

<붙임 4>

기관고유연구사업 최종보고서							
연구분야(코드)	T-3	과제번호	1310400		지원 프로그램	창의 (일반연구)과제	
과제성격(기초,응용,개발)	기초	실용화 대상여부	실용화	공개가능여부 (공개,비공개)			공개
연구과제명	(국문) 단백질 인산화 효소의 구조생물학적 연구: CDK1-Cyclin B를 중심으로 (영문) Structural studies of protein kinases: focusing on CDK1-Cyclin B						
과제책임자	소 속	바이오분자기능 연구과	직 위	선임연구원			
	성 명	이 병 일	전 공	구조생물학			
세부과제	구분	세부과제명		세부과제책임자			
		성명	소속(직위)	전 공			
	1						
	2						
	3						
총 연구기간	2013년 1월~ 2014년 12월(총 2년)		참여연구원수 (단위: 명, MY)		3		
연구기간 및 연구비 (단위:천원)	구분	연구기간	계	국립 암센터	기업부담금		
					소계	현금	현물
	계	2013.01.01 ~ 2014.12.31	160,000	160,000			
	제1차	2013.01.01. ~ 2013.12.31	80,000	80,000			
	제2차	2014.01.01. ~ 2014.12.31	80,000	80,000			
	제3차	~					
참여기업	명칭		전화		FAX		
<p>기관고유연구사업관리규칙에 따라 본 연구개발사업을 성실히 수행하였으며 아래와 같이 최종보고서를 제출합니다.</p> <p style="text-align: center;">2014년 10 월 30 일</p> <p style="text-align: center;">과제책임자 이 병 일 (서명)</p>							
국립 암 센터 원 장 귀 하							
(첨부서류)							

목 차

< 요약 문 >

(한글)	3
(영문)	4
1. 연구의 최종목표	5
2. 연구의 내용 및 결과	9
3. 연구결과 고찰 및 결론	
4. 연구성과 및 목표달성도	17
5. 연구결과의 활용계획	22
6. 참고문헌	22
7. 첨부서류	23

< 요약 문 >

연구목표 (200자 이내)	<p><최종목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - CDK1을 비롯한 항암 표적 kinase의 구조를 규명하여 CDK family의 다른 kinase와 구조적 비교를 통하여 CDK1의 작용 메커니즘을 규명하고 CDK 저해제 개발의 기반을 마련함 - CDK1의 구조를 바탕으로 기존에 개발 중인 CDK1 저해제들의 문제점을 분석하여 개선된 저해제 발굴에 도움이 되도록 함 - 기타 항암제 표적 kinase의 구조 규명을 통하여 구조 기반 항암제 개발의 토대 마련 <p><당해연도목표></p> <p>항암 표적 kinase의 결정화 및 삼차원 구조를 규명한다.</p>														
연구내용 및 방법 (500자 이내)	<ul style="list-style-type: none"> - CDK1을 비롯한 항암표적 kinase의 대량 발현 및 정제 조건 확립 - E.coli 또는 insect cell (Sf9)을 이용한 protein kinase의 대량 발현 - 컬럼 크로마토 그래피를 이용한 순수 정제 - 안정적인 단백질 정제 조건을 확립함 - 결정화 조건 스크리닝 - Protein kinase와 저해제의 결합체 제조 - ITC, SPR 등을 이용한 저해능력 확인 - 단백질과 결합이 확인된 저해제의 결정화 - 결정이 얻어지면 X-선 회절 데이터를 수집함 														
연구개발에 따른 기대성과	<p><정량적 성과¹⁾></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">구분</th> <th style="width: 30%;">달성치/목표치¹⁾</th> <th style="width: 30%;">달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>2/1</td> <td>200</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>4.71</td> <td>117</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td>구조 규명 6종</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table> <p>< 정성적 성과 ></p> <p>CDK1, Syk kinase, Pim1 kinase에 대한 발현 정제 조건 확립 insect cell expression system 구축</p> <p><기타 사항></p> <p>2015년도에 kinase 구조에 대한 논문 1편 (단독사사)로 투고 예정</p>			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	2/1	200	IF 합	4.71	117	기타 성과	구조 규명 6종	100
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)													
SCI 논문 편수	2/1	200													
IF 합	4.71	117													
기타 성과	구조 규명 6종	100													
색인어	국문	단백질 인산화 효소	세포주기	삼차원 구조											
		결정 구조	저해제	마이토시스											
		사이클린의존인산화 효소	사이클린												
	영문	kinase	cell cycle	3 dimensional structure											
		crystal structure	inhibitor	mitosis											
		CDK	Cyclin												

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Structural studies of protein kinases: focusing on CDK1-Cyclin B
Key Words	kinase, cell cycle, 3D-structure, inhibitor, mitosis, CDK, cyclin
Project Leader	BYUNG IL LEE
Associated Company	
<p>● Purposes of Research</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determining the three-dimensional structure of various protein kinases that are important for development of anticancer drugs. - The main target for research was cyclin-dependent kinase 1 that is key regulator in cell cycle especially mitosis period. - Other drug target kinases such as Syk and Pim1 were also subjects of the research. <p>● Method & Contents</p> <ul style="list-style-type: none"> - Overexpression and purification of target proteins - Crystallization of target kinases - X-ray diffraction experiment and computational calculations - Refinement of structural models - Analysis of determined kinase structures - Biochemical studies on kinases and their inhibitors <p>● Results & Discussion</p> <ul style="list-style-type: none"> - We successfully overexpressed recombinant CDK1 in Sf9 insect cells using baculovirus - Recombinant CDK1 was purified - Crystallization is not successful yet - Other drug target kinases, Syk and Pim1 kinases were purified and crystallized - Structures of Syk and Pim1 in complex with various inhibitors were determined and analyzed 	

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

1. 연구의 최종목표

● 최종 목표:

- **CDK1을 비롯한 항암 표적 kinase의 구조를 규명**하여 CDK family의 다른 kinase와 구조적 비교를 통하여 CDK1의 작용 메커니즘을 규명하고 **CDK 저해제 개발의 기반**을 마련함
- CDK1의 구조를 바탕으로 기존에 개발 중인 CDK1 저해제들의 문제점을 분석하여 개선된 저해제 발굴에 도움이 되도록 함
- 기타 항암제 표적 kinase의 구조 규명을 통하여 구조 기반 항암제 개발의 토대 마련

연차별 목표:

구분	목표	내용 및 범위	연구비
1차년도 (2013)	CDK1을 비롯한 항암표적 kinase의 대량 발현 및 정제 조건 확립	E.coli, insect cell등을 이용한 대량 발현 조건 탐색 안정한 단백질 정제 조건 탐색	80,000
2차년도 (2014)	항암 표적 kinase의 결정화 및 구조 규명	단백질 결정화 조건 탐색 및 X-선 회절 실험 X-선 회절 데이터를 이용한 위상 문제 해결 및 구조 정밀화	80,000

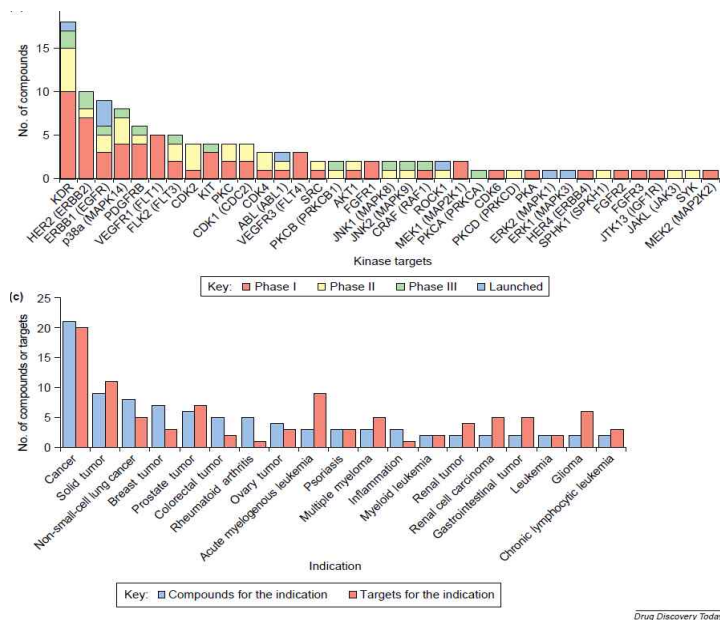
● 연구의 목적

Protein kinase 와 암

- Protein kinase는 다른 단백질의 tyrosine, serine, threonine 잔기를 인산화 하는 단백질로서 가장 연구가 많이 수행된 단백질 군임
- 인간 유전체 해독을 통하여 약 518개의 protein kinase 유전자가 확인되었으며 이 중에 약 164개 kinase는 종양과 관련되어 있고 80여개는 다른 질환과 관련되어 있음 (Manning et al., 2002)
- 생물학, 의학, 화학적인 다학제 연구를 통하여 빠른 시간내에 다양한 기능, 질환 관련성, 신약 표적으로서의 가능성 등이 연구되어 왔음
- 1998년 최초의 protein kinase 저해 기전 항암제인 Herceptin이 FDA에 승인된 이래 많은 제약사들이 kinase를 표적으로 한 항암제 개발에 성공하였거나 활발히 개발 중에 있음
- kinase는 세포의 기능을 조절하는데 거의 모든 단계에서 작용하므로 여러 질환을 대상으로 한 신약 개발전략이 모색되었음
- 현재 글로벌 제약사의 전체 R&D의 25% 정도가 kinase를 대상으로 하고 있음 (Vieth et al., 2005, Drug discovery today)
- 현재 임상에서 이용하고 있는 많은 표적 항암제가 kinase를 표적으로 하고 있으며 글로벌 제약

사의 신약개발 pipeline에서도 항암제를 중심으로 kinase를 신약개발의 표적으로 하고 있음

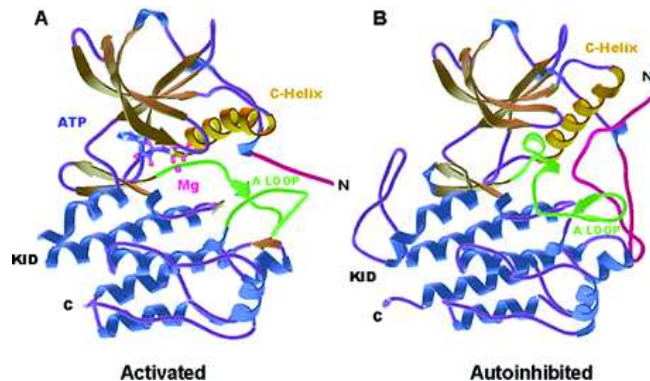
- kinase를 저해하는 전략은 크게 monoclonal antibody를 이용한 항체 신약과 소분자 물질을 이용한 약 개발로 나눌 수 있음. 하지만 세포내에 존재하는 kinase를 표적으로 하는 경우 소분자 물질이 좀더 효과적일 것으로 여겨짐
- 소분자 물질은 주로 kinase의 kinase domain에서 ATP가 결합하는 자리를 표적으로 개발되어 왔음
- 세포 안에 500개가 넘는 protein kinase가 존재하기 때문에 표적 단백질의 저해능력 뿐만 아니라 표적 선택성이 (specificity) 매우 중요한 고려 사항이 되어야 함
- 그동안 암세포에서의 분자적 변이가 많이 연구됨으로서 효과가 높고 부작용이 적은 항암제가 개발되고 있으며 특히 표적 치료제가 개발되었거나 개발되고 있으며, 이는 기존의 cytotoxic agent를 대체할 훌륭한 항암제로서 각광을 받고 있음
- Growth factor와 receptor 신호전달 체계에 작용하는 monoclonal antibody나 small molecule 저해제가 항암제로서 많이 개발되었으며 많은 경우 tyrosine kinase 저해제임 (bevacizumab, cetuximab, panitumumab, erlotinib, sunitinib, sorafenib등)
- 최근들어 tyrosine kinase 이외에 Serine/Threonine kinase가 항암제 표적단백질로서 관심을 갖고 연구가 되어 오고 있다.
- 예를 들어 mTOR 저해제, Polo-like kinase, aurora kinase 저해제들이 개발되어 현재 임상시험 중에 있음 (Lens et al., 2010, Kanayama et al., 2010, Dar et al., 2010)



(그림. 개발 중인 kinase 저해제 현황; Jeffrey et al., 2005)

Protein kinase 구조연구 현황

- 신약개발은 시간과 비용이 많이 드는 process로서 위험 부담을 줄이기 위하여 신약 표적에 대한 선행 연구를 충분히 수행하여야 함
- 신약 표적 단백질의 삼차원 구조 연구는 신약 개발 process에서 중요한 starting point가 될 수 있음
- Src oncogene이 발견되고 이것이 kinase라는 것이 확인된 이래, 많은 kinase들이 암을 비롯한 많은 질병과 연관이 있음이 밝혀졌음
- Multidomain을 가진 protein kinase가 많이 있지만 인산화와 직접 관련한 kinase domain의 삼차원 구조는 전체적으로 유사성이 높음
- kinase domain은 크게 2개의 lobe (N-lobe, C-lobe)로 이루어져 있으며 N-lobe는 C-helix를 포함한 beta-sheet 구조를 하고 있으며 C-lobe는 큰 alpha-helical 구조를 하고 있으며 ATP는 N-lobe와 C-lobe사이에 큰 binding claft를 이루고 있음

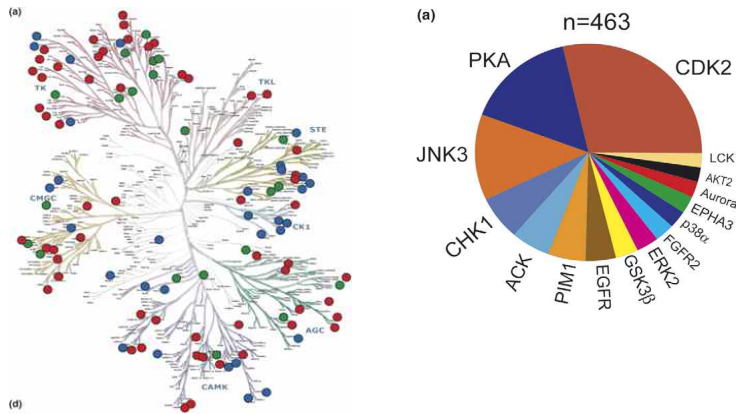


(그림. 전형적인 protein kinase 구조)

- 현재 약 500여개의 kinase와 저해제의 결합구조가 알려져 있으나 몇 개의 kinase에 집중되어 있으며 아직 삼차원 구조가 알려지지 않은 kinase가 많음 (Marsden & Kanpp, 2008)
- 현재 구조가 알려져 있지 않은 kinase의 삼차원 구조 연구를 통하여 분자수준에서의 기능을 분석하고 나아가 저해제 개발에 응용할 수 있으며 높은 수준의 논문을 발표할 수 있는 기회가 될 수 있음
- 전세계적으로 kinase의 구조 연구가 활발히 이루어지고 있으며 몇 개의 우수 연구 그룹과 글로벌 제약사들을 중심으로 집중되고 있음
- 우리나라의 경우 대학을 중심으로 여러 가지 kinase에 대한 기초연구가 수행되고 있으며, 약화학 전공을 중심으로 재해제 개발 연구가 이루어지고 있음
- **Human Protein kinase의 구조 연구는 본 연구팀 이외에는 거의 이루어지지 못하고 있음**
- 일부 제약회사에서 kinase 저해제 발굴을 시도 하고 있으나 기존 database (PDB) 상에 공개되어 있는 kinase 구조를 이용하여 초기 신약 설계는 이루어지고 있으나 설계된 kinase 저해제의

실제 binding mode의 구조적 분석을 현실적으로 하기 어려운 상황으로 신약개발에 어려움을 겪고 있음

- 이는 human protein kinase 구조 규명이 가능한 여건을 갖춘 연구팀이 거의 전무한 국내상황도 한 몫을 하고 있음



(그림. kinome에서 삼차원 구조가 밝혀진 kinases들)

구조 기반 신약 개발의 개념 및 본 연구과제의 적용 필요성

- 최근 제약사들의 R&D 예산은 기하급수적으로 증가했지만 new chemical entity는 이에 상응하게 증가하지 못함
- 고비용 저효율의 신약 개발 프로세스를 보완할 수 있는 새로운 개념의 시도가 요구됨
- 단백질 구조를 이용한 신약개발이 고효율의 신약 개발 프로세스를 위한 하나의 대안으로 제시됨
- 단백질 구조정보를 이용하여 신약개발에 성공한 대표적인 예는 Merck, Abbott등의 제약회사에서 성공한 HIV protease의 구조를 이용한 AIDS 치료제의 개발임
- 만성 골수성 백혈병 치료제인 Gleevec의 개발에도 Abl kinase 구조정보가 중요하게 이용됨 (Novartis)
- 독감치료제 Tamiflu의 개발 (Gilead)에도 Neuraminidase 구조가 중요하게 이용됨
- Hit 화합물 최적화 연구에서 구조 정보는 최소의 노력으로 최대의 효과를 낼 수 있는 지름길이 됨

연구의 범위

본 연구는 다양한 protein kinase의 삼차원 구조를 규명하고 저해제 후보물질과 결합구조를 규명하여 저해제의 결합 원리를 파악하여 우수한 저해제 후보물질을 도출한다.

구조 연구 타겟은 세포주기를 조절하는 cyclin dependent kinase 1 (CDK1), B-cell signaling에 관

여하는 Spleen tyrosine kinase (SYK), oncogenic kinase인 Pim1을 대상으로 하며 아직 삼차원 구조가 전혀 알려지지 않은 CDK1을 가장 우선순위로 연구하였다.

연구 범위는 단백질 대량 발현, 정제, 결정화, X-ray 회절 실험, 컴퓨터를 이용한 구조 정밀화와 저해제를 이용한 여러 가지 생화학적 연구를 포함한다.

2. 연구의 내용 및 결과

◆ CDK family 단백질의 구조연구

(1) 대량 발현을 위한 유전자 클로닝

- 구조규명을 위하여 정확히 folding을 이룬 수 mg이상의 고순도 단백질이 필요하며 많은 경우 E.coli에서 제대로 folding을 이루면서 발현되지 않았음
- 따라서 곤충세포를 이용한 발현 시스템이 중요한 방법이 되므로 insect cell를 이용한 발현 시스템에 용이한 벡터를 이용하여 클로닝을 시행하였음
- CDK1의 복합체 구조를 시도하기 위해서 결합 단백질인 Cyclin B1을 클로닝 하였음
- CDK family 단백질의 구조적인 연구를 위해 CDK10과 CDK19도 클로닝 하였음

Vector	Construct	Fusing tag	Expression host
pET28b	CDK1_Wild-type (1-297)	N-His	E.coli
	CDK1_syn		
pAcHLT	CDK1_WT (1-297)	N-His	Insect cell
	CDK1_E41T mutant		
	CDK1_loop mutant		
	CDK1_loop_E41T mutant		

(표. CDK1의 클로닝 construct)

Vector	Construct	Fusing tag	Expression host
pET28b	Cyclin B1 (full-length)	N-His	E.coli
pHis	Cyclin B1 (full-length/165-433)		
pGST	Cyclin B1 (full-length)	N-GST	

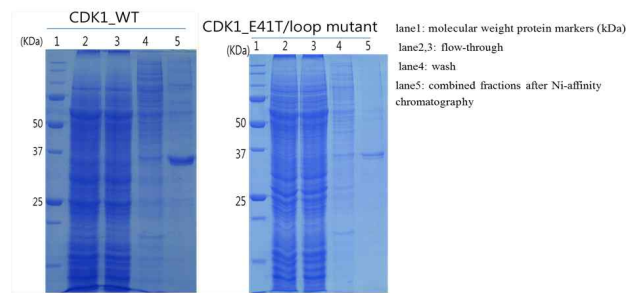
(표. CDK1의 결합단백질 Cyclin B1 의 클로닝 construct)

Vector	Construct	Fusing tag	Expression host
pET28b	CDK19 (1-341/15-341)	N-His	E.coli
pHis	CDK10 (35-331)		
pGST	CDK10 (35-331)	N-GST	
pHis	CDK10 (35-331)	C-His	
	CDK19 (1-341)		
pVL1393	CDK10 (35-331)	C-His	Insect cells
	CDK19 (1-341)		
	CDK19 (15-341)		

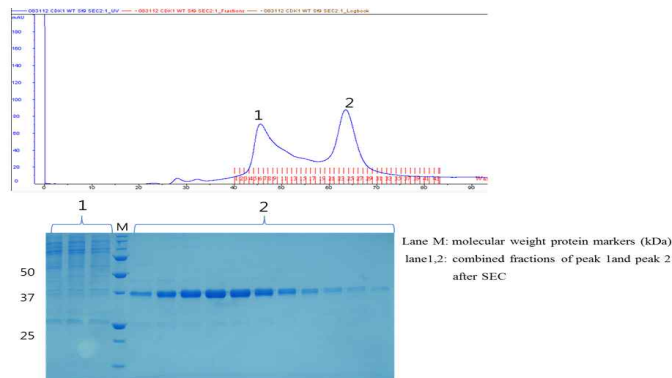
(표. CDK1 famliy CDK10 과 CDK19 클로닝 construct)

-CDK1(N-His Tag)발현 및 정제

정제를 위하여 pET28b 벡터에 클로닝 된 CDK1 full-length 를 이용하여 E.coli 시스템을 시도 하였는데 soluble하게 발현 되지 않아 insect cell을 이용하기로 하였다. Insect cell 시스템을 이용하기 위해서 발현 벡터인 pAcHLT에 클로닝된 wild type, E41T mutant 그리고 loop mutant를 발현 테스트 하였다. 테스트 결과 적은 양이지만 발현이 확인되어 정제를 시도 하였다. 정제 과정은 세 단백질의 histag을 이용하여 Ni²⁺-NTA컬럼과 size 분리법을 이용한 gel filtration 컬럼 (SEC)을 이용하여 고 순도로 정제하였다.



(그림. Ni-affinity chromatography를 이용한 CDK1_Wild-type/E41T/loop mutant)

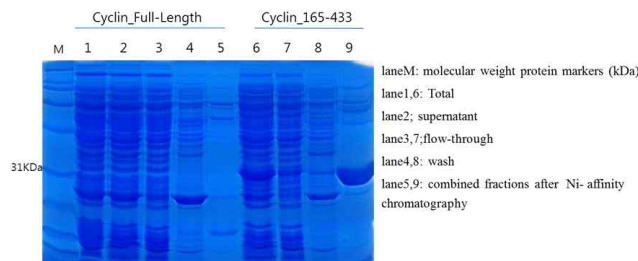


(그림. SEC를 이용한 CDK1 정제)

Gel filtration 컬럼 (SEC)후에 농축을 한 다음 Bradford 시약을 이용 하여 농도를 측정 하였다. 측정 결과 Wild-type 4.63mg/ml과 E41T mutant 3.98mg/ml 를 얻을 수 있었다.

-CDK1 (N-His Tag)결합단백질인 Cyclin B1 발현 및 정제

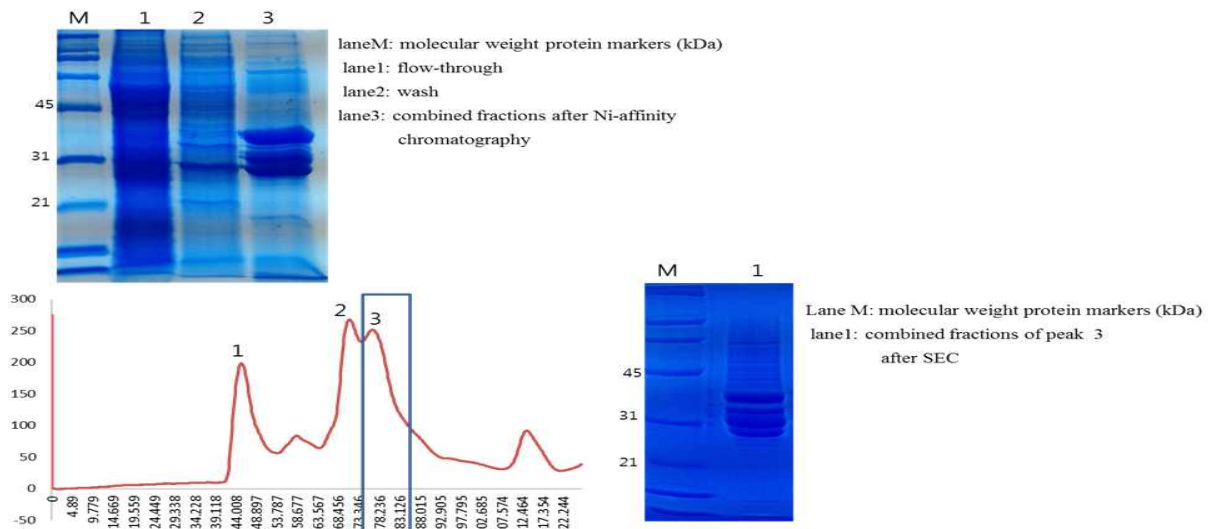
Cyclin B1의 정제를 위해서 full-length (48KDa) 와 165-433 construct (31KDa)의 발현 정도를 E.coli 시스템에서 테스트한 결과 165-433 construct가 많은 양이 발현 되어 정제를 시도 하였다.



(그림. Cyclin B1 full-length / 165-433 정제)

-CDK1_WT(N-His-Tag)-Cyclin B1 정제

CDK1의 구조적인 기능 연구와 단백질의 안정화를 위하여 복합체를 정제 하였다. 정제 과정은 두 단백질의 histag을 이용하여 Ni²⁺-NTA컬럼과 결합체와 비 결합체를 분리하기 위해서 gel filtration 컬럼 (SEC)을 이용하여 정제하였다. Gel filtration 컬럼 (SEC)후, 농축을 한 다음 Bradford 시약을 이용하여 농도를 측정 하였다. 측정 결과 12.34 mg/ml를 얻을 수 있었다.



(그림. CDK1_WT-Cyclin B1 정제)

-C-His-Tag fusion CDK1 클로닝, 발현 및 정제

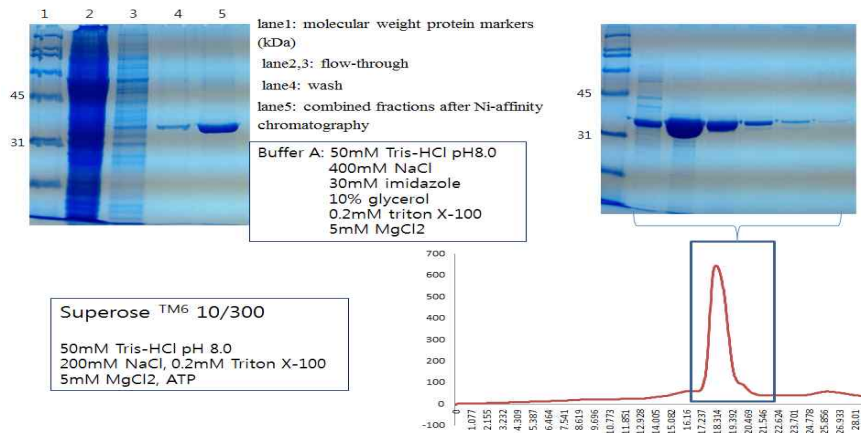
우리는 이전에 insect cell를 이용한 발현 시스템에 용이한 N-his Tag fusion 벡터(pAcHLT vector)를 이용하여 클로닝을 시행 하였다. 하지만 pAcHLT vector를 이용하여 N-His Tag으로 fusion시켰을 경우 정제를 한 후 stable 한 형태로 단백질을 얻을 수 없어서 결정화의 어려움이 있었다. 그래서 우리는 pVL1393 vector를 이용하여 C-His Tag 으로 fusion 시켜서 다시 정제를 시도 하였다.

Vector	Construct	Fusing tag	Expression host
pVL1393	CDK1_WT (1-297)	C-His	Insect cell
	CDK1_E41T mutant		
	CDK1_loop mutant		
	CDK1_loop_E41T mutant		

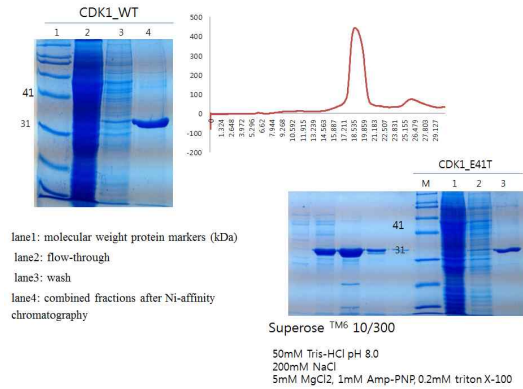
-pVL1393_CDK1_WT 발현 및 정제

Insect cell 시스템을 이용하여 발현 벡터인 pVL1393 vector 에 클로닝된 wild type, E41T mutant 그리고 loop mutant를 발현 테스트 하였다. 테스트 결과 적은 양이지만 wild type, E41T가 발현이 확인되어 정제를 시도 하였다. 정제 과정은 세 단백질의 histag을 이용하여 Ni²⁺-NTA컬럼과 size 분리법을 이용한 gel filtration 컬럼 (SEC)을 이용하여 고 순도로 정제하였다.

정제 과정 중에 stable하게 유지 하기 위해 triton X-100 (detergent)를 첨가 하여 정제를 시도 하였다. 또한 ATP, AMP-PNP, 그리고 inhibitor (flavopridol)을 넣고 정제하여 결정화를 시도 하였다.



(그림. Ni-affinity chromatography/SEC를 이용한 CDK1_Wild-type-ATP)



(그림. Ni-affinity chromatography/SEC를 이용한 CDK1_Wild-type/E41T-AMP-PNP)

- T4_Lysozyme fusion

막 단백질에서는 stability와 solubility를 향상시키기 위해서 T4 Lysozyme (PDB ID 2O7A, MW15.9 kDa), flavodoxin (PDB ID 1I1O, MW 14.9 kDa), xylanase (PDB ID 2B45, MW 19.1 kDa), rubredoxin (PDB ID1FHM, MW 5.5 kDa), and cytochrome b562RIL (PDB ID 1M6T, MW 10.9 kDa)등을 fusion partner로 이용하였다. 그래서 CDK1의 stability와 solubility를 향상하기 위해서 fusion partner들 중에서 T4_Lysozyme을 fusion 하여 정제와 결정화를 시도 하였다.

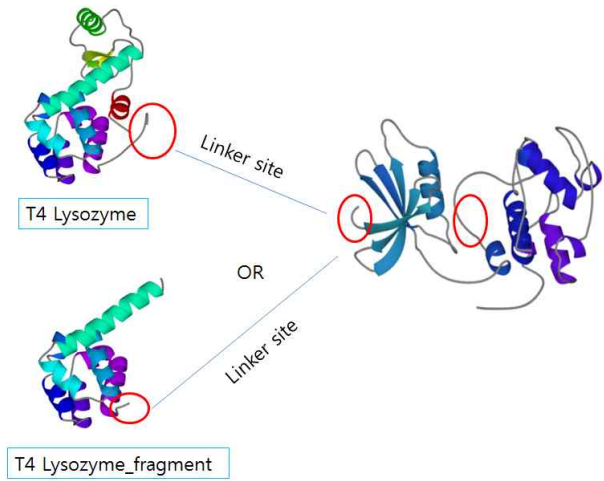
- CDK1 N-term에 T4 Lysozyme cloning construct (His-tag)

Vector	T4 Lysozyme construct	Expresion host
pET28b/CDK1	1-179	<i>E.coli</i>
	59-157	

- CDK1 loop에 T4 Lysozyme cloning construction (His-tag)

Vector	CDK1construct	T4 Lysozyme construct	Expresion host

pET28b	1-96	59-157	<i>E.coli</i>
	102-297		

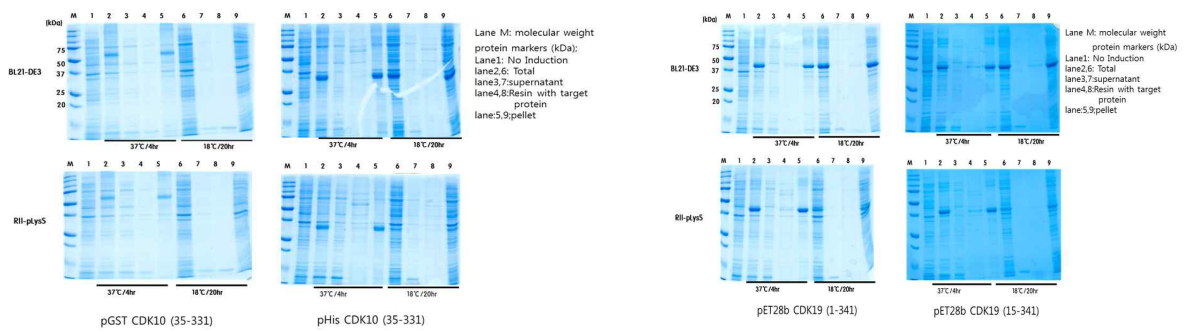


(그림. T4_Lysozyme-CDK1 linker site)

-CDK family중에 CDK10 과 CDK19 발현

CDK family protein 중에서 기능이 저해되면 암의 발생을 촉진하는 것으로 알려진 CDK10, CDK19 단백질의 구조 연구를 위하여 E.coli, insect cell 시스템에서 발현 테스트를 시도 하였다.

하지만 모두 insoluble하여 단백질 정제를 할 수 없었다.



(그림. CDK10, CDK19 발현)

- 단백질 결정화

정제에 성공하였던 CDK1 WT, E41T mutant와 Cyclin B와 co-purify한 단백질 등을 결정화하기 위하여 여러가지 스크리닝을 수행하였으나 결정을 얻지 못하였다.

◆ Syk kinase (Spleen tyrosine kinase) 단백질의 구조연구

(1) Syk kinase 대량 발현을 위한 유전자 클로닝

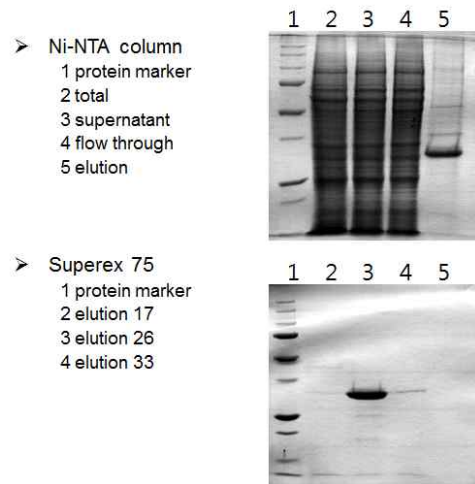
- pHis vector에 NdeI/XhoI(No stop codon)을 이용하여 Syk kinase domain (356-635) 유전자를 클로닝 하였다. 해당 construct는 C-terminal에 8개의 poly histidine tag이 달려있는 construct이다.

- pHis-Syk 유전자를 PCR로 증폭하여 pVL1393 vector에 C-terminal histag이 포함된 유전자를 클로닝하였다. 해당 유전자는 356번 아미노산 앞에 발현을 증가하기 위하여 Met-Ala-Leu을 인위적으로 fusion한 상태이다. 즉 construct는 MAL-Syk-LEHHHHHHHHH의 이미노산 서열을 갖는 재조합단백질을 생산할 수 있다.

(2) Syk kinase의 대량 발현 및 정제

- Sf9 cell에 linearized viral DNA와 pVL1392-Syk 플라스미드를 co-transfection한 후 4회의 amplification 과정을 거쳐 baculovirus를 제조하였다. 얻어진 바이러스를 Sf9 cell에 감염시켜 수 L 배양하여 재조합 단백질을 생산하였다.

- 단백질은 Ni-NTA 컬럼과 superdex75 컬럼을 이용하여 높은 순도로 정제할 수 있었다. 정제된 단백질은 10 mM HEPES pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% glycerol, 10 mM MgCl₂ 버퍼에서 안정하게 유지되었다.

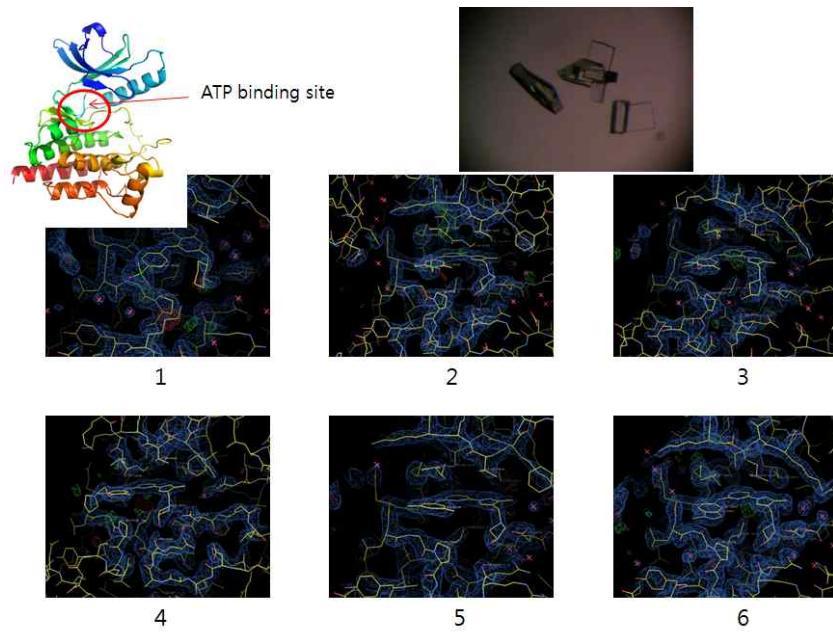


(그림. Syk kinase의 정제)

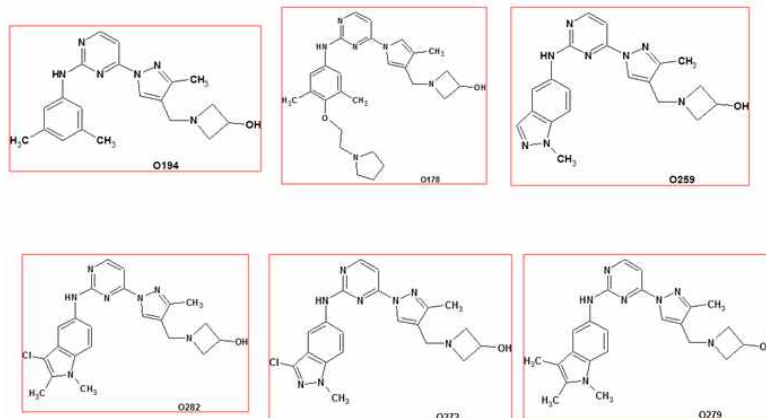
(3) Syk kinase의 결정화 및 구조 규명

- 여러 가지 결정화 스크리닝 키트를 이용하여 Syk kinase의 결정화 조건을 탐색한 결과 10~20% PEG3350, 100 mM Tris-HCl pH8.5 조건에서 여러 가지 저해제를 농도 1~5 mM로 co-crystallization하였을 때 결정을 얻을 수 있었다.

- 구조 규명에 이용된 저해제는 총 6개로서 모두 4-(pyrro)pyrimidine 또는 4-(pyrazol)pyrimidine derivative 계열이다.



(그림. Syk kinase 결정과 결정 구조. 6종의 저해제 부분의 전자밀도 그림)



(그림. Syk kinase 구조 규명에 이용된 저해제들)

◆ Pim1 kinase와 저해제의 결합체 구조연구

- Pim1 kinase 유전자 (29-313)를 pHis vector에 NdeI/NotI로 클로닝하여 대장균에서 발현 하였다. 얻어지는 재조합 단백질은 C-terminal에 Histag을 포함하고 있어 Ni-NTA 컬럼과 Superdex75 컬럼을 이용하여 Pim1을 정제하였으며 0.7 M potassium tartrate, 0.1 M MES 버퍼 조건에서 Pim1의 결정을 얻을 수 있었다.

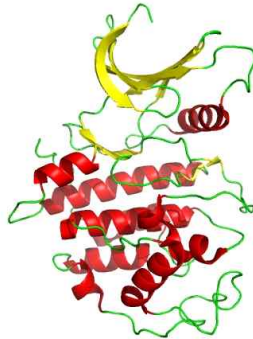
- 얻어진 결정에 저해제를 soaking하여 X-선 회절 데이터를 수집하였다.

- X-선 회절 데이터와 기존에 알려진 Pim1 kinase 구조를 이용하여 분자치환법으로 Pim1과 pyridopyrimidine derivative 계열의 저해제와의 결합 구조를 규명하였다.

3. 연구결과 고찰 및 결론

◆ CDK1 구조 연구에 대한 고찰

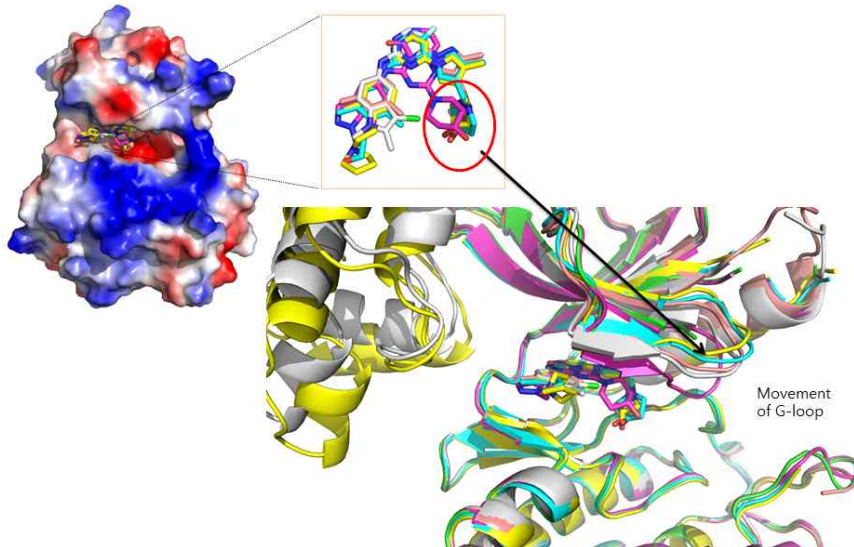
- CDK1은 CDK family 단백질 중 가장 중요한 역할을 한다고 알려져 있지만 그 삼차원 구조가 전혀 알려져 있지 않다 (Malumbres & Barbacid, 2009).
- 본 연구를 통하여 CDK1 단백질을 대량으로 발현 정제할 수 있었으며 비록 결정 구조를 규명하지는 못하였으나 얻어진 재조합 단백질을 이용하여 저해제 스크리닝이 가능할 것으로 기대된다.
- CDK1은 아미노산 서열상 CDK2와 매우 유사하여 이미 구조가 알려져 있는 CDK2 구조를 이용하여 homology modeling을 수행한 정보가 이미 있으며 이 구조 정보와 라이브러리 스크리닝을 통한 저해제 후보물질 정보를 통합하여 SAR (structure activity relation) 연구가 가능할 것이다.



(그림. homology modeling을 통한 CDK1의 삼차원 구조 모델)

◆ Syk kinase (Spleen tyrosine kinase) 단백질의 구조연구에 대한 고찰

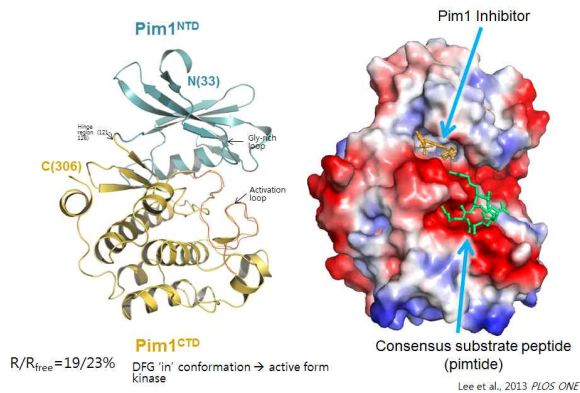
- 본 연구에서는 Syk kinase와 여러 가지 저해제의 결합체 구조를 규명함으로써 Syk 저해제 발굴의 기반을 마련하였다.
- Syk kinase와 저해제의 결합체를 분석한 결과 G-loop 부분의 구조가 저해제의 종류에 따라 크게 변화함을 확인할 수 있었다.
- 따라서 저해제 디자인에서 G-loop과의 결합에 관여하는 부분을 고려하여 디자인하게 되면 더 우수한 저해제의 발굴이 가능할 것으로 기대된다.
- Syk kinase는 기본적으로 알러지, 천식, 류마티스 등 자가면역질환의 신약 표적으로 알려져 있어 해당 질환을 적용증으로 하는 저해제 개발이 활발하게 이루어지고 있다.
- 하지만 Syk는 세포의 proliferation, differentiation등에도 큰 영향을 준다고 알려져 있어 암과의 연관성이 제기되고 있으며 실제로 haematological malignancies에 신약표적으로서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 따라서 syk 저해제 개발을 통하여 혈액암 치료제 발굴이 가능할 것이며 본 연구는 이러한 신약 개발에 중요한 기초 자료를 제공할 수 있다.



(그림. Syk kinase와 저해제 6종의 구조를 겹쳐 보았을 때 구조의 변화)

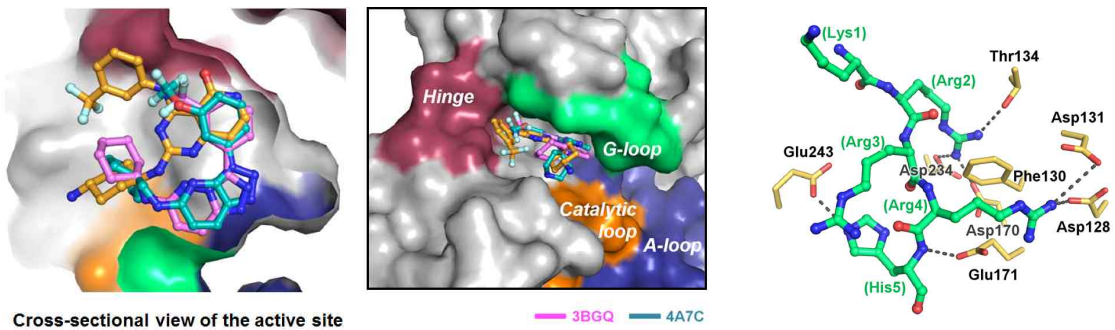
◆ Pim1 단백질의 구조연구에 대한 고찰

- 본 연구를 통하여 Pim1과 pyridopyrimidine 유도체의 결합 구조를 규명하였다. 해당 저해제 후보물질은 Pim1에 대하여 약 100 nM의 IC₅₀ 값을 보이는 초기 선도물질이었다.



(그림. 본 연구에서 도출된 Pim1-pyridopyrimidine 유도체 삼차원 구조)

- 본 Pim1-저해제들의 삼차원 구조와 기존에 알려진 Pim1-저해제 구조를 비교한 결과 비슷한 scaffold를 갖는 저해제 임에도 불구하고 새로운 결합 방식을 채용하고 있음을 확인할 수 있었다.



(그림. Pim1 저해제 결합 방식의 비교와 pimtide결합 방식)

- 이러한 특이한 결합방식으로 보아 본 저해제는 Pim1의 boardline inhibitor에 해당한다는 사실을 알게 되었다.
- 특이하게도 Pim1 구조의 substrate binding site에 E.coli에서 유래한 펩티드 (pimtide)가 결합한다는 사실을 발견하였다.
- 이러한 pimtide의 구조를 모방한 소분자 화합물을 디자인하면 Pim1에 선택성이 높은 새로운 개념의 저해제 개발이 가능할 것으로 기대한다.

◆ 결론

- 본 연구를 통하여 여러 가지 단백질 인산화 효소의 구조를 규명하는 기반을 마련하였다.
- 단백질 인산화 효소는 많은 경우 insect cell에서 baculovirus를 이용하여 발현을 하는 경우가 많은데 본 과제를 통하여 여러 가지 단백질 인산화 효소를 대량으로 생산 정제할 수 있는 기술을 확보하여 향후 다양한 항암제 표적 단백질 인산화 효소의 구조연구를 수행할 수 있게 되었다.
- 본 연구를 통하여 Spleen tyrosine kinase, Pim1 kinase등 신약표적 단백질과 신규 저해제의 결합 구조를 분석하였으며 이를 통하여 개선된 저해제 발굴의 초석이 될 것이다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Crystal Structure of Pim1 Kinase in Complex with a Pyrido[4,3-D]Pyrimidine Derivative Suggests a Unique Binding Mode	교신	PLOS ONE (3.73) <u>-상위 20% 저널임.</u>	2013; 8(7); e70358	국외 SCIE	1310400
Identification of Potent Inhibitors against Human Peptide Deformylase as Anticancer Agents	교신	Bulletin of the Korean Chemical Society (0.982)	2013; 34; 3885	국내 SCI	1310400
Crystal structure of Spleen tyrosine kinase in complex with 4-(pyrro)pyrimidine or 4-(pyrazol)pyrimidine derivatives	교신	Acta Crystallogr. Sect D.	(2015년 1월 투고 예정)	국외 SCI	1310400

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Structural basis for the recognition of peptidoglycan tripeptide by Helicobacter pylori Csd4, a D,L-carboxypeptidase controlling the helical shape	Byung Il Lee, Hyun Sook Kim, Se Won Suh	2014 International meeting of the microbiological society of Korea	국내	1310400

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

--	--	--

바. 기타연구성과

Protein Data Bank 등록 2건: pdb code 4JX3, 4JX7

(PDB site에 구조 등록 <http://rcsb.org/pdb>)

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)		
			연차	최종	
항암 표적 kinase의 구조를 규명하고 저해제 발굴의 기반을 마련한다.	1차년도	CDK1의 대량 발현 및 정제조건 확립	100	100	
		다른 항암제 표적 kinase의 대량발현 및 정제조건 확립			
	2차년도	표적 단백질의 결정화	80	80	
		표적 단백질의 구조규명			
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
---------	---------

Kinase의 대량 발현 정제에 성공하였는가?	CDK1, Syk, Pim1의 결정화를 위한 수준의 대량 발현 정제에 성공하였다.
Kinase의 구조를 규명하였는가?	Syk, Pim1의 경우 구조 규명에 성공하였다. CDK1은 구조 규명에 성공하지 못하였다.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	1	Acta Crystallogr. Sect D (IF=7.2)
산업재산권 등록		
기타	8	Protein Data Bank (PDB)에 구조 정보 등록 8건

(2) 연구성과의 활용계획

CDK1의 경우 단백질 구조 규명에 성공하지 못하였으나 재조합 단백질을 대량으로 얻을 수 있는 조건을 확립하였다. 대량으로 손쉽게 얻어지는 CDK1 재조합 단백질을 이용한 라이브러리 스크리닝이 가능할 것이고 homology modeling을 통한 CDK1 구조 모델과 스크리닝 결과를 모두 모아 새로운 저해제 발굴이 가능할 것이다.

현재 구조를 규명한 Syk 과 Pim1은 haemagological cancer에 대한 신약 표적으로서 가능성이 높기 때문에 Syk을 표적으로 하는 신약 개발에 활용할 수 있다 (Merkel et al., 2012; Singh & Matsuda, 2007). 향후 virtual chemical library를 이용한 in silico docking 연구를 통하여 Syk 저해제 후보물질을 발굴하여 실제 구조를 규명하고 이를 개량하는 일련의 연구를 통하여 우수한 Syk 저해제 발굴 연구를 수행 할 계획이다.

6. 참고문헌

Lee SJ, Han BG, Cho JW, Choi JS, Lee J, Song HJ, Koh JS, Lee BI. (2013) PLoS One. 8(7), e70358.

Malumbres, M. & Barbacid, M. (2009) Nat Rev Cancer 9(3), 153.

Merkel, A.L., Meggers, E., Ocker, M. (2012) Expert Opin. Investing Drugs 21, 425.

Singh, R., Matsuda, E. S. Annu. Rep. Med. Chem. 2007, 42, 379.

7. 첨부서류

발표 논문 2편 첨부함.

Crystal Structure of Pim1 Kinase in Complex with a Pyrido[4,3-*D*]Pyrimidine Derivative Suggests a Unique Binding Mode

Sang Jae Lee^{1,4}, Byeong-Gu Han¹, Jea-Won Cho¹, Jang-Sik Choi², Jaekyoo Lee³, Ho-Juhn Song³, Jong Sung Koh^{2,3*}, Byung Il Lee^{1*}

¹Biomolecular Function Research Branch, Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi, Republic of Korea, ²Oscotec Inc., Seongnam, Gyeonggi, Republic of Korea, ³Genosco, Cambridge, Massachusetts, United States of America, ⁴The Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Abstract

Human Pim1 kinase is a serine/threonine protein kinase that plays important biological roles in cell survival, apoptosis, proliferation, and differentiation. Moreover, Pim1 is up-regulated in various hematopoietic malignancies and solid tumors. Thus, Pim1 is an attractive target for cancer therapeutics, and there has been growing interest in developing small molecule inhibitors for Pim1. Here, we describe the crystal structure of Pim1 in complex with a newly developed pyrido[4,3-*d*]pyrimidine-derivative inhibitor (SKI-O-068). Our inhibitor exhibits a half maximum inhibitory concentration (IC₅₀) of 123 (± 14) nM and has an unusual binding mode in complex with Pim1 kinase. The interactions between SKI-O-068 and the Pim1 active site pocket residue are different from those of other scaffold inhibitor-bound structures. The binding mode analysis suggests that the SKI-O-068 inhibitor can be improved by introducing functional groups that facilitate direct interaction with Lys67, which aid in the design of an optimized inhibitor.

Citation: Lee SJ, Han B-G, Cho J-W, Choi J-S, Lee J, et al. (2013) Crystal Structure of Pim1 Kinase in Complex with a Pyrido[4,3-*D*]Pyrimidine Derivative Suggests a Unique Binding Mode. PLoS ONE 8(7): e70358. doi:10.1371/journal.pone.0070358

Editor: Roland Seifert, Medical School of Hannover, United States of America

Received: April 1, 2013; **Accepted:** June 18, 2013; **Published:** July 31, 2013

Copyright: © 2013 Lee et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: BIL was supported by a National Cancer Center Research Grant (1310400) from the National Cancer Center in Korea, and Mid-career Researcher Program (NRF-2011-0029294) and Bio & Medical Technology Development Program (NRF-2011-0030032) through the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning of Korea. SJL was supported by the Fostering Next-Generation Researchers program funded by the Ministry of Education (NRF-2011-355-C00118). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The SKI-O-068 is in a state of being patented (Patent Application WO2011/05386). JSK, JL and HJS are current employee of Genosco and JSC is a current employee of Oscotec Inc. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: jskob777@genosco.com (JSK); bilee@ncc.re.kr (BIL)

☞ These authors contributed equally to this work.

Identification of Potent Inhibitors against Human Peptide Deformylase as Anticancer Agents

Sang Jae Lee,^{†*} Ok Sung Jung,[§] Bong-Jin Lee,[‡] Kwang-Hwi Cho,^{§*} and Byung Il Lee^{†*}

[†]Research Institute, National Cancer Center, Goyang, Gyeonggi 410-769, Korea. *E-mail: bilee@ncc.re.kr

[‡]Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

[§]School of Systems Biomedical Science, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea. *E-mail: chokh@ssu.ac.kr

Received August 30, 2013, Accepted September 16, 2013

Key Words : Anticancer agent, Inhibitor, Drug design, Peptide deformylase

Peptide deformylase (PDF) catalyzes the removal of a formyl group from the N-terminal methionine residue of newly synthesized polypeptides in order to yield mature proteins. This deformylation step is an essential process in bacteria.^{1,2} For this reason, PDF has been proposed as an attractive antibacterial target.^{3,4} While it has been thought

still unclear.

In the present study, we aim to identify the new potent human PDF inhibitors for the development of anticancer reagents focused on breast cancer. These inhibitors were previously reported to show strong inhibitory activities against pathogenic bacteria.¹³

Notes

inhibitors hydroxamate/peptidomimetic [PMT387 (7a) and PMT497] and the reverse hydroxamate/nonpeptide scaffold inhibitors [PMT1039 (15c) and PMT1067] were synthesized and supplied by ProMediTech (Figure 1).^{19,20} Human PDF were purified according to previously reported method¹⁸ and biochemical PDF assays were performed closely followed by previous studies.¹³ The IC₅₀ value was calculated using nonlinear regression and GraphPad Prism 5.

In vitro Cell-based Chemosensitivity Assay. Cancer cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (complete RPMI medium). All cancer cells were plated at 1×10^4 cells per well in a 96 well plate. Drugs of different concentrations were then added. The sulforhodamine B assay is used for cell density determination, based on the measurement of cellular protein content.¹⁷

Molecular Docking Study. The binding modes of four inhibitors to human PDF (3G5P)¹⁸ were predicted using AutoDock-Vina.²¹ One cobalt ion and the flexibility of side chains of the amino acids in the active site were considered.

Acknowledgments. This work was supported by a National Cancer Center Research Grant (1310400) from the National Cancer Center in Korea

References

- Guillon, J. M.; Mechulam, Y.; Schmitter, J. M.; Blanquet, S.; Fayat, G. *J. Bacteriol.* **1992**, *1*, 4294.
- Mazel, D.; Pochet, S.; Marlière, P. *EMBO J.* **1994**, *13*, 914.
- Meinzel, T.; Mechulam, Y.; Blanquet, S. *Biochimie.* **1993**, *75*, 1061.
- Solbiati, J.; Chapman-Smith, A.; Miller, J. L.; Miller, C. G.; Cronan,

Bull. Korean Chem. Soc. 2013, Vol. 34, No. 12 3887

- J. E., Jr. *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 607.
- Lee, M. D.; She, Y.; Soskis, M. J.; Borella, C. P.; Gardner, J. R.; Hayes, P. A.; Dy, B. M.; Heaney, M. L.; Phillips, M. R.; Bornmann, W. G.; Sirotnak, F. M.; Scheinberg, D. A. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1107.
- Grujic, M.; Zavanik-Berganta, T.; Pejlerb, G.; Renkoc, M. *Cancer Letters* **2005**, *223*, 211.
- Xu, Y.; Lai, L. T.; Gabrilove, J. L.; Scheinberg, D. A. *Clin. Cancer Res.* **1998**, *4*, 171.
- Nguyen, K. T.; Hu, X.; Colton, C.; Chakrabarti, R.; Zhu, M. X.; Pei, D. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9952.
- Robien, M. A.; Nguyen, K. T.; Kumar, A.; Hirsh, I.; Turley, S.; Pei, D.; Hol, W. G. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1155.
- Fu, H.; Karlsson, J.; Bylund, J.; Movitz, C.; Karlsson, A.; Dahlgren, C. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 247.
- Mader, D.; Rabiet, M. J.; Boulay, F.; Peschel, A. *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 415.
- Escobar-Alvarez, S.; Gardner, J.; Sheth, A.; Manfredi, G.; Yang, G.; Ouerfelli, O.; Heaney, M. L.; Scheinberg, D. A. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 5099.
- Lee, S. J.; Lee, S. J.; Lee, S. K.; Yoon, H. J.; Lee, H. H.; Kim, K. K.; Lee, B. J.; Lee, B. I.; Suh, S. W. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*(Pt 7), 784.
- Aubart, K.; Zalacain, M. *Prog. Med. Chem.* **2006**, *44*, 109.
- Antczak, C.; Shum, D.; Bassit, B.; Frattini, M. G.; Li, Y.; de Stanchina, E.; Scheinberg, D. A.; Djaballah, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4528.
- Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Cancer Metastasis Rev.* **2006**, *25*, 115.
- Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112.
- Escobar-Alvarez, S.; Goldgur, Y.; Yang, G.; Ouerfelli, O.; Li, Y.; Scheinberg, D. A. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 1211.
- Lee, S. K.; Choi, K. H.; Lee, S. J.; Suh, S. W.; Kim, B. M.; Lee, B. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4317.
- Lee, S. K.; Choi, K. H.; Lee, S. J.; Lee, J. S.; Park, J. Y.; Kim, B. M.; Lee, B. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 133.
- Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455.