

Dihydrofolate Reductase-저해제 복합체에 대한 X-선 결정체 구조와 docking model의 구조 비교

안미현 · 최인희 · 김춘미[#]

이화여자대학교 약학대학

(Received November 11, 2002; Revised December 2, 2002)

Comparison of X-ray Crystallographic Structures and Docking Models of Dihydrofolate Reductase-Inhibitor Complexes

Mi Hyun Ahn, Inhee Choi and Choonmi Kim[#]

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

Abstract — A comparative study to validate the reliability of a fully automated docking program, FlexiDock, was carried out to predict the binding modes of DHFR-inhibitor complex. The inhibitors were extracted from the crystallographically determined DHFR-NADP⁺(H)-inhibitor ternary complexes of human, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and then docked back into the remaining DHFR-NADP⁺(H) binary complexes using FlexiDock. The resulting conformations and orientations were compared to the original crystal complex structures for reproducibility. Then, folate, the substrate, and known inhibitors such as methotrexate, piritrexim and trimethoprim were docked into the wild-type human DHFR and their binding modes were compared with X-ray crystallographic or other modeling data. The root mean square deviations (RMSDs) for ligands ranged from 1.14 to 1.57Å, and the protein backbone RMSDs from 0.94 to 1.26Å. FlexiDock reproduced the orientations and binding modes of all seven ligands in good agreement with the crystal structures. It proved to be a reliable and efficient program in studying binding modes of DHFR-inhibitor complexes of different species, and the information obtained from this work may provide additional insight into the design of new agents with improved activity.

Keywords □ Dihydrofolate reductase, inhibitors, FlexiDock docking, binding modes

생체 활성물질들은 대개 효소나 수용체 등과 같은 생체 내 단백질과 결합하여 그 작용을 나타내므로 활성물질의 작용과 기전을 밝히기 위해서는 이들이 결합하는 단백질의 3차원 구조를 근거로 그 상호작용이 규명되어야 한다. 현재 X-ray crystallography 나 NMR 등과 같은 방법으로 수천 종의 단백질 구조가 밝혀져 Protein Data Bank(PDB)에 저장되어 있으나 이들 단백질과 새로 고안되거나 합성된 활성 후보물질과의 결합양상을 규명하기 위해서는 protein-ligand 복합체의 결정을 만들어 X-ray crystallography를 해야 하는 등의 어려움이 있어, 이 문제를 시간, 비용 및 노력을 절감하면서 해결하기 위한 새로운 접근법이 computer-aided molecular docking에 의한 결합양상 규명 방법이다. 이 방법은 ligand 의 분자구조에 대한 정보만 있으면 목표

단백질과 어떤 상호작용으로 결합할 것인지를 제시해주므로 새로운 활성물질을 찾아내는데 크게 기여할 수 있다. 이 방법을 정립하기 위한 첫 단계는 사용하는 docking 프로그램이 얼마나 정확한 결과를 제시하는 지를 확인하는 것이며 이를 위하여 protein-ligand 복합체의 X-선 결정체 구조상에서 나타나는 상호작용과 docking 결과 형성되는 복합체 구조상의 상호작용을 서로 비교함으로써 그 프로그램의 정확성을 규명해야 한다. 따라서 본 연구에서는 dihydrofolate reductase(DHFR)를 목표 효소로 사용하여 FlexiDock docking 프로그램(Sybyl version 6.6, Tripos Co.)의 신뢰성 및 유용성을 규명하기 위한 비교연구를 수행하였다.

목표 효소인 DHFR¹⁻⁸⁾은 folate(FOL)를 dihydrofolate를 거쳐 tetrahydrofolate(THF)까지 환원하는 과정에 작용하는 효소로, THF는 DNA 구성 물질 중 하나인 thymidylate 합성 과정의 보조 효소이므로 DHFR의 저해는 곧 DNA 합성 저해를 가져와 세포 사멸을 초래한다.⁹⁾ 따라서 종 특이성을 나타내는 DHFR의 저해제는 항암제, 항생제 및 항진균제 개발의 주요 drug target이

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3277-3039 (팩스) 02-3277-2851
(E-mail) cmkime@ewha.ac.kr

되었으며 DHFR과 저해제 간의 결합양상에 대한 구조적 근거는 특정 칸에 선택적인 저해제를 고안하는데 절대적인 정보가 된다. DHFR은 일반적으로 그 내부에 7개의 parallel β -strand와 1개의 antiparallel β -strand로 구성된 β -sheet가 rigid core를 형성하고 그 주변에 4개 또는 5개의 α -helix가 있는 구조이며, 저해제는 helix α B에 인접한 hydrophobic pocket에 결합하는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

한편, 본 연구에서 검증할 docking 프로그램인 FlexiDock은 Sybyl package의 Biopolymer module 내의 docking procedure로 genetic algorithm에 근거하여 개발된 프로그램이다.¹¹⁾ 이 프로그램은 van der Waals overlap이 일어나지 않도록 단백질 잔기들의 겹사슬을 조정하여 ligand를 active site binding pocket에 맞도록 주므로 단백질의 일부와 ligand의 전부를 flexible하게 지정하여 induced-fit docking을 수행할 수 있게 해준다. 따라서 종래의 rigid docking보다 더 정확한 단백질-저해제 복합체 구조를 예측하므로 결합양상을 정확하게 규명할 수 있다. 최근 FlexiDock을 사용하여 ligand를 목표 단백질에 docking함으로써 결합양상을 규명하고 특이성을 밝히는 등의 연구가 많이 수행되고 있다. 즉, Kim과 Katzenellenbogen은 estrogen 수용체에 triarylethylene bisphenols를 docking하여 결합 친화성을 측정하였으며,¹²⁾ Stauffer 등은 estrogen 수용체에 triarylpyrazoles를 docking하여 구조-결합 친화성 상관관계에 근거하여 estrogen 수용체 antagonist로 새로운 형태의 pyrazoles를 제시한 바 있다.^{13,14)} 또 Inoue 등은 aldolase reductase에 nitromethylsulfoneanilide 유도체를 docking하고, 결과로 나온 구조에서의 ligand 위치와 상호작용으로 저해활성을 증명하였다.¹⁵⁾ Chebib 등은 adenosine 수용체에 phenylpyrazolopyrimidines를,¹⁶⁾ Dhar 등은 retinoid 수용체에 새로 합성한 heteroarotinoids를 docking하여 구조-활성 상관관계를 규명하였고,¹⁷⁾ Volter 등은 protein phosphatase에 저해제를 docking하고 그 결합양상으로부터 receptor-based pharmacophore를 구성하였다.¹⁸⁾

본 연구에서는 X-ray crystallography로 밝혀진 human, *E. coli*, 및 *Candida albicans*의 wild-type DHFR-NADP⁺(H)-inhibitor ternary complex 구조를 PDB에서 선택하여 이 구조에서 저해제를 제거하여 DHFR-NADP⁺(H) binary complex를 만들고 여기에 제거한 저해제들을 docking하여 복합체 구조를 얻었으며, X-선 구조와 그 상호작용을 비교, 검토함으로써 FlexiDock docking protocol에 의해 결정체 구조가 얼마나 정확하게 재현되는지를 검증하였고, 각각의 binding modes를 규명하였다. 또한, 이 프로그램을 사용하여 human DHFR을 목표 효소로 기질인 FOL과 기질 유사체로서 저해작용이 매우 강하며 암 치료에 널리 사용되는 methotrexate(MTX), 항생제로 AIDS 환자의 감염 치료에 사용되는 trimethoprim(TMP), 그리고 쥐의 간 DHFR에 강한 저해작용을 나타내는 piritrexim(PTX)을 docking하여 그 결

합양상을 탐구하였다. 이 연구의 결과는 FlexiDock docking 프로그램의 정확성을 확인하여 그 유용성을 제시해 줄 것이며 또한, DHFR과 저해제간의 상호작용에 대한 구조적 정보를 제공하여 중 특이성이 있는 더욱 강한 antifolate를 찾아내는데 중요하게 이용될 수 있을 것이다.

실험방법

Silicon Graphics Octane Workstation에서 Sybyl package의 일부인 FlexiDock 프로그램을 실행하였다.

Selection of DHFR complex structures

PDB에서 human DHFR(hDHFR) ternary complex 구조로 wild-type이며 186 잔기가 모두 포함되어 있는 1HFR을 선택하였고, 이 복합체의 보조효소는 NADP⁺, 그리고 ligand는 *N*-[4-[(2,4-diaminofuro[2,3d]pyrimidine-5-ylmethyl)methylamino]benzoyl]-l-glutamate(MOT)이다.¹⁾ *E. coli* DHFR(ecDHFR) ternary complex 구조로는 159 잔기가 모두 포함되어 있는 wild-type인 1RA2를 선택하였고, 보조효소는 NADP⁺, 그리고 ligand는 *N*-[4-[(2-amino-4-hydroxypteridine-6-ylmethyl)amino]benzoyl]-l-glutamate(FOL)이다.¹⁹⁾ *C. albicans* DHFR(caDHFR) ternary complex 구조로 선택한 1AOE는 homodimer로 192 잔기가 모두 포함된 A와 B chain 중 A chain을 사용하였다. 복합체를 이루고 있는 보조효소는 NADPH이며, ligand는 1,3-diamino-7-(1-ethylpropyl)-7H-pyrrolo-[3,2]quinazoline(GW3)이다.²⁰⁾ 이 ligands의 구조는 Table I에 제시되어 있다.

Preparation of Enzymes and Ligands for Docking

PDB의 DHFR 구조에 수소를 첨가하고 Tripos force field와 Gasteiger-Huckel charge를 사용하여 Powell method로 DHFR-NADP⁺(H)-ligand 복합체 구조의 에너지를 최소화(minimization) 하였으며,^{14,17)} gradient는 0.1 kcal/mol로, 나머지 조건은 Sybyl default로 하였다. 이 때 결정체 구조에서 ligand로부터 4Å 이내에 있는 물 분자들을 모두 포함시켜 ligand와의 상호작용에서 중요한 역할을 한다고 보고 된 물 분자 뿐 아니라 ligand와 직접적인 접촉이 없는 물 분자라 하더라도 상호작용 에너지에 미치는 영향이 큰²¹⁾ 물 분자들이 docking simulation에 참여하게 하였다. 에너지가 최소화 된 ternary complex에서 ligand를 제거하여 DHFR-NADP⁺(H) binary complex를 구성하였다.

Ternary complex에서 제거한 ligand에는 수소를 첨가하고 bond order를 수정하였으며, 그 외의 ligands에 대해서는 Sybyl package의 Build/Edit 메뉴를 사용하여 그 구조를 그려서 conjugate gradient method로 gradient가 0.001 kcal/mol이 될 때까지 Tripos force field와 Gasteiger-Huckel charge를 사용하

여 에너지를 최소화 하였다.¹⁴⁾

Docking Ligands into DHFR-NADP⁺(H) Complex

DHFR의 binding pocket은 active site 잔기들 외에도 ligand로부터 4Å이내에 있는 거의 모든 잔기를 포함시켜 지정하였고, ligand로부터 8Å이내의 모든 결합을 flexible하게 설정하였으며, binding pocket 잔기들과 저해제 분자에 hydrogen donor와 acceptor를 지정하였다. DHFR-NADP⁺(H) binary complex를 목표 효소로 7가지 ligands를 모두 완전히 flexible 하게 지정하여 각각의 active site에 미리 위치시키고 docking을 수행하였으며, 얻어진 구조 중 가장 낮은 에너지의 구조를 택하여 다시 docking을 수행하는 방법으로 에너지가 충분히 낮고 orientation이 적절한 구조를 최종 결과로 선택하였다. 결정체 구조의 원래 ligands를 docking 했을 때는 동일 ligand 원자 사이의 위치를 비교하였고, 다른 ligands를 docking 했을 때는 단백질의 flexible 잔기들 간의 conformation 변화를 비교하여 root mean square deviation(RMSD)를 계산하였으며 각 복합체의 결합양상을 규명하였다.

결과 및 고찰

Reproducibility

Human DHFR-MOT Complex - MOT는 기질인 folate와 유사한 구조를 가진 classical 저해제로, docking 결과 얻은 복합체 구조와 결정체 구조를 겹쳤을 때 ligand 간의 RMSD는 1.40

Å이었으며 orientation과 conformation이 거의 같은, 높은 수준의 재현성을 나타내었다(Fig. 1A). 수소결합 상호작용에 있어서(Fig. 2A) 결정체 구조와 동일하게, 모든 DHFR에서 고도로 보존되어 있는 Glu30의 carboxyl O와 furopyrimidine-2-NH₂의 H, 역시 고도로 보존되어 있는 Arg70의 guanidinium group과 glutamate- α -carboxyl O, 그리고 Gln35-NH₂의 H와 glutamate- γ -carboxyl O, Asn64-NH₂의 H와 para-aminobenzoic acid(PABA)-CO의 O, Val115-main chain(mc) O와 furopyrimidine-4-NH₂의 H, Val8-mc의 O와 furopyrimidine-2-NH₂의 H 및 Ile7-mc의 O와 furopyrimidine-4-NH₂의 H와의 수소결합이 형성되었고, 결정체 구조와 달리 Thr136과의 수소결합이 형성되지 않은 대신 그 근처의 물 분자와 결합하였으며, Ala9, Leu22, Val115 및 Tyr121과의 수소결합이 형성되었다.¹⁾ 이로써 DHFR의 작용기전에 중요한 역할을 하는 active site 잔기들과의 수소결합이 정확히 재현되었음을 확인하였다.

정전기적 상호작용의 경우에는 glutamate- α -carboxylate ion과 Arg70-guanidinium ion사이에서 동일하게 나타났으며,²²⁾ 소수성 상호작용도 Ala9, Leu22, Phe31, Phe34, Thr56, Leu60, Pro61, Leu67 및 Val115와의 사이에서 동일하게 일어났고, 이 외에 Ile7과 Val8에서 추가적으로 발견되었다.

***E. coli* DHFR-Folate Complex** - Folate는 DHFR의 기질로 docking 결과 ligand 간의 RMSD는 1.57Å이었으며 orientation과 conformation은 같았으나 전체적으로 ligand가 결정체 구조보다 NADP⁺ 쪽으로 더 깊게 docking 되었다(Fig. 1B).



Fig. 1 - Superimposition of the crystal and docked DHFR complexes for reproducibility.

Three different ligands, MOT(A), FOL(B) and GW3(C), were extracted from human, *E. coli* and *C. albicans* DHFR ternary complexes, respectively, and docked back into each of their DHFR-NADP⁺(H) binary complexes and superimposed with each other. magenta: ligands before docking atom, color: ligands after docking, brown: NADP⁺(H), green: residues of DHFRs

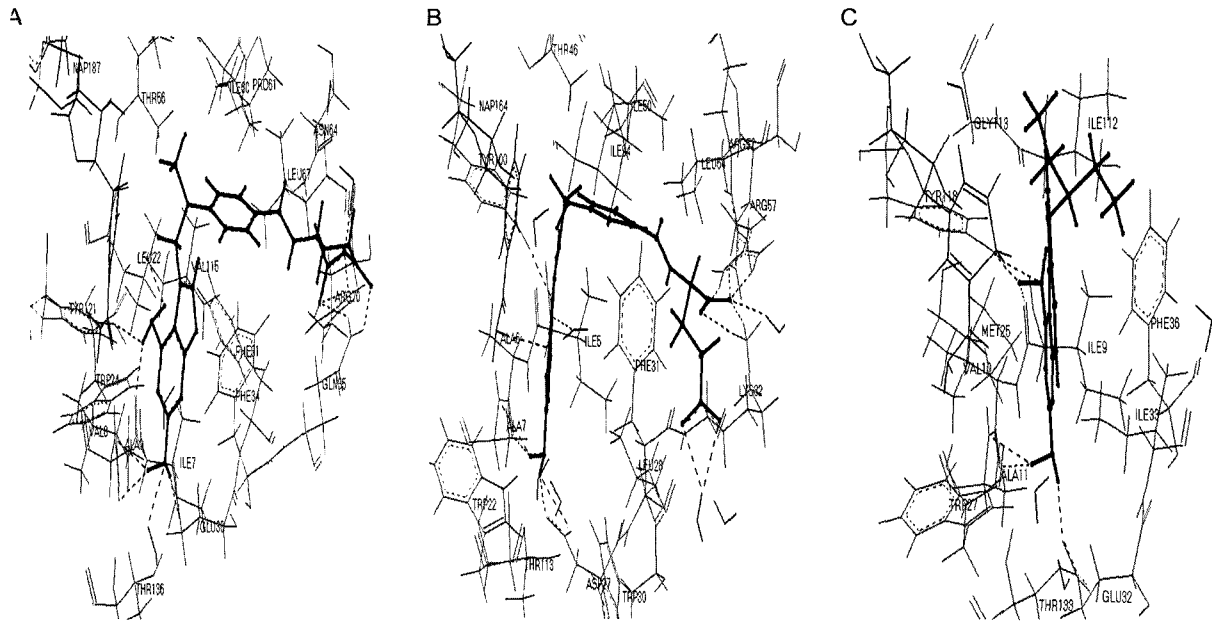


Fig. 2 – Hydrogen bonding interactions of MOT(A), FOL(B) and GW3(C) in the active sites of hDHFR, ecDHFR and caDHFR, respectively, after docking. Hydrogen bonding was viewed with WebLab Viewer and only those with the distances below 2.5 Å were depicted. thick black: ligands, thin black: NADP⁺(H), gray: residues of DHFRs

수소결합 상호작용을 비교하면(Fig. 2B), hDHFR의 Glu30에 해당하는 Asp27-carboxyl O와 pteridine-2-NH₂의 H, Arg70에 해당하는 Arg57-guanidinium group과 glutamate- α -carboxyl O, Lys32-NH₂의 H와 glutamate- α -carboxyl O, Arg52-NH₂의 H와 glutamate- α -carboxyl O, Ala6-mc의 O와 pteridine-2-NH₂의 H, 그리고 NADP⁺-CONH₂의 H와 pteridine-OH의 O사이에서 결정체 구조와 동일한 수소결합이 형성되었다. 결정체 구조에 나타난 Ile5, Leu28 및 Thr113과의 수소결합이 형성되지 않은 대신 그 근처의 물 분자들과 수소결합이 형성된 것을 알 수 있다.¹⁹⁾

정전기적 상호작용은 결정체 구조와 docking 된 구조에서 동일하게 FOL의 glutamate- α -carboxylate ion은 Lys32-NH₃⁺, Arg52-NH₂, 또는 Arg57-NH₂와 salt bridge를 형성하였다. 소수성 상호작용의 경우, 두 구조에서 모두 Ala7, Leu28, Phe31, Ile50, Leu54 및 Ile94와 상호작용 하였으며 ligand가 약간 안쪽으로 docking 됨으로써 Ala6 및 Thr46과 새로운 소수성 상호작용을 형성하였다.

C. albicans DHFR-GW3 Complex – Docking 결과 ligand 간의 RMSD는 1.14Å으로 나타나, 결정체 구조와 위치가 매우 근접하였고 orientation과 conformation이 동일하였다(Fig. 1C). Ligand인 GW3은 기질과 구조적 차이가 큰 non-classical 저해제이나 caDHFR은 hDHFR과 27%의 sequence 동일성을 가질 뿐만 아니라 active site sequence는 더욱 유사한 단백질이어서¹⁹⁾ 수소결합 상호작용의 경우(Fig. 2C), hDHFR에서 수소결합이 형성된 잔기들과 상응하는 잔기들에서 역시 수소결합이 형성되었으

며 이는 결정체 구조와 docking된 구조에서 동일하였다. 즉, Glu32-carboxyl O와 quinazoline-3-NH₂의 H, Val10-mc의 O와 quinazoline-3-NH₂의 H 또는 Ala11-mc의 N과 quinazoline-3-NH₂의 H 그리고 Tyr118-OH의 O 및 H와 quinazoline-1-NH₂의 H 및 N과의 수소결합이다. 또 두 구조에서 모두 hDHFR에서 형성되지 않은 Ile9과의 수소결합이 생겼고 hDHFR의 Arg70에 상응하는 Arg72와의 수소결합은 형성되지 않아 GW3의 구조적 차이를 반영하였으며 수소결합의 수도 classical 저해제와 비교할 때 훨씬 적게 나타남을 확인하였다. Docking 결과에서는 결정체 구조에서 나타난 Ile112와 Thr133과의 수소결합이 발견되지 않았으며 이는 ligand의 위치가 조금 변했음에 기인하는 것으로 보인다. 그러나 전체적으로 Fig. 1C에서 볼 수 있는 것처럼 결정체 구조의 ligand와 매우 근접한 위치에 docking 되었음을 알 수 있다.¹⁹⁾

결정체 구조나 docking된 구조에서 모두 정전기적 상호작용은 발견되지 않았으며, 소수성 상호작용은 결정체 구조에서의 같이 Met25, Phe36, Thr58, Ile62, Ile112 및 NADPH와 이루어졌고 결정체 구조에서 나타난 Ile33과 Leu69와의 상호작용 대신 docking 된 구조에서는 Val10 및 Ala11과 상호작용 하였다.

Docking of Other Ligands

Human DHFR과 저해제의 결합을 구조적 측면에서 이해하는 것은 사람에게서 나타나는 여러 가지 감염성 질병과 관계되는 미생물에 선택적인 저해제를 고안하는데 필수적인 단계이다. 따라

Table I – Names and structures of ligands in X-ray crystal structures of human, *E. coli*, and *C. albicans* DHFR ternary complexes

PDB code	Species	Resolution : (Released) year	Ligand		
			ID	Full name	Structure
1HFR	Human	2.10 (1998)	MOT	<i>N</i> -[4-[(2,4-Diaminofuro[2,3 <i>d</i>]pyrimidin-5-ylmethyl)methylamino]-benzoyl]-l-glutamate	
1RA2	<i>E. coli</i>	1.60 (1996)	FOL	<i>N</i> -[4-[(2-Amino-4-hydroxypteridin-6-ylmethyl)amino]-benzoyl]-l-glutamate	
1AOE	<i>C. albicans</i>	1.60 (1998)	GW3	1,3-Diamino-7-(1-ethylpropyl)-7 <i>H</i> -pyrrolo-[3,2 <i>F</i>]quinazoline	

Table II – Names and structures of other inhibitors of DHFR used for docking

Name	Structure
Folate	
Methotrexate	
Piritrexim	
Trimethoprim	

서 hDHFR-NADP⁺ binary complex를 목표 효소로 기질인 FOL과 잘 알려진 세 가지 저해제(Table II)의 docking을 시도하여 binding modes를 규명하고 그 결과를 문헌상의 구조와 비교하였다.

Folate – Human DHFR-NADP⁺ binary complex에 FOL을 docking하고 결정체 구조와 겹친 후 flexible 잔기들 간의 RMSD를 계산한 결과 0.94Å으로, 저해제가 결합하는 hydrophobic pocket의 β -sheet conformation은 결정체 구조와 거의 동일하였

다(Fig. 3A). 기질인 FOL은 pteridine ring과 PABA의 benzene ring이 서로 ‘L-shape’을 이루면서 glutamate group이 내부로 향하는 orientation으로 결합하였으며, 이 결과는 결정체 구조의 원래 ligand인 MOT의 orientation과 일치하였다.¹⁰⁾ 상호작용을 살펴보면(Fig. 4A), Glu30-carboxyl O와 pteridine-2-NH₂의 H, Asn64- β -amide group과 benzoyl group-carbonyl O, Asn64-NH₂의 H와 glutamate- α -carboxyl O에서 문헌¹⁰⁾과 동일한 수소결합이 형성되었으며, *E. coli*의 경우에서처럼 FOL이 NADP⁺ 쪽으로 좀 더 깊게 docking 되어 Arg70-guanidinium-NH₂의 H와 glutamate-carboxyl O의 거리가 5.62Å으로 멀어져 이 사이에 수소결합이 생기지 않은 대신 Ala9 및 NADP⁺와의 수소결합이 새로 형성되었다. ecDHFR-FOL의 docking 결과와 비교할 때 hDHFR에서는 수소결합의 수가 감소하고 결합 대상 잔기도 다르게 나타났으며 이는 ecDHFR의 active site 구조가 flexible한 반면 hDHFR은 rigid하고, hDHFR의 Glu30이 ecDHFR에서는 더 작은 Asp27로 바뀌어 결합공간의 크기가 달라진 점 등의 구조적 차이에 기인한다고 생각된다.¹⁰⁾

Glu30-carboxylate ion은 pteridine-2-NH₂와, 그리고 Asn64-NH₂는 glutamate- α -carboxylate ion과 정전기적 상호작용을 하며, Phe31과 Phe34의 큰 곁사슬과 Val8, Ala9, Leu22, Leu60, Pro61 및 Val115의 주사슬 원자들은 FOL과 소수성 접촉을 하였다(Table III).

Methotrexate – MTX는 기질인 FOL과 구조적 유사성이 큰 classical 저해제로 암 치료에 널리 사용되고 있는 우수한 저해제이며, docking 결과 flexible backbone 사이의 RMSD는 0.96Å으로, FOL의 경우와 마찬가지로 중앙의 β -sheet를 이루는 β -strand들의 conformation은 결정체 구조와 거의 동일하였다(Fig. 3B). MTX도 FOL과 같은 orientation으로 결합하였으며, Glu30-

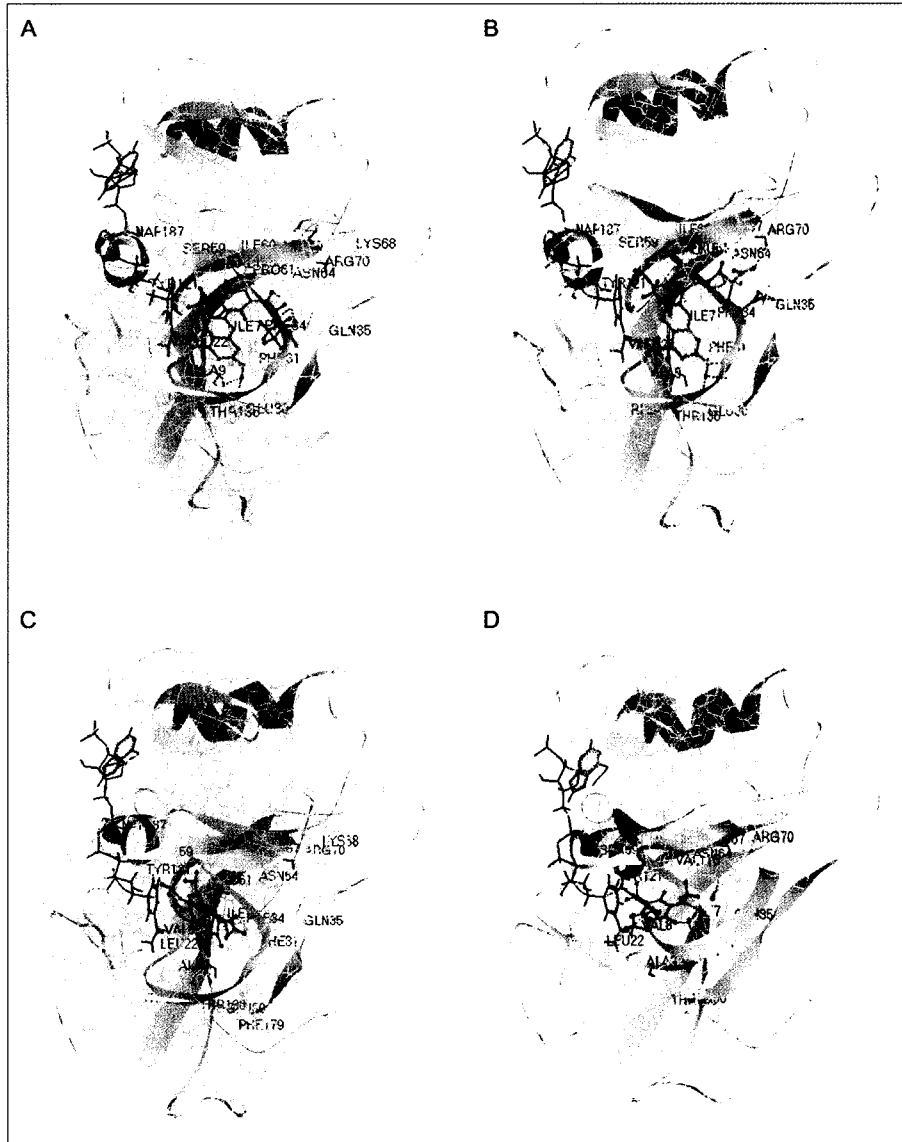


Fig. 3 - Docking of four different ligands into human DHFR-NADP⁺ binary complexes.

FOL(A), MTX(B), PTX(C) and TMP(D) shown in dark pink are docked into the hydrophobic binding pockets of active site area, of which secondary structures are presented in blue (β -strands) and red (α -helix). The black lines represent NADP⁺ molecules.

carboxyl O와 pteridine-2-NH₂의 H, Arg70-NH₂의 H와 glutamate- α -carboxyl O, Arg70-NH₂의 H와 glutamate- γ -carboxyl O, glutamate- α -carboxyl O와 Water3의 H, Asn64-NH₂의 H와 PABA의 O 사이에 수소결합이 형성되었다. 그밖에 Gln35, Ala9, Phe34 및 NADP⁺와의 수소결합도 확인할 수 있었다.²²⁾(Fig. 4B)

Glu:0-carboxylate ion과 pteridine-2-NH₂, Gln35의 NH₂와 glutamate- α -carboxylate ion, 또는 Arg70-NH₂와 glutamate- γ -carboxylate ion 사이에서 정전기적 상호작용을 하였다. 특히, Arg70-guanidinium ion과 glutamate의 carboxylate ion 사이의 salt bridge는 glutamate를 갖고 있는 classical antifolate의 주요 상호작용으로, non-classical 친지질성 antifolate에서는 발견되지

않는 반응이다.²²⁾ MTX 같은 저해제는 pteridine ring이 NADP⁺와 마주하게 되고 hydrophobic pocket을 이루는 보존 잔기인 Val8, Leu22, Phe34, 그리고 Ala9, Phe31, Ile60, Pro61 및 Leu67과 소수성 접촉을 하며(Table III), 이 결과는 MTX의 pteridine ring이 furopyrimidine ring으로 바뀐 hDHFR 복합체의 원래 ligand 인 MOT의 소수성 상호작용과 거의 일치한다.

Piritrexim - Docking 결과 RMSD는 1.04Å이었다. PTX는 기질인 FOL과 구조적 차이가 큰 non-classical 친지질성 저해제이며 독특한 conformation을 갖고 있어 DHFR과 결합하면 5-deazapteridine ring이 binding pocket의 β -strand들 쪽으로 향하면서 β -sheet의 conformation을 FOL이나 MTX의 경우와는 다

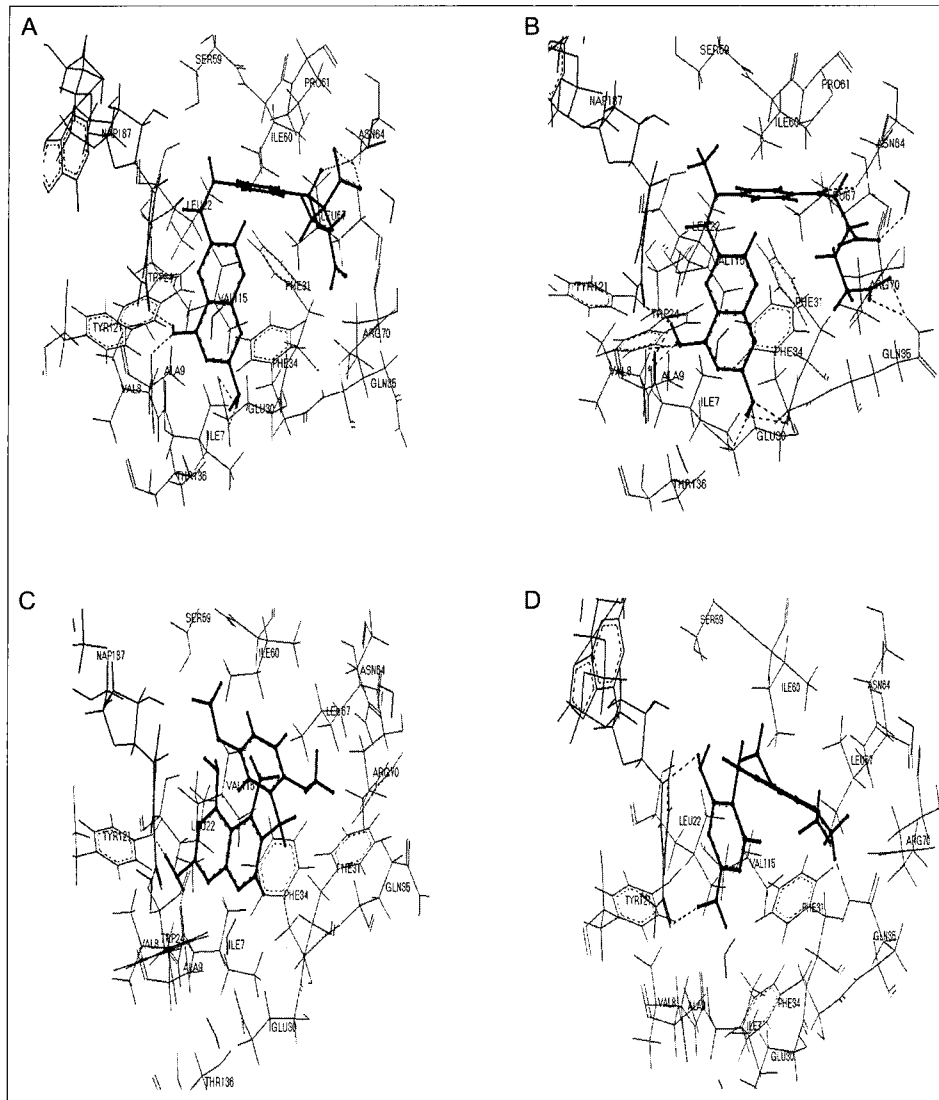


Fig. 4 – Hydrogen bonding interactions of FOL(A), MTX(B), PTX(C) and TMP(D) in the active site of hDHFR after docking.

Hydrogen bonding was viewed with WebLab Viewer and only those with the distances below 2.5 Å were depicted. thick black: ligands, thin black: NADP⁺, gray: residues of DHFRs

른 모양으로 변화시켰다. 또 dimethoxy benzene group은 NADP⁺ 쪽으로 향하여, glutamate group이 내부로 향하는 FOL이나 MTX와는 반대 방향의 orientation을 갖게 된다. 5-Deazapteridine ring은 기울어진 상태로 docking 되며 이는 문헌²²⁾과 일치하는 결과이다(Fig. 3C). 수소결합의 경우, Glu30의 carboxyl group이 pyrimidine ring의 N1 및 2-NH₂ group 구역과 반응한다는 보고가 있으나²³⁾ 본 연구 결과에서는 Glu30과 PTX의 이 구역과의 거리가 수소결합 가능 거리 밖에 있으며 대신 pyrimidine-2-NH₂의 두 H는 Ile7-CO의 O 및 Tyr121-OH의 O와 수소결합을 이루었다(Fig. 4C). PTX는 총 2개의 수소결합을 하여 다수의 수소결합을 하는 classical 저해제들과는 다른 결합양상을 나타내었다. PTX와 hDHFR 사이에서 정전기적 상호

작용은 발견되지 않았으며, 이 결과는 문헌²²⁾에서 지적한 것처럼 Arg70의 guanidinium ion과 결합할 carboxylate ion을 가진 glutamate가 없기 때문이다. 소수성 상호작용은 Val8, Leu22, Phe31, Phe34, Ile60, Pro61 및 NADP⁺와의 사이에서 형성되었다. PTX의 차별화된 결합양상은 PTX 자체의 구조적 특성 때문인 것으로 판단된다.

Trimethoprim – TMP은 박테리아 DHFR에 선택적인 항생제로 동물이나 사람의 DHFR에는 결합력이 약한 것으로 보고된 바 있다.²³⁾ hDHFR-NADP⁺-TMP 복합체의 결정체 구조는 아직 보고된 것이 없으며, Pan 등²⁴⁾이 다른 저해제와의 결정체 구조에 저해제를 바꿔 넣는 방법으로 수행한 modelling 연구가 보고된 바 있다. 본 연구에서는 TMP를 hDHFR-NADP⁺ binary

Table III – Hydrophobic interactions between the residues of human DHFR and moieties of other ligands

Hydrophobic residues of human DHFR	Moieties			
	FOL	MTX	PTX	TMP
Val8	Diaminopteridine	Diaminopteridine	Pyridopyrimidinediamine	
Ala9	Diaminopteridine	Diaminopteridine		
Leu22	Diaminopteridine	Diaminopteridine	Dimethoxybenzyl	Pyrimidinediamine
	Para amino benzoic acid	Para amino benzoic acid		Trimethoxybenzyl
Phe31	Diaminopteridine	Diaminopteridine	Dimethoxybenzyl	Trimethoxybenzyl
	Para amino benzoic acid	Para amino benzoic acid	(Pyrimidinyl)-methyl	
	Glutamate		Pyridopyrimidinediamine	
Phe34	Diaminopteridine	Diaminopteridine	(Pyrimidinyl)-methyl	
Ile60	Para amino benzoic acid	(Amino)-methyl	Dimethoxybenzyl	Trimethoxybenzyl
		Para amino benzoic acid	Pyridopyrimidinediamine	
Pro61	Para amino benzoic acid	Para amino benzoic acid	Dimethoxybenzyl	Trimethoxybenzyl
Leu67		Glutamate		
		Para amino benzoic acid		
Val115				Pyrimidinediamine
NADP	Diaminopteridine	(Pteridinyl)-methyl	Pyridopyrimidinediamine	Pyrimidinediamine
	(Pteridinyl)-methyl	(Amino)-methyl		

complex에 docking 함으로써 ligand가 최적의 위치를 찾아 결합하도록 유도하였으며, 그 결과 결정체 구조와 docking 된 구조의 단백질 골격 간의 RMSD는 1.26Å으로, 이 경우에도 FOL이나 MTX의 경우와 달리, binding pocket을 이루는 β -sheet의 conformation이 변하였고 trimethoxy benzene group이 바깥쪽으로 향하는 독특한 orientation을 나타내었다(Fig. 3D). Gln35-NH₂의 H와 3-methoxy group의 O, NADP⁺-CONH₂의 O와 pyrimidine-2-NH₂의 H, 그리고 NADP⁺-pyridine ring의 N과 pyrimidine-4-NH₂의 H 사이에서 총 3개의 수소결합을 형성하였으나, 효소 잔기와는 1개의 수소결합만이 형성되어(Fig. 4D), non-classical 저해제의 달라진 결합양상을 나타내었다. 또한, ligand가 바깥쪽으로 튀어나온 상태로 docking 됨으로써 저해작용이 강한 다른 저해제들에 비해 잔기들과의 결합력이 약한 것을 알 수 있었다. 소수성 상호작용의 경우, Leu22, Phe31, Pro61 Ile60, Val115 및 NADP⁺와 반응하며, Pan 등이 제시한 3개의 소수성 핵심 잔기들 중 Ile60과 Val115는 일치하나 Phe34는 상호작용 가능 거리 밖에서 발견되었다. 또 Pan 등²⁴⁾의 modeling 연구에서 제시한 것처럼 docking 결과에서도 TMP의 두 aromatic ring은 ‘L-shaped’ conformation을 이루었으나 상호작용 하는 잔기들이 일치하지 않는 것은 실험방법에 근본적인 차이가 있기 때문으로 생각된다.²⁴⁾ 아직 X-선 결정체 구조가 밝혀지지 않았으나 flexible docking은 효소와 저해제 분자들이 계속 움직이면서 저해제가 가장 안정하게 결합할 수 있는 위치를 찾아 결합하는 방법이며 재현성 검증에서도 탁월한 결과를 얻었으므로 본 연구

결과가 타당할 것으로 판단된다.

결 론

신약개발을 위한 후보물질의 도출을 위해 목표 단백질과 더 잘 결합할 수 있는 강력한 저해제를 고안해야 하는 필요성과, 단백질의 작용기전을 규명하기 위해 ligand와의 결합양상을 규명해야 하는 등의 필요성에 의하여 computer-aided molecular docking 연구는 새로운 연구방법으로 빠른 속도로 발전하고 있다. 본 연구에서는 다양한 종류의 암에 유효한 강력한 항암제, 내성의 발현으로 인해 끊임없이 요구되고 있는 새로운 항생제 그리고 AIDS환자에서 나타나는 감염증을 치료할 수 있는 항진균제 등을 개발하기 위한 우수한 drug target인 DHFR의 세 가지 종에 대해 그 저해제와의 결합양상을 FlexiDock docking protocol에 의해 구하여 이를 결정체 구조와 비교하였으며, 그 결과 이 프로그램의 탁월한 재현성을 확인하였다. 또한 이 프로그램을 사용하여 human DHFR에 네 가지 ligands를 docking하여 그 결합양상을 규명하였으며, 이 결과를 문헌상의 결과와 비교했을 때 docking 방법에 의해 정확하고 타당한 상호작용이 제시됨을 확인하였다. 특히 piritrexim이나 trimethoprim처럼 wild-type hDHFR-NADPH와의 ternary crystal complex 구조가 밝혀지지 않은 경우에는 FlexiDock docking 방법으로 그 구조를 규명할 수 있었다. 본 연구는 docking model을 사용하여 종에 특이성을 가지는 새로운 DHFR 저해제를 고안함

으로써 항암, 항생, 및 항진균제 개발을 위한 후보물질을 도출할 수 있는 중요한 방법을 제공하였으며, 또한 computer-aided molecular docking 방법의 유용성과 신뢰성을 입증하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2001년도 이화여대 Intramural faculty research grant로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Cody, V., Galitsky, N., Luft, J. R., Pangborn, W., Blakley, R. L. and Gangjee, A. : Comparison of ternary crystal complexes of F31 variants of human dihydrofolate reductase with NADPH and a classical antitumor furoprymidine. *Anti-Cancer Drug Design* **13**, 307 (1998).
- 2) Meiering, E. M., Li, H., Delcamp, T. J., Freisheim, J. H. and Wagner, G. : Contributions of tryptophan 24 and glutamate 30 to binding long-lived water molecules in the ternary complex of human dihydrofolate reductase with methotrexate and NADPH studied by site-directed mutagenesis and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **247**, 309 (1995).
- 3) Chowdhury, S. E., Villamor, V. B., Guerrero, R. H., Leal, I., Brun, R., Croft, S. L., Goodman, J. M., Maes, L., Ruiz-Perez, L. M., Pacanowska, D. G. and Gilbert, I. H. : Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase. *J. Med. Chem.* **42**, 4300 (1999).
- 4) Lewis, W. S., Cody, V., Galitsky, N., Luft, J. R., Pangborn, W., Chundurn, S. K., Spencer, H. T., Appleman, J. R. and Blakley, R. L. : Methotrexate-resistant variants of human dihydrofolate reductase with substitutions of leucine 22. *J. Biol. Chem.* **270**, 5057 (1995).
- 5) Walker, V. K., Tyshenko, M. G., Kuiper, M. J., Darger, R. V., Yuhas, D. A., Cruickshank, P. A. and Chaguturu, R. : Tobacco budworm dihydrofolate reductase is a promising target for insecticide discovery. *Eur. J. Biochem.* **267**, 394 (2000).
- 6) Cody, V., Galitsky, N., Luft, J. R., Pangborn, W., Rosowsky, A. and Blakley, L. : Comparison of two independent crystal structures of human dinucleotide phosphate and the very tight-binding inhibitor PT523. *Biochemistry* **36**, 13897 (1997).
- 7) Graffner-Nordberg, M., Marelius, J., Ohlsson, S., Persson, A., Swedberg, G., Andersson, P., Andersson, S. E., Aqvist, J. and Hallberg, A. : Computational predictions of binding affinities to dihydrofolate reductase: synthesis and biological evaluation of methotrexate analogues. *J. Med. Chem.* **43**, 3852 (2000).
- 8) Gangjee, A., Vidwans, A. P., Vasudevan, A., Queener, S. F., Kisliuk, R. L., Cody, V., Li, R., Galitsky, N., Luft, J. R. and Pangborn, W. : Structure-based design and synthesis of lipophilic 2,4-diamino-6-substituted quinazolines and their evaluation as inhibitors of dihydrofolate reductases and potential antitumor agents. *J. Med. Chem.* **41**, 3426 (1998).
- 9) Barry, I. S., Adam, P. D. and Joseph, R. B. : Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *Faseb* **4**, 2441 (1990).
- 10) Oefner, C., D'Arcy, A. and Winkler, F. K. : Crystal structure of human dihydrofolate reductase complexed with folate. *Eur. J. Biochem.* **174**, 377 (1988).
- 11) Sybyl version 6.6. FlexiDock Manual, Tripos Co.: Receptor-Based Design Manual, Ligand-Based Design Manual, Force-Field Manual, Getting started (1999).
- 12) Kim, S. H. and Katzenellenbogen, J. A. : Triarylethylene bisphenols with a novel cycle are ligands for the estrogen receptor. *Bioorganic & Med. Chem.* **8**, 785 (2000).
- 13) Stauffer, S. R., Huang, Y., Coletta, C. J., Tedesco, R. and Katzenellenbogen, J. A. : Estrogen pyrazoles: Defining the pyrazole core structure and the orientation of substituents in the ligand binding pocket of the estrogen receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 141 (2001).
- 14) Stauffer, S. R., Huang, Y. R., Aron, Z. D., Coletta, C. J., Sun, J., Katzenellenbogen, B. S. and Katzenellenbogen, J. A. : Triarylpyrazoles with basic side chains: development of pyrazole-based estrogen receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 151 (2001).
- 15) Inoue, J., Cui, Y. S., Sakai, O., Nakamura, Y., Kogiso, H. and Kador, P. F. : Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel N-nitromethylsulfonanilide derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2167 (2000).
- 16) Chebib, M., McKeveney, D. and Quinn, R. J. : 1-Phenylpyrazolo [3,4-d]pyrimidines; structure-activity relationships for C6 substituents at A1 and A2A adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2581 (2000).
- 17) Dhar, A., Liu, S., Klucik, J., Berlin, K. D., Madler, M. M., Lu, S., Ivey, R. T., Zacheis, D., Brown, C. W., Nelson, E. C., Birckbichler, P. J. and Benbrook, D. M. : Synthesis, structure-activity relationships, and RARgamma-ligand interactions of nitrogen heteroarotinoids. *J. Med. Chem.* **42**, 3602 (1999).
- 18) Volter, K. E., Embrey, K. J., Pierens, G. K. and Quinn, R. J. : A study of the binding requirements of calyculin A and dephosphonocalyculin A with PP1, development of a molecular recognition model for the binding interactions of the okadaic acid class of compounds with PP1. *Eur. J. Pharm. Sci.* **12**, 181 (2001).
- 19) Whitlow, M., Howard, A. J., Stewart, D., Hardman, K. D., Kuyper, L. F., Baccanari, D. P., Fling, M. E. and Tansik, R. L. : X-ray crystallographic studies of *Candida albicans* dihydrofolate reductase. High resolution structures of the holoenzyme and an inhibited ternary complex. *J. Biol. Chem.*

- 272, 30289 (1997).
- 20) Sawaya, M. R. and Kraut, J. : Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence. *Biochemistry* **36**, 586 (1997).
- 21) Lauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M. and Hagler, A. T. : Structure and energetics of ligand binding to proteins: *Escherichia coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins*. **4**, 31 (1988).
- 22) Klon, A. E., Heroux, A., Ross, L. J., Pathak, V., Johnson, C. A., Piper, J. R. and Borhani, D. W. : Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexed with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **320**, 677 (2002).
- 23) Matthews, D. A., Bolin, J. T., Burridge, J. M., Filman, D. J., Voltz, K. W. and Kraut, J. : Dihydrofolate reductase. The stereochemistry of inhibitor selectivity. *J. Biol. Chem.* **260**, 392 (1985).
- 24) Pan, R., Bowen, D. and Southerland, W. M. : Molecular modelling of trimethoprim complexes of human wild-type and mutant dihydrofolate reductases: identification of two subsets of binding residues in the antifolate binding site. *Biopharm. Drug. Dispos.* **20**, 335 (1999).