



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

폐암 세포에서 UBA6 및 USE1 단백질을
저해하는 저분자 화합물 발굴

Discovery of small molecule compounds that
inhibit the UBA6 and USE1 protein in lung
cancer cells

울 산 대 학 교 대 학 원

의 과 학 과

김 원 호

폐암 세포에서 UBA6 및 USE1 단백질을
저해하는 저분자 화합물 발굴

지도교수 이창환

이 논문을 이학석사학위 논문으로 제출함

2024년 08월

울산대학교 대학원

의과학과

김원호



김원호의 이학석사 학위논문을 인준함

심사위원 진 준 오 (인)

심사위원 이 창 환 (인)

심사위원 박 성 준 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원
2 0 2 4 년 0 8 월

국문요약

폐암은 전세계적으로 높은 발병률과 사망률을 보이고 있는 질환이며, 치료 타겟을 발굴하기 위한 다양한 연구가 진행 중에 있다. 그 중에서도 USE1 단백질은 폐암 조직에서 발현이 증가해 있으면서, 암의 성장을 촉진하는 역할을 한다는 선행연구 결과가 있다. 본 연구에서는 UBA6-USE1 연쇄작용을 억제하는 기전을 가지는 화합물 개발을 통해 폐암 치료에 적용해보고자 한다. 먼저, 후보군에 해당하는 화합물들의 효소 활성 억제 능력 및 농도를 검증하기 위한 Ubiquitin charging assay를 시행했다. 이 과정에서 선정된 KA20-01003, KA20-01007 화합물이 UBA6-USE1에 의한 유비퀴틴 활성화 및 전달 과정을 저해함을 확인했다. 이 과정에서 KA20-01007은 KA20-01003 보다는 높은 농도에서 UBA6-USE1의 유비퀴틴 활성화 및 전달 억제 효과를 나타내었고, KA20-01007의 경우 KA20-01003에 비해 UBA6에 대한 특이성이 높은 것으로 나타났다. 유비퀴틴 활성화 및 전달 과정을 저해함으로써 폐암 세포에 미치는 영향을 확인하였고, 결과적으로 폐암 세포의 증식, 세포 집락 형성, 이동 및 침습 능력이 억제되는 것을 확인했다. 또한 폐암 세포 이외의 다른 암종의 세포에서도 같은 효과를 확인했다. KA20-01007을 통해 폐암 세포 마우스 이종이식 실험에서 해당 화합물이 생체내에서 암 조직의 성장을 효과적으로 저해할 수 있음을 확인했다. 본 연구에서 폐암의 새로운 치료제로서 해당 화합물이 갖는 가능성을 제시하고자 한다.

Keywords : Ubiquitin-proteasome system; Ubiquitin like modifier activating enzyme 6; UBA6-specific E2 conjugating enzyme; Lung cancer

목차

국문요약	I
목차	II
서론	1
재료 및 실험방법	3
연구결과	6
고찰 및 결론	60
참고문헌	62
영문요약	65

I. 서론

폐암은 5대 암종 중 하나로 폐 조직에서 시작되는 악성 종양이며 흡연과 환경 오염, 유전적 요인 등이 주된 원인으로 주목되는 질환이다[1-3]. 암으로 인한 사망률의 큰 부분을 차지하는 주요 원인으로 알려져 있으며 그중 비소세포 폐암 환자의 비율이 특히 높다. 현재 사용되는 치료 방법으로는 국소부위의 외과적 절제를 통한 치료, 방사선 치료 및 EGFR, ALK 등을 타겟으로 하는 화학요법 등이 이용되고 있다[4-7]. 하지만 이런 다양한 치료법들이 있음에도 불구하고 폐암은 재발 및 전이가 잘 일어나며, 특히 화학요법에 대한 감응성이 감소하는 환자의 비율이 점차 증가하고 있다. 이에 따라 신규 치료 타겟을 발굴하여 표적 저해하는 화합물의 개발 필요성이 대두되고 있다[8-10].

Ubiquitin-proteasome system (UPS)은 진핵 세포에서 단백질 분해의 대부분을 담당하는 중요한 시스템으로 알려져 있다[11]. 이 과정은 E1, E2, E3 효소의 연쇄반응을 통해 유비퀴틴을 기질 단백질에 전달함으로써 이루어진다. 이때 E1은 Adenosine triphosphate (ATP)를 사용하여 유비퀴틴을 활성화시켜 E2로 전달을 유도한다. 유비퀴틴에 관여하는 E1은 2가지가 존재하며 Ubiquitin like modifier activating enzyme 6 (UBA6)와 Ubiquitin like modifier activating enzyme 1 (UBE1)이 있다. UBE1의 경우 상호작용하는 E2가 많은 반면에 UBA6는 훨씬 적은 수의 E2와 상호작용한다. 그 중에서도 UBA6는 UBA6-specific E2 conjugating enzyme 1 (USE1)과 특이적으로 작용하며, USE1은 UBA6에 의해서는 유비퀴틴이 전달되지만 UBE1에 의해서는 전달되지 않는 것을 확인했다[12]. 이러한 UBA6-USE1의 특이적인 반응을 이용하여 치료 타겟으로 이용하고자 하며, USE1은 최근 연구에서 폐암에서 높은 발현양을 보인다고 보고되었다[13-16].

USE1의 발현이 폐암에서 증가함에 따라, 폐암 세포의 증식과 집락 형성이 현저히 늘어났습니다[17]. 트랜스웰 침습 및 상처 치유 분석에서도 세포의 침습성과 이동성이 증가하는 것으로 나타났다. 반면, USE1 발현을 감소시킴으로써 폐암 세포의 증식, 집락 형성, 침습성 및 이동성이 모두 감소하는 현상이 관찰되었다. 이러한 결과는 USE1의 발현 증가가 폐암에서 종양 발생을 촉진하고 예후를 악화시키는 요인임을 시사한다. USE1은 UBA6의 특이적인 E2 효소로서, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달을 억제하면 USE1으로의 유비퀴틴 전달도 차단되어 폐암의 종양 발생을 효과적으로 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

MLN4924는 유비퀴틴 외에 대표적인 유비퀴틴 유사 단백질인 NEDD8을 표적하여 저해하는 소분자 화합물이다[18]. NEDD8 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated 8)은 단백질의 번역 후 수정에 중요한 역할을 하는 작은 유비퀴틴 유사 단백질이다. 유비퀴틴과 비슷한 방식으로 특정 단백질에 결합하여 기능을 조절한다. 이 과정을 NEDDylation이라고 한다. MLN4924는 NEDD8 활성화 효소를 억제하는 작용을 가지고 있다. NEDD8 활성화 효소를 억제하여 세포 내 NEDD8 연결의 형성과 활성화를 방해한다. NEDD8-activating enzyme E1

catalytic subunit (NAE1)과 Ubiquitin like modifier activating enzyme 3 (UBA3)가 이량체를 이루어 NEDD8을 활성화시키며, Adenosine triphosphate (ATP)를 사용하여 연결되어 이후 NEDD8의 E2라고 불리는 UBE2M, UBE2F 등에 연결되어 이후 Cullin family 등과 같은 단백질에 전달된다. MLN4924는 NAE1/UBA3가 ATP를 사용하여 NEDD8을 활성화하고 전달하는 것을 억제한다. MLN4924는 AMP를 모방하는 구조로서 아데닌 대신 N6에 데아자퓨린을 가지고 리보스당 대신 탄소환, 인산염 대신 황산염을 가져 NAE의 뉴클레오타이드 결합 부위에 결합한다[19]. 결과적으로 NAE에 특이적이게 결합하며 다른 E1들인 UAE, SAE, UBA6, UBE1, ATG7에 비해 선택적임을 확인했다[20]. MLN4924를 통해 NEDDylation을 억제함으로써 위암 세포에서 세포의 성장 및 이동성을 억제할 수 있다[21]. 또한 유방암에서도 같은 효과가 보고되었으며, 이는 일반적인 약물에 대한 저항성을 가지는 세포에서도 유효했다[22, 23].

본 연구에서는 화합물인 KA20-01003과 KA20-01007을 통해서 실험을 진행했다. UBA6와 UBE1의 유비퀴틴 활성화 및 전달을 억제를 확인하기 위해 Ubiquitin charging assay를 통해 UBA6와 UBE1으로의 유비퀴틴이 활성화 및 전달되는지 확인하고자 하였으며, E1을 통해 유비퀴틴을 전달 받는 E2에 유비퀴틴의 전달이 억제되는지도 평가하였다. 폐암 세포 및 다른 암종에서도 유비퀴틴 전달 및 활성화가 억제되는지와 세포의 증식, 집락 형성, 이동 및 침습 능력이 감소하는지 평가하는 실험을 진행했다. 또한 KA20-01007 화합물의 경우 KA20-01003 보다 UBA6에 대한 선택성 및 특이성이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이를 마우스 이종이식 실험을 통해 부작용 및 치료효과를 확인하고자 했다.

II. 재료 및 실험방법

세포 배양

이 실험에 사용한 세포주 (A549, NCI-H1299, NCI-H1975, AGS, HCT116)는 ATCC를 통해 입수하였으며, 다른 세포주인 (Hs578T, PC3)은 한국세포주은행을 통해 입수하여 Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM)(Corning), Roswell Park Memorial Institute (RPMI)(Corning)에서 성장시켰다. DMEM, RPMI는 10% Fetal Bovine Serum (FBS)(Corning)와 1% Penicillin-Strptomycin (P/S)(Corning)가 첨가되었다. 세포들은 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 유지됐다.

시약 처리

화합물을 처리하기 위해 각 세포들을 6 well 세포 배양 플레이트 (SPL)에 5×10^5 cell/well의 밀도로 배양하고 24시간 후 0.1-10 μ M 농도로 16시간 처리했다.

Ubiquitin charging assay

세포를 MES-용해 버퍼 (50 mM MES, 150 mM NaCl, 0.2% Nonidet P40, protease inhibitors, pH 4.5)를 이용해 4°C에서 15분간 용해 시켰다. 용해물을 수집하여 원심분리를 이용해 4°C에서 15분간 원심분리 하였다. 이후 원심분리된 상층액을 4×LDS sample buffer (Invitrogen)과 함께 혼합하여 NuPAGE 4~12% Bis-Tris, 1.0 mm, 12 well (Invitrogen)에 단백질을 로딩하여 전기영동을 진행했다.

세포 용해 및 SDS-PAGE

세포를 1% SDS 용해 버퍼 (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS)를 이용하여 녹인 후 23게이지 바늘을 사용해 피스톤질을 20회 반복해 균질화 시켰다. 용해물을 수집하여 5x SDS sample buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 10% SDS, Glycerol 50%, Bromophenol blue 0.05%, β -mercaptoethanol 5%)와 함께 혼합하여 SDS-PAGE 8, 12%, 1.5 mm, 12 well에 단백질을 로딩하여 전기영동을 진행했다.

웨스턴 블롯

전기영동이 끝난 NuPAGE gel (Invitrogen), SDS gel을 트랜스퍼를 진행하여 PVDF membrane (Merck) 0.45 μ m를 이용해 단백질을 옮겼다. 이후 5% Skim milk (LPS)를 이용하여 1시간 동안 blocking을 진행하였고, 1차 항체를 4°C에서 16시간 처리한 후 Phosphate-buffered saline (PBS)(Intron)에 Tween 20 0.5% (LPS)를 첨가하여 10분씩 3번 세정 하였다. 다음으로 Horseradish peroxidase (HRP) 결합 2차 항체를 25°C에서 1시간 처리한 후 PBST를 이용하여 10분씩 3번 세정 한 후 Enhanced chemiluminescence (ECL) 용액 (Biorad)을 이용해 발광하는 표적 단백질을 X-ray 필름에 감광하여 검출했다. 사용한 1차 항체는 α -UBA6[12], α -USE1[24],

α -UBE1 (Bethyl), α -UBE2A (Bethyl), α -p53 (Cell Signaling Technology), α -p21 (Cell Signaling Technology), α -PARP (Cell Signaling Technology), α -Caspase 3 (Cell Signaling Technology), α -Actin (Santacruz)를 이용하였고, 2차 항체는 Goat anti-rabbit IgG, polyclonal 항체 (HRP conjugate) (Enzo)를 사용했다.

세포 증식률 측정

세포 증식률을 측정하기 위해 세포를 96 well 세포 배양 플레이트 (SPL)에 1×10^3 cell/well의 밀도로 배양하고 0-3일에 분석하였다. 각 분석일에 Cell Titer-Glo 시약 (Promega)을 첨가하고 15분이 지난 후에 GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega)를 이용해 측정했다.

상처 치유 분석

상처 치유 분석을 위해 세포를 6 well 세포 배양 플레이트에 7×10^5 cell/well의 밀도로 48시간 배양했다. 이후 세포를 200 μ L 파이펫 팁으로 긁고 PBS로 두 번 세정한 후 화합물이 든 배지를 첨가하여 0-2일에 현미경으로 분석하였다.

세포 집락 형성 분석

세포 집락 형성 분석을 위해 세포를 6 well 세포 배양 플레이트에 1×10^3 cell/well의 밀도로 1-2주 동안 배양하였다. 이후 PBS로 세정하고 4% Paraformaldehyde (Biosolution)를 사용하여 30분 동안 고정하였다. PBS로 두 번 세정한 후 0.5% Crystal violet (Biosesang)으로 20분 동안 염색한 후 수돗물을 이용해 세정하였다.

트랜스 웰 침습 분석

트랜스 웰 침습 분석을 위해 SPLInsert Hanging 24 well (SPL)을 사용했다. 트랜스 웰 삽입물의 상부 챔버에 Matrigel matrix (Corning) 원액과 PBS를 이용해 1:10으로 희석하여 100 μ L로 분주하여 37°C에서 30분 인큐베이션 했다. 이후 세포를 24 well 세포 배양 플레이트에 놓여진 8 μ m 트랜스 웰 삽입물의 상부 챔버에 3×10^5 cell/well 밀도로 배양하였다. 하부 챔버에는 10% FBS 및 1% P/S가 첨가된 DMEM, RPMI로 채우고 36시간 동안 배양하였다. 트랜스 웰 인서트에 침투한 세포를 PBS로 세정하고 4% Paraformaldehyde를 사용하여 30분 동안 고정하였다. PBS로 세정하고 0.5% Crystal violet으로 20분 동안 염색한 후 수돗물을 이용해 세정하였다. 이후 트랜스 웰 상부 챔버에 남아있는 세포를 면봉으로 제거하고 현미경으로 분석하였다.

마우스 이종이식 모델

마우스 종양 이식모델은 오리엔트바이오(주)에서 구매하여 아산생명과학 연구원 동물 시설에서 사육한 수컷 BALB/c 면역 결핍 마우스 (누드마우스) 5주령을 이용하여 실험 그룹으로 무작위 분할하였다. 세포 주입은 27게이지 바늘을 사용하여 1×10^7 개의 A549 세포를 면역 결핍 마우스의 우측 옆구리 피하에 주사하였고 7일 뒤부터 종양의

성장을 추적하기 위해 주기적으로 종양의 크기를 측정하였다. 각 그룹의 마우스 종양 크기를 결정하기 위해 최대 종단 직경 (길이)와 최대 횡단 직경 (너비)를 버니어 캘리퍼스를 이용해 측정하였다. 종양의 크기는 타원체 공식으로 계산하였다: $V=(L \times W^2)/2$, V 는 종양의 부피 (mm^3), L 은 종양의 길이 (mm), W 는 종양의 너비 (mm)를 나타낸다.

체내 치료 효과

이종이식 종양 크기가 100 mm^3 에 도달하면 면역 결핍 마우스를 무작위로 3개의 그룹으로 나누었다 (그룹당 6마리). 주사는 2~3일 간격으로 시행하였고, KA20-01007을 두가지 농도로 사용하였다 (12.5 mg/kg , 50 mg/kg). 그와 동시에 암 조직의 부피와 마우스 개체의 체중을 측정하여 치료효과 및 부작용 여부를 확인하였다. 또한 실험 종료일에 마우스를 희생 시키고 피하 암 조직을 적출 하여 사진을 촬영하였다.

III. 연구 결과

1. 폐암 세포에서의 KA20-01003의 유비퀴틴 억제 효과

화합물인 KA20-01003의 유비퀴틴 억제 효과를 폐암 세포주 A549, H1299, H1975를 사용하여 검증하였다. KA20-01003을 0.1-10 μM 농도로 처리한 후, 유비퀴틴 활성화 및 전달을 측정하기 위해 Ubiquitin charging assay를 수행하였다. 이 실험에서 주요 타겟은 UBE1, UBA6였다. UBE1은 UBE2A와 특이적으로 상호작용하는 것으로 알려져 있으며, UBE2A는 UBE1에 의해 유비퀴틴을 전달 받는다. UBA6의 경우, USE1이라는 E2와 특이적으로 상호작용한다. 실험 결과, KA20-01003을 처리한 세포에서는 UBE1과 UBA6에 의한 유비퀴틴의 활성화 및 E2로의 전달이 억제되었음을 확인할 수 있었다. A549에서는 UBE1 0.5 μM , UBE2A 0.7 μM , UBA6, USE1 0.1 μM 에서 억제 효과를 나타냈고 (그림 1), p53-null type인 H1299에서는 UBE1 0.1 μM , UBE2A, UBA6, USE1 0.1 μM 에서 나타났다 (그림 2). EGFR에 돌연변이를 가지는 H1975에서는 UBE1 0.5 μM , UBE2A 3 μM , UBA6, USE1 0.1 μM 에서 나타났다 (그림 3). 결과적으로, KA20-01003은 UBE1과 UBA6 모두에 대해 유비퀴틴 전달을 억제하는 비특이성 효과를 보였다. 이 결과는 KA20-01003이 폐암 세포에서 UBE1 및 UBA6의 유비퀴틴 활성화 및 전달을 효과적으로 억제하지만, E1 효소에 대한 비특이적인 억제 효과를 가짐을 보여준다.

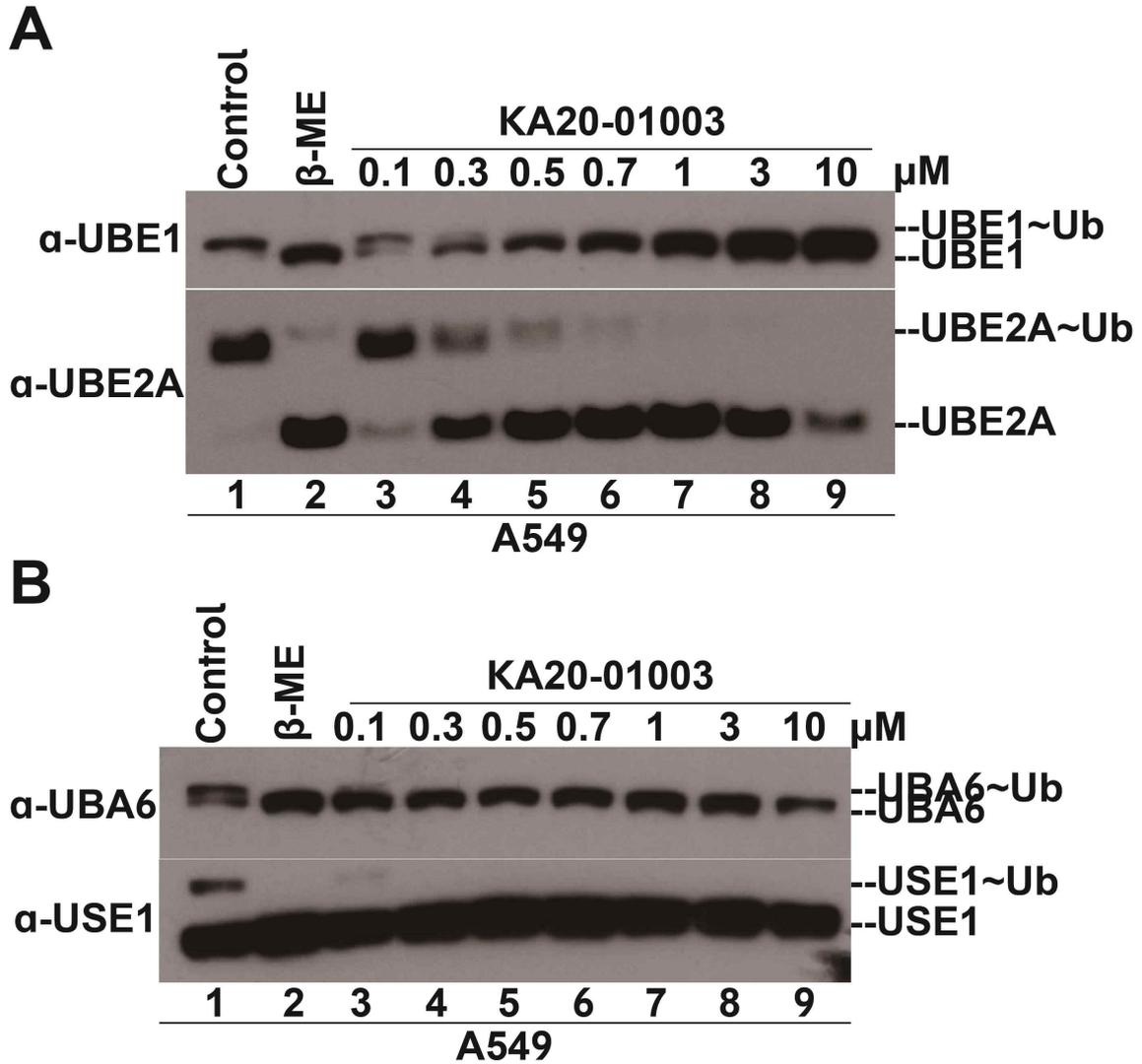


그림 1. A549 세포에서 KA20-01003의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 A549 세포에서 KA20-01003을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 $0.5 \mu\text{M}$, UBE2A는 $0.7 \mu\text{M}$ 에서 나타났다. (B) UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 $0.1 \mu\text{M}$, USE1은 $0.1 \mu\text{M}$ 에서 나타났다.

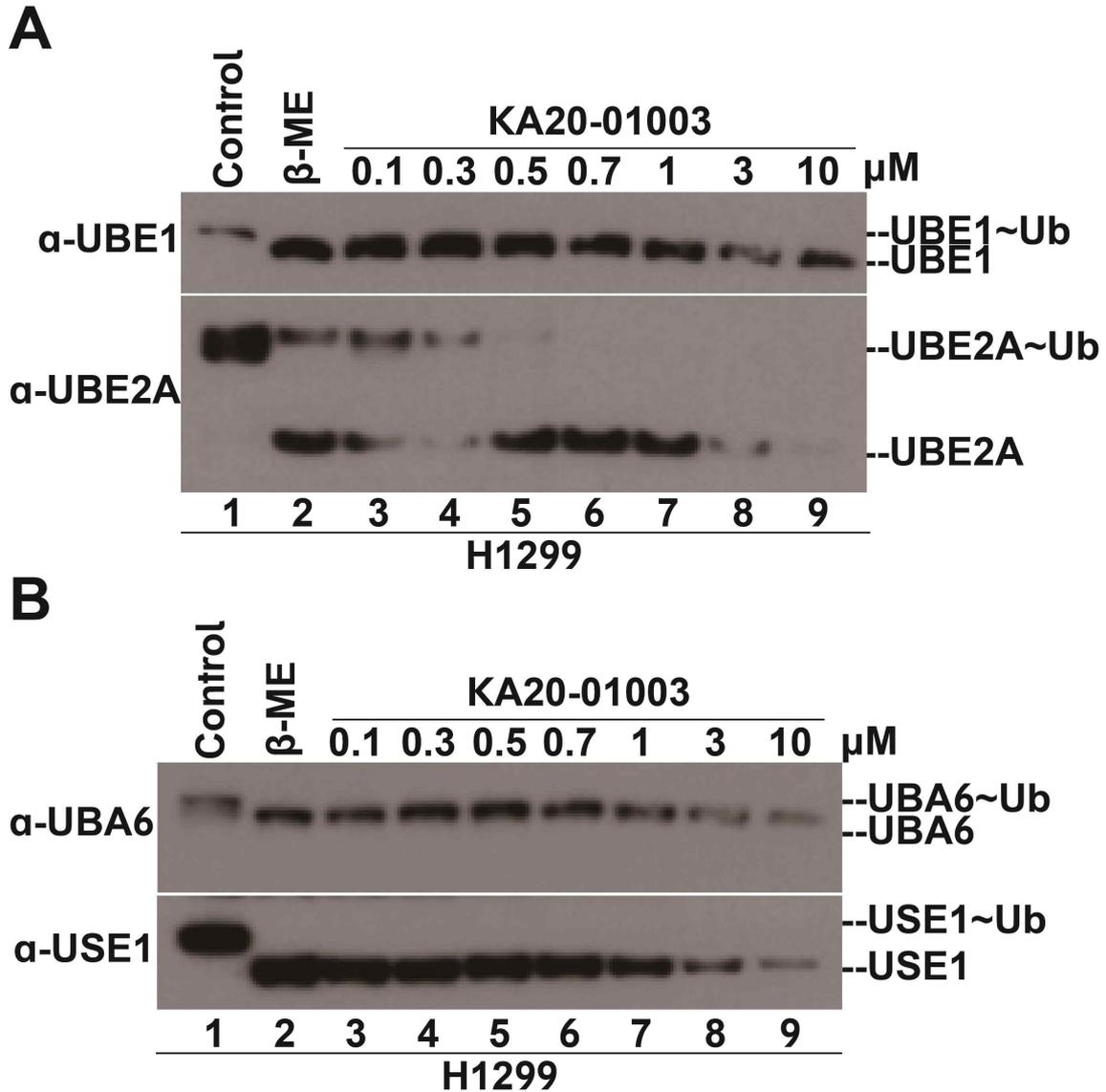


그림 2. H1299 세포에서 KA20-01003의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 H1299 세포에서 KA20-01003을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.1 μ M, UBE2A 0.5 μ M에서 나타났다. (B) UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.1 μ M, USE1은 0.1 μ M에서 나타났다.

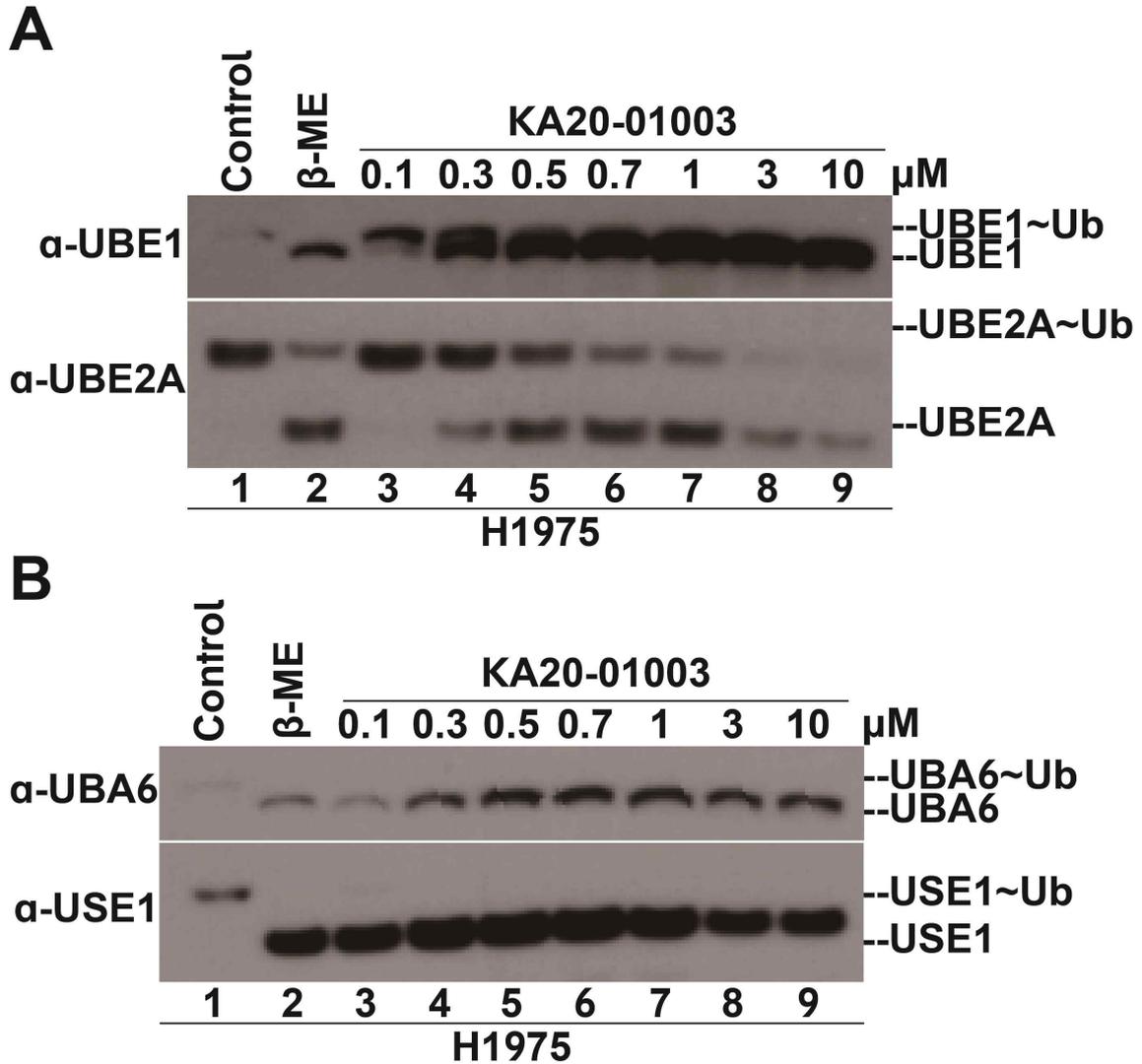


그림 3. H1975 세포에서 KA20-01003의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 H1975 세포에서 KA20-01003을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.5 μ M, UBE2A는 3 μ M에서 나타났다. (B) UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.1 μ M, USE1은 0.1 μ M에서 나타났다.

2. 폐암 세포에서의 KA20-01007의 유비퀴틴 억제 효과

다음으로 KA20-01007 화합물의 유비퀴틴 억제 효과를 평가하기 위해 폐암 세포주 A549, H1299, H1975에 대한 실험을 수행하였다. KA20-01007을 0.1-10 μM 의 농도로 세포에 처리하였으며, Ubiquitin charging assay를 통해 UBE1 및 UBA6의 유비퀴틴 활성화 및 E2 전달체와의 상호작용을 조사하였다. 실험 결과, KA20-01007은 특히 UBA6와의 상호작용을 효과적으로 억제하며 UBE1보다는 UBA6에 대한 특이성을 더 크게 나타냈다. A549에서는 UBE1, UBE2A에서는 나타나지 않았다. UBA6, USE1 1 μM 에서 억제 효과를 나타냈다 (그림 4). p53-null type인 H1299에서는 UBE1, UBE2A에서는 나타나지 않았고 UBA6, USE1 1 μM 에서 나타냈다 (그림 5). EGFR에 돌연변이를 가지는 H1975에서는 UBE1, UBE2A에서는 나타나지 않았으며, UBA6, USE1 1 μM 에서 나타냈다 (그림 6). 결과적으로 KA20-01007을 사용했을 때 UBE1 보다 UBA6에 더 높은 특이성을 나타냄을 확인했다. 이 결과는 KA20-01007이 폐암 세포에서 UBA6에 대한 특이성을 통한 유비퀴틴 활성화 및 전달 경로를 표적으로 하여 유비퀴틴화 과정을 조절 할 수 있는 잠재력을 가지고 있음을 보여준다.

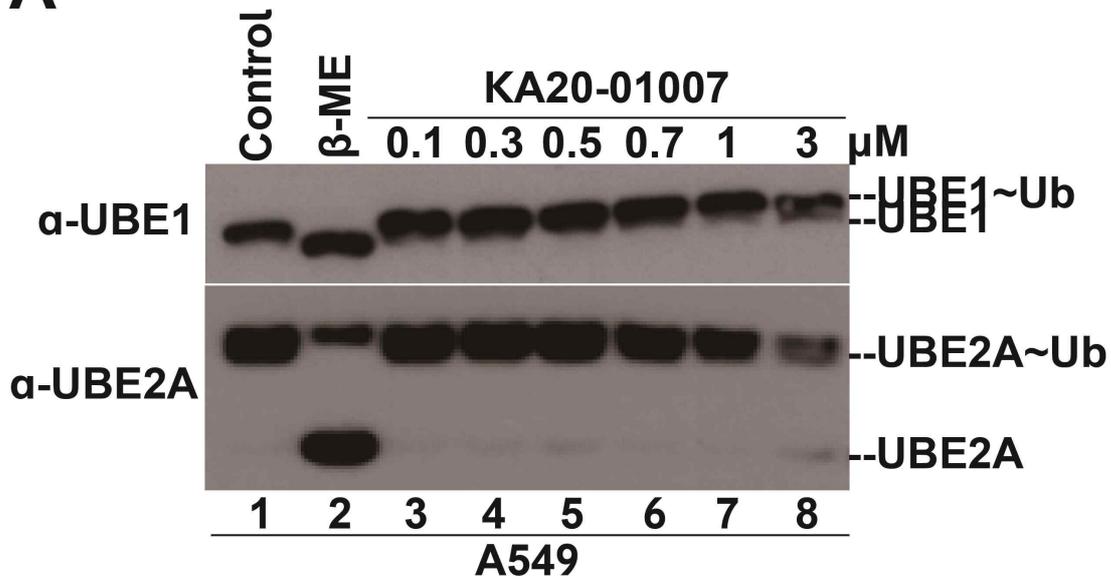
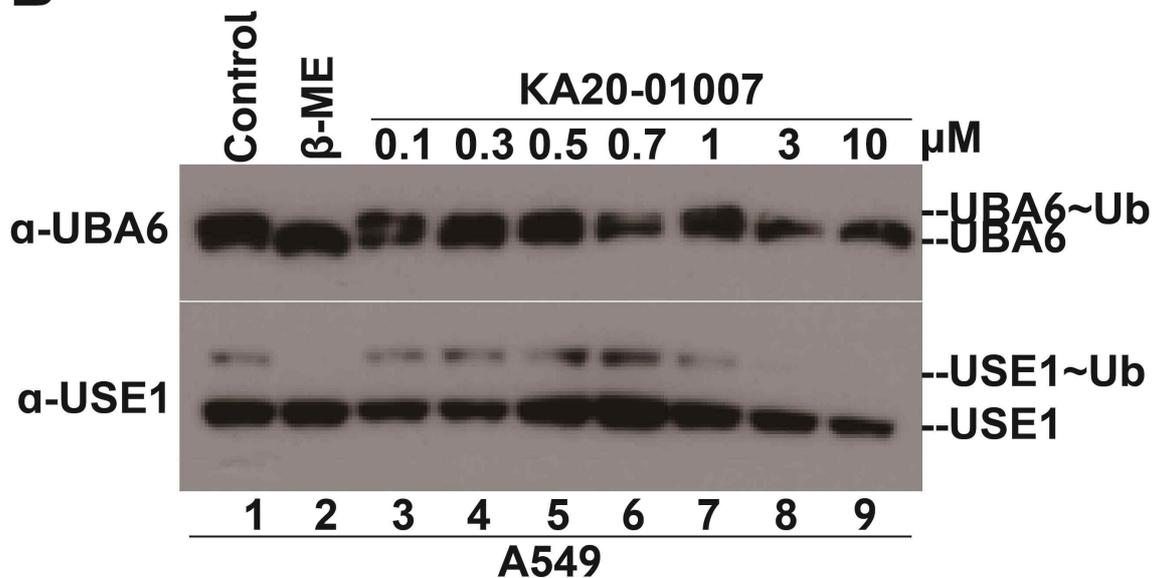
A**B**

그림 4. A549 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 A549 세포에서 KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1, UBE2A 모두 나타나지 않았다. (B) UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 1 μ M, USE1도 1 μ M에서 나타났다.

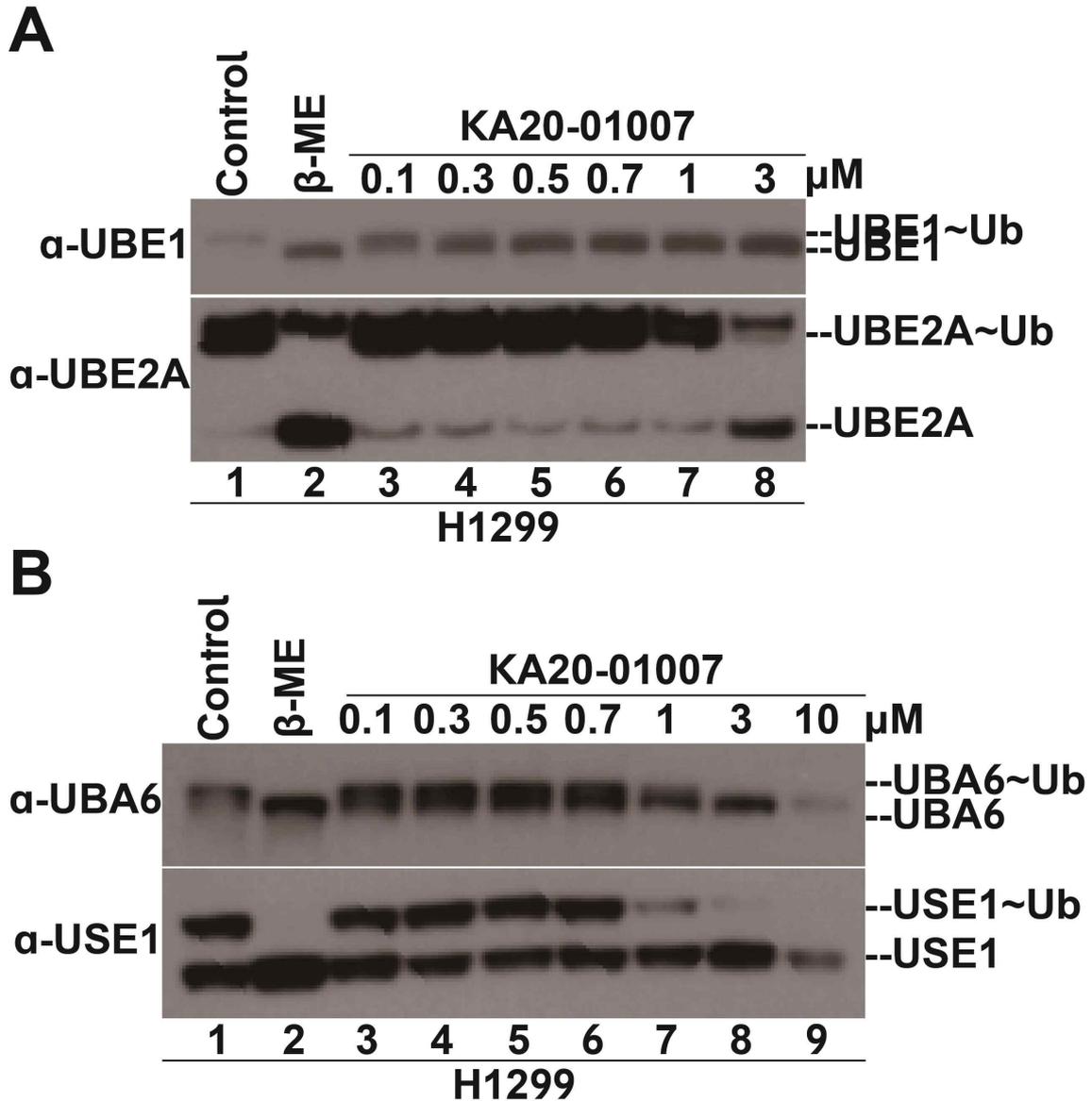


그림 5. H1299 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 H1299 세포에서 KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 나타나지 않았으며, UBE2A는 3 μ M에서 나타났다. (B) UBA6, USE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 1 μ M에서 나타났다.

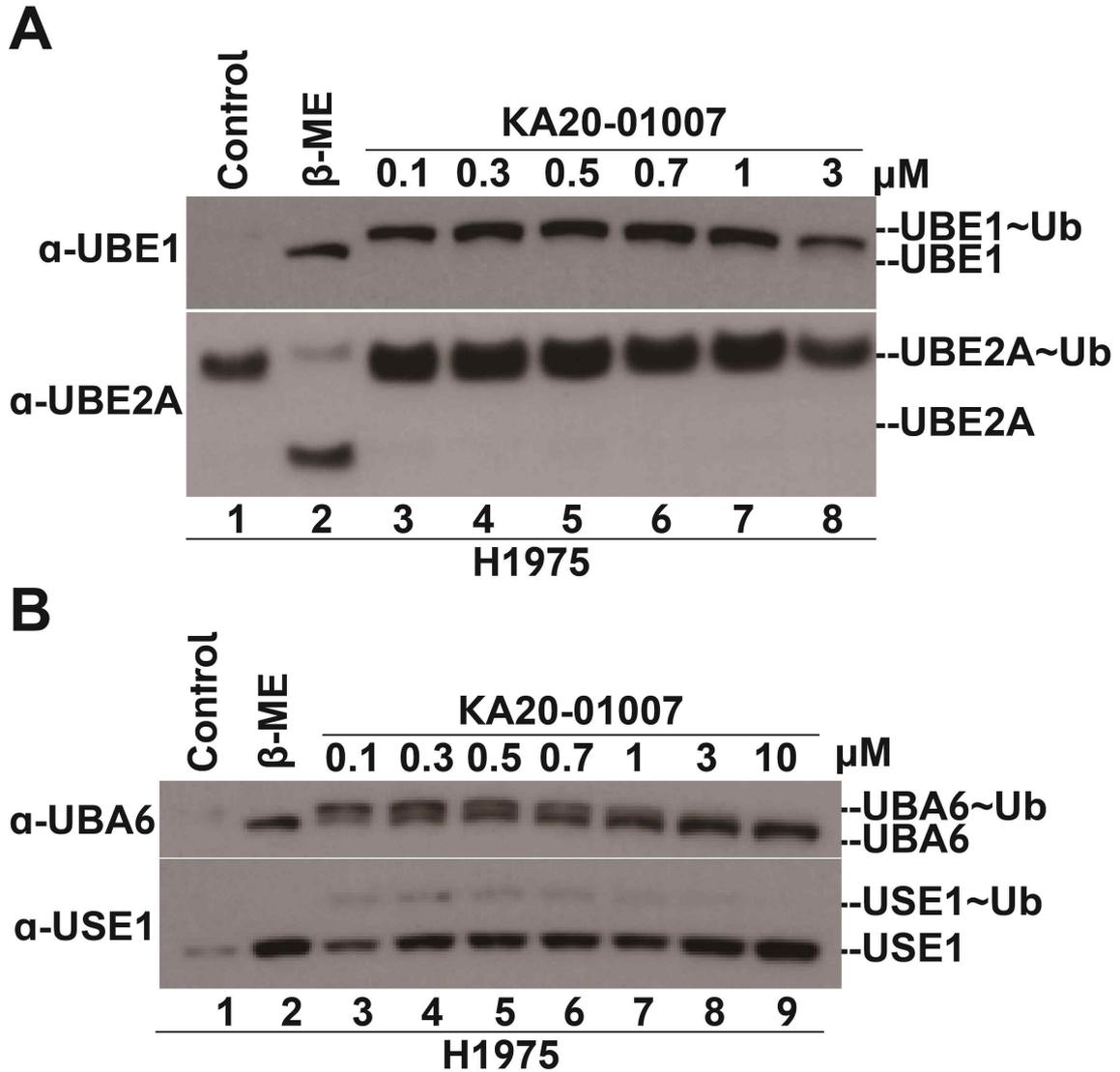


그림 6. H1975 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 폐암 세포인 H1975 세포에서 KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1, UBE2A에서는 효과가 나타나지 않았다. (B) UBA6, USE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 1 μ M에서 나타났다.

3. 폐암 세포에서의 KA20-01003가 세포 성장, 집락 형성, 이동성 및 침습성에 미치는 영향

연구결과 1을 통해 KA20-01003의 유비퀴틴 억제 효과를 각 농도를 통해 폐암 세포 주에서 확인하였다. 결과적으로 UBE1과 UBA6를 통한 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달이 효과적으로 억제되었다는 것을 확인할 수 있었다. 이 억제 효과는 세포의 생리적 특성에도 영향을 미쳤다. 세포 증식은 Cell titer Glo를 사용하여 측정되었고, KA20-01003 처리군에서 대조군에 비해 세포 증식이 현저히 감소하였다. 또한 세포 집락 형성 실험에서도 집락의 수와 크기가 줄어든 것이 관찰되었다 (그림 7-9). 상처 치유 분석과 트랜스 웰 침습 분석을 통해 세포의 이동성 및 침습성을 확인하였다 (그림 10-12). 상처 치유 분석은 세포 이동성을 평가하는 실험 방법으로, 폐암 세포 주의 이동성을 확인하기 위해 실시했다. 200 μ L 파이펫 팁을 사용해 일직선의 스크래치를 가한 후 세포가 이동해 상처를 치유하는 효과를 확인했다. KA20-01003을 처리한 그룹은 대조군에 비해 상처를 치유하기 위한 세포의 이동성이 감소하는 것을 관찰했다. 트랜스 웰 침습 분석은 matrigel matrix를 이용해 폐암 세포의 침입 능력을 평가했다. 이는 암세포가 기저막을 통과하여 주변 조직으로 침투하는 능력을 실험하는 것으로 침습성을 나타내며 암의 전이와 직접적으로 관련되어 있다. Matrigel matrix는 단백질 기질을 모사하기 위해 사용되었으며, 이를 뚫고 트랜스 웰 하부에 이동한 세포를 확인했다. KA20-01003을 처리한 그룹은 대조군에 비해 침습한 세포의 수가 적은 것을 확인할 수 있으며, 세포의 침습성이 떨어지는 것을 확인했다. 결과적으로 KA20-01003을 사용했을 때 세포의 성장, 집락 형성, 이동성 및 침습성이 감소함을 관찰할 수 있다.

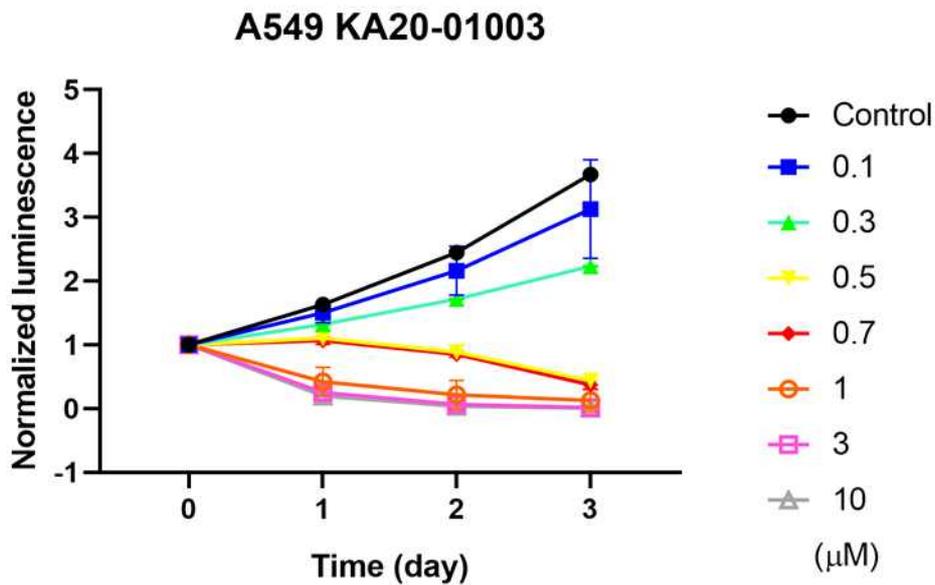
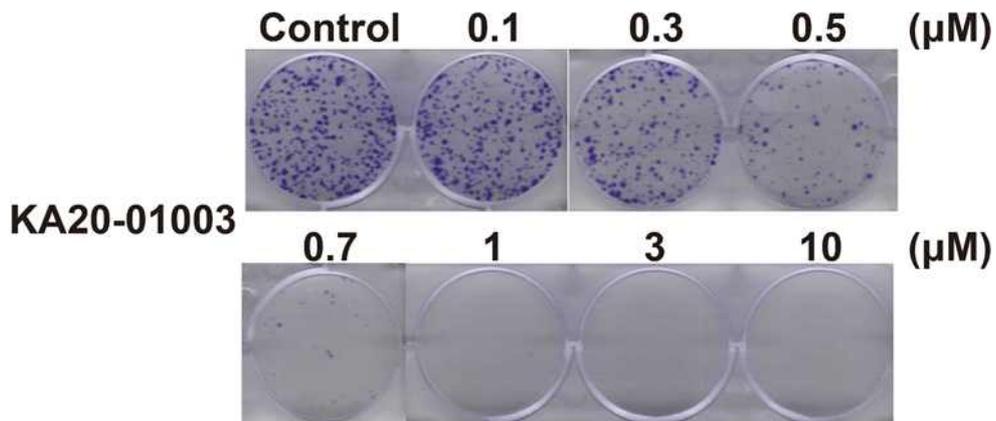
A**B**

그림 7. KA20-01003가 폐암 세포 A549의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 A549에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 A549에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

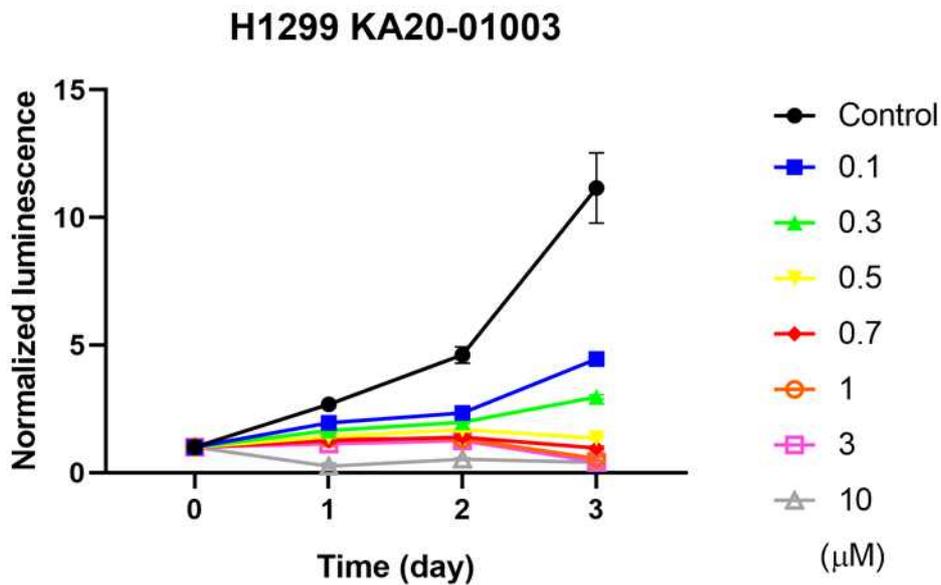
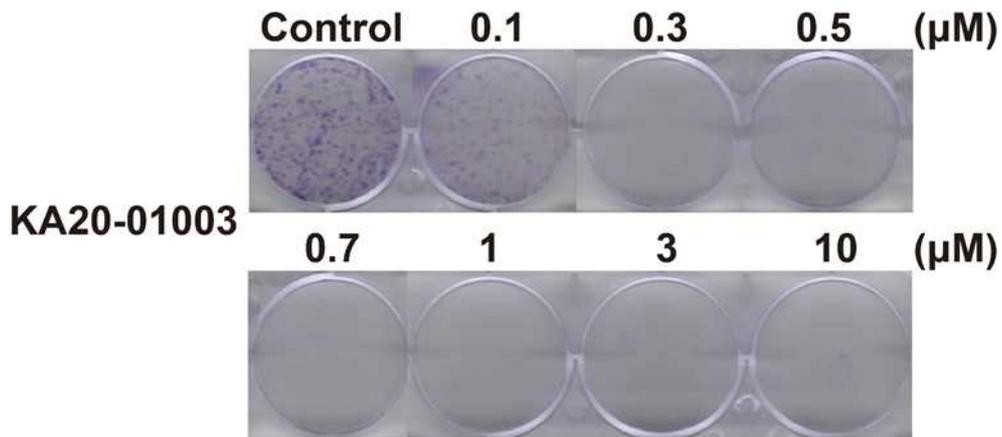
A**B**

그림 8. KA20-01003가 폐암 세포 H1299의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 H1299에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 H1299에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

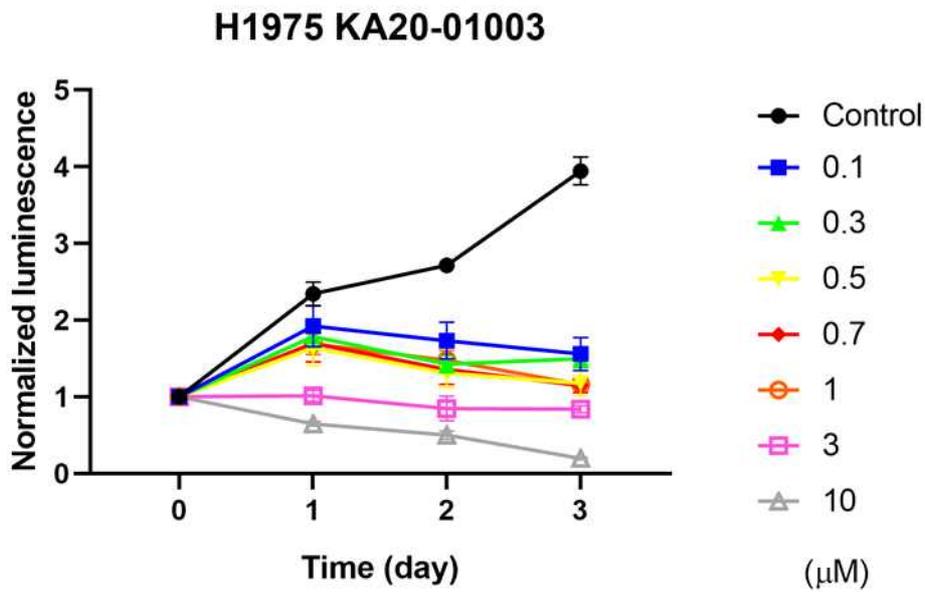
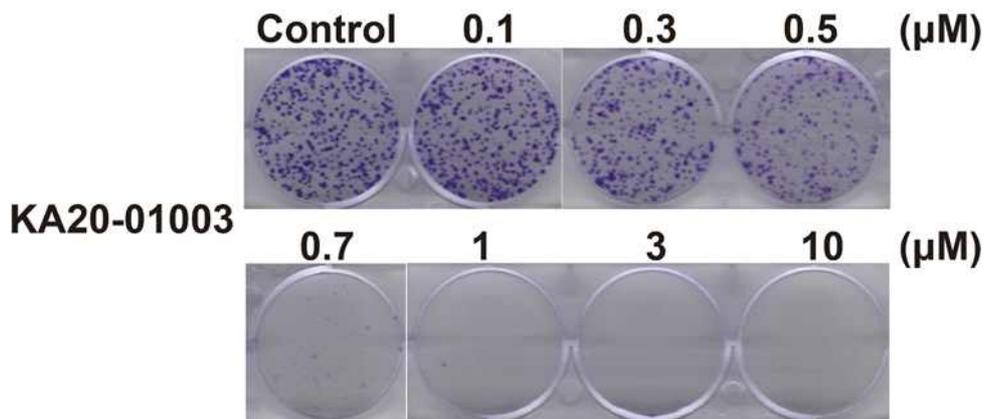
A**B**

그림 9. KA20-01003가 폐암 세포 H1975의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 H1975에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 H1975에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

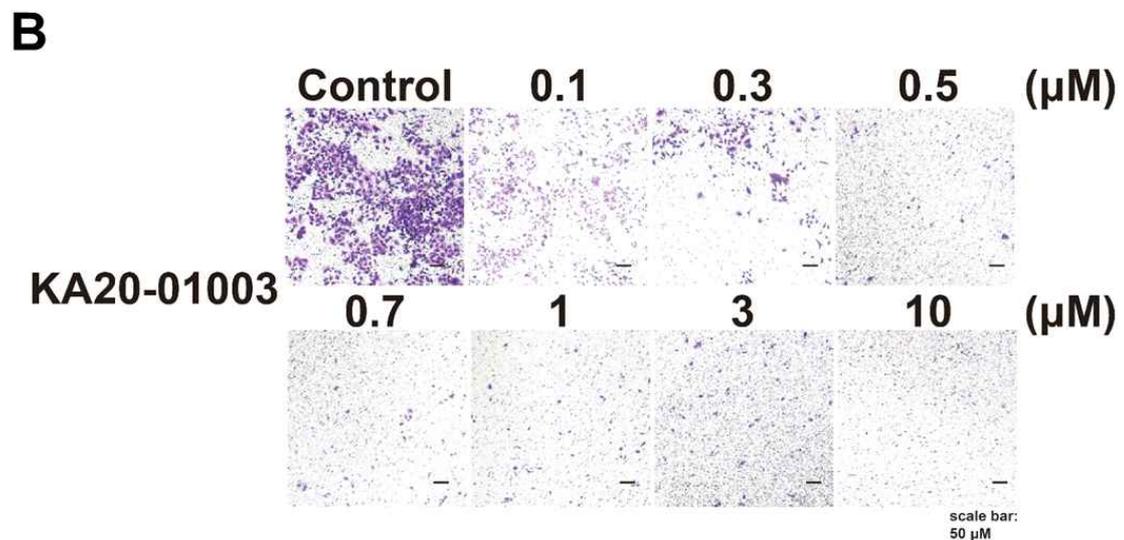
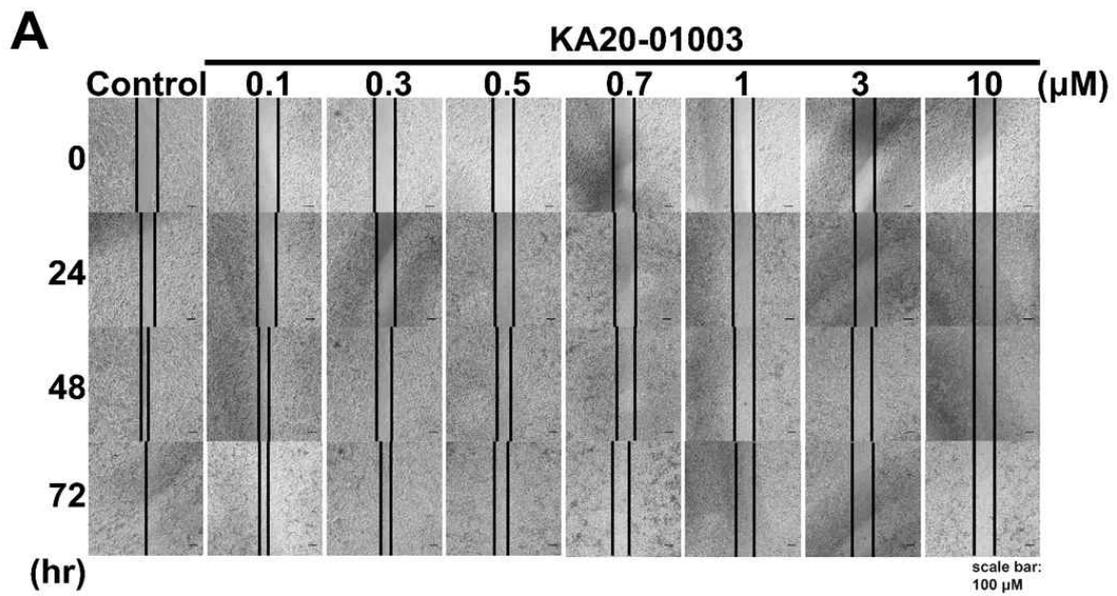


그림 10. KA20-01003가 폐암 세포 A549의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상 처 치유 분석을 통해 폐암 세포 A549에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 A549에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

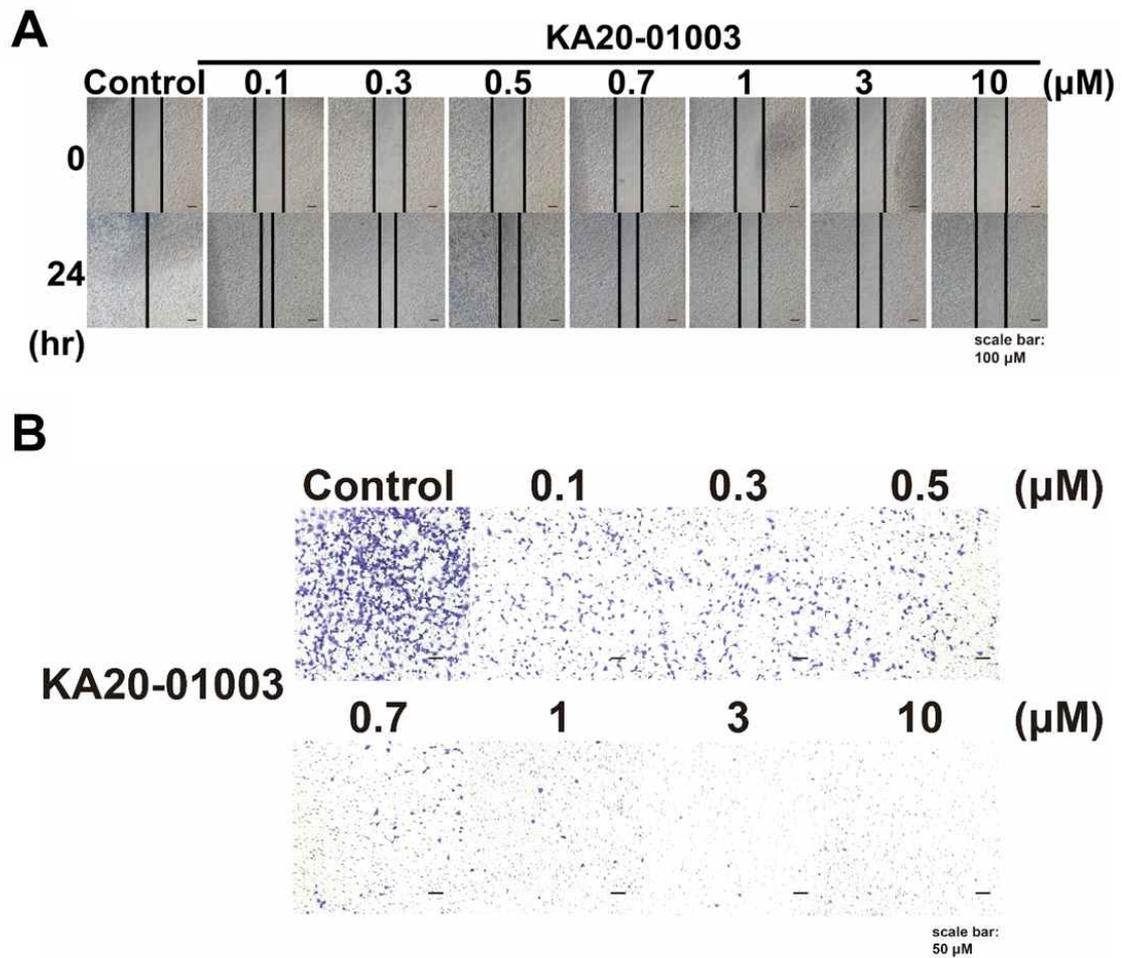


그림 11. KA20-01003가 폐암 세포 H1299의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 폐암 세포 H1299에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 24시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 H1299에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

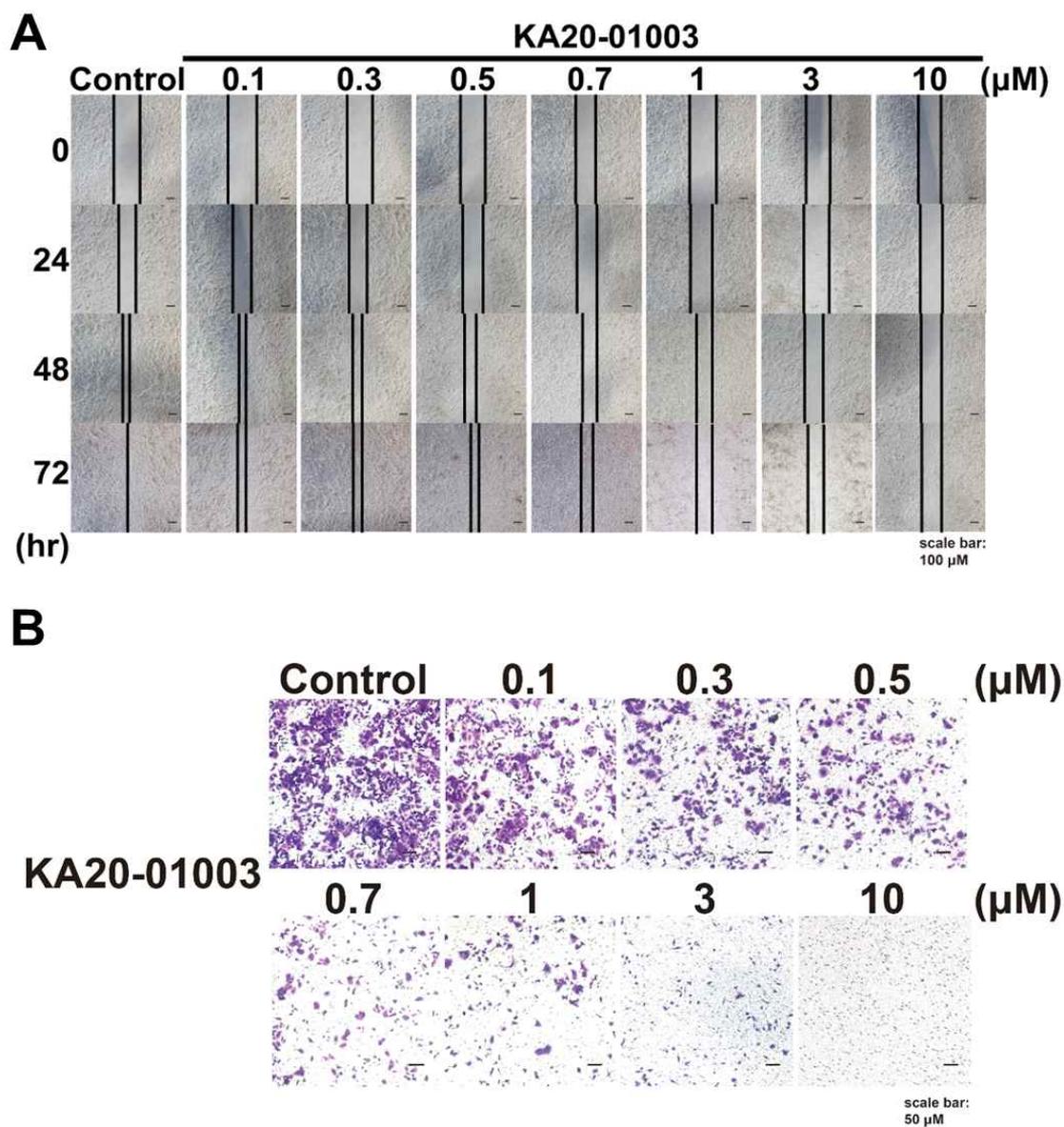


그림 12. KA20-01003가 폐암 세포 H1975의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 폐암 세포 H1975 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 H1975에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

4. 폐암 세포에서의 KA20-01007가 세포 성장, 집락 형성, 이동성 및 침습성에 미치는 영향

연구결과 2을 통해 KA20-01007의 유비퀴틴 억제 효과를 각 농도를 통해 폐암 세포주에서 확인하였다. KA20-01007이 3 μ M에서는 UBA6에 특이성을 가지는 억제 효과를 나타냈고, 이 억제 효과는 세포의 생리적 특성에도 영향을 미쳤다. 세포 증식은 Cell titer Glo 실험을 통해 확인했다. KA20-01007 처리한 그룹에서 세포 증식이 현저히 감소함을 확인했다. UBA6에 특이성을 갖는 농도인 3 μ M에서도 세포의 증식이 감소했으며 이는 세포 분열과 성장에 직접적으로 영향을 미칠 수 있음을 나타냈다. 세포 집락 형성 능력도 감소하였으며, 세포들의 집락의 수와 크기 모두에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다 (그림 13-15). 상처 치유 분석과 트랜스 웰 침습 분석을 이용해 세포의 이동성과 침습성을 평가했다 (그림 16-18). 상처 치유 분석에서는 스크래치 후의 치유 과정이 눈에 띄게 느려졌으며, 트랜스 웰 침습 분석에서는 Matrigel matrix를 통과하여 이동한 세포의 수가 대조군에 비해 현저히 감소했다. 이는 KA20-01007이 세포의 이동과 침습 능력을 감소시킴으로써, 암의 진행 및 전이를 억제할 가능성이 높음을 나타낸다. 결과적으로 KA20-01007의 유비퀴틴 억제 효과는 세포의 성장, 집락 형성, 이동성 및 침습성에 광범위한 영향을 미치며, 이 결과는 암 치료에 있어서 KA20-01007이 효과적인 치료 대안이 될 수 있음을 보여준다.

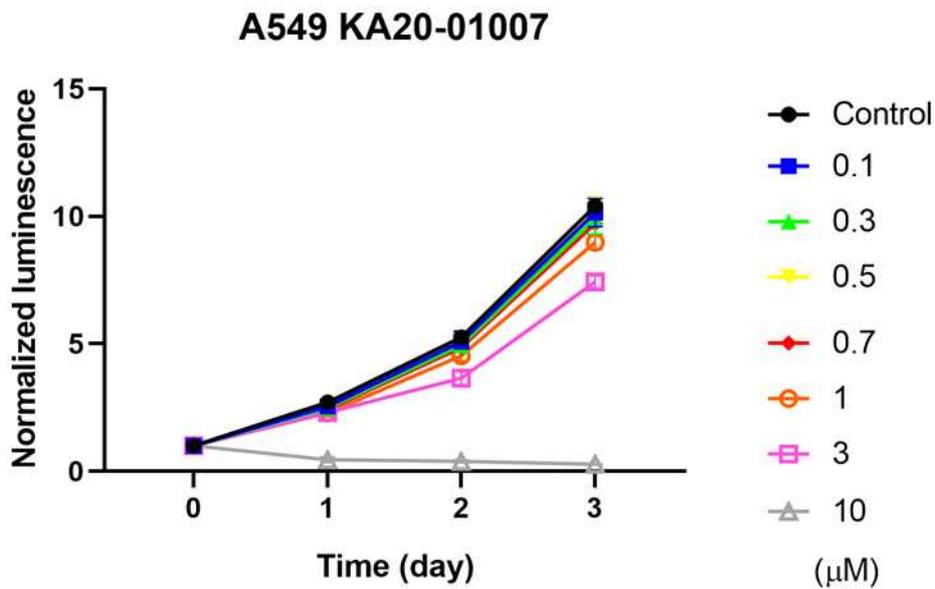
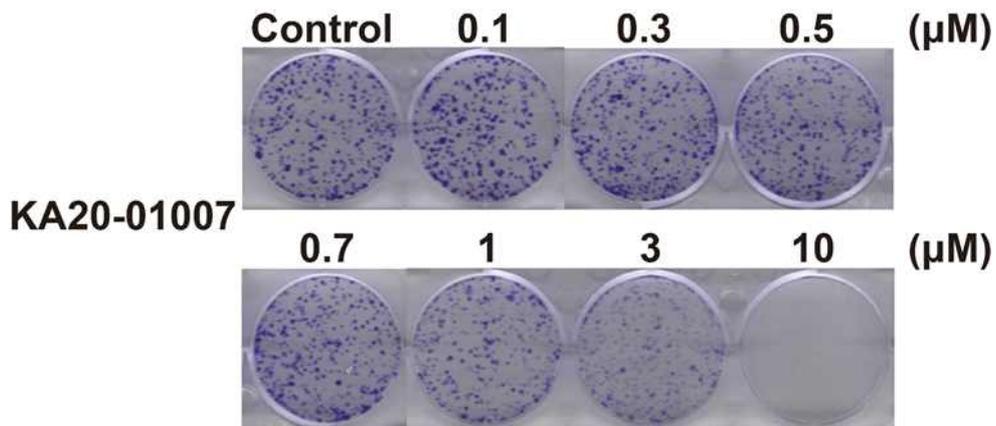
A**B**

그림 13. KA20-01007가 폐암 세포 A549의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 A549에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 A549에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

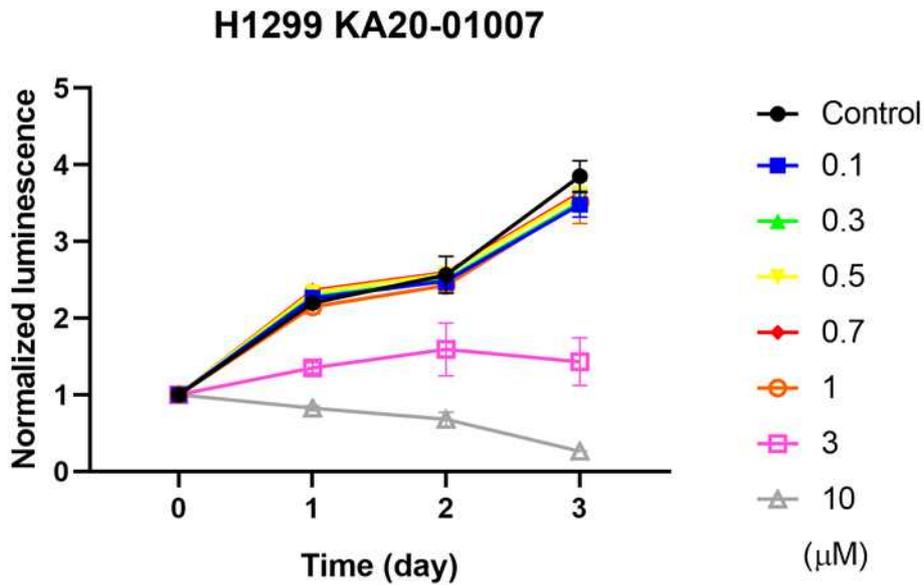
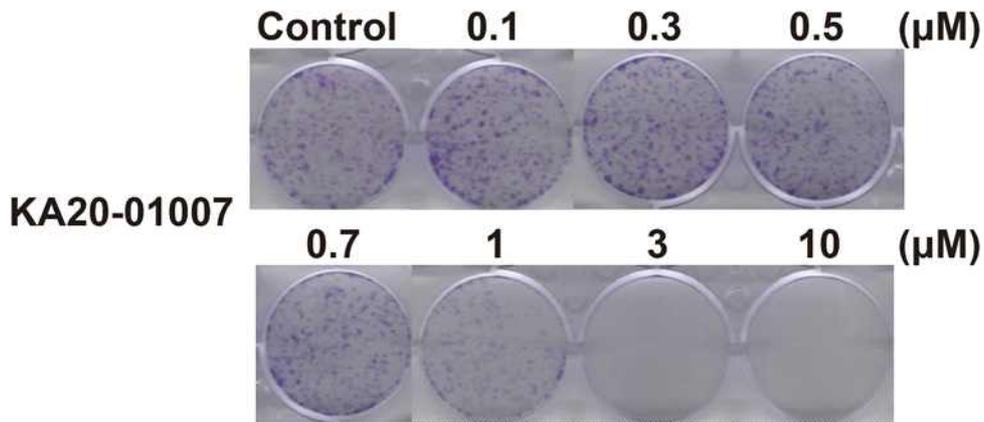
A**B**

그림 14. KA20-01007가 폐암 세포 H1299의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 H1299에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 H1299에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

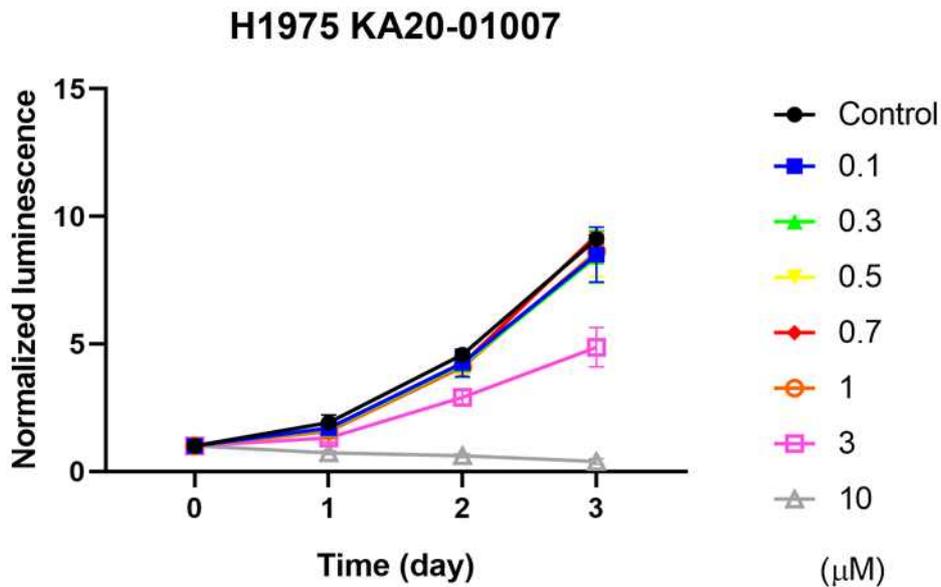
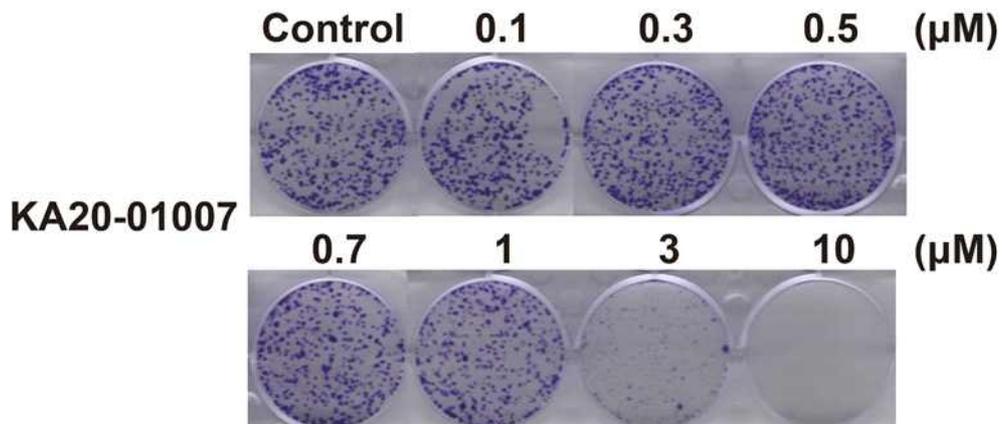
A**B**

그림 15. KA20-01007가 폐암 세포 H1975의 성장에 미치는 영향. (A) 폐암 세포 H1975에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 폐암 세포 H1975에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

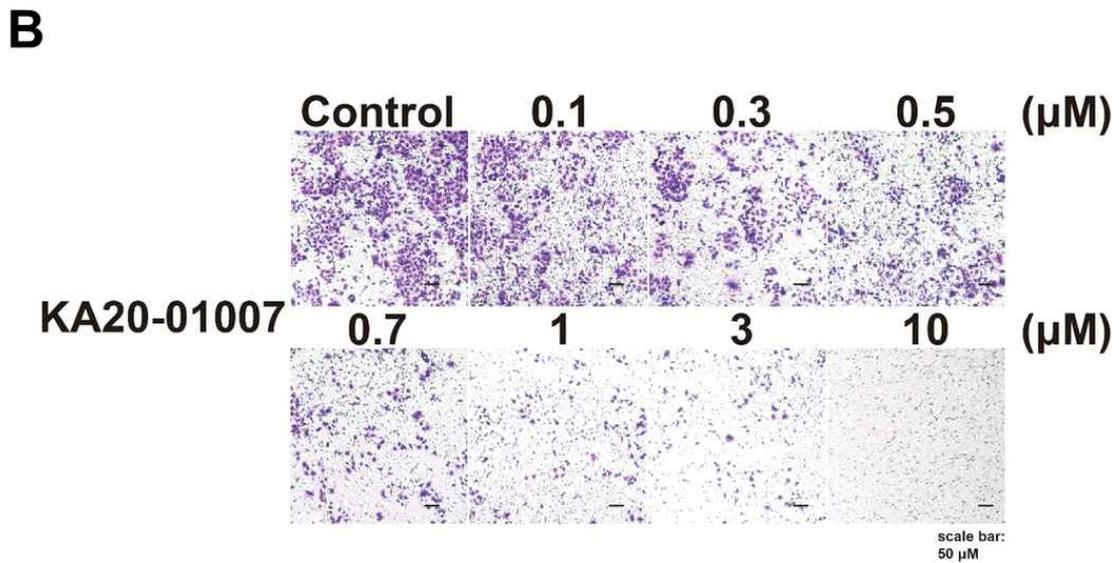
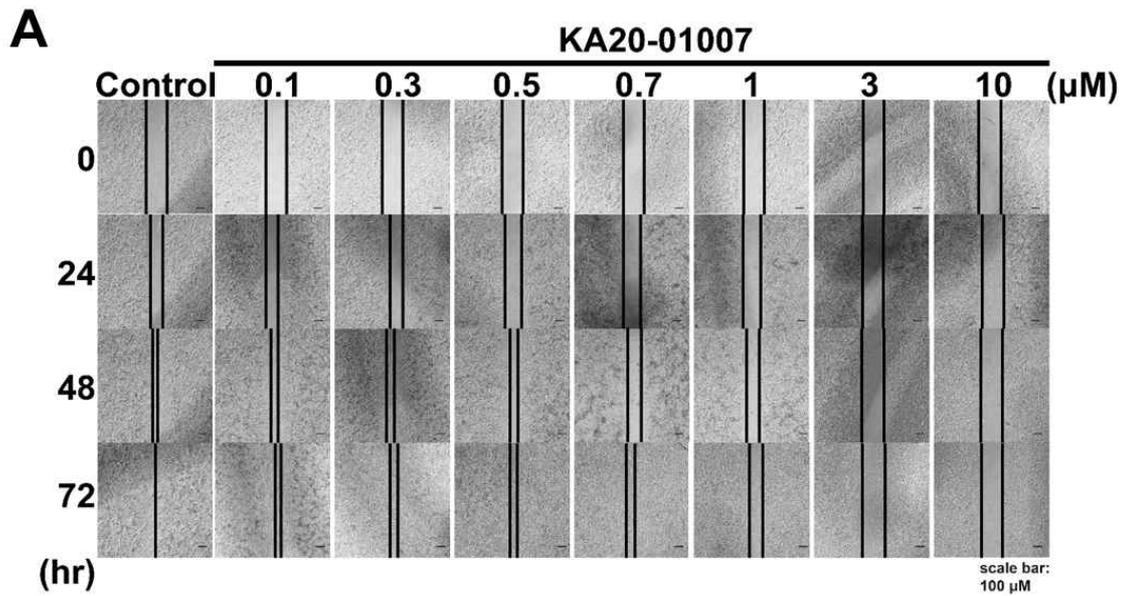


그림 16. KA20-01007가 폐암 세포 A549의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 폐암 세포 A549에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 A549에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

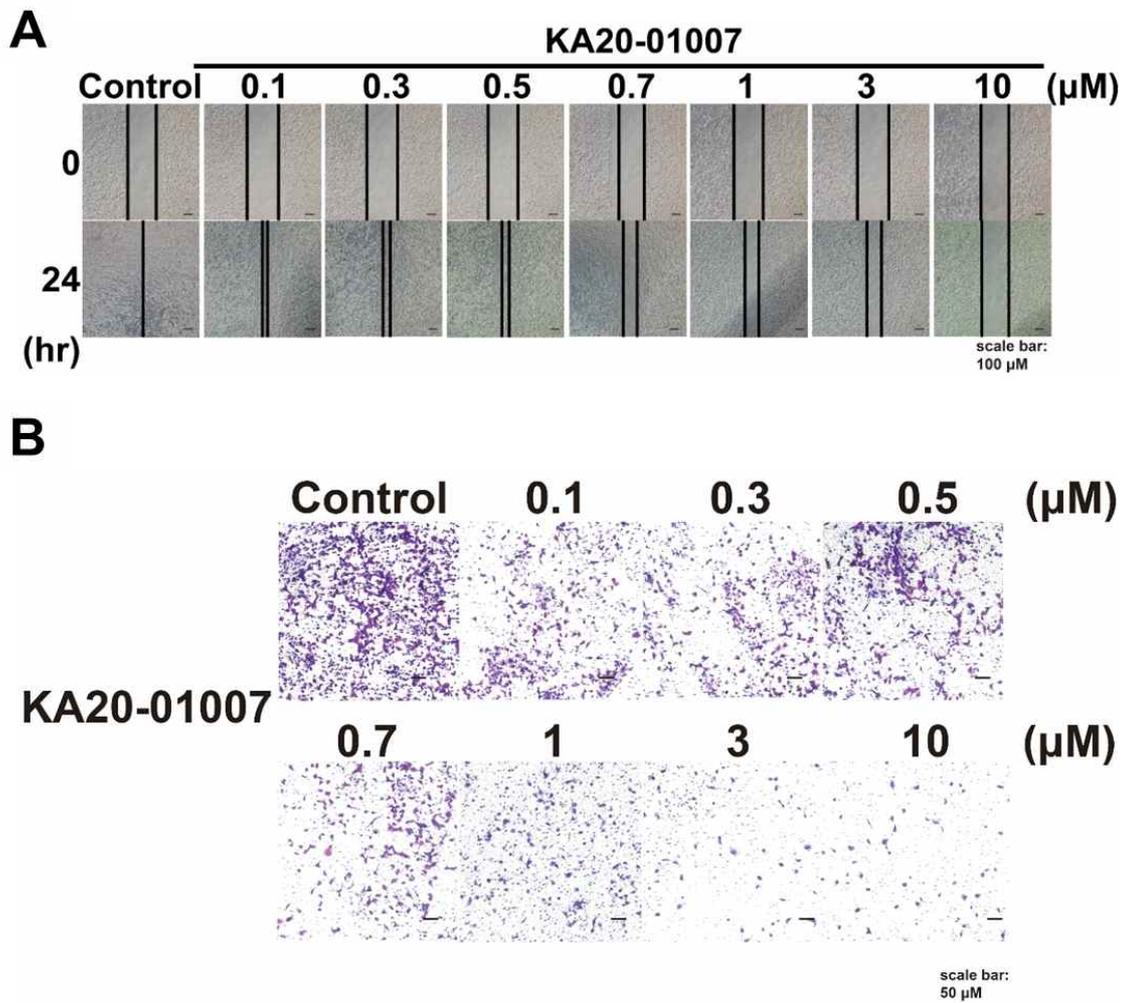


그림 17. KA20-01007가 폐암 세포 H1299의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 폐암 세포 H1299에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 24시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 H1299에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

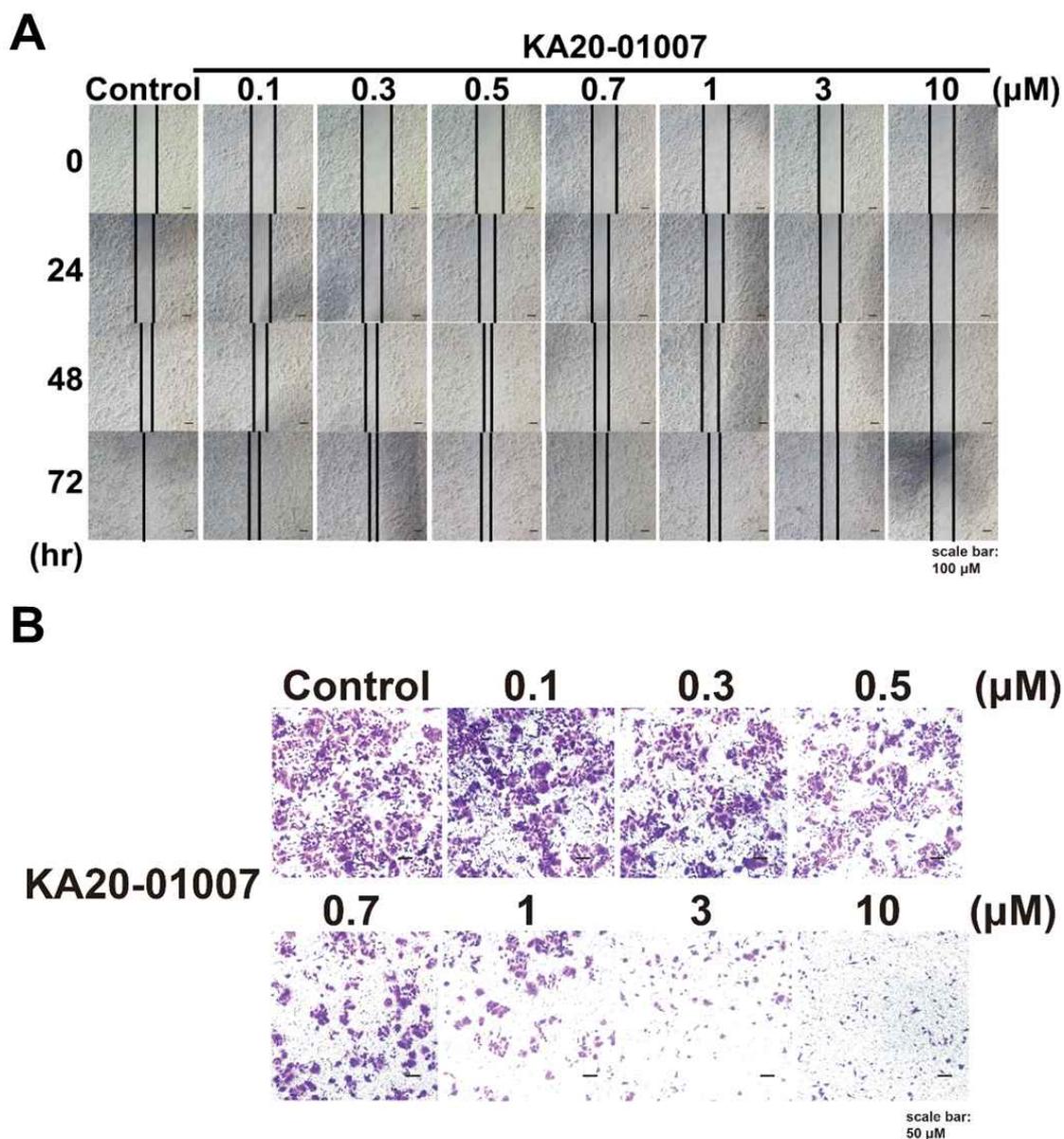


그림 18. KA20-01007가 폐암 세포 H1975의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 폐암 세포 H1975 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 폐암 세포 H1975에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

5. 다른 암종에서의 KA20-01003의 유비퀴틴 억제 효과

KA20-01003 화합물의 유비퀴틴 억제 효과를 폐암 세포에서 확인 후, 이 화합물이 다양한 다른 암종에서도 유사한 효과를 나타내는지 검증하기 위한 실험을 진행했다. KA20-01003을 0.1-10 μM 농도로 전립선암 (PC3), 위암 (AGS), 대장암 (HCT116), 유방암 (HS578T) 세포에 처리하여 Ubiquitin charging assay를 통해 UBE1 및 UBA6에 대한 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달을 평가했다. 실험 결과 KA20-01003의 처리는 전립선암, 위암, 대장암, 유방암 세포에서도 UBE1과 UBA6에 대한 유비퀴틴 활성화를 효과적으로 억제했다 (그림 19-22). PC3에서 UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 1 μM , UBE2A 1 μM 에서 나타났고, UBA6, USE1 0.1 μM 에서 나타났다. AGS에서 UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.3 μM , UBE2A 0.7 μM 에서 나타났고, UBA6 0.1 μM , USE1 0.5 μM 에서 나타났다. HCT116은 UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.1 μM , UBE2A 3 μM 에서 나타났고, UBA6, USE1 0.1 μM 에서 나타났다. HS578T는 UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.5 μM , UBE2A 0.5 μM 에서 나타났고, UBA6 0.1 μM , USE1 0.3 μM 에서 나타났다. 결과적으로 KA20-03003 화합물은 폐암 세포 이외에 다양한 다른 암종에서도 UBE1과 UBA6에 모두 작용하여 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달을 억제함을 확인했다. 또한 KA20-01003은 폐암 세포에서와 같은 결과로 UBE1과 UBA6 모두에 작용하는 비특이성을 나타냈다.

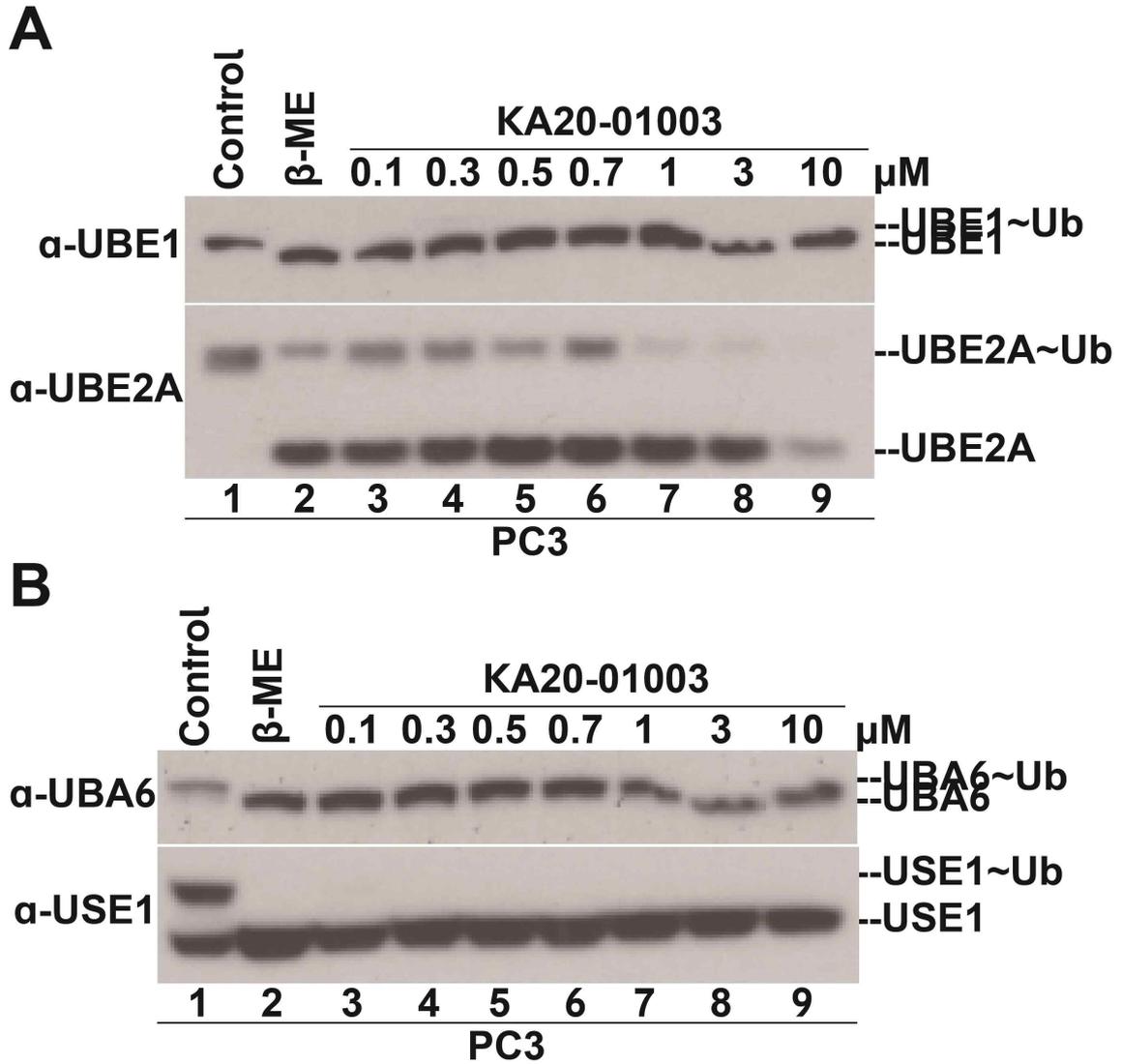


그림 19. PC3 세포에서 KA20-01003의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 전립선 암세포인 PC3에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 1 μ M, UBE2A 1 μ M에서 나타났다. (B) UBA6, USE1 0.1 μ M에서 나타났다.

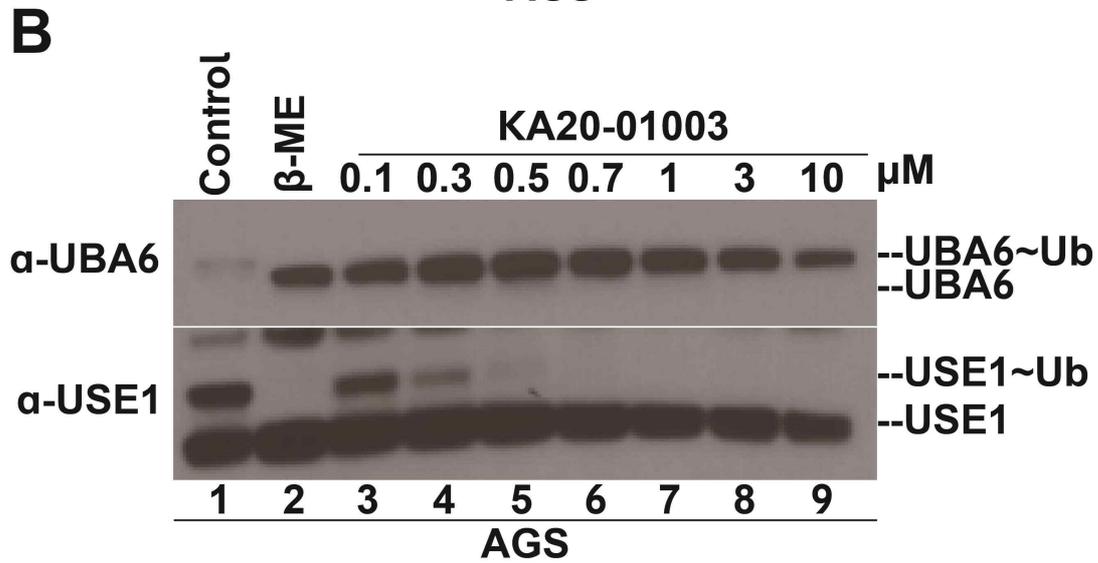
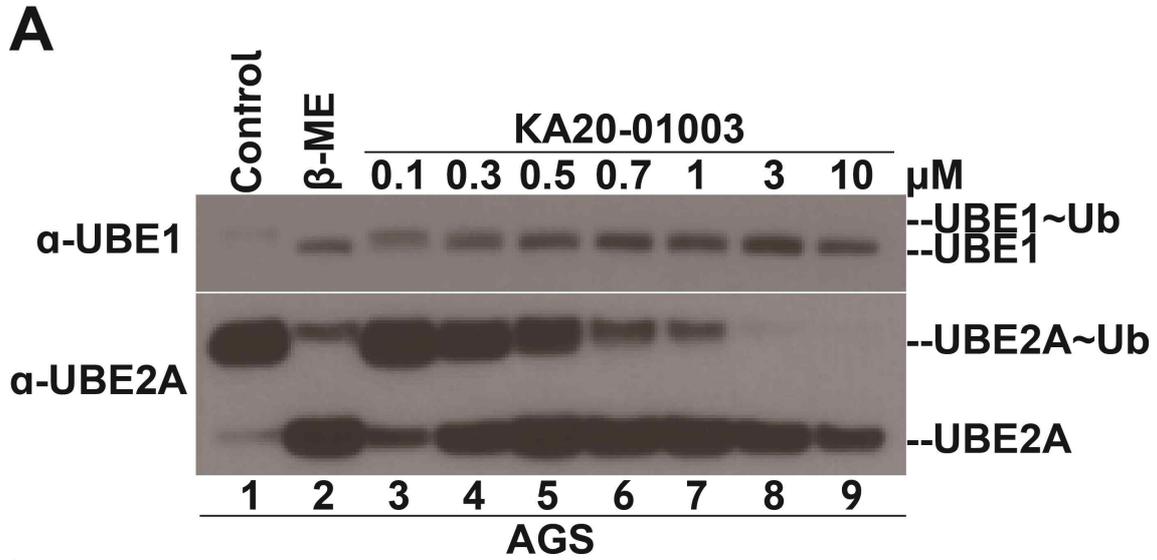


그림 20. AGS 세포에서 KA20-01003, KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 위암 세포인 AGS에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.3 μ M, UBE2A 0.7 μ M에서 나타났다. (B) UBA6 0.1 μ M, USE1 0.5 μ M에서 나타났다.

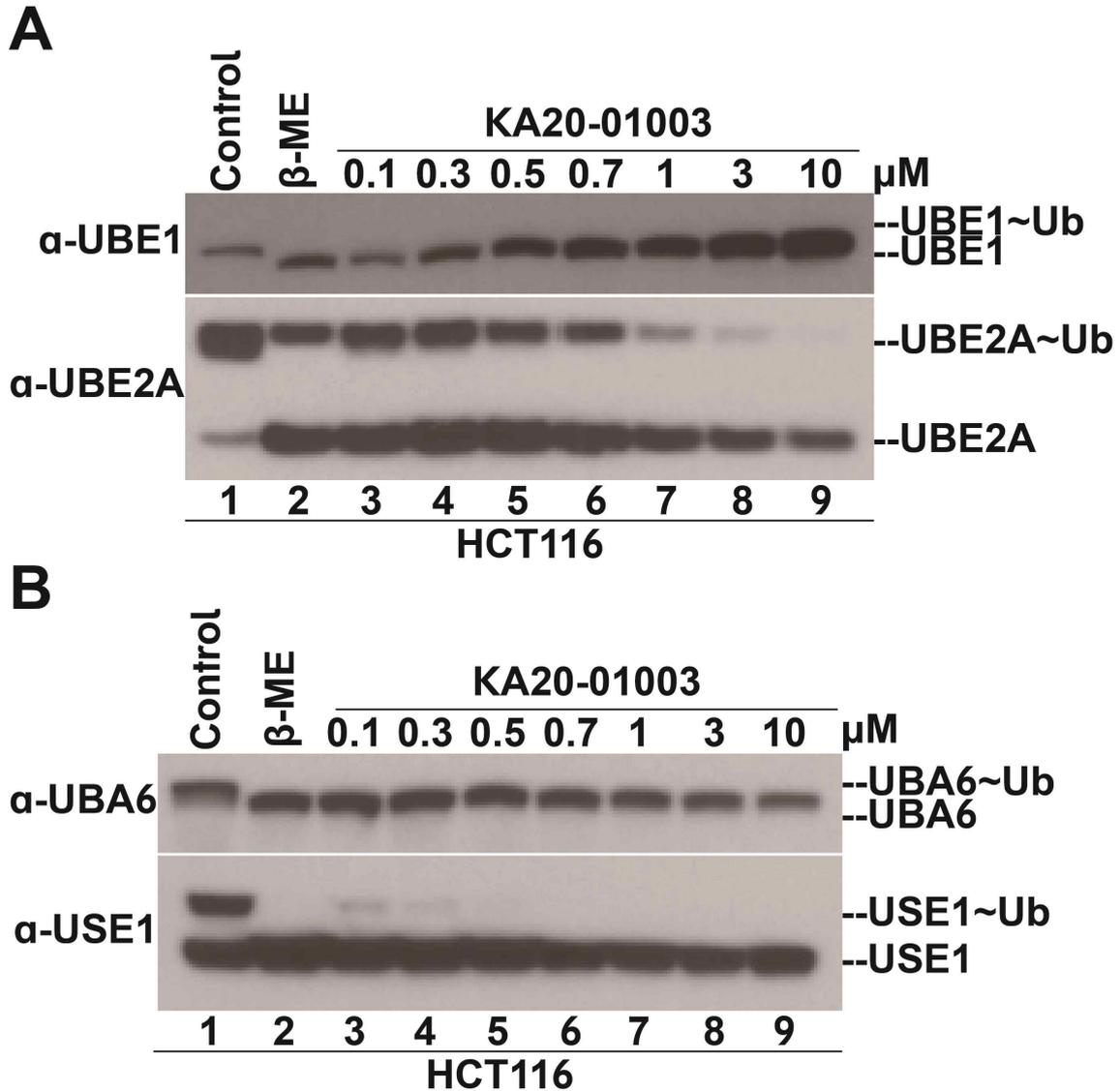


그림 21. HCT116 세포에서 KA20-01003, KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 대장암 세포인 HCT116에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.1 μ M, UBE2A 3 μ M에서 나타났다. (B) UBA6, USE1 0.1 μ M에서 나타났다.

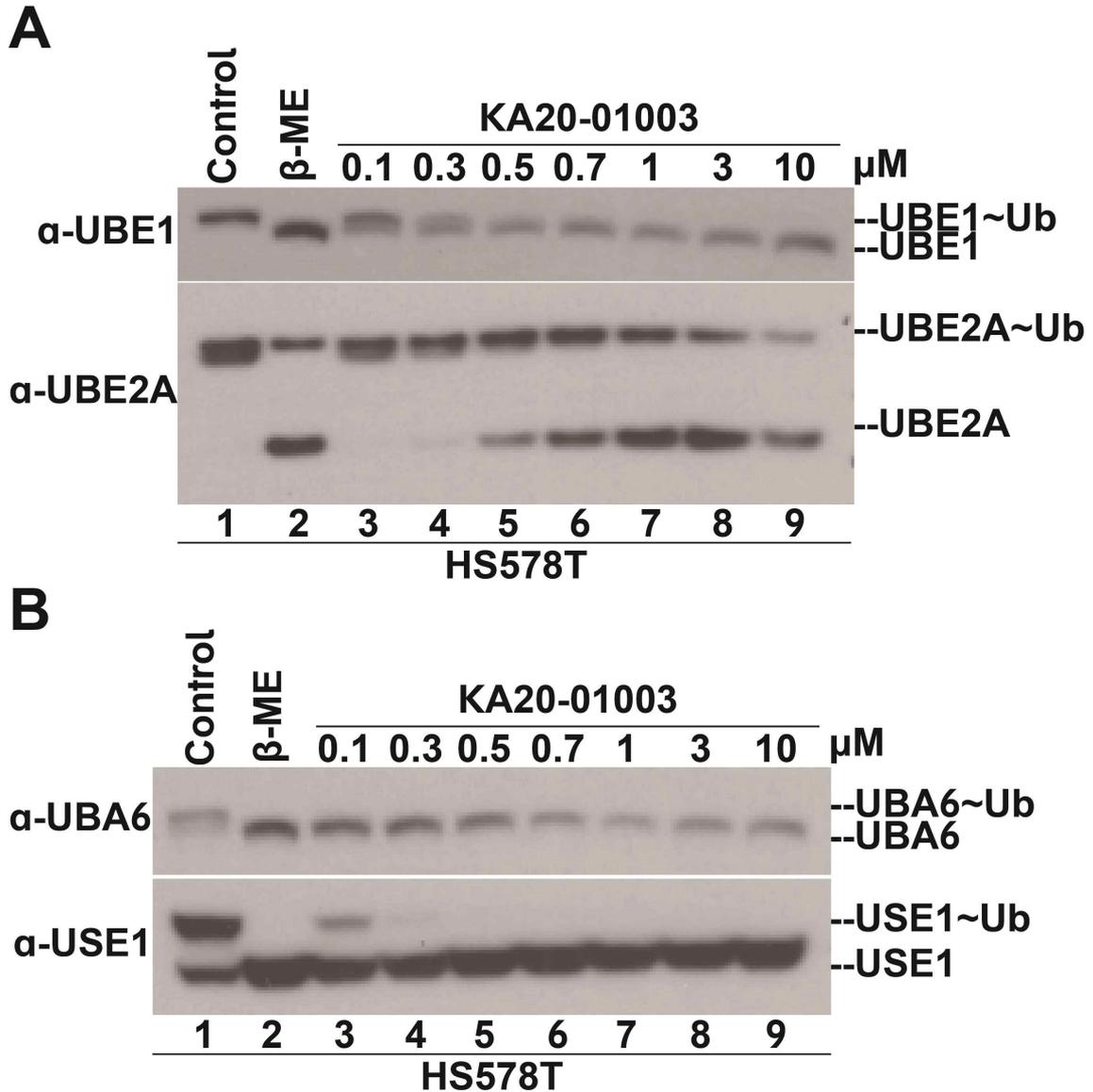


그림 22. HS578T 세포에서 KA20-01003, KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 유방암 세포인 HS578T에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과는 0.5 μ M, UBE2A 0.5 μ M에서 나타났다. (B) UBA6 0.1 μ M, USE1 0.3 μ M에서 나타났다.

6. 다른 암종에서의 KA20-01007의 유비퀴틴 억제 효과

KA20-01007 화합물의 유비퀴틴 억제 효과를 KA20-01003과 마찬가지로 폐암 세포를 넘어 다양한 암종에서 평가했다. 전립선암, 위암, 대장암, 유방암 세포에 0.1-10 μ M 농도로 처리한 후, Ubiquitin charging assay를 통해 UBE1 및 UBA6에 대한 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달을 억제하는 효과를 확인했다. 실험 결과 KA20-01007은 폐암 세포 뿐만 아니라 전립선암, 위암, 대장암, 유방암 세포에서도 유비퀴틴의 활성화와 E2 효소로의 전달을 효과적으로 억제했다 (그림 23-26). PC3에서는 UBE1에 대한 억제 효과는 나타나지 않았고, UBE2A 10 μ M, UBA6 3 μ M, USE1 10 μ M에서 나타났다. AGS에서는 UBE1, UBE2A에 대한 효과는 나타나지 않았으며, UBA6 3 μ M, USE1 3 μ M에서 나타났다. HCT116도 UBE1, UBE2A에 대한 효과는 나타나지 않았지만 UBA6, USE1 3 μ M에서 나타났다. HS578T에서도 UBE1, UBE2A에 대한 효과는 나타나지 않았고, UBA6 3 μ M, USE1 10 μ M에서 나타났다. 결과적으로 KA20-01007은 폐암 세포에서와 마찬가지로 UBE1보다 UBA6에 특이성을 보였다. 종합적으로 KA20-01007은 폐암 세포와 다른 암종에서도 UBE1보다 UBA6에 대한 특이성이 높으며 이는 UBA6에 관련한 신호 전달을 억제함을 예상 할 수 있다.

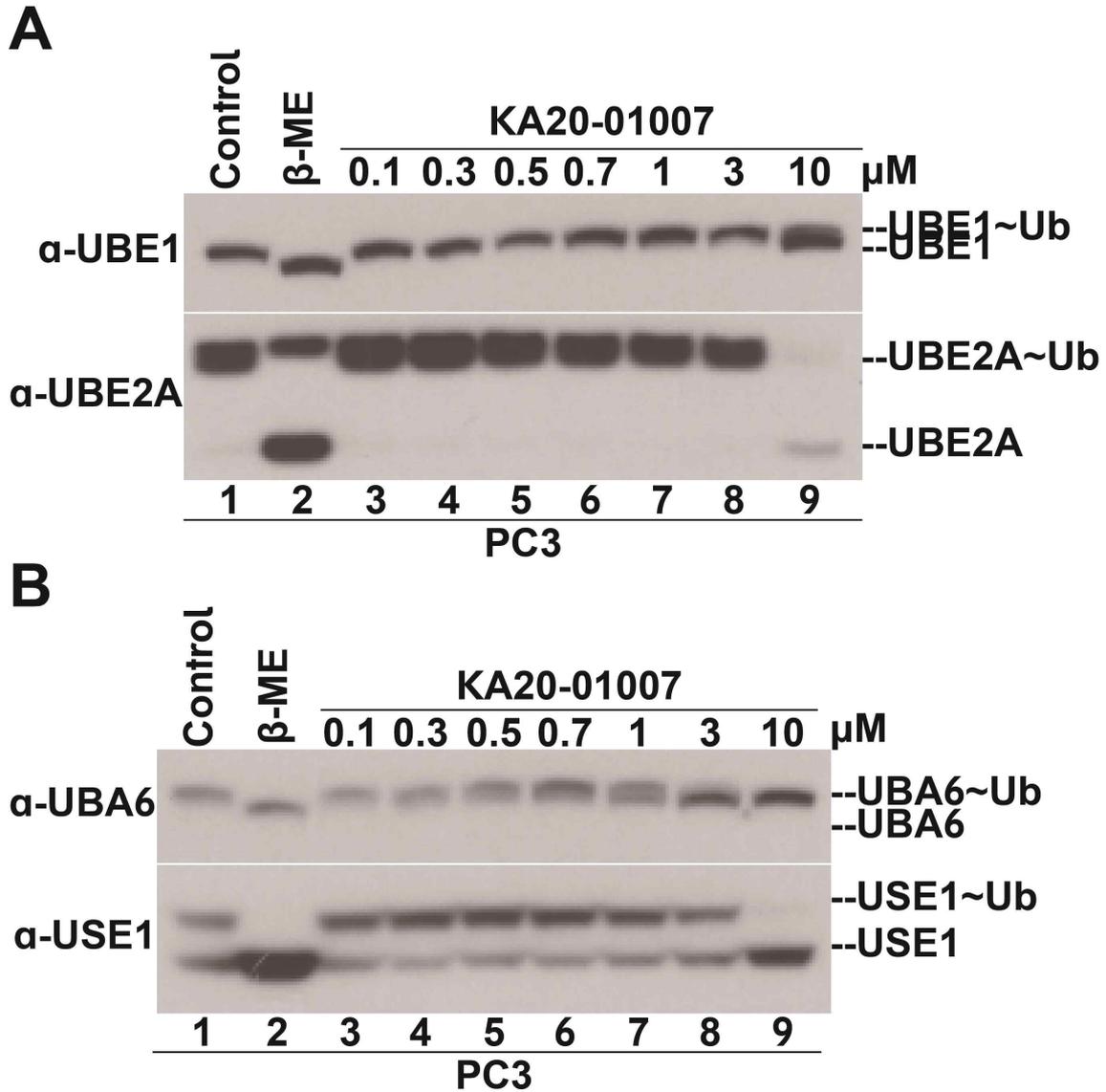


그림 23. PC3 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 전립선 암세포인 PC3에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1과 UBE2A 10 μ M에서 효과가 나타났다. (B) UBA6는 3 μ M, USE1 10 μ M에서 나타났다.

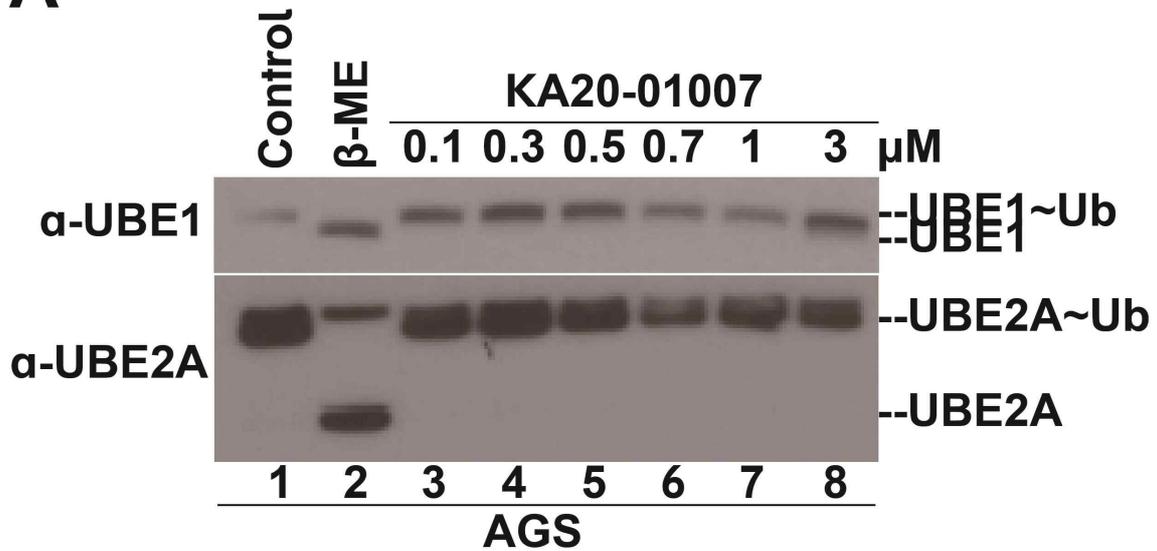
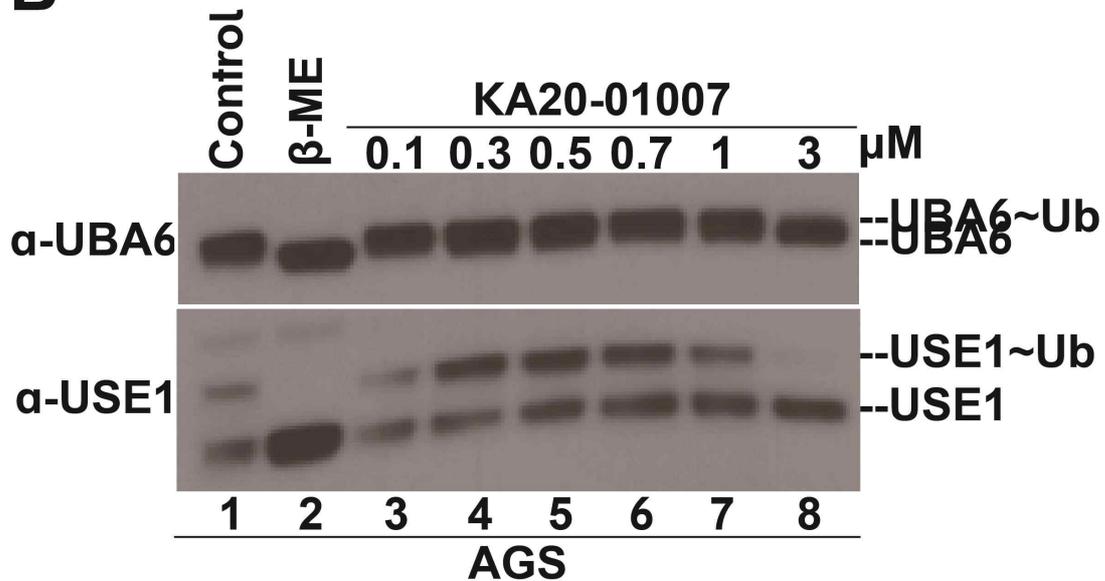
A**B**

그림 24. AGS 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 위암 세포인 AGS에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1, UBE2A에 대한 효과는 나타나지 않았다. (B) UBA6 3 μ M, USE1 3 μ M에서 나타났다.

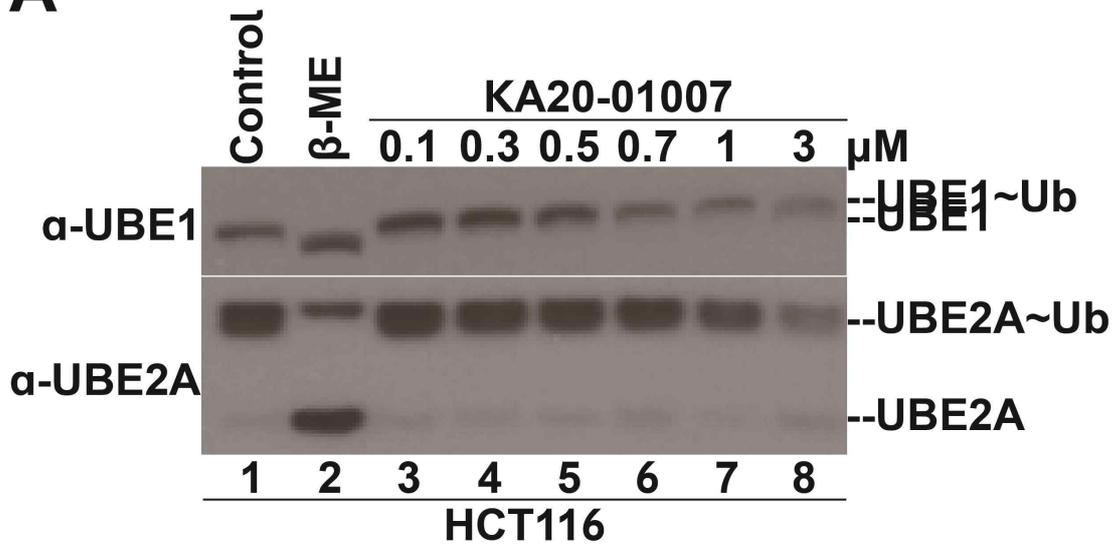
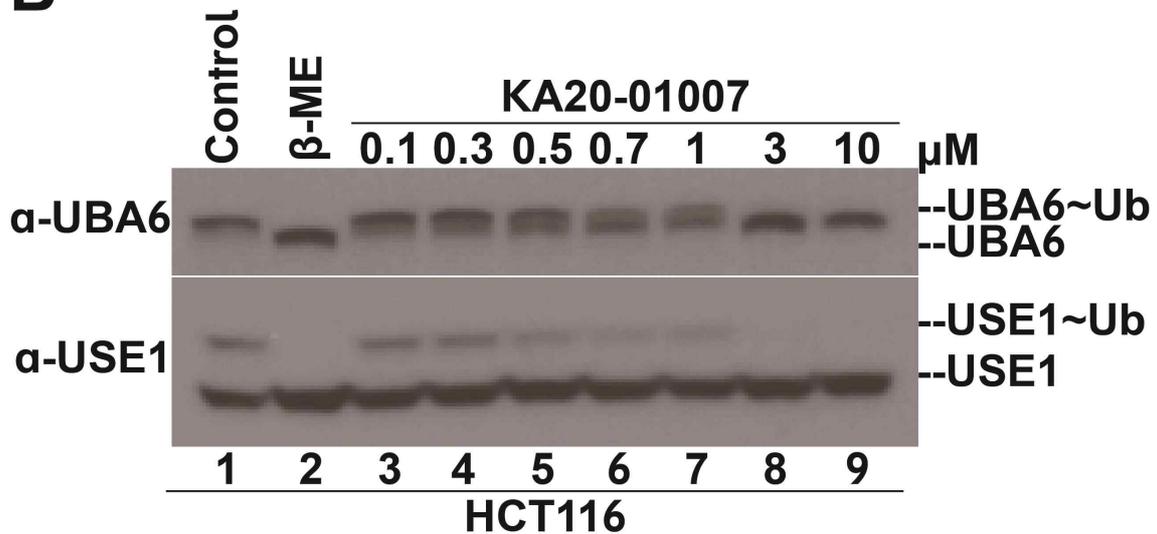
A**B**

그림 25. HCT116 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 대장암 세포인 HCT116에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1, UBE2A 모두 효과가 나타나지 않음 (B) UBA6, USE1 3 μ M에서 나타났다.

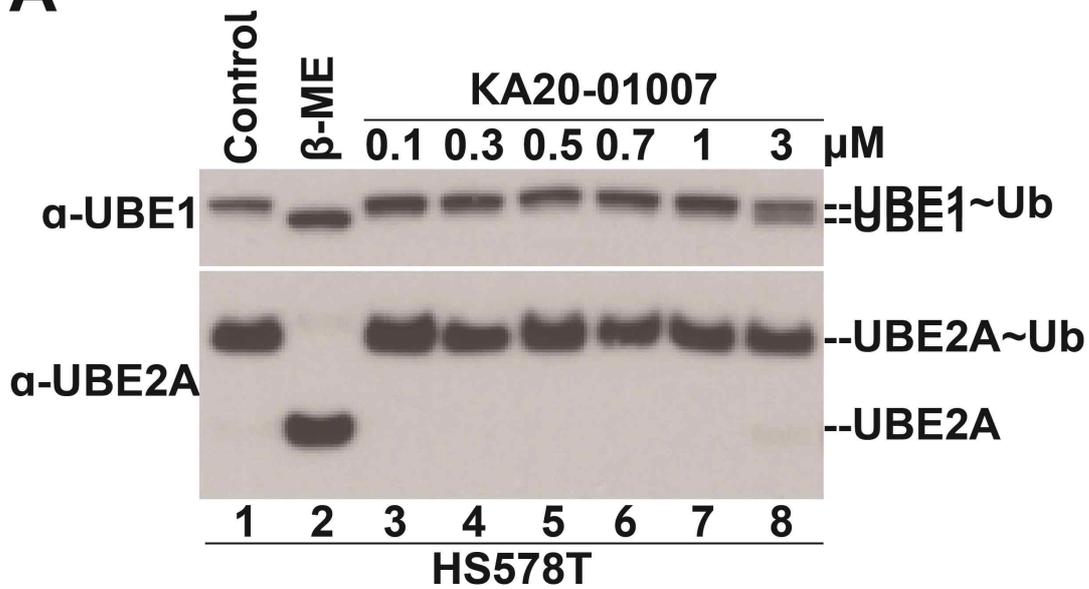
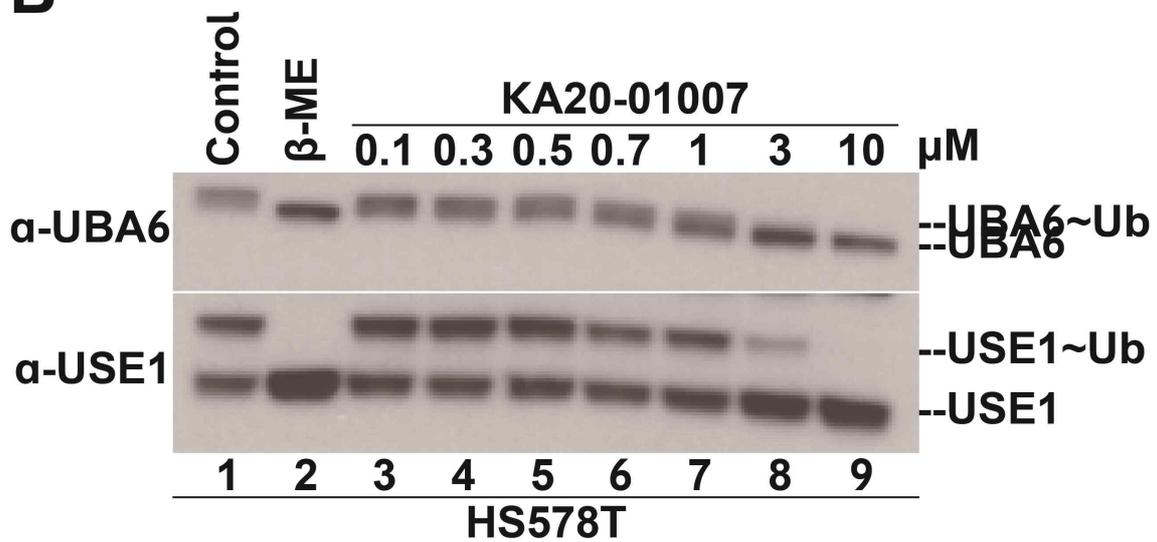
A**B**

그림 26. HS578T 세포에서 KA20-01007의 UBE1, UBA6에 대한 유비퀴틴 전달 억제 효과. 유방암 세포인 HS578T에서 KA20-01003, KA20-01007을 농도별로 16시간 처리하고 비환원 조건 하에서 웨스턴 블랏을 위해 세포 용해물을 처리하고 각 단백질의 항체를 통해 검출했다. Control은 DMSO를 처리하였으며 β -ME는 세포 용해물에 첨가하였다. (A) UBE1, UBE2A 모두 효과가 나타나지 않음 (B) UBA6 3 μ M, USE1 10 μ M에서 나타났다.

7. 다른 암종에서의 KA20-01003가 세포 성장, 집락 형성, 이동 및 침습성에 미치는 영향

연구결과 5를 통해 각각의 암종에서 KA20-01003의 유비퀴틴 활성화 및 E2 효소로의 전달 억제 효과를 Ubiquitin charging assay를 이용해 확인했다. KA20-01003이 유비퀴틴의 활성화 및 E2로의 전달을 억제함으로써 세포 증식, 집락 형성, 이동 및 침습 능력을 감소시키는 것을 확인하고자 실험을 진행했다. PC3, AGS, HCT116, HS578T에 KA20-01003을 0.1-10 μ M 농도로 처리하였다. 세포 증식은 Cell Titer Glo를 통해 측정했다. 그 결과 세포 증식이 대조군에 비해 감소함을 확인할 수 있다. 세포 집락 형성 실험에서도 집락 형성이 감소하는 것을 확인했다 (그림 27-30). 이동 및 침습성을 확인하기 위해 상처 치유 분석 및 트랜스 웰 침습 분석을 실시했다. 상처 치유 분석을 통해 스크래치를 회복하는 세포의 이동성을 확인했을 때 KA20-01003을 처리한 그룹에서 이동성이 감소함을 확인했다. 트랜스 웰 침습 분석의 matrigel matrix를 침습하여 트랜스 웰 하부 챔버에 침습되는 세포를 확인했고, KA20-01003을 처리했을 때 세포의 침습성이 감소함을 관찰했다 (그림 31-34). 결과적으로 KA20-01003을 처리했을 때 폐암 세포이외의 다른 암종에서 세포의 증식, 집락 형성, 이동성 및 침습성이 감소함을 확인했다.

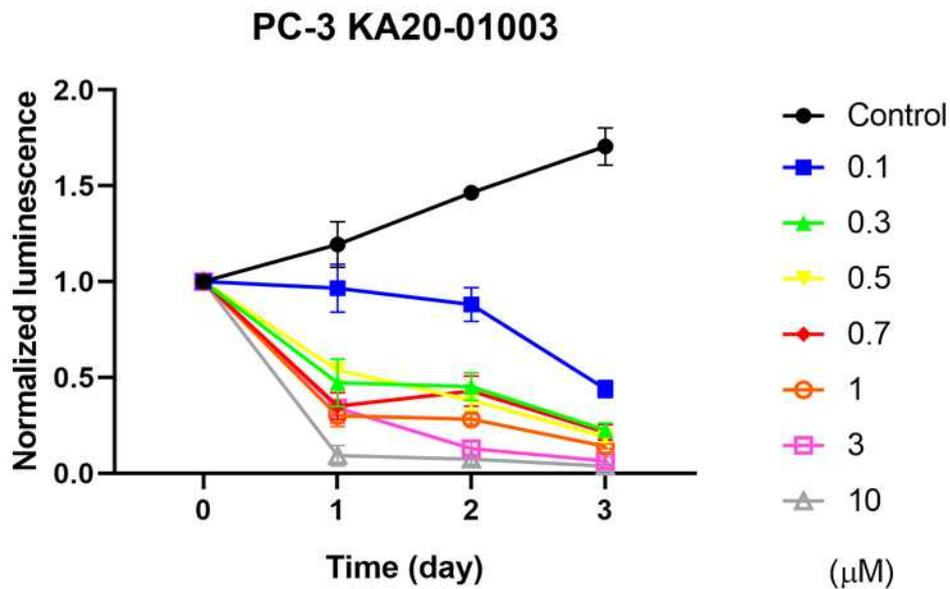
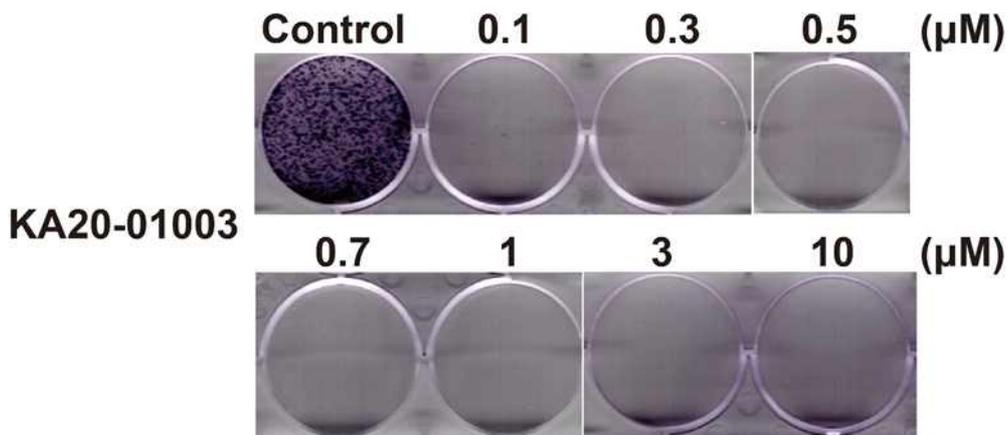
A**B**

그림 27. KA20-01003가 전립선 암세포 PC3의 성장에 미치는 영향. (A) 전립선 암세포 PC3에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 전립선 암세포 PC3에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

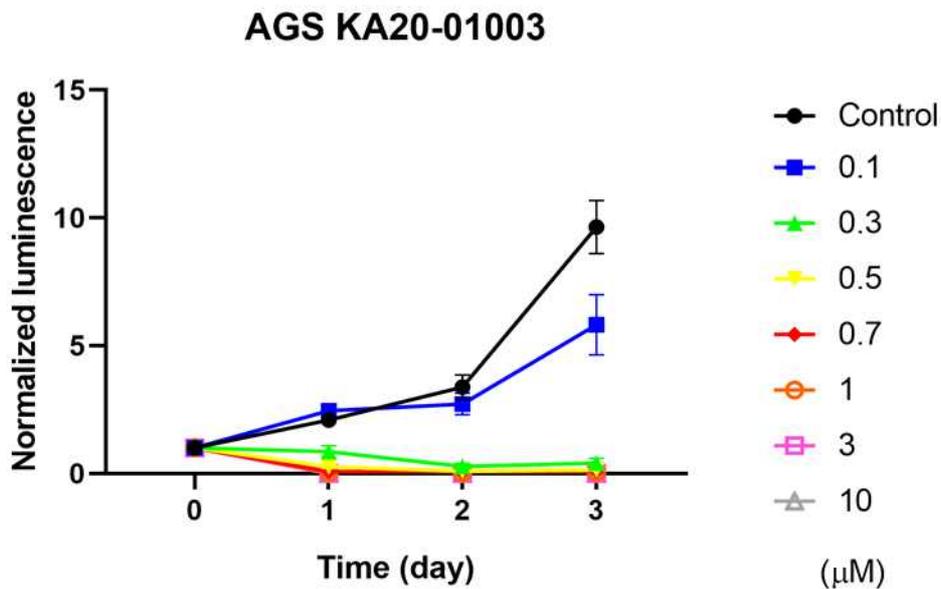
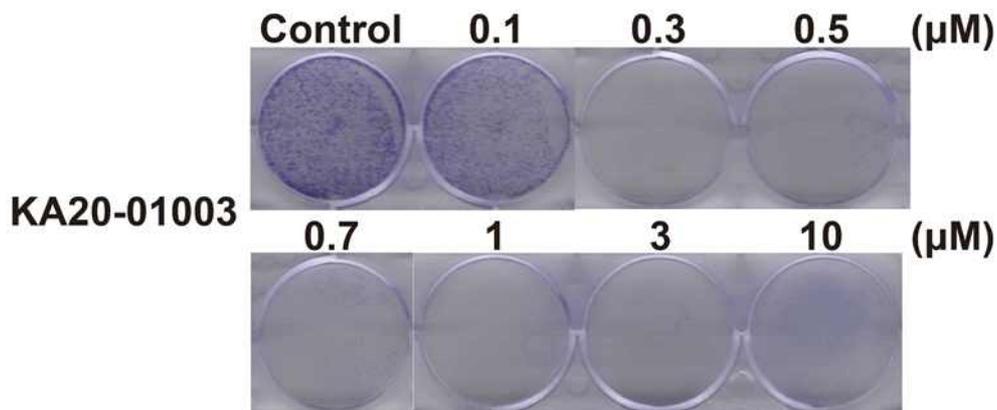
A**B**

그림 28. KA20-01003가 위암 세포 AGS의 성장에 미치는 영향. (A) 위암 세포 AGS에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 위암 세포 AGS에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

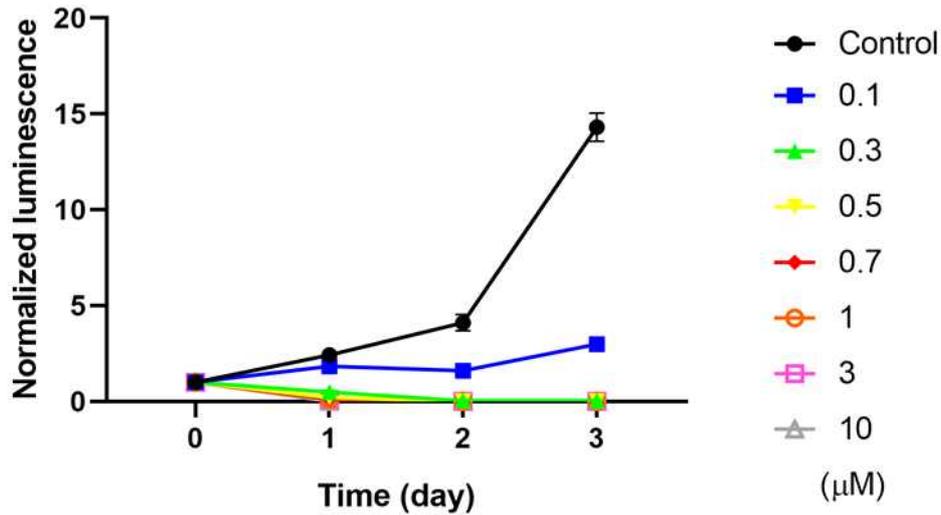
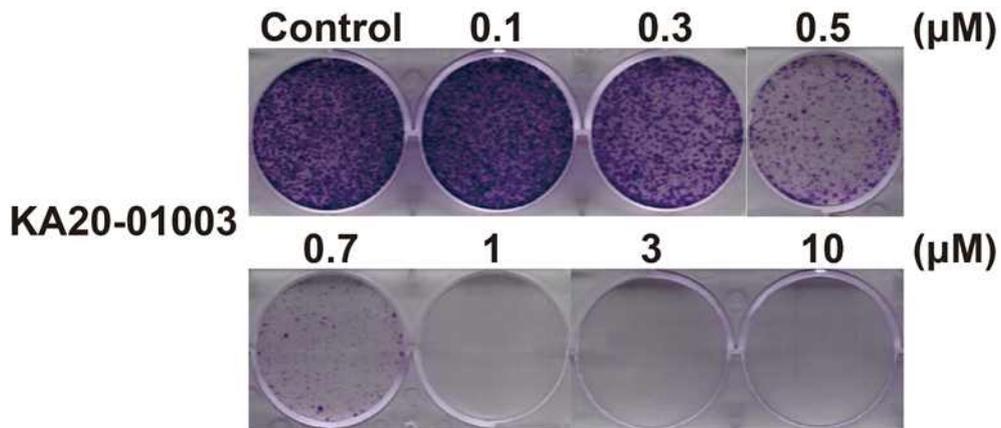
A**HCT116 KA20-01003****B**

그림 29. KA20-01003가 대장암 세포 HCT116의 성장에 미치는 영향. (A) 대장암 세포 HCT116에 KA20-01003 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 대장암 세포 HCT116에 KA20-01003 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

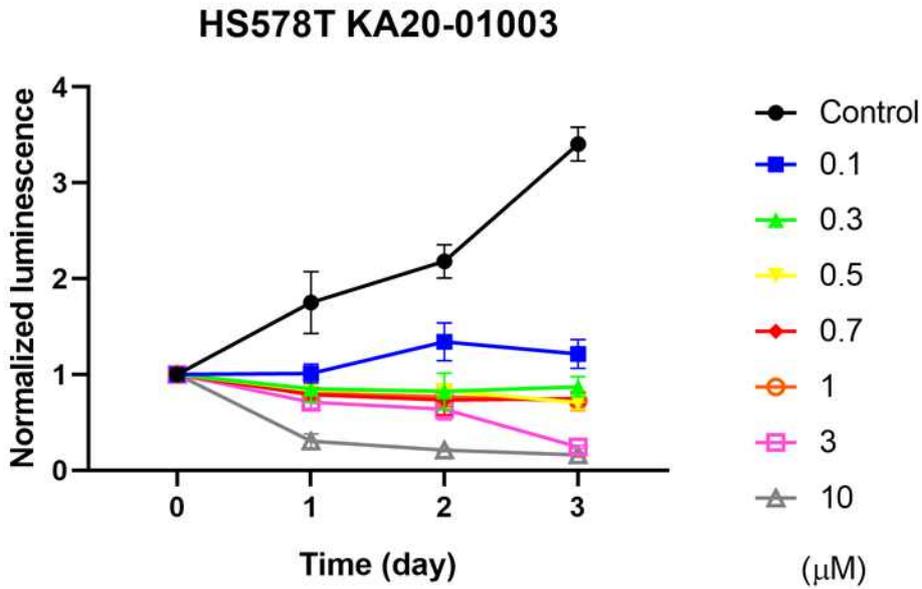
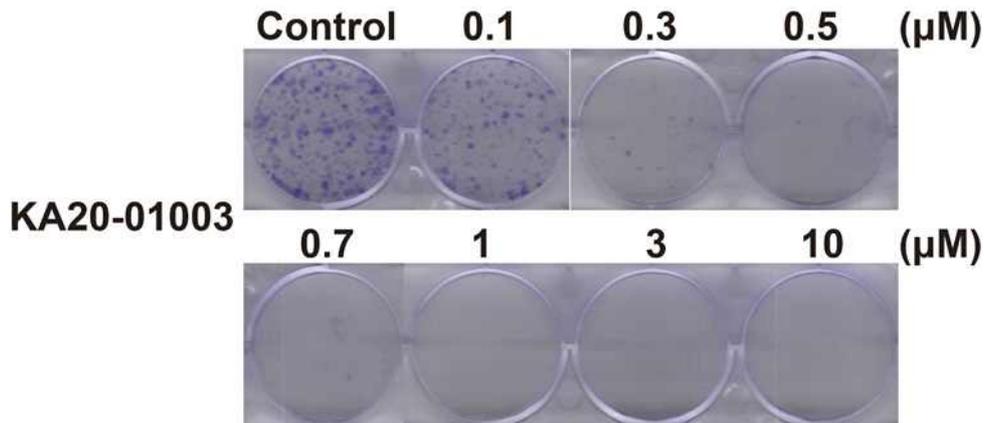
A**B**

그림 30. KA20-01003가 유방암 세포 HS578T의 성장에 미치는 영향. (A) 유방암 세포 HS578T에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 유방암 세포 HS578T에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

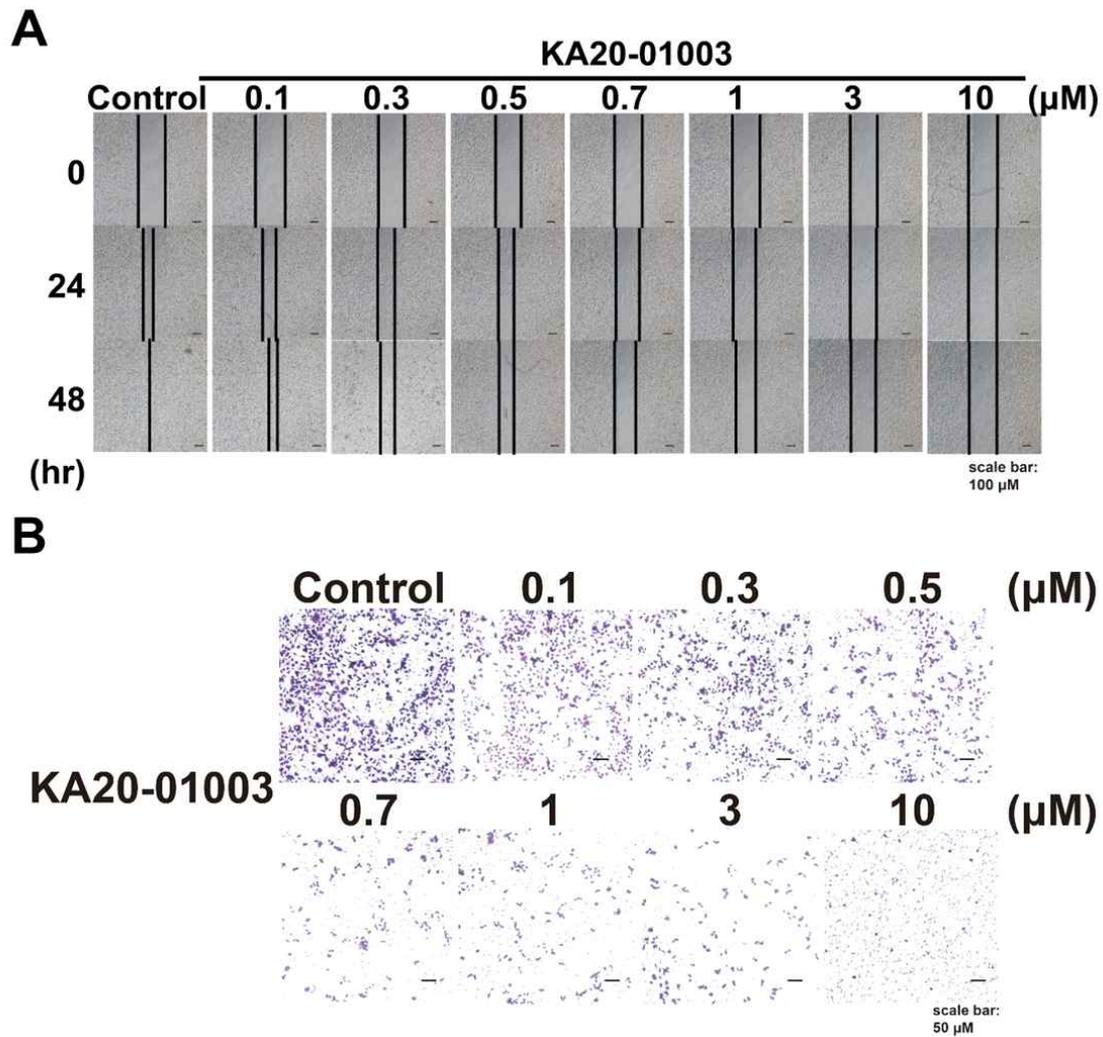


그림 31. KA20-01003가 전립선 암세포 PC3의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 전립선 암세포 PC3에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 전립선 암세포 PC3에 KA20-01003 (1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

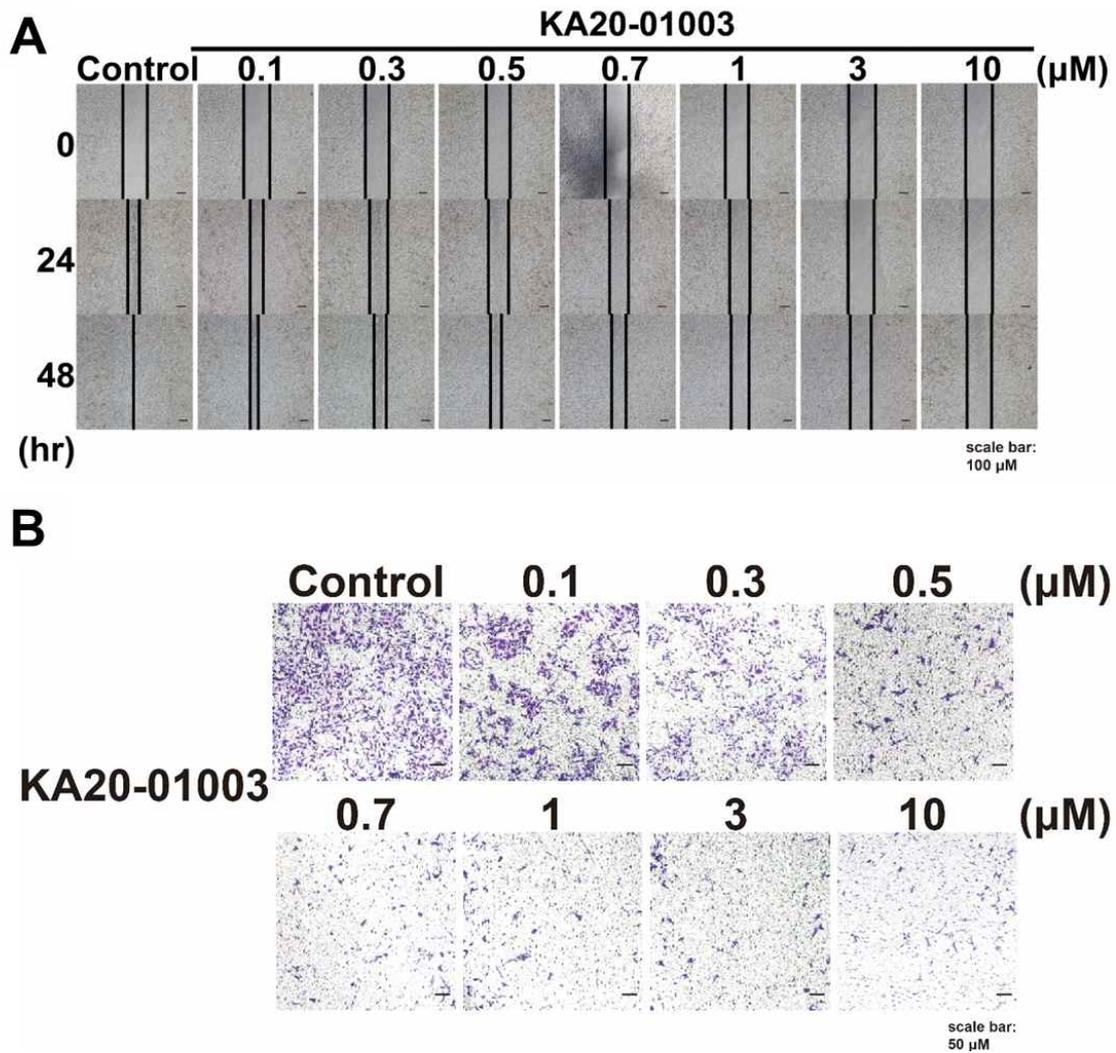


그림 32. KA20-01003가 위암 세포 AGS의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 위암 세포 AGS에 KA20-01003 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 위암 세포 AGS에 KA20-01003 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

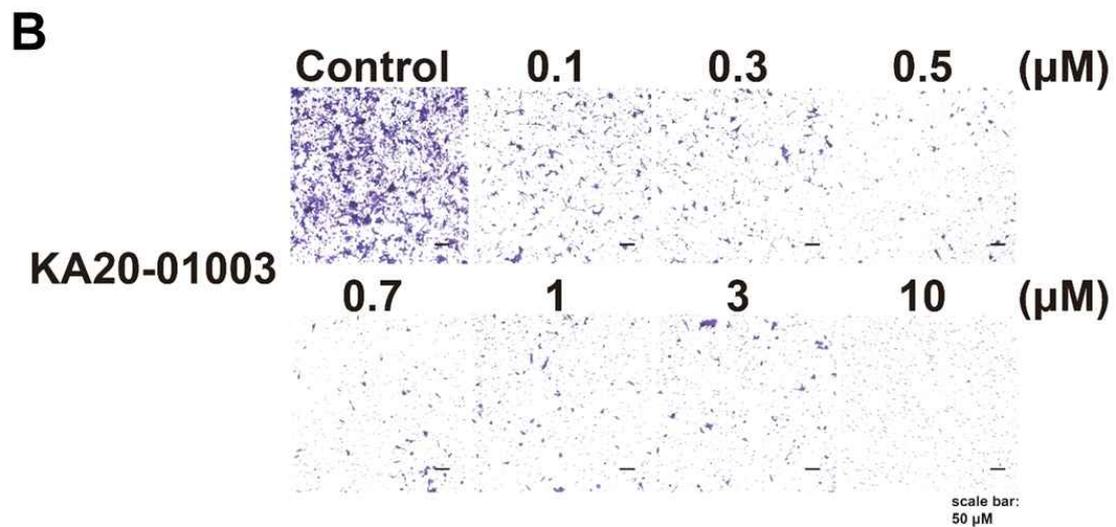
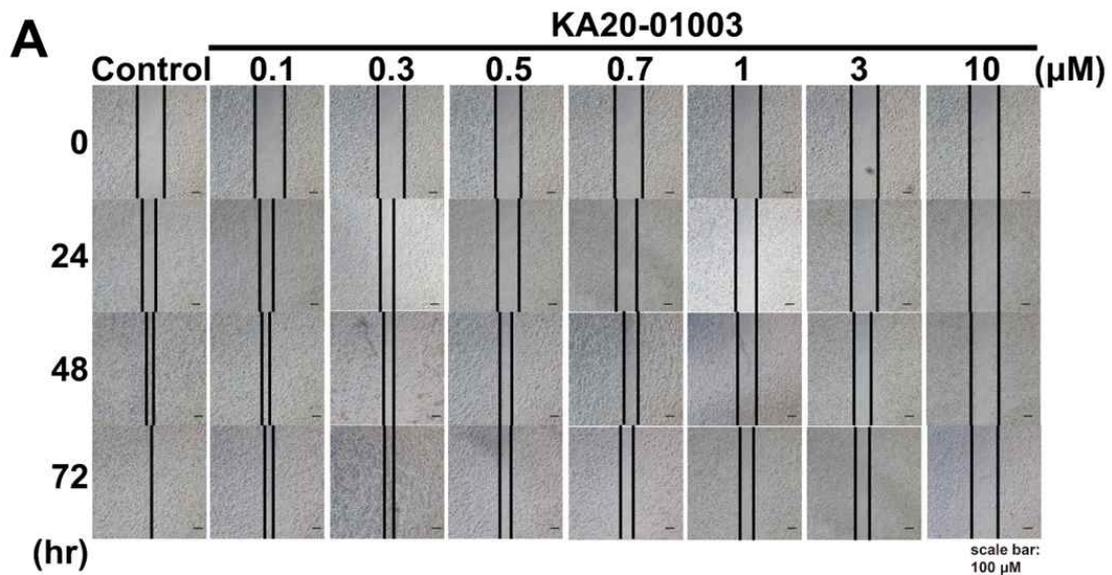


그림 33. KA20-01003가 대장암 세포 HCT116의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 대장암 세포 HCT116에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 대장암 세포 HCT116에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

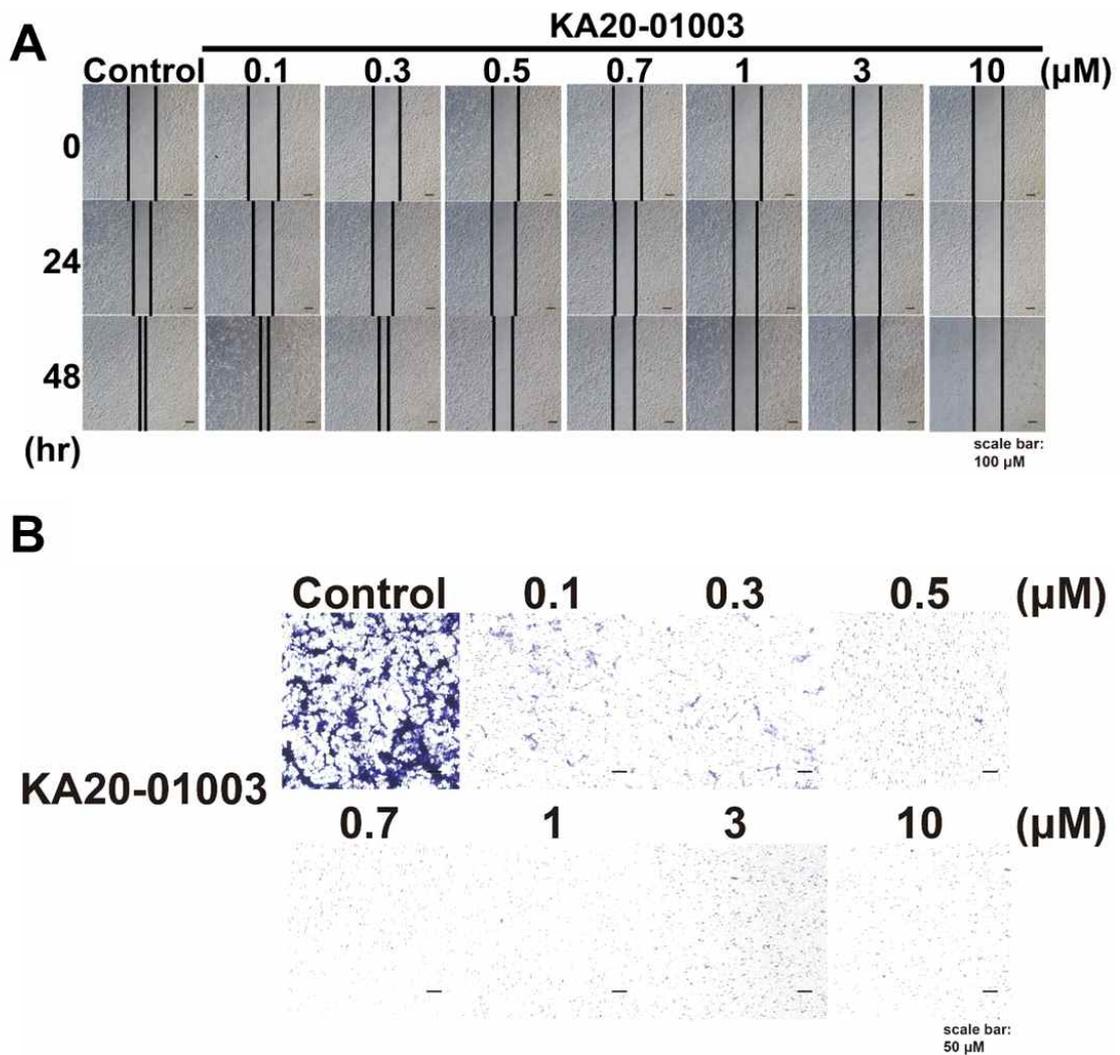


그림 34. KA20-01003가 유방암 세포 HS578T의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 유방암 세포 HS578T에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 유방암 세포 HS578T에 KA20-01003 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

8. 다른 암종에서의 KA20-01007가 세포 성장, 집락 형성, 이동 및 침습성에 미치는 영향

연구 결과 6을 통해 KA20-01007의 폐암 이외의 다른 암종에서 유비퀴틴 활성화 및 전달 억제 효과를 Ubiquitin charging assay를 이용해 확인했다. KA20-01007은 다른 암종에서도 UBA6에 대한 특이성을 나타냄을 확인했고 이를 통해 세포 증식, 집락 형성, 이동 및 침습 능력을 감소시키는 것을 확인하고자 실험을 진행했다. PC3, AGS, HCT116, HS578T에 KA20-01007을 0.1-10 μM 농도로 처리했다. 각 세포에서 UBA6가 억제되는 농도에서 세포 증식, 집락 형성, 이동 및 침습 능력이 감소하는 것을 확인했다. 세포 증식은 Cell Titer Glo를 이용해 측정하였고, 세포 증식이 대조군에 비해 감소함을 확인했다. 세포 집락 형성에서도 마찬가지로 집락 형성이 감소함을 관찰했다 (그림 35-38). 이후 세포의 이동 및 침습 능력을 확인하기 위해 상처 치유 분석 및 트랜스 웰 침습 분석을 실시했다. 각 세포에 KA20-01007을 0.1-10 μM 농도로 처리했다. 상처 치유 분석은 스크래치를 회복함을 통해 세포의 이동성을 확인했으며, UBA6를 억제하는 농도에서 세포의 이동성이 감소함을 확인했다. 또한 트랜스 웰 침습 분석을 통해 matrigel matrix를 침습하여 트랜스 웰 하부 챔버에 침습되는 세포를 확인했을 때도 세포의 침습성이 감소함을 관찰했다 (그림 39-42). 결과적으로 KA20-01007을 통해 폐암 이외의 다른 암종에서 세포의 증식, 집락 형성, 이동성 및 침습성이 감소함을 나타냈다.

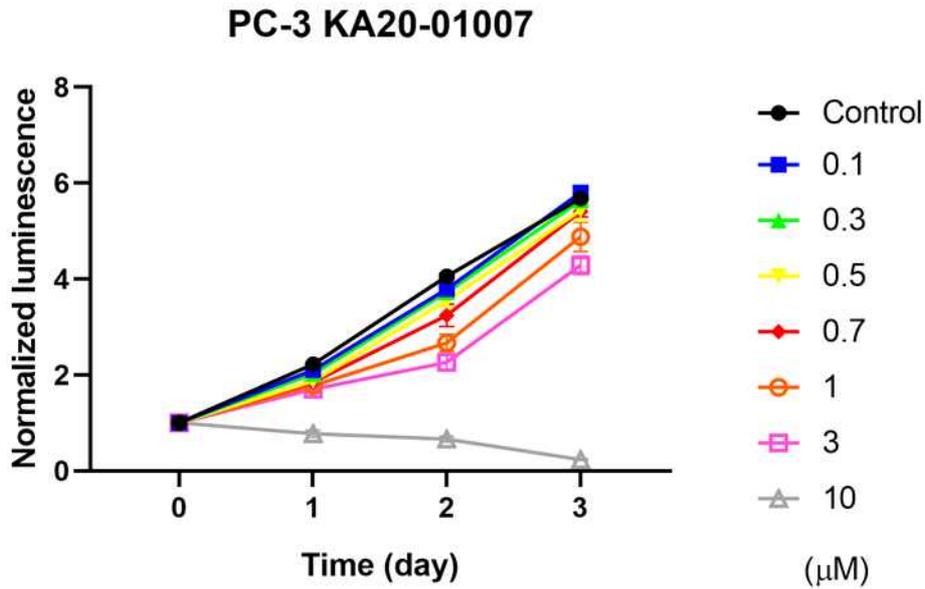
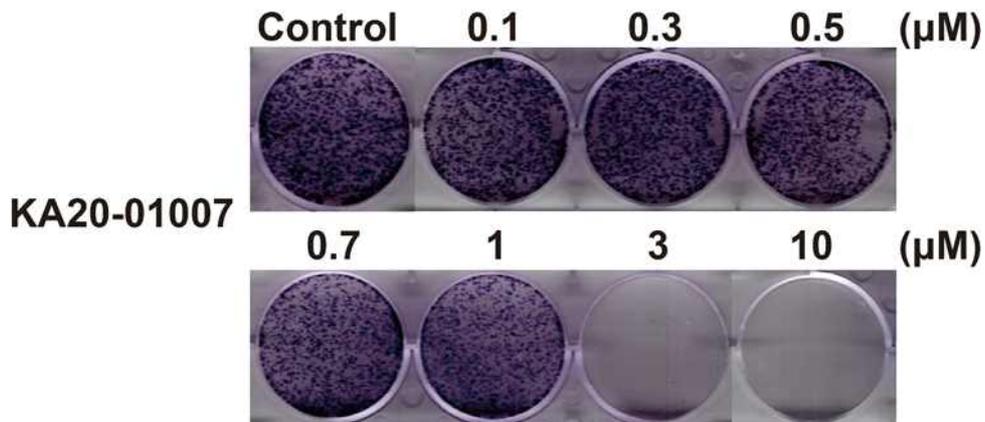
A**B**

그림 35. KA20-01007가 전립선 암세포 PC3의 성장에 미치는 영향. (A) 전립선 암세포 PC3에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 전립선 암세포 PC3에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

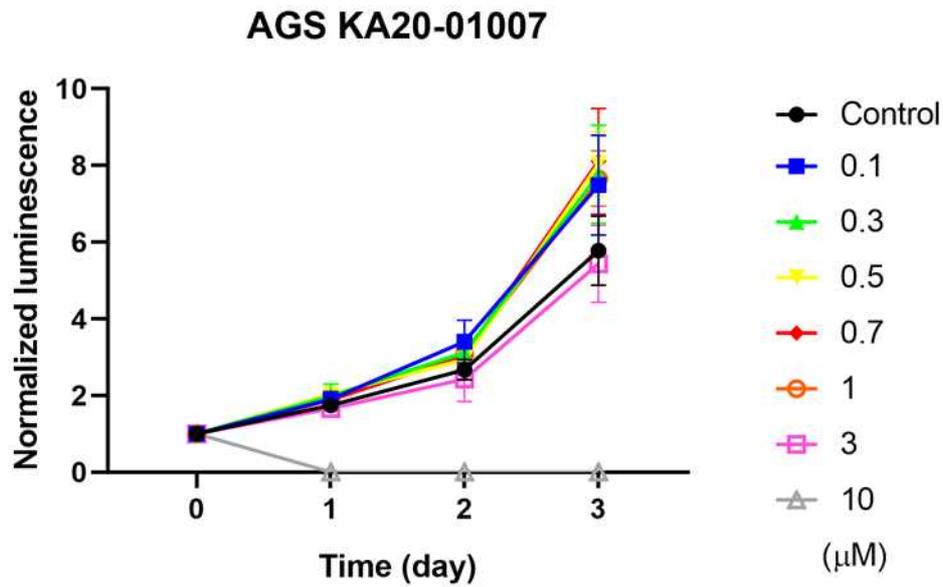
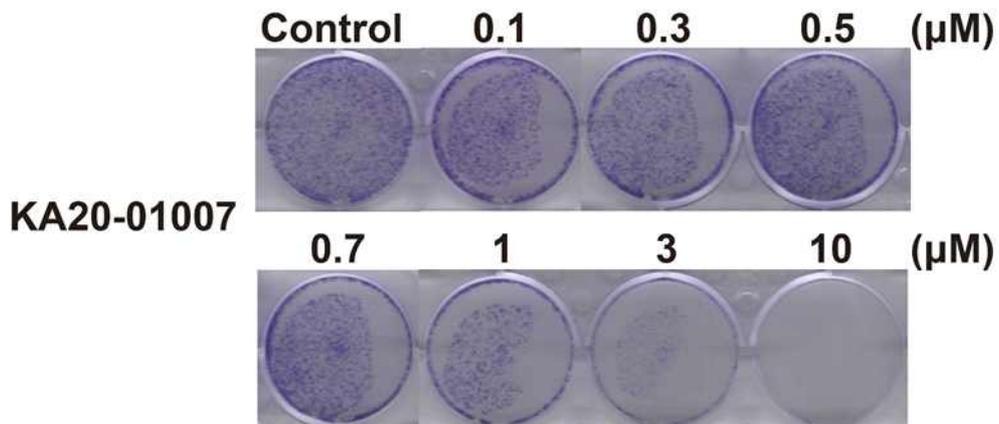
A**B**

그림 36. KA20-01007가 위암 세포 AGS의 성장에 미치는 영향. (A) 위암 세포 AGS에 KA20-01007 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 위암 세포 AGS에 KA20-01007 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

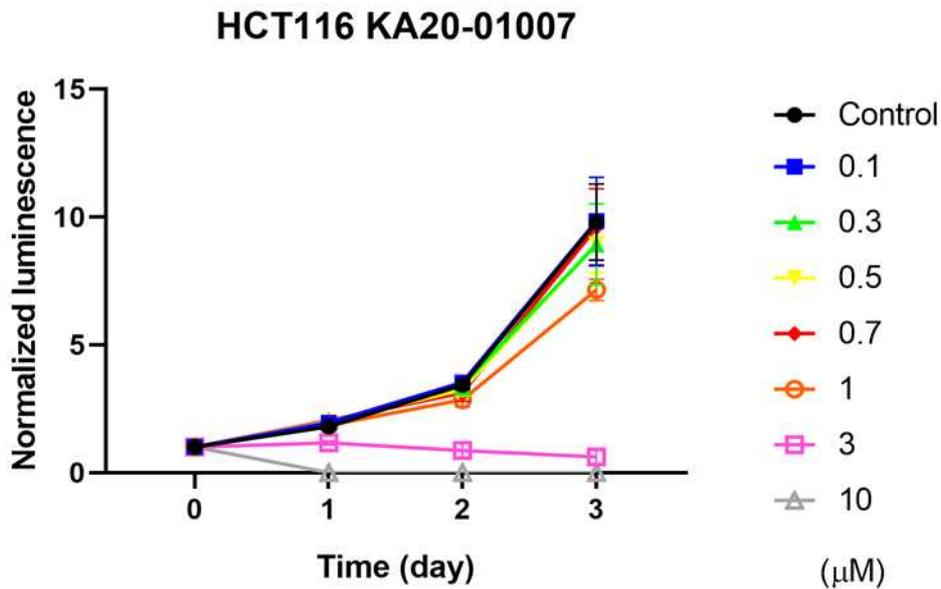
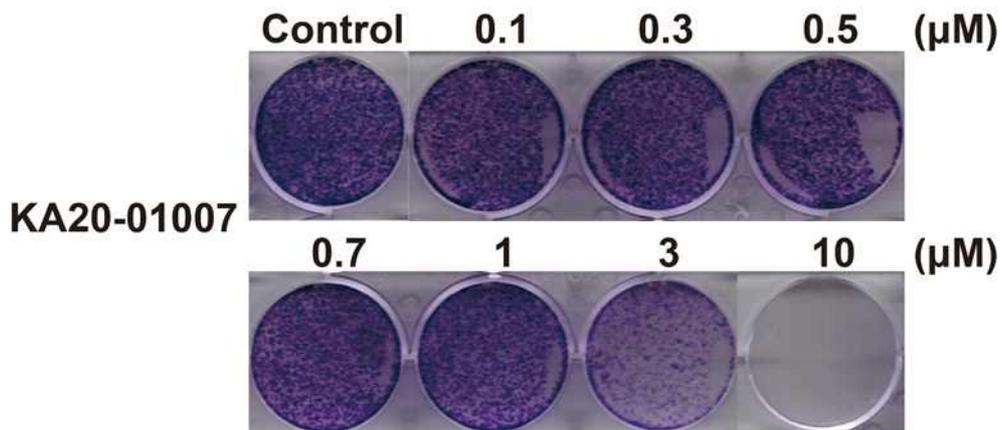
A**B**

그림 37. KA20-01007가 대장암 세포 HCT116의 성장에 미치는 영향. (A) 대장암 세포 HCT116에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 대장암 세포 HCT116에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

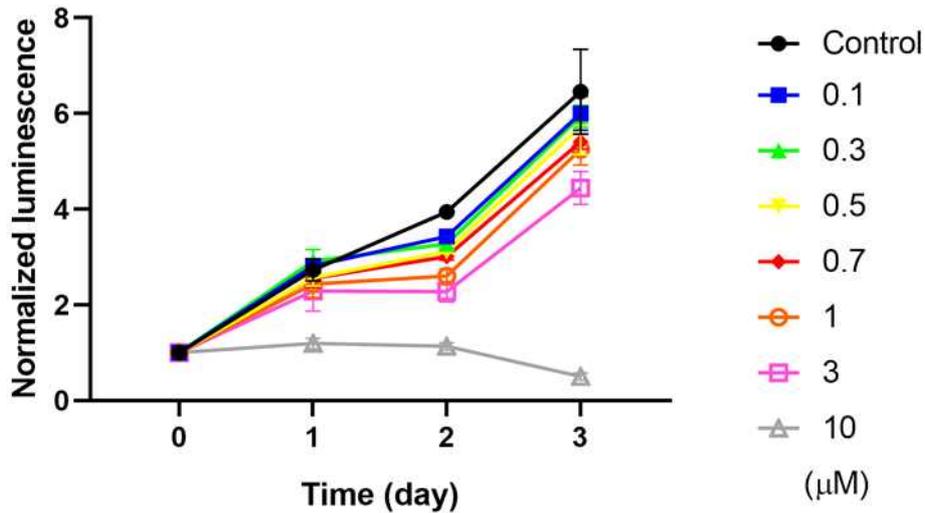
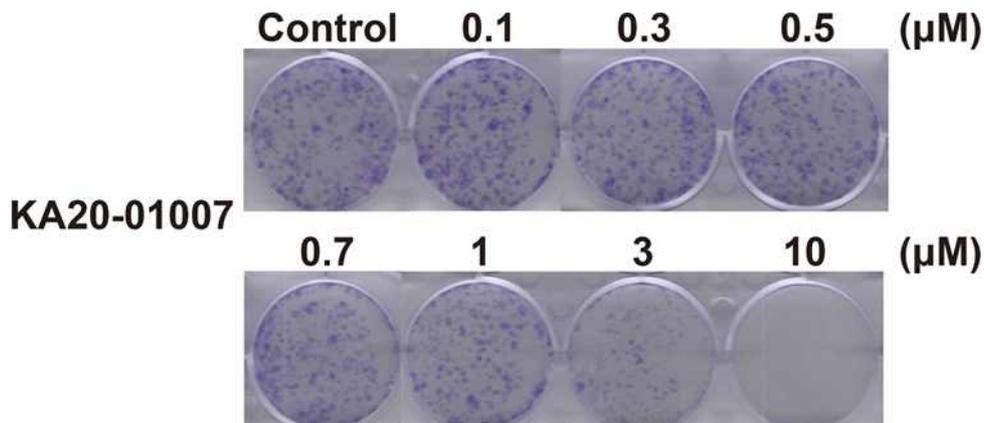
A**HS578T KA20-01007****B**

그림 38. KA20-01007가 유방암 세포의 성장에 미치는 영향. (A) 유방암 세포 HS578T에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 cell viability를 Cell-Titer-Glo luminescent assay를 통해 측정했다 (Control을 통해 normalized 했음, n=4). (B) 유방암 세포 HS578T에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 세포 증식을 확인했다. 10일 배양한 후 crystal violet로 염색했다.

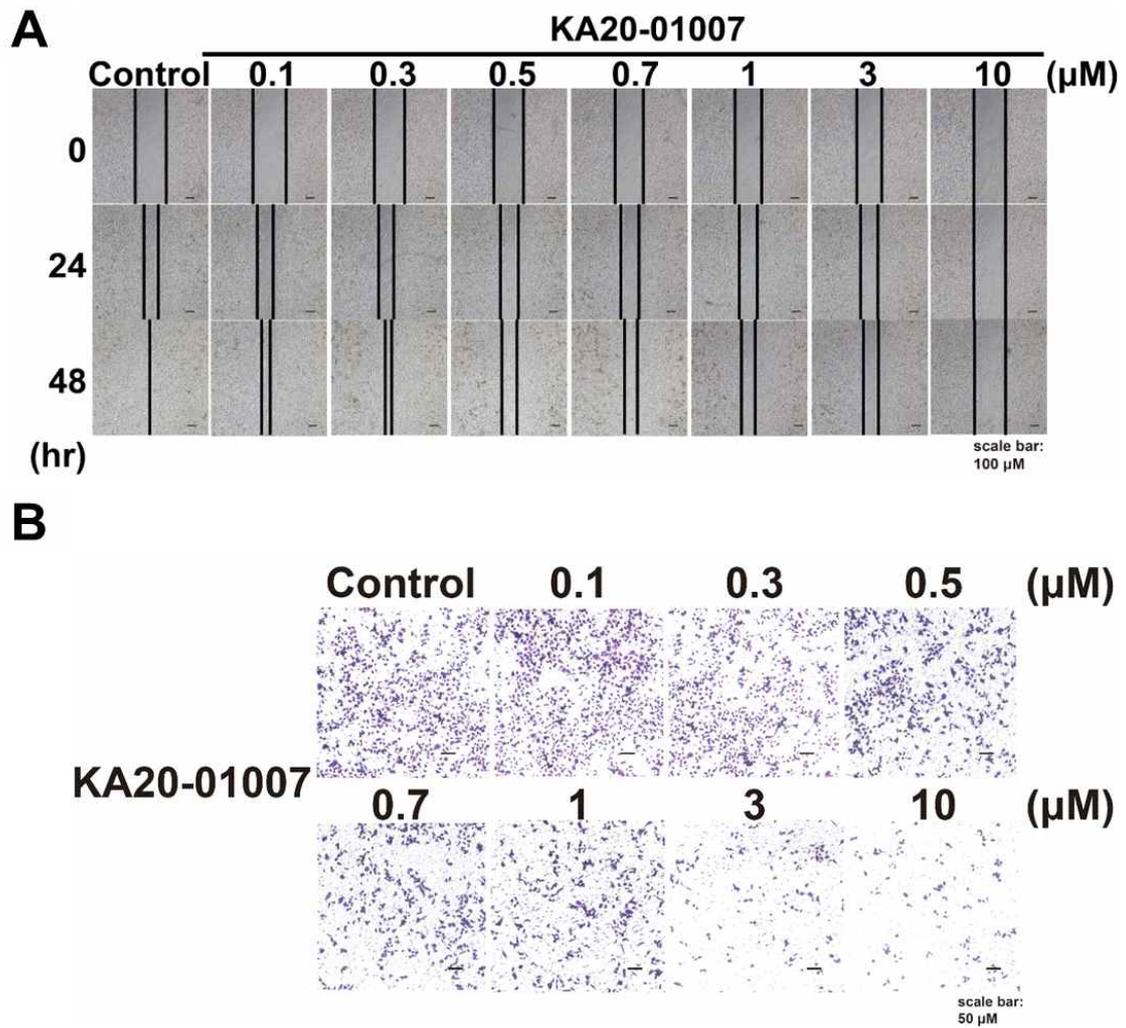


그림 39. KA20-01007가 전립선 암세포 PC3의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 전립선 암세포 PC3에 KA20-01007 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 전립선 암세포 PC3에 KA20-01007 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

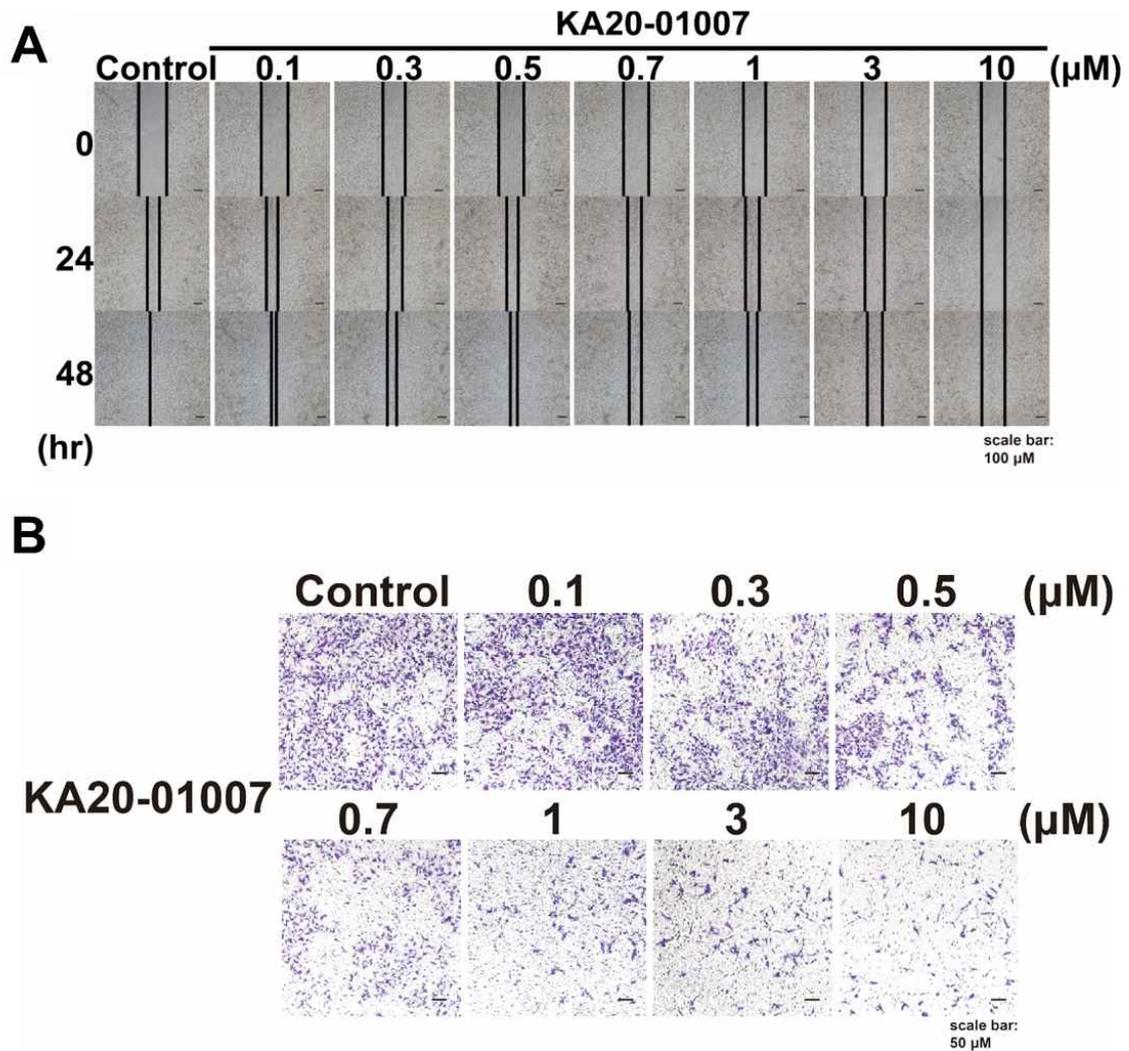


그림 40. KA20-01007가 위암 세포 AGS의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 위암 세포 AGS에 KA20-01007 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 위암 세포 AGS에 KA20-01007 (0.1 μM-10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

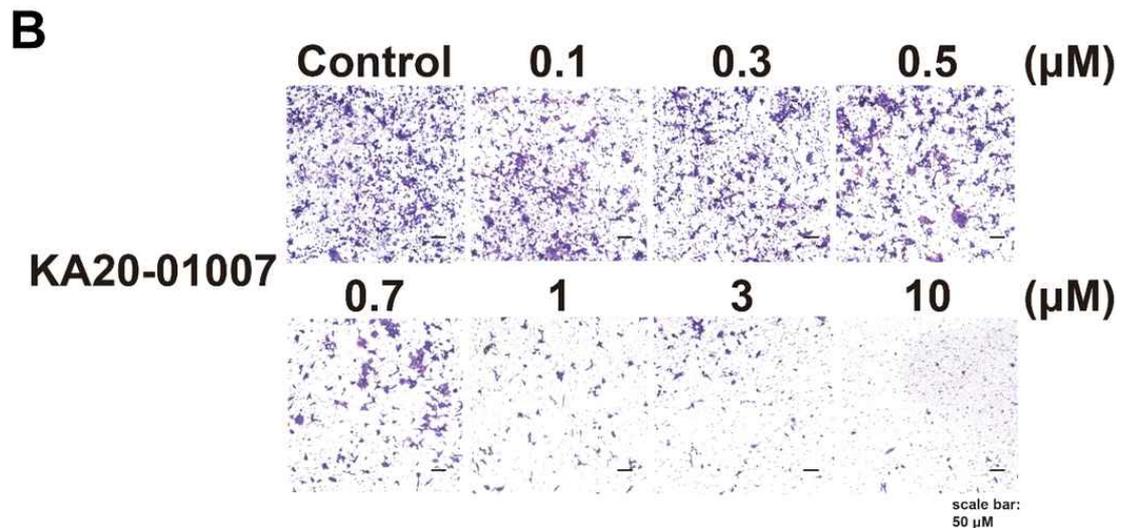
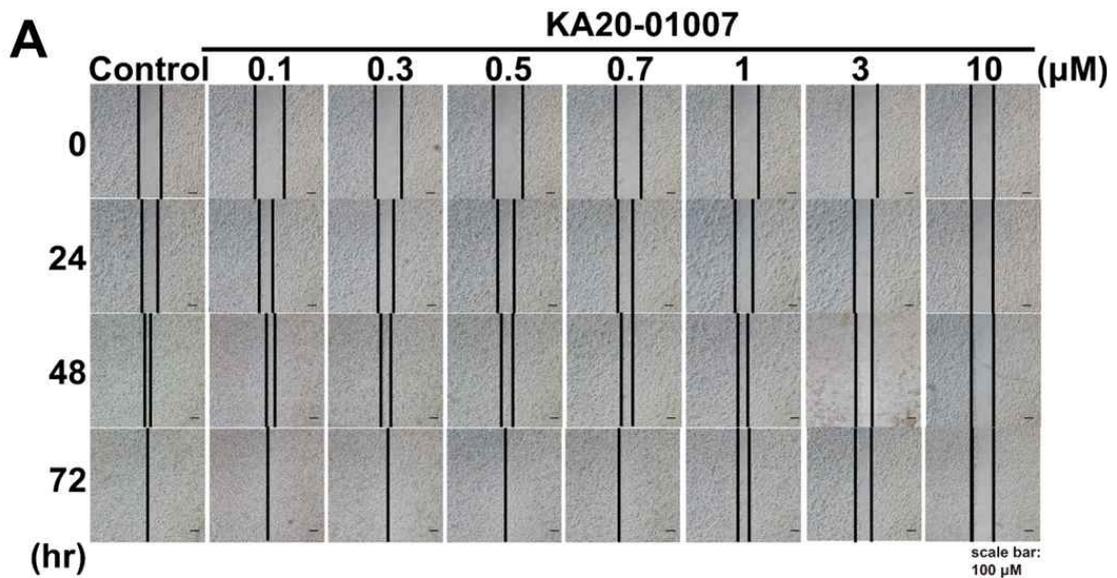


그림 41. KA20-01007가 대장암 세포 HCT116의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 대장암 세포 HCT116에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 72시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 대장암 세포 HCT116에 KA20-01007 (0.1 μM -10 μM) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

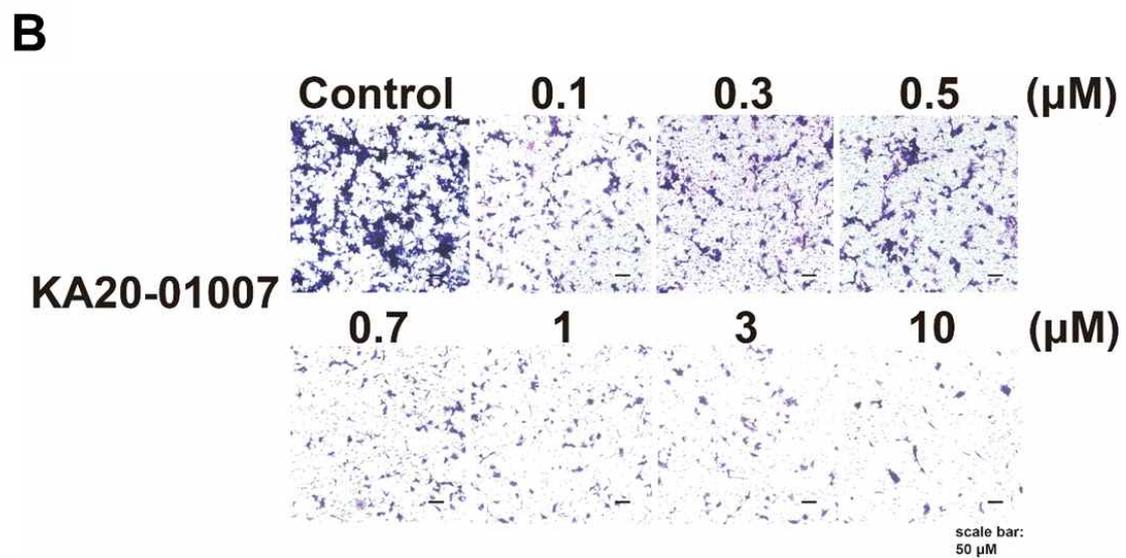
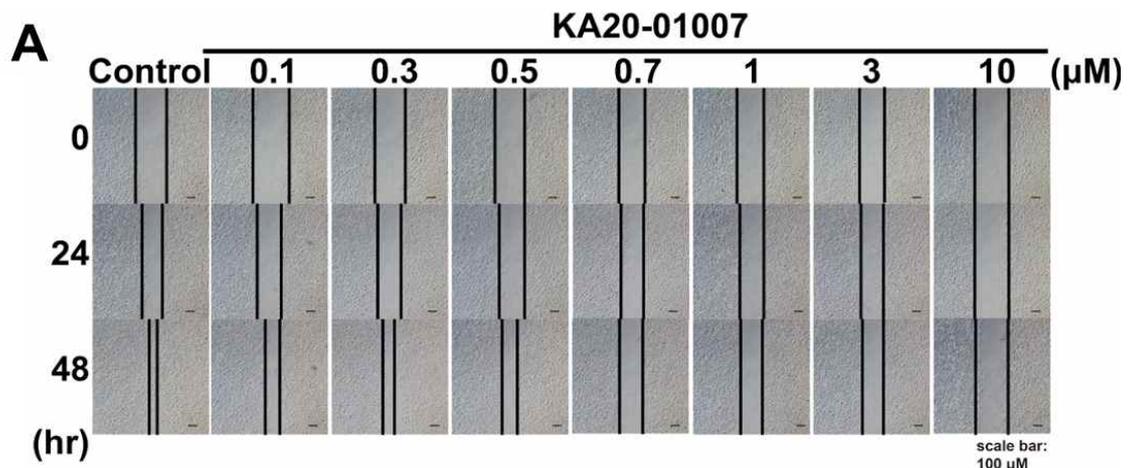


그림 42. KA20-01007가 유방암 세포 HS578T의 이동성 및 침습성에 미치는 영향. (A) 상처 치유 분석을 통해 유방암 세포 HS578T에 KA20-01007 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 이동성을 확인했다. 24시간 주기로 48시간 동안 관측하였다. (B) 트랜스웰 침습 분석을 통해 유방암 세포 HS578T에 KA20-01007 (0.1 μ M-10 μ M) 처리 후 침습성을 확인했다. 트랜스웰을 이용하여 세포를 배양한 후 36시간 후 crystal violet으로 염색하여 관찰했다.

9. KA20-01007의 유비퀴틴 활성화 및 전달 억제를 통한 세포 사멸 유도

연구 결과 2를 통해 KA20-01007이 UBA6에 특이성을 가지며, 유비퀴틴 활성화 및 E2 효소로의 전달을 억제함을 확인했다. 또한 연구 결과 4를 통해 KA20-01007을 사용했을 때 세포의 증식, 집락 형성, 이동성 및 침습성이 감소함을 관찰했다. 결과적으로 UBA6의 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달을 억제함으로써 인해 일어나는 세포 신호 전달에서의 단백질들을 확인하고자 실험을 진행했다. KA20-01007을 0-10 μ M 농도로 16시간 처리했다. 이 후 세포를 1% SDS 용해 버퍼를 이용해 용해시켰다. 용해시킨 단백질을 SDS-PAGE를 통해 크기별로 분리한 후 웨스턴 블롯을 통해 단백질을 검출했다. 결과는 p53 단백질의 발현이 농도에 따라 증가하였고, 하위 신호로 존재하는 p21 단백질의 발현도 증가했다. 또한 세포 사멸 단백질로 알려져 있는 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 단백질의 절단된 형태도 증가되었으며, Caspase 3 단백질의 절단된 형태도 증가함을 확인했다 (그림 43). 이 실험의 결과로 KA20-01007이 세포 내 p53과 p21의 발현을 증가시키고, 세포 사멸 관련 단백질인 PARP, Caspase 3 단백질의 활성화가 유도됨을 보임으로써 KA20-01007이 세포 사멸을 유도할 가능성이 있다.

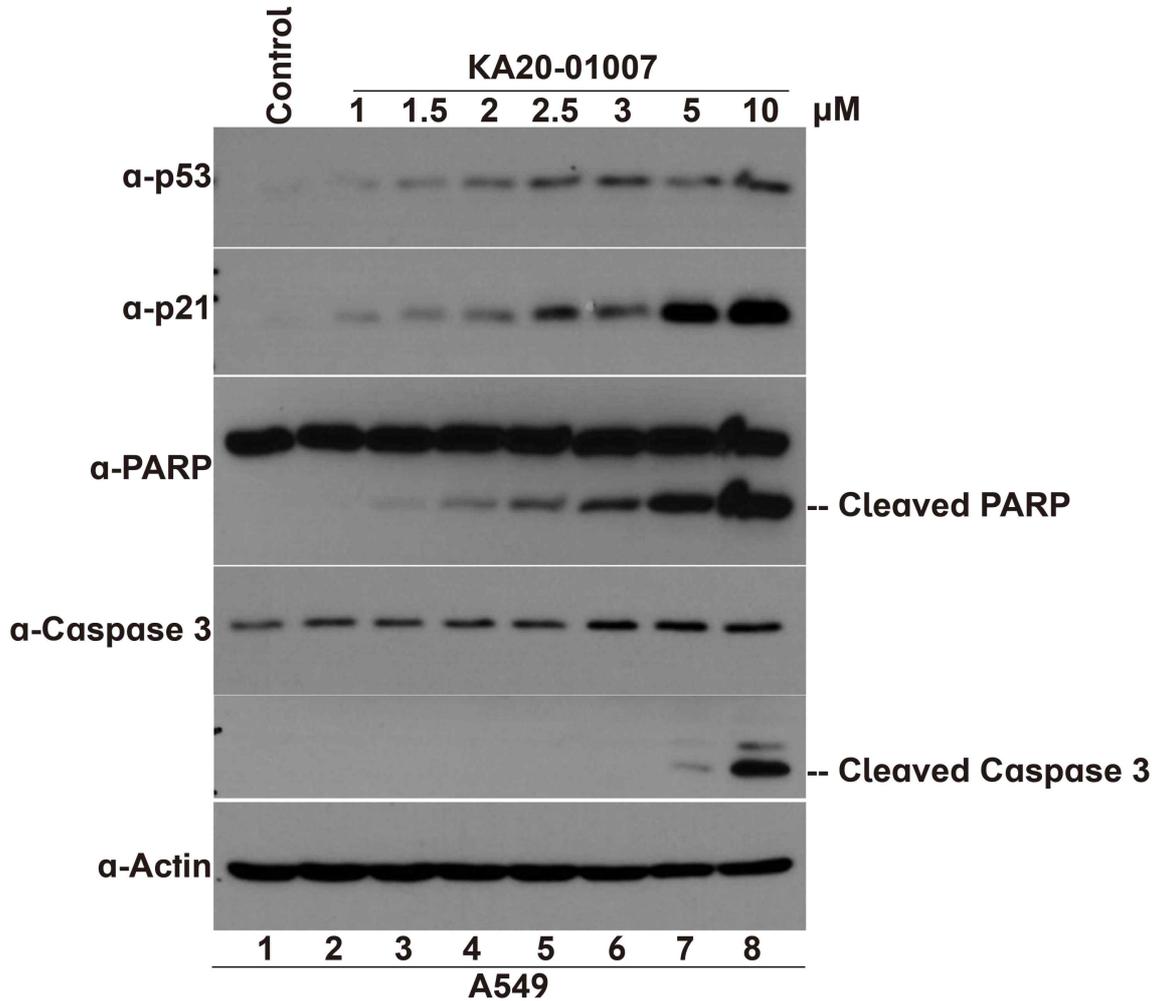


그림 43. KA20-01007 처리에 따른 세포 사멸 유도. A549 세포에 KA20-01007을 0-10 μM 의 농도로 처리한 후, 각각의 단백질 발현을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. p53, p21, PARP, 절단된-PARP, 절단된-Caspase 3 및 Actin단백질의 발현을 각각 검출하였다. Actin은 로딩 컨트롤로 사용되었다. 결과에서 p53 및 p21 단백질의 발현은 KA20-01007 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으며, PARP 및 Caspase 3의 절단 된 형태 역시 증가하였음을 확인할 수 있다.

10. 마우스 이종이식 모델에서 KA20-01007의 효과

KA20-01007이 KA20-01003에 비해 UBA6에 대한 선택성이 더 높다는 것을 확인했다. 이 연구에서는 KA20-01007이 폐암 세포의 증식, 집락 형성, 이동성 및 침습성을 억제하는 효과가 있음을 밝혔다. 이러한 세포 실험 결과를 바탕으로, KA20-01007이 생체 내에서도 유사한 억제 효과를 발휘하는지를 검증하기 위해 면역 결핍 마우스를 이용한 이종이식 실험을 진행했다. 실험에서는 A549 폐암 세포를 1×10^7 cell개 세포로 준비하여, 각 면역 결핍 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 주사로 주입하였다. 종양의 크기가 일정 크기에 도달하면, 마우스들을 무작위로 3개의 그룹으로 나누어 각각 6마리씩 배치했다 (n=6). 각 그룹은 KA20-01007의 처리 그룹 두 개와 대조군으로 구성됐다. KA20-01007의 농도 설정은 세포 실험에서 사용한 농도를 기준으로 하였으며, 이를 마우스의 체중 20 g에 맞추어 계산하여 12.5 mg/kg 및 50 mg/kg의 두 가지 농도를 사용했다. 대조군인 Vehicle 그룹은 KA20-01007을 녹인 용매를 동일한 방식으로 투여했다. 약물은 2~3일 간격으로 피하 주사 형태로 투여되었으며, 실험 기간 동안 마우스의 체중 변화와 종양의 크기를 주기적으로 측정했다. 결론적으로, KA20-01007 처리 그룹에서는 마우스의 체중 감소가 관찰되지 않았으며, 종양의 크기와 무게가 유의미하게 감소함을 확인했다. 특히, 높은 농도 (50 mg/kg)의 KA20-01007을 투여한 그룹에서 종양 억제 효과가 더욱 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과는 KA20-01007이 폐암 세포의 증식을 억제하는 효과가 있음을 생체 내에서도 입증하는 것으로, 향후 폐암 치료제 개발에 중요한 기초 자료가 될 수 있다 (그림 44).

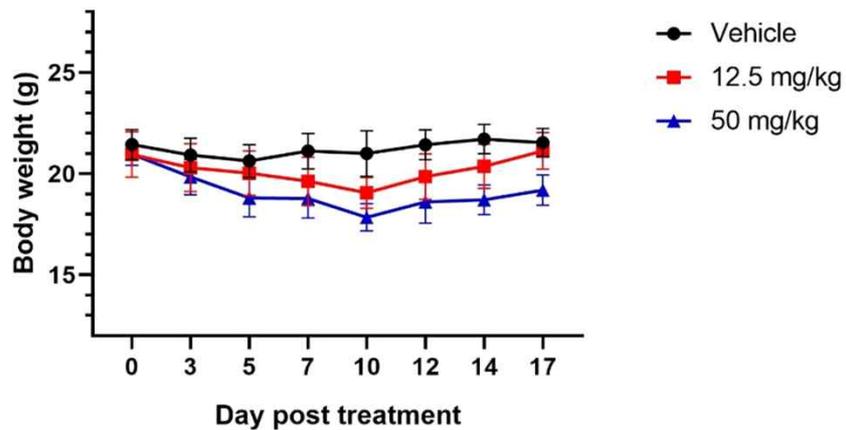
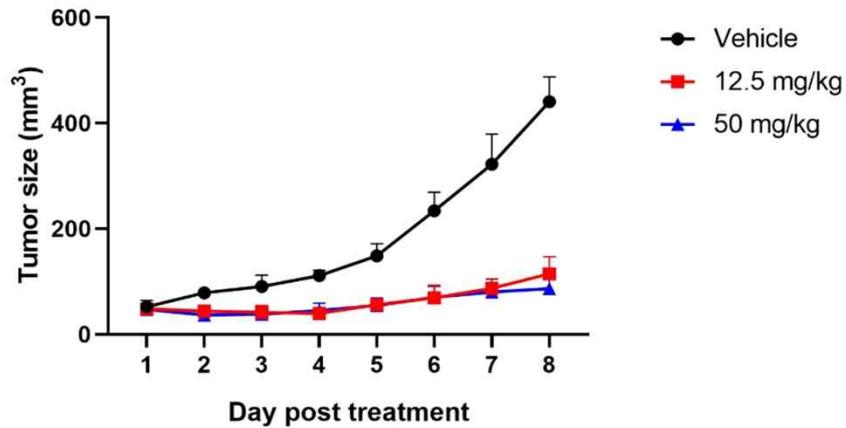


그림 44. KA20-01007의 생체내 치료 효과를 확인하기 위한 이종 이식 및 치료 실험. 생체의 A549 세포를 마리당 1×10^7 cell만큼 누드 마우스 피하에 이종 이식한 후, 종양의 크기가 일정크기에 도달했을 때 실험을 시작하였다. 음성 대조군으로 약물이 없는 용매를 사용하여 치료 효과를 확인하였다. 암 조직의 부피와 마우스 개체의 체중을 측정하여 치료 효과 및 부작용 여부를 확인하였고 암 조직을 적출 하여 촬영하였다. 실험 결과 KA20-01007을 투여한 그룹에서 종양의 부피가 감소하였고, 몸무게는 줄지 않았음을 확인할 수 있다. (n=6)

V. 고찰 및 결론

폐암은 많은 연구가 진행된 현재까지도 비교적 타 암종에 비해 높은 사망률을 가지며, 이는 제한된 치료방법 선택지와 화학요법 내성 등의 문제 때문이다. 폐암 치료를 위해 UPS를 통한 새로운 치료 타겟을 발굴하고자 실험을 진행했다[1, 2, 5, 8].

본 연구에서 UPS에서 시작되는 효소인 UBE1과 UBA6에 대한 유비퀴틴 활성화 및 E2로의 전달을 억제하는 화합물인 KA20-01003, KA20-01007을 통해 실험을 진행했다. 이 화합물은 유비퀴틴의 전달을 억제하여 E1에 연결되지 못하게 하고, 연쇄작용을 통해 E2로의 전달을 억제한다.

KA20-01007이 KA20-01003보다 UBA6-USE1에 더 특이성을 가지는 것을 확인했다. E1 효소는 두 가지밖에 알려져 있지 않다. 이 중 UBE1은 UBA6에 비해 특이성을 보이는 E2 효소가 많이 존재하고 있기 때문에 UBE1을 억제한다면 심각한 부작용이 나올 것이라 예측된다. 그렇기에 UBA6의 경우 UBE1에 비해 특이성을 보이는 E2가 적으며 특히 USE1의 경우는 UBA6만이 조절할 수 있는 E2로 알려져 있다[12, 25]. 이러한 UBA6-USE1을 조절할 수 있는 화합물이 있다면 UBE1을 조절하는 것에 비해 낮은 부작용을 보여줄 수 있을 것이다.

최근 연구에서 USE1이 폐암에서 높은 발현양을 나타냄으로 인해 폐암의 증식, 집락 형성, 이동 및 침습성을 증가시킨다는 보고가 있었다[17]. 본 연구의 결과에 따르면, UBA6-USE1의 연쇄작용을 억제하는 KA20-01007을 이용하여 UPS를 제어하면 폐암 세포의 증식과 집락형성, 이동성 및 침습성을 감소시킬 수 있었다. UBA6-USE1에 대한 연쇄작용은 폐암 뿐 아니라 다른 암종에서도 UBA6-USE1의 유비퀴틴 전달을 억제하고 세포의 증식 및 이동성, 침습성을 억제하는 결과를 나타냈기 때문에 효용가치가 더 높을 것이라 예상된다.

또한 UBA6 단백질을 원인으로 하는 다른 질병 등에도 적용이 가능할 것으로 사료된다. 본 연구에서 발굴한 소분자 화합물은 유비퀴틴 연쇄작용 및 활성화를 억제하기 때문에 UBA6를 통한 문제에서 해결할 능력을 가지고 있다.

다른 연구에서 이노신을 통해 UBA6를 억제함으로써 종양의 면역원성과 면역 반응을 증강시킬 수 있다고 밝혔다[26]. 이 연구 결과는 UBA6를 표적으로 한 KA20-01007의 암 면역 치료에서의 큰 잠재력을 나타낸다. KA20-01007을 통해 UBA6의 억제가 이루어지면 종양의 면역원성을 증가시키고 면역 반응을 증강시켜 암 면역 치료의 결과를 향상시킬 수 있는 가능성이 크다. KA20-01007과 면역 체크포인트 억제제를 함께 사용하면 종합적인 암 치료 전략에 도움 될 것이다.

UBA6 단백질의 발현량 조절은 철 관련 질환의 예방에도 사용될 수 있다[27]. 본 연구에서는 UBA6와 NDFIP1이 ferroportin의 유비퀴틴화를 통해 분해를 조절하는 중요한 역할을 한다는 사실을 밝혀냈다. 이를 바탕으로, UBA6의 활성을 억제함으로써 ferroportin의 안정성을 높일 수 있다. UBA6의 활성을 억제하여 ferroportin의 유비퀴틴화를 감소시키고 분해를 억제하면 ferroportin이 유지되어 세포 내의 철 배출을 촉진해 철 대사의 균형을 회복할 것이다. 이러한 결과는 KA20-01007을 사용하여

UBA6의 활성을 조절하여 철 관련 질환을 예방하고 치료하는 데 유망한 접근법이 될 수 있음을 시사한다.

다른 접근으로는 UBA6의 자가포식과의 연관성을 활용할 수 있다. UBA6와 BIRC6는 LC3의 유비퀴틴화를 촉진하여 LC3의 분해를 유도한다[28]. UBA6의 활성을 KA20-01007을 이용해 억제함으로써 LC3의 분해를 막아 자가포식과 관련한 질환의 치료에도 새로운 치료 타겟이 될 수 있다.

USE1은 폐암 이외에 간암에서도 높게 발현 된 것을 확인했고 USE1의 발현을 억제하거나 과발현 시킴을 통해 세포의 증식, 이동성, 침습성이 촉진되었다. 반대로 발현을 억제하면 감소했다[29]. 결과적으로 USE1을 조절함으로써 간암에서 종양 발달을 억제할 수 있다. KA20-01007을 사용시 UBA6-USE1을 통하는 유비퀴틴의 전달 및 활성을 제어함으로써 간암의 치료하는 타겟이 될 수 있다.

UBA6는 유비퀴틴 외에도 유비퀴틴 유사 단백질인 FAT10을 활성화하는 특이적인 E1 효소로 잘 알려져 있으며, 같은 경로에서 USE1도 특이적인 E2 효소로 작용한다 [30-32]. UBA6는 뇌 발달, 암 진행 및 다양한 생리적 과정에 중요한 역할을 함을 시사한다[33-36]. 특히 UBA6와 FAT10의 상호작용 및 그 구조적 특성은 FAT10ylation 과정을 이해하고, 이를 통해 질병 발병기전을 밝히는 데 중요하다[37]. UBA6와 FAT10의 구조는 현재 밝혀져 있으며, 이들은 서로 다른 부위에 결합하여 기능한다 [38, 39]. UBA6는 유비퀴틴화에는 영향을 미치지 않으면서 FAT10ylation에는 선택적으로 영향을 주는 것으로 나타났다. 이는 UBA6가 특정 상황에서 FAT10과의 상호작용을 통해 특정 단백질을 조절할 수 있음을 의미한다. KA20-01007은 UBA6의 FAT10ylation을 선택적으로 억제하는 데 사용 될 수도 있다. 유비퀴틴과 결합하는 부위가 다르기에 KA20-01007을 좀 더 변형시켜 이용해 볼 수 있을 것이다.

더 나아가 KA20-01007과 마찬가지로 UBA6에 대한 선택성이 높은 화합물 이외에도, 구조를 변형시킴을 통해 유비퀴틴 유사 단백질과 관련된 E1 효소들에 억제 효과를 낼 수 있는 새로운 화합물을 만들 수 있을 것이다. 예를 들어 이전에 알려져 있던 AMP 유사체인 E1 억제제 TAK-243, MLN4924, ML-792, TAK-981등이 있으며, 이들은 아데노신 설파메이트의 구조나 리보스 구조, 뉴클레오베이스 구조를 변형을 주며 E1에 대한 선택성을 확인해 볼 수 있을 것이다[18, 40-42]. 이 접근법을 통해 UBA6와 같은 특정 E1 효소를 표적으로 하여 암 치료에서의 새로운 가능성을 열 수 있다.

본 연구의 결과들을 종합했을 때, KA20-01007 화합물은 폐암뿐만 아니라 다른 암 종에서도 유비퀴틴의 전달을 억제하여 암 증식을 억제할 수 있음을 확인했다. 또한 동물 실험에서도 세포주 수준 실험과 마찬가지로 폐암 성장 억제 효과를 보였고, 이는 추후 임상 적용 가능성 또한 기대할 수 있다.

VI. 참고문헌

1. de Toro, M., et al., *New potential targeted strategies in small cell lung cancer*. *Transl Lung Cancer Res*, 2023. **12**(4): p. 661-664.
2. Torre, L.A., R.L. Siegel, and A. Jemal, *Lung Cancer Statistics*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **893**: p. 1-19.
3. Hamann, H.A. and J.L. Pujol, *Introduction to the Special Section: The Experience and Impact of Lung Cancer Stigma*. *J Thorac Oncol*, 2018. **13**(8): p. 1053-1054.
4. Delahaye, C., et al., *Early Steps of Resistance to Targeted Therapies in Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(11).
5. Ettinger, D.S., et al., *Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017. **15**(4): p. 504-535.
6. Gazdar, A.F., *Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Oncogene*, 2009. **28 Suppl 1**(Suppl 1): p. S24-31.
7. Ganti, A.K., et al., *Update of Incidence, Prevalence, Survival, and Initial Treatment in Patients With Non-Small Cell Lung Cancer in the US*. *JAMA Oncol*, 2021. **7**(12): p. 1824-1832.
8. Hirsch, F.R., et al., *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments*. *Lancet*, 2017. **389**(10066): p. 299-311.
9. Sandler, A.B., D.H. Johnson, and R.S. Herbst, *Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(12 Pt 2): p. 4258s-4262s.
10. Liu, Y.C., et al., *Managing Persistent Subsolid Nodules in Lung Cancer: Education, Decision Making, and Impact of Interval Growth Patterns*. *Diagnostics (Basel)*, 2023. **13**(16).
11. Nandi, D., et al., *The ubiquitin-proteasome system*. *J Biosci*, 2006. **31**(1): p. 137-55.
12. Jin, J., et al., *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. *Nature*, 2007. **447**(7148): p. 1135-8.
13. Spano, D. and G. Catara, *Targeting the Ubiquitin-Proteasome System and Recent Advances in Cancer Therapy*. *Cells*, 2023. **13**(1).
14. Kim, Y.J., et al., *Ubiquitin-proteasome system as a target for anticancer treatment-an update*. *Arch Pharm Res*, 2023. **46**(7): p. 573-597.
15. Park, J., J. Cho, and E.J. Song, *Ubiquitin-proteasome system (UPS) as*

- a target for anticancer treatment.* Arch Pharm Res, 2020. **43**(11): p. 1144-1161.
16. Ye, Z., et al., *The roles of protein ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery in lung cancer.* Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1220108.
 17. Kim, S.J., et al., *Association of Uba6-Specific-E2 (USE1) With Lung Tumorigenesis.* J Natl Cancer Inst, 2017. **109**(3): p. 1-11.
 18. Soucy, T.A., et al., *An inhibitor of NEDD8-activating enzyme as a new approach to treat cancer.* Nature, 2009. **458**(7239): p. 732-6.
 19. Brownell, J.E., et al., *Substrate-assisted inhibition of ubiquitin-like protein-activating enzymes: the NEDD8 E1 inhibitor MLN4924 forms a NEDD8-AMP mimetic in situ.* Mol Cell, 2010. **37**(1): p. 102-11.
 20. Zhou, L., et al., *NEDD8-conjugating enzyme E2s: critical targets for cancer therapy.* Cell Death Discov, 2023. **9**(1): p. 23.
 21. Lan, H., et al., *Neddylation inhibitor MLN4924 suppresses growth and migration of human gastric cancer cells.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 24218.
 22. Lan, C., et al., *An Integrative Pan-Cancer Analysis Revealing MLN4924 (Pevonedistat) as a Potential Therapeutic Agent Targeting Skp2 in YAP-Driven Cancers.* Front Genet, 2022. **13**: p. 866702.
 23. Du, M.G., et al., *The Absence of PTEN in Breast Cancer Is a Driver of MLN4924 Resistance.* Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 667435.
 24. Lee, P.C., et al., *Alternative ubiquitin activation/conjugation cascades interact with N-end rule ubiquitin ligases to control degradation of RGS proteins.* Mol Cell, 2011. **43**(3): p. 392-405.
 25. Groettrup, M., et al., *Activating the ubiquitin family: UBA6 challenges the field.* Trends Biochem Sci, 2008. **33**(5): p. 230-7.
 26. Zhang, L., et al., *Inhibition of UBA6 by inosine augments tumour immunogenicity and responses.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 5413.
 27. Traeger, L., et al., *UBA6 and NDFIP1 regulate the degradation of ferroportin.* Haematologica, 2022. **107**(2): p. 478-488.
 28. Jia, R. and J.S. Bonifacino, *Negative regulation of autophagy by UBA6-BIRC6-mediated ubiquitination of LC3.* Elife, 2019. **8**.
 29. Shi, X., et al., *Upregulation of ubiquitin-conjugating enzyme E2Z is associated with human hepatocellular carcinoma.* Biochem Biophys Res Commun, 2020. **523**(1): p. 25-32.
 30. Chiu, Y.H., Q. Sun, and Z.J. Chen, *E1-L2 activates both ubiquitin and FAT10.* Mol Cell, 2007. **27**(6): p. 1014-23.
 31. Schulman, B.A. and J.W. Harper, *Ubiquitin-like protein activation by*

- E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 319-31.
32. Aichem, A., et al., *USE1 is a bispecific conjugating enzyme for ubiquitin and FAT10, which FAT10ylates itself in cis.* Nat Commun, 2010. **1**: p. 13.
 33. Kim, M.J., et al., *Early-stage paired housing improves social interaction in neuronal Uba6-deficient mice.* Biochem Biophys Res Commun, 2019. **514**(2): p. 545-549.
 34. Lee, P.C., et al., *Altered social behavior and neuronal development in mice lacking the Uba6-Use1 ubiquitin transfer system.* Mol Cell, 2013. **50**(2): p. 172-84.
 35. Lee, J.Y., et al., *Ubiquitin Activating Enzyme UBA6 Regulates Th1 and Tc1 Cell Differentiation.* Cells, 2021. **11**(1).
 36. Amer-Sarsour, F., et al., *Disease-associated polyalanine expansion mutations impair UBA6-dependent ubiquitination.* EMBO J, 2024. **43**(2): p. 250-276.
 37. Wang, F. and B. Zhao, *UBA6 and Its Bispecific Pathways for Ubiquitin and FAT10.* Int J Mol Sci, 2019. **20**(9).
 38. Xiang, S., et al., *FAT10: Function and Relationship with Cancer.* Curr Mol Pharmacol, 2020. **13**(3): p. 182-191.
 39. Yuan, L., et al., *Crystal structures reveal catalytic and regulatory mechanisms of the dual-specificity ubiquitin/FAT10 E1 enzyme Uba6.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 4880.
 40. Garcia, P., et al., *Effects of targeting sumoylation processes during latent and induced Epstein-Barr virus infections using the small molecule inhibitor ML-792.* Antiviral Res, 2021. **188**: p. 105038.
 41. Langston, S.P., et al., *Discovery of TAK-981, a First-in-Class Inhibitor of SUMO-Activating Enzyme for the Treatment of Cancer.* J Med Chem, 2021. **64**(5): p. 2501-2520.
 42. Arakawa, Y., et al., *Activity of the Ubiquitin-activating Enzyme Inhibitor TAK-243 in Adrenocortical Carcinoma Cell Lines, Patient-derived Organoids, and Murine Xenografts.* Cancer Res Commun, 2024. **4**(3): p. 834-848.

VII. Abstract

Lung cancer is characterized by high global incidence and mortality rates, necessitating ongoing research to identify effective therapeutic targets. Among these targets, the UBE1 protein, which is overexpressed in lung cancer tissues, has been implicated in promoting tumor growth. This study is dedicated to developing an inhibitor for the UBA6-UBE1 cascade, aiming to offer a novel approach to lung cancer treatment. Initially, we conducted a Ubiquitin charging assay to evaluate the enzyme inhibition potency and determine the optimal concentrations of potential candidate compounds. The assay confirmed that compounds KA20-01003 and KA20-01007 effectively inhibit the ubiquitin activation and transfer processes mediated by UBA6-UBE1. Furthermore, KA20-01007 was confirmed to have higher specificity for UBA6 compared to KA20-01003. Subsequently, we explored the biological implications of inhibiting the ubiquitin activation and transfer processes in lung cancer cells. The results indicated significant reductions in cell proliferation, colony formation, migration, and invasion capabilities. These inhibitory effects were also observed in other types of cancer cells. Further validation in a xenograft mouse model of lung cancer confirmed that KA20-01007 effectively suppressed the growth of tumor tissues *in vivo*. This study underscores the potential of this compound as an innovative therapeutic agent for lung cancer, suggesting its broad applicability across various cancer types.

Keywords : Ubiquitin-proteasome system; Ubiquitin like modifier activating enzyme 6; UBA6-specific E2 conjugating enzyme; Lung cancer