

## A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer (Nature 441: 106-110)

강성균(한국해양연구원)

**새로운** 항암제를 개발하기 위해서는 암세포의 특이한 molecular target 연구가 선행조건이다. 일반적으로 암세포는 growth signal을 자체적으로 충분히 제공하든지, apoptosis에 의한 cell death로부터 자유로운 특징을 보이며, 관련 pathway에 연관된 유전자들이 훌륭한 molecular target이 될 수 있다. 본 연구에서는 RNA interference library를 이용하여 암세포의 생존과 관련한 유전자들을 negative screening 방식을 이용하여 선정하고, 이러한 유전자의 cell growth, proliferation과의 연관성을 고찰한 시도가 있어 주목된다.

cell proliferation과 survival에 관련한 조절유전자들을 screen하기 위해 연구팀은 2500개의 사람의 유전자를 대상으로 한 개의 유전자당 3-6개의 shRNA를 tetracyclin repressor를 이용한 inducible expression 방식으로 제작하고, 각각의 shRNA를 identification하기 위한 60 base로 이루어진 barcode를 tagging하였다. 이러한 shRNA의 retrovirus library를 암세포에 transduction 한 후 이를 반으로 나눠 한쪽은 control로, 다른 한쪽은 doxycycline을 이용 shRNA를 induction하여 cell survival이나 proliferation에 관련 된 유전자의 knock-down 암세포의 성장에 지장이 생긴 세포주는 결과적으로 population에서 차지하는 정도가 줄어들은 사실을 이용하였다. Induction후 적절한 시점에 control과 doxycycline을 첨가한 세포들을 PCR로

barcode sequence를 증폭하고 이를 이용하여 barcode oligonucleotide로 구성된 microarray를 이용하여 분석 두개의 population에 존재하는 각각의 shRNA의 존재량을 비교하여, proliferation에 영향을 주는 shRNA를 확인하였다.

특히 연구팀은 여러 개의 암세포 중 특정한 암세포에만 국한되는 성장조절유전자를 screen하고자 lymphoma cell line중 subcell line을 대상으로 shRNA를 이용한 실험을 진행하였다. 생존을 위해 NF- $\kappa$ B signal에 의존적인 activated B-cell like DLBCL (OCI-Ly3, OCI-Ly10) 과 의존적이지 않은 germinal centre B-cell like DLBCL (OCI-Ly7, OCI-Ly19) 을 비교한 결과 activated B-cell like DLBCL의 경우 NF- $\kappa$ B pathway를 knock-down하는 shRNA를 발현한 경우 전체 population에서 거의 제거가 된 것을 확인하였다. 해당 유전자로는 IKBKB, B cell, T cell에서 antigen receptor signalling에 의해 NF- $\kappa$ B pathway를 activation 하는 CARD11, CARD11과 협력하는 MALT1, BCL10과 같은 유전자가 screen 되었으며, 이러한 결과는 Q-PCR에 의해서도 확인되었다. 또한 확인된 shRNA는 개별적인 shRNA의 injection을 통해 target molecule의 GFP fusion을 이용한 fluorescence의 감소정도를 이용해 효과를 검증하였으며, 또한 NF- $\kappa$ B의 활성화시 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 proteasome에 의해 분해되는 사실을 이용하여 I $\kappa$ B $\alpha$ 와 luciferase의 fusion을 이용한 luciferase 활성으로 검증하였다. 한

편 CARD11을 target으로 하는 shRNA의 경우 IL-6와 같은 NF- $\kappa$ B의 하위 유전자의 발현조절을 microarray 실험을 통해 확인하였다. 저자들은 일련의 실험의 통해 CARD11이 lymphoid system에 제한성 등 여러 가지를 고려할 때 activated B-cell-like DLBCL 암세포를 치료하기 위한 molecular target 가능성을 강조하고 있다.

저자들이 일련의 실험을 통해 보여준 RNA interference를 이용한 negative screening은 tumor suppressor등을 확인하기 위한 positive screening과 함께 새로운 molecular target을 연구하기 위한 좋은 tool이 될 것으로 기대된다.

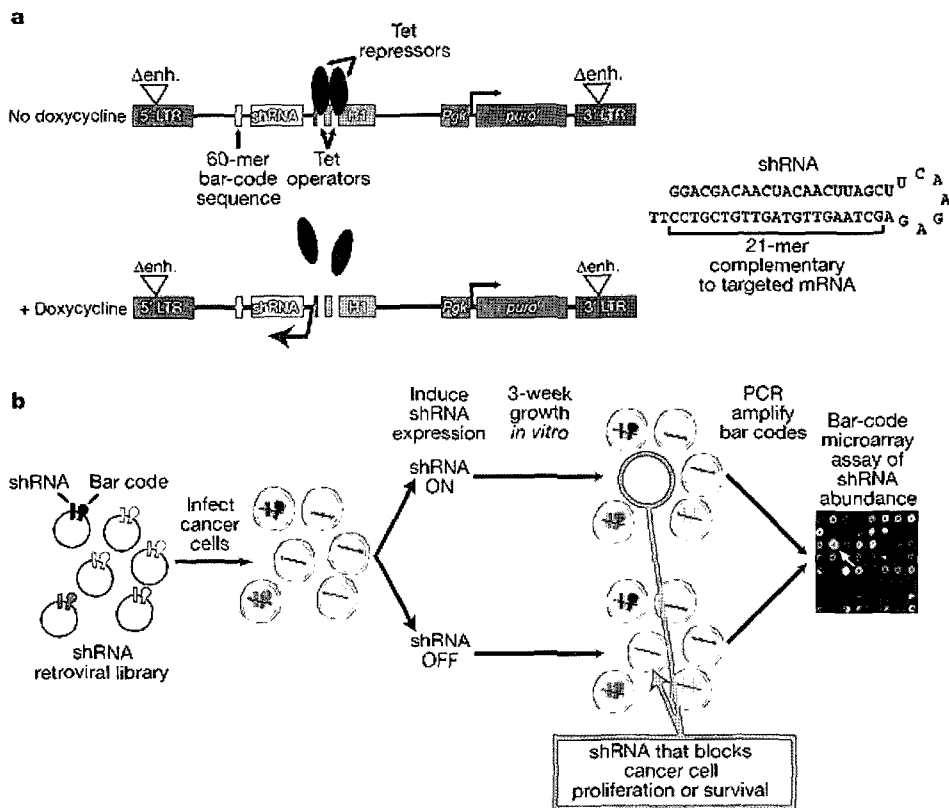


Figure 1. Inducible shRNA library screen for genes controlling cancer cell proliferation and survival. a, Structure of the inducible shRNA-expressing retroviral vector after integration into genomic DNA of infected cells. Two tetracycline repressor (TETR) binding sites (Tet operators) were inserted into the histone H1 promoter, which drives shRNA expression. In cell lines expressing the TETR, shRNA from this vector is only expressed upon addition of doxycycline, which dissociates the TETR from the H1 promoter. A random 60-bp molecular bar-code oligonucleotide was cloned adjacent to each shRNA, and the association of a particular bar-code sequence with a particular shRNA was determined by sequencing each vector in the library. Also shown is a diagram of the shRNA structure, consisting of a 21-base sequence complementary to a targeted mRNA and a 9-base loop. LTR, long terminal repeat; puro, puromycin resistance gene; Pgk, phosphoglycerate kinase promoter; enh., deletion of LTR promoter sequences. b, Achilles' heel loss-of-function genetic screen for genes required for cancer cell proliferation or survival. (See text for details.)