

## Deubiquitinase Otubain 1 as a Cancer Therapeutic Target

Dong Eun Kim<sup>1</sup>, Seon Min Woo<sup>2</sup> and Taeg Kyu Kwon<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keimyung University, 1095 Dalgubeoldae-ro, Dalseo-Gu, Daegu 42601, Korea

<sup>2</sup>Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 1095 Dalgubeoldae-ro, Dalseo-Gu, Daegu 42601, Korea

Received March 25, 2020 / Revised April 21, 2020 / Accepted April 21, 2020

The ubiquitin system uses ligases and deubiquitinases (DUBs) to regulate ubiquitin position on protein substrates and is involved in many biological processes which determine stability, activity, and interaction of the target substrate. DUBs are classified in six groups according to catalytic domain, namely ubiquitin-specific proteases (USPs); ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs); ovarian tumor proteases (OTUs); Machado Joseph Disease proteases (MJDs); motif interacting with Ub (MIU)-containing novel DUB family (MINDY); and Jab1/MPN/MOV34 metalloenzymes (JAMMs). Otubain 1 (OTUB1) is a DUB in the OTU family which possesses both canonical and non-canonical activity and can regulate multiple cellular signaling pathways. In this review, we describe the function of OTUB1 through regulation of its canonical and non-canonical activities in multiple specifically cancer-associated pathways. The canonical activity of OTUB1 inhibits protein ubiquitination by cleaving Lys48 linkages while its non-canonical activity prevents ubiquitin transfer onto target proteins through binding to E2-conjugating enzymes, resulting in the induction of protein deubiquitination. OTUB1 can therefore canonically and non-canonically promote tumor cell proliferation, invasion, and drug resistance through regulating FOXM1, ERα, KRAS, p53, and mTORC1. Moreover, clinical research has demonstrated that OTUB1 overexpresses with high metastasis in many tumor types including breast, ovarian, esophageal squamous, and glioma. Therefore, OTUB1 has been suggested as a diagnosis marker and potential therapeutic target for oncotherapy.

**Key words** : Cancer, deubiquitinases, E2 enzyme, OTUB1, protein stability

### 서 론

유비퀴틴화(ubiquitination)는 타겟 단백질에 유비퀴틴(ubiquitin)을 첨가하여 단백질의 안정화, 국소화, 활성화 및 상호작용을 바꿈으로써 다양한 생물학적 과정을 조절한다[15, 42]. Ubiquitin은 타겟 단백질의 lysine 잔기에 이소펩타이드(isopeptide)결합을 통하여 공유결합되고, E1 활성화(activating) 효소, E2 접합(conjugating) 효소, E3 리가아제(ligase) 효소에 의해 ubiquitination을 유도한다. E1에 결합하여 활성화된 ubiquitin은 E2으로 이동함으로써 E2-ubiquitin 접합체를 형성한다. 이 접합체를 인식한 E3 ligase 효소는 E2에 결합하여 직접적으로 타겟 단백질로 ubiquitin을 이동시킨다[10]. 이 과정이 반복될 경우, 타겟 단백질에 7개의 lysine 잔기(Lys6, 11, 27, 29, 33, 48, 63) 중 하나에 폴리유비퀴틴 사슬(polyubiquitin chain)이 형성된다. 대표적으로 Lys48 ubiquitin chain은 전형

적인 프로테아좀 매개 단백질 분해를 유도하는 반면, Lys63 ubiquitin chain은 리소좀 매개 단백질 분해, 상호작용 및 DNA 복구, 세포 내 신호전달과 같은 다양한 기능을 조절한다 [26, 28]. Ubiquitination 과정은 탈유비퀴틴화 효소(deubiquitinases, DUBs)에 의해 타겟 단백질의 Lys 잔기와 ubiquitin 사이의 isopeptide결합을 잘라냄으로써 억제될 수 있으며, 이 과정을 탈유비퀴틴화(deubiquitination)라고 한다[25]. DUBs는 인간에서는 100여종이 존재하며 촉매 domain에 따라 5개의 시스테인 프로테아제, 1개의 메탈로프로테아제로 총 6개의 그룹으로 나뉘어진다(Table 1). 1) 시스테인 프로테아제: ubiquitin specific proteases (USPs), ubiquitin C-terminal hydrolases (UCHs), ovarian tumor proteases (OTUs), Machado-joseph disease proteases (MJDs), MIU-containing novel DUB family (MINDY) protease; 2) 메탈로프로테아제: Jab1/MPN/MOV 34 metalloenzymes (JAMMs). DUBs는 프로테아좀 및 리소좀 의존적인 단백질 가수 분해 및 세포 주기 진행, 세포 사멸과 같은 다양한 세포 내 기능을 조절할 수 있으며, 암 뿐만 아니라 신경퇴행성질환 및 전염성 질환과 같은 다양한 질병에도 관여한다[34, 35]. 따라서, DUBs는 항암 및 질병치료를 위한 약물 개발에 있어 전략적 타겟이 될 수 있다.

OTU 그룹에 속하는 otubain 1 (OTUB1)은 다양한 암에서 발현이 높으며 세포사멸 및 증식, 전이, 항암제 내성을 조절한다고 보고되었다[5, 24, 45]. 또한 OTUB1은 DUB의 정규적

#### \*Corresponding author

Tel : +82-53-258-7358, Fax : +82-53-258-7355

E-mail : kwontk@dsmc.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Table 1. Human deubiquitinase family members

Protease	Catalytic domain	References
Cysteine	USP	USP1/2/3/4/5/6/7/8/9X/9Y/10/11/12/13/14/15/16/17/18/19/20/21/22/24/25/26/27X/28/29/30/31/32/33/34/35/36/37/38/39/40/41/42/43/44/45/46/47/48/49/50/51/52/53, CYLD, USPL1 [25, 37]
	OTU	OTUB1/2, OTUD1/3/4/5/6A/6B, A20, Cezanne, Cezanne2, TRABID, VCPIP1, OTULIN, YOD1, [6, 36]
	UCH	BAP1, UCHL1/3/5 [22, 27]
	MJD	Ataxin-3, Ataxin-3-like, JosD1/2 [33]
	MINDY	MINDY1/2/3 [1]
Metalloproteases	JAMM	MYSM1, STAMBP, STAMBPL1, BRCC3, CSN5/6, PSMD7/14, EIF3F, MPND, PRPF8 [38]

USP: ubiquitin-specific protease; CYLD: cylindromatosis (turban tumor syndrome); USPL1: ubiquitin specific peptidase like 1; OTU: ovarian tumor; OTUB: OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding; OTUD: OTU deubiquitinase; TRABID: tumor-necrosis factor receptor-associated factor-binding protein domain; VCPIP1: valosin containing protein interacting protein 1; OTULIN: OTU deubiquitinase with linear linkage specificity; YOD1: ubiquitin thioesterase OTU1; UCH: ubiquitin C-terminal hydrolases; BAP1: BRCA1 associated protein-1; MJD: machado-joseph disease; JosD: josephin domain containing; MINDY: motif interacting with ubiquitin (MIU)-containing novel DUB family; JAMM: Jab1/Mov34/Mpr1 Pad1 N-terminal+ (MPN+); MYSM1: Myb-like, SWIRM and MPN domains 1; STAMBP: STAM binding protein; STAMBPL1: STAM binding protein like 1; BRCC3: BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3; CSN: COP9 signalosome 5; PSMD: proteasome 26S subunit, non-ATPase; EIF3F: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F; MPND: MPN domain containing; PRPF8: pre-mRNA processing factor 8.

(canonical) 활성뿐만 아니라 E2 conjugating 효소에 결합하여 단백질 기질로 ubiquitin의 이동을 막는 비정규적(non-canonical) 활성도 가지고 있다[32]. 본 보고에서는 OTUB1의 canonical, non-canonical 활성 조절에 따른 다양한 신호전달경로에서 OTUB1의 역할에 대해 기술하고자 한다.

OTUB1은 DUB특정 억제제인 유비퀴틴 알데히드(Ubal)를 이용하여 정제되었으며, OTU 도메인을 함유하고 있는 Ubal 결합 단백질로써 otubain이라는 이름으로 처음 동정 되었다 [6]. OTUB1 유전자는 염색체 11q13.1에 위치하고 있으며, 2개의 OTU 도메인과 E2가 결합할 수 있는 α-helix를 포함한 271개의 아미노산으로 구성된 시스테인 프로테아제(cysteine protease)이다[14]. OTUB1의 OTU domain에는 추정 촉매 3가 원소(putative catalytic triad)인 Asp88, Cys91, His265 잔기가 존재한다(Fig. 1) [31]. 생화학적 분석 결과, OTUB1은 촉매의존적인 canonical 활성을 통하여 특이적으로 Lys48 poly-

본 론

OTUB1의 활성 조절에 따른 기능 및 역할  
OTUB1의 정규적(canonical) 활성

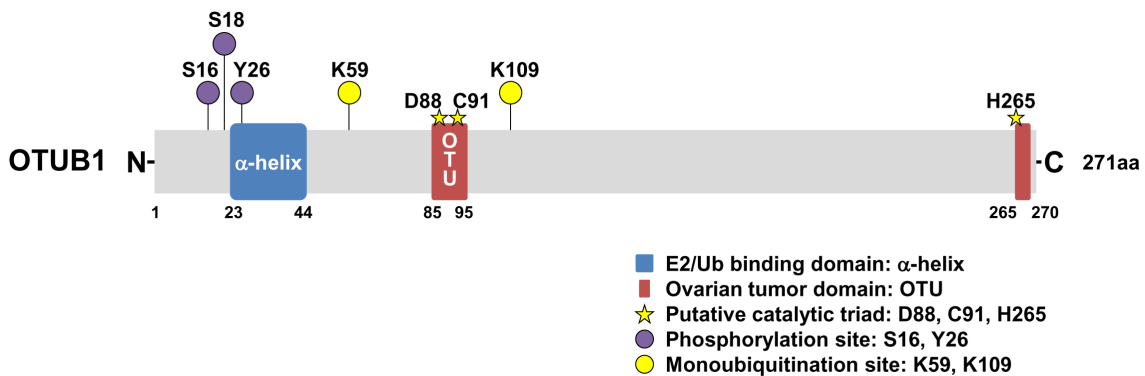


Fig. 1. The schematic domains of OTUB1. OTUB1 contains an E2/Ub binding α-helix and two OTU domains. The putative catalytic triad (D88, C91 and H265) is located in OTU domain and can regulate DUB activity of OTUB1. The N-terminal α-helix activates the non-canonical DUB activity by binding to the E2/Ub conjugating complex. Phosphorylation site (S16 and Y26) is located in N-terminus, and involved in OTUB1 translocation and non-canonical activity, respectively. K59 and K109 residue is important for binding to the E2 conjugating enzyme through OTUB1 mono-ubiquitination.

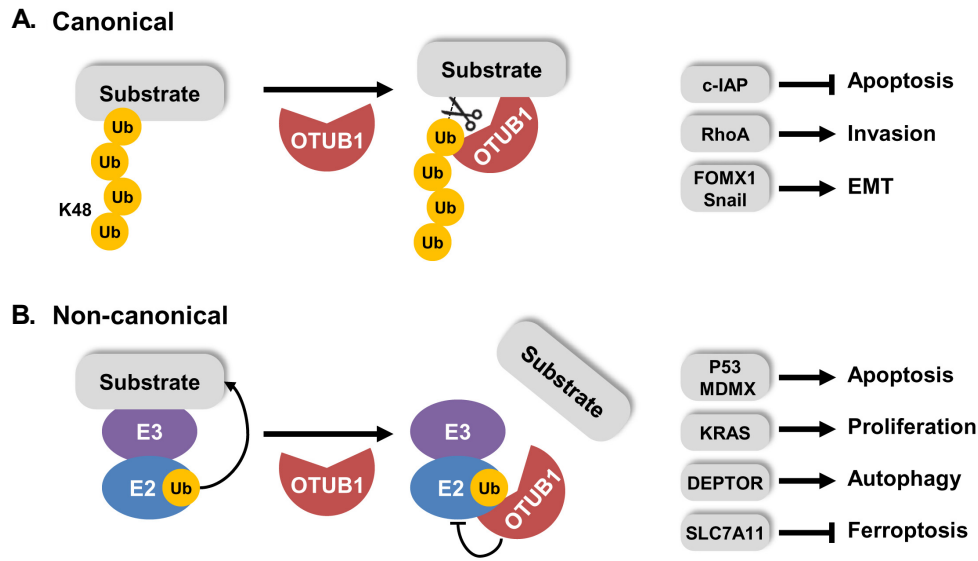


Fig. 2. Canonical and non-canonical activities of OTUB1. For canonical activity, OTUB1 directly interacts protein substrate and cleaves a K48-linked polyubiquitin chain through catalytic activity, resulting in target protein stabilization. For non-canonical activity, OTUB1 binds E2-Ub conjugating complex in N-terminal  $\alpha$ -helix and inhibits transfer of ubiquitin onto protein substrate by preventing E2 function, resulting in target protein stabilization.

ubiquitin chain을 절단하는 반면, Lys63 polyubiquitin chain은 절단하지 못한다(Fig. 2) [6].

이전 보고에 따르면, OTUB1은 c-IAP1의 Lys48 polyubiquitin chain을 분해하고 ubiquitination 억제를 통해 안정화시킨다. OTUB1의 발현 억제 시 cIAP1의 분해가 가속화되며, TWEAK나 IAP 길항제 매개 세포사멸을 증진시킨다[17]. 또한 암의 전이 및 증식을 통한 종양 형성에도 중요한 역할을 하는데, OTUB1은 RhoA 의존적으로 항암유전자인 p53의 인산화 억제 및 비활성화를 통하여 전립선암세포의 전이를 증진시킨다[21]. 유방암 발생에 영향을 미치는 estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ )의 경우 OTUB1이 직접적으로 결합하여 canonical DUB 활성을 통해 ER $\alpha$ 의 ubiquitination이 억제되며, OTUB1의 Cys91 잔기를 변형시켰을 경우 canonical DUB 활성 기능이 상실되어 다시 ER $\alpha$ 의 ubiquitination이 유도되고 결과적으로 ER $\alpha$ 의 전사를 억제한다[40]. 유방암 및 자궁암에서는 세포 주기 진행 및 epithelial-mesenchymal transition (EMT)를 촉진하는 전사인자인 FOXM1이 OTUB1에 의해 ubiquitination 되지 못하고 안정화 조절을 통하여 암의 증식 및 전이를 증진시킨다. 또한 암환자의 샘플을 통하여 OTUB1과 FOXM1 발현간의 상당한 상관관계를 확인하였고, 두 유전자의 발현이 높은 암환자의 경우 생존율이 낮다[24, 43]. 특히 유방암세포의 경우, OTUB1의 canonical 활성에 의한 FOXM1 발현 증가는 epirubicin에 의한 세포독성을 약화시킬 수 있다[24]. 따라서, OTUB1은 항암제에 대한 저항성 및 종양 형성 증진에 중요한 역할을 하기 때문에 항암치료에 있어 OTUB1-FOXM1 축이 중요한 타겟이 될 수 있다. 식도암에서는 OTUB1이 EMT의 중요 증진 인자인 Snail의 ubiquitination을 통한 프로테아좀 매개 단백질 분해

를 막음으로써 Snail 단백질 안정화를 증가시키고 암세포 전이를 촉진하며, OTUB1의 발현이 높은 식도암환자의 경우 좋지 않은 예후가 나타난다(Table 2) [49].

**OTUB1의 비정규적(non-canonical) 활성**

OTUB1은 아미노말단에 E2 conjugating 효소와 결합할 수 있는  $\alpha$ -helix가 존재하며, 이 domain이 E2와 결합하게 되면 촉매 비의존적인 non-canonical 활성화에 의해 ubiquitin이 타겟 단백질로 이동하지 못하게 한다(Fig. 2) [32]. 구조적으로 OTUB1과 E2는 3가지의 상호작용 방법을 통하여 OTUB1의 non-canonical 활성을 조절한다. 첫번째는 OTUB1 아미노말단의  $\alpha$ -helix에 직접적으로 결합한 E2와 OTUB1 카르복시말단간의 상호작용이며, 두번째는 E2를 통하여 OTUB1 아미노말단의  $\alpha$ -helix에 결합된 ubiquitin과 OTU domain간의 상호작용, 마지막으로 OTUB1 카르복시말단과 free ubiquitin간의 상호작용이다[23]. 특히, OTUB1 카르복시말단에 free ubiquitin의 결합은  $\alpha$ -helix에 E2-ubiquitin 복합체의 형성을 증가시키고 OTUB1의 알로스테릭(allosteric) 효과를 유도함으로써 E2의 기능을 억제한다. 반면 free ubiquitin이 없을 경우 OTUB1에 E2-ubiquitin 복합체는 결합할 수 없으며, OTUB1 아미노말단에  $\alpha$ -helix를 결핍 시키면 OTUB1의 non-canonical 활성 능력이 상실된다[44]. 따라서, OTUB1의 non-canonical 활성은 아미노말단의  $\alpha$ -helix에 E2-ubiquitin 복합체의 결합 유무가 중요하며 이에 따라 활성도가 결정된다.

OTUB1의 non-canonical 활성은 DNA 손상과정에서 OTUB1에 의한 염색질의 Lys63 ubiquitination 억제를 통하여 처음 발견되었다[32]. 이 때 OTUB1은 E2 conjugating 효소인 UBC13

Table 2. The target protein and function of OTUB1 according to activity in cancers

Activity	Target protein	E2 conjugating enzyme	Function	References
Canonical	c-IAP	-	Inhibited apoptosis	[17]
	RhoA	-	Increased invasion	[21]
	ER $\alpha$	-		[40]
	FOXM1	-	EMT	[24, 43]
	Snail	-	EMT	[49]
Non-canonical	Histone	UBC13		[32]
	SMAD2/3	UBCH5	Activated TGF signaling	[16, 19]
	p53	UBCH5	Increased apoptosis	[41]
	MDMX	UBCH5	Increased apoptosis	[8]
	KRAS	-	Increased proliferation	[5]
	DEPTOR	-	Increased autophagy, inhibited proliferation	[48]
	SLC7A11	-	Inhibited ferroptosis	[30]

c-IAP: cellular inhibitor of apoptosis protein; RhoA: ras homolog family member A; ER $\alpha$ : estrogen receptor alpha; FOXM1: forkhead box protein M1; MDMX: murine double minute X; KRAS: kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog; DEPTOR: DEP domain-containing mTOR-interacting protein; SLC7A11: solute carrier family 7 member 11; UBC13: ubiquitin-conjugating enzyme E2 13; UBCH5: ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1; EMT: epithelial - mesenchymal transition; TGF: transforming growth factor.

과 결합하여 E2의 기능을 막음으로써 DNA가 손상이 된 위치에서 염색질의 ubiquitination을 억제한다. 이 후 많은 연구를 통하여 OTUB1과 상호작용할 수 있는 E2 conjugating 효소가 밝혀졌으며, non-canonical 활성을 통한 여러 단백질의 ubiquitination 억제가 보고되었다. TGF $\beta$  신호 전달 경로를 통한 암세포 성장 촉진은 SMAD2/3의 인산화가 중요하며, E3 ligase인 NEDD4L은 TGF $\beta$ 에 의해 활성화된 SMAD2/3를 poly-ubiquitination시키고 프로테아좀을 통한 단백질 분해를 유도한다[16]. 이 때, OTUB1은 UBCH5와 결합하여 NEDD4L에 의한 SMAD2/3의 ubiquitination을 억제하고 안정화를 유지함으로써 TGF $\beta$  경로를 활성화시킨다[19]. 많은 암에서 돌연변이 형태로 존재하는 KRAS는 다양한 신호 전달 경로를 통하여 종양 세포 성장 및 생존에 관여하며, ubiquitination될 경우 KRAS의 활성억제를 통해 제 기능을 하지 못한다[46]. 이를 조절할 수 있는 여러 인자 중 OTUB1은 non-canonical 활성을 통해 KRAS의 mono-ubiquitination을 억제하고 KRAS의 기능을 활성화시킴으로써 폐암 세포의 성장을 증진시킨다[5]. 최근 OTUB1에 의한 non-apoptotic 세포사멸인 ferroptosis 조절에 대해 보고되었다. Ferroptosis는 철(iron) 매개의 지질 과산화에 의해 유도되는 새로운 유형의 세포사멸로, system X $_c^-$ 를 구성하는 SLC7A11의 발현 억제를 통해 야기된다[11]. OTUB1은 직접적으로 SLC7A11과 결합하여 ubiquitination 억제를 통한 단백질 안정화를 유지시키는데, 이는 E2 결합 도메인인 Asp88 잔기를 변형시켰을 경우 OTUB1에 의한 SLC7A11 단백질의 안정화가 일어나지 않기 때문에 OTUB1의 non-canonical 활성 의존적으로 SLC7A11의 발현이 조절됨을 알 수 있다[30]. 따라서, OTUB1에 의한 SLC7A11 안정화 조절은 ferroptosis를 억제하고 최종적으로 종양 형성에 기여한다.

많은 연구를 통하여 OTUB1의 canonical 및 non-canonical

활성이 종양 형성에 관여한다고 밝혀졌지만, 일부 연구에서는 OTUB1의 non-canonical 활성이 암세포사멸을 유도한다고 보고하였다. 종양유전자로 잘 알려진 p53은 OTUB1에 의해 단백질 안정화 및 p53 조절 전사인자를 통한 발현 증가로 암세포사멸을 유도한다. OTUB1의 아미노말단과 p53의 DNA 결합 domain이 부착되어 상호작용함으로써 non-canonical 경로를 활성을 통해 p53의 deubiquitination에 의한 단백질 안정화를 유도한다[41]. 이러한 현상은 Asp88 잔기 변형 및 OTUB1 발현 억제에 의해 약화되며, 결과적으로 DNA 손상에 따른 p53에 의해 조절되는 전사인자의 발현을 증가시키지 못하고 암세포사멸을 억제할 수 있다. 또한 OTUB1은 p53 조절자로 알려진 MDMX의 ubiquitination을 억제시키고 단백질 발현을 안정화시킨다. MDMX는 인산화 된 p53과 함께 미토콘드리아로 이동하여 세포사멸을 유도하는데, OTUB1은 MDMX의 안정화뿐만 아니라 미토콘드리아 내 MDMX와 인산화 된 p53의 축적을 유도하여 세포사멸을 일으킨다[8]. 뿐만 아니라 OTUB1은 자가포식(autophagy)에 중요한 mTOR 복합체의 구성요소 중 하나인 DEPTOR의 발현을 조절 할 수 있는데, OTUB1 아미노말단이 DEPTOR와 직접적으로 결합하여 non-canonical 경로를 통해 DEPTOR의 deubiquitination 및 안정화를 유도하고 mTOR complex 1 경로를 억제함에 따라 autophagy를 활성화한다. OTUB1 아미노말단이 결핍될 경우, DEPTOR와 결합하지 못하고 ubiquitination을 유도함에 따라 autophagy 억제를 통한 암세포의 증식을 초래한다(Table 2) [48]. 따라서, OTUB1은 종양 치료에 있어 새로운 진단 표적 전략이 될 수 있다.

### OTUB1의 발현 및 non-canonical 활성 조절 기전

#### OTUB1의 발현 조절

최근 보고에 따르면, CXCL12/CXCR7 경로 활성을 통하여

OTUB1 발현이 조절될 수 있다[18, 31]. 주로 내분비 관련 암의 발달과 진행에 중요한 CXCL12/CXCR7 신호전달 경로는 하부의 ERK 인산화에 따른 OTUB1 발현을 증가시키고, OTUB1에 의한 ER $\alpha$  deubiquitination을 통하여 전사단계의 ER $\alpha$  발현 증가를 유도하고, 결과적으로 유방암세포 및 환자에서 CXCR7/OTUB1/ER $\alpha$  경로를 통한 tamoxifen에 대한 저항성을 나타낸다[18]. 또한 대장암세포에서 에스트로젠 관련 수용체 알파(estrogen-related receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )가 OTUB1 프로모터에 결합하여 전사단계에서 OTUB1 발현을 증가시키며, OTUB1에 의해 EMT 중요 단백질인 vimentin 증가함으로써 대장암의 전이를 촉진한다[50].

OTUB1의 발현은 miR-542-3p의 타겟으로 전사 후 단계에서 조절될 수 있다. 종양 억제 microRNA로 알려진 miR-542-3p는 OTUB1 3'-UTR에 추정 서열이 존재하며 직접적으로 OTUB1 mRNA 및 단백질 발현을 억제한다. EMT 매개 암세포 전이 및 증식에 관여하는 OTUB1은 miR-542-3p mimics에 의해 발현이 억제될 경우, 대장암 세포의 전이를 억제하고 사멸을 유도한다[47]. 따라서, OTUB1을 타겟으로 한 miRNA의 발견은 임상적 유용성을 제공하며 전이성이 뛰어난 종양의 발달을 억제하는 치료요법이 될 수 있다. 현재까지 OTUB1의 발현 조절 기전에 대한 연구는 미흡하며 더 많은 연구가 필요한 실정이다.

#### OTUB1의 non-canonical 활성 조절

처음 OTUB1은 직접적으로 p53과 결합하여 non-canonical 활성을 통해 p53 deubiquitination을 촉진한다고 보고되었다[41]. 이후 연구를 통하여 UBCH5에 의해 우선적으로 OTUB1의 Lys59와 Lys109 잔기에서 mono-ubiquitination이 유도된다고 밝혀졌다[29]. Mono-ubiquitination된 OTUB1의 경우, UBCH5와 결합력이 뛰어나고 UBCH5의 Ub-conjugating 활성을 억제하여 타겟 단백질인 p53으로 ubiquitin의 이동을 막는다[29]. 결과적으로 non-canonical 활성 의존적으로 p53의 ubiquitination을 억제함으로써 단백질 안정성을 유지할 수 있다. 따라서, UBCH5 E2에 의해 mono-ubiquitination된 OTUB1은 non-canonical 활성화를 통하여 UBCH5의 기능을 막고 p53과 같은 타겟 단백질의 안정화를 조절할 수 있다.

#### OTUB1의 세포소기관 내 이동

OTUB1은 다양한 인산화 잔기를 가지고 있으며, 그 중에서 OTUB1의 아미노말단에 위치한 serine 16, 18 잔기는 세균에 의한 세포 내 감염성을 증진시킨다[12]. OTUB1 Ser16 잔기는 casein kinase 2 (CK2)에 의해 인산화될 수 있으며, 인산화된 OTUB1은 핵으로 이동하고 인산화되지 않은 OTUB1은 세포질에 위치한다[20]. 비록 인산화 여부에 따라 세포 내 OTUB1의 위치가 다르지만, Ser16 잔기의 인산화가 OTUB1의 활성화 조절에 영향을 주지 않는다. 하지만 CK2에 의해 인산화되어 핵 내로 이동한 OTUB1은 전리 방사선(ionizing radiation)에

다른 DNA 복구과정에 중요한 p53-binding protein 1 (53BP1) 복합체 형성을 유도한다[20].

#### OTUB1 억제제 개발의 필요성

대부분의 DUBs는 활성적인 cysteine 잔기를 가지고 있기 때문에 이를 타겟으로 한 촉매 활성을 막는 친전자성(electrophilic)의 억제제가 많다[9]. OTUB1의 경우, cysteine protease를 억제하는 화합물인 N-ethylmaleimide이 OTUB1의 촉매 활성을 억제함으로써 OTUB1의 tetra-Ub를 통한 단백질 가수분해를 막는다[6]. PR-619는 ubiquitin 활성 위치 probe에 OTUB1의 결합하지 못하게 하여 OTUB1의 DUB 활성을 막는 저분자 물질이다[2]. 하지만 OTUB1 이외에도 다양한 DUB가 PR-619에 의해 활성이 억제되어 제 기능을 할 수 없기 때문에, 이를 OTUB1 특이적인 억제제로 활용하기 위해서는 변형된 물질로 개발되어야 한다. 합성되어 개발된 활성 억제제뿐만 아니라 ubiquitin 돌연변이로 알려진 Ubv.B1.1은 OTUB1의 활성을 억제할 수 있다[2]. Ubv.B1.1은 OTUB1의 ubiquitin 결합 위치에 부착하여 타겟 단백질의 Lys48 ubiquitin chain의 절단을 막고, OTUB1과 E2의 결합도 방해한다[13]. 따라서, Ubv.B1.1은 OTUB1의 canonical 및 non-canonical 활성 모두를 억제할 수 있다.

일반적인 DUB와는 달리 OTUB1은 canonical과 non-canonical 활성이라는 특유의 2가지 타겟을 가지고 있다. 기존 알려진 다른 DUB 활성 억제제처럼 초고속 활성 분석 (high-throughput screening) 기법을 통해 ubiquitin chain을 절단하는 OTUB1의 canonical DUB 촉매 활성을 억제할 수 있는 억제제를 개발할 수 있다[4, 7]. 하지만 OTUB1의 non-canonical 활성을 억제할 수 있는 물질 개발의 경우, 근본적으로 OTUB1과 E2의 결합을 막아야 하며, 이를 위해서는 특정 단백질간 상호작용을 억제하는 기법이 필요하기 때문에, 현재로서 OTUB1의 non-canonical 활성을 막는 새로운 억제제 개발에 어려움이 있다[3, 39].

## 결론

탈유비퀴틴화효소 중 OTU 그룹에 속하는 otubain 1 (OTUB1)은 다른 탈유비퀴틴화효소와 달리 canonical과 non-canonical 경로를 통해 OTUB1의 활성화를 유도하고 타겟 단백질의 ubiquitination을 억제함으로써 안정화를 유지시킨다. Canonical 활성 경로의 경우 타겟 단백질에 부착된 ubiquitin chain을 직접적으로 절단하며, non-canonical 활성 경로의 경우 E2 conjugating 효소의 기능을 억제하고 타겟 단백질로 ubiquitin의 이동을 막는다(Fig. 2). OTUB1은 다양한 암에서 발현이 높으며 canonical 경로 활성화를 통해 종양의 진행 및 전이 증진효과 뿐만 아니라, 항암제에 대한 저항성을 가지기 때문에 환자의 생존율이 감소하는 등 나쁜 예후를 나타낸다. 이와 다르게 OTUB1의 non-canonical 활성 증가는 종

양역제유전자로 잘 알려진 p53의 ubiquitination 억제를 통하여 안정화를 유지함으로써 암세포사멸 유도를 통한 항암효과를 나타낸다. 뿐만 아니라, OTUB1에 의한 DEPTOR 발현 증가로 autophagy 활성을 통한 암세포 증식 억제 효과가 나타난다 (Table 2). 비록 암의 유형이나 병기에 따라 OTUB1의 역할이 다르고 non-canonical 활성과 같은 특이한 특징을 가지고 있어 임상적으로 적용할 수 있는 OTUB1 억제제의 개발이 어렵지만, OTUB1은 대부분의 종양에서 발현이 높기 때문에 종양 치료 및 예후 예측을 위한 새로운 진단 마커이자 치료 전략이 될 수 있다.

### 감사의 글

본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단(NRF-2017R1D1A1B03028366, NRF-2018R1D1A3B07049596, NRF-2019R1A2C2005921)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

1. Abdul Rehman, S. A., Kristariyanto, Y. A., Choi, S. Y., Nkosi, P. J., Weidlich, S., Labib, K., Hofmann, K. and Kulathu, Y. 2016. MINDY-1 is a member of an evolutionarily conserved and structurally distinct new family of deubiquitinating enzymes. *Mol. Cell* **63**, 146-155.
2. Altun, M., Kramer, H. B., Willems, L. I., McDermott, J. L., Leach, C. A., Goldenberg, S. J., Kumar, K. G., Konietzny, R., Fischer, R., Kogan, E., Mackeen, M. M., McGouran, J., Khoronenkova, S. V., Parsons, J. L., Dianov, G. L., Nicholson, B. and Kessler, B. M. 2011. Activity-based chemical proteomics accelerates inhibitor development for deubiquitylating enzymes. *Chem. Biol.* **18**, 1401-1412.
3. Arkin, M. R., Tang, Y. and Wells, J. A. 2014. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality. *Chem. Biol.* **21**, 1102-1114.
4. Arnst, J. L., Davies, C. W., Raja, S. M., Das, C. and Natarajan, A. 2013. High-throughput compatible fluorescence resonance energy transfer-based assay to identify small molecule inhibitors of amsh deubiquitinase activity. *Anal. Biochem.* **440**, 71-77.
5. Baietti, M. F., Simicek, M., Abbasi Asbagh, L., Radaelli, E., Lievens, S., Crowther, J., Steklov, M., Aushev, V. N., Martinez Garcia, D., Tavernier, J. and Sablina, A. A. 2016. OTUB1 triggers lung cancer development by inhibiting RAS mono-ubiquitination. *EMBO Mol. Med.* **8**, 288-303.
6. Balakirev, M. Y., Tcherniuk, S. O., Jaquinod, M. and Chroboczek, J. 2003. Otubains: A new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. *EMBO Rep.* **4**, 517-522.
7. Chen, J., Dexheimer, T. S., Ai, Y., Liang, Q., Villamil, M. A., Inglese, J., Maloney, D. J., Jadhav, A., Simeonov, A. and Zhuang, Z. 2011. Selective and cell-active inhibitors of the USP1/UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells. *Chem. Biol.* **18**, 1390-1400.
8. Chen, Y., Wang, Y. G., Li, Y., Sun, X. X. and Dai, M. S. 2017. Otub1 stabilizes MDMX and promotes its proapoptotic function at the mitochondria. *Oncotarget* **8**, 11053-11062.
9. D'Arcy, P., Wang, X. and Linder, S. 2015. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* **147**, 32-54.
10. Deshaies, R. J. and Joazeiro, C. A. 2009. RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399-434.
11. Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B. 3rd. and Stockwell, B. R. 2012. Ferroptosis: An iron-dependent form of non-apoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072.
12. Edelmann, M. J., Kramer, H. B., Altun, M. and Kessler, B. M. 2010. Post-translational modification of the deubiquitinating enzyme otubain 1 modulates active rhoa levels and susceptibility to yersinia invasion. *FEBS J.* **277**, 2515-2530.
13. Ernst, A., Avvakumov, G., Tong, J., Fan, Y., Zhao, Y., Alberts, P., Persaud, A., Walker, J. R., Neculai, A. M., Neculai, D., Vorobyov, A., Garg, P., Beatty, L., Chan, P. K., Juang, Y. C., Landry, M. C., Yeh, C., Zeqiraj, E., Karamboulas, K., Allali-Hassani, A., Vedadi, M., Tyers, M., Moffat, J., Sicheri, F., Pelletier, L., Durocher, D., Raught, B., Rotin, D., Yang, J., Moran, M. F., Dhe-Paganon, S. and Sidhu, S. S. 2013. A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system. *Science* **339**, 590-595.
14. Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjostedt, E., Lundberg, E., Szgyarto, C. A., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Lindskog, C., Danielsson, F., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Olsson, I., Navani, S., Huss, M., Nielsen, J., Ponten, F. and Uhlen, M. 2014. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 397-406.
15. Finley, D., Ciechanover, A. and Varshavsky, A. 2004. Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell* **116**, S29-32.
16. Gao, S., Alarcon, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P. Y., Goerner, N., Macias, M. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Massague, J. 2009. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Mol. Cell* **36**, 457-468.
17. Goncharov, T., Niessen, K., de Almagro, M. C., Izrael-Tomasevic, A., Fedorova, A. V., Varfolomeev, E., Arnott, D., Deshayes, K., Kirkpatrick, D. S. and Vucic, D. 2013. OTUB1 modulates c-IAP1 stability to regulate signalling pathways.

- EMBO J.* **32**, 1103-1114.
18. Hao, M., Weng, X., Wang, Y., Sun, X., Yan, T., Li, Y., Hou, L., Meng, X. and Wang, J. 2018. Targeting CXCR7 improves the efficacy of breast cancer patients with tamoxifen therapy. *Biochem. Pharmacol.* **147**, 128-140.
  19. Herhaus, L., Al-Salihi, M., Macartney, T., Weidlich, S. and Sapkota, G. P. 2013. OTUB1 enhances TGFbeta signalling by inhibiting the ubiquitylation and degradation of active SMAD2/3. *Nat. Commun.* **4**, 2519-2531.
  20. Herhaus, L., Perez-Oliva, A. B., Cozza, G., Gourlay, R., Weidlich, S., Campbell, D. G., Pinna, L. A. and Sapkota, G. P. 2015. Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates the deubiquitylase OTUB1 at ser16 to trigger its nuclear localization. *Sci. Signal.* **8**, ra35.
  21. Iglesias-Gato, D., Chuan, Y. C., Jiang, N., Svensson, C., Bao, J., Paul, I., Egevad, L., Kessler, B. M., Wikstrom, P., Niu, Y. and Flores-Morales, A. 2015. OTUB1 de-ubiquitinating enzyme promotes prostate cancer cell invasion *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*. *Mol. Cancer* **14**, 8-21.
  22. Jensen, D. E., Proctor, M., Marquis, S. T., Gardner, H. P., Ha, S. I., Chodosh, L. A., Ishov, A. M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D. C., Wilkinson, K. D., Maul, G. G., Barlev, N., Berger, S. L., Prendergast, G. C. and Rauscher, F. J. 3rd. 1998. BAP1: A novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* **16**, 1097-1112.
  23. Juang, Y. C., Landry, M. C., Sanches, M., Vittal, V., Leung, C. C., Ceccarelli, D. F., Mateo, A. R., Pruneda, J. N., Mao, D. Y., Szilard, R. K., Orlicky, S., Munro, M., Brzovic, P. S., Klevit, R. E., Sicheri, F. and Durocher, D. 2012. OTUB1 co-opts Lys48-linked ubiquitin recognition to suppress E2 enzyme function. *Mol. Cell* **45**, 384-397.
  24. Karunarathna, U., Kongsema, M., Zona, S., Gong, C., Cabrera, E., Gomes, A. R., Man, E. P., Khongkow, P., Tsang, J. W., Khoo, U. S., Medema, R. H., Freire, R. and Lam, E. W. 2016. OTUB1 inhibits the ubiquitination and degradation of FOXM1 in breast cancer and epirubicin resistance. *Oncogene* **35**, 1433-1444.
  25. Komander, D., Clague, M. J. and Urbe, S. 2009. Breaking the chains: Structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 550-563.
  26. Komander, D. and Rape, M. 2012. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 203-229.
  27. Koulich, E., Li, X. and DeMartino, G. N. 2008. Relative structural and functional roles of multiple deubiquitylating proteases associated with mammalian 26S proteasome. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1072-1082.
  28. Kulathu, Y. and Komander, D. 2012. Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 508-523.
  29. Li, Y., Sun, X. X., Elferich, J., Shinde, U., David, L. L. and Dai, M. S. 2014. Monoubiquitination is critical for ovarian tumor domain-containing ubiquitin aldehyde binding protein 1 (Otub1) to suppress UbcH5 enzyme and stabilize p53 protein. *J. Biol. Chem.* **289**, 5097-5108.
  30. Liu, T., Jiang, L., Tavana, O. and Gu, W. 2019. The deubiquitylase OTUB1 mediates ferroptosis via stabilization of SLC7A11. *Cancer Res.* **79**, 1913-1924.
  31. Makarova, K. S., Aravind, L. and Koonin, E. V. 2000. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and chlamydia pneumoniae. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 50-52.
  32. Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y. C., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., Gingras, A. C., Natsume, T., Suda, T. and Durocher, D. 2010. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* **466**, 941-946.
  33. Nicastrò, G., Menon, R. P., Masino, L., Knowles, P. P., McDonald, N. Q. and Pastore, A. 2005. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: Structural determinants for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 10493-10498.
  34. Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K. and Bernards, R. 2005. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-786.
  35. Pinto-Fernandez, A. and Kessler, B. M. 2016. Dubbing cancer: Deubiquitylating enzymes involved in epigenetics, DNA damage and the cell cycle as therapeutic targets. *Front. Genet.* **7**, 133-145.
  36. Quesada, V., Ordonez, G. R., Sanchez, L. M., Puente, X. S. and Lopez-Otin, C. 2009. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D239-243.
  37. Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H. and Wilkinson, K. D. 2009. Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 363-397.
  38. Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M. and Fukai, S. 2008. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* **455**, 358-362.
  39. Sheng, C., Dong, G., Miao, Z., Zhang, W. and Wang, W. 2015. State-of-the-art strategies for targeting protein-protein interactions by small-molecule inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 8238-8259.
  40. Stanisic, V., Malovannaya, A., Qin, J., Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. 2009. OTU domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) alpha and affects ERalpha transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 16135-16145.
  41. Sun, X. X., Challagundla, K. B. and Dai, M. S. 2012. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme otubain 1. *EMBO J.* **31**, 576-592.
  42. Swatek, K. N. and Komander, D. 2016. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**, 399-422.
  43. Wang, Y., Zhou, X., Xu, M., Weng, W., Zhang, Q., Yang, Y., Wei, P. and Du, X. 2016. OTUB1-catalyzed deubiquitination of FOXM1 facilitates tumor progression and predicts a poor prognosis in ovarian cancer. *Oncotarget* **7**, 36681-36697.

44. Wiener, R., Zhang, X., Wang, T. and Wolberger, C. 2012. The mechanism of OTUB1-mediated inhibition of ubiquitination. *Nature* **483**, 618-622.
45. Xu, L., Li, J., Bao, Z., Xu, P., Chang, H., Wu, J., Bei, Y., Xia, L., Wu, P., Yan, K., Lu, B. and Cui, G. 2017. Silencing of OTUB1 inhibits migration of human glioma cells *in vitro*. *Neuropathology* **37**, 217-226.
46. Xu, L., Lubkov, V., Taylor, L. J. and Bar-Sagi, D. 2010. Feed-back regulation of Ras signaling by Rabex-5-mediated ubiquitination. *Curr. Biol.* **20**, 1372-1377.
47. Yuan, L., Yuan, P., Yuan, H., Wang, Z., Run, Z., Chen, G., Zhao, P. and Xu, B. 2017. Mir-542-3p inhibits colorectal cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting OTUB1. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 159-172.
48. Zhao, L., Wang, X., Yu, Y., Deng, L., Chen, L., Peng, X., Jiao, C., Gao, G., Tan, X., Pan, W., Ge, X. and Wang, P. 2018. OTUB1 protein suppresses mTOR complex 1 (mTORC1) activity by deubiquitinating the mTORC1 inhibitor DEPTOR. *J. Biol. Chem.* **293**, 4883-4892.
49. Zhou, H., Liu, Y., Zhu, R., Ding, F., Cao, X., Lin, D. and Liu, Z. 2018. OTUB1 promotes esophageal squamous cell carcinoma metastasis through modulating Snail stability. *Oncogene* **37**, 3356-3368.
50. Zhou, Y., Jia, Q., Meng, X., Chen, D. and Zhu, B. 2019. ERRalpha regulates OTUB1 expression to promote colorectal cancer cell migration. *J. Cancer* **10**, 5812-5819.

## 초록 : 암 치료 표적으로서 OTUB1

김동은<sup>1</sup> · 우선민<sup>2</sup> · 권택규<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>계명대학교 의과대학 이비인후과교실, <sup>2</sup>계명대학교 의과대학 면역학교실)

유비퀴틴 시스템은 ubiquitin ligases와 deubiquitinases (DUBs)에 의해 타겟 기질의 ubiquitination 유무에 따라 안정화, 활성화, 국소화 및 상호작용을 변화시키고 암 발병의 관여하는 다양한 생물학적 과정을 조절한다. DUBs는 촉매 domain에 따라 6그룹으로 나뉘어지는데, 그 중에서 OTU 그룹 내 대부분의 DUB는 세포의 연속적 신호 반응(cell signaling cascade)을 조절할 수 있다. 특이하게도 OTU 그룹에 속하는 otubain 1 (OTUB1)은 정규적(canonical) 활성화와 비정규적(non-canonical) 활성을 모두 가지고 있다. 본 보고에서는 OTUB1의 canonical, non-canonical 활성화 조절에 있어서 다양한 신호전달경로 및 OTUB1의 역할에 대해 기술하였다. OTUB1은 이 두 종류의 활성화 경로를 통하여, OTUB1은 암 관련 신호 전달 체계에 중요한 FOXM1, ERα, KRAS 및 EMT를 조절하고 암세포 증식 및 전이 능력 향상 및 항암제에 대한 내성을 나타낸다. 또한 임상적으로 전이성 및 종양 분화도가 높은 암 조직에서 OTUB1의 발현이 높으며, 이에 따라 환자의 생존율이 감소하는 등 나쁜 예후를 나타낸다. 따라서, 임상적으로 적용할 수 있는 OTUB1 억제제의 개발이 이루어진다면 OTUB1은 종양 치료에 있어 중요한 진단 마커이자 치료적인 타겟이 될 수 있다.