

Computer Graphics: Quinolone계 항균제의 DNA-Intercalator에 관한 이론적 연구

서 명 은

이화여자대학교 약학대학

(Received December 24, 1994)

Computer Graphics: Theoretical Study of Antibacterial Quinolone Derivatives as DNA-Intercalator

Myung-Eun Suh

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul, 120-750 Korea

Abstract—Based on Computer graphics molecular modeling method, quinolone derivatives as DNA-gyrase inhibitors formed stable DNA-intercalation complex with deoxycytidyl-3',5'-deoxy guanosine[d(C_pG)₂] dinucleotide. When d(C_pG)₂ and d(A_pT)₂ were compared in order to find out which DNA could form more stable DNA-Drug complex based on interaction energy(ΔE) and DNA-Drug complex energy, d(C_pG)₂ resulted in lower energy than d(A_pT)₂.

Keywords □ DNA-Intercalation complex, DNA-Drug interaction energy

DNA-intercalator의 항암작용 기전에 관한 학설은 1961년 처음으로 Lerman¹⁾에 의하여 제창되었는데, 그는 평면체(planar) 화학구조를 가진 항암제, 즉 actinomycin, daunomycin 등은 DNA의 double helix 내에 삽입(intercalate)되므로서 항암작용을 갖는다고 발표하였다. DNA-gyrase 또는 topoisomerase II는 Fig. 1과 같이 DNA를 절단한 후 여러 단계를 거쳐 복제에 의한 세포증식을 일으키는 효소이다. DNA-gyrase inhibitor로 작용하는 quinolone계 항균제들은 DNA-intercalator로 작용하는 항암제인 anthracyclines, anthracerendiones, acridiones, actinomycin 등과 유사하게 mammalian DNA-topoisomeras II에 대해 작용 기전을 갖는 평면체 화합물이다. 그럼에도 불구하고 DNA와는 결합하지 않고 gyrase균 효소와만 결합하는 것으로 알려져왔다. 그러나 1985년 Shen²⁾과 Pernet의 연구보고에서 DNA-gyrase inhibitor인 norfloxacin의 결합부분은 DNA-gyrase가 아닌 순수한 DNA와의 결합이라는 논문을 발표함으로써 학계에 큰 관심을 불러일으켰다. 즉 Shen은 supercoil화된 DNA에 4분자의 norfloxacin이 배위결합한다는 model을

제시하였다(Fig. 2). 이때 quinolone 화합물의 N₁위치에 치환된 치환기들 사이에서는 tail to tail hydrophobic interaction이 가능하므로 약물이 모여 multipul set의 binding group을 가진 multimolecule을 구성하게 된다고 하였다.

그러나 그후 Shen³⁾ 연구진의 DNA-unwinding 실험결과에서 저농도인 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 DNA와 결합하나 고농도인 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상일때는 대부분의 quinolone 유도체들은 DNA-unwinding 효과가 없었기 때문에 quinolone 항균제들은 결코 DNA-intercalator가 될 수 없다고 하였다. 이와 같이 DNA-gyrase inhibitor인 quinolone 화합물의 DNA-intercalator에 관한 학설은 그 찬반론이 엇갈리고 있다. 따라서 본 연구진은 computer graphics 분자모델에 의한 분자역학적(molecular mechanics)energy 차원에서 각 약물분자와 DNA와의 complex를 형성시켰을 때 나타나는 DNA와 약물간의 상호작용 energy값(ΔE)으로부터 DNA-intercalator에 관한 이론적 연구를 시행하였다.

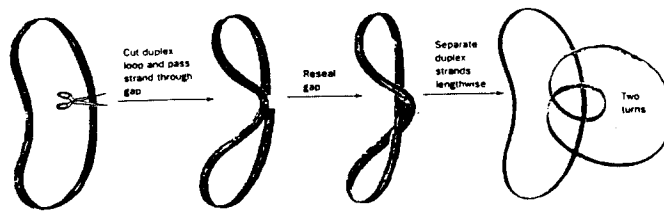


Fig. 1—DNA-topoisomeraseII의 작용기전

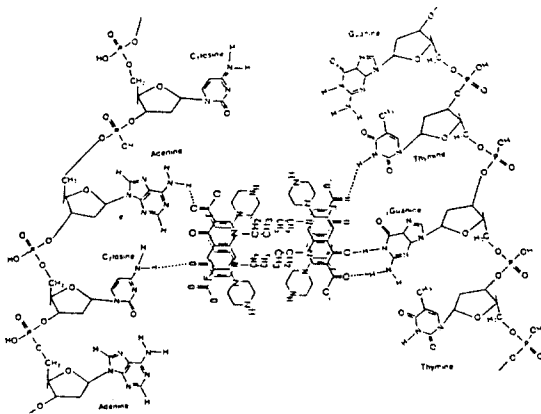


Fig. 2—DNA와 4분자 Norfloxacin과의 Binding Model

실험방법

본 연구를 위한 분자 modeling은 Sybyl program (6.0 version) software와 hardware로는 silicongraphics IRIS 4D/310 GTX workstation을 사용하였다. Molecular mechanics energy계산은 MOPAC(6.0) program의 AM₁을 이용하였고, Maximin2 energy계산의 조건은 Tripos parameter값과 Gasteiger-Hückel charge 값을 인용했으며 gradient norm은 0.001을 주었고 400 iteration까지 계산하였다.

DNA-gyrase 저해제인 quinolone계 화합물의 분자 modeling과 Maximin2 energy값 계산—Quinolone계 화합물에 있어 가장 중요한 약물학적 구조인 β -Ketocarboxylic acid의 구조는 Fig. 3과 같이 A,B 두 형태의 서로 다른 Energy 준위의 이성체를 갖는다.¹⁾

본 연구에서는 현재 시판되고 있는 DNA-gyrase 저해제인 quinolone계 항균제 14종(Fig. 4)을 모두 A, B 두 이성체의 구조로 computer modeling한 후 각각 Maximin2 energy값을 계산하였다(Table I). Energy

optimization된 구조들은 computer에 저장하였다.

DNA-intercalation complex의 구성 및 ΔE 값 계산—Sobell⁵⁾의 X-ray crystal data로 부터 deoxycytidyl-3',5'-deoxyguanosine dinucleotided $d[C_pG]_2$ 와 deoxyadenyl-3',5'-deoxythymosine dinucleotide $[d(A_pT)_2]$ 를 modeling한 후 computer에 저장하였다. 이미 computer에 저장해 놓은 DNA-gyrase 저해제인 oxolinic acid A,B 두 type의 분자를 각각 D₁, D₂ 화면에 불러왔다. D₃ 화면으로는 이미 저장해 놓은 $d(C_pG)_2$ dinucleotide구조를 불러온 후 D₁ 화면의 oxolinic acid A 구조를 D₃ 화면의 $d(C_pG)_2$ -double helix내에다 docking방법을 이용하여 삽입시켰다. 전면, 측면, 단면으로 확인하여 약물이 DNA-double helix내에 정확히 중앙에 삽입되었는지를 확인한 후 DNA-drug complex의 Maximin2 energy값을 계산하였다(Fig. 5,6 참조).

이상과 동일한 방법으로 D₂ 화면의 quinolone계 oxolinic acid B type의 구조를 docking방법으로 D₃ 화면의 $d(C_pG)_2$ -double helix내에 중앙에 삽입시킨 다음 DNA-drug complex의 Maximin 2 Energy값을 계산하였다. 이상과 같이 pefloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, rosoxacin, miloxacin, nalidixic acid, enoxacin, pefloxacin, lomefloxacin, fleroxacin, enrofloxacin, ofloxacin, difloxacin, amifloxacin, A-566 20 등도 A,B 두 형태의 구조로부터 DNA-double helix내에 삽입되어진(Intercalate) DNA-drug complex를 형성시킨 후 각각의 Maximin2 energy값을 구하였다. $d(A_pT)_2$ dinucleotide도 동일한 방법으로 complex를 형성시킨 후 Maximin2 energy값을 계산하였다(Table I)

DNA-bisintercalator complex의 구성 및 ΔE 값 계산—Nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin 등, 두 분자가 서로 포개어지는 형태로 상하 그리고 좌우로

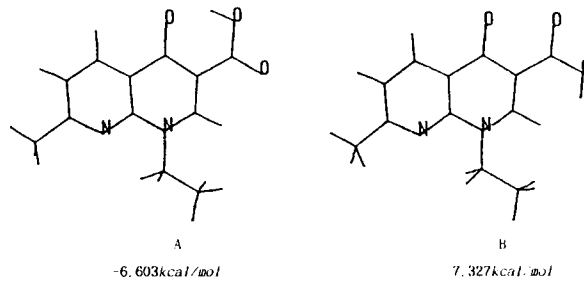


Fig. 3 - Nalidixic acid의 A,B-conformer와 energy

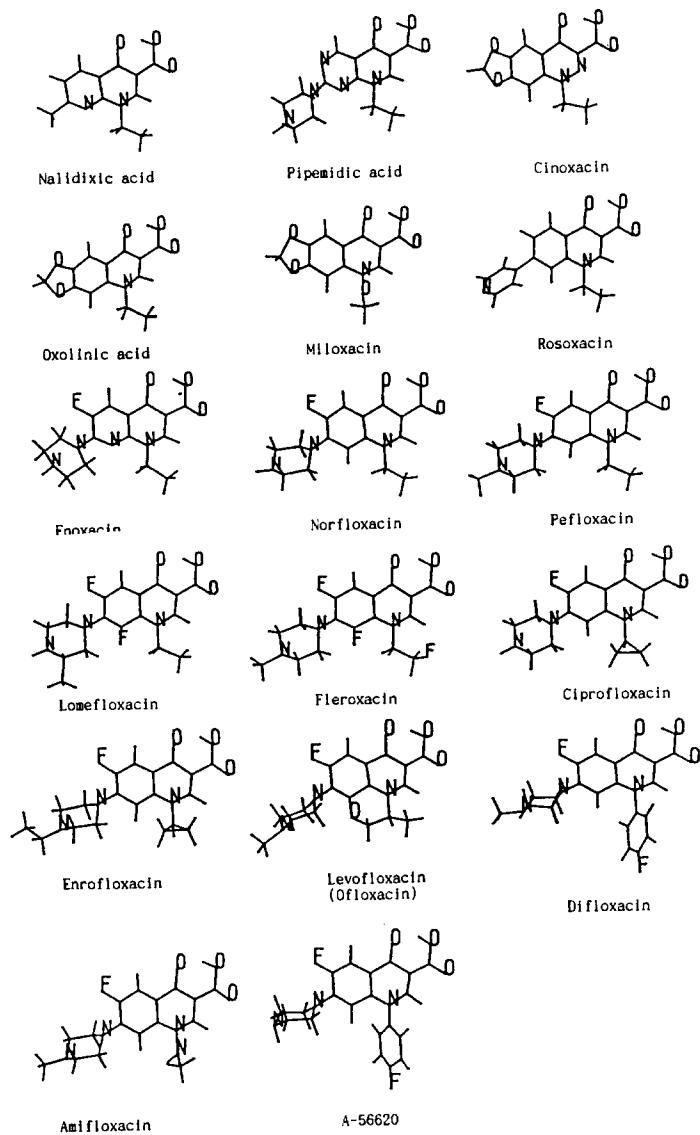


Fig. 4

Table I—Conformer E. 값과 DNA-Drug 상호작용 E. 비교

Compounds	Conformation-Energy		d(A _p T) ₂ -Complex	d(C _p G) ₂ -Complex
		(kcal/mol)	ΔE(kcal/mol)	ΔE(kcal/mol)
Nalidixic acid	A	-3.56	18.45	-14
	B	7.34	24.54	-10.75
Levofloxacin (Ofloxacin)	A	11.46	26.27	-16.00
	B	17.32	48.64	5.98
Pipemidic acid	A	-3.11	4.60	-19.41
	B	4.66	22.28	-10.75
Cinoxacin	A	19.11	9.23	-16.00
	B	25.88	12.52	-13.98
Oxolinic acid	A	16.83	8.58	-19.16
	B	27.50	20.91	-5.98
Miloxacin	A	5.16	-5.02	-19.47
	B	15.84	28.30	14.52
Rosoxacin	A	4.40	16.30	-23.40
	B	15.79	29.00	-10.61
Enoxacin	A	1.04	6.47	-17.25
	B	10.18	21.32	-1.67
Norfloxacin	A	6.62	17.95	-21.66
	B	19.36	25.00	-11.74
Perfloxacin	A	6.20	2.40	-4.23
	B	19.97	16.24	9.99
Lomefloxacin	A	9.73	28.27	-16.56
	B	21.68	40.69	-4.14
Fleroxacin	A	10.13	37.21	-20.17
	B	22.43	45.50	-2.87
Enrofloxacin	A	101.35	13.44	-1.77
	B	113.41	26.75	8.62
Ciploxacin	A	102.35	10.13	-18.00
	B	113.42	24.44	-3.80

*ΔE = (DNA-Drug complex E.) - Drug E.

docking시킨 후 energy minimization하여 Maximin2 energy값을 구한 후 D₁과 D₂화면에 옮겨놓았다. 이미 저장해 둔 d(C_pG)₂-double helix 구조를 D₃화면으로 불러온 후 docking방법으로 D₃화면의 상하로 포개어진 norfloxacin을 D₃화면의 d(C_pG)₂-double helix내에 삽입시켰다(Fig. 7). 동일한 방법으로 좌우로 나열된 Bis-ciprofloxacin을 D₂화면으로 불러온 후 D₃화면의 d(C_pG)₂-double helix내에 삽입시켰다(Fig. 8). 이렇게 형성된 DNA-bisintercalator complex의 Maximin2 Energy값을 구하였다. 다른quinolone계 화합물인 perfloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin 등도 위와 같이 DNA-bisintercalator complex를 형성시킨 후 Maximin2 energy값을 계산하였다(Table II).

DNA-drug interaction E.(ΔE) 계산—ΔE = (DNA-drug complex E.) - Drug E.

DNA와 약물간의 상호작용 energy값(ΔE)은 DNA-drug complex energy값과 약물의 분자 energy값의 차로 구하였다.

결과 및 고찰

DNA-drug interaction E.값 비교—DNA-gyrase inhibitor 화합물들은 d(A_pT)₂-DNA helix, d(C_pG)₂-DNA helix와 각각 complex를 형성시킨 후 Maximin2 energy를 계산하여 각각의 Interaction E.(ΔE)를 비교 검토해 보았다. Table I에서 보는 바와 같이 DNA-

Table II—Mono-, di-, tetraintercalator E.와의 interaction E. 비교

compound	molecular energy(kcal/mol)	d(C _p G) ₂ -complex ΔE(kcal/mol)
Nalidixic acid:		
mono-intercalator	- 3.558	- 14.000
di-intercalator	- 21.624	- 13.231
tetra-intercalator	- 53.243	계산불가
Norfloxacin:		
mono-intercalator	6.627	- 21.661
di-intercalator	- 2.796	- 7.862
Ciprofloxacin:		
mono-intercalator	102.351	- 18.00
di-intercalator	200.00	9.620
tetra-intercalator	계산불가	계산불가
Perfloxacin:		
mono-intercalator	6.208	- 4.227
di-intercalator	0.195	계산불가
tetra-intercalator	- 10.252	계산불가

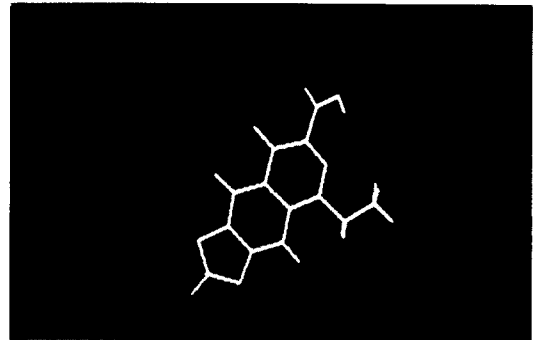
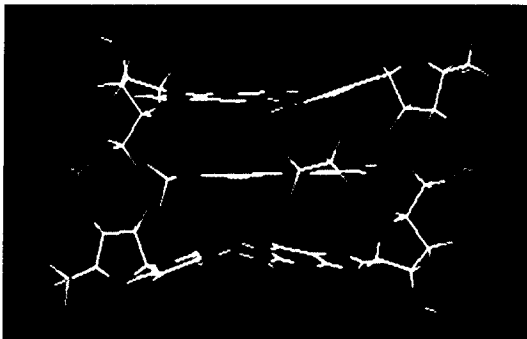
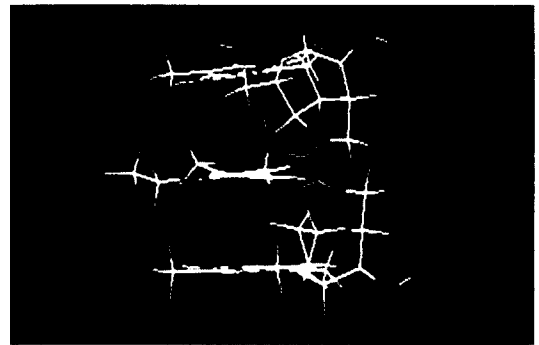
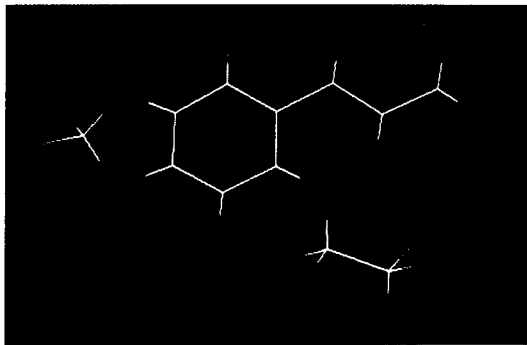


Fig. 5—(상) Cinoxacin
(하) DNA-Oxolinic acid complex 정면도

Fig. 6—(상) DNA-Oxolinic acid complex 측면도
(하) DNA-Oxolinic acid complex 단면도

gyrase inhibitor 화합물들은 d(C_pG)₂-DNA helix와의 complex가 d(A_pT)₂-DNA helix와의 complex보다 훨씬 더 안정하므로 intercalator가 target로 결합하려는

핵산의 염기성핵은 guanin쪽임을 추정할 수 있었다. 이러한 연구결과는 지금까지 여러 학자들에 의하여 논란이 되어온 intercalator가 결합하려는 핵산의 염

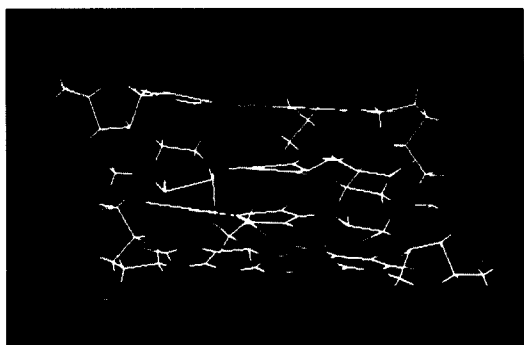


Fig. 7—DNA-di-Norfloracin complex 정면도

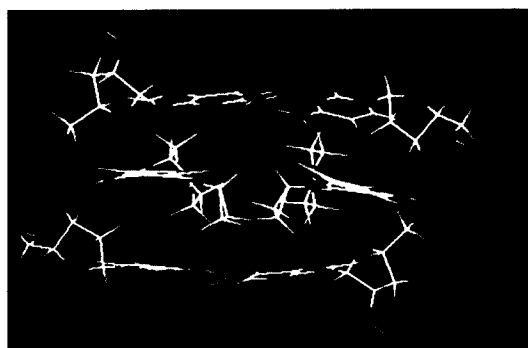


Fig. 8—DNA-di-Ciprofloxacin complex 정면도

기성핵이 adenin쪽인가, 또는 guanin쪽인가의 문제 해결에 중요한 정보가 될 것으로 사료된다.

DNA-mono, bis intercalator complex energy 비교—Shen 연구보고에서 4분자의 DNA-gyrase inhibitor가 DNA-helix에 intercalator로서 작용한다는 학설에 따라 본인의 연구에서도 $d(C_0G)_2$ -DNA helix에 quinolone 항균제 4분자를 docking시켜 보았으나 van der Waals의 영향을 받아 DNA-helix의 모형을 변형을 초래하며 따라서 complex의 interaction energy가 너무 높아 Maximin2 E. 계산이 불가능하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 $d(C_0G)_2$ -DNA helix의 형태가 상하, 좌우로 변형된 것을 알수있었다. Table II에서 보는 바와 같이 DNA-monointercalator complex가 DNA bisintercalator complex보다 interaction energy(ΔE)값의 energy 준위가 더 낮은 것으로 보아 더 안정함을 알 수 있었다. 이러한 연구결과를 통해 quinolone계는 monointercalator로 DNA와 결합하였을 때가 가장 안정한 DNA-drug complex를 형성함을

증명할 수 있었다. 1989년에 발표된 Shen 연구진의 DNA-unwinding 실험에서 저농도인 $0.3 \mu\text{g/ml}$ 에서는 DNA와 결합하였으나 고농도인 $50 \mu\text{g/ml}$ 에서는 DNA와 결합하지 않았다는 연구결과는 본실험의 energy 계산에 의한 결과와 일치하였다. 다만 Shen 연구진은 norfloracin이 고농도에서 DNA와 결합하지 않는 이유를 규명하지 못하였기 때문에 DNA-intercalator가 될수 없다고 결론지었다. 그러나 본 연구진은 molecular mechanics차원에서 DNA와 약물간의 interaction energy(ΔE)값을 계산해 본 결과 quinolone계는 DNA와 monointercalator로서 결합할 때 가장 안정한 complex를 형성하였고, bis-, tetra-intercalator가 DNA와 결합할 때는 높은 interaction energy에 의하여 DNA구조가 많이 변형됨을 확인할 수 있었다.

N-1 치환기의 입체효과—지금까지의 생리활성 실험연구에 의하면 N-1위치에 methyl기, ethyl기, cyclopropyl기 이외의 다른 aliphatic기가 첨가되었을 경우 항균효과가 없었다는 실험보고는 본인의 DNA-intercalator 연구결과를 통해 이론적으로 증명이 가능하였다. 즉 N-1원자는 Sp^3 구조를 가지므로 planar하지 않기 때문에 N-원자에 결합되는 탄소의 수가 많으면 많을수록 DNA-helix표면에 입체장애를 유발하므로 intercalator로서 부적합함을 증명할 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단과 DFG 연구기금으로 수행하였기에 이에 감사하는 바입니다.

문헌

- 1) Lerman, L. S.: Structural considerations in the intercalation of deoxyribonucleic acid and Acridines. *J. Mol. Biol.* **3**, 18-30 (1961).
- 2) Shen, L. L., Kohlbrenner, W. E., Weigi, D. and Baranowski J.: Mechanism of Quinolone Inhibition of DNA Gyrase. *J. Biol. Chem.* **264**, 2973-2978 (1989).
- 3) Shen, L. L., Baranowski, J., Wai, T., Chu, D., and Pernet, A. G.: The Binding of Quinolones to DNA: International Telesymposium on Quinolone: 159-169 (1989).

- 4) Suh, M. E.: ComputerGraphics /Grid-Search 분석에 의한 Quinolone Conformation에 관한 이론적 연구: 약학회지 **38**, 721-724 (1994).
- 5) Sobell, H. M.; Visualization of Drug-Nucleic Acid Interactions at Atomic Resolution: *J. Mol. Biol.* **114**, 333-365 (1977).
- 6) Sybyl Molecular-Modeling-Program 6.0, Tripos Assoc. Inc. St. Louis, Miss., U.S.A (1992).