



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](#)

이학석사 학위논문

삼중음성유방암 세포에서 TTP를  
유도하는 천연 화합물 선별

Selection of natural compounds which  
induce TTP expression in TNBC cell

울산대학교 대학원

생 명 과 학 과

이 주 원

삼중음성유방암 세포에서 TTP를  
유도하는 천연 화합물 선별

Selection of natural compounds which  
induce TTP expression in TNBC cell

지도교수 박 정 우

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함




2023 년 12 월

울 산 대 학 교 대 학 원

생 명 과 학 과

이 주 원

이주원의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원 이 병 주   
심사위원 정 춘 수   
심사위원 박 정 우 

울 산 대 학 교 대 학 원

2024 년 2 월

# 목 차

I. 국문 요약 .....	1
II. 서론 .....	2
III. 실험 재료 및 방법 .....	4
IV. 결과 .....	6
V. Figures and Tables	
1. 유방암 세포에서 TTP 발현을 유도하는 천연 화합물 Screening .....	10
1-1. (Table 1) TTP 발현에 대한 천연 화합물 3차 Screening .....	11
1-2. (Table 2) 3차 Screening에서 선별한 5가지 화합물의 4차 Screening .....	12
2. MDA-MB-231 세포에 선별된 Dexamethasone에 의한 TTP 발현 유도 환경 분석 .....	13
3. Dexamethasone 처리된 MDA-MB-231 세포의 RNA-seq 분석 .....	14
4. KEGG pathway에서의 각각의 억제제들과 Dexamethasone을 같이 처리하였을 때의 TTP 발현 유도 비교 .....	15
5. Hippo pathway inhibitor인 XMU-MP-1이 TTP 발현을 유도 .....	16
6. Hippo pathway를 통한 TTP 발현 유도가 아님을 발견 .....	17
7. TTP 유도 pathway 조사를 위해 선별된 inhibitor와 XMU-MP-1 co-treat ..	18
8. TTP 발현에서의 XMU-MP-1과 FOXO1의 관계성과 가능성 제시 .....	19
VI. 고찰 .....	20
VII. 참고 문헌 .....	22
VIII. Abstract .....	25

## I. 국문 요약

mRNA를 분해하는 단백질인 tristetraprolin(TTP)은 oncogene의 발현을 억제함으로써 종양 억제제 역할을 수행하는데, 이를 유도하여 암 세포 성장을 억제할 수 있는 가능성을 연구하였다. 많은 암세포에서 TTP 발현이 억제되어 있고, TTP 발현을 유도하는 경우 oncogene 발현 억제를 통해 암 세포의 성장을 억제할 수 있다. 유방암 세포에 TTP promoter를 갖는 luciferase reporter를 형질전환하여 1019개의 천연 화합물을 screening하여 TTP 발현을 유도하는 물질을 찾았다. Betamethasone-21-phosphate(Betamethasone-21-P)이 가장 효과적인 것으로 확인되었으며, 이와 유사한 구조를 가진 Dexamethasone도 유사한 정도로 TTP 발현을 유도하였다. 따라서 이후 실험에서는 Dexamethasone을 사용하였다. Dexamethasone에 의한 TTP 발현 유도 pathway를 분석하기 위해 MDA-MB-231 세포에 Dexamethasone 처리 후 3시간 동안 세포의 RNA를 추출하여 RNA-sequencing을 진행하였다. Dexamethasone 처리로 인해 증가한 유전자들의 KEGG pathway 분석 결과, FOXO pathway와 Hippo pathway 관련 유전자들의 발현이 증가함을 확인하였다. FOXO inhibitor와 Hippo signal inhibitor 처리 후 세 발현 변화를 분석한 결과, FOXO inhibitor는 Dexamethasone에 의한 TTP 발현 유도를 억제하였다. 그러나 Hippo signal 중 MST1/2를 억제하는 XMU-MP-1을 처리한 결과, 높은 농도에서 TTP 발현이 유도되는 것을 확인하였다. MST1/2의 siRNA 처리와 MST1/2의 down-stream 유전자인 LATS1/2 및 YAP의 억제는 TTP 발현에 변화를 주지 않았다. 이 결과에서 XMU-MP-1이 Hippo pathway의 MST1/2를 억제하여 TTP를 유도하는 것보다는 다른 pathway를 통해 TTP 발현을 조절하는 가능성을 제시하였다. 이전 연구에서 FOXO1과 TTP의 상호작용에 대해 연구하였고, 이를 바탕으로 XMU-MP-1과 FOXO inhibitor인 AS1842856을 함께 처리했을 때 TTP 발현이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 이 연구 결과에서는 XMU-MP-1이 MDA-MB-231 세포에서 Hippo pathway가 아닌 다른 pathway를 통해 TTP 발현을 유도하며, 특히 FOXO1과의 시너지 효과로 증가하는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 두 가지 약물이 자극하는 특정 pathway가 TTP를 증가시켜 TNBC 세포에서의 성장을 억제하고 약물 치료 가능성을 제시하고 있다.

## II. 서론

Tristetraprolin(TTP, ZFP36)은 mRNA의 3'-untranslated region(3'-UTR)의 AU rich element(ARE)에 결합하고 이러한 mRNA의 분해를 촉진시키는 RNA 결합 단백질이다 [1, 2] ARE는 cytokine 및 oncogene mRNA와 같이 많은 short-lived mRNA에서 발견된다[3]. TTP는 다양하게 발현이 되며 특히 비장, 림프절 및 흉선에서 높은 수준으로 발현된다[4]. 그러나 다양한 암에서 TTP의 발현이 많이 감소되어 있습니다. TTP의 downregulation은 oncogene의 발현 증가와 상관관계가 있으며 암의 성장 과정에 기여할 수 있다[5]. 암세포에서 TTP의 재발현은 성장을 억제하는 효과를 가지고 있다[6, 7, 8]. 또한 암세포에서 TTP의 발현은 p53에 의해 유도되고 Myc에 의해 억제된다[9, 10]. 특히, 대부분의 유형의 암은 p53 pathway에서 결함을 가지며 c-Myc는 종종 인간 암에서 활성화된다[11, 12]. 이러한 특징은 인간 암세포에서 TTP 발현의 감소로 이어질 수 있다. 따라서 암세포에서의 TTP의 발현은 암 예방 및 치료를 위한 새로운 치료법을 제시할 수 있다.

척추 동물의 Hippo pathway는 세포의 억제, 기관 크기와 종양 형성의 조절과 관련되어 있다[13, 14]. YAP은 포유류의 Hippo pathway의 주요 요소로 알려져 있다[15, 16, 17]. 인간의 YAP은 여러 유형의 종양에서 증폭되는 종양 유전자 후보이다[18]. 또한 YAP의 protein의 수준과 핵의 국소화는 많은 인간 암에서 증가한다[15, 19]. 다른 연구들에 따르면 MST1은 세포 주기를 조절하고 p53과 관련된 신호 전달 경로를 통해 세포 사멸을 유도하는 것으로 알려졌으며, 실제로도 다양한 암에서 tumor suppressor로서의 역할을 할 수 있다[20, 21, 22]. 따라서 MST1은 암세포의 증식과 사멸을 조절하여 인간 암세포에서 치료를 위한 바이오마커로 역할을 할 수 있다 [23].

유방암은 여성에게 흔하게 진단되는 암으로 알려져 있으며, 세계적으로도 암과 관련된 사망의 두번째 원인으로 알려져 있다[24]. 일반적으로 유방암은 Estrogen receptor(ER), progesterone receptor(PR), human epidermal growth factor receptor 2(HER2)와 같이 세 가지의 receptor에 의해 유형이 구분된다[25]. 그 중 triple negative breast cancer(TNBC)는 세 가지 receptor가 negative한 형태를 가지거나 없는 유방암으로, 전체 유방암 중에 약 15~20%차지하고 있으며 다른 유형의 유방암에 비해 예후가 좋지 않으며, 대부분의 환자들에 있어서 재발 확률과 전이 속도가 높다고 알려져 있다[26, 27]. TNBC 환자는 다른 유형의 유방암과는 다르게 3가지의 receptor를 표적으로 하는 약물을 사용하여 치료가 어렵다[28]. 그래서 현재 TNBC는 3가지의 receptor에 non-specific chemotherapy로 알려진 taxane과 anthracycline 계열의 약물을 처리하여 치료를 하고 있다[29].

본 연구에서 세포를 기반으로 하는 reporter assay를 통하여 천연 화합물 library를

screening하여 암세포에서 TTP 발현을 유도할 수 있는 천연 화합물을 확인하였다. 1019개의 천연 화합물 중에서 A06 물질을 선별하였고, A06의 광학이성질체인 Beta methasone-21-P을 제공받았다. Betamethasone-21-P와 현재 상용화되어있는 Dexamethasone을 처리하였을 때의 TTP 유도 확인 결과 Dexamethasone에서도 유사하게 TTP 발현을 증가시킬 수 있었다. 이후 Dexamethasone을 사용하여 TTP 발현을 유도하는 pathway를 분석하였다. 이전 연구에서 Dexamethasone으로 유도된 TTP가 FOXO1과 상호작용한다는 결과를 얻었다[35]. 하지만 TTP를 증가시킬 수 있는 화합물을 찾고자 하였고 재조사를 하였고, 그 결과 Hippo pathway가 가장 TTP의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하여 MST1/2 inhibitor인 XMU-MP-1을 통하여 TTP 발현을 유도하고 그에 따른 정확한 pathway를 파악하고자 하였다.



### III. 실험 재료 및 방법

#### 3.1. Cells and Chemicals

Human MDA-MB-231 breast cancer cell line을 한국세포주은행(Seoul, Korea)을 통하여 구매하였다. 해당 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1X), liquid (high glucose)에 heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) 10%를 더하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>인큐베이터에서 배양하였다. Dexamethasone(sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), Wortmannin, QNZ, MK2206, idasanutlin, AS1842856, XMU-MP-1, LATS-IN-1, Tozasertib과 p38 MAPK 억제제 (Selleckchem, Houston, TX, USA)를 이번 연구에서 사용하였다.

#### 3.2. Plasmid, small interfering RNAs, Transfection and Dual-luciferase Assay

인간의 TTP 프로모터를 포함시킨 pGL3/TTPp-1343 plasmid를 이용하여 Luciferase assay를 진행하였다. Small interfering RNAs(siRNAs)는 YAP, MST1과 scRNA(scrambled siRNA)를 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 주문하여 실험을 진행하였다. 각각의 siRNA는 10 μM, 6 μl로 Opti-MEM 300 μl와 함께 처리하여 24시간동안 배양하였다. 이후 TTP mRNA level은 qRT-PCR을 통해 분석하였다.

#### 3.3. Screening of the Natural Product Library and Luciferase assay

천연물 Library를 사용하여 암세포에서 TTP 발현을 유도하는 천연물을 선별하였다. 1019개의 천연물 library는 한국화학은행에서 제공받았다. 100 mm plate에서 MCF-7 cell에서 TurbofectTM(Fermentas, Waltham, MA, USA)을 이용하여 pGL3/TTPp-1343-luciferase reporter와 pRL-SV40 Renilla-luciferase의 공동 형질감염을 진행하였다. 24시간 동안 배양 후, 세포를 harvest하여 100 μl에서 well당 4 x 10<sup>3</sup> cell만큼 96-well plate에 세포를 분주하고 30 μl의 천연 화합물과 함께 배양하였습니다. 이후 유도된 luciferase 활성을 확인하기 위해 세포에 동일한 volume으로 DMSO를 처리하였다.

#### 3.4. RNA Isolation

Harvest한 cell pellet에 1 ml의 Trizol reagent를 사용하여 cell lysis를 유도한 후 200 μl chloroform을 처리하여 RNA와 DNA 및 protein 층을 분리하였다. 분리된 RNA 층을 새로운 micro tube에 옮긴 후 400 μl isopropanol을 추가하여 centrifuge를 통하여 RNA를 침전시켰다. RNA pellet을 제외한 상층액을 제거 후 70 % EtOH를 1 ml 넣어 washing하였다. 이후 RNA pellet에 남아있는 용액을 상온에서 air dry 하였다. Air dry 이후 DEPC water를 이용하여 RNA를 녹인 후 실험을 진행하였다.

### **3.5. Real time PCR**

DNase I이 처리되어 있는 RNA를 Oligo-dT, Superscript II reverse-transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 StepOnePlus™ 제품사의 Real time PCR system을 이용하여 qRT-PCR을 진행하였다

### **3.6. Protein extraction**

Harvest한 cell pellet에 PhosSTOPEASYpack(Roche), cOmplete Tablets EDTA-free, EASYpack(Roche)를 추가한 M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent(Thermo scientific, 78501)을 이용하여 lysis하였다. 이후 BCA assay를 통하여 protein의 농도를 측정하였다.

### **3.7. SDS-PAGE and Immunoblotting**

Protein을 SDS-PAGE로 분석하여 Hybond-P membrane(Amersham Biosciences)으로 옮겼다. Membrane을 skim milk로 blocking한 후 Rabbit anti-Human TTP(T5327, Sigma), Anti-B-actin(A2228, Sigma), Rabbit anti-PI3 kinase p85(4292S, cell signaling), Rabbit anti-human Aurora A(14475, cell signaling)를 처리하여 protein level을 분석하였다.

### **3.8. RNA-seq**

MDA-MB-231 cell에 500 nM Dexamethasone을 처리 후 3시간 뒤 harvest하여 RNA sample을 제작하였고 RNA-seq을 수행하였다. 각 sample의 DNA는 RNeasyMinElute Cleanup Kit(Qiagen)을 이용하여 제거하였다. RNA는 제조 업체의 권장 사항에 따라 1.0 µg로 준비한 후 HiSeq1500 platform(Illumina)을 사용하여 sequencing을 진행하였다. RNA-seq 분석은 STAR 2.7.9a를 사용하여 Human genome GRCh38에 mapping되었다. 유전자의 발현 수는 bedtools에 구현된 multicov를 사용하여 측정하였고, 차별적으로 발현된 유전자(DEG)는 EdgeR을 사용하였다.

## IV. 결과

### 유방암 세포에서 TTP 발현을 유도하는 천연 화합물 Screening

한국화학물은행에서 제공받은 1019개의 천연 화합물을 이용하여 유방암 세포 중 하나인 MCF-7 세포에서 luciferase reporter gene에서 TTP promoter를 가지고 있는 pGL3-TTPp-1343을 형질전환하였고, 이후 화합물들에 따른 TTP의 발현을 확인하였다. Luciferase assay를 통한 screening은 3차까지 진행하였다(Fig.1A~C). 세 번의 screening을 통해 01-E10, 01-G05, 07-B10, 07-A10, 05-A06 물질들이 지속적으로 TTP 발현 증가를 보여줌을 확인하였다(Table.1). 선별한 물질들을 re-screening을 진행하였고, 그 중 01-E10과 05-A06 물질이 계속해서 TTP 발현 증가를 보여주었다(Table. 2).

### MDA-MB-231 세포에 선별된 Dexamethasone에 의한 TTP 발현 유도 환경 분석

한국화학물은행에 05-A06에 대한 정보를 얻고자 요청하였고, 광학 이성질체로서 Betamethasone-21-P를 추천을 받았다. 하지만 해당 물질에 대한 정보가 많이 알려져 있지 않았고, 그에 따라 비슷한 구조를 가진 물질인 Dexamethasone을 발견하였다. Dexamethasone은 항염증 효과가 있다고 알려져 있으며[30], 추가로 최근에는 종양 세포의 증식을 억제할 수 있다는 연구 결과도 나오고 있다[31]. Betamethasone-21-P와 Dexamethasone을 처리하여 TTP 발현의 증가를 확인하였을 때 유사하게 TTP를 유도할 수 있음을 확인하였고, 이후 Dexamethasone을 선택하여 실험을 진행하였다(Fig.2A). TTP발현의 유도가 TNBC에서 어떠한 영향을 줄 수 있는지에 대해 알아보고 위해 TNBC 세포 중 하나인 MDA-MB-231 세포에 Dexamethasone을 시간대 별로 처리하여 TTP 발현을 확인하였다. 12hr, 24hr 시간대에서는 Control과 비교하였을 때 크게 증가하지 않았지만 나머지 시간대에서는 TTP 발현이 증가한 것을 확인할 수 있고, 특히 3시간대에 가장 많이 증가된 것을 보여주고 있다(Fig.2B). 3시간까지 증가한 후 다시 감소하며 48시간대에 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 TTP가 TTP를 표적으로 할 수 있다는 다른 연구에 의해 설명될 수 있다. Dexamethasone에 의한 TTP의 증가가 간접적인 영향일 가능성이 높은 후반부의 시간대보다는 직접적으로 TTP 발현에 관여했을 것으로 예상되는 초기 시간대에 초점을 맞춰 1시간대와 3시간대를 선별하였다. 두 시간대에서 No treat 군과 비교를 하였을 때, 가장 많은 TTP 발현 증가를 보여주었던 3시간대에서 약 10배 증가된 것을 확인하였다(Fig.2C). 이후 3시간대의 샘플을 이용하여 TTP target gene으로 알려진 VEGF와 Myc[8, 10]의 발현이 조절되는 것을 확인하였다.

### Dexamethasone처리된 MDA-MB-231 cell의 RNA-seq 분석

이전의 실험들에서 Dexamethasone이 TNBC 중 하나인 MDA-MB-231 세포에서 TT

의 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 그래서 약물을 처리하였을 때 TTP 유도의 기본적인 매커니즘을 파악하기 위해 Dexamthasone(500 nM, 3hr) 처리한 샘플을 각각 3개씩 RNA-seq을 진행하였다. No treat 군과 Dexamethasone 처리 그룹을 비교하여 분석하였고, 95개의 상향 조절된 DEG와 62개의 하향 조절된 DEG를 확인할 수 있었다(Fig.3A, B). 이후 Dexamethasone에 의해 조절되는 pathway들을 분석하기 위해 약물 처리된 샘플에서 상향 조절된 유전자들과 하향 조절된 유전자들을 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 통해 pathway를 분석하였다. 분석 결과, 암세포에서의 transcriptional misregulation, NF-kB pathway, small cell lung cancer, p53 pathway, PI3K-AKT pathway, Hippo pathway, Thyroid cancer, Basal cell carcinoma, Aderens junction와 FOXO pathway를 포함한 여러 신호 전달 경로와 연결되어 있음을 보여주었다(Fig.3C).

### **KEGG pathway에서의 각각의 억제제들과 Dexamethasone을 같이 처리하였을 때의 TTP 발현 유도 비교**

MDA-MB-231 세포에서 Dexamethasone에 의해 유도된 TTP 발현과 관련된 pathway를 추가로 조사하기 위해 상향 조절된 각각의 KEGG pathway의 inhibitor들을 처리하였다. 각각 Dexamethasone과 PI3K pathway를 억제하는 Wortmannin(Fig.4A), NF-kB pathway를 억제하는 QNZ(Fig.4B), FOXO1 pathway를 억제하는 AS1842856(Fig.4C), AKT pathway를 억제하는 MK-2206(Fig.4D), p53 pathway를 억제하는 Idasanutlin(Fig.4E), Hippo pathway를 억제하는 XMU-MP-1(Fig.4F)을 함께 처리하였다. 그 중 Wortmannin을 처리한 것은 Dexamethasone 단독으로 처리했을 때보다 약 1.5배 정도 증가하였고, XMU-MP-1을 처리한 샘플군에서는 단독으로 처리한 것보다 약 2배 이상 증가하였다(Fig.4A, E).

### **Hippo pathway inhibitor인 XMU-MP-1이 TTP 발현을 유도**

MDA-MB-231 세포에서의 TTP 발현 유도에 p53 pathway와 Hippo pathway의 관련성을 확인하기 위해 p53 signal과 Hippo signal을 활성화시키는 MDM2 inhibitor(Idasanutlin)과 MST1/2 inhibitor(XMU-MP-1)를 단독으로 처리하였다. XMU-MP-1을 처리하였을 때, 5  $\mu$ M 이상의 농도에서 TTP 발현의 증가를 보여주었으며(Fig.5A), Idasanutlin을 처리하였을 때는 아무것도 처리하지 않은 샘플과 큰 차이를 보여주지 않았으며 오히려 1  $\mu$ M에서 감소를 하는 경향을 확인하였다(Fig.5B). TTP 증가를 보여주었던 XMU-MP-1을 더 낮은 농도에서 처리하여 TTP 발현을 유도할 수 있는지 확인하고자 하였다. 이러한 의문은 1  $\mu$ M에서부터 농도에 의존적으로 TTP 발현이 증가하는 것으로 해결할 수 있었다(Fig.5C).

### **Hippo pathway를 통한 TTP 발현 유도가 아님을 발견**

Hippo pathway의 주요 요소는 YAP으로 알려져 있다[15, 16, 17]. YAP은 세포의 밀집도에 의해 Hippo signaling이 조절된다는 연구 결과가 있다[32]. 그래서 낮은 세포 밀집 조건( $2 \times 10^5$ )과 높은 세포 밀집 조건( $1 \times 10^6$ )아래에서 XMU-MP-1을 처리하여 TTP 발현 유도를 확인하였다. 5배 차이의 세포 밀집도에도 불구하고 MDA-MB

-231 세포에서 XMU-MP-1에 의한 TTP 발현에 변화가 없었으며 이는 세포 밀집도와는 연관이 없다는 것을 보여준다(Fig.6A). 이후 XMU-MP-1에 의해 증가된 YAP이 TTP 발현에 있어서 영향을 줄 수 있는지 확인을 하고자 YAP을 knock-down한 후(Fig.6C) XMU-MP-1을 처리하여 TTP 발현의 변화를 확인하였다. YAP을 knock-down했음에도 불구하고 TTP 발현 유도에 있어서 유의미한 차이를 보여주지 않았다(Fig.6B). MST1/2는 LATS1/2를 활성화하여 YAP/TAZ를 억제한다고 알려져 있다[33]. XMU-MP-1의 target인 MST1/2에 의해 TTP의 유도가 일어나는 것인지를 확인하기 위해 MST1/2의 downstream인 LATS1/2의 억제제인 LATS-IN-1을 처리하였다. MST1/2 inhibitor인 XMU-MP-1을 처리했던 것과는 다르게 LATS-IN-1을 처리하였을 때 오히려 TTP의 감소를 보여주었다(Fig.6D). 이는 MDA-MB-231 세포에서 XMU-MP-1을 처리해서 TTP 발현을 유도하는 것이 MST1/2의 억제에 의한 것이 아닌 다른 pathway를 통해 진행된다는 가능성을 제시한다. 최종적으로 확인하기 위해 MST1/2 knock-down(Fig.6F)을 통해 TTP 발현이 조절되는지 실험하였고, MST1/2 knock-down된 샘플군에서 TTP 발현의 증가가 일어나지 않았다(Fig.6E). 이는 XMU-MP-1 처리 시, MST1/2에 의해 TTP가 유도되지 않는다는 것을 의미하고 있다.

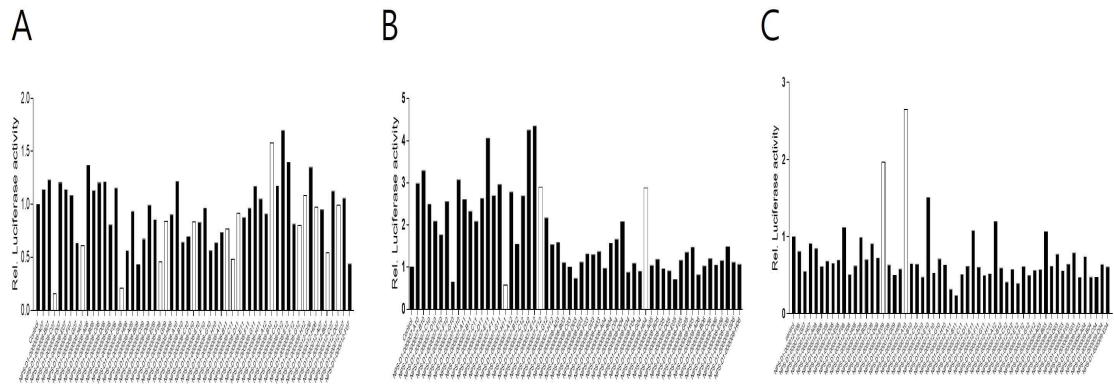
#### **TTP 유도 pathway 조사를 위해 선별된 inhibitor와 XMU-MP-1 co-treat**

XMU-MP-1이 MST1/2뿐만 아니라 다른 kinase를 조절할 수 있다는 연구 결과가 있다[34]. 앞의 결과들에서 XMU-MP-1을 사용하여 Hippo pathway를 조절하였을 때 TTP 발현의 유도가 일어나지 않음을 보여주었기에 XMU-MP-1을 처리하였을 때 조절되는 다양한 pathway에 있는 kinase들 중 percent control(ctrl%)과  $K_d$ 값을 고려하여[34] AURKA와 PIK3CG를 선별하였다. AURKA inhibitor인 Tozasertib을 농도별로 XMU-MP-1과 함께 처리하였을 때, TTP의 RNA와 protein 수준에 있어서 증가되는 경향을 발견하지 못하였다(Fig.7A, B). 오히려 RNA에서는 Tozasertib 100 nM과 1000 nM에서 약간 감소하는 것을 보여주었다(Fig.7A). 추가로 PIK3CG inhibitor인 wortmannin을 농도별로 XMU-MP-1과 함께 처리하였다. 마찬가지로 TTP의 RNA와 protein의 수준에 있어서 증가하는 경향을 보여주지 않았다. 이러한 결과들은 TTP 발현에 있어서 MDA-MB-231 세포에서 XMU-MP-1처리하였을 때 MST1/2, AURKA, 그리고 PIK3CG가 영향을 주지 않는다는 것을 말해주고 있다.

#### **TTP 발현에서의 XMU-MP-1과 FOXO1의 관계성과 가능성 제시**

이전에 했던 연구들에서 FOXO1이 TTP을 유도한다는 결과를 도출하였다[35]. XMU-MP-1과 AS1842856을 함께 처리하였을 때 TTP의 RNA발현이 XMU-MP-1을 단독으로 처리했을 때보다 약 3배 증가하였고(Fig.8A), protein 수준에 있어서도 눈에 띄게 증가하는 것을 보여주었다(Fig.8B). 이후 TTP target gene으로 알려진 Myc[10]을 확인하였을 때, 두 약물을 함께 처리하면 더 많이 감소되는 것을 확인하였다. 이전 연구[35]에서의 FOXO1을 억제하였을 때 TTP가 감소되는 결과들과는 반대로 MDA-MB-231 세포에서 XMU-MP-1이 Hippo pathway를 통해 TTP를 증가시키지는 않지만, FOXO1 inhibitor와 함께 처리하였을 때 시너지 효과로 TTP의 발현이 더 증가되는 것으로 보아 TTP의 발현 유도가 XMU-MP-1과 FOXO pathway가 연관성이 있을 수

있으며 더 나아가 TNBC 세포에서의 TTP 증가 유도를 통하여 화합물치료법에도 가능성이 있음을 시사하고 있다.



**Figure 1. 유방암 세포에서 TTP 발현을 유도하는 천연 화합물 screening.**

(A, B, C) MCF-7 세포에 pGL3/TTPp-1342-luciferase reporter를 형질전환 후 천연 화합물을 30  $\mu\text{l}$  씩 처리하여 24시간 동안 배양 후 형광 분석.

**Table 1. TTP 발현에 대한 천연 화합물 3차 Screening**

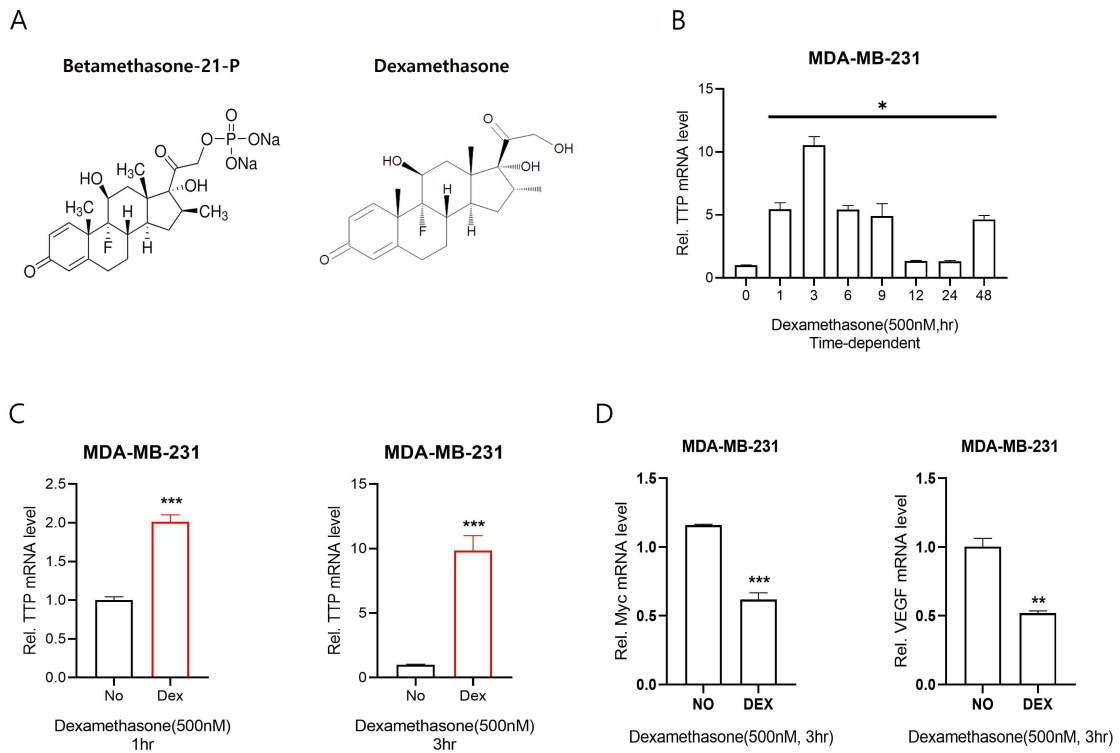
Library Position	Compound Concentration(mM)	Fold changes in TTP promoter activity		
		1st screening	2nd screening	3rd screening
NPS-D1-000001-G05	4.7	5.29	2.52	2.4
NPS-D1-000001-E10	4.6	5.12	2.09	3.27
NPS-D1-000007-E12	5.1	4.36	0.68	0.5
NPS-D1-000007-D12	4.9	4.26	0.76	0.65
NPS-D1-000007-E11	5.1	4.06	0.95	0.76
NPS-D1-000011-B08	10.0	3.85	0.59	0.7
NPS-D1-000007-B10	5.2	3.29	2.43	2.61
NPS-D1-000002-G03	5.1	3.10	0.79	0.93
NPS-D1-000007-H10	5.4	3.08	0.93	0.84
NPS-D1-000007-A10	5.4	2.99	2.04	2.38
NPS-D1-000007-G11	5.0	2.96	0.62	0.71
NPS-D1-000010-C10	10.0	2.87	0.8	1.39
NPS-D1-000007-A12	5.0	2.79	0.61	0.51
NPS-D1-000011-E10	10.0	2.78	2.07	1.89
NPS-D1-000007-F11	4.7	2.70	0.92	0.78
NPS-D1-000007-C12	5.2	2.70	0.57	0.72
NPS-D1-000007-D11	5.1	2.65	1.22	0.89
NPS-D1-000007-A11	5.4	2.60	1.52	1.14
NPS-D1-000007-F10	4.9	2.56	0.94	1.05
NPS-D1-000007-C10	5.1	2.50	0.84	1.09
NPS-D1-000006-F04	5.1	2.49	2.62	1.73
NPS-D1-000008-F11	5.4	2.39	1.13	0.96
NPS-D1-000003-D12	4.7	2.35	0.72	0.82
NPS-D1-000007-B11	4.8	2.33	1.31	1.47
NPS-D1-000005-A06	5.1	2.32	2.69	3.15
NPS-D1-000007-G12	4.7	2.12	0.56	0.99
NPS-D1-000007-C11	4.7	2.09	1.28	1.09
NPS-D1-000007-D10	4.6	2.09	1.78	1.43
NPS-D1-000008-D04	4.8	2.07	0.81	1.04
NPS-D1-000006-B07	5.0	2.07	1.35	1.94
NPS-D1-000002-C09	5.0	2.04	1.15	0.89



Table 2. 3차 Screening에서 선별한 5가지 화합물의 4차 Screening.

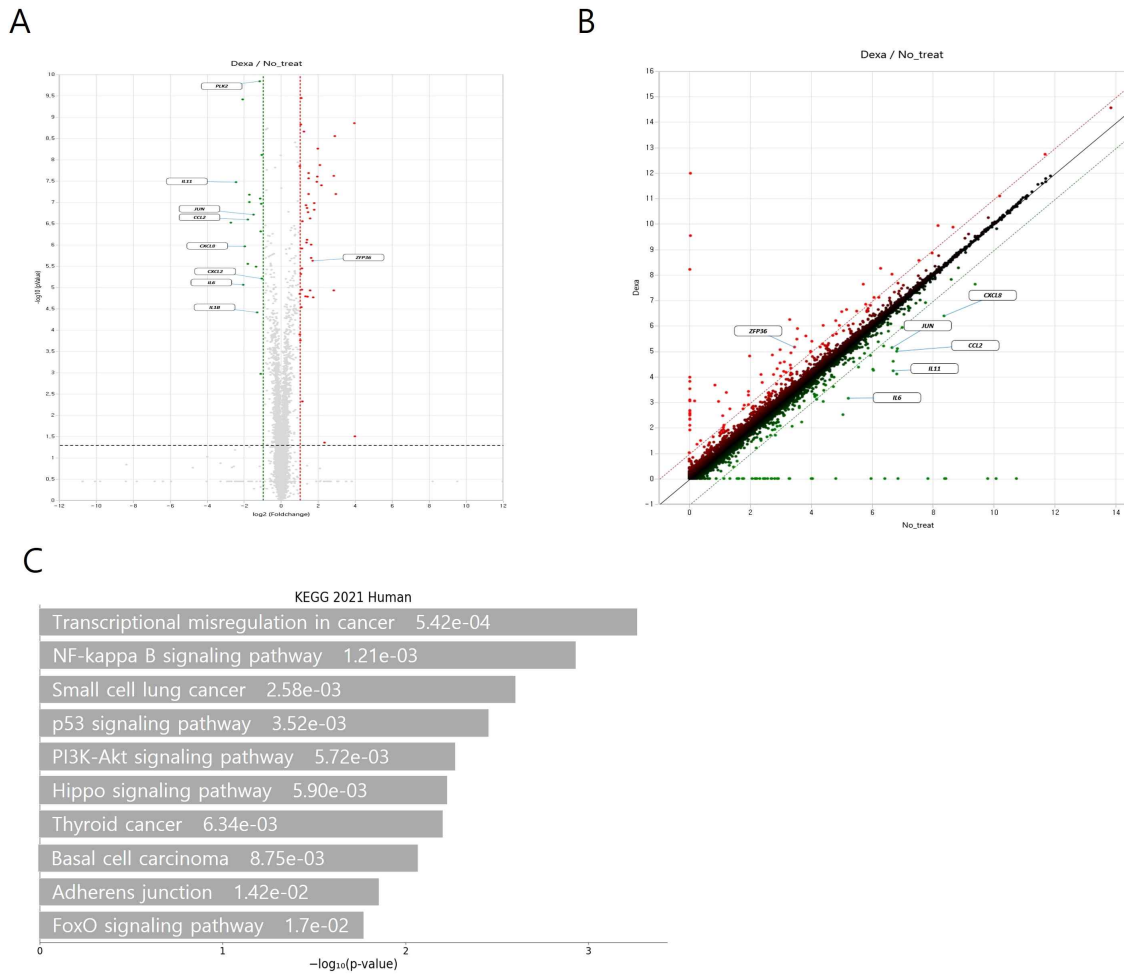
Compound name	Fold changes in TTP-Promoter Luciferase activity						
	1 <sup>st</sup> screening (30 $\mu$ l)	2 <sup>nd</sup> screening (30 $\mu$ l)	3 <sup>rd</sup> screening (30 $\mu$ l)	4 <sup>th</sup> screening			
				5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	30 $\mu$ l	50 $\mu$ l
01-E10	5.12	2.09	3.27	3.63	4.77	6.82	6.37
01-G05	5.28	2.52	2.4	1.49	2.02	4.21	5.50
07-B10	3.29	2.43	2.61	1.18	1.32	1.28	1.66
07-A10	2.99	2.04	2.38	1.44	1.12	1.49	1.56
05-A06	2.32	2.69	3.14	2.45	3.28	5.64	5.91

MCF-7 세포에서 3차 screening에서 선별한 물질을 MDA-MB-231 세포에서 4차 screening을 진행.



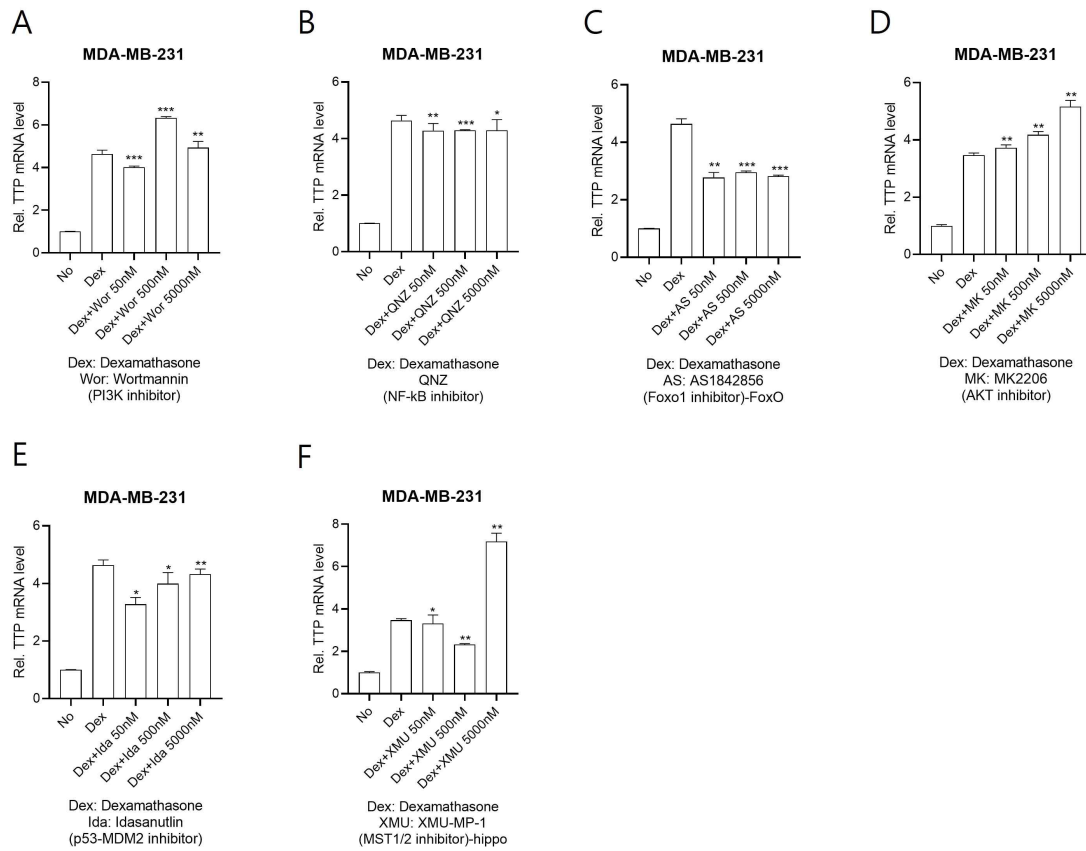
**Figure 2. MDA-MB-231 세포에 선별된 Dexamethasone에 의한 TTP 발현 유도 환경 분석.**

(A) A06 화합물과 광학 이성질체인 Betamethasone-21-PDS와 유사한 Dexamethasone의 구조. (B) Dexamethasone 500 nM로 시간별로 TTP RNA 발현을 real-time PCR로 분석. (C) MDA-MB-231 세포에 Dexamethasone 500 nM을 1시간대와 3시간대에 같은 시간대의 no treat 샘플과 real-time PCR로 TTP 발현 비교. (D) Dexamethasone 처리 후 TTP target gene을 real-time PCR로 분석. (\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )



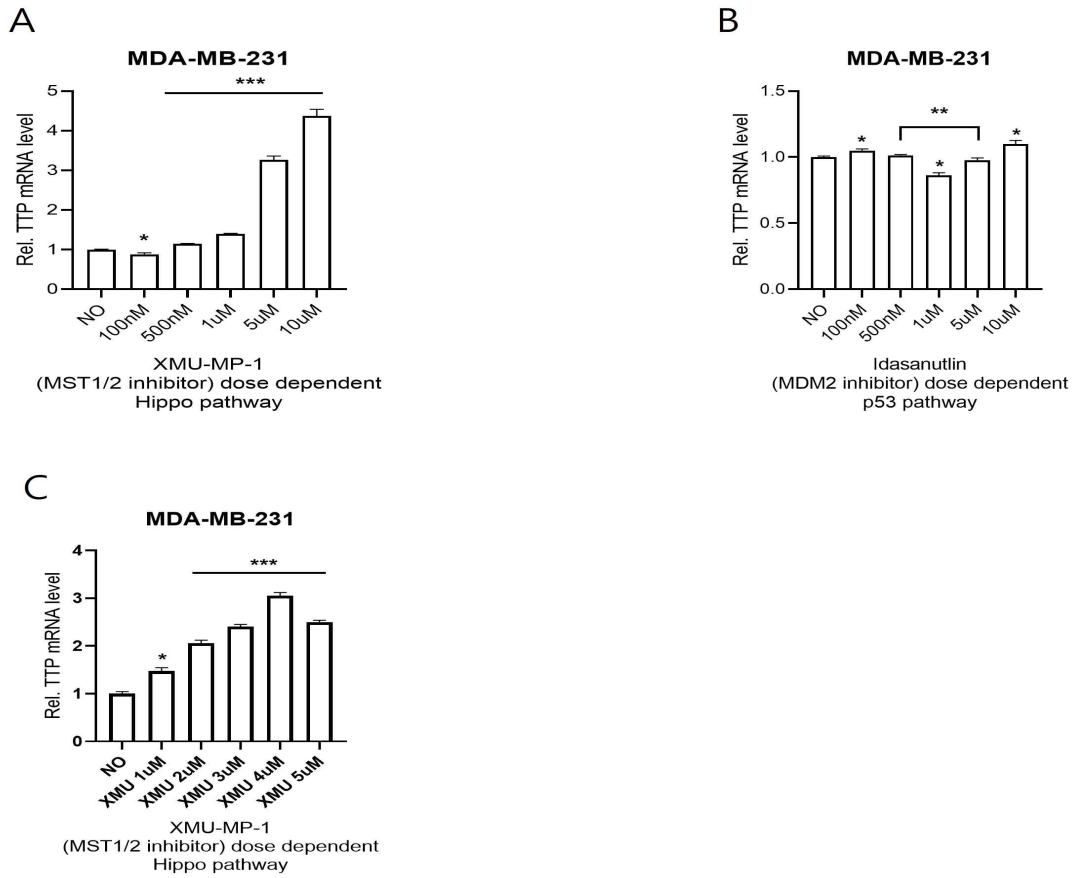
**Figure 3. Dexamethasone 처리된 MDA-MB-231 세포의 RNA-seq 분석**

(A). Dexamethasone 처리된 세포에서의 DEGs(differentially expressed genes)Volcano plot 분석. (B) Dexamethasone 처리된 세포에서의 DEGs scatter plot 분석. (C). 증가된 유전자들에 대한 KEGG pathway 분석.



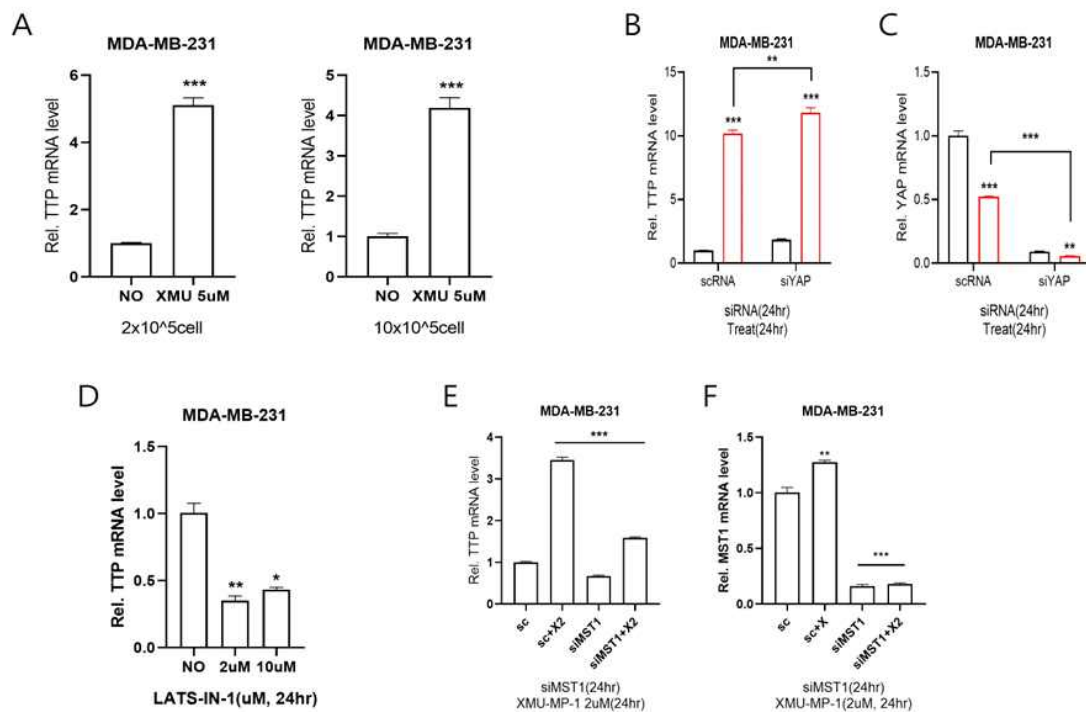
**Figure 4. KEGG pathway에서의 각각의 억제제들과 Dexamethasone을 같이 처리하였을 때의 TTP 발현 유도 비교.**

(A) PI3K (Wortmannin). (B) NF-kB (QNZ). (C) FOXO1 (AS1842856). (D) AKT (MK-2206). (E) p53 (Idasanutlin). (F) MST1/2 (XMU-MP-1). (A~F) Dexamethasone과 농도 별로 처리하여 TTP의 발현을 real-time PCR로 분석. (\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )



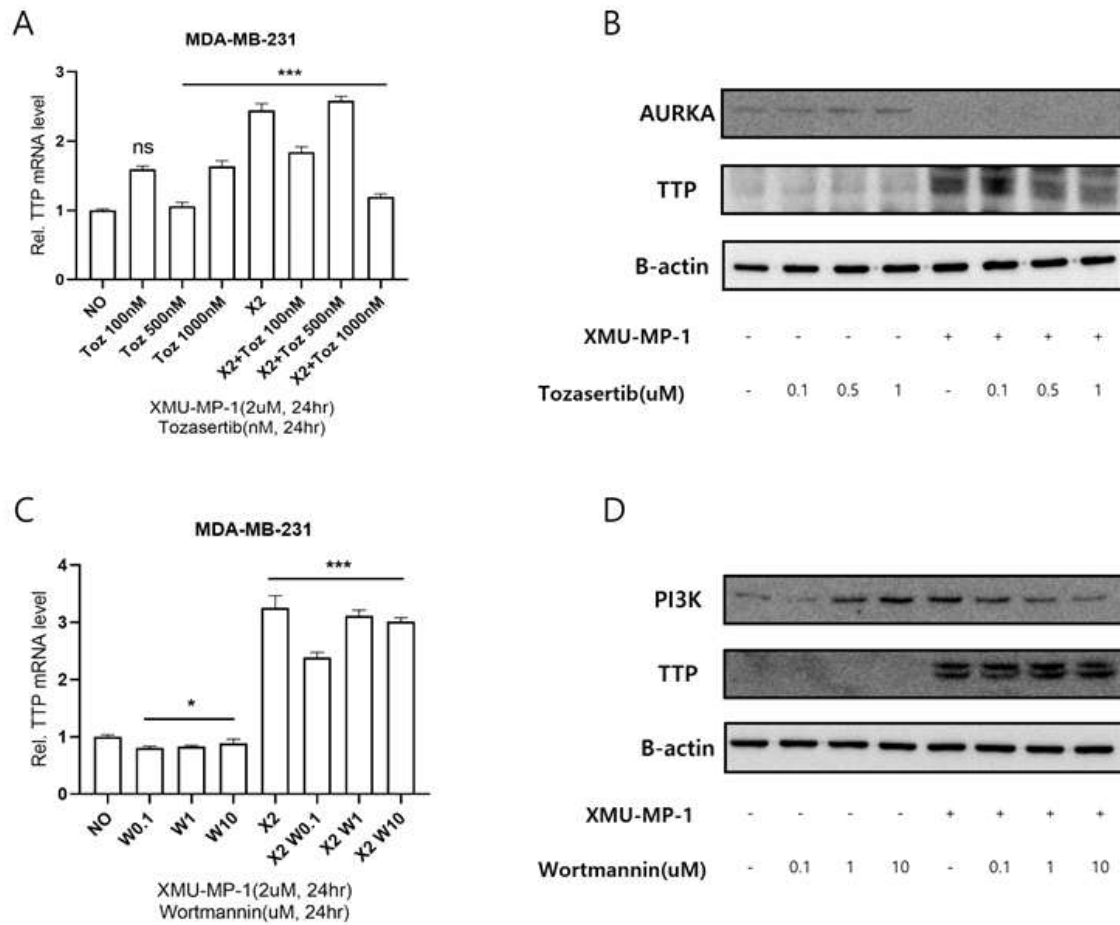
**Figure 5. Hippo pathway inhibitor인 XMU-MP-1이 TTP 발현을 유도.**

(A) XMU-MP-1을 단독으로 농도별로 처리하여 TTP 발현 확인. (B) Idasanutlin을 단독으로 농도별로 처리하여 TTP 발현 확인. (C) XMU-MP-1을 1~5 μM으로 처리하여 TTP 발현 확인. (A~C) Real-time PCR을 통해 RNA level 분석. (\* p < 0.5, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)



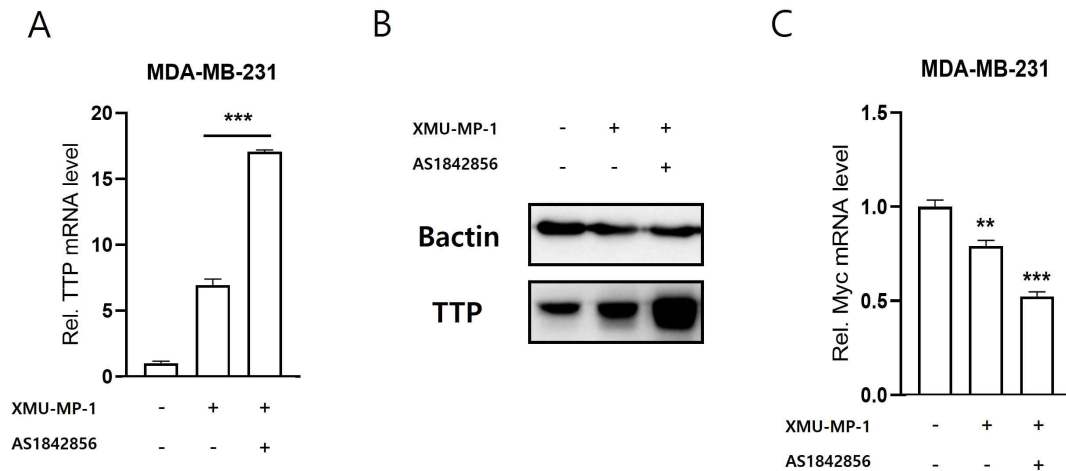
**Figure 6. Hippo pathway를 통한 TTP 발현 유도가 아님을 발견.**

(A) (왼쪽) 2 x 10<sup>5</sup> cell에 XMU-MP-1을 5 μM 처리, (오른쪽) 2 x 10<sup>6</sup> cell에 XMU-MP-1을 5 μM 처리. (B) siYAP으로 형질전환 24시간 후 XMU-MP-1 5 μM 처리하여 TTP level 확인. (C) siYAP을 형질전환 24시간 후 XMU-MP-1 5 μM 처리하여 YAP level 확인. (D) LATS-IN-1을 2 μM, 10 μM으로 24시간 동안 처리하여 TTP level 확인. (E) siMST1으로 형질전환 24시간 후 XMU-MP-1 처리하여 TTP level 확인. (F) siMST1으로 형질전환 24시간 후 XMU-MP-1 처리하여 MST1 level 확인. (A~F) Real-time PCR을 통해 RNA level 분석. (\* p < 0.5, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001)



**Figure 7. TTP 유도 pathway 조사를 위해 선별된 inhibitor와 XMU-MP-1 co-treat**

(A) XMU-MP-1과 Tozasertib을 농도별로 MDA-MB-231 세포에 처리하여 real-time PCR로 TTP level 확인. (B) XMU-MP-1과 Tozasertib을 농도별로 세포에 처리하여 AURKA와 TTP protein level 확인. (C) XMU-MP-1과 Wortmannin을 농도별로 MDA-MB-231 세포에 처리하여 real-time PCR로 TTP level 확인. (D) XMU-MP-1과 Wortmannin을 농도별로 세포에 처리하여 PI3K와 TTP protein level 확인. (\*  $p < 0.5$ , \*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )



**Figure 8. TTP 발현에서의 XMU-MP-1과 FOXO1의 관계성과 가능성 제시.**

(A) XMU-MP-1(5  $\mu$ M)과 AS1842856(1  $\mu$ M)을 함께 처리하여 24시간대에서 real-time PCR로 TTP level 확인. (B) XMU-MP-1(5  $\mu$ M)과 AS1842856(1  $\mu$ M)을 함께 처리하여 24시간대에서 TTP protein level 확인. (C) XMU-MP-1(5  $\mu$ M)과 AS1842856(1  $\mu$ M)처리 후 24시간대에서 TTP의 target gene을 real-time PCR로 RNA level 확인. (\*  $p < 0.5$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )



## VI. 고찰

인간 유전자의 약 16%는 mRNA 3'UTR 내에 ARE motif를 가지고 있으며[36], 이들 중 다수는 면역 반응 및 종양 형성과 관련이 있다[37, 38]. TTP는 p-body의 단백질 구성 요소를 TTP-mRNA complex에 모집하여 ARE에 결합하고 ARE를 가진 mRNA 분해를 증가시킨다[39, 40]. 종양 발병 및 진행에 관여하는 유전자의 하향 조절에 의해 TTP는 종양 억제인자로서 기능할 수 있다. 그러나 TTP의 발현은 다양한 암에서 감소되어 있다. 따라서, TTP 발현이 낮은 암세포에서 TTP를 유도하는 화합물은 암 치료에 있어서 새로운 후보군이 될 수 있다.

천연물에서 추출한 화합물은 구조적 다양성을 입증할 수 있으며, 다양한 매커니즘을 통해 작용할 가능성이 있다. 현재까지 암세포에서 TTP 발현을 유도하는 천연 화합물 library로부터 화합물을 동정한 보고는 없었다. 한국화학은행에서 제공하는 천연화합물 library에는 약용 식물에서 추출한 1,019개의 순수 천연화합물이 포함되어 있다. 이 연구에서 암세포에서 TTP 발현을 유도하는 새로운 화합물을 발견하기 위해 luciferase를 이용한 reporter assay를 진행하였다. Library를 screening한 후 한국화학은행으로부터 광학 이성질체로서 Betamethasone-21-PDS를 추천 받았고, 이와 구조가 비슷하며 현재 상용화되어 있고 최근 암 세포를 억제할 수 있다고 알려진 Dexamethasone을 선택하였고 실험 결과 TTP의 강력한 유도제임을 확인하였다. 이후 RNA-seq을 통해 증가된 유전자와 감소된 유전자를 분석하였고, 본 연구의 목적인 TTP 유도제로서의 화합물을 찾기 위해 증가된 유전자들에 초점을 맞춰 KEGG pathway를 분석하였다. RNA-seq data에 나온 pathway 중 정확한 pathway와 관련되어 있는 것들 위주로 억제제들을 처리하여 진행하였다. 그 중 PI3K inhibitor(Wortmannin)과 MST1/2 inhibitor(XMU-MP-1)이 Dexamethasone과 시너지 효과로 TTP 발현이 증가하였다. 하지만 PI3K inhibitor의 경우 MST1/2 inhibitor에 비하여 증가된 정도가 낮았기 때문에 Hippo pathway에 초점을 맞춰 실험을 진행하였다.

MST1/2의 억제로 인해 YAP/TAZ의 발현이 증가하게 되면 세포의 성장이 증가한다는 연구 결과가 있지만[41], 또 다른 연구 결과에서는 YAP이 ferroptosis를 유발하여 세포 사멸을 유도하기도 한다[42]. TNBC 세포에서도 YAP이 TTP를 유도하여 세포 사멸을 유도할 수 있는지 확인하기 위해 우선 Hippo pathway를 통해 진행되는 것인지 확인하는 실험을 진행하였다. Hippo pathway와 관련된 LATS1/2의 억제와 YAP과 MST1의 knock-down에도 불구하고 TTP의 발현에 있어서 큰 변화를 보여주지 않았다. 이러한 연구 결과로 인하여 XMU-MP-1이 TTP를 유도하는 것에 있어서 Hippo pathway와는 관련이 없음을 확인할 수 있었다.

하지만 XMU-MP-1을 처리하였을 때 TTP 발현이 증가되는 것을 지속적으로 확인하였다. 다른 연구에서 XMU-MP-1이 Hippo pathway 뿐만 아니라 다양한 pathway를 통해 진행될 수 있다는 연구 결과가 보고되었다[34]. 보고된 연구 결과를 토대로 Hi

ppo pathway를 제외한 가장 유망한 pathway의 kinase들 중 AURKA와 PIK3CG를 선별하였고, 각각의 inhibitor를 처리하여 TTP 발현을 확인하였다. PIK3CG inhibitor (Wortmannin)의 경우에는 큰 변화가 없었으나, AURKA inhibitor(Tozasertib)의 경우에는 XMU-MP-1과 함께 처리하였을 때 농도별로 TTP가 감소되거나 변화가 없는 결과가 도출되었다. TTP 발현에 있어서 일관적인 결과가 입증되지 않았기 때문에 선별된 off-target에 있어서 큰 효과를 볼 수 없었다. 하지만 이번 연구에서 계속해서 XMU-MP-1의 처리 농도가 5  $\mu$ M로 다른 약물들에 비해 높은 농도임을 알 수 있다. 후보 선별에 있어서 낮은  $K_d$ 값을 기준으로 선별하였는데 처리한 농도와 연관성을 찾기 위해 좀 더 높은  $K_d$ 값을 기준으로 kinase를 조사하였을 때 유의미한 결과를 얻어낼 가능성이 있음을 제시하고 있다.

추가로, 이전 연구에서 FOXO1이 TTP의 발현 증가를 조절하는 중요한 요소로 작용할 수 있음을 증명하였다[35]. 그래서 XMU-MP-1과 AS1842856을 함께 처리하였을 때, 시너지 효과로 TTP 발현이 현저히 증가함을 확인하였다. 이전에 했던 연구에서는 Dexamethasone 처리 시 FOXO1를 억제하게 되면 TTP의 증가가 억제되는 것으로 나타났지만, XMU-MP-1을 처리 후 FOXO1을 억제하게 되면 오히려 TTP가 더 증가하게 되는 결과를 보여주었다. XMU-MP-1과 FOXO1 억제로 인한 TTP 증가에 대한 정확한 기작은 밝혀지지 않았으나, 확인한 실험(Fig.8A~C)을 기반으로 TTP를 충분히 유도할 수 있는 저분자 화합물에 대한 가능성과 나아가 TNBC 세포에서 화합물치료제로서의 역할을 할 수 있을 가능성을 제시한다.

## VII. 참고 문헌

1. Brooks, S.A.; Blackshear, P.J. Tristetraprolin (TTP): Interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, 1829, 666–679.
2. Carballo, E.; Lai, W.S.; Blackshear, P.J. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraprolin. *Science*, 1998, 281, 1001–1005.
3. Shaw, G.; Kamen, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 1986, 46, 659–667.
4. Lai, W.S.; Stumpo, D.J.; Blackshear, P.J. Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J. Biol. Chem*, 1990, 265, 16556–16563.
5. Brennan, S.E.; Kuwano, Y.; Alkharouf, N.; Blackshear, P.J.; Gorospe, M.; Wilson, G.M. The mRNA-destabilizing protein tristetraprolin is suppressed in many cancers, altering tumorigenic phenotypes and patient prognosis. *Cancer Res*, 2009, 69, 5168–5176.
6. Marderosian, M.; Sharma, A.; Funk, A.P.; Vartanian, R.; Masri, J.; Jo, O.D.; Gera, J.F. Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling. *Oncogene*, 2006, 25, 6277–6290.
7. Young, L.E.; Sanduja, S.; Bemis-Standoli, K.; Pena, E.A.; Price, R.L.; Dixon, D.A. The mRNA binding proteins HuR and tristetraprolin regulate cyclooxygenase 2 expression during colon carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2009, 136, 1669–1679.
8. Lee, H.H.; Son, Y.J.; Lee, W.H.; Park, Y.W.; Chae, S.W.; Cho, W.J.; Kim, Y.M.; Choi, H.J.; Choi, D.H.; Jung, S.W.; et al. Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int. J. Cancer*, 2010, 126, 1817–1827.
9. Lee, J.Y.; Kim, H.J.; Yoon, N.A.; Lee, W.H.; Min, Y.J.; Ko, B.K.; Lee, B.J.; Lee, A.; Cha, H.J.; Cho, W.J.; et al. Tumor suppressor p53 plays a key role in induction of both tristetraprolin and let-7 in human cancer cells. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41, 5614–5625.
10. Rounbehler, R.J.; Fallahi, M.; Yang, C.; Steeves, M.A.; Li, W.; Doherty, J.R.; Schaub, F.X.; Sanduja, S.; Dixon, D.A.; Blackshear, P.J.; et al. Tristetraprolin impairs myc-induced lymphoma and abolishes the malignant state. *Cell*, 2012, 150, 563–574.
11. Soussi, T.; Beroud, C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer*, 2001, 1, 233–240.
12. Cole, M.D. The myc oncogene: Its role in transformation and differentiation. *Ann. Rev. Genet*, 1986, 20, 361–384.
13. D Pan, Hippo signaling in organ size control. 2007, 21, 886–897.
14. L Zhang, T Yue, J Jiang, Hippo signaling pathway and organ size control.

- 2009,3,68–73.
15. J Dong, et al., Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. 2007,130,1120–1133.
  16. B Zhao, et al., Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. 2007,21,2747–2761.
  17. FD Camargo, et al., YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. 2007,17,2054–2060.
  18. L Zender, et al., Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. 2006,125,1253–1267.
  19. AA Steinhardt, et al., Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. 2008,39,1582–1589.
  20. Yuan, F., Xie, Q., Wu, J., Bai, Y., Mao, B., Dong, Y., Bi, W., Ji, G., Tao, W., Wang, Y., Yuan, Z. MST1 promotes apoptosis through regulating Sirt1-dependent p53 deacetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286, 6940-6945.
  21. Grusche, F. A., Richardson, H. E. and Harvey, K. F. Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Current Biology*, 2010, 20, R574-R582.
  22. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. and Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie. *The Drosophila Homolog of YAP Cell*, 2005, 122, 421-434.
  23. Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R. and Jiang, J. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes & Development*, 2003, 17, 2514-2519.
  24. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71, 209–49.
  25. A. Goldhirsch et al., Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. 2011, 22, 1736–1747.
  26. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discov*, 2019, 9, 176–98.
  27. Chacón, R.D., Costanzo, M.V. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*, 2010, 12, S3.
  28. Swati Sucharita Mohanty, Role of hormone receptors and HER2 as prospective molecular markers for breast cancer: An update. *Genes & Diseases*, 2020, 648-658.
  29. Berrada N, Delaloge S, André F. Treatment of triple-negative metastatic breast cancer: toward individualized targeted treatments or chemosensitization? *Ann Oncol*, 2010, 21, Suppl 7:vii30-vii35.
  30. Agnes E. Coutinho, Karen E. Chapman. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2011, 335, 2-13

31. Yuantao Wu, Rui Xia. Dexamethasone inhibits the proliferation of tumor cells. *Cancer Manag Res.*, 2019, 11: 1141-1154
32. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai Z, and Guan K. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 2007, 21:2747-61.
33. Zhang, X., Zhao, H., Li, Y. et al. The role of YAP/TAZ activity in cancer metabolic reprogramming. *Mol Cancer*, 2018, 17, 134.
34. Fuqin Fan, Zhixiang He, Lu-Lu Kong, et al. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Science Translational Medicine*, 2016, 8, 352ra108.
35. Jeon Do Yong, So Yeon Jeong, Ju Won Lee, et al. FOXO1 Is a key mediator of Glucocorticoid-induced Expression of Tristetraprolin in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(22), 13673.
36. Gruber, A.R.; Fallmann, J.; Kratochvill, F.; Kovarik, P.; Hofacker, I.L. Aresite: A database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39, D66–D69.
37. Khabar, K.S.A. Hallmarks of cancer and AU-rich elements. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 2017, 8, 1368.
38. Bisogno, L.S.; Keene, J.D. RNA regulons in cancer and inflammation. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 2018, 48, 97–103.
39. Lykke-Andersen, J.; Wagner, E. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the protein s TTP and BRF-1. *Genes Dev*, 2005, 19, 351–361.
40. Jing, Q.; Huang, S.; Guth, S.; Zarubin, T.; Motoyama, A.; Chen, J.; Padova, F.D.; Lin, S.; Gram, H.; Han, J. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, 2005, 120, 623–634.
41. Li, H., Wu, BK., Kanchwala, M. et al. YAP/TAZ drives cell proliferation and tumour growth via a polyamine–eIF5A hypusination–LSD1 axis. *Nat Cell Biol*, 2022, 24, 373–383.
42. T. Sun, J.T. Chi. Regulation of ferroptosis in cancer cells by YAP/TAZ and Hippo pathways: The therapeutic implications. *Genes and Dis.*, 2020, 8, 241-249

## VII. Abstract

Tristetraprolin(TTP), a protein responsible for mRNA degradation, functions as a tumor suppressor by inhibiting the expression of oncogenes. TTP expression is suppressed in many cancer cells, and when TTP expression is induced, the growth of cancer cells can be suppressed through suppression of oncogene expression. Breast cancer cells were transformed with a luciferase reporter with a TTP promoter, and 1,019 natural compounds were screened to find substances that induce TTP expression. Betamethasone-21-phosphate(Betamethasone-21-P) was confirmed to be the most effective, and Dexamethasone, which has a similar structure, also induced TTP expression to a similar extent. Subsequent experiments focused on Dexamethasone due to its effectiveness. To analyze the pathway inducing TTP expression by dexamethasone, RNA was extracted from MDA-MB-231 cells for 3 hours after treatment with dexamethasone and RNA-sequencing was performed. As a result of KEGG pathway analysis of genes increased due to dexamethasone treatment, it was confirmed that the expression of genes related to the FOXO pathway and Hippo pathway increased. Further analysis involving FOXO and Hippo pathway inhibitors demonstrated that a FOXO inhibitor inhibited Dexamethasone-induced TTP expression, while the Hippo pathway inhibitor XMU-MP-1, specifically targeting MST1/2, led to an increase in TTP expression at higher concentrations. However, when treated with XMU-MP-1, which inhibits MST1/2 among Hippo signals, it was confirmed that TTP expression was induced at high concentrations. Silencing MST1/2 and downstream genes(LATS1/2 and YAP) did not significantly impact TTP expression. These results suggested the possibility that XMU-MP-1 regulates TTP expression through a different pathway rather than inducing TTP by suppressing MST1/2 of the Hippo pathway. In a previous study, the interaction between FOXO1 and TTP was studied, and based on this, it was confirmed that TTP expression was significantly increased when XMU-MP-1 and the FOXO inhibitor AS1842856 were treated together. The results of this study showed that XMU-MP-1 induces TTP expression through a pathway other than the Hippo pathway in MDA-MB-231 cells, and was especially observed to increase through a synergistic effect with FOXO1. These results show that the specific pathway stimulated by the two drugs increases TTP, inhibiting the growth of TNBC cells, and suggesting the possibility of drug treatment.