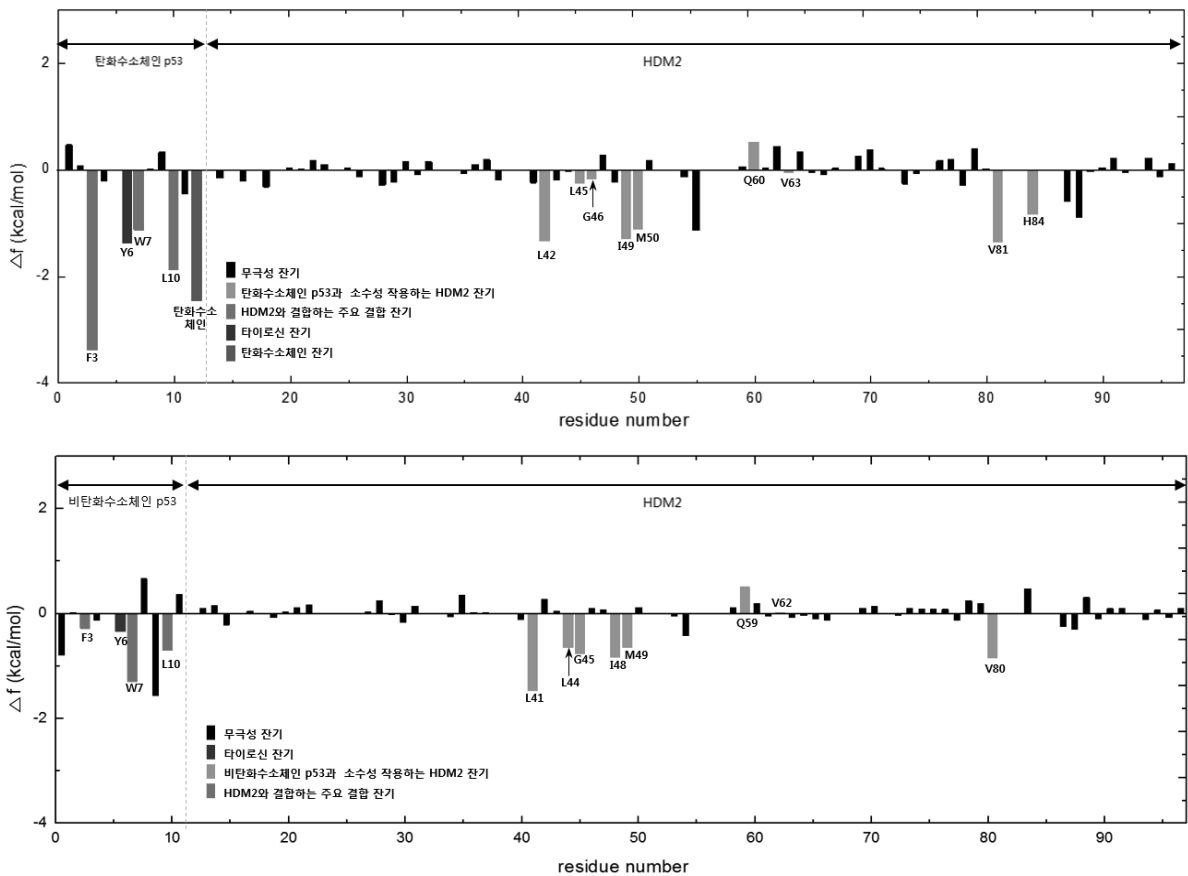


그림 5. a. 탄화수소체인 p53/HDM2 복합체 및 b. 비탄화수소체인 p53/HDM2 복합체의 각 아미노산 잔기별 용매화 결합자유에너지 분석 그래프. (주요 결합 아미노산 잔기(F3, W7, L10)는 분홍색, 탄화수소체인은 초록색, HDM2와 상호작용하는 아미노산 잔기들은 주황색, 소수성 작용에 기여하는 Y6을 보라색, 그리고 일반 무극성 아미노산 잔기를 주황색으로 나타내었습니다.)

으로 비탄화수소체인-p53/HDM2 아미노산 잔기들에 비해 용매화 자유결합에너지 값들이 더 큰 음수 값을 기여했는데, 이는 HDM2의 기여보다 HDM2와 결합하는 펩타이드 아미노산 잔기에 따라 큰 차이를 보였습니다. 눈여겨볼 부분은 그림5의 a에서 탄화수소체인과 Y6잔기가 Δf 값에 기여하고 있는 부분이 두드러지게 큰 것과, 주요 HDM2와 결합하는 아미노산 잔기 중 나선구조 위에 위치한 L10이 비탄화수소체인 p53의 L10 잔기에 비해 매우 증가한 부분, 그리고 특이하게도 F3의 Δf 값이 매우 커진 부분이다. 우리가 계산한 탄화수소체인 p53의 F3은 1YCR에서 발견되는 페닐알라닌이 HDM2와 상호작용하는 잔기들보다 더 많은 잔기들과 높은 확률로 소수성 상호작용을 하고 있음을 확인(특히, 그림5의 a에서 볼 수 있듯이 Δf 에 기여하고 있는 Y55잔기)하였고, L10의 경우 또한 다른 잔기들과도 높은 확률로 소수성 상호작용을 하고 있음을 확인(마찬가지로 그림5의 a의 Δf 에 기여를 하고 있는 I87, Y88부분)하였을 뿐만 아니라, HDM2의 올바른 결합자리가 아닌 다른 부위와 결합한 것으로 보이는 비탄화수소체인 p53의 L10과는 달리 1YCR에서 관찰되는 것과 모두 같은 부위와 높게 상호작용하고 있는 탄화수소체인 p53의 L10은 HDM2와의 결합에 있어 더 많은 Δf 값을 기여하는 것으로 생각됩니다. 결과적으로, 탄화수소체인은 나선구조를 유지시켜 HDM2와의 결합 친화도를 높여주는 동시에 HDM2의 결합 시, HDM2의 표면과도 소수성 상호작용하여 결합의 안정도에도 큰 기여를 하는 것 알 수 있었습니다.

결론

우리는 분자동역학 실험을 통하여 펩타이드에 연결된 탄화수소체인의 중요성을 알아보고

자 탄화수소체인-p53과 비탄화수소체인-p53구조를 계산하여 열역학적인 방법으로 분석하였습니다. 탄화수소체인-p53은 야생형 p53을 구조를 모방한 펩타이드의 초기 나선구조를 코일 형태로 풀리지 않게 단단히 유지시켜주어 주요 결합 잔기들을 올바른 결합방향으로 배치시키고 고정시킴으로써 HDM2의 결합부위에 적절하게 결합하도록 유도하였습니다. 뿐만 아니라, HDM2의 표면과 근접하게 상호작용하여 높은 Δf 에 기여하는 것으로 보아 p53-HDM2의 복합체 구조를 안정한 상태로 형성하는 것을 알 수 있었습니다. 특히, 펩타이드에 함께 설계된 타이로신(Y6)의 경우에도 비탄화수소체인-p53이 HDM2와 결합 형성 시, HDM2 표면과 상호작용을 통해 나선구조 위에 위치하지 않았던 주요결합 잔기 W7가 올바르게 결합할 수 있도록 방향을 유도하였으며, 소수성 상호작용을 통한 Δf 값에도 기여하여 긍정적인 역할을 한 것으로 생각됩니다. 결과적으로, 이 연구에서 탄화수소체인-p53은 비탄화수소체인-p53에 비해 HDM2에 대한 상호작용이 더 좋으며, 적절한 잔기의 배치로 결합친화도 또한 높은 것을 확인하였습니다. 이 결과는 암 질병 치료를 목적으로 p53-HDM2 상호작용을 억제하는데 반드시 필요한 p53-HDM2 억제제의 설계에 탄화수소체인의 역할이 중요함을 시사하며 그 가능성을 보여줍니다.

감사의 글

본 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단 첨단 사이언스·교육 허브 개발 사업의 지원을 받아 수행된 연구입니다.(NRF-2011-0020576)

참고문헌

[1] Adelene Y. L. Sim, Thomas Joseph, David P. Lane, and Chandra Verma J., *Chem. Theory Comput.* 10, 1753–1761 **(2014)**

[2] Christopher J. Brown, Sonia Lain, Chandra S. Verma, A. J., *Nat.*, 9, 862-873 **(2009)**

[3] Verdine, G. L.; Walensky, L. D. *Clin. Cancer Res.*, 13, 7264–7270. **(2007)**

[4] Bock, J. E., Gavenonis, J., Kritzer, J. A. *ACS Chem. Biol.*, 8, 488–499. **(2013)**

[5] Sohee Baek, Peter S. Kutchukian, Gregory L. Verdine, *J. Am. Chem.Soc.*,134, 103–106 **(2012)**

[6] Garima Tiwari and Chandra S. Verma, *J. Phys. Chem.* 121, 657–670 **(2017)**

[7] Adelene Y. L. Sim and Chandra Verma, *J Comput Chem*, 36, 773–784 **(2015)**

[8] Christian E. Schafmeister, Julia Po, and Gregory L. Verdine *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 122, 24 **(2000)**

[9] OLEG TROTT, ARTHUR J. OLSON, *J Comput Chem.* 31, 455–461 **(2010)**

[10] Paul H. Kussie, Svetlana Gorina, Vincent Marechal, Brian Elenbaas, Jacques Moreau, Arnold J. Levine, Nikola P. Pavletich, *science*, 274 8 **(1996)**